ADALBERTO ALVES MARTINS NETO

**Desvio da resposta imunológica deflagrada por morte celular
em melanoma experimental pelo imunoestimulador P-MAPA:
uma potencial estratégia antitumoral dependente da ativação
de receptores *TOLL-LIKE*?**

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

**São Paulo
2017**

ADALBERTO ALVES MARTINS NETO

**Desvio da resposta imunológica deflagrada por morte celular
em melanoma experimental pelo imunoestimulador P-MAPA:
uma potencial estratégia antitumoral dependente da ativação
de receptores *TOLL-LIKE*?**

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

**São Paulo
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Martins Neto, Adalberto Alves

Desvio da resposta imunológica deflagrada por morte celular em melanoma experimental pelo imunoestimulador P-MAPA : uma potencial estratégia antitumoral dependente da ativação de receptores TOLL-LIKE? / Adalberto Alves Martins Neto. -- São Paulo, 2017.

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

Programa de Oncologia.

Orientador: Roger Chammas.

Descritores: 1.Melanoma 2.Receptores Toll-Like/agonistas 3.Microambiente tumoral 4.Imunoterapia 5.Quimioterapia

USP/FM/DBD-434/17

A todos os seres de boa luz e as
circunstâncias harmônicas que nos
permitem aos ensaios da vida.

AGRADECIMENTOS

Do latim “Gratus”, e é assim que vou escrevendo a minha história com sentimento, alegrias, lágrimas, encontros, e desencontros. Quanto tempo empenhado aqui. Sim! Deveria ser mais, sempre poderá ser mais em qualquer atividade, mas não me faltou tempo e nem coragem para realizar este trabalho com amor, dedicação, lealdade, firmeza, dignidade, e profissionalismo.

Desembarquei em São Paulo como um novo morador no dia 04 de Fevereiro de 2013, com um tremendo frio na barriga porque como falavam estava eu “sem parentes nem aderentes”, mas o desejo de crescer sempre foi maior e assim segui. Não teria espaço aqui para descrever a minha relação com esse Estado, mas fica a minha gratidão por refletir em mim a sua grandeza, me alertar que sempre há paz em meio ao caos, e ter posto no meu caminho PESSOAS e suas QUALIDADES.

Interagi com pessoas de diversos brilhos, e para aquelas de brilho mediano amplio meu reconhecimento, pois até na aridez e desencanto a vida merece respeito, mas vou me silenciar para esses desencontros porque meus sonhos e meu ânimo não acabaram. Para os seres de luz, eu seguirei com vocês até onde a vida permitir e não por obrigação, mas por comunhão os retribuo com palavras do coração.

Aos meus pilares do dia a dia em São Paulo, Sofia Krause e Rômulo Carneiro, quantas histórias, não é meninos?! Bilhetes como: “Vai dar certo o seu projeto”; “Calma rapaz, você vai conseguir”, “Parabéns pelo reconhecimento”,... Ah, como é bom sentir vocês tão perpétuos.

Aos profissionais do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), em especial à família CTO (Centro de Investigação Translacional em Oncologia). Quanto empenho das meninas da limpeza e dos seguranças, tão gentis quando passamos. Não posso esquecer-me dos colaboradores e ex-colaboradores da Patologia, Maiara Vicente, Regiane, Rosângela e aos demais, pela atenção, cuidado com os meus materiais histológicos e empenho corrente. Valdeci Amaro pelas saudações, pelos papos curtos e sua alegria constante quando nos encontramos. Fayola e Renan por garantirem vidrarias sempre limpas e esterilizadas. Maria José (Biobanco) permitindo minha iniciação aos cortes histológicos congelados e como manipular corretamente o

nitrogênio líquido. Luiz (almoxarifado), sempre pronto ao acesso aos materiais de uso. E claro, aos demais que facilitaram meus trabalhos.

À equipe do laboratório de Biologia Celular (LIM/59-HC/FMUSP) pelo acesso, aprendizado, e retorno às minhas origens em Histologia. Afinal, eu me desmantelo quando vejo uma fotomicrografia tecidual. E não nego, sou biólogo desde o dia em que vi um epitélio ciliado, quanta perfeição.

À equipe do laboratório de Biologia Celular (UFPR) pela interação, troca de conhecimento, e pela confiança em meu trabalho.

Aos membros do biotério central da FMUSP, Vânia Cardoso, Adilamar, Anderson Militão, Gabriel, pelo fornecimento dos animais utilizados neste trabalho. Bianca Helena, como foi e é prazeroso ajudá-la nas discussões com Zebrafish, quero ver esse núcleo na Rede PREMIUM crescer e ser referência.

Aos meus bioteristas prediletos, André e Maria Aparecida. Sinônimo de dedicação e respeito, vocês são DEZ e a ética em experimentação animal agradece.

À Farmabrilis pela parceria na aquisição do composto P-MAPA, bem como aos Professores Dr. Wagner Fávaro e Dr. Nelson Duran pela aquisição do composto MRB-CFI-1. Bem, a literatura do P-MAPA e de seus similares será constante em minha vida, pois é isso, sou parte dessa história.

Aos amigos da Pós-graduação. Impossível digitar todos os nomes, porque a importância de vocês é maior. Heróis, cientistas, sonhadores... eu não duvido que somos brilhantes, quanta honra.

À minha amiga colombiana Margarita Cortes Martinez. Não tem como explicar o gostar entre pessoas, não é minha amiga?! Aprendi TANTO com essa médica patologista; discutimos TANTO na oportunidade sobre conceitos de morte celular, que você dizia: “Adalberto! Você me deixa de cabelo em pé”. Como foi bom, doutora, você é um SUCESSO!

A partir daqui, meu coração vai acelerando... É o ápice desse momento!

Ao laboratório de Oncologia Experimental (FMUSP/ICESP). Nossa, é preciso respirar fundo e entender que convivemos por anos. Eu sou grato por todas as vezes que entrei nesse laboratório, e tenho todos no lado esquerdo do

peito. Homens e mulheres de inteligência complexa, vocês me fortaleceram e me tornaram um ser cada vez mais digno. Aqui, vou elevar alguns de vocês.

Aos AMIGOS de laboratório (Alexandre Sarmento- vulgo “homi, seu menino!; Sílvia Guedes e Mari Ikoma- meninas das vesículas; Jânio Mororo- vulgo “meu querido”; Camila Moraes Melo e Luciana Kovacs- minhas irmãs profissionais; Renata Ottes- delicadeza em pessoa; Lizeth Córdoba- outra Colombiana gente boa, não é “Cordobita”?!; Karina Mie- quanta seriedade e doçura; Cristina Rangel- muito carinhosa e inteligente; Ana Roberta- uma mulher sonhadora, que me faz bem e é um ombro amigo) por serem fraternos, companheiros, inspirações, equilíbrio, força, coragem,...vocês são lindos! Ah, e cadê elas? É claro que são AMIGOS também, mas prefiro me dedicar à parte.

À Clévia dos Santos Passos por iluminar qualquer ambiente com sua presença. Que mulher arretada! Você me orgulha, e sou grato por sua chegada.

À Carolina Rosal pela força, preocupação com meu bem-estar, amizade, sorrisos, perseverança, pela eterna amizade. Você tem um significado muito particular, e sabe da minha luta.

À Mayara D’Auria Jacomassi. A minha eterna queridinha, que movimenta qualquer partícula em seu redor. Uma linda pessoa, de qualidades superiores, de uma inteligência incomparável, e que ficará para sempre em minha vida. Obrigado minha irmãzinha por todos os momentos que passamos, e saiba que somos amigos para sempre, na primavera ou em qualquer das estações, nas horas tristes e nos momentos de prazer, amigos para sempre.

À minha FAMÍLIA por ser toda a BONDADE que há, e tudo para mim. Passamos por tantas dificuldades que se não fosse assim, não seríamos uma FORTALEZA. Aqui estou sem palavras, mas peço a DEUS que nos proteja todos os dias.

Chegando ao fim, aí sim é motivo de orgulho. O conheci por volta das 23h do dia 29 de Julho de 2006, durante a SBBC-SIMEC Búzios/RJ. Naquele dia tive a sorte de interagir com o Prof. Dr. Roger Chammas. De lá até aqui, lutei muito para ser seu orientando. Alguns estados eu precisei percorrer para ter a oportunidade de que o senhor me visse, mas sempre foi muito gratificante te ouvir palestrando. Quanta inteligência num único homem. Eu te agradeço

imensamente por cada palavra direcionada a mim; dos momentos em sua sala, sempre revigorantes; da dureza quando preciso; pelos ensinamentos e alerta para o futuro. Mestre! É impossível adjetivar tamanho respeito para contigo. Seja firme na luta, e quero vê-lo sempre rodeado de muitos alunos, pesquisadores, livros, artigos científicos, fórmulas no quadro, ideias, bons resultados, enfim... tudo aquilo que te faça feliz. Você continua sendo a minha inspiração profissional, e meu muito obrigado Doutor Chammas.

Ao bom coordenador da VIDA, aquele que não costuma “faiá”. Não importa como você o imagina, mas aqui o concebo como DEUS.

À agência de fomento CAPES pela promoção financeira deste trabalho.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por abrigar a realização deste trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Oncologia, em nome das secretárias, coordenadores, professores, e técnicos. Vocês fazem parte da minha identidade profissional.

Ao leitor desse trabalho, grato pelo seu tempo.

Aos membros desta banca
de defesa, pela experiência
e expertise.

“[Desiderata]...Exercise caution in your
business affairs, for the world is full of trickery.
But let this not blind you to what virtue there
is; Many persons strive for high ideals, and
everywhere life is full of heroism.”

Max Ehrmann

RESUMO

Martins Neto AA. **Desvio da resposta imunológica deflagrada por morte celular em melanoma experimental pelo imunoestimulador P-MAPA: uma potencial estratégia antitumoral dependente da ativação de receptores TOLL-LIKE?** [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

O melanoma é o mais agressivo tumor da pele, cuja resistência aos tratamentos quimioterápicos tem promovido a crescente utilização de imunoquimioterapia, como é o caso da utilização de agonistas dos receptores *Toll-Like* (TLRs). Nesse contexto, os compostos abreviados por P-MAPA e seu sintético estrutural MRB-CFI-1 com reconhecidas propriedades antitumorais e imunológicas, são fortes candidatos na terapia e prevenção desse tipo de câncer. Esse estudo visa determinar o potencial anticâncer do P-MAPA e de MRB-CFI-1 contra o melanoma murino em consequência ao padrão de resposta microambiental semelhante ao de morte imunogênica, em regimes de tratamento terapêutico ou vacinal, na vigência de quimioterapia com cisplatina e/ou em associação com antígenos de células tumorais totais. Após avaliação *In vivo* do crescimento de tumores B16F10 implantados em modelos murinos selvagem e nocaute para o gene *Myd88*, na vigência ou não do tratamento com cisplatina e/ou P-MAPA, nossos resultados mostraram que o P-MAPA apresentou atividade pró-tumoral e antagonizou a ação da cisplatina em inibir o crescimento dos tumores, de forma dependente de *Myd88*. Além disso, através de análises qualitativa e quantitativa pelo *software ImageJ* em fotomicrografias de secções tumorais coradas histologicamente, observamos que o P-MAPA promoveu mudanças microambientais nos tumores que podem impactar negativamente em seu desempenho. Como monoterapia em esquema de vacinação com lisado tumoral total em combinação com quimioterapia, o P-MAPA em dose baixa falhou em suprimir o crescimento de tumores B16F10, mas o seu sintético MRB-CFI-1 foi capaz de prevenir o crescimento desse tipo de melanoma num regime de vacinação profilática. Apesar do sucesso terapêutico desse imunomodulador em diversos modelos de câncer e de doenças infecciosas, o P-MAPA não foi eficaz em produzir respostas microambientais contra o melanoma murino, dados esses que limitam a aplicabilidade clínica do composto. De outro modo, o composto fosfato inorgânico MRB-CFI-1 foi protetivo em retardar o aparecimento desse tipo de doença. Assim, o presente estudo foi importante por ampliar o entendimento funcional do P-MAPA numa abordagem imunoquimioterápica em modelos biológicos de tumores de melanoma, e representa uma importante mudança na utilização de constituintes individuais similares ao P-MAPA que sejam mais eficazes, de fácil obtenção, e de produção controlada e garantida.

Descritores: melanoma; receptores Toll-Like/agonistas; microambiente tumoral; imunoterapia; quimioterapia

ABSTRACT

Martins Neto AA. **Deviation of the immune response triggered by cell death in experimental melanoma by immunostimulator P-MAPA: a potential antitumor strategy dependent on the activation of Toll-Like receptors?** [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2017.

Melanoma is the most aggressive skin cancer, whose resistance to chemotherapeutic treatments has promoted the increasing use of immunochemotherapy, as is the case for the use of Toll-Like receptor agonists (TLRs). In this context, the compounds abbreviated by P-MAPA and its structural synthetic MRB-CFI-1 with recognized antitumor and immunological properties are strong candidates in the therapy and prevention of this type of cancer. This study aims to determine the anti-cancer potential of P-MAPA and MRB-CFI-1 against murine melanoma as a consequence of the microenvironmental response pattern similar to that of immunogenic death in therapeutic or vaccine treatment regimens when using chemotherapy with cisplatin alone or in combination with whole tumor cell antigens. After *In vivo* evaluation of the growth of B16F10 tumors implanted in wild-type and Myd88 gene knockout mice, under treatment or not with cisplatin and / or P-MAPA, our results showed that P-MAPA showed pro-tumor activity and antagonized the action of cisplatin in inhibiting the growth of tumors in a Myd88-dependent manner. In addition, using qualitative and quantitative analysis by ImageJ software in histological images of tumor sections, we observed that P-MAPA promoted microenvironmental changes in tumors that may negatively impact its performance. As monotherapy in vaccination schedule with total tumor lysate in combination with chemotherapy, low dose P-MAPA failed to suppress the growth of B16F10 tumors, but its synthetic MRB-CFI-1 was able to prevent the growth of this type of melanoma in prophylactic vaccination regimen. Despite the therapeutic success of this immunomodulator in various cancer models and infectious diseases, P-MAPA has not been effective in producing microenvironmental responses against murine melanoma, data that limit the clinical applicability of the compound. Otherwise, the inorganic phosphate compound MRB-CFI-1 was protective in delaying the onset of this type of disease. Thus, the present study was important because it broadened the functional understanding of P-MAPA in an immuno-chemotherapeutic approach in biological models of melanoma tumors and represents an important change in the use of individual constituents similar to P-MAPA that are more efficient, easily obtainable, and controlled and guaranteed production.

Descriptors: melanoma, toll-like receptors/agonists; tumor microenvironment; immunotherapy; chemotherapy

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação brasileira de normas técnicas
ANOVA	Análise de variância
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
bp	Pares de base
BSA	Albumina do soro bovino
CD	Grupo de diferenciação
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CIBio	Comissão interna de biossegurança
CMN	Centro de medicina nuclear
Cis-DDP ou CIS	<i>cis</i> -diaminodicloplatina(II) ou Cisplatina
COBEA	Colégio Brasileiro de experimentação animal
COL-1	Colágeno tipo 1
COX-2	Cicloxigenase-2
CO ₂	Gás dióxido de carbono
CpG	Citosina-fosfato-Guanina
DAB	3,3'-diaminobenzidina
DAMPs	Padrões moleculares associados ao perigo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FL2	Canal 2 de intensidade de fluorescência
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSC	Dispersão frontal da luz
H&E ou HE	Hematoxilina e Eosina
HED	Dose Equivalente Humana
HEPES	<i>N</i> -(2-hidroxietil)piperazina- <i>N'</i> -(2-ácido etanosulfônico)
HIF-1	Fator induzido por hipóxia-1
HMGB1	Proteína do grupo de alta mobilidade-1
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IFN	Interferon

Ig	Imunoglobulina
IKK	Quinase IκB
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
IRF	Fator de resposta a interferons
i.t	intratumoral
KO	Nocaute
LRRs	Repetições ricas em leucina
MAMPs	Padrões moleculares associados a micróbios
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MNU	N-metil-N-nitrosouréia
MRB-CFI-1	Modificador de Resposta Biológica- Composto
	Fosfato Inorgânico-1
MyD88	Proteína 88 de resposta primária de diferenciação mieloide
NaCl	Cloreto de Sódio
NFκB	Fator nuclear kappa B
NK	Célula matadora natural
NO	Óxido nítrico
N7	Átomo de nitrogênio na posição 7
PADI	Processamento e Análise Digital de Imagens
P.A.S	Ácido periódico de Schiff
PECAM-1	Molécula-1 de adesão celular endotelial plaquetária
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
P.I.	Iodeto de propídio
P-MAPA	Agregado polimérico de fosfolinoleato- palmitoleato de magnésio e amônio proteico
PNM	Palpável e não mensurável
RENCA	Carcinoma renal murino
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute

s.c.	Subcutâneo
SFB	Soro fetal bovino
SPF	Livre de patógenos específicos
SSC	Dispersão lateral da luz
α -SMA	Alfa-actina de músculo liso
T.A	Temperatura ambiente
TBK	Quinase ligante de TANK
TBS	Tampão Salina Tris
TGF- β	Fator de crescimento transformante- β
Th	Célula T auxiliar
TIR	Receptor Toll-IL-1
TLRs	Receptores do tipo <i>Toll</i>
Treg	Célula T regulatória
TRIF	Proteína adaptadora contendo domínio TIR induzindo interferon- β
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
U.V	Ultra Violeta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WT	Selvagem

