



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

JÉSSICA OHANA LEMES CARNEIRO GOETTEN

**Neutrófilos tratados com BJcuL diminuem a capacidade
invasiva de células de neuroblastoma *in vitro***

**CURITIBA
2019**

JÉSSICA OHANA LEMES CARNEIRO GOETTEN

**Neutrófilos tratados com BJcuL diminuem a capacidade
invasiva de células de neuroblastoma *in vitro***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Selene Elifio Esposito

Co-orientadora: Prof. Dra. Patrícia Stuelp-Campelo

CURITIBA
2019

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Edilene de Oliveira dos Santos CRB 9 / 1636

G599n
2019 Goetten, Jéssica Ohana Lemes Carneiro
Neutrófilos tratados com BJcuL diminuem a capacidade invasiva de células
de neuroblastoma in vitro / Jéssica Ohana Lemes Carneiro Goetten ;
orientadora, Selene Elífo Esposito ; coorientadora, Patrícia Stuelp-Campelo.
--2019

71 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2019
Bibliografia: f. 57-66

1. Tumores em crianças – Tratamento. 2. Metástase. 3. Neutrófilos. 4.
Neuroblastoma. I. Elífo-Esposito, Selene Lobo. II. Campelo, Patrícia Stuelp.
III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDD 20. ed. – 618.92994

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho ao meu esposo, Anderson,
que sempre me fez acreditar que eu seria capaz,
e aos meus amados pais, Edinaldo e Silvana,
que me deram todo suporte em suas orações.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, louvo a **Deus** pela oportunidade de finalizar essa etapa acadêmica. Foram muitos momentos em que me vi incapaz de seguir em frente, mas Ele me fortaleceu e não me permitiu desistir.

Agradeço ao meu marido, **Anderson**, que, ajudou-me a conquistar o Marcelino Champagnat durante a graduação, dando-me, assim, a oportunidade de fazer parte desse programa de pós-graduação. Agradeço a paciência e por não dar crédito às minhas inseguranças. Desejo, também, honrar meus pais com esse título. Tudo que angariei até aqui não foi apenas para o meu crescimento, mas como forma de agradecer à educação, amor e dedicação dados a mim pelos meus pais **Edinardo** e **Silvana**. Agradeço pelas orações, pelos abraços reconfortantes, pelas palavras de incentivo e pelo consolo diante dos momentos mais frágeis.

À minha orientadora, Prof. Dra. **Selene Elíffio Espósito**, agradeço o voto de confiança que a mim foi dado desde o início, pois mesmo não nos conhecendo previamente, aceitou que eu fizesse parte do seu seleto grupo de alunos altamente capacitados, academicamente experientes e com alta qualidade de produção. Agradeço por todo o conhecimento que obtive nesses dois anos de mestrado, como aluna e como ser humano. Estendo os meus agradecimentos à minha co-orientadora Prof. Dra. **Patrícia Stuelp-Campelo** que, tão gentilmente, aceitou o convite para contribuir com esse trabalho.

À Dra. **Simone Michaela Simons** do Laboratório de Parasitologia, do instituto Butantan, agradeço pela colaboração com esse projeto.

Agradeço à toda a equipe do Laboratório Experimental Multiusuário que de alguma maneira contribuiu para que essa pesquisa se concretizasse.

A todos os colegas do laboratório, com os quais pude contar como equipe, como pesquisadores e como grandes amigos, agradeço, em especial, ao **Nilton de França Jr.** pelo treinamento; à **Sheron Cogo**, pelo apoio e por torcer pela minha evolução acadêmica e, à **Bruna Rodrigues**, que foi meu braço direito.

Por fim, agradeço à **Capes** pelo suporte financeiro e à **PUCPR** pela infraestrutura.

EPÍGRAFE

*“Se você for uma pessoa que busca realmente a verdade, é necessário que,
ao menos uma vez na vida, duvide de todas as coisas,
da maneira mais profunda possível.”*

(René Descartes)

RESUMO

Neuroblastoma (NB) é um tumor majoritariamente pediátrico com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 40% nos casos mais agressivos, com desenvolvimento de metástase e de doença refratária aos tratamentos disponíveis. Componentes do microambiente tumoral, tais como células do sistema imunológico, contribuem na progressão tumoral, assim, a modulação de células imunes para um perfil pró-inflamatório e antitumoral poderia potencializar a imunoterapia proposta para pacientes oncológicos de alto risco. Estudos anteriores mostraram o potencial antitumoral de BJcuL, uma lectina do tipo C isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*, capaz, também, de induzir respostas imunogênicas. O objetivo do presente estudo foi analisar o efeito de BJcuL na modulação de neutrófilos e a interferência dessas células na migração e invasão *in vitro* de células de NB. Para tal, células da linhagem SK-N-SH foram incubadas com os meios condicionados (MCs) obtidos a partir dos tratamentos de neutrófilos com BJcuL (2,5 µg/ml) e fMLP (10 µM) por 1h e 24h. Foi realizado, também, um co-cultivo de neutrófilos e SK-N-SH com esses mesmos estímulos. A partir desses tratamentos (meio condicionado e co-cultivo) as células tumorais foram testadas quanto a viabilidade pelo teste de Azul de Metileno, migração por *Scratch Wound Healing* e invasão pelo método de *Soft Agar*. No ensaio de viabilidade, apenas neutrófilos tratados com BJcuL por 24h em co-cultivo com SK-N-SH foram citotóxicos. Já a migração das células tumorais aumentou significativamente quando incubadas com os MCs de neutrófilos tratados com BJcuL por 1h ($p=0,0024$) e 24h ($p=0,0123$) e quando em co-cultivo com neutrófilos tratados por 24h com a lectina ($p=0,0003$). Quanto ao teste de invasão, neutrófilos incubados com BJcuL reduziram significativamente a invasão de SK-N-SH tanto em co-cultivo por 1h ($p=0,0005$) e 24h ($p=0,0007$) quanto com os MCs de 1h e 24h (ambos $p<0,0001$). Os dados obtidos demonstram que SK-N-SH mantém o seu potencial migratório frente à modulação de neutrófilos por BJcuL, porém tem sua capacidade invasiva significativamente reduzida. Portanto, esse resultado pode ser explorado a fim de compreender os mecanismos envolvidos nessa ação anti-invasiva e, assim, utilizá-la no combate ao tumor como um coadjuvante da imunoterapia.

ABSTRACT

Neuroblastoma (NB) is a pediatric tumor with a mortality rate of 40% in the most aggressive cases and with development of the metastasis and refractory disease. Tumor microenvironment components as immune cells contribute in the tumor progression; thereby, the modulation of immune cells to a pro-inflammatory and anti-tumoral profile could potentialize the immunotherapy, which is the suggested approach for high-risk patients. Previous studies showed the antitumoral potential of BJcuL, a C-type lectin isolated from *Bothrops jararacussu* venom. It was also able to induce immunogenic responses, promoting the rolling and adhesion of leukocytes and the activation of neutrophils. The aim of this study was to analyze the interference of BJcuL-treated neutrophils on the capacity of migration and invasion *in vitro* of NB cells. For such, SK-N-SH line cells were incubated in a conditioned medium (CMs) obtained from the treatments of neutrophils with BJcuL (2,5 µg/ml) and controls for 1h and 24h. It also was performed, a co-cultivation with neutrophils and SK-N-SH under the same treatments was performed. From those treatments (conditioned medium and co-cultivation) tumor cells were tested for viability by Methylene Blue assay, migration by the Scratch Wound Healing method, and malignancy by the Soft Agar method. In the viability assay, neutrophils treated with BJcuL for 24h in co-cultivation with SK-N-SH were the only cytotoxic condition. The migration of tumor cells increased significantly when incubated with CMs obtained from neutrophils treated with BJcuL for 1h ($p=0,0024$) and 24h ($p=0,0123$). The SK-N-SH cells migration was also increased when the SK-N-SH cells were co-cultivated with neutrophils treated for 24h with the lectin ($p=0,0003$). As for the invasion assay, neutrophils incubated with BJcuL significantly reduced the invasion of SK-N-SH in co-cultivation for 1h ($p=0,0005$) and 24h ($p=0,0007$), as well as when incubated them with the neutrophil conditioned medium for 1h and 24h (both $p<0,0001$). The data show so far that SK-N-SH cells maintain their migratory potential under neutrophil modulation by BJcuL. However, they have a significant decrease in their invasive capacity. Therefore, the malignancy results can be explored to comprehend the mechanisms involved in this anti-invasive action and, thus, use it in combating the tumor as an adjuvant to immunotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
Figura 1. Ilustração do microambiente tumoral e seus componentes	21
Figura 2. Etapas da metástase e a influência de células imunológicas	27
Figura 3. Fluxograma da metodologia aplicada	33
Figura 4. Separação dos neutrófilos por dupla centrifugação	36
Figura 5. Método de <i>Soft Agar</i>	41
Figura 6. Análise da viabilidade de SK-N-SH tratadas com leucócitos e neutrófilos	44
Figura 7. Migração das células SK-N-SH tratadas com BJcuL	45
Figura 8. Migração das células SK-N-SH	47
Figura 9. Invasão das células SK-N-SH tratadas com neutrófilos	49
Figura 10. Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio de neutrófilos	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma (INSS).....	18
Tabela 2. Comparação dos tratamentos iniciais padrão segundo o grupo de risco.....	19
Tabela 3. Células imunológicas e seus tratamentos para obtenção dos meios condicionados.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A-498 – Linhagem de Câncer de Rim;
- A549 – Linhagem de Adenocarcinoma Alveolar;
- AGS – Linhagem de Carcinoma Gástrico;
- ARG2 – Arginase 2;
- Caki-1 – Linhagem de Câncer de Rim;
- CBSs – *Carbohydrate-binding Sites* (Sítios de Ligação de Carboidratos);
- CBDs – *Carbohydrate-binding Domains* (Domínios Ligantes de Carboidratos);
- CFPAC-1 – Linhagem de Câncer de Pâncreas;
- CTCs – *Circulating Tumor Cells* (Células Tumorais Circulantes);
- CTLA-4 – *Cytotoxic T-lymphocyte-associated Antigen 4* (proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico);
- ECM – *Extracellular matrix* (Matriz Extracelular);
- EMT – *Epithelial-mesenchymal Transition* (Transição Epitelial-Mesenquimal);
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio;
- FBS – *Fetal Bovine Serum* (Soro Fetal Bovino);
- fMLP – N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine;
- GCO – *Global Cancer Observatory* (Observatório Global do Câncer)
- GM-CSF – *Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor* (Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Macrófagos);
- HCT116 – Linhagem de Câncer Colorretal;
- HT29 – Linhagem de Câncer Colorretal;
- IARC – *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer);
- ICAM 1 – *Intercellular Adhesion Molecule* (Molécula 1 de adesão intracelular);
- INCA – Instituto Nacional do Câncer;
- IFN – Interferon;
- IL – Interleucina;
- IMR-32 – Linhagem de Neuroblastoma;
- INSS – *International Neuroblastoma Staging System* (Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma);
- KELLY – Linhagem de Neuroblastoma;
- LAN-1 – Linhagem de Neuroblastoma;

MC – Meio condicionado (nomenclatura da autora);
MDSCs – *Myeloid-derived Suppressor Cells* (Células Mieloides Supressoras);
MHC – *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Principal de Histocompatibilidade);
MIK – *Mitosis-karyorrhexis Index* (Índice de Mitose e Cariorrhexis);
MKN45 – Linhagem de Carcinoma Gástrico;
MMPs – *Matrix metalloproteinases* (Matriz Metaloproteinases);
NB – Neuroblastoma;
NETs – *Neutrophil Extracellular Traps* (Redes Extracelulares de Neutrófilos);
NK – Natural Killers (Assassinas Naturais);
OMS – Oncostatin M;
OVCAR-5 – Linhagem de Carcinoma de Ovário;
PBNs – *Peripheral Blood Neutrophils* (Neutrófilos de Sangue Periférico);
PD-1 – *Programmed Cell Death Protein 1* (Receptor 1 de Morte Celular Programada);
PMA - *Phorbol 12-myristate 13-acetate*;
PNT – Peroxinitrito;
RPMI – Meio de Cultivo;
SH-SY-5Y – Linhagem de Neuroblastoma;
SKNAS – Linhagem de Neuroblastoma;
SK-N-SH – Linhagem de Neuroblastoma;
TAMs – Tumor-associated Macrophages (Macrófagos Associados ao Tumor);
TANs – *Tumor-associated Neutrophils* (Neutrófilos Associados ao Tumor);
TGF – *Transforming Growth Factor* (Fator de Transformação de Crescimento);
TME – *Tumor Microenvironment* (Microambiente Tumoral);
TNF – *Tumor Necrosis Factor* (Fator de Necrose Tumoral);
TRAIL – TNF-related Apoptosis-inducing Ligand (ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF);
VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular);

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	67
APÊNDICE B – Imagens do ensaio de migração de células SK-N-SH com neutrófilos tratados por 1h (direto e indireto).....	69
APÊNDICE C – Financiamento e colaborações desta pesquisa.....	70
APÊNDICE D – Outros resultados.....	71

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
EPÍGRAFE	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XI
LISTA DE APÊNDICES	XIII
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Neuroblastoma	16
1.2 Imunoterapia	19
1.3 Microambiente tumoral	20
1.3.1 CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE NO TME	22
1.3.1.1 Neutrófilos.....	22
1.3.1.2 Monócitos/Macrófagos.....	23
1.3.1.3 Linfócitos.....	23
1.4 Metástase e o sistema imune	24
1.4.1 METÁSTASE	24
1.4.2 TOXINAS DERIVADAS DE VENENO DE SERPENTE E SUA AÇÃO CONTRA METÁSTASE.....	27
1.5 Lectinas	28
1.5.1.1 BJcuL.....	28
2. JUSTIFICATIVA	31
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS	32
3.1 Hipótese	32
3.2 Objetivo Geral	32
3.3 Objetivos Específicos	32
4 MÉTODOS	33
4.1 Escolha da Linhagem de Neuroblastoma	34
4.2 Manutenção Celular de Neuroblastoma	34
4.3 Obtenção de células imunes de sangue periférico	34

4.3.1 COLETA DE SANGUE DE VOLUNTÁRIOS.....	34
4.3.2 ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILOS DO SANGUE PERIFÉRICO.....	35
4.4 Purificação da BJcuL.....	37
4.5 Obtenção dos meios condicionados de neutrófilos.....	37
4.6 Ensaios com as células SK-N-SH.....	37
4.6.1 TESTE DE CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO PELO MÉTODO DE <i>SCRATCH WOUND HEALING</i>	37
4.6.1.1 Método direto.....	37
4.6.1.2 Método indireto.....	38
4.6.1.3 Migração de células SK-N-SH tratadas com BJcuL.....	38
4.6.2 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR.....	38
4.6.3 TESTE DE INVASÃO.....	39
4.7 Determinação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular em neutrófilos.....	41
4.8 Análise Estatística.....	42
5 RESULTADOS.....	43
5.1 Análise da Viabilidade de SK-N-SH.....	43
5.2 Análise da Migração de SK-N-SH.....	45
5.2.1 MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS SK-N-SH TRATADAS COM BJcuL.....	45
5.2.2 MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS SK-N-SH FRENTE AO TRATAMENTO COM NEUTRÓFILOS E SEUS MEIOS CONDICIONADOS.....	45
5.3 Invasão das células SK-N-SH tratadas com neutrófilos.....	48
5.4 Determinação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio.....	50
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neuroblastoma

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e estima-se que 1 a cada 5 homens e 1 a cada 6 mulheres ao redor do mundo desenvolverão câncer ao longo da vida, e que, aproximadamente, 12,5% desses homens e 9% dessas mulheres virão a óbito (*Global Cancer Observatory*, 2019). Os tumores malignos mais globalmente diagnosticados são de pele, pulmão, mama e colorretal, enquanto os com maior índice de mortalidade são de pulmão, colorretal, estômago e fígado (Ferlay et al., 2015; *Global Cancer Observatory*, 2019). No Brasil, em 2018, o número de novos casos foi de 559.371, sendo os tumores de mama (15,3%) e próstata (15,2%) os mais frequentes.

O câncer infanto-juvenil (0-19 anos) corresponde de 1 a 4% de todos os tumores malignos na maioria das populações. Nos países desenvolvidos, atinge 1% do total de neoplasias, enquanto em países em desenvolvimento essa proporção representa de 3% a 10% do total de neoplasias (Ferlay et al., 2015; INCA, 2018). No Brasil, em 2015, o câncer infanto-juvenil gerou 2.704 óbitos, sendo considerado a segunda causa de morte nessa faixa etária. Já em 2019, estima-se que ocorrerão 12.500 novos casos no país, atingindo principalmente as regiões Sudeste (5.300) e Nordeste (2.900) (INCA, 2018).

Os tumores infanto-juvenil mais comuns são as leucemias e os tumores sólidos do sistema nervoso, atingindo 29% e 26%, respectivamente (*American Cancer Society*, 2018). Dentre esse último, o neuroblastoma (NB) é o mais frequente em crianças menores de 1 ano e é responsável por 15% das mortes por câncer pediátrico (*American Cancer Society*, 2018; Olsen et al., 2017). O neuroblastoma é um tumor sólido majoritariamente extracranial que pode surgir durante o desenvolvimento fetal ou, precocemente, após o nascimento (Hashimoto et al., 2016; Mora et al., 2001). Atinge de 8 a 10% das crianças com câncer nos EUA e Europa (Borriello et al., 2016), contando com mais de 650 casos diagnosticados a cada ano na América do Norte.