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
g	Gramas
°C	Celsius, grau
mM	Milimolar
μl	Microlitro
ml	Mililitros
mg	Miligramas
m ²	Metros quadrados
min	Minutos
μm	Micrômetros
s	Segundos
μg	Micrograma
h	Hora
mm ²	Milímetro quadrado
μm ²	Micrômetro quadrado
cm ³	Centímetro cúbico
nm	Nanômetro
Kg	Kilograma
+	Mais ou positivo
<	Menor que
±	mais ou menos
=	Igual a
mm ³	Milímetro cúbico
KDa	Kilodalton
M	Massa Molar
mm	Milímetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustrações esquemáticas das características morfológicas de neoplasias melanocíticas, bem como da representação clonal em cada tipo de lesão -----	25
Figura 2	Estrutura dos receptores do tipo <i>Toll</i> (TLRs) e sinalização -----	30
Figura 3	Hipótese de trabalho -----	34
Figura 4	Morfologia da linhagem celular de melanoma murino B16F10 -----	39
Figura 5	Detecção da contaminação por micoplasma através da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir do meio de cultura das linhagens celulares B16F10 (passagem seriada de número #79) destinadas à inoculação nos animais e congeladas -----	40
Figura 6	Esquema do modelo experimental de implantação <i>In vivo</i> de células tumorais B16F10, e regimes de tratamento dos animais -----	42
Figura 7	Tumor subcutâneo B16F10 -----	48
Figura 8	Processamento e Análise Digital de Imagens (PADI) -----	49
Figura 9	Quantificação da marcação imunoistoquímica para α -SMA -----	50
Figura 10	Quantificação da marcação imunoistoquímica para CD31 -----	51
Figura 11	Quantificação da marcação histoquímica de fibras reticulares -----	52
Figura 12	Avaliação da viabilidade e do ciclo celular de células B16F10 tratadas com P-MAPA e marcadas com Iodeto de Propídio (P.I. – 2,5mg/ml), através de citometria de fluxo ---	55
Figura 13	Análise do crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 selvagem (WT), durante tratamentos intraperitoneal (i.p) com cisplatina (CIS) [2mg/Kg] e/ou com P-MAPA [5mg/Kg] -----	58

Figura 14	Análise do crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 selvagem (WT), durante tratamentos intraperitoneal (i.p) com cisplatina (CIS) [2mg/Kg] e/ou subcutâneo (s.c.) / intratumoral com P-MAPA [5mg/Kg] -----	59
Figura 15	Análise quantitativa de cortes histológicos corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E) de tumores murino B16F10, em diferentes grupos de tratamento -----	61
Figura 16	Análise quantitativa de cortes histológicos corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E) de tumores murino B16F10, em diferentes grupos de tratamento -----	62
Figura 17	Análise quantitativa de cortes histológicos corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E) de tumores murino B16F10, em diferentes grupos de tratamento -----	63
Figura 18	Fração de área positiva para CD31 avaliada por imunoistoquímica em cortes histológicos de tumores murino B16F10, em camundongos C57BL/6 de tipo selvagem -----	64
Figura 19	Quantificação do número de células (núcleos) com ImageJ, em secções H&E de tumores B16F10 de camundongos C57BL/6 selvagem -----	65
Figura 20	Impregnação por prata de fibras reticulares em cortes histológicos de melanoma murino B16F10 em camundongos C57/BL6 selvagem -----	67
Figura 21	Fração de área positiva para α -SMA avaliada por imunoistoquímica em cortes histológicos de tumores murino B16F10, em camundongos C57/BL6 de tipo selvagem -----	68
Figura 22	Análise imunoistoquímica de pan-caderinas em cortes histológicos de tumores murino B16F10 -----	69
Figura 23	Análise imunoistoquímica de pan-caderinas em cortes histológicos de tumores murino B16F10 -----	70
Figura 24	Análise do crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 nocaute para o gene <i>Myd88</i> (<i>Myd88-KO</i>), durante tratamentos intraperitoneal (i.p) com cisplatina (Cis) [2,0mg/Kg] ou subcutâneo (s.c.) com CIS+P-MAPA [5,0mg/Kg] -----	71

Figura 25	Quantificação do número de células (núcleos) com ImageJ, em secções H&E de tumores B16F10 de camundongos C57BL/6 Myd88-KO -----	72
Figura 26	Efeito do P-MAPA na viabilidade celular e distribuição do ciclo celular em células de melanoma B16F10 -----	73
Figura 27	Morfologia da linhagem celular de melanoma murino B16F10 frente ao tratamento com P-MAPA -----	74
Figura 28	Análise do crescimento tumoral de melanomas B16F10 em camundongos C57BL/6 de tipo selvagem, durante vacinação terapêutica com lisado total de células tumorais B16F10 (equivalente à 2×10^5 células lisadas/animal) e/ou P-MAPA (0,5mg/Kg) sozinho ou em combinação com quimioterapia à base de cisplatina (2mg/Kg) -----	76
Figura 29	Análise do crescimento tumoral de melanomas B16F10 em camundongos C57BL/6 de tipo selvagem, após vacinação profilática com lisado total de células tumorais B16F10 (equivalente à 2×10^5 células lisadas/animal) sozinho ou em combinação com a droga MRB-CFI-1 -----	78
Figura 30	Resumo de resultados -----	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Peso médio em gramas (g) de tumores B16F10 em diferentes grupos de tratamento -----	59
Tabela 2	Peso médio em gramas (g) de tumores B16F10 em diferentes grupos de tratamento -----	76
Tabela 3	Peso médio em gramas (g) de tumores B16F10 em diferentes grupos de tratamento -----	77

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	Carta de aprovação emitida pela Comissão de Ética no Uso de Animais-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo -----	95
ANEXO B	Carta de aprovação emitida pela Comissão de Ética no Uso de Animais-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo -----	96
ANEXO C	Carta de aprovação emitida pela Comissão Interna de Biossegurança do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo -----	97
ANEXO D	Análise histoquímica pela coloração de Tricrômio de Masson para avaliar fibras colágenas, em cortes de tumores murino B16F10 de diferentes grupos de tratamento -----	98
ANEXO E	Análise histoquímica pela coloração de ácido periódico-Schiff e Alcian Blue para avaliar conteúdo glicoproteico, em cortes histológicos de tumores murino B16F10 de diferentes grupos de tratamento -----	99
ANEXO F	Marcação imunoistoquímica para colágeno do tipo 1 (COL-1) em corte histológico de tumor murino B16F10 tratado com P-MAPA -----	100

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ANEXOS

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 MELANOMA	24
1.2 CISPLATINA	26
1.3 VACINAS ANTICÂNCER	28
1.4 RECEPTORES DO TIPO <i>TOLL</i>	29
1.5 AGONISTAS DE RECEPTORES TLRs	31
1.5.1 P-MAPA	31
1.5.2 MRB-CFI-1	32
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	36
3.1 OBJETIVO GERAL	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 MODELO ANIMAL	38
4.2 LINHAGEM CELULAR	39
4.3 MODELO MURINO DE MELANOMA SUBCUTÂNEO E TRATAMENTO DOS ANIMAIS	41
4.4 PREPARAÇÕES DE LISADO TOTAL DE CÉLULAS TUMORAIS	44
4.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	44
4.5.1 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	44
4.5.2 COLORAÇÕES	44
4.5.3 IMUNOISTOQUÍMICA	46
4.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA	47

4.6.1 QUANTIFICAÇÃO DAS ÁREAS TUMORAIS PRESERVADAS E DAS ÁREAS DE MORTE CELULAR -----	47
4.6.2 DENSIDADE CELULAR -----	49
4.6.3 QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO DAB -----	50
4.6.4 QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO RETICULINA -----	52
4.7 TRATAMENTO <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS B16F10 E ANÁLISE DA VIABILIDADE E DO CICLO CELULAR, POR MARCAÇÃO COM IODETO DE PROPÍDIO (P.I.) -----	53
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA -----	53
 5. RESULTADOS -----	 57
5.1 O CANDIDATO A DROGA IMUNOTERÁPICA (P-MAPA) NÃO FOI EFICAZ EM INIBIR O CRESCIMENTO DE TUMORES B16F10 EM CAMUNDONGOS SELVAGENS -----	57
5.2 O IMUNOMODULADOR P-MAPA PROMOVEU MUDANÇAS MICROAMBIENTAIS EM TUMORES B16F10 NOS CAMUNDONGOS SELVAGENS -----	60
5.3 O IMUNOMODULADOR P-MAPA ATUOU EM TUMORES B16F10 PELA VIA <i>TOLL-LIKE</i> , NA DEPENDÊNCIA DA PROTEÍNA ADAPTADORA Myd88 -----	71
5.4 O P-MAPA PARECE NÃO ALTERAR AS FASES DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS B16F10 DE MELANOMA MURINO -----	73
5.5 APLICAÇÕES DE AGONISTAS PARA TLRs EM MODELOS VACINAIS PARA MELANOMA MURINO B16F10 -----	75
5.5.1 O P-MAPA falha em suprimir o crescimento de tumores B16F10, em esquema terapêutico de vacinação -----	75
5.5.2 O efeito protetivo do modificador de resposta biológica (MRB-CFI-1) contra o crescimento <i>In vivo</i> de tumores B16F10, em esquema profilático de vacinação -----	77
 6. DISCUSSÃO -----	 81
 7. CONCLUSÕES -----	 88
 REFERÊNCIAS -----	 89
 ANEXOS -----	 95

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 MELANOMA

O melanoma, termo originalmente empregado em 1838 por Robert Carswell, é um tipo agressivo de malignidade que tem origem no melanócito, a célula responsável pela pigmentação básica da pele.^{1,2}

A figura 1 (página 25) apresenta ilustrações esquemáticas de neoplasias melanocíticas que variam do nevo benigno ao melanoma metastático. Apesar da disposição sequencial dessas lesões lembrarem um modelo em passos para a iniciação e progressão do melanoma, na realidade tem sido proposto que trajetórias diferentes de progressão podem ocorrer dependendo do tipo de melanoma, portanto, não sendo representadas nessa imagem.^{3,4}

De fato, é possível que em peles normais expostas intermitentemente ao sol, a transformação da pele normal em direção ao melanoma metastático possa ter como lesão precursora o nevo benigno, passando pelo nevo displásico, melanoma in situ, e melanoma invasivo. Porém, aproximadamente 30% dos nevos comuns preexistentes podem evoluir para o tipo de melanoma sem dano crônico a exposição solar, sendo assim considerado como um dos fatores de risco à progressão da doença.^{5,6}

Outro fator de risco ao aparecimento e progressão das lesões neoplásicas é a exposição à luz solar por longos períodos de tempo, em que a proliferação dos melanócitos é estimulada pelos queratinócitos com dano ao DNA induzido pela radiação ultravioleta (UV). Nesse tipo de melanoma em que a sua origem está cronicamente associada ao dano provocado pela radiação solar, é praticamente impossível que nevos comuns preexistentes sirvam como lesão precursora.^{7,8}

Uma importante característica biológica contemplada na figura 1(B) é o conceito de evolução clonal à medida que caminhamos em direção ao melanoma metastático, em que tanto a proliferação de melanócitos quanto o surgimento de novas variantes clonais com aquisição de novas mutações aumentam, gradativamente, ao passo que cruzamos tal espectro morfológico partindo das lesões benignas em direção às lesões malignas.³

Figura 1. Ilustrações esquemáticas das características morfológicas de neoplasias melanocíticas, bem como da representação clonal em cada tipo de lesão.

(A) Espectro morfológico das lesões melanocíticas: **Nevo** – lesão benigna em que os melanócitos em proliferação ocupam a junção dermo-epidérmica e/ou a camada dérmica da pele. **Nevo displásico** – Categoria intermediária entre as lesões benigna e maligna, em que características celulares e estruturais alteradas são encontradas. Clinicamente, essa lesão é definida como uma mancha acastanhada de pelo menos 5 mm em diâmetro, com pigmentação variável e bordas irregulares ou indistintas. **Melanoma *in situ*** – padrão de alteração melanocítica em que os melanócitos com núcleos alargados crescem de forma inteiramente irregular dentro da epiderme. **Melanoma invasivo** – Lesão em que as células de melanoma deixam o epitélio da epiderme e entram no tecido mesenquimatoso subjacente, como a derme ou submucosa, tornando-se invasivo. Para melanomas, o risco de doença metastática e morte se correlaciona com a profundidade da invasão. **Melanoma metastático** – lesão maligna em que as células tumorais se disseminam além do local do tumor primário e colonizam outros tecidos. (B) Panorama evolutivo da aquisição de características biológicas em melanoma. Observar o aumento substancial de processos mutacionais e surgimento de novas variantes biológicas no sentido dos melanomas metastáticos. Para maiores informações, ler o texto acima. (Adaptado de Shain, AH e Bastian, BC. 2008) ³

Nas últimas décadas, a incidência e a mortalidade por melanoma metastático aumentaram em todo o mundo, e essa doença corresponde a 3% de todos os tumores malignos registrados no Brasil. Segundo fontes oficiais, para a estimativa 2016 – 2017 são esperados 5.670 novos casos de melanoma no país, e foram estimados 87.110 novos casos nos Estados Unidos, para 2017.^{9, 10}

O tratamento do melanoma depende de vários fatores prognósticos. Quando detectado precocemente e limitado à pele, o procedimento cirúrgico por ressecção com ampliação de margens continua sendo o padrão de tratamento. Mesmo para pacientes com comprometimento linfonodal regional, cujas taxas de sobrevida em 5 anos são diminuídas em torno de 30% em comparação aos pacientes com doença restrita à pele, a abordagem cirúrgica por esvaziamento linfonodal apresenta benefício por aumentar as taxas de sobrevida.^{11, 12,13}

Na forma inoperável da doença, os procedimentos de radioterapia e quimioterapia podem ser indicados, embora com eficácia limitada. A quimioterapia que se baseia na infusão de drogas citotóxicas, incluindo dacarbazina, compostos de platina, alcalóides da vinca, nitrosouréias e taxanos, ainda hoje é a forma primária de abordagem do melanoma metastático. Contudo, os agentes quimioterápicos nos padrões de mono- ou poliquimioterapia proporcionam baixas taxas de resposta e sobrevida, como exemplo, a taxa de resposta produzida por cisplatina de até 16,3%, uma limitação que torna o melanoma metastático como sendo um dos cânceres mais difíceis de tratar de forma eficaz.^{14, 15}

1.2 CISPLATINA

A cisplatina ou *cis*-diaminodicicloplatina(II) (*cis*-DDP; $\text{Cl}_2\text{H}_6\text{N}_2\text{Pt}^{+2}$; 300,1g/mol) é um composto inorgânico na forma de um sólido cristalino de cor amarela, mas claro em solução reconstituída em água. Esse composto de platina foi sintetizado em 1845 por Peyrone, tendo sua estrutura química elucidada por Alfred Werner em 1893. As propriedades anticâncer da cisplatina só foram noticiadas por volta de 1960 por Barnett Rosenberg, quando identificou esse complexo como um agente antiproliferativo para *Escherichia coli*. A aplicação clínica do composto foi realizada pela primeira vez em 1971, sendo aprovado para uso clínico em 1978 com o nome comercial de Platinol® (Bristol-Myers Squibb).¹⁶

Atualmente a *cis*-DDP tem um papel central na quimioterapia para vários tipos de cânceres, sendo indicada no tratamento de segunda e terceira linhas para melanoma, apesar de seus efeitos colaterais que incluem nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, náusea e vômito. A prática clínica com o uso de altas doses do composto é impossibilitada por seus efeitos tóxicos, e um importante inconveniente no tratamento ambulatorial é a sua administração intravenosa. Além disso, outra desvantagem é que muitos tumores são refratários ao composto, apresentando taxas de resposta desanimadoras em torno de 7-25% nos tratamentos quimioterápicos de segunda e terceira linhas.¹⁷

O mecanismo bioquímico aceito como responsável pelas propriedades antitumorais da *cis*-DDP é a sua ligação ao DNA genômico no núcleo celular, inibindo o processamento do DNA no que acarreta na morte da célula tumoral. O principal sítio de ataque da *cis*-DDP ao DNA são os átomos N7 da guanina e adenina localizadas na fenda maior da dupla hélice, resultando em diferentes adutos estruturais (ligação cruzada 1,2- intracadeia, ligação cruzada intercadeia, aduto monofuncional e ligação cruzada DNA-proteína). Apesar do efeito citotóxico da *cis*-DDP está ligado a sua interação com o DNA, vários tipos de proteínas estão envolvidas nos mecanismos de reparo desses adutos e são responsáveis, em parte, pela resistência dos tumores à droga.¹⁸

Num esforço para aumentar as taxas de resposta e sobrevida ao melanoma metastático, e enfatizando a necessidade por novos agentes e por combinações de drogas que potencializem seus efeitos anticâncer com baixa toxicidade, a imunoterapia tem se tornado uma abordagem promissora no tratamento da doença. Na prática, o melanoma por ser uma doença com a capacidade de provocar uma resposta imune espontânea, tem se tornado um modelo importante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o câncer humano. As abordagens imunoterápicas incluem o uso de citocinas, bioquimioterapia, terapia alvo, bem como a utilização de vacinas.^{19,20}

1.3 VACINAS ANTICÂNCER

O termo vacina deriva do latim “vaccinus”, relativo ao trabalho de Edward Jenner contra a varíola humana. Essas preparações biológicas utilizadas há décadas para prevenir (vacina profilática) ou tratar (vacina terapêutica) doenças infecciosas, se constituem, atualmente, numa importante abordagem para produzir ou potencializar respostas imunológicas eficazes contra o câncer.²¹

As vacinas licenciadas são classificadas em sete categorias a depender do método de produção: viva atenuada; organismo inteiro inativado; subunidades (proteína/toxoide); polissacarídeo; glicoconjugada; recombinante; e reinfusão de células sanguíneas personalizadas.²¹