No Brasil, a incidência anual do NB é estimada em 5,9 casos/milhão com o maior índice em Curitiba (14,2/milhão de crianças), e o menor em Manaus (2,3/milhão de crianças) (Camargo et al., 2011). No Hospital Pequeno Príncipe no Paraná, dentre os tumores sólidos pediátricos mais frequentemente diagnosticados estão os NBs em

estágios avançados (média de 7 casos/ano), cuja taxa de sobrevivência em 10 anos é de apenas 21%. Nesse caso, 71% dos pacientes em estágio 4 da doença eram maiores de 2 anos. O perfil de diagnóstico tardio se repete em todo o estado paranaense (Parise et al., 2006).

Derivado de células neuroepiteliais originadas na crista neural, o neuroblastoma surge na medula da adrenal e medula espinhal ou em regiões periaórticas, onde tecidos do sistema nervoso simpático estão presentes. Assim, esse tumor se inicia principalmente em áreas como abdômen, onde se concentra a maior parte dos casos (65%), pescoço, tórax e pélvis (Brodeur, 2003; Maris, 2010; *National Cancer Institute*, 2018). É uma neoplasia heterogênea, com amplo espectro de comportamento clínico, podendo variar desde uma manifestação irrissecável ou metastática, mais comum em crianças maiores de 18 meses, até uma regressão espontânea ou regressão utilizando quimioterapia moderada, em crianças menores de 18 meses (Maris et al., 2007; Diede, 2014; Matthay et al., 2016).

O paciente diagnosticado com NB tem o estadiamento da doença estabelecido pelo Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma (*International Neuroblastoma Staging System - INSS*) que é determinado a partir da localização do tumor (tabela 1). O NB pode ser classificado, também, histologicamente, quanto à diferenciação (indiferenciado, pouco diferenciado e diferenciado) e ao índice de mitoses e cariorrexis (*Mitosis-karyorrhexis Index – MIK*) em baixo, intermediário e alto. Essas duas análises são importantes para indicar em qual grupo de risco o paciente se encontra e traçar um possível prognóstico (Shimada et al., 2001). Além desses fatores (estadiamento e histologia), a amplificação do gene *MYCN*, anomalias genéticas e idade do paciente também são itens considerados (Mora et al., 2001; Masecchia et al., 2012). O tratamento do neuroblastoma é determinado, portanto, pelo grupo de risco no qual o paciente se encaixa (baixo, médio e alto) (Tabela 2).

Tabela 1. Sistema Internacional de Estadiamento de Neuroblastoma (INSS)

Estágio	Características	Ilustração
1	Tumor localizado em apenas um lado do corpo (direito ou esquerdo), com excisão cirúrgica completa; linfonodos próximos ao tumor podem conter células tumorais; linfonodos distantes negativos.	
2A	Tumor localizado, mas com ressecção cirúrgica incompleta; linfonodos próximos ao tumor podem conter células tumorais; linfonodos distantes negativos.	
2B	Há localização unilateral do tumor, podendo ou não ser inteiramente removido por cirurgia. Há disseminação para linfonodos adjacentes ao tumor.	
3	O tumor ainda não se disseminou, mas: <ul style="list-style-type: none"> • Não pode ser removido por cirurgia e já cruzou a linha média; ou • Está unilateralmente localizada na área de origem, mas já alcançou linfonodos distantes; ou • Invade ambos os lados do corpo, não sendo removível por cirurgia. 	
4	Há metástases que podem atingir: Linfonodos distantes, ossos, fígado, pele, medula óssea ou outros órgãos (exceto os indicados no estágio 4S).	
4S	Tumor primário localizado, como definido nos estágios 1, 2A ou 2B, com metástase limitada à pele, fígado e medula óssea, contudo no máximo 10% das células da medula são tumorais. Ocorre em crianças menores de 1 ano de idade.	

Fonte: Adaptado de *American Cancer Society*, 2018.

Tabela 2. Comparação dos tratamentos iniciais padrão segundo o grupo de risco.

Grupo de Risco	Terapia Padrão
Baixo Risco	Observação; Ressecção cirúrgica.
Risco Intermediário	Quimioterapia: (carboplatina, etoposide, ciclofosfamida e doxorubicina); Ressecção cirúrgica.
Alto Risco	Quimioterapia: (carboplatina, etoposide, ciclofosfamida, doxorubicina e topotecan); Cirurgia; Quimioterapia Mieloablativa com transplante autólogo de células tronco; Radioterapia por feixe externo; Imunoterapia associada à agente de diferenciação.

Fonte: Adaptado de Meany H.J, 2019.

1.2 Imunoterapia

A imunoterapia contra o câncer desenvolveu-se a partir de estudos elementares de distinção de “próprio” do “não próprio” e do conhecimento da complementação da imunidade humoral por células imunes. Atualmente, o embasamento que rege a imunoterapia é a interação entre ligante e receptor que, além de conferir ao sistema imune a capacidade de reconhecer células tumorais como estranhas, permite, uma vez elucidada, a compreensão sobre *checkpoints* imunológicos (Stambrook, Maher e Farzaneh, 2017).

Os “*checkpoints* imunológicos” são moléculas supressoras do sistema imune que acabam por facilitar o escape tumoral. Os dois “pontos de verificação” mais estudados na imunoterapia são o CTLA-4 (proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico) e o PD-1 (receptor 1 de morte celular programada). O CTLA-4 é uma proteína intracelular que se transloca até à membrana celular e compete com CD28

para se ligar a moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, gerando um sinal inibitório para células T (Renrick, Dunbar e Shanker, 2019). PD-1 é expressa na superfície de células T e B ativadas e células NK, gerando um sinal inibitório quando ligado à PD-L1 e PD-L2 (ligantes de PD). Assim, ambas, CTLA-4 e PD-1, estão intimamente relacionadas à supressão antitumoral (Pardoll, 2012; Gentilini, Calabrese e Paga, 2018).

No NB, pacientes de alto risco recebem terapia com múltiplas abordagens. A imunoterapia associada a agentes de diferenciação é aplicada, geralmente, na fase pós consolidação (posterior ao tratamento quimioterápico e cirúrgico), tendo como principal objetivo eliminar células tumorais residuais. Nessa etapa são aplicados 4 medicamentos: Unituxin, Proleukin (IL-2), GM-CSF e Isotretinoína. Unituxin é um anticorpo monoclonal que atinge o gangliosídeo GD2, um carboidrato abundante na superfície de neuroblastos. Esse imunoterápico é potencializado, então, quando associado às citocinas GM-CSF e IL-2, uma vez que elas são capazes de ativar e estimular a ação antitumoral do sistema imune inato (macrófagos, granulócitos e células NK). Por fim, o Isotretinoína é utilizado durante a imunoterapia a fim de induzir a diferenciação de NB, tornando as células tumorais mais suscetíveis ao tratamento (Seeger, 2011; Cheung e Dyer, 2013; Ahmed *et al.*, 2014; Armideo, Callahan e Madonia, 2017; *American Cancer Society*, 2018).

Embora a imunoterapia tenha resultados relevantes e promissores (Herbst *et al.*, 2014; Powles *et al.*, 2014), alguns riscos ainda são questionados. Além da toxicidade, drogas que ativam o sistema imune podem gerar inflamação sistêmica inespecífica e efeitos colaterais autoimunes, fazendo-se necessária a administração de anti-inflamatórios esteroidais ou mesmo imunossupressores (Gentilini, Calabrese e Paga, 2018).

1.3 Microambiente tumoral

O ambiente que circunda o tumor é extremamente complexo em sua composição. Além das células tumorais e vasos – sanguíneos e linfáticos – circundantes, o microambiente tumoral (*Tumor Microenvironment* - TME) é formado por uma matriz extracelular (*Extracellular Matrix* - ECM), fibroblastos, células mieloides supressoras (*Myeloid-derived Suppressor Cells* – MDSCs) e por células imunes maduras, tais como linfócitos T e B, células *natural killers* (NK), neutrófilos,

macrófagos, células dendríticas, dentre outras (Figura 1) (Hui e Chen, 2015; Borriello et al., 2016; Komohara e Takeya, 2017).

Figura 1. Ilustração do microambiente tumoral e seus componentes

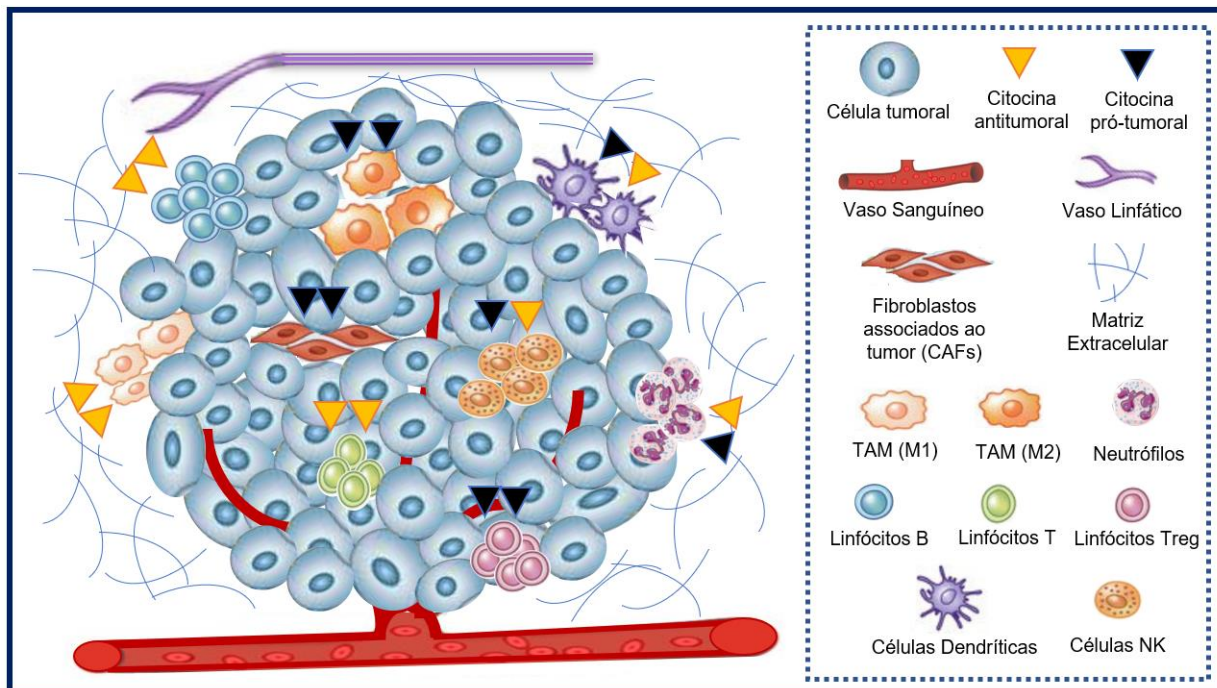


Figura 1. Ilustração do Microambiente tumoral, no qual há células malignas sustentadas por uma matriz extracelular e alimentadas por vasos linfáticos e sanguíneos. Além disso, é possível observar a presença de células imunes (elencadas no quadro) e uma gama de citocinas que atuam ora beneficiando, ora suprimindo o tumor. TAM (do Inglês *Tumor-associated Macrophages*); Treg (linfócitos T reguladores); Células NK (do inglês *Natural Killers*). **Fonte:** Adaptado de Quail e Joyce, 2014.

As transformações sofridas ou geradas pelos componentes do TME, além de induzirem à imunossupressão e à resistência quimioterápica, estão intimamente relacionadas à progressão e metástase tumoral (Hashimoto et al., 2016). A matriz extracelular que o compõe tem papel importante no desenvolvimento do câncer e, em estágios mais avançados da progressão tumoral, torna-se desorganizada, alterando o comportamento das células no TME e facilitando a angiogênese (Lu, Weaver e Werb, 2012; Hui e Chen, 2015). Os fibroblastos são capazes de secretar fatores de crescimento e quimiocinas, como CXCL12 que promove o crescimento e a sobrevivência de células malignas, além de servir como quimioatrativo para a migração de outras células (Hanahan e Cousses, 2012). A ação imunossupressora das MDSCs é atribuída a diversos mecanismos, tais como: indução de células T reguladoras, liberação de fator transformador do crescimento beta (*Transforming*

Growth Factor Beta - TGF- β) e IL-10, ou, ainda, pela produção de NO que reage com ânion superóxido e produz peroxinitrito (PNT), inibidor direto das células T e, por conseguinte, redutor da responsividade imunológica via o complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* - MHC) (Marvel e Gabrilovich, 2015).

1.3.1 CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE NO TME

As células maduras do sistema imunológico são os componentes mais estudados do TME devido ao seu comportamento ambíguo: ora como uma maquinaria de defesa antitumoral, ora modulada em benefício do tumor.

1.3.1.1 Neutrófilos

Aproximadamente 100 bilhões de neutrófilos são gerados por dia em um adulto saudável. Esse grande número representa a importância dessas células para o sistema imune inato como primeira linha de defesa contra patógenos. A ação protetiva dos neutrófilos é proveniente principalmente da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), entretanto, são capazes, ainda, de realizar fagocitose, degranulação, formação de redes extracelulares (*Neutrophil Extracellular Traps* - NETs) e liberação de citocinas, sendo essa última, de extrema importância para o recrutamento de outras células de defesa para o local de dano (Germic et al., 2019).

Os neutrófilos são dirigidos a fenótipos distintos (N1 e N2) dependendo do ambiente e estímulos a que são submetidos. Quando sob ação de TGF- β adquirem um caráter anti-inflamatório e pró-tumoral (N2), aumentando os níveis de MMP e arginase. Por outro lado, quando TGF- β é inibido, os neutrófilos são polarizados para N1, adquirindo um caráter pró-inflamatório e antitumoral, secretando TNF e EROS. Essa plasticidade se manifesta durante o processo inflamatório, mas é mais evidente no TME, onde os neutrófilos são nomeados como neutrófilos associados ao tumor (*Tumor-associated Neutrophils* – TANs) (Fridlender et al., 2009; Rao, Zhong e Sun, 2014).

Segundo Mantovani e seus colaboradores (2011), os TANs medeiam a transformação maligna (iniciação), a progressão, angiogênese e a metástase. Entretanto, a relação entre mau prognóstico e infiltração neutrofílica não é absoluta, isso porque, devido à plasticidade de neutrófilos para fenótipos N1 e N2, faz-se necessária a identificação da população predominante no TME estudado. Exemplo

disso é que a presença numerosa de neutrófilos em tumores como carcinomas de pescoço e bronco-alveolar indicou mau prognóstico, enquanto foi o inverso para câncer gástrico (Galdiero et al., 2013).

1.3.1.2 Monócitos/Macrófagos

Os macrófagos são importantes células do sistema imune inato. Quando há algum dano tecidual, os monócitos circulantes no sangue migram para o tecido e se diferenciam em macrófagos. Uma vez no tecido, atuam com alta capacidade fagocítica, com foco não somente no combate aos patógenos, mas também na remoção da matriz e de restos celulares provenientes da lesão. Além disso, os macrófagos complementam sua atuação liberando citocinas e fatores de crescimento e de angiogênese que permitem a restauração tecidual (Martin e Leibovich, 2005).

Essas funções antagônicas pró e anti-inflamatória são importantes para eliminação do patógeno e restauração tecidual, respectivamente. Elas provêm de macrófagos distintamente diferenciados, ou seja, quando há estímulos como TNF- α e IL-6, os monócitos são classicamente diferenciados, manifestando um fenótipo M1, pró-inflamatório. Quando na presença de citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13, induzem à uma diferenciação alternativa anti-inflamatória (Todoric, Antonucci e Karin, 2016).

Semelhantemente, os monócitos circulantes são atraídos para dentro do tecido tumoral e diferenciam-se nos chamados macrófagos associados ao tumor (*Tumor-associated Macrophages* - TAMs) (Komohara, Jinushi e Takeya, 2014; Komohara e Takeya, 2017). Os TAMs também podem ser classicamente ativados (M1), apresentando um caráter antitumoral ou ativados alternativamente, assumindo um fenótipo M2, pró-tumorigênico. Nesse cenário, há intensa liberação de citocinas que direcionam para um ou outro perfil e influenciam profundamente a progressão tumoral, bem como as capacidades de invasão e metástase (Mantovani et al., 2004; Lin et al., 2006; ElSawa et al., 2011; Hashimoto et al., 2016).

1.3.1.3 Linfócitos

Os linfócitos são células mononucleares com diversos subtipos, com fenótipos e funções diferentes que se complementam para a defesa do organismo. Basicamente, resumem-se aos linfócitos T CD4 (*helper*), T CD8 (citotóxicos), T reg (reguladores) e linfócitos B. No contexto da defesa do organismo contra tumores, os linfócitos T são os mais relevantes.

Uma elevada infiltração dessas células no TME indica uma imunovigilância contínua e, geralmente, um bom prognóstico (Zhang, Endres e Kobold, 2019). Não é ao acaso que um dos principais mecanismos de evasão imunológica pelo tumor envolva a inibição da apresentação de antígenos via MHC (tanto de classe I quanto da II) (Drake, Jaffe e Pardoll, 2006). Sendo assim, os linfócitos T têm sido o principal alvo de estudo para o desenvolvimento de novas imunoterapias (Stambrook, Maher e Farzaneh, 2017; Kallikourdis, 2018; Zhang, Endres e Kobold, 2019).

O microambiente tumoral compreende, portanto, uma gama de citocinas moduladoras e células imunes que interagem com células tumorais direta ou indiretamente. Sendo assim, todo esse cenário confere ao câncer a capacidade ou não de progressão e metástase.

1.4 Metástase e o sistema imune

1.4.1 METÁSTASE

Metástase envolve a migração de células tumorais que partem do tumor primário em direção a órgãos distantes para, nestes, estabelecerem tumores secundários (Urra e Araya-Maturana, 2017).

Embora haja avanços no estudo, diagnóstico e tratamento do câncer, grande parte dos pacientes com metástase avançada não evoluem para remissão com o uso da terapêutica disponível. Conseqüentemente, cerca de 90% dos casos de morte associado ao câncer são causados por doença metastática (Lambert, Pattabiraman e Weinberg, 2017).

Para que haja disseminação de células malignas do tumor primário e sua colonização no novo tecido alvo, são necessárias algumas etapas que são conhecidas como cascata de invasão e metástase (Figura 2): (i) Invasão local de células tumorais primárias em tecidos vizinhos e intravasamento dessas células no sistema circulatório; (ii) Sobrevivência durante o trânsito hematogênico; (iii) Extravasamento através da parede vascular para adentrar tecidos distantes; e (iv) Colonização do tumor secundário no novo tecido (Lambert, Pattabiraman e Weinberg, 2017).

Nos carcinomas, um dos primeiros passos que antecede a intravasamento, mas que não obrigatoriamente ocorre, é a transição epitelial-mesenquimal (*Epithelial-mesenchymal Transition* - EMT), durante o qual as células tumorais perdem marcadores epiteliais e adquirem características mesenquimais. Esse processo as

confere propriedades de células tronco, aumentando a motilidade (diminuição da adesão célula-célula), a capacidade de invasão e habilidade de degradar componentes da matriz extracelular (Kalluri e Weinberg, 2009; Quail e Joyce, 2013; Lambert, Pattabiraman e Weinberg, 2017). Embora o NB seja de origem neuroectodermal, as suas células também sofrem mudanças semelhantes quando adotam um fenótipo invasivo e metastático (Vitali et al., 2008; Schwankhaus et al. 2014).

Citocinas secretadas por leucócitos, tais como IL-6 e IL-23, são capazes de iniciar o processo de EMT via ativação da sinalização de STAT3. Se a sinalização de STAT3 se der em resposta a um ambiente inflamatório, há uma inibição da expressão de E-caderina e, diminui, portanto, a adesão célula-célula (Yu, Pardoll e Jove, 2009; Smith e Kang, 2013).

A invasão do tumor primário em vasos pode atingir ou tecidos adjacentes normais ou vasos novos formados pelo próprio tumor. Como resultado, ocorre o intravasamento que permite que as células malignas primárias tenham acesso à circulação e transitem pelo organismo (Kang e Pantel, 2013; Lambert, Pattabiraman e Weinberg, 2017). A invasão e o intravasamento só são possíveis se houver a quebra da membrana basal e o remodelamento da matriz extracelular. A clivagem proteolítica e a degradação das proteínas da ECM durante a invasão são dependentes de enzimas do tipo metaloproteinases (*Matrix Metalloproteinases* - MMPs) e catepsinas (Joyce e Pollard, 2009; Smith e Kang, 2013). Essas enzimas podem ser secretadas por células tumorais, mas já se sabe que células imunes como mastócitos, macrófagos e neutrófilos também secretam proteases capazes de remodelar a matriz extracelular presente nos limites do tumor (Pahler et al., 2008; Smith e Kang, 2013; Quail e Joyce, 2014).

Estima-se que apenas 0,01% das células tumorais circulantes (*Circulating Tumor Cells* - CTCs), ou seja, aquelas que tiveram sucesso no processo de intravasamento, sejam capazes de sobreviver e estabelecer metástases em órgãos distantes (Chambers et al., 2001; Joyce e Pollard, 2009). Isso porque, durante o trânsito pelos vasos, há diversos obstáculos para sua sobrevivência, como o fluxo hidrodinâmico e a defesa do sistema imune, principalmente por células NK. Entretanto a interação entre CTCs e tipos celulares circulantes, tais como plaquetas, macrófagos e neutrófilos, auxiliam no processo de passagem e extravasamento dessas células. É

possível que citocinas produzidas no TME possam ligar CTCs à macrófagos, protegendo-as das NK. As plaquetas, por sua vez, formam um agregado com as células tumorais e aumentam a deposição de fibrina impedindo o reconhecimento imune, além disso, as plaquetas liberam citocinas capazes de recrutar neutrófilos. Essa última ação parece controversa, entretanto, essas quimiocinas atraem neutrófilos que estão sob a sinalização do tumor primário, portanto, nesse caso, exercem ação imunossupressora por meio da inibição de NK e de células T citotóxicas (Condeelis e Pollard, 2006; Quail e Joyce 2013; Smith e Kang, 2014; Coffelt et al., 2015; Spiegel et al., 2016; Lambert, Pattabiraman e Weinberg, 2017).

A etapa de extravasamento é o momento de adesão à parede do vaso sanguíneo e entrada no tecido ou órgão distante do tumor primário. Sendo assim, esse processo depende da quantidade e da qualidade de moléculas de adesão presentes nas células endoteliais e nas CTCs. Plaquetas e neutrófilos auxiliam o extravasamento por meio da expressão de selectinas e da molécula 1 de adesão intracelular (*Intercellular Adhesion Molecule - ICAM-1*) (Camerer et al., 2004; Smith e Kang, 2013).

A extravasamento não garante às células tumorais o estabelecimento da metástase. O novo ambiente pode ativamente suprimir o crescimento e a sobrevivência dessas células tumorais, eliminando as mais sensíveis. Entretanto, as que sobreviverem aos mecanismos de proteção podem entrar em um estado de dormência mediada ou não pela imunidade – imunoedição levando a um estado de equilíbrio – que pode durar anos (Quail e Joyce, 2014).

Embora haja resistência por parte do tecido ou órgão secundário, as células malignas são capazes de superar os fatores que limitam sua colonização, isso porque o local de metástase não é aleatoriamente escolhido. O tumor primário é capaz de criar condições para o estabelecimento metastático através da liberação de fatores que contribuem para a formação de um nicho pré-metastático, caracterizado por uma gama de células derivadas da medula óssea, alta quantidade de fibroblastos e grande secreção de oncoproteínas e citocinas que favorecem o crescimento tumoral. Além disso, vesículas derivadas do tumor primário chamadas de exossomos, contêm DNA, mRNAs, microRNAs e proteínas, capazes de auxiliar no processo de modulação do sítio pré-metastático, preparando-o para a chegada das células tumorais. Diante disso, as células metastáticas recebem diversas vantagens que podem auxiliar o tumor secundário a superar o estado de dormência mediado em parte pelo TME e,

assim, colonizar o novo ambiente (Quail e Joyce, 2014; Celià-Terrassa e Kang, 2016, Lambert et. al, 2018).

O conhecimento dos diversos mecanismos envolvidos em cada etapa da metástase ainda não é completo, entretanto o que já se sabe norteia e dirige estudos para o desenvolvimento de uma terapêutica efetiva. Porém os avanços ainda são pequenos (Urra e Araya-Maturana, 2017).

Figura 2. Etapas da metástase e a influência de células imunológicas

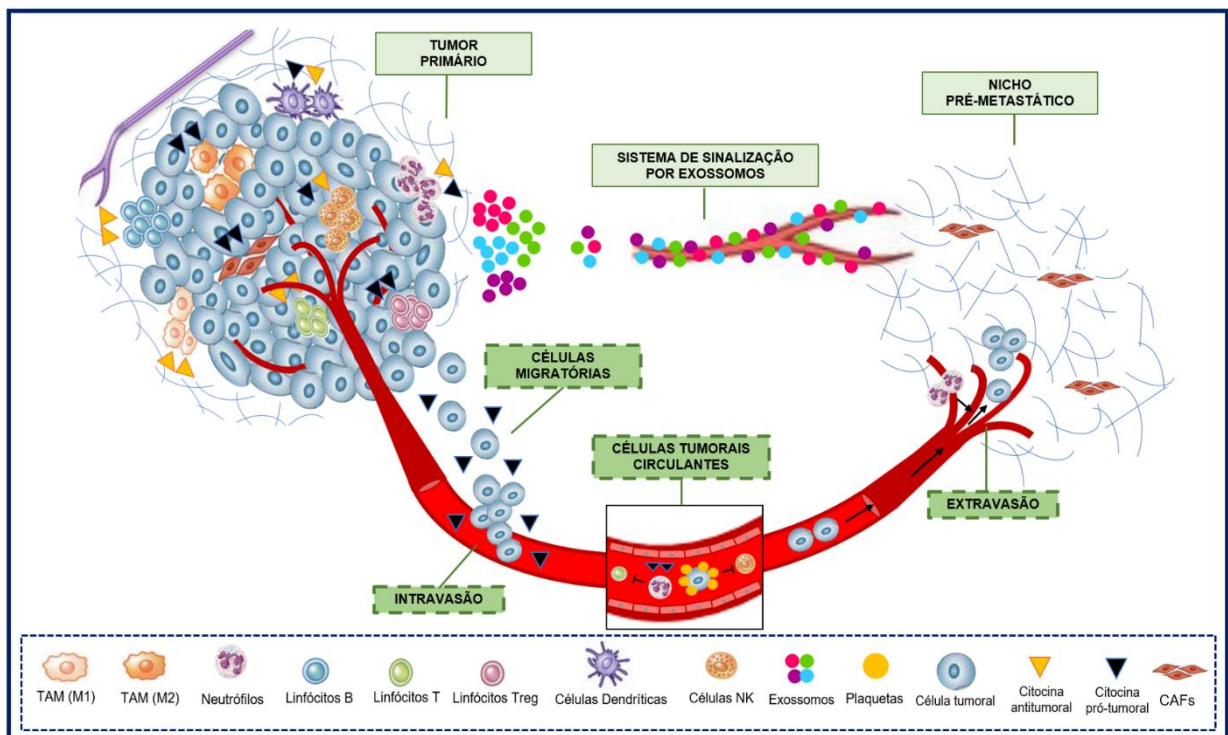


Figura 2. Ilustração indicando as etapas da metástase e os componentes celulares (células imunes e tumorais) e não celulares (citocinas e exossomos) envolvidos nessa sequência de acontecimentos: Invasão local de células tumorais primárias em tecidos vizinhos e intravasamento dessas células no sistema circulatório; Sobrevivência durante o trânsito hematogênico; Extravasamento o através das parede vascular para adentrar tecidos distantes; Colonização do tumor secundário no nicho pré-metastático. **Fonte:** Adaptado de Quail e Joyce, 2014.

1.4.2 TOXINAS DERIVADAS DE VENENO DE SERPENTE E SUA AÇÃO CONTRA METÁSTASE

Toxinas isoladas de veneno de serpente são fontes naturais de uma gama de moléculas que podem ser úteis contra o tumor, principalmente no que tange a obtenção de agentes antimigratórios e anti-invasivos. Muito se sabe sobre a ação dessas toxinas – desintegrinas, lectinas do tipo C, cardiotoxinas, dentre outras – na

indução de morte celular, mas pouco é reportado quanto à sua capacidade inibitória sobre a adesão, migração e invasão de células cancerígenas (Urra e Araya-Maturana, 2017).

A inibição da metástase por alteração na relação actina/citoesqueleto é um dos mecanismos pelos quais essas toxinas atuam, uma vez que para a célula migrar é necessária uma arquitetura organizada (Urra e Araya-Maturana, 2017). Como exemplo, têm-se Daboialectina e BJcuL, duas lectinas dependentes de cálcio capazes de desregular o citoesqueleto em células tumorais (Nolte et al., 2012; Pathan et al., 2017; Urra e Araya-Maturana, 2017).

Daboialectina é uma lectina de baixa massa molecular isolada do veneno de *Daboia russelii*. Essa toxina diminui os níveis de GTPases do tipo Rho e Rac e aumenta a expressão de Cdc42, fatores esses que diminuem a quantidade de actina, desestabilizando o citoesqueleto (Pathan et al., 2017). A BJcuL, lectina isolada do veneno de *Bothrops jararacussu*, atua desorganizando o filamento de actina por se ligar à glicoproteínas da ECM e acelerando o descolamento das células tumorais da matriz extracelular (Nolte et al., 2012).

1.5 Lectinas

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas capazes de reconhecer e se ligar de modo reversível, não covalente e especificamente à carboidratos. A família de lectinas contém uma variedade de domínios ligantes de carboidratos (*Carbohydrate-binding Domains* - CBDs), cada um contendo um ou mais sítios de ligação (*Carbohydrate-binding Sites* - CBSs) que reconhecem açúcares simples ou mais complexos (Barre et al., 2019). Elas englobam uma classe de proteínas estruturalmente diversificada, de origem não imune e sem capacidade enzimática (Buts et al., 2001).

São moléculas de grande importância científica e farmacológica devido ao seu envolvimento em diversos processos biológicos, como a indução de agregação plaquetária, hemaglutinação, ativação da proliferação leucocitária, regulação do crescimento celular, adesão celular, ativação de apoptose, dentre outros (Mastro et al., 1986; Knibbs et al., 1994; Oseki et al., 1994; Perillo et al., 1998; Damasio et al., 2014). As lectinas demonstraram também, papel chave durante a iniciação de infecção, na alteração do comportamento celular durante metástase e na proteção de neonatos contra antígenos do ambiente (Singh et al., 1999; Carvalho et al., 2001).

As lectinas animais podem ser classificadas em cinco diferentes grupos, dentre os quais está o grupo das lectinas cálcio dependentes, nomeado, também, como tipo C (Drickamer et al., 1992). Um exemplo desse tipo de lectina é a selectina que medeia a ligação entre leucócitos e o endotélio durante o processo inflamatório. Outro exemplo são as colectinas, componentes do surfactante pulmonar que, por serem capazes de se ligar a carboidratos presentes em diversos microrganismos, mimetizam um processo de opsonização, estimulando a fagocitose e ativação do sistema do complemento (Hartshorn et al., 1996).

As lectinas são amplamente distribuídas em plantas, animais e outros organismos. Sua presença é marcante em venenos de serpentes, tais como das famílias Viperidae, Elapidae e Crotalidae (Carvalho et al., 1998). Dentre essas moléculas podemos citar a BJcuL proveniente do veneno de *Bothrops jararacussu*.

1.5.1.1 BJcuL

O veneno bruto de *Bothrops jararacussu* possui, em sua composição, uma mistura de proteínas e peptídeos bioativos, principalmente enzimas capazes de gerar lesões locais ou sistêmicas, caracterizando o envenenamento botrópico (Milani et al., 1997). BJcuL, isolada a partir desse veneno, foi classificada como um dímero ligado a dissulfeto composto de subunidades idênticas de 15 kDa e demonstrou alta afinidade com glicoproteínas contendo β -D-galactosídeos (Carvalho et al., 1998; Carvalho et al., 2001).

Foi demonstrado que BJcuL é capaz de gerar edema, aumentar a permeabilidade vascular e facilitar o rolamento e diapedese de leucócitos, atuando nas células endoteliais por meio da adesão à fibronectina e vitronectina. Ainda nesse contexto, induz a uma rápida e expressiva alteração da produção de superóxido e função fagocítica dessas células, além de retardar a apoptose neutrofílica tardia, aumentando seu tempo de ação inflamatória (Elíffio-Esposito et al., 2007; Elíffio-Esposito et al., 2011). Um estudo realizado recentemente (Dias-Netipannyj et al., 2016) indicou que a BJcuL, ao ligar-se na superfície de macrófagos, tem ação imunomoduladora, sendo capaz de aumentar a fagocitose, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor* - TNF- α), IL-6 e fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (*Granulocyte-macrophage Colony-stimulating*

factor - GM-CSF). Essas funções desempenhadas pela lectina trazem grandes indícios de que ela pode se relacionar ao processo inflamatório de múltiplas maneiras.

Entretanto, as ações da BJcuL podem ir além, atingindo o campo da investigação antitumoral. Segundo Carvalho e colaboradores (2001), BJcuL teve ação citotóxica em células de carcinoma de ovário, câncer de mama metastático e glioblastoma. Células de carcinoma gástrico, após tratamento com BJcuL, também perderam viabilidade. O efeito citotóxico da lectina sobre esse tipo tumoral foi acompanhado por uma inibição da adesão à ECM, desorganização do citoesqueleto e indução à apoptose (Damasio et al., 2014).

Diante disso, as interações da BJcuL com células imunes e tumorais se mostram, embora não totalmente elucidadas, bastante consolidadas. Assim, testar a capacidade imunodulatória da BJcuL sobre células malignas no que tange o potencial migratório e invasivo tumoral, parece ser uma estratégia promissora na busca por tratamentos alternativos que potencializem a imunoterapia.

2. JUSTIFICATIVA

O neuroblastoma é um câncer infantil que acomete principalmente crianças menores de um ano. Embora haja avanços na pesquisa e no tratamento deste tipo de tumor o índice de mortalidade chega a 40% em menos de 5 anos nos casos mais agressivos da doença. Este fato, por si só, justifica a busca por novas terapias.

A imunoterapia tem sido proposta e incorporada como um tratamento para os pacientes de alto risco e para aqueles que desenvolveram uma doença refratária e residual após o tratamento quimioterápico tradicional. No entanto, a toxicidade associada à essa terapia é considerável e pouco se sabe sobre seus efeitos a longo prazo, especialmente em pacientes muito jovens. Desta maneira, compreender a complexa interação entre as células do sistema imune e as células de neuroblastoma pode ser a chave para estabelecer estratégias que potencializem a imunoterapia.