No contexto das vacinas de organismo inteiro inativado, o lisado total de células tumorais é uma das fontes alternativas de antígenos em imunoterapia do câncer. Em apoio a esse racional, um estudo de meta-análise em que foram analisadas as respostas de 3.444 pacientes em 173 ensaios clínicos usando imunoterapia para diversos tipos de cânceres, entre eles o melanoma, os autores concluíram que os pacientes imunizados com lisado total de células tumorais tiveram uma resposta objetiva altamente significativa (8,1%) quando comparados com aqueles imunizados com antígenos molecularmente definidos (3,6%).²²

Para utilização clínica, os lisados totais de células tumorais podem ser preparados por pelo menos quatro métodos diferentes, sendo o tratamento das células tumorais por ciclos repetidos de congela-descongela uma dessas abordagens. Nessas preparações, as células tumorais são induzidas à morte celular por necrose com liberação de sinais de perigo, uma vez que quando ligados às células dendríticas podem provocar a sua maturação parcial.²³

As células dendríticas são importantes reguladores das respostas imunológicas, e as mais potentes células apresentadoras de antígenos que podem preparar e ativar linfócitos virgens “naïve” contra tumores. Essas células ganharam destaque em diversas estratégias imunoterápicas devido às suas propriedades únicas de ativar o sistema imune anticâncer, e um dos mecanismos propostos para alvejar essas células e disparar suas ações é através da manipulação dos receptores *Toll-Like* (TLRs).^{24, 25}

1.4 RECEPTORES DO TIPO *TOLL*

Os receptores TLRs compõem uma família de proteínas transmembrana do tipo I, codificados pelo gene *Toll*. Inicialmente, em 1985, esse gene foi identificado como um controlador da polaridade embrionária dorsoventral na mosca das frutas *Drosophila melanogaster*. Até o momento, já foram caracterizados 10 diferentes TLRs funcionais em humanos e 13 TLRs funcionais em roedores, que se localizam em diferentes compartimentos subcelulares dependendo da natureza macromolecular dos seus ligantes.^{26, 27, 28}

Os TLRs reconhecem ligantes exógenos (microbianos), os chamados padrões moleculares associados a micróbios – **MAMPs**, tais como: produtos bacterianos (endotoxina, flagelina, lipoproteínas, ácido lipoteicóico), produtos fúngicos (zymosan), produtos de protozoários (molécula como profilina), e produtos virais (RNA de cadeia dupla, DNA com motivos CpG não-metilados). Além disso, esses receptores, principalmente TLR2 e TLR4, podem detectar ligantes endógenos (do hospedeiro), os chamados padrões moleculares associados ao perigo – **DAMPs**, tais como: proteínas de choque térmico, proteína não-histona de ligação ao DNA (HMGB1), ácido úrico, proteína surfactante A, e vários produtos de degradação da matriz extracelular. Os TLRs que reconhecem ligantes lipoproteicos são expressos na membrana plasmática (TLRs -1, -2, -4, -5, -6, -10), enquanto TLRs que detectam ácidos nucleicos virais são localizados em endossomos (TLRs -3, -7, -8, -9).^{26, 27, 28}

Sendo um importante subgrupo dos receptores de reconhecimento de patógenos, os TLRs são componentes chaves do sistema imune inato desencadeando um conservado programa de defesa do hospedeiro, através da indução de citocinas inflamatórias, regulação positiva de moléculas co-estimulatórias, indução de genes antimicrobianos, produção aumentada de quimiocinas e moléculas de adesão, e a geração acentuada de reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio. Como também, os TLRs direcionam a ativação do sistema imune adaptativo, intensificando o processamento de antígenos por células apresentadoras de antígenos profissionais e sua apresentação cruzada a células T, bem como regulando a função das células T regulatórias e levando a ativação e maturação da resposta imune por células B.^{29, 30, 31}

Os TLRs são desprovidos de atividade enzimática, mas uma vez ligados tendem a dimerizar, recrutar proteínas adaptadoras, e reunir uma cascata de sinalização multiproteica (figura 2). Com exceção de TLR-3 que sinaliza via TRIF e ativa o fator de resposta a interferon, todos os outros receptores TLRs podem utilizar a proteína adaptadora MyD88 que fosforila proteínas quinases e, assim, ativa fatores de transcrição, tais como: NFκB e MAPKs. Esta cascata de sinalização sendo disparada resulta numa ampla variedade de efeitos biológicos, como regulação do metabolismo, organização do citoesqueleto, e sobrevivência celular. Esta plasticidade não depende apenas dos sinais TLRs, mas de uma complexa rede de interações com outras vias de sinalização receptoras, determinando o balanço entre os eventos imunes de proteção e destruição tecidual. Portanto, é importante entender e compreender como os TLRs estão envolvidos nesses eventos imunes, já que a disfunção em TLRs ou em produtos de genes associados, bem como a restauração de TLRs perdidos ou mutados, podem resultar em respostas imunes inadequadas ou inapropriadas, e modificar o prognóstico de doenças como o câncer.

32, 33

Figura 2. Estrutura dos receptores do tipo Toll (TLRs) e sinalização.

Os TLRs são estruturalmente caracterizados pela presença extracelular de motivos repetidos ricos em leucina (LRRs), e por um domínio citoplasmático de homologia TIR (receptor Toll-IL-1). Os TLRs recrutam moléculas adaptadoras, como MyD88 e TRIF, para indução de citocinas inflamatórias e interferons do tipo-I através dos fatores de transcrição NFκB e IRFs, respectivamente. **MyD88** (Proteína 88 de resposta primária de diferenciação mieloide), **IKK** (complexo quinase IκB), **TRIF** (proteína adaptadora contendo domínio TIR induzindo interferon-β), **TBK** (Quinase ligante de TANK), **IRF** (Fator de resposta a interferons), **NFκB** (Fator nuclear kappa B). (Adaptado de Mahla, RS. et al. 2013)³⁴

Compreendendo que os TLRs podem exercer potentes funções imunoestimuladoras e que os tumores são ambientes imunogênicos, é notório pela quantidade de dados clínicos o interesse em administrar agonistas exógenos de TLRs em regimes imunoquimioterápicos. Por exemplo, o Bacilo de Calmette-Guérin (BCG – ligante de TLRs- 2/ -4) com indicação para imunoterapia de carcinoma *in situ* de bexiga, e imiquimode (Aldara® - ligante de TLR-7) contra queratose actínica, carcinoma basocelular superficial, e verrugas genitais externas.^{35, 36, 37}

Nesse contexto dos agonistas para TLRs, os compostos abreviados por P-MAPA e seu similar sintético MRB-CFI-1 são considerados fortes candidatos à droga imunoterápica.

1.5 AGONISTAS DE RECEPTORES TLRs

1.5.1 P-MAPA

O agregado polimérico de fosfolinoleato-palmitoleato de magnésio e amônio proteico (P-MAPA) é um composto biotecnológico derivado da fermentação do fungo *Aspergillus orizae*, com peso molecular de 320 KDa, em que seus principais componentes são magnésio (Mg^{2+}), amônio (NH_4^+), fosfato, ácidos linoleico e palmitoleico, e proteína. O conteúdo percentual de proteína está ao redor de 0,5%, com massa molecular de 10 kDa. Os aminoácidos encontram-se distribuídos em porcentagem da seguinte maneira (cromatografia de filtração em gel em coluna de *Sephacryl S-300*): Aspartato (Asp) 7,19%; Treonina (Thr) 3,56%; Serina (Ser) 7,56%; Glutamato (Glu) 8,53%; Prolina (Pro) 0,5%; Glicina (Gly) 9,69%; Alanina (Ala) 7,46%; Valina (Val) 1,0%; Metionina (Met) 4,38%; Isoleucina (Ile) 2,54%; Leucina (Leu) 3,03%; Tirosina (Tyr) 0,5%; Fenilalanina (Phe) 1,0%; Histidina (His) 2,73%; Lisina (Lys) 3,56%; Triptofano (Trp) 1,3%; e Arginina (Arg) 35,2%. Biologicamente, O composto tem se mostrado capaz de combater vários tipos de doenças infecciosas, virais e câncer.^{38, 39}

Em modelo de infecção bacteriana com *Listeria monocytogenes* em camundongos, o P-MAPA foi capaz de estimular a mielopoiese de modo dose-dependente e promoveu 40% de cura em animais com infecção letal, sugerindo-se que o composto possa ter contribuído na recuperação do número de fagócitos

desses animais.⁴⁰ Nesse sentido, macrófagos derivados da cavidade peritoneal de camundongos foram ativados *in vitro* pelo P-MAPA, como observado pelo aumento na produção de óxido nítrico, apresentando o composto como um possível modulador das funções efectoras de fagócitos em doenças infecciosas e câncer.⁴¹

No modelo de necrose hepática após infecção de camundongos C57BL/6 com o flebovírus Punta Toro, o P-MAPA (5mg/Kg) protegeu 70% dos animais da morte e promoveu proteção completa numa dose simples elevada de 100mg/Kg, sem demonstrar sinais de toxicidade. Além disso, a dose mais elevada de P-MAPA foi capaz de reduzir a carga viral sistêmica e diminuir a gravidade da doença hepática.

⁴²

O P-MAPA demonstrou resultados positivos no tratamento da leishmaniose visceral canina, melhorando os sinais clínicos dos cães com a doença sintomática e potencializando as respostas imunes, enquanto reduziu os níveis de IL-10 e aumentou a liberação de IL-2, IFN- γ e o número de células T CD8⁺.⁴³ Ainda no modelo de leishmaniose canina, o P-MAPA aumentou a expressão de TLR-2 e induziu a produção de espécie reativa de oxigênio e óxido nítrico em macrófagos de cães infectados, bem como aumentou discretamente as proteínas p38 MAPK e IKK, sugerindo o reconhecimento do P-MAPA por receptores do tipo *Toll*.⁴⁴

1.5.2 MRB-CFI-1

O modificador de resposta biológica-complexo fosfato inorgânico-1 (MRB-CFI-1) é um composto nanométrico de magnésio, amônio e fosfato de tamanho entre 420-530 nm. Esse composto foi desenvolvido no laboratório de carcinogênese urogenital e imunoterapia (Instituto de Biologia – UNICAMP) em parceria com o laboratório NANOBIOS (Instituto de Química – UNICAMP), liderado pelos professores Wagner José Fávaro e Nelson Eduardo Duran Caballero.⁴⁵

Para ser obtido o complexo fosfato inorgânico (CFI-1), foram utilizadas várias proporções dos diferentes componentes do P-MAPA até chegar numa estrutura semelhante com ausência total de proteínas e lipídeos.⁴⁵

Após a caracterização da parte inorgânica do composto MRB-CFI-1, foi desenvolvida e caracterizada a parte proteica. A parte proteica do CFI-1 foi desenvolvida em função da parte proteica do P-MAPA, apresentando alto grau de

complexação com o CFI-1, peso molecular entre 14-16 kDa, e com a seguinte distribuição de aminoácidos: Arginina (9%), Serina (8%), Treonina (7%) e Tirosina (2%), sendo denominada de P14-16. Embora não seja a mesma proteína presente no P-MAPA, a proteína do MRB-CFI-1 é muito similar.⁴⁵

Acredita-se que esse composto em escala nanométrica possua propriedades antitumorais e imunológicas muito similares com o P-MAPA.⁴⁵

2. JUSTIFICATIVA

Reconhecendo os compostos imunomoduladores P-MAPA e seu sintético estrutural MRB-CFI-1 como indutores de respostas imunológicas anticâncer via receptores *Toll-like*, o presente trabalho busca como alternativa terapêutica e/ou preventiva a combinação entre quimioterapia convencional com esses possíveis indutores de morte imunogênica, para o tratamento do melanoma. Entende-se por morte imunogênica um caso peculiar de morte celular regulada que, em hospedeiros imunocompetentes, é capaz de ativar uma resposta imunológica adaptativa contra antígenos associados às células mortas. Assim, esperamos que o P-MAPA e MRB-CFI-1 mantenham uma resposta imune prolongada que seja capaz de inibir ou prevenir o crescimento *In vivo* de tumores B16F10, melhorando o desempenho do agente quimioterápico cisplatina (figura 3).

Figura 3. Hipótese de trabalho.

Nesta ilustração, observamos a atuação citotóxica da cisplatina sobre células tumorais, embora não promova um padrão típico de morte imunogênica e apresente uma limitação ao tratamento quimioterápico. Dessa forma, a utilização de agonistas TLRs (P-MAPA ou MRB-CFI-1) visa seus efeitos sobre respostas imunes eficazes, em que se esperam atividades imunológicas anticâncer sustentadas.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o potencial anticâncer do P-MAPA e de MRB-CFI-1 contra o melanoma murino em consequência ao padrão de resposta microambiental semelhante ao de morte imunogênica, em regimes de tratamento terapêutico ou vacinal, na vigência de quimioterapia com cisplatina e/ou em associação com antígenos de células tumorais totais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o crescimento de tumores implantados em camundongo selvagem (*wild-type* - WT) e nocaute para o gene *Myd88* (*Myd88^{-/-}*), na vigência ou não do tratamento terapêutico combinado entre cisplatina e P-MAPA;
2. Caracterizar histologicamente o microambiente tumoral, fornecendo informações morfológicas e quantitativas de seus elementos, nos modelos de tratamento terapêutico;
3. Examinar o potencial do P-MAPA contra o melanoma murino B16F10, em camundongos C57BL/6 selvagem, num modelo terapêutico de vacinação usando antígenos de células tumorais totais e na vigência de quimioterapia à base de cisplatina.
4. Investigar o potencial de MRB-CFI-1 contra o crescimento do melanoma murino B16F10 induzido em camundongos C57BL/6 selvagem, num modelo profilático de vacinação com antígenos de células tumorais totais.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MODELO ANIMAL

No modelo murino de melanoma subcutâneo foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos, de *background* genético isogênico, pertencentes à linhagem C57BL/6 dos tipos selvagem (*Wild-Type* ou WT) e nocaute para o gene *Myd88* (*Myd88*^{-/-} ou *Myd88*-KO).

Segundo Adachi et al.⁴⁷, os camundongos deficientes para o gene *Myd88* foram gerados após desintegração desse gene por recombinação homóloga, visando à substituição de dois éxons que codificam a porção C-terminal de *Myd88* com o gene de resistência a neomicina. Esses animais cresceram sem demonstrar anormalidades até 20 semanas de idade, sem alterações na composição dos linfócitos em órgãos linfoides (timo, baço e linfonodos), porém, foram deficientes em várias respostas imunes induzidas por IL-1 (proliferação de timócitos, produção de proteínas de fase aguda, e citocinas inflamatórias) e por IL-18 (atividade lítica de células NK, produção de interferon- γ).

Os animais utilizados em nosso estudo tinham entre seis e oito semanas de idade, pesavam entre 19 e 30g, e foram provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais WT e *Myd88*-KO classificados de acordo com o seu padrão sanitário, respectivamente, como SPF (do inglês, livre de patógenos específicos) e convencionais, foram mantidos no Biotério de Experimentação Animal do Centro de Medicina Nuclear (CMN) /Departamento de Radiologia-FMUSP, nas seguintes condições: alojados em grupos de seis animais por unidade microisoladora (gaiola), mantidos em “*racks*” num ambiente com temperatura controlada entre 20-25°C, umidade relativa entre 40-60%, e com ciclo de luz/escuridão de 12/12 horas.

Os animais receberam água e ração estéreis, *ad libitum*, trocadas três vezes por semana para manutenção da qualidade SPF. Quando submetidos à eutanásia, segundo as recomendações do painel de eutanásia da American Veterinary Medical Association⁴⁸, esta prática foi realizada após anestesia por via intraperitoneal, com a mistura de cetamina/xilazina (100mg/kg e 10mg/kg de peso corporal, respectivamente) seguido por manutenção em câmara de CO₂. Ao final do

experimento, os animais eutanasiados foram encaminhados para descarte pela coleta de lixo biológico da FMUSP.

A utilização e manipulação dos animais no modelo de implantação tumoral, e a coleta de materiais biológicos, foram aprovadas e conduzidas de acordo com as regras preconizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, número de protocolos: 540/13 e 009/17) da FMUSP, bem como, pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) (ANEXOS A, B, e C, respectivamente, páginas 95, 96, e 97).

4.2 LINHAGEM CELULAR

Neste estudo, utilizamos a linhagem celular de melanoma murino designada como B16F10, doação do Dr. M. Hendrix (University of Arizona).

A B16F10 é uma sublinhagem altamente agressiva e metastática que foi selecionada *in vitro* pelo Dr. Isaiah J. Fidler*, após dez ciclos da formação de metástases pulmonares em modelo murino C57BL/6J a partir da linhagem parental B16.⁴⁹

Em cultura, as células B16F10 possuem propriedade de crescimento aderente, e apresentam morfologia mista de células epitelióides e fusiformes (figura 4).

Figura 4. Morfologia da linhagem celular de melanoma murino B16F10.

Fotomicrografia por inversão de células B16F10 na passagem seriada de número 80, após 48h de cultivo em meio completo para crescimento celular. Observar o aspecto semelhante ao epitelial e fusiforme dessas células, em aderência ao fundo da placa de cultura celular. Aumento 200X

*FIDLER, I. J. Selection of successive tumour lines for metastasis. **Nat New Biol**, v. 242, n. 118, p. 148-149, Apr. 1973.