Nosso grupo de pesquisa tem estudado os efeitos biológicos de toxinas derivadas de secreções animais, com maior ênfase no seu potencial antitumoral e imunogênico. Nesse contexto, a lectina de *B. jararacussu* demonstrou ser capaz de polarizar células do sistema imune, mais especificamente os macrófagos e neutrófilos, para um fenótipo pró-inflamatório.

Portanto, determinar se os produtos gerados por essa ação sob neutrófilos são agentes antitumorais no que tange às capacidades migratória e invasiva das células tumorais é um estudo capaz de gerar dados relevantes, principalmente para a compreensão dos mecanismos envolvidos na ação de agentes exógenos na modulação imunológica para um perfil antitumoral.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

A hipótese desse estudo é de que neutrófilos modulados por BJcuL, em contato direto ou não com neuroblastos, diminuam o poder migratório e invasivo das células de neuroblastoma.

3.2 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de neutrófilos tratados com BJcuL e de seu meio condicionado no poder de migração e invasão de células de neuroblastoma *in vitro*.

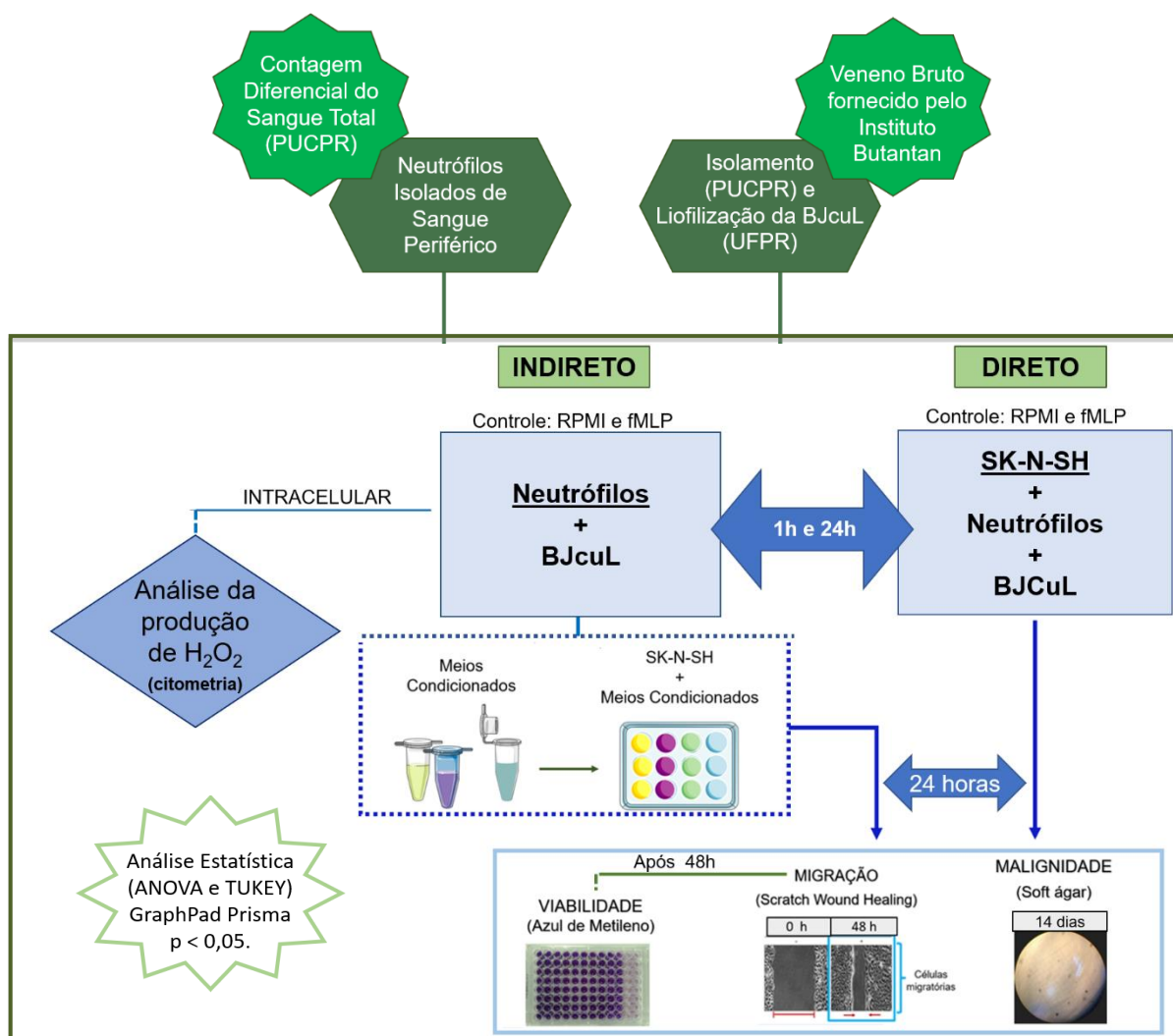
3.3 Objetivos Específicos

- Analisar o efeito direto da BJcuL sobre as células SK-N-SH no que tange a viabilidade, migração e invasão;
- Determinar possíveis interferências na viabilidade, capacidade de migração e de invasão das células SK-N-SH quando incubados com os meios condicionados de neutrófilos tratados com BJcuL e controles (fMLP e RPMI);
- Avaliar possíveis interferências na viabilidade, migração e invasão das células SK-N-SH quando em co-cultivo com neutrófilos e seus tratamentos (BJcuL e controles - fMLP e RPMI).

4 MÉTODOS

Os métodos realizados nesse trabalho foram padronizados com o intuito de acompanhar a capacidade de proliferação, migração e invasão de células de neuroblastoma (SK-N-SH) frente aos tratamentos com BJcuL, neutrófilos e meio condicionado de neutrófilos. Para tal, fez-se necessário o isolamento dessas células imunológicas do sangue periférico, a produção de meios condicionados provenientes dos tratamentos de neutrófilos com BJcuL e a incubação desses meios com as células tumorais e, por fim, o co-cultivo de SK-N-SH com neutrófilos e seus estímulos. A partir desses tratamentos, foram realizados os ensaios de Azul de Metileno para verificar a proliferação tumoral, *Scratch Wound Healing*, para avaliar a migração das células tumorais, e *Soft Agar* para verificar a invasão tumoral.

Figura 3. Fluxograma da metodologia aplicada.



Fonte: A autora, 2019

4.1 Escolha da Linhagem de Neuroblastoma

As linhagens celulares derivadas de neuroblastoma apresentam diferentes graus de agressividade tumoral. As células SK-N-SH, utilizadas no presente trabalho, são heterogêneas, com algumas células em processo de diferenciação, mas na grande maioria, células que se mantiveram em estágio imaturo (Niewiarowska-Sendo et al., 2015). Portanto foram escolhidas por simularem as condições de um tumor mais agressivo no qual as células possuem grande capacidade de migração e invasão.

As SK-N-SH adquiridas comercialmente e utilizadas nesse trabalho são provenientes de medula óssea de paciente de 4 anos do sexo feminino, obtidas pós tratamento quimioterápico e radiológico. São células do tipo I (intermediárias) e não possuidoras da amplificação do gene *MYCN*.

4.2 Manutenção Celular de Neuroblastoma

As células de neuroblastoma humano da linhagem SK-N-SH (ATCC® HTB-11™) foram cultivadas e mantidas em garrafas de cultivo celular T-75 (TPP®) contendo meio de cultura RPMI 1640 (CULTILAB/EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum* - FBS) (GIBCO/EUA) e 100 UI/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina (GIBCO/EUA). As culturas foram mantidas em estufa úmida, contendo 5% de CO₂, a 37 °C, e observadas diariamente em microscópio óptico. A troca de meio foi realizada a cada dois dias e as células foram repicadas (n° passagens ≤ 3) sempre que atingiram 80% de confluência. A cada repique, as células foram avaliadas quanto à viabilidade celular através do corante Azul de Tripán (Sigma-Aldrich/Brasil) e contadas em câmara de Neubauer.

4.3 Obtenção de células imunes de sangue periférico

4.3.1 COLETA DE SANGUE DE VOLUNTÁRIOS

A coleta de sangue venoso foi realizada em adultos saudáveis na idade de 20-40 anos, frequentadores do Laboratório Experimental Multiusuário (LEM) da PUCPR, mediante assinatura do termo de consentimento (modelo em Apêndice A) aprovado pelo Comitê de Ética (Plataforma Brasil) sob CAAE 79976417.0.0000.0020.

O sangue foi colhido de forma asséptica com seringa e agulha descartáveis, sendo imediatamente transferido para um tubo estéril com citrato de sódio. Uma alíquota de 300 µL de sangue total de cada doador foi utilizada para contagem diferencial em contador automático ABX MICROS 60. Esse procedimento foi adotado

a fim de garantir que os doadores estivessem saudáveis e que os neutrófilos não estivessem pré-ativados.

4.3.2 ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILOS DO SANGUE PERIFÉRICO

Os tubos de coleta foram centrifugados a 1100 rpm por 20 minutos. O plasma separado foi transferido para um tubo falcon e centrifugado novamente a 1000 rpm por 10 minutos para retirada das plaquetas. O plasma foi, então, devolvido ao tubo de coleta e homogeneizado com os eritrócitos. Foram preparados tubos falcon com 6 mL de Histopaque® (Sigma-Aldrich/Reino Unido) (3 mL de Histopaque 1119 e 3 mL de Histopaque 1077 na parte superior) (Figura 4A; Tubo A). A esses tubos foram adicionados 6 mL de sangue total e seguiu-se a centrifugação a 2400 rpm por 45 minutos. Depois da centrifugação, observaram-se quatro partes distintas: uma camada de plasma, uma segunda de células mononucleares, uma terceira de polimorfonucleares e, por fim, uma quarta com eritrócitos (Figura 4A; Tubo B).

A camada de células polimorfonucleares foi retirada com micropipeta (Figura 4A; camada 3), lavada em PBS 1X e ressuspensa em meio para contagem em câmara de Neubauer com Azul de Tripán. Uma alíquota dessas células foi lavada com PBS 1X novamente, foram ressuspensas em 1000 µL de PBS 1X e a população celular (1×10^5 células) foi analisada em citômetro FACS Calibur® (BD Biosciences) quanto a sua distribuição por tamanho e complexidade (FSC x SSC), sendo possível detectar a presença de neutrófilos, linfócitos e monócitos (Figura 4B; Análise da camada 3).

Nesse primeiro isolamento, devido à presença da camada de mononucleares, não foi possível isolar com eficiência as células polimorfonucleares, sendo visível a presença de linfócitos e monócitos. Assim, foi adicionada uma segunda separação ao procedimento, a fim de obter um isolamento mais eficaz de neutrófilos.

Após a primeira centrifugação de 45 minutos, o plasma foi coletado em um tubo falcon e as células mononucleares foram descartadas. As células polimorfonucleares foram coletadas em um tubo falcon e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos para retirada do histopaque. Os eritrócitos foram misturados ao plasma e 5 mL dessa mistura foi adicionado ao tubo contendo as células polimorfonucleares. Foi feito um novo tubo contendo o histopaque conforme já descrito e esses 6 mL de sangue total enriquecidos com células polimorfonucleares foram adicionados a esse tubo (Figura 4A; Tubo C). Novamente realizou-se a centrifugação (2500 rpm por 45 minutos).

Nesse segundo isolamento, foi possível observar três camadas: plasma, células polimorfonucleares e células vermelhas (Figura 4A; Tubo D). Uma parte dos neutrófilos (1×10^5 células) foi ressuspensa em 1000 μL de PBS 1X e a população celular foi analisada em citômetro FACS Calibur® (BD Biosciences) quanto a sua distribuição por tamanho e complexidade (FSC x SSC) (Figura 4B; Análise da camada 5). As demais células foram ressuspensas em meio RPMI para serem avaliadas quanto à viabilidade celular através do corante Azul de Tripán e contadas em câmara de Neubauer.

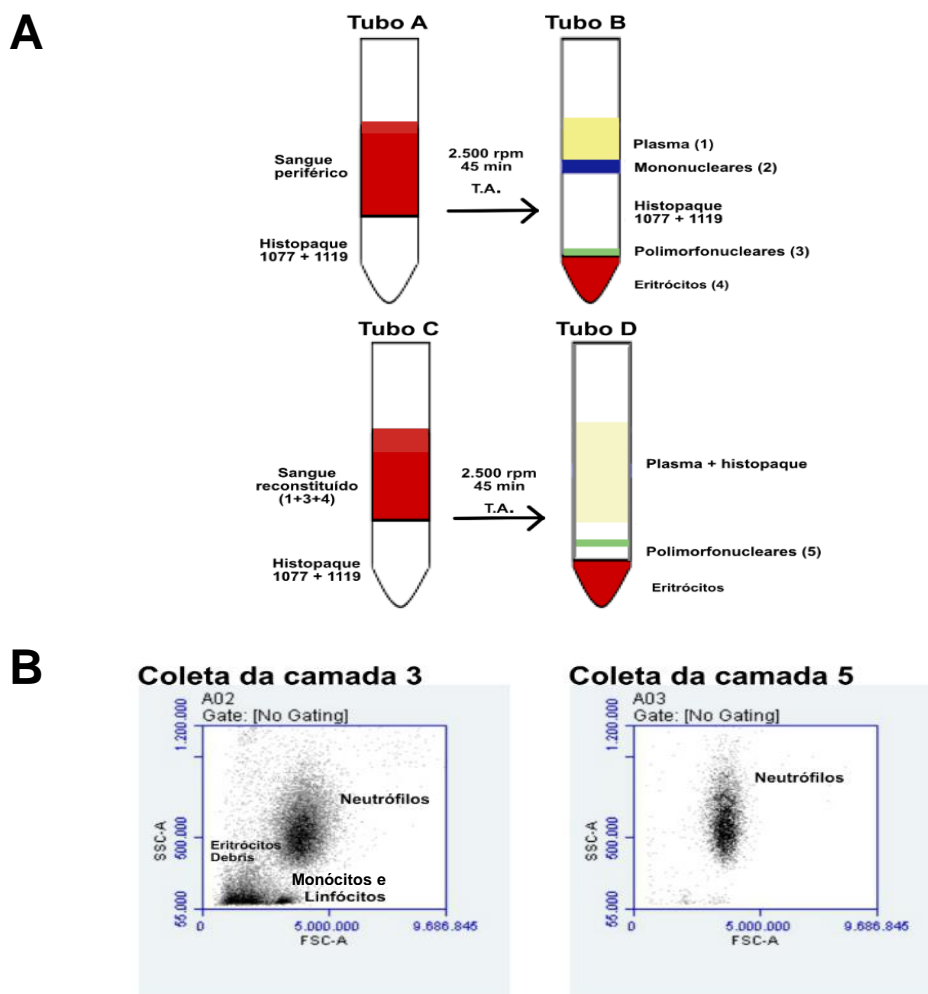


Figura 4. Separação dos neutrófilos por dupla centrifugação. (A) Os tubos A e B representam a primeira separação de sangue total com o uso de histopaque (1077+1119), obtendo-se 4 camadas distintas: plasma, mononucleares, polimorfonucleares e eritrócitos. Os tubos C e D representam a segunda centrifugação, na qual 3 camadas são geradas (plasma, polimorfonucleares e eritrócitos) a partir de um sangue enriquecido de polimorfonucleares obtidos da primeira centrifugação. (B) Análise por citometria de fluxo das frações coletadas. Gráficos de Dot Plot demonstrando a população de neutrófilos obtida na primeira centrifugação, indicando a presença de linfócitos, monócitos e eritrócitos e, na segunda centrifugação, com uma grande concentração de neutrófilos sem, no entanto, outros tipos celulares.

4.4 Purificação da BJcuL

O veneno bruto de *Bothrops jararacussu* foi fornecido pelo Instituto Butantan/São Paulo e foi purificado para obtenção de BJcuL por meio de cromatografia de afinidade usando uma coluna de agarose-D-galactose, como previamente descrito Elíffio-Esposito et al. (2007). Para o presente trabalho a atividade e homogeneidade da fração obtida foi realizada por teste de hemaglutinação, utilizando sangue do tipo AB e SDS-PAGE, respectivamente.

4.5 Obtenção dos meios condicionados de neutrófilos

Para obtenção dos meios condicionados (MCs), após o isolamento do sangue periférico, os neutrófilos ($2,5 \times 10^5$ células/mL) foram transferidos para placas de 6 poços e mantidos em cultivo por 4 horas com meio RPMI 2%.

Após esse período, foram adicionados os tratamentos – fMLP (*N-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine* - Sigma Aldrich/EUA) ($10 \mu\text{M}$), BJcuL ($2,5 \mu\text{g/ml}$) e meio RPMI 2% como controle, permanecendo em contato com neutrófilos por 1h ou por 24h. Após esses períodos de incubação, os sobrenadantes foram centrifugados – para eliminação de debris – filtrados e congelados a -80°C até o seu uso.