Em relação ao cultivo da linhagem celular, as células B16F10 foram crescidas em garrafa de cultura de células com meio RPMI-1640 (Gibco®), pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), 20mM de HEPES (*N*-(2-hidroxietil)piperazina-*N'*-(2-ácido etanosulfônico), 24mM de Bicarbonato de Sódio, e mantidas em estufa a 37°C, numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂/95% de ar. Quando as células atingiram confluência entre 60 – 80%, elas foram removidas da garrafa de cultura por curta exposição à PBS-EDTA e tripsina 0,25% - EDTA (Gibco®), para que o número de células e a viabilidade celular fossem definidos por contagem em câmara de Neubauer, através do método de exclusão com azul de tripan 0,2%, 0,05% de azida sódica (NaN₃). Posteriormente, as células foram subcultivadas, congeladas em freezer -80°C ou direcionadas sobre gelo para inoculação nos animais.

As células utilizadas nos experimentos estiveram nas passagens seriadas de números 79 a 83, com viabilidade celular acima de 90%, e foram negativas para contaminação por micoplasma (figura 5).

Figura 5. Detecção da contaminação por micoplasma através da reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir do meio de cultura das linhagens celulares B16F10 (passagem seriada de número #79) destinadas à inoculação nos animais e congeladas.

Imagem de gel de agarose, submetido à corrente eletroforética, contendo produto de PCR para micoplasma. Marcação com Syber® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Banda de 280 pares de base (bp) indica positividade da reação. **LEGENDA:** 1 – marcador de peso molecular; 2 – células B16F10 inoculadas; 3 – células B16F10 congeladas; 4 – controle positivo; 5 – controle negativo; 6 – branco.

4.3 MODELO MURINO DE MELANOMA SUBCUTÂNEO E TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Para os estudos de implantação *In vivo* de células tumorais, células B16F10 foram cultivadas *In vitro* até atingirem a fase de crescimento logarítmico (subitem 4.2). Após o preparo da suspensão de células únicas viáveis, 2×10^5 células em 100µl de meio RPMI-1640 sem soro foram inoculadas subcutaneamente no quadrante abdominal direito de cada camundongo, com o auxílio de seringa hipodérmica de 1 ml (BD Plastipak™) e agulha 27^{1/2}-G (BD Eclipse™) (figura 6A, página 42).

Os camundongos C57BL/6 selvagem e nocaute para o gene *Myd88* foram identificados com marcas indeléveis na cauda, e divididos randomicamente nos grupos de tratamento, cada qual utilizando em média seis animais.

Em seguida ao aparecimento de um tumor palpável e não mensurável (PNM) (em torno de 5-10 dias após a implantação), os camundongos foram tratados, por uma das três vias de administração de fármacos - intraperitoneal (i.p.) - subcutânea contralateral ao tumor (s.c.) – e/ou intratumoral (i.t.), com o imunomodulador P-MAPA (5mg/Kg; Farmabrasilis, São Paulo, Brasil)⁵⁰ sozinho ou em combinação com quimioterapia à base de cisplatina (i.p., CIS, 2mg/Kg – HED (Dose Equivalente Humana) para adulto de 6mg/m²; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)^{51,52} (figura 6B, página 42).

Além de testar como monoterapia, P-MAPA na dose de 0,5mg/Kg foi administrado subcutaneamente em preparações de vacina terapêutica com o lisado total de células B16F10 (correspondendo a 2×10^5 células submetidas ao método de congela-descongela/injeção) seguido por quimioterapia com cisplatina (i.p., 2mg/Kg) (figura 6C, página 42). Ainda, o composto MRB-CFI-1 (NANOBIOS/ INOVA-UNICAMP, São Paulo, Brasil) nas doses de 0,5mg/Kg e 5mg/Kg foi testado, por via s.c., em preparações de vacina profilática com o lisado total de células B16F10 (2×10^5 células/injeção) (figura 6D, página 43).

O grupo controle recebeu PBS ou PBS e Pluronic® F-68 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 5% em solução salina (NaCl 0,9%) estéril, seguindo os regimes de tratamento e as vias de administração dos fármacos.

A avaliação diária do tumor foi feita pela mensuração dos seus diâmetros maior (**D**) e menor (**d**) com um paquímetro, e o volume tumoral (**V**) foi calculado usando a fórmula de uma elipsoide: $V = 0,5235 \times d^2 \times D$.

Após os tratamentos, os animais foram eutanasiados e os tumores removidos cirurgicamente e pesados. Em seguida, os tumores foram seccionados no plano longitudinal médio, sendo metade fixada em formalina neutra tamponada a 10% por 24 horas e encaminhado para processamento histológico, e a outra metade congelada. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética em pesquisa da FMUSP.

Figura 6. Esquema do modelo experimental de implantação *In vivo* de células tumorais B16F10, e regimes de tratamento dos animais.

A) Células B16F10 foram cultivadas *In vitro* até atingirem confluência em torno de 60%, e repiques foram feitos durante uma semana (a cada repique, o número da passagem seriada- # é elevado em 1). No dia da inoculação (dia 0), 2×10^5 células/animal foram implantadas subcutaneamente e após, a viabilidade celular foi checada por azul de tripan sendo acima de 90%;

B) Esquema de tratamento terapêutico com P-MAPA em combinação com o quimioterápico cisplatina (CIS). Os animais foram randomizados nos grupos de tratamento, sendo os fármacos injetados após o aparecimento de um tumor palpável e não mensurável, e readministrados a cada três dias;

C) Esquema vacinal terapêutico com o lisado de células B16F10 em combinação com o adjuvante P-MAPA, seguido de quimioterapia à base de CIS (2mg/Kg). Uma única imunização foi realizada cinco dias após a implantação tumoral, com P-MAPA e/ou lisado tumoral, e quimioterapia foi administrada a partir do décimo dia com intervalos a cada três dias. O reforço dos tratamentos foi realizado um dia antes do término do experimento;

D) Esquema vacinal profilático com o lisado de células B16F10 em combinação com o modificador de resposta biológica MRB-CFI-1. Duas imunizações com MRB-CFI-1 e/ou lisado tumoral, com intervalo de sete dias, foram administradas antes da implantação tumoral. Após o desafio tumoral, todos os animais foram avaliados diariamente para checar o aparecimento do tumor.

Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados e os tumores encaminhados para avaliação histológica. **P, M, G** – frasco de cultura celular pequeno (P), médio (M) e grande (G); **i.p.** – intraperitoneal; **s.c.** – subcutâneo; **i.t.** – intratumoral; **WT e Myd88 KO** – camundongos C57BL/6 selvagem e nocaute para o gene *Myd88*, respectivamente. Para maiores detalhes, ler o texto.

4.4 PREPARAÇÕES DE LISADO TOTAL DE CÉLULAS TUMORAIS

Células de melanoma B16F10 em subconfluência foram recolhidas e ressuspensas em 1x PBS na densidade de 2×10^5 células/100 μ L, e depois 1mL da suspensão celular foi transferida para cada criotubo. Após rápido congelamento em nitrogênio líquido, as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 3min. Um total de oito ciclos congela-descongela foram repetidos, vortexando brevemente as amostras a cada ciclo. O lisado celular obtido foi utilizado imediatamente ou congelado a -80°C para uso posterior.

4.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

4.5.1 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após a fixação, os fragmentos tumorais foram preparados num processador automático de tecidos (Microm STP420ES, Thermo Scientific™), por desidratação em álcool 100% (x4; 30min cada; 45°C), clarificação em xilol (x3; os dois primeiros banhos no tempo de 20min cada, e o último banho no tempo de 25min; 40°C), e impregnação em parafina (x4; o primeiro banho no tempo de 30min, e os três últimos banhos no tempo de 25min; 65°C). Em seguida ao processamento, o material foi incluído em blocos de parafina, e cortes histológicos de 3 a 4 μ m de espessura foram fixados sobre lâminas de vidro para microscopia, dando continuidade aos métodos de coloração histoquímica e reação imunoistoquímica descritos.

4.5.2 COLORAÇÕES

HEMATOXILINA/ EOSINA (H&E)

Essa marcação de rotina foi realizada em equipamento automático (Gemini AS Automated Slide Stainer, Thermo Scientific™), seguindo ao protocolo: desparafinização em xilol (x4; 1min cada; temperatura ambiente- TA), hidratação em álcool 100% (x4; 1min cada; TA), lavagem em água corrente (x1; 1min; TA), coloração com hematoxilina de Harris (x1; 4min; TA), lavagem em água corrente (x1;

1min; TA), coloração com eosina (x1; 20s; TA), desidratação em álcool 100% (x4; 1min cada; TA), fixação do corante e conservação do material com xilol (x4; 1min cada; TA).

Resultado da marcação por microscopia de luz:

- A) Núcleos celulares e outras estruturas de natureza ácida evidenciados em roxo;
- B) Citoplasma e espaços intercelulares visualizados em rosa.

TRICRÔMIO DE MASSON (COM AZUL DE ANILINA)

Essa marcação histoquímica para fibras colágenas foi realizada através de kit, seguindo metodologia padronizada (Kit EasyPath, Tricrômio de Masson com azul de anilina; Erviegas, cód. EP-11- 20013).

Resultado da marcação por microscopia de luz:

- A) Núcleos celulares evidenciados em marrom castanho ao preto;
- B) Citoplasma e fibras musculares visualizados em vermelho;
- C) Colágeno marcado em azul.

ALCIAN BLUE pH2,5 / P.A.S

Essa marcação histoquímica para demonstrar glicoproteínas foi realizada através de kit, seguindo metodologia padronizada (Kit EasyPath, Alcian Blue pH 2,5 – P.A.S; Erviegas, cód. EP-12- 20019).

Resultado da marcação por microscopia de luz:

- A) Substância P.A.S⁺ corada em magenta/ vermelho;
- B) Mucinas ácidas e carboidratos evidenciados em azul turquesa.

IMPREGNAÇÃO ARGÊNTICA PARA RETICULINA

Essa marcação histoquímica para demonstrar fibras reticulares argirofílicas foi realizada através de kit, seguindo metodologia padronizada (Kit EasyPath, Reticulina; Erviegas, cód. EP-12- 20021).

Resultado da marcação por microscopia de luz:

A) Fibras reticulares visualizadas em negro.

4.5.3 IMUNOISTOQUÍMICA

Neste estudo, utilizamos os seguintes anticorpos monoclonais, da Abcam[®]: anti-alfa-actina de músculo liso (anti- α -SMA; clone 0.N.5, ab18147) específico para células da musculatura lisa vascular e mioepiteliais, e anti-colágeno I (clone COL-1, ab6308) específico para fibras do tecido conjuntivo; e da Cell Signaling Technology[®]: anti-CD31 (PECAM-1; clone D8V9 XP[®], cellsignal #77699) que reconhece a proteína PECAM-1 expressa por células endoteliais. Além disso, o anticorpo policlonal anti-pan-caderina (clone ZyPC7, Invitrogen #71-7100), que reage com todos os membros da família caderina (incluindo, N- E- P- R- caderinas), foi utilizado.

A reação imunoistoquímica indireta para esses marcadores foi padronizada em nosso laboratório, uma vez que os cortes histológicos foram desparafinados com xilol e hidratados usando concentrações graduadas de etanol à água destilada. Na recuperação antigênica pelo calor, as lâminas histológicas foram mergulhadas nos tampões citrato de sódio 10mM- pH 6,0/ 0,05% Tween 20 (para, α -SMA e colágeno I) ou Tris buffer 0,5M- pH10 (para, CD31 e pan-caderina) e levadas a um forno micro-ondas por 15min em potência 80%. Seguindo bloqueio da atividade da peroxidase endógena (3% H₂O₂ : metanol) e pré-incubação com soro normal de cabra 10%, os anticorpos primários (anti- α -SMA [0,2 μ g/ml], anti-COL1 [0,25mg/ml], anti-CD31 diluição 1/20, anti-pan-caderina [12,5 μ g/ml]) diluídos em 1x TBS/ 1% BSA foram aplicados sobre os cortes por 12h a 4°C. Após incubação com anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 1h a 37°C, a detecção colorimétrica foi realizada através do kit 3,3'-diaminobenzidina- DAB (DAKO, K3468) por 1min em

temperatura ambiente. A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris por 1min, e a montagem das lâminas processada com ERV-MOUNT (EasyPath, EP-MOUNT 1500). Entre cada etapa, as lâminas foram enxaguadas com as soluções de lavagem, 1x TBS/ 0,025% Triton X-100 e 1x TBS/ 0,1% Tween-20, por 5min (x2-3, temperatura ambiente).

Para tais reações, o próprio tecido tumoral foi utilizado como controle positivo das marcações, e controle negativo sem incubação com os anticorpos primários foi realizado em cortes histológicos tumorais para cada lâmina submetida à reação imunoistoquímica.

Resultado da reação por microscopia de luz:

A) α -SMA, marcação em marrom do citoplasma/ citoesqueleto;

B) COL-1, marcação em marrom da matriz extracelular;

C) CD31, marcação em marrom do endotélio vascular;

D) pan-caderina, marcação em marrom dos contatos periféricos célula-célula, embora um padrão citoplasmático e nuclear de marcação foi observado devido à natureza policlonal do anticorpo.

4.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA

4.6.1 QUANTIFICAÇÃO DAS ÁREAS TUMORAIS PRESERVADAS E DAS ÁREAS DE MORTE CELULAR

Cada lâmina foi previamente identificada e correspondia ao espécime tumoral de um animal após tratamentos. As lâminas com os cortes histológicos tumorais marcados com H&E foram visualizadas por microscopia de luz. Para cada lâmina, aproximadamente vinte fotomicrografias aleatórias de toda a extensão tumoral foram capturadas no formato de pasta (.tif), e submetidas à análise através do software ImageJ versão 1.45S (Plugin Grid, malha de 80 pontos por cada foto) (figura 7, página 48). Após a quantificação, os valores foram organizados em tabela de Excel e os gráficos foram gerados utilizando o programa GraphPad Prism.

Para obter a porcentagem das áreas tumorais de interesse (preservada ou morte) em relação ao compartimento de referência (tecido tumoral total), os resultados da análise das imagens foram aplicados nas seguintes fórmulas, em que $\bar{X}_{(n)}$ representa a média aritmética das contagens de (n) fotos por lâmina:

Relação entre área tumoral preservada e tumor total (%) =

$$\frac{\bar{X}_{(n)} \text{ pontos em tumor preservado}}{\bar{X}_{(n)} \text{ pontos em tumor total}} \times 100$$

Relação entre área tumoral morta e tumor total (%) =

$$\frac{\bar{X}_{(n)} \text{ pontos em tumor morto}}{\bar{X}_{(n)} \text{ pontos em tumor total}} \times 100$$

Figura 7. Tumor subcutâneo B16F10.

(A) Área tumoral preservada, mostrando células tumorais viáveis e vasos sanguíneos funcionais (**cabeças de seta**) com hemácias em seu interior (células circulares vermelhas). **(B)** Área de morte celular, com aspecto eosinofílico, mostrando alterações nucleares. Fotomicrografia H&E (aumento 200x), seguida da quantificação das áreas de interesse, através do software ImageJ versão 1.45S.

4.6.2 DENSIDADE CELULAR

Como descrito acima, após a captura das fotomicrografias do material histológico marcado em H&E, se seguiu o processamento e análise digital das imagens através do software ImageJ (versão 1.45S).

Para cada imagem, inicialmente foram excluídas regiões indesejadas (áreas de morte celular, áreas em branco e áreas com artefato), permitindo que a análise fosse realizada apenas na área tumoral preservada, cuja medida de área foi calculada em milímetros quadrados (mm^2). Depois, parâmetros foram aplicados com a finalidade de tornar os pixels da imagem melhores distinguíveis, até que o número de partículas (equivalentes aos núcleos celulares) fosse contado automaticamente (figura 8). A padronização dos parâmetros foi definida em nosso laboratório, e após a quantificação, os valores (número de células/ mm^2 de área tumoral preservada) foram organizados em tabela de Excel e os gráficos foram gerados utilizando o programa GraphPad Prism.

Figura 8. Processamento e Análise Digital de Imagens (PADI).

- 1- Exclusão de áreas indesejadas; 2- PADI; 3- Ajuste dos pixels;
4- Quantificação das partículas.

4.6.3 QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO DAB

As lâminas submetidas à imunoistoquímica para o marcador α -SMA, contendo o controle negativo e positivo da reação, foram digitalizadas utilizando um scanner Vslide para lâminas (MetaSystems, Alemanha), em colaboração com o laboratório de Histotecnologia (Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná).

Uma vez digitalizadas, as imagens foram abertas utilizando o programa VSViewer v 2.1.102 (MetaSystems, Alemanha), sendo fotografados os controles negativo e positivo de cada lâmina (escala 1000 μ m) utilizando a função “Snapshot”. Em seguida, o material fotografado foi analisado através do software ImageJ (versão 1.45S) (Plugin Colour Deconvolution, H&E DAB, matriz marrom), com a finalidade de mensurarmos a área tumoral e quantificarmos a marcação em marrom (valor para limiarização “Threshold” fixado em 180). Como os controles negativo e positivo numa mesma lâmina correspondiam ao mesmo corte histológico, as áreas tumorais totais mensuradas em micrômetros quadrados (μ m²) foram iguais. Após a quantificação da área marcada em marrom (correspondente ao antígeno investigado), o valor do controle negativo foi subtraído do valor do controle positivo para descontarmos qualquer marcação inespecífica, e o resultado foi dado como a porcentagem relativa de área marcada por área tumoral total (figura 9).

Figura 9. Quantificação da marcação imunoistoquímica para α -SMA.