4.6 Ensaio com as células SK-N-SH

4.6.1 TESTE DE CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO PELO MÉTODO DE *SCRATCH WOUND HEALING*

As células de neuroblastoma foram cultivadas em placa de 24 poços, numa densidade de $3,5 \times 10^5$ células/poço, com o intuito de atingir 80% de confluência em 24h. Passado esse período, a superfície da monocamada celular foi riscada por raspagem mecânica utilizando uma ponteira de plástico estéril (P20) e as células desaderidas foram retiradas por lavagem com RPMI. A etapa seguinte variou conforme o método (direto ou indireto):

4.6.1.1 Método direto

Para o co-cultivo das células SK-N-SH com neutrófilos, um novo meio RPMI 2% contendo essas células ($7,5 \times 10^4$ células/poço) foi adicionado. Em cada poço, as células imunes receberam seus tratamentos – BJcuL ($2,5 \mu\text{g/ml}$), fMLP ($10 \mu\text{M}$) ou controle (RPMI 2%) – permanecendo por 1h. Após esse tempo, os neutrófilos foram lavados com meio RPMI para retirada dos estímulos e colocados novamente nos seus

poços durante 24h. Já para o tratamento por 24h, os neutrófilos foram adicionados juntamente com seus estímulos aos poços, não havendo a lavagem até a finalização das 24h.

As placas de co-cultivo com neutrófilos com SK-N-SH foram, então, fotografadas em microscopia (EVOS® XL) para rastrear a migração das células tumorais por um período de 48h (t_0 e t_{48}), sendo realizada troca de meio a cada 24h.

4.6.1.2 Método indireto

Um novo meio foi adicionado sendo composto por 50% de meio RPMI 2% (e 50% de meio condicionado (MC) obtido nos tratamentos (tabela 3). No caso dos poços controle, apenas adicionou-se meio RPMI 2%. As placas foram fotografadas em microscopia (EVOS® XL) para rastrear a migração das células por um período de 48h (t_0 e t_{48}), sendo realizada troca de meio a cada 24h.

Tabela 3. Células imunológicas e seus tratamentos para obtenção do meio condicionado.

	RPMI 2%	BJcuL	fMLP
Neutrófilos	MC Neut./RPMI	MC Neut./BJcuL	MC Neut./fMLP

Fonte: A autora, 2019.

4.6.1.3 Migração de células SK-N-SH tratadas com BJcuL

As células de neuroblastoma foram incubadas diretamente com BJcuL nos ensaios direto como controle. Entretanto um ensaio realizado separadamente, sofreu algumas variações metodológicas. As células SK-N-SH foram plaqueadas na densidade de 1×10^6 células/poço em placa de seis poços. Após 24h, foi realizada a raspagem mecânica utilizando uma ponteira de plástico estéril (P200), os poços foram lavados com RPMI 2% e adicionou-se BJcuL (2,5 $\mu\text{g/ml}$). A distância percorrida foi registrada no tempo total de 48h (t_0 e t_{48}), após lavagem com meio a cada 24h. As fotos, nesse caso, foram obtidas por câmera de 8MP Iphone 6 a partir de microscopia óptica.

4.6.2 TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

O teste de viabilidade das células SK-N-SH tratadas com neutrófilos (direto e indireto) foi realizado diretamente na placa de 24 poços utilizada no teste de migração. Após as 48h do teste *Scratch Wound Healing*, as placas foram centrifugadas a 1500

rpm por 2 minutos para diminuição da perda de células viáveis por se tratar de uma célula semi-aderente. Os meios foram, então, retirados e, após a secagem completa dos poços, foi adicionado 200 µL de metanol. Após 10 minutos de fixação, seguiu-se uma segunda centrifugação (1500 rpm/2 min), o metanol foi retirado e foi adicionado 300 µL de azul de metileno 0,05% (Sigma-Aldrich/Brasil). Após 10 minutos, seguiu-se a terceira centrifugação (1500 rpm/2 min) e a placa foi, então, lavada com água por imersão. A placa permaneceu em temperatura ambiente para secagem e, após 24h, foi adicionado 300 µL HCl 0,1M. A placa foi mantida em leve agitação por 10 minutos e, após esse tempo, 100 µL de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços para leitura de absorbância em leitor de microplaca (ThermoPlate – TP Reader) no comprimento de onda na faixa de 630 nm.

Os resultados desse teste foram normalizados, ou seja, a viabilidade do controle não tratado de cada ensaio independente foi considerada 100% e os demais tratamentos referentes àquele mesmo ensaio foram convertidos em porcentagem tendo o controle como referência.

4.6.3 TESTE DE INVASÃO

O teste do *soft agar* (ou ágar macio) quantifica a tumorigenicidade medindo a capacidade de proliferação e formação de colônias de uma célula em suspensão dentro de um gel de agarose semi-sólido. O princípio deste método se baseia no fato de que as células não transformadas (não tumorais) são incapazes de propagar-se rapidamente na ausência de ancoragem à matriz extracelular (ECM) e sofrem apoptose. Em contraste, as células transformadas malignamente perdem a sua dependência de ancoragem. Por conseguinte, estas células são capazes de crescer e formar colônias dentro da matriz de ágar semi-sólido (Borowicz et al., 2014).

Esse teste foi adaptado a partir do protocolo de Borowicz et al. (2014), cuja metodologia foi ajustada para as células SK-N-SH de neuroblastoma, a fim de determinar a densidade celular ideal, o tamanho de poço que melhor se encaixava nesse estudo e para garantir que a linhagem de NB escolhida era capaz de formar colônias no *soft agar* quando cultivada apenas com RPMI.

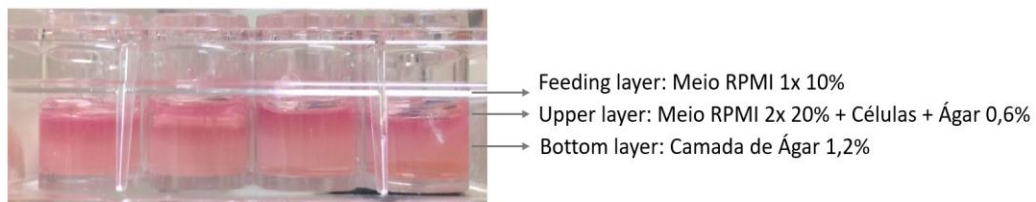
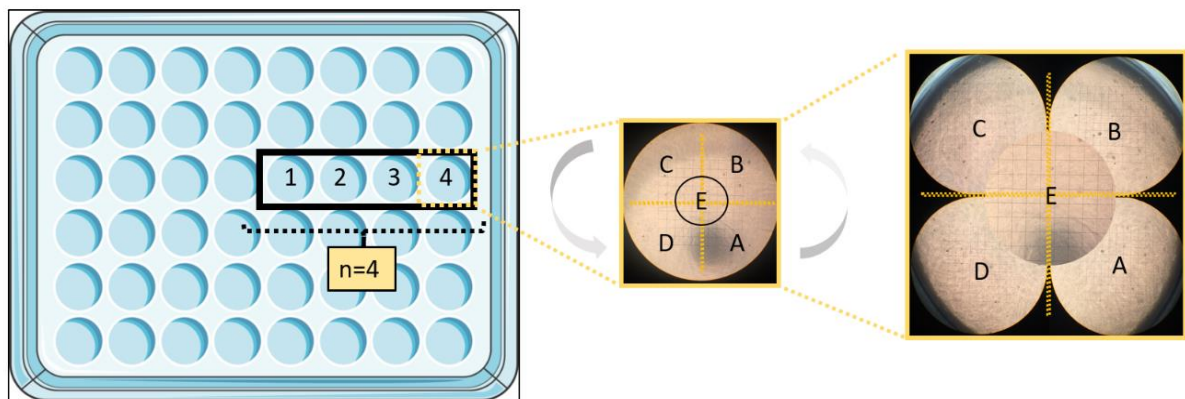
Em placa de 48 poços, adicionou-se 500 µL de uma solução contendo 50% de meio RPMI 2X 20% (FBS) e 50% de ágar 1,2%. Após a solidificação dessa camada (*bottom layer*), foi adicionado, por poço, uma segunda solução (*upper layer*) formada por 250 µL de meio RPMI 2X 20% (FBS) contendo 2×10^3 células, 125 µL de ágar 1,2%

e 125 µL de água destilada. A cada 72 horas, foram adicionados 30-50 µL de meio RPMI 1X 10% (FBS) para formação de um *feeding layer* (Figura 5A). Os resultados foram obtidos após 14 dias de incubação. Para a realização deste teste, foi importante a padronização de alguns pontos, tais como a adequação do número de células plaqueadas, o método de contagem das colônias (*software ImageJ*) e a capacidade de formação de colônias pela célula em questão.

As células de SK-N-SH que foram plaqueadas no *soft agar* eram provenientes de um plaqueamento prévio em placa espelho. Essas células foram plaqueadas na densidade de 2×10^3 células/poço e, após 24h de adesão, receberam seus tratamentos: meio condicionado ou neutrófilos ($7,5 \times 10^4$ células/poço) e seus estímulos. Os tratamentos seguiram o mesmo padrão dos testes direto e indireto descritos nos itens 4.6.1.1 e 4.6.1.2: os tratamentos de SK-N-SH com meio condicionado se deu por 24h; Os tratamentos dos neutrófilos diretamente com SK-N-SH ocorreram por 1h e 24h, sendo que no de 1h, as células imunes, após a lavagem, foram devolvidas aos poços e permaneceram em co-cultivo por 24h. Após esse período, as células SK-N-SK foram tripsinizadas (Tripsina 1X - Sigma-Aldrich/Canadá) e transferidas ao seu poço equivalente na placa contendo o *soft agar*.

O resultado desse ensaio foi obtido a partir de uma análise quantitativa conforme detalhado na Figura 5B. Os poços foram segmentados em 5 partes (4 bordas e centro) conforme mostrado no desenho (Figura 5B). As colônias dessas 5 regiões foram contadas e somadas, determinando o número de colônias por poço. A média por condição foi gerada e plotada em gráfico de coluna (item 5.3).

É importante ressaltar que a contagem foi realizada por dois avaliadores sem que os indivíduos soubessem quais tratamentos estavam sendo analisados, eliminando, assim, qualquer resultado tendencioso.

A**B**

$$\text{N}^{\circ} \text{ de col\~{o}nias} = \frac{\sum (\text{A-E})_1 + \sum (\text{A-E})_2 + \sum (\text{A-E})_3 + \sum (\text{A-E})_4 + \sum (\text{A-E})_n}{n}$$

Onde:

n = número de poços de uma mesma condição de tratamento;
 A-E = número de colônias em cada um dos cinco campos (A, B, C, D e E).

Figura 5. Método de *Soft Agar*. (A) A imagem ilustra uma placa na qual foi realizado o teste de *soft agar*. É possível observar a formação das três camadas citadas na metodologia. *Bottom layer* é a camada de ágar 1,2%; *Upper Layer* é formada por meio RPMI 2X 20%, 2×10^3 células e ágar 1,2% diluído a 0,6%; E, por fim, a camada de *feeding layer* de meio RPMI 1X 10% para manutenção de upper layer. (B) O esquema descreve como foi realizada a determinação do nº de colônias: soma das colônias presentes nos cinco campos de um mesmo poço, seguida pela média da soma de todos os poços da mesma condição.

4.7 Determinação da produção de peróxido de hidrogênio intracelular em neutrófilos

A produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) foi obtida por citometria de fluxo FACS Calibur® (BD Biosciences) usando a sonda 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate (DCFH-DA - Sigma Aldrich/MO, EUA) que permitiu detectar e quantificar a produção intracelular de H_2O_2 .

Os neutrófilos tratados para obtenção do meio condicionado (1h e 24h) foram transferidos para tubos de citometria na densidade de 1×10^5 células/mL e lavados por

centrifugação com PBS 1X e o sobrenadante, descartado. As células foram, então, tratadas com a sonda por 45 min na ausência de luz, lavadas novamente com PBS 1X e ressuspensas em 250 µL de FixFACs (PBS-Azida: Fomaldeído), permanecendo nesta solução (em 2-8°C) até o momento da análise.

4.8 Análise Estatística

Para levantamento estatístico, foi realizado ANOVA e teste de *Tukey* para a comparação entre os grupos de tratamentos. As análises foram realizadas usando o programa *GraphPad Prisma* e o nível de significância foi determinado pelo $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da Viabilidade de SK-N-SH

A viabilidade se deu pelo método de Azul de metileno que é capaz, por meio de absorbância, indicar o grau de viabilidade celular.

Na figura 6A (1h) e 6B (24h), é possível observar que os estímulos BJcuL e fMLP isoladamente e diretamente sobre SK-N-SH, não têm ação sobre a viabilidade de neuroblastoma. Quando neuroblastoma foi co-cultivado com neutrófilos, tratados ou não com BJcuL e fMLP por 1h não houve citotoxicidade (Figura 6A), por outro lado, no tempo 24h, as células imunes ativadas por BJcuL (Figura 6B) diminuiram significativamente a viabilidade de neuroblastoma. Já no tratamento indireto, os meios condicionados de 1h e 24h não foram capazes de alterar a viabilidade de SK-N-SH (Figura 6C e 6D).

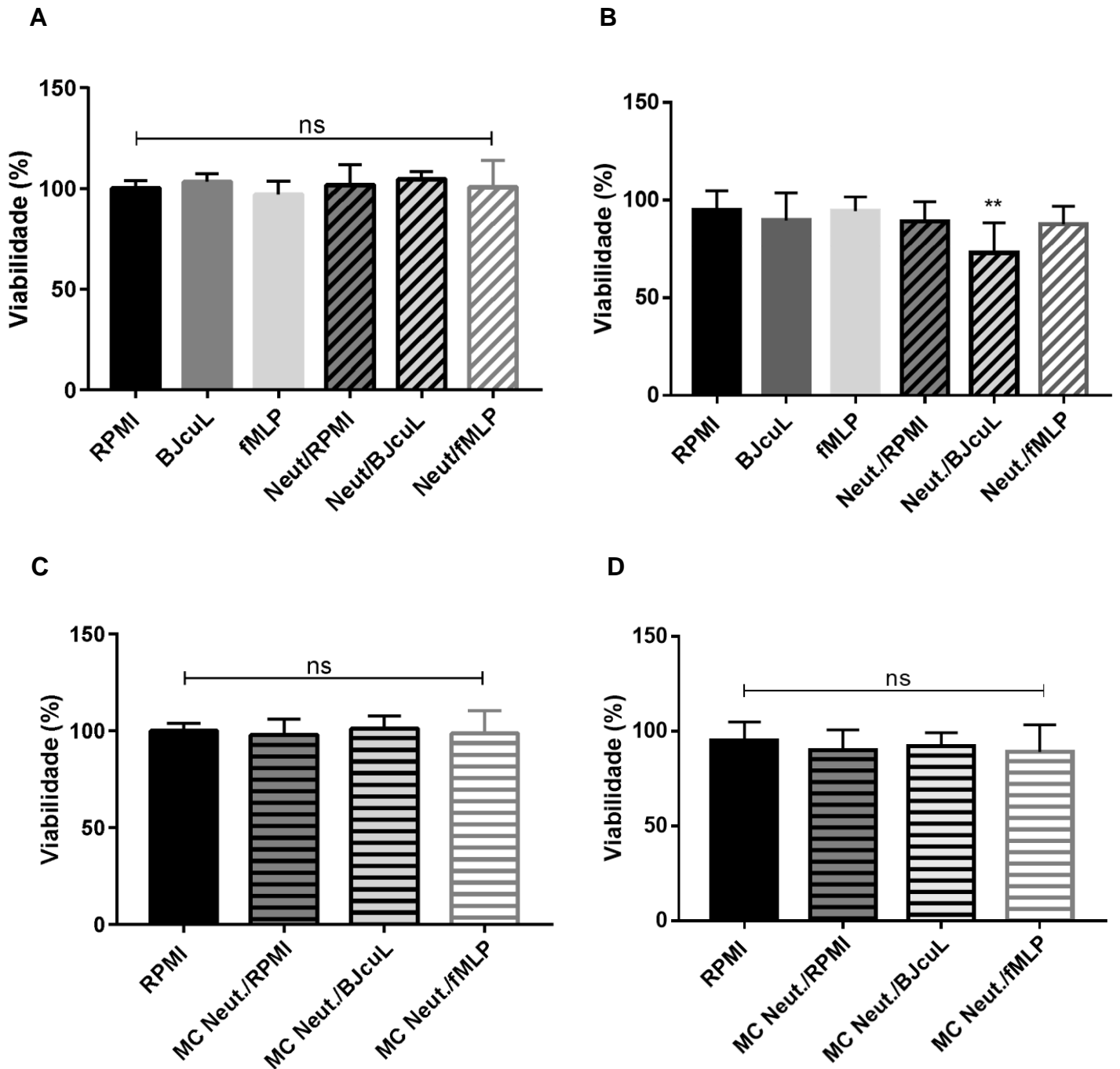


Figura 6. Análise da viabilidade de SK-N-SH tratadas com neutrófilos e meios condicionados. As células SK-N-SH foram plaqueadas ($3,5 \times 10^5$ célula/poço) para o ensaio de *Scratch Wound Healing* em presença de neutrófilos ($7,5 \times 10^4$ célula/poço) e seus estímulos/ meios condicionados (MCs) de neutrófilos (MC Neut./RPMI, MC Neut./BJcuL e MC Neut./fMLP). Após a finalização do *Scratch Wound Healing*, seguiu-se o ensaio de viabilidade das SK-N-SH provenientes do co-cultivo com neutrófilos e estimuladas por (A) 1h e (B) 24h e a viabilidade das SK-N-SH incubadas com MCs gerados a partir do tratamento com os estímulos por (C) 1h e (D) 24h. Os resultados A-D estão representados com média e desvio padrão ($n=10$) do total de células, o qual foi normalizado conforme o número de células viáveis do grupo não tratado (RPMI). A comparação estatística entre os grupos de tratamento foi realizada por one-way ANOVA e teste de Tukey com $p < 0,05$. (B) $**p=0,0026$.