Para quantificar a marcação imunoistoquímica para CD31, de cada lâmina, aproximadamente vinte fotomicrografias aleatórias em área tumoral preservada foram capturadas no formato de pasta (.tif). Após segmentação e processamento (valor para limiarização “Threshold” fixado em 150) das imagens através do software ImageJ versão 1.45S (Plugin Colour Deconvolution, H&E DAB, matriz marrom), as regiões de interesse foram quantificadas. O resultado da marcação foi dado como a porcentagem relativa de área marcada por área tumoral preservada. Após a quantificação, os valores foram organizados em tabela de Excel e os gráficos foram gerados utilizando o programa GraphPad Prism (figura 10).

Figura 10. Quantificação da marcação imunoistoquímica para CD31.

1- Segmentação; 2- Processamento; 3- Cálculo da marcação.

4.6.4 QUANTIFICAÇÃO DA MARCAÇÃO RETICULINA

A quantificação da marcação histoquímica para fibras reticulares ocorreu após, aproximadamente, vinte fotomicrografias aleatórias em área tumoral preservada serem capturadas por cada lâmina, no formato de pasta (.tif). Figura 11, processamento (valor para limiarização “Threshold” fixado em 100) e segmentação das imagens através do software ImageJ versão 1.45S (Plugin Shape Filter, Circularidade 20-infinito, Elongação 0,8-1), com quantificação das regiões de interesse (fibras em negro). O resultado da marcação foi dado como a porcentagem relativa de área marcada por área total de tumor preservado. Após a quantificação, os valores foram organizados em tabela de Excel e os gráficos foram gerados utilizando o programa GraphPad Prism.

Figura 11. Quantificação da marcação histoquímica de fibras reticulares.

1- Processamento; 2- Segmentação; 3- Cálculo da marcação.

4.7 TRATAMENTO *IN VITRO* DE CÉLULAS B16F10 E ANÁLISE DA VIABILIDADE E DO CICLO CELULAR, POR MARCAÇÃO COM IODETO DE PROPÍDIO (P.I.)

Células tumorais B16F10 foram cultivadas *In vitro* até atingirem a fase de crescimento logarítmico (subitem 4.2). Após o preparo da suspensão de células únicas viáveis, 10^5 células em 2000µl de meio RPMI-1640 completo foram plaqueadas por cada poço, numa placa para cultura de células com 12 poços. Depois de aderidas, as células foram tratadas por 24h com P-MAPA nas diferentes concentrações de 0,5, 5 e 10µg/ml. As soluções de P-MAPA nas diferentes concentrações foram obtidas por diluição seriada, a partir da concentração estoque de 1,6mg/ml de P-MAPA em Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). O teste para cada concentração foi realizado em triplicata, e para fins de comparação, consideramos como controle as células mantidas em cultura com meio RPMI-1640 completo e corrigido com DMSO, pelo mesmo período de tempo.

Após o tratamento, as células de cada poço individual foram recolhidas em tubos de 1,5ml por curta exposição à PBS-EDTA e Tripsina 0,25% -EDTA (Gibco®), fixadas por 2 h à temperatura ambiente em etanol 70%, e incubadas por 30 min à temperatura ambiente, protegidas da luz, com solução P.I (2,5mg/ml, Sigma) sob tratamento com RNase (20mg/ml). Posterior à lavagem com PBS, o conteúdo de DNA e a porcentagem de células hipodiplóides foram analisadas por citometria de fluxo (figura 12, página 55).

O Iodeto de Propídio ($C_{27}H_{34}I_2N_4$; 668,3946 g/mol) é um corante fluorescente que se liga aos ácidos nucleicos, por intercalação aos pares de base de forma estequiométrica. Geralmente, a fluorescência do P.I é detectada no canal FL2 dos citômetros de fluxo, de acordo com suas propriedades espectrais (excitação máxima em 535nm, emissão máxima em 617nm).⁵³

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do software *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows. A escolha do método estatístico foi determinada pelo teste de normalidade, e pelo número e tipos de grupos comparados. Os testes t de Student para amostras independentes e Análise de Variância (ANOVA) foram utilizados para

determinar os níveis de significância da comparação entre dois ou mais grupos, com valores em distribuição normal. Quando os valores não seguiram a distribuição normal, os testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis foram utilizados para comparar dois ou mais grupos independentes. Foram considerados como estatisticamente significativo, os resultados cujo valor de (P) foi menor que 0,05.

Figura 12. Avaliação da viabilidade e do ciclo celular de células B16F10 tratadas com P-MAPA e marcadas com lodeto de Propídio (P.I. – 2,5mg/ml), através de citometria de fluxo.

A) 10.000 eventos foram adquiridos num citômetro de fluxo Attune® Acoustic Focusing (Life Technologies) equipado com um laser de Argônio (488nm), e um gate de análise (R1) foi definido na população celular de interesse (exclusão de debris). B) A partir dos eventos em R1, um dot-plot de área (A) e altura (H) foi utilizado para definir um gate (R2) na população de células individuais (exclusão de células mortas e doublets). C) A partir dos eventos em R2, um histograma PI foi utilizado para calcular as fases do ciclo celular. D) Um histograma PI foi utilizado para calcular as células hipodiploides, dentro do gate R1.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 O CANDIDATO A DROGA IMUNOTERÁPICA (P-MAPA) NÃO FOI EFICAZ EM INIBIR O CRESCIMENTO DE TUMORES B16F10 EM CAMUNDONGOS SELVAGENS

As figuras 13 (A e B, página 58) e 14 (página 59) apresentam três experimentos independentes, em que o crescimento de tumores B16F10 implantados em camundongos selvagens foi mensurado em diferentes grupos de tratamento.

As observações relatadas aqui foram provenientes das mensurações diárias de tumores subcutâneos. Desse modo, foram excluídas das análises as medidas de volume tumoral adquiridas de camundongos que apresentaram tumores abdominais ou parcialmente implantados em tal cavidade, bem como as medidas registradas de animais que morreram antes de receberem qualquer tratamento.

As avaliações da figura 13 (A e B), no qual os tratamentos terapêuticos com cisplatina (CIS) e/ou P-MAPA foram conduzidos por via intraperitoneal (i.p.), mostraram que a cisplatina inibiu o crescimento tumoral quando comparada ao grupo controle tratado com o veículo de diluição (PBS). Ao contrário, observamos nenhum benefício pelo tratamento com P-MAPA, quer sozinho ou em combinação com o agente quimioterápico, já que os tumores continuaram a crescer de modo semelhante ao grupo controle (PBS), com nenhum efeito aditivo ou sinérgico pelo cotratamento com cisplatina.

Na figura 14, em que o tratamento com a cisplatina foi realizado por via intraperitoneal e o P-MAPA foi administrado inicialmente por via subcutânea contralateral ao tumor e depois por via intratumoral, ainda observamos que o tratamento terapêutico com o P-MAPA nos esquemas de monoterapia ou na vigência de uma segunda droga não apresentou efeito antitumoral, pelo menos no modelo de melanoma murino B16F10. Os animais tratados com P-MAPA portaram tumores maiores em comparação ao grupo controle (PBS), e ainda quando da combinação com a cisplatina, antagonizou o efeito anticâncer deste quimioterápico.

Ao final dos experimentos, os tumores foram retirados cirurgicamente e pesados. Tumores de consistência rígida (endurecidos) foram notados no grupo

tratado com P-MAPA, em comparação aos tumores provenientes dos outros tratamentos. Além disso, a Tabela 1 (página 59) apresenta o peso médio em gramas (g) dos tumores de diferentes grupos de tratamento, referente aos experimentos mostrados nas figuras 13(B) e 14, em que podemos observar uma aparente redução do peso tumoral no grupo tratado com cisplatina em relação ao grupo controle (PBS), mas não nos grupos tratados com P-MAPA. Tais alterações macroscópicas nos direcionaram a análise microscópica dos tumores, na tentativa de associarmos possíveis mudanças microambientais com o insucesso do tratamento com P-MAPA.

Figura 13. Análise do crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 selvagem (WT), durante tratamentos intraperitoneal (i.p) com cisplatina (CIS) [2mg/Kg] e/ou com P-MAPA [5mg/Kg].

Os gráficos A e B representam dois experimentos independentes. Os camundongos foram inoculados subcutaneamente com células B16F10 de melanoma murino (2×10^5 células tumorais/100 μ l), e submetidos randomicamente nos grupos de tratamento. n= número de animais analisados por grupo. A duração do tratamento é indicada por setas pretas. No grupo controle, os animais foram tratados com o veículo de diluição (PBS). **Gráfico (A)** * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, teste ANOVA para medidas repetidas, e pós-teste de Bonferroni. **Gráfico (B)** * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, teste Two-way ANOVA, e pós-teste de Bonferroni.

Figura 14. Análise do crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 selvagem (WT), durante tratamentos intraperitoneal (i.p) com cisplatina (CIS) [2mg/Kg] e/ou subcutâneo (s.c.) / intratumoral com P-MAPA [5mg/Kg].

Gráfico representativo de um experimento independente. Os camundongos foram inoculados com células B16F10 de melanoma murino (2×10^5 células tumorais/100µl), e submetidos randomicamente nos grupos de tratamento. n= número de animais analisados por grupo. A duração do tratamento é indicada por setas (setas pretas indicam tratamento subcutâneo com P-MAPA, enquanto as setas vermelhas indicam entrega intratumoral de P-MAPA). No grupo controle, os animais foram tratados com o veículo de diluição (PBS). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, teste ANOVA para medidas repetidas, e pós-teste de Bonferroni.

Tabela 1 – Peso médio em gramas (g) de tumores B16F10 em diferentes grupos de tratamento

Experimentos	Grupos Experimentais			
	PBS	Cisplatina (CIS)	P-MAPA	CIS+P-MAPA
Figura 13(B)	$3,6 \pm 1,4$ (n= 5)	$1,4 \pm 0,8$ (n= 4)	$5,0 \pm 1,9$ (n= 3)	$2,3 \pm 1,1$ (n= 5)
Figura 14	$1,6 \pm 1,2$ (n= 4)	$0,3 \pm 0,3$ (n= 4)	$1,2 \pm 1,0$ (n= 7)	$2,6 \pm 0,9$ (n= 5)

Os valores são apresentados como a mediana $\pm$ desvio quartílico de dois experimentos independentes, referentes às figuras 13(B) e 14. (n) Tamanho da amostra analisada por grupo, após o término do experimento. Nenhuma diferença significativa entre os grupos, apesar de uma aparente diminuição no peso dos tumores do grupo CIS; teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

5.2 O IMUNOMODULADOR P-MAPA PROMOVEU MUDANÇAS MICROAMBIENTAIS EM TUMORES B16F10 NOS CAMUNDONGOS SELVAGENS

As figuras 15 (página 61), 16 (página 62), e 17 (página 63) mostram os resultados obtidos das contagens de áreas tumorais preservadas e de morte celular, nos cortes histológicos corados em H&E dos tumores de diferentes tratamentos provenientes dos experimentos mostrados nas figuras 13(A), 13(B), e 14, respectivamente. Nas figuras 15 e 16 que correspondem aos tratamentos intraperitoneais com cisplatina e P-MAPA, observamos que entre os grupos de tratamento, um maior percentual de tecido tumoral morto por tecido tumoral total foi associado aos tratamentos com cisplatina+P-MAPA. Já nos tratamentos intraperitoneal com cisplatina e subcutâneo/intratumoral com P-MAPA (figura 17), embora os tumores do grupo cisplatina+P-MAPA ainda apresentaram mais áreas de morte tumoral do que de tumor preservado, o maior percentual de áreas de morte tumoral foi notado no tratamento com P-MAPA, em relação aos outros grupos.

Apesar das alterações na proporção de áreas tumorais preservadas e de morte celular, como registradas, por exemplo, em função dos tratamentos com cisplatina e P-MAPA, nenhuma diferença foi notada quanto à vascularização em tecido tumoral preservado, pelo menos da comparação entre os grupos controle (PBS) e P-MAPA (figura 18, página 64, correspondente à intensidade de marcação por área de CD31 nas amostras tumorais provenientes do experimento da figura 13A).

Para investigarmos as alterações macroscópicas das peças tumorais que foram mais endurecidas ao toque no grupo tratado com P-MAPA em relação aos outros grupos de tratamento, e com aparente aumento de peso tumoral, realizamos a contagem automatizada do número de células em áreas tumorais preservadas a partir dos cortes histológicos corados em HE. Além disso, investigamos um possível efeito do P-MAPA sobre o estroma tumoral através da avaliação da deposição de colágenos e glicoproteínas, como também pela marcação imunoistoquímica de colágeno do tipo 1, actina- alfa de músculo liso, e de pan-caderinas.

A figura 19 (página 65) apresenta a densidade celular nos diferentes grupos de tratamento das amostras provenientes do experimento apresentado na figura 14, em que podemos observar que o P-MAPA aumentou o número de células por área tumoral preservada em relação ao grupo tratado com cisplatina.

Figura 15. Análise quantitativa de cortes histológicos corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E) de tumores murino B16F10, em diferentes grupos de tratamento.

A) Fotomicrografias representativas das regiões intratumorais dos camundongos tratados com PBS (controle), Cisplatina (CIS), P-MAPA ou CIS+P-MAPA. Padrões morfológicos de morte celular (cabeças de seta) foram considerados pelas alterações nucleares (pícnose, cariorrexe, cariólise) e citoplasmáticas (intensa eosinofilia). (aumento x200; escala: 40µm)

B) Fotomicrografias digitais foram capturadas de, aproximadamente, vinte campos histológicos diferentes e aleatórios de cada amostra tumoral, e as regiões de tecidos tumorais de interesse foram mensuradas pelo *software ImageJ* (grade do tipo pontos, 10x8). n, número de tumores analisados por tratamento. Os dados são apresentados como o percentual da fração entre as regiões de interesse (tecido tumoral preservado ou tecido tumoral morto) pelo tumor total (soma dos tecidos preservado e morto), e os valores médios são apresentados no interior das barras.

Figura 16. Análise quantitativa de cortes histológicos corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E) de tumores murino B16F10, em diferentes grupos de tratamento.

A) Fotomicrografias representativas das regiões intratumorais dos camundongos tratados com PBS (controle), Cisplatina (CIS), P-MAPA ou CIS+P-MAPA. Padrões morfológicos de morte celular (cabeças de seta) foram considerados pelas alterações nucleares (picnose, cariorrexe, cariólise) e citoplasmáticas (intensa eosinofilia). (aumento x200; escala: 40µm)

B) Fotomicrografias digitais foram capturadas de, aproximadamente, vinte campos histológicos diferentes e aleatórios de cada amostra tumoral, e as regiões de tecidos tumorais de interesse foram mensuradas pelo *software ImageJ* (grade do tipo pontos, 10x8). n, número de tumores analisados por tratamento. Os dados são apresentados como o percentual da fração entre as regiões de interesse (tecido tumoral preservado ou tecido tumoral morto) pelo tumor total (soma dos tecidos preservado e morto), e os valores médios são apresentados no interior das barras.

Figura 17. Análise quantitativa de cortes histológicos corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (H&E) de tumores murino B16F10, em diferentes grupos de tratamento.

A) Fotomicrografias representativas das regiões intratumorais dos camundongos tratados com PBS (controle), Cisplatina (CIS), P-MAPA ou CIS+P-MAPA. Padrões morfológicos de morte celular (cabeças de seta) foram considerados pelas alterações nucleares (picnose, cariorrexe, cariólise) e citoplasmáticas (intensa eosinofilia). (aumento x200; escala: 40µm)

B) Fotomicrografias digitais foram capturadas de, aproximadamente, vinte campos histológicos diferentes e aleatórios de cada amostra tumoral, e as regiões de tecidos tumorais de interesse foram mensuradas pelo *software ImageJ* (grade do tipo pontos, 10x8). n, número de tumores analisados por tratamento. Os dados são apresentados como o percentual da fração entre as regiões de interesse (tecido tumoral preservado ou tecido tumoral morto) pelo tumor total (soma dos tecidos preservado e morto), e os valores médios são apresentados no interior das barras.

Figura 18. Fração de área positiva para CD31 avaliada por imunoistoquímica em cortes histológicos de tumores murino B16F10, em camundongos C57BL/6 de tipo selvagem.

A) Fotomicrografias representativas de diferentes campos histológicos das regiões intratumorais de camundongos tratados com PBS (controle) ou P-MAPA. Escala: 50µm, aumento x200;

B) Quantificação da marcação marrom para CD31 por ImageJ (*Colour Deconvolution*). Representação Box-whisker plot do percentual de fração relativa da marcação positiva para CD31 por área tumoral preservada (μm^2). Número de tumores analisados por tratamento – 3 (PBS), 2 (P-MAPA). Total de fotomicrografias analisadas por tratamento – 61 (PBS), 36 (P-MAPA). Os dados são referentes ao experimento da Figura 13A, e são apresentados como a mediana, intervalo interquartil e valores máximo e mínimo. Nenhuma diferença significativa entre os grupos; teste de Mann Whitney.

Figura 19. Quantificação do número de células (núcleos) com ImageJ, em secções H&E de tumores B16F10 de camundongos C57BL/6 selvagem.

Representação Box-whisker plot do número de células por milímetros quadrados (mm^2) de área tumoral preservada, em diferentes campos histológicos de tumores de camundongos tratados com PBS, Cisplatina (CIS), P-MAPA ou CIS+P-MAPA. n = Número de tumores analisados por tratamento. t = Total de fotomicrografias analisadas por tratamento (aumento x200). Os dados são referentes ao experimento da Figura 14, e são apresentados como a mediana, intervalo interquartilico e valores máximo e mínimo. **p < 0,01, ***p < 0,001, teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

Quanto à avaliação de colágenos e de glicoproteínas através de métodos histoquímicos - tricrômio de Masson e alcian blue/ P.A.S (ANEXOS D e E, respectivamente, páginas 98-99), não observamos depósitos dessas proteínas nas regiões intratumorais de qualquer um dos grupos experimentais, sendo as marcações limitadas à região da cápsula tumoral. Igual observação foi notada para marcação imunoistoquímica para colágeno do tipo 1 (ANEXO F, página 100). Portanto, a busca por espessas fibras colágenas em regiões intratumorais não foi associada ao endurecimento observado nos tumores B16F10 pertencentes ao grupo P-MAPA.

Por outro lado, a avaliação de fibras reticulares (colágeno tipo III) por impregnação com sais de prata, revelou essas finas fibras colágenas nas regiões intratumorais de todos os grupos experimentais, sendo, aparentemente, mais ocorrente nos tumores do grupo P-MAPA em comparação a todos os outros grupos (Figura 20A, página 67). Após quantificação da marcação nos grupos controle (PBS) e P-MAPA, um aumento da intensidade de marcação por área tumoral preservada foi observado nas amostras do grupo P-MAPA, indicando que esse composto foi capaz de promover uma alteração estrutural nos tumores B16F10, pelo menos ao que se refere ao constituinte da matriz extracelular do tipo reticulina (Figura 20B, página 67).

Além da avaliação de constituintes da matriz extracelular, outra abordagem que utilizamos para entender as alterações macroscópicas das peças tumorais endurecidas no grupo P-MAPA, foi através do estudo imunoistoquímico para a proteína α -SMA do citoesqueleto pertencente ao sistema de microfilamento de actina, bem como das moléculas de adesão celular do tipo caderinas, ambas com importantes funções na formação e manutenção da arquitetura tecidual.

A marcação para α -SMA foi detectada tanto na região capsular quanto nas regiões intratumorais, principalmente em torno dos vasos sanguíneos, e deste modo, após quantificação não observamos alterações entre os grupos experimentais (figura 21, página 68). Já a marcação para pan-caderinas nos revelou um padrão de marcação de membrana, aparentemente, mais intenso nos grupos com P-MAPA em relação ao controle PBS (figuras 22 e 23; páginas 69 e 70). Para esse estudo, não foi possível quantificar a marcação de pan-caderinas nos contatos celulares devido à

impossibilidade de segmentar o padrão de marcação citoplasmática do membranar, sendo útil atentar para a marcação em marrom nos contatos célula-célula.

Figura 20. Impregnação por prata de fibras reticulares em cortes histológicos de melanoma murino B16F10 em camundongos C57/BL6 selvagem.

As fibras reticulares formam redes finas exibidas na cor preta. **A)** Fotomicrografias representativas das regiões intratumorais que correspondem à intensidade de marcação mínima, média ou máxima em camundongos C57BL/6 de tipo selvagem tratados com PBS (controle), cisplatina (CIS), P-MAPA ou CIS+P-MAPA. **B)** Quantificação das fibras em negro com ImageJ (shape filter plugin). Cada ponto no gráfico representa o percentual de fração relativa da marcação positiva para fibras reticulares por área tumoral preservada. Número de tumores analisados por grupo: PBS - 3; P-MAPA - 4. Total de fotomicrografias analisadas por grupo de tratamento: PBS - 80; P-MAPA - 55. Os dados são apresentados com a mediana (linhas pretas). ** $p < 0.01$ em comparação ao grupo PBS; teste de Mann Whitney. As marcações tumorais foram realizadas nas amostras do experimento da Figura 14 (aumento x200; escala: 50 μ m).

Figura 21. Fração de área positiva para α -SMA avaliada por imunoistoquímica em cortes histológicos de tumores murino B16F10, em camundongos C57/BL6 de tipo selvagem.

A) Fotomicrografias representativas das regiões intratumorais de camundongos tratados com PBS (controle), cisplatina (CIS), P-MAPA, ou CIS+P-MAPA;

B) Quantificação da marcação marrom para alfa-actina de músculo liso (α -SMA) por ImageJ (*Colour Deconvolution*). Cada ponto no gráfico representa o percentual de fração relativa da marcação positiva para α -SMA por área tumoral total (μm^2). Os dados são apresentados como a mediana (linhas pretas). Número de tumores analisados – 3 em cada grupo. Nenhuma diferença significativa entre os grupos; teste de Kruskal-Wallis, e pós-teste de comparação múltipla de Dunn. As marcações tumorais foram realizadas nas amostras do experimento da Figura 14 (aumento x200; escala: 50 μm).

Figura 22. Análise imunoistoquímica de pan-caderinas em cortes histológicos de tumores murino B16F10.

A expressão de pan-caderina é baseada na marcação de membrana, embora um padrão de marcação citoplasmática seja também notado. A intensidade de marcação total foi classificada como fraca, moderada, e forte (coloração em marrom). As marcações tumorais foram realizadas nas amostras do experimento da Figura 13A. Fotomicrografias representativas das regiões intratumorais de camundongos C57BL/6 selvagem tratados com PBS (Controle) ou P-MAPA. Escala: 50µm, aumento x200.

Figura 23. Análise imunoistoquímica de pan-caderinas em cortes histológicos de tumores murino B16F10.

A expressão de pan-caderina é baseada na marcação de membrana, embora um padrão de marcação citoplasmática seja também notado. A intensidade de marcação total foi classificada como fraca, moderada, ou forte (coloração em marrom). As marcações tumorais foram realizadas nas amostras do experimento da Figura 14. Fotomicrografias representativas das regiões intratumorais de camundongos C57BL/6 selvagem tratados com PBS (Controle), cisplatina (CIS), P-MAPA ou CIS+P-MAPA. Escala: 50µm, aumento x200.

Os resultados mostraram que o P-MAPA, de alguma forma, apresentou atuação pró-tumoral nos esquemas de tratamento terapêutico em melanoma murino, acompanhada de mudanças microambientais. Para investigarmos se tais alterações foram dependentes da interação do composto com a via *Toll-Like*, mensuramos o crescimento de tumores B16F10 implantados em camundongos *Myd88*-KO e realizamos contagens do número de células por área tumoral preservada, pelo menos no grupo de tratamento em que o P-MAPA reverteu o efeito anticâncer da cisplatina em camundongos selvagens.

5.3 O IMUNOMODULADOR P-MAPA ATUOU EM TUMORES B16F10 PELA VIA *TOLL-LIKE*, NA DEPENDÊNCIA DA PROTEÍNA ADAPTADORA *Myd88*

A figura 24 mostra as mensurações diárias do volume tumoral no grupo de tratamento com cisplatina (CIS) e no cotratamento com CIS+P-MAPA, em camundongos *Myd88*-KO. Neste experimento observamos que a taxa de crescimento tumoral não variou entre os grupos experimentais, apontando que o P-MAPA precisou da proteína *Myd88* para antagonizar o efeito da cisplatina como observado em animais selvagens.

Figura 24. Análise do crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 nocaute para o gene *Myd88* (*Myd88*-KO), durante tratamentos intraperitoneal (i.p) com cisplatina (Cis) [2,0mg/Kg] ou subcutâneo (s.c.) com CIS+P-MAPA [5,0mg/Kg].

Gráfico representativo de um experimento independente. A duração do tratamento é indicada por setas pretas, 1-30 dias após a inoculação de 2×10^5 células B16F10 por animal. No gráfico, cada linha vermelha e verde mostra o crescimento tumoral por animal em seu respectivo grupo de tratamento ($n=5$ camundongos por grupo). Nenhuma diferença significativa nas curvas de crescimento tumoral entre os grupos experimentais.

Ao final desse experimento, os animais foram eutanasiados e seus tumores foram pesados. Nenhuma alteração macroscópica foi notada entre os tumores de tais tratamentos, bem como dos pesos médios em gramas sendo a mediana $\pm$ desvio quartílico de $(1,6 \pm 1,7)$ para o grupo tratado com cisplatina (CIS) e de $(2,3 \pm 1,4)$ para o grupo que recebeu CIS+P-MAPA. Com relação à quantificação do número de células por área tumoral preservada, ao contrário do observado no modelo animal selvagem, o P-MAPA não foi capaz de aumentar a celularidade no modelo animal *Myd88-KO* (figura 25, referente à figura 24).

Figura 25. Quantificação do número de células (núcleos) com ImageJ, em secções H&E de tumores B16F10 de camundongos C57BL/6 *Myd88-KO*.

Representação Box-whisker plot do número de células por milímetros quadrados (mm^2) de área tumoral preservada, em diferentes campos histológicos de tumores de camundongos tratados com cisplatina (CIS) ou com CIS+P-MAPA. n = Número de tumores analisados por tratamento. t = Total de fotomicrografias analisadas por tratamento (aumento x200). Os dados são apresentados como a mediana, intervalo interquartílico, e valores máximo e mínimo. Nenhuma diferença significativa ($P=0,5$), teste de Mann Whitney.

Para entendermos se o aumento da celularidade nos tumores de animais selvagens tratados com P-MAPA foi devido à sua ação proliferativa sobre células B16F10, realizamos o tratamento *in vitro* dessas células com o composto e analisamos o ciclo celular.

5.4 O P-MAPA PARECE NÃO ALTERAR AS FASES DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS B16F10 DE MELANOMA MURINO

Após o tratamento de células B16F10 com concentrações de P-MAPA capazes de ter efeitos estimuladores sobre receptores *Toll-Like* dos tipos -2 e -4, como mostrado em trabalho anterior⁵⁴, observamos que tais concentrações não foram citotóxicas para as células e nem modificaram o seu conteúdo de DNA. Relatamos que as células em cultura e tratadas com P-MAPA mantiveram inalterados a viabilidade e ciclo celular como analisado por citometria de fluxo (figura 26), e não mostraram sinais de alteração morfológica ou perda de adesão visível ao microscópio de luz (figura 27, página 74).

Figura 26. Efeito do P-MAPA na viabilidade celular e distribuição do ciclo celular em células de melanoma B16F10.

Células B16F10 (10^5 células/poço) foram semeadas em placa de cultura de 12 poços, tratadas por 24h com concentrações indicadas de P-MAPA, coletadas e marcadas com iodeto de propídio (PI). **(A)** A distribuição da intensidade de fluorescência das células marcadas foi analisada por citometria de fluxo. As fases sub-G1, G0G1, S-G2M foram separadas utilizando as marcas ("gate") M0, M1 e M2, respectivamente. **(B)** A porcentagem de células em sub-G1 e a relação entre G0G1/SG2M foram quantificadas. Controle de veículo (Dimetil sulfoxido 0,6% -DMSO em meio de cultura RPMI-1640). Os dados são expressos como as médias $\pm$ erro padrão. n, Número de replicatas por condição. Viabilidade celular e ciclo celular – Nenhuma diferença significativa entre os grupos.

Figura 27. Morfologia da linhagem celular de melanoma murino B16F10 frente ao tratamento com P-MAPA.

Fotomicrografias por inversão de células B16F10 na passagem seriada de número 70, após 24h de exposição a P-MAPA diluído em meio RPMI 1640 completo com DMSO 0,6%, em diferentes concentrações. No grupo experimental controle, as células B16F10 foram mantidas em cultura com meio RPMI 1640 completo corrigido com DMSO 0,6%, por 24h. Observar o aspecto epitelióide e fusiforme dessas células, em aderência ao fundo da placa de cultura celular. Aumento 200X

Em adição ao estudo em que o P-MAPA foi utilizado como possível monoterapia para o tratamento do melanoma B16F10, a segunda parte dessa produção acadêmica/ científica apresenta o desempenho dos fármacos P-MAPA e MRB-CFI-1, agonistas dos receptores do tipo *Toll* (TLRs) e semelhantes em estrutura e função, quanto à inibição e prevenção de tumores B16F10 implantados, em modelos de vacinação.

5.5 APLICAÇÕES DE AGONISTAS PARA TLRs EM MODELOS VACINAIS PARA MELANOMA MURINO B16F10.

5.5.1 O P-MAPA falha em suprimir o crescimento de tumores B16F10, em esquema terapêutico de vacinação.

Ao final desse experimento (figura 28, página 76), notamos que os animais com tumores e tratados com P-MAPA em combinação com cisplatina (P-MAPA+CIS) apresentaram o maior crescimento tumoral em relação aos outros grupos experimentais, com nenhum benefício do tratamento quimioterápico.

Apesar de não ter sido detectada diferença significativa quando comparados os grupos controle (PBS) e quimioterapia com cisplatina (CIS), ainda assim foi possível verificar na cinética de crescimento tumoral para cisplatina uma tendência à inibição, após a terceira administração intraperitoneal com o quimioterápico sozinho.

Além disso, podemos notar que os grupos de vacinação com o lisado total de células tumorais B16F10 apresentou, até certo ponto, um efeito de inibição do crescimento tumoral em relação aos outros grupos de tratamento, sendo ainda capaz de reverter o efeito pró-tumoral do P-MAPA.

Quanto ao peso médio em gramas dos tumores provenientes desse experimento, observamos um aparente decréscimo no peso dos tumores do grupo tratado com o lisado total de B16F10, sozinho ou em combinação com P-MAPA (0,5mg/Kg), assim como dos tumores provenientes do grupo cisplatina, ao contrário daqueles dos grupos PBS e P-MAPA+CIS (tabela 2, página 76).

Figura 28. Análise do crescimento tumoral de melanomas B16F10 em camundongos C57BL/6 de tipo selvagem, durante vacinação terapêutica com lisado total de células tumorais B16F10 (equivalente à 2×10^5 células lisadas/animal) e/ou P-MAPA (0,5mg/Kg) sozinho ou em combinação com quimioterapia à base de cisplatina (2mg/Kg).

Gráfico representativo de um experimento independente. Os camundongos foram inoculados subcutaneamente com células B16F10 de melanoma murino (2×10^5 células tumorais/100µl). Após os tumores serem palpáveis, os camundongos foram submetidos randomicamente em cinco grupos de tratamento (I, II, III, IV, V). n, número de animais incluídos na análise. A duração do tratamento é indicada pelas setas (setas pretas indicam o primeiro ciclo de tratamento com vacinação subcutânea, enquanto as setas vermelhas indicam o segundo ciclo de tratamento com cisplatina (CIS) intraperitoneal). Os volumes tumorais foram mensurados diariamente a partir do oitavo dia. No grupo controle, os animais foram tratados com o veículo de diluição (PBS). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, teste ANOVA para medidas repetidas, e pós-teste de Bonferroni.

Tabela 2 – Peso médio em gramas (g) de tumores B16F10 em diferentes grupos de tratamento

Grupos Experimentais				
PBS + PBS	PBS + Cisplatina (CIS)	P-MAPA + CIS	Lisado de B16F10 + CIS	P-MAPA/Lisado de B16F10 + CIS
1,4 ± 0,7	0,7 ± 1,3	2,8 ± 0,4	0,8 ± 1,0	0,2 ± 1,5
(n=3)	(n=3)	(n=5)	(n=3)	(n=5)

Os valores são apresentados como a mediana ± desvio quartílico de um experimento independente, referente à figura 28. (n) Tamanho da amostra analisada por grupo, após o término do experimento. Nenhuma diferença significativa entre os grupos, apesar de uma aparente diminuição no peso dos tumores dos grupos CIS e com lisado B16F10; teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

5.5.2 O efeito protetivo do modificador de resposta biológica (MRB-CFI-1) contra o crescimento *In vivo* de tumores B16F10, em esquema profilático de vacinação.

Como apresentado na figura 29 (página 78), a utilização do composto MRB-CFI-1 como adjuvante em esquema profilático de vacinação induziu uma resposta preventiva contra o crescimento do melanoma murino B16F10, principalmente na dose de 0,5mg/Kg.

Elevada incidência tumoral e maiores volumes tumorais foram observados nos animais que receberam PBS nos dias da imunização (controle dos tratamentos), ao contrário do registrado nos outros grupos experimentais em que o surgimento dos tumores foi retardado e seus volumes tumorais foram menores. Tal efeito protetivo de MRB-CFI-1, na dose de 0,5mg/Kg, contra o melanoma B16F10 foi favorecido pela combinação com antígenos totais de células B16F10 lisadas, quando da comparação com o controle PBS. Embora, inicialmente, o composto MRB-CFI-1 na dose de 5mg/Kg tenha retardado o crescimento tumoral em comparação com o controle PBS, ao final do experimento esse efeito foi perdido.

Quanto ao peso médio em gramas dos tumores provenientes desse experimento, observamos um aparente decréscimo no peso dos tumores do grupo tratado com o lisado total de B16F10, sozinho ou em combinação com P-MAPA (0,5mg/Kg) (tabela 3).

Tabela 3 – Peso médio em gramas (g) de tumores B16F10 em diferentes grupos de tratamento

Grupos Experimentais					
PBS	Lisado de B1610	MRB-CFI-1 (0,5mg/Kg)	MRB-CFI-1 (5mg/Kg)	MRB-CFI-1 (0,5mg/Kg) + lisado de B16F10	MRB-CFI-1 (5mg/Kg) + lisado de B16F10
1,8 ± 0,8 (n=8)	0,7 ± 0,6 (n=4)	1,2 ± 0,7 (n=4)	1,2 ± 1,0 (n=8)	0,5 ± 0,5 (n=7)	2,6 ± 1,2 (n=6)

Os valores são apresentados como a mediana ± desvio quartílico de um experimento independente, referente à figura 29. (n) Tamanho da amostra analisada por grupo, após o término do experimento. Nenhuma diferença significativa entre os grupos, apesar de uma aparente diminuição no peso dos tumores dos grupos tratados com lisado de B16F10 e/ou MRB-CFI-1 (0,5mg/Kg); teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunn.

Figura 29. Análise do crescimento tumoral de melanomas B16F10 em camundongos C57BL/6 de tipo selvagem, após vacinação profilática com lisado total de células tumorais B16F10 (equivalente a 2×10^5 células lisadas/animal) sozinho ou em combinação com a droga MRB-CFI-1.