5.2 Análise da Migração de SK-N-SH

A capacidade de migração da célula de neuroblastoma foi analisada através do ensaio de *Scratch Wound Healing*, cujo emprego permite visualizar e medir a distância percorrida pela célula após a raspagem mecânica e aplicação do tratamento. Foram feitas medições na largura da fenda em diferentes tempos e calculada a diferença entre o tempo inicial e o final, gerando assim o que foi denominado como distância de migração.

5.2.1 MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS SK-N-SH TRATADAS COM BJcuL

A capacidade migratória de SK-N-SH quando tratada diretamente com BJcuL não sofreu alteração. É possível observar nas Figuras 7A e 7B que as células da linhagem SK-N-SH possuem grande capacidade de migração.

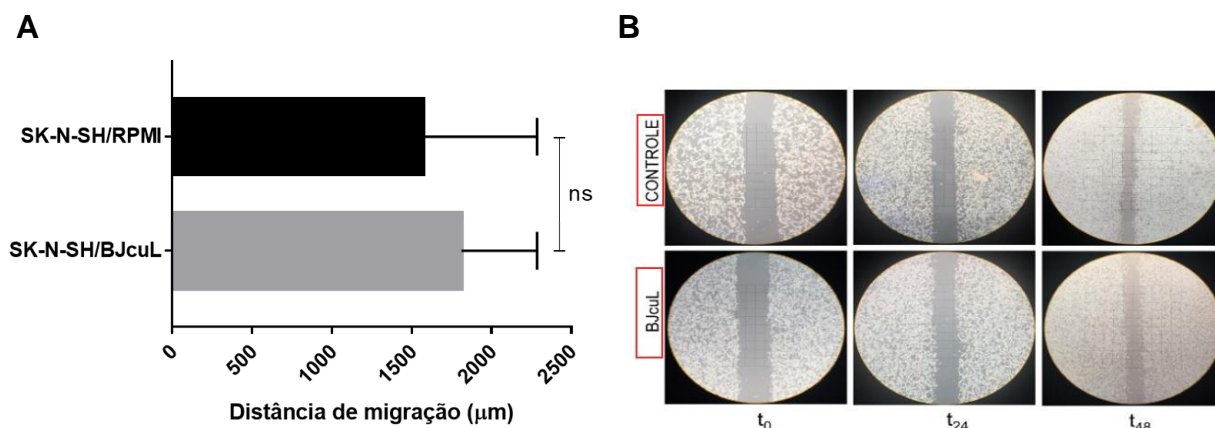


Figura 7. Migração das células SK-N-SH tratadas com BJcuL. (A) As células SK-N-SH foram plaqueadas (1×10^6 células/poço) e tratadas durante 24 horas com BJcuL (2,5 µg/mL). A distância entre as células após 48 horas da raspagem mecânica foi medida pelo *software ImageJ*. O resultado está representado com média e desvio padrão ($n=8$). A comparação estatística entre os grupos de tratamento foi realizada por *t de Student* $p < 0,05$. (B) Imagens de microscopia óptica do ensaio *in vitro* de *Scratch Wound Healing* do controle e do tratamento com BJcuL em t_0 , t_{24} e t_{48} . ns, não significativo.

5.2.2 MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS SK-N-SH FRENTE AO TRATAMENTO COM NEUTRÓFILOS E SEUS MEIOS CONDICIONADOS

Quanto ao método direto, na figura 8A, é possível observar que apenas neutrófilos ativados por 1h com fMLP foram capazes de diminuir a migração de NB quando comparada à incubação de SK-N-SH com neutrófilos não tratados. Na figura 8B, quando as células tumorais foram incubadas com neutrófilos não tratados, nota-se uma diminuição de migração. Entretanto, neutrófilos tratados com BJcuL e fMLP

por 24h aumentaram significativamente a migração tumoral, sem, no entanto, ultrapassar a migração basal da célula SK-N-SH controle cultivada apenas com RPMI.

Quanto ao método indireto, na figura 8C, nota-se que o meio condicionado de neutrófilos não tratados foi capaz de diminuir a capacidade de migração da célula SK-N-SH. Por outro lado, o MC de neutrófilos tratados com BJcuL e fMLP por 1h gerou aumento de migração. Na figura 8D, o meio condicionado de neutrófilos tratados por 24h com BJcuL e fMLP também induziram a um aumento de migração, mas de maneira mais discreta que as demais condições.

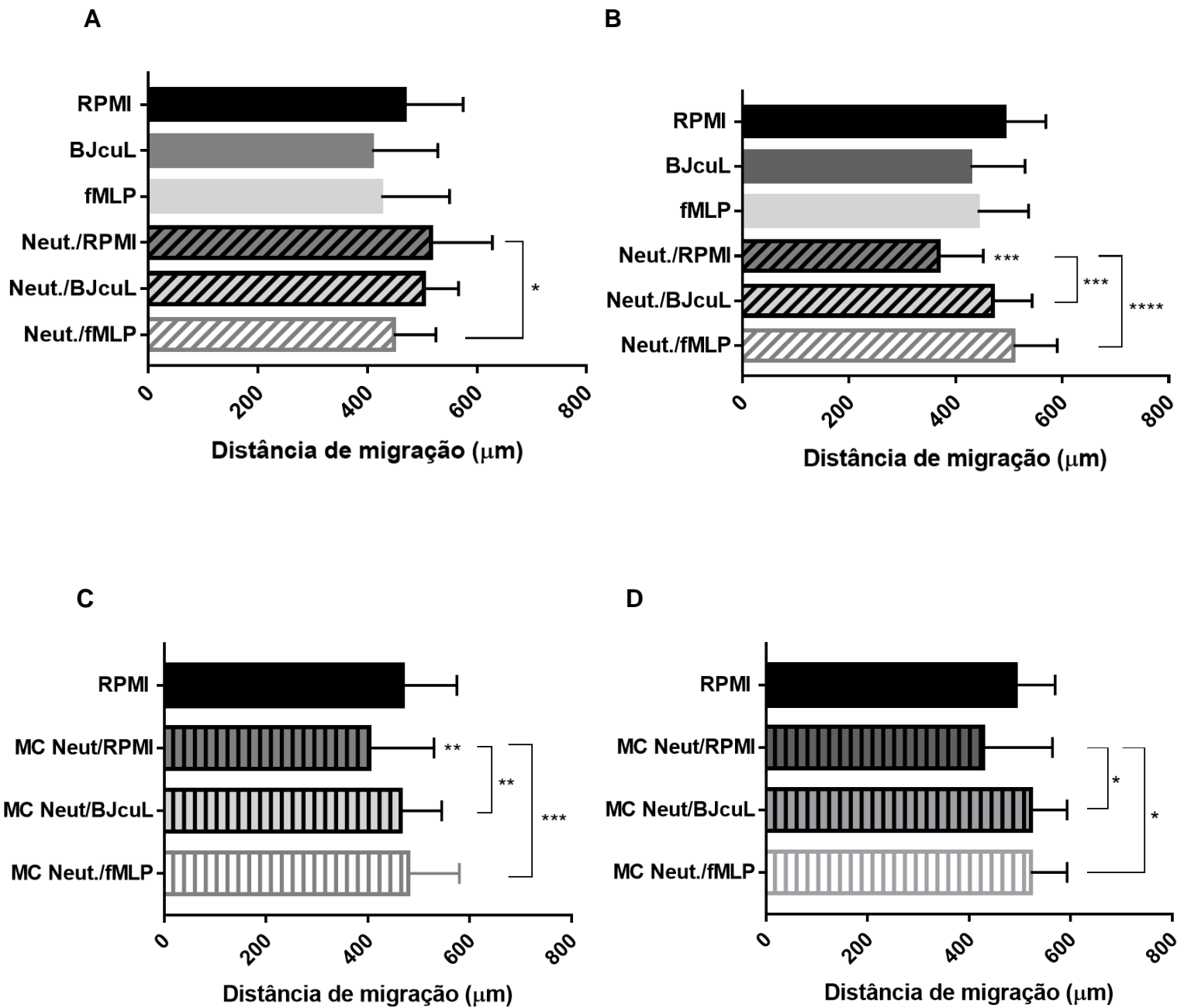


Figura 8. Migração das células SK-N-SH. As células SK-N-SH foram plaqueadas ($3,5 \times 10^5$ célula/poço) e foram adicionados neutrófilos e os estímulos BJcuL ($2,5 \mu\text{g/mL}$), fMLP ($10 \mu\text{M}$) e RPMI 2% como controle, por (A) 1h – sendo retirados os estímulos após esse período, mas com retorno dos neutrófilos ao co-cultivo – e (B) 24h. As células SK-N-SH foram plaqueadas ($3,5 \times 10^5$ célula/poço) e foram adicionados os meios condicionados de neutrófilos (MC Neut./BJcuL, MC Neut./fMLP e MC Neut./RPMI) obtidos dos tratamentos com seus estímulos por (C) 1h e (D) por 24h. Após 24h, o MC e os neutrófilos foram retirados, seguindo-se mais 24h de cultivo, totalizando 48h. Em todos (A-D) a distância de migração foi obtida pela diferença entre as distâncias dos tempos 0h e 48h. O resultado está representado com média e desvio padrão ($n=10$). A comparação estatística entre os grupos de tratamento foi realizada por one-way ANOVA e teste de Tukey. (A) $*p=0,0296$; (B) $***p=0,0003-0,0006$ e $****p<0,0001$; (C) $**p=0,0024-0,0044$ e $***p=0,0001$; (D) $*p=0,0123$.

5.3 Invasão das células SK-N-SH tratadas com neutrófilos

Na condição de tempo 1h, a incubação de células SK-N-SH com neutrófilos (direto) diminui significativamente a invasão do tumor, independentemente da presença ou ausência de ativação e do tratamento dessas células imunes serem com a lectina ou com fMLP (Figura 9A). Na figura 9C, o efeito se repete, havendo uma diminuição da capacidade de estabelecimento de colônias tumorais quando tratadas com os meios condicionados de neutrófilos (MC neut./RPMI, MC neut./BJcuL e MC neut./fMLP).

Na condição de tempo 24h, as células tumorais quando co-cultivadas (Figura 9B) com neutrófilos não tratados ou tratados com fMLP formam menos colônias que o controle (RPMI). Além disso, pode-se observar que BJcuL é capaz de interferir na invasão tumoral e que isso se intensifica quando há interação com neutrófilos. Na figura 9D, os meios condicionados MC neut./BJcuL e MC neut./fMLP diminuíram significativa e consideravelmente a capacidade do tumor de formação de colônias enquanto o MC neut./RPMI gerou diminuição, mas menos proeminente que as demais condições.

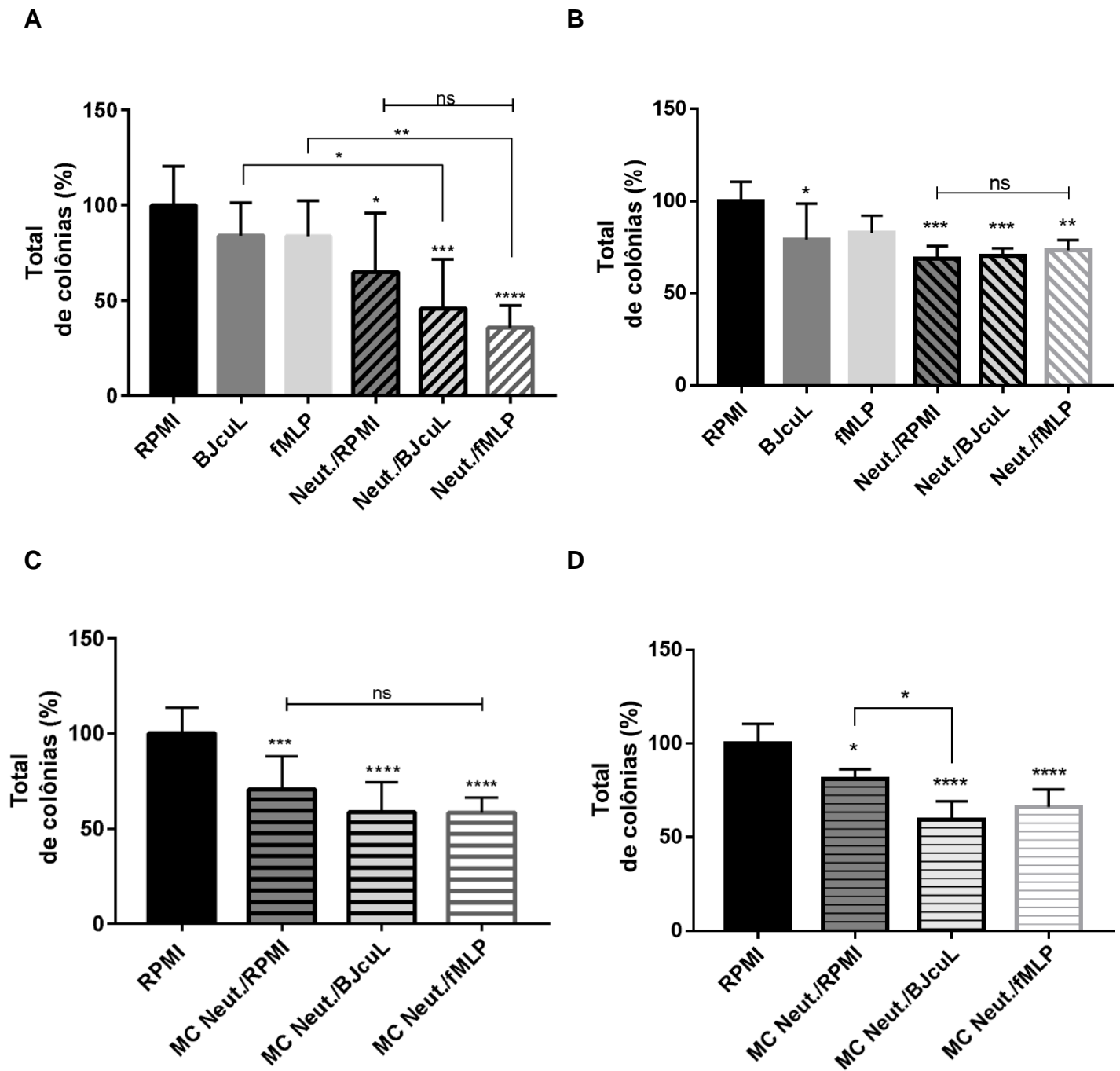


Figura 9. Invasão das células SK-N-SH tratadas com neutrófilos (direto e indireto). As células SK-N-SH (2×10^3 células/poço) foram incubadas com neutrófilos tratados com BJcuL ($2,5 \mu\text{g/mL}$), fMLP ($10 \mu\text{M}$) e RPMI 2%, como controle por (A) 1h – sendo retirados os estímulos após esse período, mas com retorno dos neutrófilos ao co-cultivo – e por (B) 24h. As células SK-N-SH (2×10^3 células/poço) foram incubadas por 24h com os meios condicionados de neutrófilos (MC Neut./RPMI, MC Neut./BJcuL e MC Neut./fMLP) obtidos dos tratamentos com seus estímulos por (C) 1h e (D) 24h. Após 24h com os tratamentos, as células SK-N-SH foram desaderidas, lavadas e plaqueadas na placa espelho contendo o *soft agar*. Os resultados estão representados com média e desvio padrão ($n=8$) do total de colônias, o qual foi normalizado conforme o número de colônias do grupo não tratado (RPMI). A comparação estatística entre os grupos de tratamento foi realizada por one-way ANOVA ($p < 0,05$) e teste de Tukey. (A) $*p = 0,05$ e $**p = 0,01$; (B) $*p = 0,0249$, $**p = 0,025$, $***p = 0,0006-0,0007$; (C) $***p = 0,0005$ e $****p < 0,0001$; (D) $*p = 0,0135-0,0280$ e $****p < 0,0001$.

5.4 Determinação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio

A produção de EROS pelas células da imunidade inata indica uma ativação pró-inflamatória para defesa contra patógenos ou para, via de regra, aumentar a capacidade antitumoral dessas células. Diante disso, visando acompanhar a ativação das células imunes, os neutrófilos incubados com BJcuL e fMLP (1h e 24h) foram analisados quanto a produção intracelular de EROS.

Na figura 10A, é possível observar que BJcuL não foi capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos tratados por 1h, já fMLP gerou uma ativação significativa. No tempo 24h (Figura 10B), esse perfil inverte-se, apresentando produção de EROS apenas pelas células imunes tratadas com BJcuL.

Embora a determinação da produção de EROs tenha sido realizada com o intuito de nortear as respostas obtidas na migração e invasão, ela não é o parâmetro decisório, uma vez que muitos fatores como interação célula-célula e liberação de citocinas estão envolvidos. Assim, foi dado sequência aos testes independentemente dos perfis de ativação obtidos.