(A,B) Incidência tumoral **(A)** e crescimento de melanoma B1610 **(B)**. No dia 14 (seta vermelha), após as vacinações subcutâneas (setas pretas) com lisado de células B16F10 e/ou com a droga MRB-CFI-1 (doses de 0,5mg/Kg e 5mg/Kg), os camundongos nos diferentes grupos de tratamento (I, II, III, IV, V, VI) foram desafiados subcutaneamente com 2×10^5 células viáveis de melanoma B16F10. Os volumes tumorais foram mensurados diariamente a partir do dia 21. n, número de animais incluídos na análise. No grupo controle, os animais foram tratados com o veículo de diluição (PBS). O painel superior direito, em **(B)**, mostra fotografias representativas dos tumores B16F10 nos diferentes grupos de tratamento. A significância estatística foi determinada pelo teste ANOVA para medidas repetidas, e pós-teste de Bonferroni ((**a**) indica $p < 0,001$ para I versus II; (**b**) indica $p < 0,01$ para I versus III; (**c**) indica $p < 0,05$ para I versus IV; (**d**) indica $p < 0,001$ para I versus V; (**e**) indica $p < 0,05$ para V versus VI).

Figura 30. Resumo de resultados.

Para maiores informações, ler o capítulo- Resultados.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A lista de agonistas para os receptores do tipo *Toll* (TLRs) em imunoterapia do câncer, assim como o número de fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios liberados após conexão desses ligantes aos seus receptores, é enorme.^{55, 56, 57, 58}

Com relação aos ligantes de TLR- 2 e -4, prováveis receptores envolvidos com os compostos utilizados em nosso trabalho, diferentes preparações purificadas a partir de componentes da parede celular de microrganismos vêm demonstrando potenciais anticâncer, quer como monoterapia ou como adjuvantes para vacinação. Por exemplo, SMP-105 (uma preparação de componentes da parede celular de *Mycobacterium bovis* BCG- Tokyo) junto com células inativadas de carcinoma pulmonar de Lewis (3LL) induziram atividade anticâncer no modelo tumoral 3LL em camundongos pela ativação de TLR-2, capaz de montar respostas imunes do tipo-Th1, sem a contribuição de TLR-4.⁵⁹

Em pacientes com melanoma, um ensaio clínico de fase I está em andamento para avaliar os efeitos de uma vacina de peptídeo combinada com lipopolissacarídeo (LPS ou endotoxina - ligante natural de TLR-2 e -4) e um adjuvante à base de óleo mineral, sobre o sistema imune (identificador NCT01585350, fonte www.clinicaltrials.gov). Ainda no cenário de melanoma, o ligante OM-174 (lipídeo A purificado de *Escherichia coli*) para TLR-2 e -4 mostrou atividade antitumoral mediada por células matadoras naturais (Natural Killer –NK) e linfócitos T citotóxicos, sozinho ou em associação com a droga citostática ciclofosfamida, no modelo murino de melanoma B16.⁶⁰

O composto de origem fúngica P-MAPA (estimulador de TLR-2 e -4) também demonstrou em trabalhos anteriores resultados animadores como um fármaco anticâncer, melhorando as respostas imunes. Em tumor ascítico de Ehrlich, o P-MAPA (5,0mg/Kg – dose ótima biologicamente ativa) aumentou para 27 dias a sobrevivência de camundongos com tumores e ao mesmo tempo reduziu em 50% o crescimento tumoral, possivelmente pelo efeito estimulador do composto sobre a mielopoiese.⁵⁰ Ainda neste modelo tumoral, o P-MAPA restaurou funções imunes de células esplênicas em camundongos portadores de tumor, tais como a proliferação de linfócitos estimulados por mitógeno, atividade aumentada de células NK e

aumento da produção de citocinas (IL-2 e IFN- γ), acompanhada da redução em 35% na esplenomegalia desses animais.⁶¹

Em modelos animais para tumores metastáticos, como tumores transplantáveis 3LL e carcinoma renal murino (RENCA), o P-MAPA (5mg/Kg ao dia) aumentou a sobrevida e regrediu o crescimento tumoral em 60%, como também diminuiu o número de metástases pulmonares de camundongos C57BL/6.⁶²

No modelo animal de carcinogênese urotelial induzida pelo carcinógeno químico N-metil-N-nitrosouréia (MNU), o P-MAPA restaurou as características morfológicas do trato urinário à condição normal, e aumentou o nível de expressão das proteínas p53, TLR-2/ -4, e proteínas da via de sinalização de interferon em extratos de bexiga urinária de camundongos com câncer e tratados com o composto, sem demonstrar evidências para hepatotoxicidade e nefrotoxicidade.^{54, 63}

Os resultados positivos que demonstraram a ação de estimuladores de respostas imunes eficazes contra o câncer via TLR-2 e -4, em especial os efeitos imunomoduladores do P-MAPA capazes de restaurar os mecanismos efetores de respostas imunes de um estado imunossupressor em diversos modelos de câncer, nos interessaram em investigar o desempenho do P-MAPA em melanoma murino B16F10.

Ao invés de atividade anticâncer, os nossos resultados mostraram que os animais portando tumores B16F10 e sendo tratados com P-MAPA não foram beneficiados por tal tratamento, quer como monoterapia ou em combinação ao quimioterápico cisplatina, quer baseado nas vias de administração intraperitoneal ou subcutânea/ intratumoral. Tais locais de administração do fármaco foram escolhidos por serem reconhecidos sítios de amplas respostas imunes mediadas por efetores de imunidade inata e celular/ humoral, uma vez que estruturas de patógenos são reconhecidas como “sinal de perigo” pelos receptores *Toll* na superfície de células apresentadoras de antígeno, mas pelo que nos parece tais respostas não foram estimuladas pelo P-MAPA.^{64, 65, 66, 67}

Os resultados no modelo *In vivo* para o melanoma B16F10 que demonstraram o insucesso do P-MAPA como imunoterapia sistêmica e local em combinação com cisplatina, embora contrários às observações de sucesso dessa mesma combinação em diminuir as lesões neoplásicas uroepitelial em 80% dos animais com câncer de bexiga não músculo invasivo, dão apoio aos achados experimentais que mostraram

nenhum benefício da combinação de P-MAPA e doxorrubicina em restaurar as características histológicas da bexiga urinária após lesões neoplásicas.⁶⁸

Uma possível explicação para o insucesso do P-MAPA como imunoterapia para o melanoma B16F10 pode ser o desequilíbrio dos mecanismos de controle das respostas imunes em direção aos estímulos imunossupressores, como é observado no curso normal das respostas imunológicas que passam a ser reguladas por mecanismos inibitórios que garantem a sua homeostasia. De fato, a aplicação sistêmica de lipopeptídeos Pam2 (agonistas do complexo TLR-2/ -6) em modelo murino B16 não foi eficaz em retardar o crescimento de tumores implantados, sendo tal observação atribuída aos mecanismos de supressão imune, já que os compostos induziram a liberação de IL-10 dependente de TLR-2 com a promoção de células T regulatórias.⁶⁹

Outra explicação para a falha terapêutica do P-MAPA pode ser pensada com base na diminuição do mecanismo de ação desse composto em disparar a sinalização de interferon- γ via *TLRs*, no contexto de tumores de melanoma e em associação à cisplatina. Num estudo em que amostras de melanoma de pacientes irresponsivos à imunoterapia com ipilimumabe foram avaliadas, os autores observaram que o mecanismo de resistência tumoral frente a esse tratamento foi devido à falta de sinalização pela via de interferon- γ .⁷⁰ Na mesma direção, outros autores investigaram os efeitos da cisplatina em combinação com agonistas de *TLRs* em células dendríticas, e concluíram um estado tolerogênico para essas células induzido por cisplatina numa maneira dose-dependente, aumentando a produção da molécula imunossupressora IL-10 (via sinalização por p38 MAPK e NF- κ B) e diminuindo os níveis de moléculas produzidas por células imunes ativadas (interferon- γ , IL-17A, IL-2).⁷¹

Em nossos resultados, além de observarmos uma maior carga tumoral associada ao tratamento com P-MAPA em relação aos outros grupos experimentais, ainda notamos alterações microambientais que podem impactar negativamente na sinalização TLR, tais como: maior número de áreas de morte celular; aumento de constituintes do sistema colágeno; e modulação positiva de moléculas de adesão do tipo caderinas.

A elevação das áreas de morte celular nos tumores de tratamento com P-MAPA, como possível consequência do crescimento tumoral desenfreado, pode ser

pensada como um possível mecanismo de resistência das células tumorais as ações de agonistas de TLRs. Sabe-se que até mesmo em massas tumores pequenas de $1,5 \text{ mm}^3$ ($\sim 10^6$ células) a captação de oxigênio e glicose pelas células tumorais é deficiente, tornando-as hipóxicas e com um perfil metabólico glicolítico.⁷² A dependência ao metabolismo da glicólise pode tornar as células tumorais mais resistentes aos mecanismos de ação de agonistas TLR e a drogas citotóxicas, em que células em condições de hipóxia podem ativar o fator de transcrição (HIF)-1 que por sua vez controla genes para fatores imunossupressores como IL-10, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento transformante- β (TGF- β) e cicloxigenase-2 (COX-2).⁷³

Além da relação entre mudança metabólica em células tumorais e a baixa eficácia de agonistas TLR, outra possível explicação para o baixo desempenho do P-MAPA pode ter sido a tolerância das células tumorais viáveis aos mecanismos imunes estimulados por sinalização TLR, através de morte celular. Células em processo de morte podem desviar o perfil de morte imunogênica para um perfil de morte tolerogênica mediante a inativação de DAMPs, como ocorre na oxidação de HMGB1 (proteína do grupo de alta mobilidade-1) por ativação de caspase e produção de espécies reativas de oxigênio por células em apoptose, como também através da liberação de citocinas anti-inflamatórias por células em apoptose ou por macrófagos induzidos por células apoptóticas que direcionam as respostas imunes para o perfil Th2, portanto pró-tumoral.⁷⁴

Devido aos elevados pesos médios em gramas e, principalmente, ao endurecimento dos tumores do grupo P-MAPA registrados em comparação aos outros grupos de tratamento, inicialmente tentamos associar essas alterações com fibrose, através da marcação para depósitos de fibras colágenas e pela detecção de alfa-actina de músculo liso (α -SMA).

A fibrose é o resultado da deposição excessiva de componentes da matriz extracelular em órgãos e tecidos como uma consequência da proliferação e ativação de fibroblastos e miofibroblastos (fibroblastos- α -SMA⁺), em que reações imunológicas preferencialmente do tipo Th2 disparam as propriedades pró-fibróticas dessas células.⁷⁵ No modelo de fibrose da pele induzida pelo antineoplásico bleomicina em camundongos com desenvolvimento deficiente de linfócitos Th1 em comparação ao grupo controle, foi demonstrado nesses animais um

desenvolvimento de fibrose mais extensa com acumulação de células inflamatórias associadas com o perfil de citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, TGF- β), indicando que a presença de resposta Th1 é importante no controle da fibrose.⁷⁶

Nossos resultados histológicos para os marcadores de fibrose citados acima mostraram que não ocorreu alteração entre os grupos experimentais, apesar de detectarmos alterações macroscópicas indicativas de efeito fibrogênico nas peças tumorais do grupo tratado com P-MAPA. Em trabalho anterior, instilação local com P-MAPA em carcinoma de bexiga não músculo invasivo demonstrou a ocorrência de áreas de cicatrização (fibrose) na parede da bexiga urinária dos grupos tratados com o composto.⁶³

Embora fibras colágenas espessas não tenham sido detectadas nas regiões intratumorais dos grupos experimentais, o sistema de fibras reticulares foi aumentado no grupo tratado com P-MAPA em comparação ao controle de tratamento. Tal resultado é importante para explicar a alteração microambiental por endurecimento dos tumores do grupo P-MAPA, ao que pode favorecer na falha terapêutica do composto. Dado da literatura tem demonstrado a indução de fibrose por acúmulo de reticulina como indicador da promoção tumoral, na leucemia de células pilosas.⁷⁷

Ainda nesse sentido, os tumores do grupo P-MAPA demonstraram, aparentemente, uma maior expressão de moléculas de tipo caderinas nos contatos célula-célula, em comparação aos outros grupos. Esse resultado também dar suporte racional de que a maior adesividade dos contatos célula-célula pôde ter contribuído para a maior rigidez observada nos tumores do grupo P-MAPA, e a literatura mostra diversas funções para o eixo caderinas- integrinas- e citoesqueleto de actina como crucial para promover estabilidade juncional célula-célula, e remodelamento de matiz extracelular com variações na mecano-sinalização, funções que podem se correlacionar com o estado fibrogênico de tecidos.^{78, 79, 80}

Observamos que os efeitos estimulados pelo P-MAPA estiveram na dependência da via TLR dependente da proteína adaptadora MyD88. Neste cenário, já é conhecido que a sinalização através de MyD88 pode ativa o fator nuclear κ B (NF- κ b) que em câncer pode manter o fenótipo imunossupressor de macrófagos associados ao tumor (polarização M2), e além disso, pela ativação de NADPH

oxidase e arginase-1 é responsável pela função supressora de células supressoras de origem mieloide que limitam os efeitos de imunoterapias anticâncer.^{81, 82}

Por fim, o análogo estrutural MRB-CFI-1 na dose de 5mg/Kg não apresentou efeito prolongado em prevenir o crescimento tumoral B16F10, mas em dose baixa de 0,5mg/Kg foi capaz de atrasar o crescimento tumoral e quando associado à antígenos tumorais o seu efeito ainda foi melhorado. Similarmente, a utilização de um agonista de receptor Toll-like (Poly I:C) como adjuvante para vacina de lisado celular B16 conferiu proteção contra a formação tumoral, exercendo seus efeitos mediado por potente imunidade antitumoral.⁸³

Acredita-se que a ação do MRB-CFI-1 sobre o microambiente tumoral é mediada por ativação local do sistema imune, e dados da literatura tem demonstrado que a administração intratumoral de compostos de fosfato ativa o sistema imune no microambiente tumoral, ao qual pode explicar as respostas antitumorais nos camundongos imunizados com esse composto.^{84, 85}

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Em dose baixa ou alta, nos esquemas terapêuticos para tratamento sistêmico e/ou local de melanoma murino com P-MAPA, quer como adjuvante em vacina de lisado total de células tumorais ou como monoterapia, o composto não foi eficaz em desacelerar o crescimento tumoral e antagonizou o efeito anticâncer da cisplatina. Ainda, o P-MAPA em dose alta como tratamento terapêutico provocou mudanças microambientais nos tumores que apontam para promoção tumoral, via ligação TLR na dependência de Myd88. Igualmente em dose alta, o composto fosfato inorgânico MRB-CFI-1 (sintético estrutural do P-MAPA) não preveniu o crescimento do melanoma murino B16F10 ainda que como adjuvante com vacina tumoral total; porém, em dose baixa foi eficaz na prevenção deste tipo de tumor, e com melhor desempenho quando em associação com antígenos tumorais totais. Assim, o presente estudo foi importante por ampliar o entendimento funcional do P-MAPA numa abordagem imunoquimioterápica em modelos biológicos de tumores de melanoma, e representa uma importante mudança na utilização, em doses baixas, de constituintes individuais similares ao P-MAPA que sejam mais eficazes contra tumores, de fácil obtenção, e de produção controlada e garantida.

REFERÊNCIAS¹

1. Karamanou, M. et al. Sir Robert Carswell (1793-1857): coining the term "melanoma". **J BUON**, v. 17, n. 2, p. 400-402, Apr-Jun. 2012.
2. Wainstein, AJA; Belfort, FA. Conduta para o melanoma cutâneo. **Rev.Col.Bras.Cir**, v. 31, n. 3, p. 204-214, Mai-Jun. 2004.
3. Shain, AH; Bastian, BC. From melanocytes to melanomas. **Nat Rev Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345-358, Jun. 2016.
4. Zaidi, MR; Day, CP; Merlino, G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. **J Invest Dermatol**, v. 128, n. 10, p. 2381-2391, Oct. 2008.
5. Shitara, D. et al. Nevus-associated melanomas: clinicopathologic features. **Am J Clin Pathol**, v.142, n.4, p. 485-491, Oct. 2014.
6. Bevona, C. et al. Cutaneous melanomas associated with nevi. **Arch Dermatol**, v. 139, n. 12, p. 1620-1624, Dec. 2003.
7. Cui, R. et al. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. **Cell**, v. 128, n. 5, p. 853-864, Mar. 2007.
8. Whiteman, DC. et al. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 95, n. 11, p. 806-812, Jun. 2003.
9. Estimativa 2016, Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/dncc>>. Acesso em: 07 Oct. 2017.
10. Cancer Stat Fact: Melanoma of the Skin. National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Disponível em: <<http://seer.cancer.gov/>>. Acesso em: 07 Oct. 2017.
11. Raigani, S; Cohen, S; Boland, GM. The Role of Surgery for Melanoma in an Era of Effective Systemic Therapy. **Curr Oncol Rep**, v. 19, n. 3, p. 1-17, Mar. 2017.
12. Weide, B. et al. Prognostic factors of melanoma patients with satellite or in-transit metastasis at the time of stage III diagnosis. **PLoS One**, v. 8, n. 4, e63137, Apr. 2013.
13. Morton, DL. et al. Final Trial Report of Sentinel-Node Biopsy versus Nodal Observation in Melanoma. **N Engl J Med**, v. 370, n. 7, p. 599-609, Feb. 2014.
14. Jilaveanu, LB; Aziz, SA; Kluger, HM. Chemotherapy and biologic therapies for melanoma: do they work?. **Clin Dermatol**, v. 27, n. 6, p. 614-625, Nov-Dec. 2009.
15. Glover, D. et al. Phase II randomized trial of cisplatin and WR-2721 versus cisplatin alone for metastatic melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E1686). **Melanoma Res**, v. 13, n. 6, p. 619-626, Dec. 2003.

¹ De acordo com a ABNT. NBR 6023

16. Florea, AM; Büsselberg, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. **Cancers (Basel)**, v. 3, n. 1, p. 1351-1371, Mar. 2011.
17. Boulikas, T; Vougiouka, M. Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs (review). **Oncol Rep**, v. 11, n. 3, p. 559-595, Mar. 2004.
18. Cepeda, V. et al. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 7, n. 1, p. 3-18, Jan. 2007.
19. Zito, CR; Kluger, HM. Immunotherapy for metastatic melanoma. **J Cell Biochem**, v. 113, n. 3, p. 725-734, Mar. 2012.
20. Ascierto, PA; Streicher, HZ; Sznol, M. Melanoma: a model for testing new agents in combination therapies. **J Transl Med**, v. 8, n. 38, p. 1-7, Apr. 2010.
21. Delany, I; Rappuoli, R; De Gregorio, E. Vaccines for the 21st century. **MBO Mol Med**, v. 6, n. 6, p. 708-720, Jun. 2014.
22. Neller, MA; López, JA; Schmidt, CW. Antigens for cancer immunotherapy. **Semin Immunol**, v. 20, n. 5, p. 286-295, Oct. 2008.
23. Chiang, CL; Coukos, G; Kandalaft, LE. Whole Tumor Antigen Vaccines: Where Are We?. **Vaccines (Basel)**, v. 3, n. 2, p. 344-372, Apr. 2015.
24. González, FE. et al. Tumor cell lysates as immunogenic sources for cancer vaccine design. **Hum Vaccin Immunother**, v. 10, n. 11, p. 3261-3269. 2014.
25. Sauter, B. et al. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. **J Exp Med**, v. 191, n. 3, p. 423-434, Feb. 2000.
26. Szatmary, Z. Molecular biology of toll-like receptors. **Gen Physiol Biophys**, v. 31, n. 4, p. 357-366, Dec. 2012.
27. Rakoff-Nahoum, S; Medzhitov, R. Toll-like receptors and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 1, p. 57-63, Jan. 2009.
28. Means, TK; Golenbock, DT; Fenton, MJ. The biology of Toll-like receptors. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 11, n. 3, p. 219-232, Sep. 2000.
29. Pasare, C; Medzhitov, R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. **Adv Exp Med Biol**, v. 560, p. 11-18, 2005.
30. Iwasaki, A; Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat Immunol**, v. 5, n. 10, p. 987-995, Oct. 2004.
31. Pasare, C; Medzhitov, R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. **Nature**, v. 438, n. 7066, p. 364-368, Nov. 2005.
32. Roach, JM. et al. Phylogeny of Toll-like receptor signaling: adapting the innate response. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. 1-8, Jan. 2013.

33. Kimbro, K; Parker, S. Recent patents in Toll-like receptor pathways and relevance to cancer. **Recent Pat Anticancer Drug Discov**, v.4, n. 3, p. 189-195, Nov. 2009.
34. Mahla, RS. et al. Sweeten PAMPs: Role of Sugar Complexed PAMPs in Innate Immunity and Vaccine Biology. **Front Immunol**, v. 4, n. 248, p. 1-16, Set. 2013.
35. Vacchelli, E. et al. Trial Watch: FDA-approved Toll-like receptor agonists for cancer therapy. **Oncoimmunology**, v. 1, n. 6, p. 894–907, Set. 2012.
36. Patel, SG. et al. Intravesical therapy for bladder cancer. **Expert Opin Pharmacother**, v. 16, n. 6, p. 889-901, Apr 2015.
37. Gupta, AK.; Browne, M.; Bluhm, R. Imiquimod: a review. **J Cutan Med Surg**, v. 6, n. 6, p. 554-560, Nov-Dec. 2002.
38. Iseu da Silva Nunes, Giselle Zenker Justo, Nelson Eduardo Duran Caballero. **Protein aggregate magnesium-ammonium phospholinoleate-palmitoleate anhydride immunomodulator, its production process and formulation**. US 2006/0093628 A1, 4 May 2006.
39. Iseu da Silva Nunes, Giselle Zenker Justo, Nelson Eduardo Duran Caballero. **Novo imunomodulador: Agregado proteico de anidrido de fosofolinoleato- palmitoleato de amônio e magnésio e processo de sua obtenção e formulação**. Brasil 0305373-3, 6 Nov 2003.
40. de Melo, A; Justo, GZ; de Souza Queiroz, ML. Stimulation of myelopoiesis in *Listeria monocytogenes*-infected mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **Hum Exp Toxicol**, v. 20, n. 1, p. 38-45, Jan. 2001.
41. Bromberg, N. et al. Macrophage nitric oxide (NO) stimulation by an immunomodulator: P-MAPA. In: Nitric Oxide, 14., 2006. **Posters...** 2006. p. A27-A38.
42. Durán, N. et al. A biotechnological product and its potential as a new immunomodulator for treatment of animal phlebovirus infection: Punta Toro virus. **Antiviral Res**, v. 83, n. 2, p. 143-147, Aug. 2009.
43. Santiago, ME. et al. Improvement in clinical signs and cellular immunity of dogs with visceral leishmaniasis using the immunomodulator P-MAPA. **Acta Trop**, v. 127, n. 3, p. 174-180, Sep. 2013.
44. Melo, LM. Effects of P-MAPA immunomodulator on Toll-like receptor 2, ROS, nitric oxide, MAPKp38 and IKK in PBMC and macrophages from dogs with visceral leishmaniasis. **Int Immunopharmacol**, v. 18, n. 2, p. 373-378, Fev. 2014.
45. Wagner José Fávaro, Nelson Eduardo Duran Caballero. **Processo de obtenção de complexo nanoestruturado (CFI-1), complexo nanoestruturado associado à proteína (MRB-CFI-1) e uso**. INOVA UNICAMP Brasil 1020170127680, 2017.
46. Ohndorf, UM. et al. Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins. **Nature**, v. 399, n. 6737, p. 708-712, Jun. 1999.
47. Adachi, O. et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. **Immunity**, v. 9, n. 1, p. 143-150, Jul. 1998.

48. American Veterinary Medical Association. **AVMA** Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. Schaumburg, p. 1-102, 2013.
49. FIDLER, I. J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. **Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 218-224, Jan. 1975.
50. Justo, GZ; Durán, N; Queiroz, ML. Myelopoietic response in tumour-bearing mice by an aggregated polymer isolated from *Aspergillus oryzae*. **Eur J Pharmacol**, v. 388, n. 3, p. 219-226, Feb. 2000.
51. Reagan-Shaw, S.; Nihal, M.; Ahmad, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB J**, v. 22, n. 3, p. 659-661, Mar. 2008.
52. US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). **Guidance for Industry**: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Rockville, MD, p. 1-27, Jul. 2005.
53. National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Database CID 104981**. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/104981>>. Acesso em: 08 Nov. 2017.
54. Fávaro, WJ. et al. Effects of P-MAPA Immunomodulator on Toll-Like Receptors and p53: Potential Therapeutic Strategies for Infectious Diseases and Cancer. **Infect Agent Cancer**, v.7, n. 1, p. 1-14, Jun. 2012.
55. Aranda, F. et al. Trial Watch: Toll-like receptor agonists in oncological indications. **Oncoimmunology**, v. 3, p. 1-10, May. 2014.
56. Vacchelli, E. et al. Trial Watch: Toll-like receptor agonists for cancer therapy. **Oncoimmunology**, v. 2, n. 8, p. 1-14, Aug. 2013.
57. Galluzzi, L. et al. Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. **Oncoimmunology**, v. 1, n. 5, p. 699-716, Aug. 2012.
58. Lu, H. TLR Agonists for Cancer Immunotherapy: Tipping the Balance between the Immune Stimulatory and Inhibitory Effects. **Front Immunol**, v. 5, n. 83, p. 1-4, Mar. 2014.
59. Murata, M. Activation of Toll-like receptor 2 by a novel preparation of cell wall skeleton from *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo (SMP-105) sufficiently enhances immune responses against tumors. **Cancer Sci**, v. 99, n. 7, p. 1435-1440, Jul. 2008.
60. D'Agostini, C. et al. Antitumour effect of OM-174 and cyclophosphamide on murine B16 melanoma in different experimental conditions. **Int Immunopharmacol**, v. 5, n. 7-8, p. 1205-1212, Jul. 2005.
61. Justo, GZ; Durán, N; Queiroz, ML. Natural killer cell activity, lymphocyte proliferation, and cytokine profile in tumor-bearing mice treated with MAPA, a magnesium aggregated polymer from *Aspergillus oryzae*. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 25, n. 3, p. 305-319, Aug. 2003.

62. Farmabrasilis. Modelos animais para estudo do câncer – Carcinoma pulmonar de Lewis, 2008. Disponível em: <http://farmabrasilis.org.br/todos_conteudos_interna.php?idioma=br&id=161#>. Acesso em: 8 Nov. 2017.
63. Garcia, PV. et al. Alterations in ubiquitin ligase Siah-2 and its corepressor N-CoR after P-MAPA immunotherapy and anti-androgen therapy: new therapeutic opportunities for non-muscle invasive bladder cancer. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 5, p. 4427-4443, May. 2015.
64. Holmgren, J; Czerkinsky, C. Mucosal immunity and vaccines. **Nat Med**, v. 11, p. 45-53, Apr. 2005.
65. Heath, WR; Carbone, FR. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. **Nat Immunol**, v. 14, n. 10, p. 978-985, Oct. 2013.
66. Woo, SR; Corrales, L; Gajewski TF. Innate immune recognition of cancer. **Annu Rev Immunol**, v. 33, p. 445-474, Jan. 2015.
67. Grauer, OM. et al. TLR ligands in the local treatment of established intracerebral murine gliomas. **J Immunol**, v. 181, n. 10, p. 6720-6729, Nov. 2008.
68. Dias, QC. et al. Potential therapeutic strategies for non - muscle invasive bladder cancer based on association of intravesical immunotherapy with p - mapa and systemic administration of cisplatin and doxorubicin. **Int Braz J Urol**. v. 42, n. 5, p. 942-954, Set-Oct. 2016.
69. Yamazaki, S. et al. TLR2-dependent induction of IL-10 and Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells prevents effective anti-tumor immunity induced by Pam2 lipopeptides in vivo. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. 1-10, Apr. 2011.
70. Gao, J. et al. Loss of IFN- γ Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 397-404, Oct. 2016.
71. Kim, WS. et al. Cisplatin induces tolerogenic dendritic cells in response to TLR agonists via the abundant production of IL-10, thereby promoting Th2- and Tr1-biased T-cell immunity. **Oncotarget**, v. 7, n. 23, p. 33765-33782, Jun. 2016.
72. Gatenby, RA; Gillies, RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis?. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 11, p. 891-899, Nov. 2004.
73. Spaner, DE. et al. Obstacles to effective Toll-like receptor agonist therapy for hematologic malignancies. **Oncogene**, v. 27, n. 2, p. 208-217, Jan. 2008.
74. Green, DR. et al. Immunogenic and tolerogenic cell death. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 5, p. 353-363, May. 2009.
75. Wick, G. et al. The immunology of fibrosis. **Annu Rev Immunol**, v. 31, p. 107-135, 2013.
76. Lakos, G. et al. Increased bleomycin-induced skin fibrosis in mice lacking the Th1-specific transcription factor T-bet. **Pathobiology**, v. 73, n. 5, p. 224-237, Sept. 2006.
77. Shehata, M. et al. TGF-beta1 induces bone marrow reticulin fibrosis in hairy cell leukemia. **J Clin Invest**, v. 113, n. 5, p. 676-685, Mar. 2004.

78. Mui, KL; Chen, CS; Assoian, RK. The mechanical regulation of integrin-cadherin crosstalk organizes cells, signaling and forces. **J Cell Sci**, v. 129, n. 6, p. 1093-10100, Mar. 2016.
79. Leckband, DE; de Rooij, J. Cadherin adhesion and mechanotransduction. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 30, p. 291-315, Oct. 2014.
80. Mertz, AF. et al. Cadherin-based intercellular adhesions organize epithelial cell-matrix traction forces. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 3, p. 842-847, Jan. 2013.
81. Hagemann, T. et al. "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. **J Exp Med**, v. 205, n. 6, p. 1261-1268, Jun. 2008.
82. Hong, EH. et al. Blockade of Myd88 signaling induces antitumor effects by skewing the immunosuppressive function of myeloid-derived suppressor cells. **Int J Cancer**, v. 132, n. 12, p. 2839-2848, Jun. 2013.
83. Lin, B. et al. B16 cell lysates plus polyinosinic-cytidylic acid effectively eradicate melanoma in a mouse model by acting as a prophylactic vaccine. **Mol Med Rep**, v. 10, n. 2, p. 911-916, Aug. 2014.
84. Shirota, Y; Shirota, H; Klinman, DM. Intratumoral injection of CpG oligonucleotides induces the differentiation and reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. **J Immunol**, v. 188, n. 4, p. 1592-1599, Feb. 2012.
85. Corrales, L. et al. Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. **Cell Rep**, v. 11, n. 7, p. 1018-1030, May. 2015.

ANEXOS

ANEXO A – Carta de aprovação emitida pela Comissão de Ética no Uso de Animais-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 19/12/13, **APROVOU Ad Referendum** o Protocolo de Pesquisa nº 540/13 intitulado: “Desvio da resposta imunológica deflagrada por morte celular em melanoma experimental pelo imunoestimulador P-MAPA: uma potencial estratégia antitumoral dependente da ativação de receptores toll-like?” apresentado pelo Departamento de Radiologia e Oncologia.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CEUA-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, de acordo com 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: Adalberto Alves Martins Neto

CEUA-FMUSP, 19 de Dezembro de 2013

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética em Uso de Animais

ANEXO B – Carta de aprovação emitida pela Comissão de Ética no Uso de Animais-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

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 **“Desvio da resposta imunológica deflagrada por morte celular em melanoma experimental pelo imunomodulador P-MAPA: (Parte 2 - uma potencial estratégia antitumoral no contexto de adjuvância em processo vacinal?)”**, registrada com o nº **009/17**, sob a responsabilidade de **Roger Chammas e Adalberto Alves Martins Neto**, apresentada pelo Departamento de Radiologia e Oncologia - 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 22.03.17

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 09-01-2017 Término: 09-07-2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongo C57Bl/6
Nº de animais	49
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

CEUA-FMUSP, 22 de Março de 2017

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

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua.fm@usp.br

ANEXO C – Carta de aprovação emitida pela Comissão Interna de Biossegurança do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

Departamento de Radiologia
Av. Dr Eneas de Carvalho Aguiar, 255 – 3º Andar – sala 2.11
CEP 05403-000
São Paulo – SP- Brasil
Fone/Fax: (11) 2661-7064

APROVAÇÃO

A Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, APROVOU, em 12 de fevereiro de 2014, projeto: Desvio da resposta imunológica deflagrada por morte celular em melanoma experimental pelo imunoregulador P-MAPA: uma potencial estratégia antitumoral dependente da ativação de receptores toll-like?; Pesquisador responsável: Prof Dr Roger Chammas. Pesquisador executante: Adalberto Alves Martins Neto. Finalidade: Doutorado

São Paulo, 17 de fevereiro de 2014

Profª Drª Maria Aparecida Nagai
Presidente da Comissão interna de Biossegurança
Departamento de Radiologia – FMUSP
CQB 0084/98

ANEXO D – Análise histoquímica pela coloração de Tricrômio de Masson para avaliar fibras colágenas, em cortes de tumores murino B16F10 de diferentes grupos de tratamento.

Regiões intratumorais, independente dos grupos de tratamento, apresentaram fraca marcação para colágenos (secções representativas, por grupo de tratamento: A, B, C, D). Intensa marcação positiva foi visualizada nas regiões capsulares de todos os grupos de tratamento (secção representativa: E – deposição de fibras colágenas, em azul, no grupo de tratamento com cisplatina). As marcações tumorais foram realizadas nas amostras do experimento da Figura 14. Aumento x200.

ANEXO E – Análise histoquímica pela coloração de ácido periódico-Schiff e Alcian Blue para avaliar conteúdo glicoproteico, em cortes histológicos de tumores murino B16F10 de diferentes grupos de tratamento.

Regiões intratorais, independente dos grupos de tratamento, apresentaram fraca marcação para glicoproteínas (secções representativas, por grupo de tratamento: B, C, D, E). Em A (controle positivo da reação), fotomicrografia de intestino delgado apresentando intensa marcação *P.A.S* na bordadura em escova da superfície celular (cabeça de seta), e células caliciformes com mucina coradas em azul pelo Alcian Blue (seta longa), devido ao elevado conteúdo de polissacarídeos nestas estruturas. As marcações tumorais foram realizadas nas amostras do experimento da Figura 14. Aumento x200.

ANEXO F – Marcação imunoistoquímica para colágeno do tipo 1 (COL-1) em corte histológico de tumor murino B16F10 tratado com P-MAPA.

As fotomicrografias superiores (A e B) correspondem ao controle negativo da reação, sem incubação com o anticorpo primário. As fotomicrografias inferiores (C e D) correspondem a marcação com anti-COL1 [0,25mg/ml]. A deposição de fibras colágenas (marcação em marrom) foi detectada apenas na região capsular, sendo negativa nas regiões intratumorais. Aumento x200.