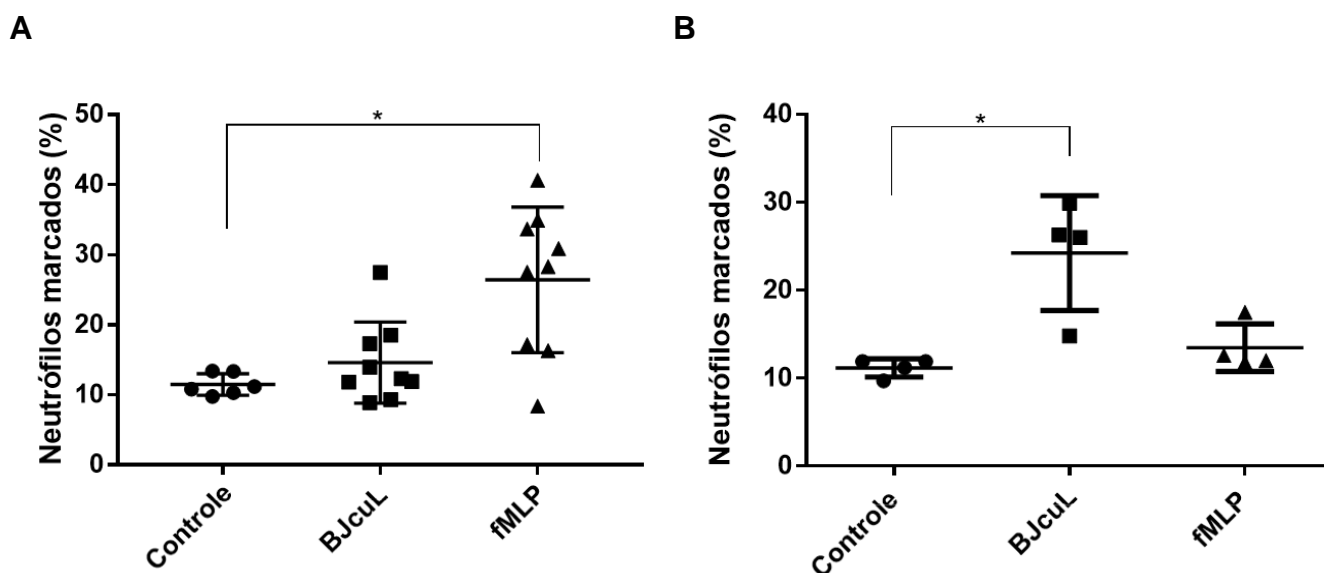


Figura 10. Determinação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio de neutrófilos. Os neutrófilos foram tratados com BJcuL (2,5 µg/mL) e fMLP (10 µM) por 1h e por 24h. Foram, então, incubadas com a sonda DCFH-DA e submetidos à citometria de fluxo para análise da produção de EROs. (A) Gráfico quantitativo gerado a partir dos resultados do histograma indicando a ativação significativa de fMLP sobre neutrófilos tratados por 1h. (B) Gráfico quantitativo indicando a ativação significativa de BJcuL sobre neutrófilos tratados por 24h. O resultado está representado como média e desvio padrão (A) n=9 e (B) n=4, usando teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação entre os grupos. (A) *p= 0,0127 e (B) *p= 0,0132.

6 DISCUSSÃO

O neuroblastoma é um câncer pediátrico no qual cerca de 40% dos pacientes apresentam diagnóstico de metástase e, embora haja avanços e terapia intensiva, aproximadamente metade dos pacientes classificados no grupo de alto risco vem à óbito. Nesse sentido, o conhecimento sobre as interações que ocorrem dentro do TME do neuroblastoma, principalmente no que tange a imunovigilância é essencial para implementar novas estratégias para imunoterapia (Pistoia et al., 2013).

O presente trabalho surgiu do conhecimento das diversas funções biológicas exercidas por BJcuL, que envolvem ensaios prévios realizados em nosso laboratório que mostraram a capacidade dessa lectina em polarizar neutrófilos e ativar macrófagos para fenótipo M1, trazendo, portanto, base para a possibilidade de BJcuL ativar leucócitos para um perfil pró-inflamatório e, conseqüentemente, antitumoral (Elíffio-Esposito et al., 2011, Dias-Netipanyj et al., 2016). Partindo desse pressuposto, a linhagem SK-N-SH de neuroblastoma foi incubada com neutrófilos tratados com BJcuL, bem como com os seus meios condicionados e diretamente com a lectina.

Os resultados mostraram que as células tumorais não sofreram alterações na viabilidade quando em contato apenas com a BJcuL (Figuras 6A-B), diferente do encontrado por autores que trabalharam com essa lectina em outros tipos tumorais. No trabalho realizado por Pereira-Bittencourt e colegas (1999), BJcuL inibiu o crescimento de células tumorais de rim (Caki-1 e A-498) e pâncreas (CFPAC-1). Também foi citotóxica para carcinoma de ovário (OVCAR-5), cujas células, após 96h de incubação com BJcuL, apresentaram alto declínio na viabilidade (Carvalho et al., 2001). Nolte e seus colaboradores (2012) demonstraram que essa lectina induziu apoptose em células de carcinoma gástrico (MKN45 e AGS) ao alterar a capacidade de adesão dessas células e Damasio e colegas (2014), indicaram que BJcuL sensibiliza proteínas pró-apoptóticas da via extrínseca da apoptose (FADD e caspase 8), sugerindo que a lectina seria capaz de favorecer a apoptose via TRAIL (*TNF-related Apoptosis-inducing Ligand* - ligante indutor de apoptose relacionado a TNF). Como seqüência do observado por Damasio et al. (2014), e a fim de testar essa hipótese, nosso grupo utilizou concentrações crescentes de BJcuL (1 µg/mL - 20 µg/mL) sobre células de câncer colorretal (HT29 e HCT116) na presença ou ausência de TRAIL. O que se encontrou foi que além de induzir acúmulo de FADD e caspase 8, BJcuL também induziu acúmulo de proteínas anti-apoptóticas, como c-FLIP, Bcl-2

e survivina, bem como de proteínas poliubiquitinadas, indicando que essa lectina é capaz de interferir no sistema ubiquitina-proteassomo (Tese de doutorado - Zischler, 2016).

Resultados atuais do nosso grupo de pesquisa mostraram que as células SK-N-SH não expressam ou expressam muito pouco caspase-8 (dados não publicados), o que parece ser comum em células de NB (Borriello et al., 2016). Este fator pode ser determinante para o impedimento da apoptose pela via extrínseca, já que, uma vez ativada e liberada no citoplasma, a caspase-8 participa da ativação das caspases efetoras no final do processo dessa via de morte (Segawa e Nagata, 2015). Diante dos dados da literatura, o teste de viabilidade das células SK-N-SH tratadas com BJcuL também foi realizado com concentrações superiores à 2,5 µg/mL (0-20 µg/mL) e em tempos superiores a 24h, como 48h e 72h, entretanto não houve qualquer citotoxicidade (dados não mostrados). Embora, o esperado para os testes de viabilidade fosse uma não alteração para garantir a não interferência na migração, uma vez que a migração nesse caso seria apenas reflexo do aumento do número de células, pode-se perceber que o comportamento das células de neuroblastoma quanto à proliferação frente à lectina contraria os resultados apresentados para os carcinomas. Isso pode indicar que o NB, de fato, exprime perfil diferenciado quando comparado aos demais tumores descritos e essas diferenças podem estar relacionadas à deficiência de expressão da caspase-8 por essa linhagem.

Segundo a literatura, leucócitos são capazes de interferir na viabilidade de células tumorais. Neutrófilos, segundo Sun et al. (2018), são capazes de interromper o ciclo celular precoce do tumor quando co-cultivadas com células A549 (adenocarcinoma alveolar). Monócitos polarizados pelo tumor para fenótipo M1, embora controverso, foram capazes de aumentar a viabilidade de algumas linhagens de NB (SKNAS, KELLY, IMR-32 e LAN-1), pois, segundo Fultang e colaboradores (2018), a arginase 2 (ARG2) conduz à proliferação de NB via regulação do metabolismo da arginina e que esta pode ocorrer pela secreção de IL1 β e TNF- α por TAMs M1. Por outro lado, linfócitos T $\gamma\delta$, mostraram-se citotóxicos para neuroblastoma, apresentando uma ação mais proeminente quando tratados com IL-2 (Schilbach et al., 2000). No presente estudo, os neutrófilos não tratados e seu meio condicionado (1h e 24h) não foram capazes de alterar a viabilidade da linhagem SK-N-SH de neuroblastoma (Figuras 6A-D), entretanto os neutrófilos tratados com BJcuL

quando em co-cultivo com SK-N-SH por 24h foram capazes de diminuir significativamente a viabilidade celular. Analisando os demais resultados obtidos, pode-se observar que a modulação dessas células imunes por BJcuL por um tempo de 24h e a interação célula-célula (neutrófilo e SK-N-SH) foram determinantes para essa ação, visto que a mesma condição no método indireto (24h) e tempo de 1h não alterou a viabilidade.

TGF- β é uma citocina que modula neutrófilos para um caráter anti-inflamatório por inibir a degranulação e a produção de EROs. Uma vez que se estabeleceu esse direcionamento, a esses neutrófilos, análogos aos macrófagos, deu-se a classificação N2, pró-tumorigênicos (Shen et al., 2007; Shaul e Fridlender, 2017). O fMLP é um fator produzido por bactérias que promove o mecanismo de degranulação e de produção de EROs (Andersson et al. 1987). Assim, comparativamente, pode-se conjecturar que fMLP polariza neutrófilos para um fenótipo N1 e esses estão relacionados a um caráter antitumoral. Entretanto no ensaio de migração, esse efeito só foi observado no ensaio direto de 1h (fig. 8A), quando se teve uma diminuição da migração tumoral quando incubado com fMLP.

Como indicado na figura 8, BJcuL promove o mesmo tipo de resposta induzida pela incubação com fMLP. Para 24h de incubação no tratamento direto e em todos os tempos de incubação no indireto, verifica-se uma queda na migração dos neuroblastos incubados com neutrófilos, sem qualquer tratamento. No entanto, quando tratados com BJcuL ou fMLP, os neutrófilos parecem ser impedidos de realizar tal ação e a migração volta aos níveis daquela obtida no controle com RPMI. Segundo Elíffio-Espósito (2011), o tratamento de neutrófilos com BJcuL e fMLP por 45 minutos polarizam essas células imunes para um fenótipo N1, todavia, no presente trabalho pode-se observar um efeito oposto quando os estímulos são colocados por 24h. Os dados obtidos na determinação de produção de EROs (Figura 10A-B) reforçam a constatação de que os efeitos de fMLP e BJcuL sobre neutrófilos podem variar de maneira não linear com os tempos 1h e 24h, já que em 1h apenas neutrófilos com fMLP sofrem ativação, sendo essa ativação não mais detectada em 24h, e paralelamente, vemos o inverso para BJcuL.

Os resultados obtidos para invasão (Figura 9A-D) nesse estudo contrariam o observado, até então, para outros tipos tumorais que apresentam muito mais indícios de um papel pró-invasivo para neutrófilos (Kalluri e Weinberg, 2009; Wislez et al.,

2003). No câncer de mama, por exemplo, as células tumorais estimulam a liberação de OMS (oncostatin M) por neutrófilos através da produção de GM-CSF. O OMS, por sua vez, induz a secreção de fator de crescimento do endotélio vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF), capaz de promover o destacamento de células tumorais e, conseqüentemente, gerar comportamento invasivo (Queen et al., 2005). Piccard, Muschel e Opdenakker (2012), revisaram as características dos fenótipos tipo N1 e N2 de neutrófilos, indicando que os neutrófilos tipo-N1 possuem aumento de FAS, IL-12, TNF- α , CCL3 e ICAM-1 e uma diminuição de arginase, CCL2, MMP-9 e STAT3. Essas citocinas e sinalizadores podem estar envolvidos nos resultados obtidos para invasão, uma vez que tanto o método direto quanto o indireto foram capazes de diminuir a invasão tumoral, indicando não ser, nesse caso, a interação célula-célula o fator determinante. Portanto uma posterior identificação das citocinas presentes nos meios (co-cultivo e condicionado) permitirá auxiliar o entendimento sobre a modulação de BJcuL sobre neutrófilos e de seu papel dúbio de, concomitantemente, aumentar migração e diminuir invasão.

Nesse estudo nos deparamos com algumas limitações que podem ser bastante relevantes para explicar os resultados. Primeiramente, a complexidade do microambiente tumoral composta por dezenas de sinalizações e de interações entre células imunes, não imunes (fibroblastos, por exemplo) e tumorais não pode ser mimetizada facilmente. Nos testes realizados, trabalhamos com células imunes isoladas e, portanto, a complexa rede de comunicação que ocorre entre a defesa inata e adaptativa pode ter sido consideravelmente afetada refletindo nos resultados obtidos. O *Scratch Wound Healing* é um método 2D para estudar uma migração que ocorre em 3D, isso pode ser uma grande limitação para a detecção de uma migração real, o que não o invalida, mas traz a necessidade de ensaios complementares que reforcem os resultados apresentados. Por fim, os neutrófilos utilizados no ensaio foram provenientes de sangue periférico de pacientes saudáveis. Eruslanov (2017), ressalta que, em contraste com os neutrófilos de sangue periférico (*Peripheral Blood Neutrophils* - PBNs), a interação entre os TANs e o microambiente tumoral provavelmente cause alterações fenotípicas e funcionais nas populações de TAN durante a progressão do tumor. Por esse motivo, segundo o pesquisador, para entender o papel dos neutrófilos durante a progressão tumoral, as próprias TANs devem ser investigadas e comparadas com os PBNs, entretanto o uso de neutrófilos

provenientes de pacientes seja de sangue periférico ou do TME é bastante delicado diante do comitê de ética, visto que os pacientes ideais para o estudo se encontram na faixa de 1-5 anos de idade.

Os resultados obtidos no ensaio de migração por 24h indicaram que as células imunes tratadas com BJcuL e em contato direto com o tumor possivelmente sejam modulados pelo câncer a um fenótipo N2. Esses neutrófilos (N2) passam, hipoteticamente, a liberar citocinas, tais como IL-6 e IL-23 que podem estimular a transição epitelial-mesenquimal (Yu, Pardoll e Jove, 2009; Smith e Kang, 2013) e iniciar o processo de migração. Entretanto, sabe-se que para a metástase ocorrer, o passo que se segue é a invasão. Os resultados para o teste de invasão obtidos demonstraram que neutrófilos tratados com BJcuL afetam significativamente nesse processo. Sendo assim, esse estudo demonstrou que a modulação de neutrófilos com BJcuL pode ser uma ferramenta a ser explorada a fim de compreender os mecanismos envolvidos em sua ação anti-invasiva e, portanto, utilizá-la no combate ao tumor como um coadjuvante da imunoterapia.

7 CONCLUSÃO

Os resultados indicaram que BJcuL, ao modular neutrófilos, é capaz de alterar funções importantes das células SK-N-SH. No ensaio de viabilidade, neutrófilos tratados com BJcuL diminuíram significativamente a capacidade proliferativa do tumor, enquanto, na migração, estimularam a motilidade dos neuroblastos. Por fim, neutrófilos incubados com BJcuL em contato direto com o tumor, ou ainda seu meio condicionado (MC neut./BJcuL) interferiram de forma expressiva sobre a invasão de SK-N-SH.

Os dados obtidos demonstram a relevância da BJcuL e da sua ação moduladora sobre neutrófilos, uma vez que uma etapa importante da metástase – invasão – sofreu interferência sob sua ação. Sendo assim, o observado no teste de invasão traz a perspectiva de desenvolvimento de estratégias que auxiliem a imunoterapia fazendo uso da BJcuL.

A etapa seguinte envolve, portanto, a identificação de citocinas presentes nos meios a fim de compreender quais mecanismos moleculares e sinalizações estão envolvidos nos dados observados.

REFERÊNCIAS

- AHMED, M. A., HU, J., CHEUNG, N. V. Structure based refinement of a humanized monoclonal antibody that targets tumor antigen disialoganglioside GD2. **Front Immunol.**, v. 14, n. 5, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25177320>>. Acesso em 15 jan. 2019;
- AMERICAN Cancer Society. EUA, 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/neuroblastoma.html>>. Acesso em 15 maio 2018;
- ANDERSSON, T. et al. Cell surface expression of f-Met-Leu-Phe receptors on human neutrophils. Correlation to changes in the cytosolic free Ca⁺² level and action of phorbol myristate acetate. **J Clin Invest.**, v. 79, n. 4, p. 1226-1233, 1987. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3558823>>. Acesso em 10 março 2019;
- ARMIDEO, E.; CALLAHAN, C.; MADONIA, L. Immunotherapy for High-Risk Neuroblastoma: Management of Side Effects and Complications. **J Adv Pract Oncol.**, v. 8, n. 1, p. 44–55, 2017. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5995538/>>. Acesso em 18 jan. 2019.
- BARRE, A. et Al. Overview of the Structure – Function Relationships of Mannose-Specific Lectins from Plants, Algae and Fungi. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 2, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30634645>>. Acesso em 20 jan. 2019;
- BIRDSALL, H. H. et al. Induction of VCAM-1 and ICAM-1 on human neural cells and mechanisms of mononuclear leukocyte adherence. **J Immunol.**, v.148, n. 9, p. 2717–2723, 1992. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1374096>>. Acesso em 17 jan. 2019;
- BOROWICZ, S. et al. The soft agar colony formation assay. **Journal of visualized experiments: JoVE.**, n. 92, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25408172>>. Acesso em: 15 nov. 2017;
- BORRIELLO, L. et al. More than the genes, the tumor microenvironment in neuroblastoma. **Cancer Letters**, v. 380, n. 1, p. 304–314, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26597947>>. Acesso em: 26 de nov. 2017;
- BRODEUR, G. M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. **Nat Rev Cancer**, v. 3, n. 3, p. 203-16, 2003. ISSN 1474-175X (Print)1474-175x. Acesso em 5 jan. 2019;
- BUTS, L. et al. Weak Protein-Protein Interactions in Lectins: The Crystal Structure of a Vegetative Lectin from the Legume *Dolichos biflorus*. **J. Mol. Biol.**, v. 309, n. 1, p. 193–201, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11491289>>. Acesso em 15 dez 2017;

CAMARGO B. et al. Socioeconomic status and the incidence of non-central nervous system childhood embryonic tumours in Brazil. **BMC Cancer**, v. 11, n. 1, p. 160, 2011. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/160>>. Acesso em 4 jan. 2019;

CAMERER, E. et al. Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. **Blood**, v. 104, n. 2, p. 397–402, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15031212>>. Acesso em 17 jan. 2019;

CARVALHO, D. D. et al. Isolation and Characterization of a New Lectin from the Venom of the Snake *Bothrops Jararacussu*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 44, n. 5, p. 933–938, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11478954>>. Acesso em 12 jan. 2017;

CARVALHO, D. DE; SCHMITMEIER, S. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon**, v. 39, p. 1471–1476, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010101001064>>. Acesso em 15 dez. 2017;

CELIÀ-TERRASSA, T.; KANG, Y. Distinctive properties of metastasis-initiating cells. **Genes Dev.**, v. 30, n. 8, p. 892-908, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4840296/>>. Acesso em 17 jan. 2019.

CHAMBERS, A. F. et al. Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. **Surg Oncol Clin N Am.**, v. 10, n. 2, p. 243-55, vii, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11382585>>. Acesso em 21 Jan. 2019;

CHEUNG, N. V.; DYER, M. A. Neuroblastoma: Developmental Biology, Cancer Genomics, and Immunotherapy. **Nat Rev Cancer**, v.13, n. 6, p. 397–411, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4386662/>>. Acesso em 15 jan. 2019;

COFFELT, S. B. et al. Europe PMC Funders Group IL17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. **Nature**, v. 522, n. 7556, p. 345–348, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25822788>>. Acesso em 16 jan. 2019;

CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 263–266, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16439202>>. Acesso em 16 jan. 2019.

DAMASIO, D. C. et al. The lectin BJcuL induces apoptosis through TRAIL expression, caspase cascade activation and mitochondrial membrane permeability in a human colon adenocarcinoma cell line. **Toxicon**, v. 90, p. 299–307, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25194746>>. Acesso em: 27 nov. 2017;

DIAS-NETIPANYJ, M. F. et al. BjcL, a snake venom lectin, modulates monocyte-derived macrophages to a pro-inflammatory profile *in vitro*. **Toxicology in Vitro**, v. 33, p. 118–124, 2016;

DIEDE, S. J. Spontaneous regression of metastatic cancer: learning from neuroblastoma. **Nat Rev Cancer**, v. 14, n. 2, p. 71-2, 2014. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24616911> >. Acesso em: 16 jan. 2019;

DRAKE, C. G.; JAFFEE, E.; PARDOLL, D. M. Mechanisms of Immune Evasion by Tumors. **Adv Immunol.**, v. 90, n. 1, p. 51–81, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16730261>>. Acesso em 26 jan. 2019;

DRICKAMER, K. Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. **Nature**, v. 360, n. 6400, p.183-186, 1992. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1279438>>. Acesso em: 31 nov. 2017;

ELIFIO-ESPOSITO, S. L. et al. A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom can adhere to extracellular matrix proteins and induce the rolling of leukocytes. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 13, n. 4, p. 782–799, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992007000400009>>. Acesso em: 30 nov. 2017;

ELIFIO-ESPOSITO, S. et al. Human neutrophil migration and activation by BJcL, a galactose binding lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom. **BMC immunology**, v. 12, p. 10, 2011. BioMed Central. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21266049>>. Acesso em: 27 nov. 2017;

ELSAWA, S. F. et al. Comprehensive analysis of tumor microenvironment cytokines in Waldenstrom macroglobulinemia identifies CCL5 as a novel modulator of IL-6 activity. **Blood**, v. 118, n. 20, p. 5540–5549, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21454528>>. Acesso em 18 jan. 2019;

ERUSLANOV, E. B. et al. Phenotype and function of tumor-associated neutrophils and their subsets in human lung cancer. **Cancer Immunol Immunother.**, v. 66, n. 8, p. 997–1006, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28283697>>. Acesso em: 31 jan. 2019;

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in **GLOBOCAN**, v. 386, 2015. Disponível: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/25220842/>>. Acesso em 10 jan. 2019;

FRIDLENDER, Z. G. et al. Polarization of Tumor-Associated Neutrophil (TAN) Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. **Cancer Cell**, v. 16, n. 3, p. 183–194, 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2754404/>>. Acesso em 3 fev. 2019;

FULTANG, L. et al. Macrophage-Derived IL1 β and TNF α Regulate Arginine

Metabolism in Neuroblastoma. **Cancer Res.**, v. 79, n. 3, p. 611-624, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30545920>>. Acesso em 25 fev. 2019;

GALDIERO, M. R.; GARLANDA, C.; JAILLON, S.; MARONE, G.; MANTOVANI, A. Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 7, p. 1404–1412, 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.24260>>. Acesso em: 29 nov. 2018;

GENTILINI, F. G; CALABRESE, E; PAGA, C. Immunoterapia e cancro: verso il 2020 **Recenti Prog Med**, v. 109; p. 566-569, 2018. Disponível em <http://www.recentiproggressi.it/r.php?v=3082&a=30740&l=336110&f=allegati/03082_2018_12/fulltext/02_Editoriale%20-%20Gentilini.pdf>. Acesso em 12 jan. 2019;

GERMIC, N.; FRANGEZ, Z.; YOUSE, S.; SIMON, H. Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation. **Cell Death Differ.**, v. 26, n. 4, p. 715-727, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30737475>>. Acesso em 2 fev. 2019;

GLOBAL Cancer Observatory. France, 2019. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/76-brazil-fact-sheets.pdf>>. Acesso em 12 jan. 2019;

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 309–322, 2012. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>>. Acesso em 29 jan. 2019;

HARTSHORN, K. Interactions of recombinant human pulmonary surfactant protein D and SP-D multimers with influenza A. **Am J Physiol.**, v. 271, n. 5 Pt. 1; p.753-762, 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8944718>>. Acesso em 1 dez. 2017;

HASHIMOTO, O.; YOSHIDA, M.; KOMA, Y.-I.; et al. Collaboration of cancer-associated fibroblasts and tumour-associated macrophages for neuroblastoma development. **Journal of Pathology J Pathol**, v. 240, p. 211–223, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5095779/pdf/PATH-240-211.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2017;

HERBST R. S. et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patient. **Nature**, v. 515, n. 7528, p. 563–567, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25428504>>. Acesso em 18 jan. 2019;

HUI, L.; CHEN, Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. **Cancer Letters**, v. 368, p. 7–13, 2015. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.039>>. Acesso em 28 jan. 2019;

INSTITUTO Nacional de Câncer. Brasil, 2018. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>>. Acesso em 12 jan. 2019;

INTERNATIONAL Agency for Research on Cancer. France, 2018. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>>. Acesso em 10 jan. 2019;

JOYCE, J. A.; POLLARD, J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 4, p. 239–252, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279573>>. Acesso em 16 jan. 2019;

KALLIKOURDIS, M. T cell responses to tumor: how dominant assumptions on immune activity led to a neglect of pathological functions, and how evolutionary considerations can help identify testable hypotheses for improving immunotherapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 67, n. 6, p. 989-998, 2018. Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29335855>>. Acesso 23 jan. 2019;

KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J. Clin. Invest.**, v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19487818>>. Acesso 15 jan. 2019;

KANG, Y.; PANTEL, K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. **Cancer Cell**. v. 23, n. 5, p. 573–581, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23680145>>. Acesso em 16 jan. 2019;

KOMOHARA, Y.; JINUSHI, M.; TAKEYA, M. Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. **Cancer Sci.**, v. 105, n. 1, p. 1-8, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1111/cas.12314>>. Acesso em 4 fev 2019;

KOMOHARA, Y.; TAKEYA, M. CAFs and TAMs: maestros of the tumour microenvironment. **The Journal of Pathology**, v. 241, n. 3, p. 313–315, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27753093>>. Acesso em: 26 nov. 2017;

KNIBBS, R. N. et al. Wild-type and cultured Ehrlich ascites tumour cells differ in tumorigenicity, lectin binding patterns and binding to basement membranes. **Glycobiology**, v. 4, n. 4, p. 419-428, 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7827403>>. Acesso em 15 Jan. 2017;

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN D. R; WEINBERG R. A. Emerging biological principles of metastasis. **Cell.**, v. 168, n. 4, p. 670–691, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28187288>>. Acesso em 21 jan. 2019;

LIN, E. Y. et al. Macrophages Regulate the Angiogenic Switch in a Mouse Model of Breast Cancer. **Cancer Res.**, v. 66 n. 23, p. 11238–11247, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17114237>>. Acesso em 2 fev. 2019;

LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. **J. Cell Biol.**, v. 196, n. 4, p. 395–406, 2012. Disponível em: <www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201102147>. Acesso em 1 fev. 2019;

MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.*, v. 25, n. 12, p. 677-686, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530839>>. Acesso em 2 fev. 2019;

MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M. A.; COSTANTINI, C. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 8, p. 519–531, 2011. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3024>>. Acesso em: 3 fev. 2019;

MARIS, J. M. et al. Neuroblastoma. **Lancet**, v. 369, n. 9579, p. 2106-20, 2007. ISSN 1474-547X (Electronic)0140-6736 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17586306>. Acesso em: 15 agosto 2017;

MARIS, J. M. Recent Advances in Neuroblastoma. **N Engl J Med**, v. 362, n. 23, p. 2202–2211, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20558371>>. Acesso em 12 abril 2018;

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends Cell Biol**, v. 15, n. 11, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16202600>>. Acesso em 2 fev. 2019;

MARVEL, D.; GABRILOVICH, D. I. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. **J Clin Invest**, v. 125, n. 9, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi:10.1172/JCI80005>>. Acesso em 1 fev. 2019;

MASECCHIA, S. et al. Genome instability model of metastatic neuroblastoma tumorigenesis by a dictionary learning algorithm., 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4566396/pdf/12920_2015_Article_132.pdf>. Acesso em: 26 nov. 2017;

MASTRO, A. M. et al. Mitogenic activity of snake venom lectins. **Cell. Tissue Kinet.**, v. 19, v. 5 p. 557-566, 1986. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3791376>>. Acesso em 15 Jan. 2017;

MATTHAY, K. K. et al. Neuroblastoma. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, p. 16078, 11 2016. ISSN 2056-676X. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27830764>>. Acesso em: 15 agosto 2017;

MEANY, H. J. Non-High-Risk Neuroblastoma: Classification and Achievements in Therapy. **Children (Basel)**, v. 6, n. 1, p. 5, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6352142/>>. Acesso em 25 jan. 2019;

MILANI, Jr. R. et al. Snake bites by the jararacussu (*Bothrops jararacussu*): clinicopathological studies of 29 proven cases in: São Paulo State. **Q. J. Med**, v. 90, p.323-334, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9205667>>. Acesso em: 12 dez. 2017;

MORA, J. et al. Molecular Genetics of Neuroblastoma and the Implications for Clinical Management: A Review of the MSKCC Experience. **The Oncologist**, v. 6, p. 263–268, 2001. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11423673>%5Cn<http://theoncologist.alphamedpress.org/cgi/doi/10.1634/theoncologist.6-3-263>> Acesso em 20 agosto 2017;

NATIONAL Cancer Institute. EUA, 2018. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/types/neuroblastoma>> Acesso em 20 jan. 2019;

NIEWIAROWSKA-SENDO, A. et al. The effect of differentiation agents on inflammatory and oxidative responses of the human neuroblastoma cell line SK-N-SH. **Acta Biochim Pol**, v.62, n. 3, p. 435-443, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26284263>>. Acesso em: 29 nov. 2017;

NOLTE, S. et al. BJcuL, a lectin purified from Bothrops jararacussu venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly. **Toxicon**, v.59, n. 1, p. 81-85, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079298>>. Acesso em: 18 nov. 2017;

OLSEN, R. et al. MYCN induces neuroblastoma in primary neural crest cells. **Nature Publishing Group**, v. 36, p. 5075–5082, 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/onc/journal/v36/n35/pdf/onc2017128a.pdf>>. Acesso em: 26 nov. 2017;

OZEKI, Y. et al. C-type galactoside-binding lectin from Bothrops jararaca venom: comparison of its structure and function with those of botrocetin. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 308, n. 1, p. 306-310, 1994. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8311467>>. Acesso em 15 Jan. 2017;

PAHLER, J. C. et al. Plasticity in Tumor-Promoting Inflammation: Impairment of Macrophage Recruitment Evokes a Compensatory. **Neoplasia**, v. 10, n. 4, p. 329–339, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18392134>>. Acesso em: 16 jan. 2019;

PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nat Rev Cancer**, V.12, n. 4, p. 252–264, 2016. Disponível em: <doi:10.1038/nrc3239>. Acesso em: 10 jan. 2019;

PARISE, I. Z. et al. Neuroblastoma in southern Brazil: an 11-year study. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 28, n. 2, p. 82-7, 2006. ISSN 1077-4114 (Print) 1077-4114 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16462579>. Acesso em: 16 agosto 2017;

PATHAN, J. et al. Daboialectin, a C-type lectin from Russell's viper venom induces cytoskeletal damage and apoptosis in human lung cancer cells *in vitro*. **Toxicon**, v. 127, p. 11–21, 2017. doi: 10.1016/j.toxicon.2016.12.013. Acesso em 21 jan. 2019;

PERILLO, N. L.; MARCUS M. E.; BAUM L. G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. **J Mol Med**, v.76, n.6 p. 402–412, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9625297>>. Acesso em 16 dez. 2017;

PICCARD, H.; MUSCHEL, R. J.; OPDENAKKER, G. One the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. **Crit. Rev Oncol Hematol.**, v. 82, n. 3, p. 296-309, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21798756>>. Acesso em 14 março 2019;

PISTOIA, V. et al. Immunosuppressive microenvironment in neuroblastoma. **Front Oncol.**, v. 3, n. 167, p. 1–8, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805414>>. Acesso em 15 jan. 2019;

POWLES, T. et al. MPDL3280A(anti-PD-L1) treatmentleadstoclinical activity in metastatic bladder cancer. **Nature**, v. 515, v. 7528, p. 558-562, 2014. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25428503>>. Acesso em 18 jan. 2019.

QUAIL, D.F.; JOYCE, J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med.**, v. 19, n. 11, p. 1423–1437, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24202395>>. Acesso em 15 jan. 2019;

QUEEN, M. M. et al. Breast Cancer Cells Stimulate Neutrophils to Produce Oncostatin M: Potential Implications for Tumor Progression. **Cancer Res.**, v. 65, n. 19, p. 8896–8905, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16204061>>. Acesso em: 30 jan. 2019;

RAO, X.; ZHONG, J.; SUN, Q. The heterogenic properties of monocytes/macrophages and neutrophils in inflammatory response in diabetes. **Life Sci**, v.116, n 2, p. 59–66, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4253730/pdf/nihms632857.pdf>>. Acesso em 21 jan. 2019;

RENRIK, A. N.; DUNBARD, Z.T.; SHANKER, A. Update on the current revolution in cancer immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 11, n. 1, p. 15-20, 2019. Disponível em: <<https://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/imt-2018-0135>>. Acesso em 15 jan. 2019;

SCHILBACH, K. E. et al. Human gammadelta T lymphocytes exert natural and IL-2-induced cytotoxicity to neuroblastoma cells. **J Immunother.**, v. 23, n. 5, p. 536-548, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001547>>. Acesso em 10 março 2019;

SCHWANKHAUS, N. et al. Cell adhesion molecules in metastatic neuroblastoma models. **Clin Exp Metastasis**, v. 31, n. 4, p. 483-496, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24549749>>. Acesso em: 12 jan. 2019;

SEEGER, R. C. Immunology and Immunotherapy of Neuroblastoma. **Semin Cancer Biol.**, v. 21, n. 4, p. 229–237, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21971567>>. Acesso em 15 jan. 2019;

SEGAWA, K.; NAGATA, S. An apoptotic ‘Eat Me’ Signal: Phosphatidylserine Exposure. **Trends Cell Biol.**, v. 25, n. 11, p. 639-650, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26437594>>. Acesso em 13 março 2019;

SHAUL, M. E.; FRIDLENDER, Z. G. Neutrophils as active regulators of the immune system in the tumor microenvironment. **J Leukoc Biol.**, v. 102, n. 2., p. 343-349, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28264904>>. Acesso em 12 fev. 2019;

SHEN, L. et al. Inhibition of human neutrophil degranulation by transforming growth factor β 1. **Clin Exp Immunol.**, v. 149, n. 1, p. 155-161, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1942024/>>. Acesso em 10 fev. 2019;

SHIMADA, H. et al. International Neuroblastoma Pathology Classification for Prognostic Evaluation of Patients with Peripheral Neuroblastic Tumors A Report from the Children’s Cancer Group. **Cancer**, v. 92, n. 9, p. 2451-2461, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11745303>>. Acesso em: 2 out. 2017;

SINGH, R. S.; TIWARY A. K.; KENNEDY J. F. Lectins: Sources, Activities, and Applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 145–178, 1999;

SMITH, H. A.; KANG, Y. The Metastasis-Promoting Roles of Tumor-Associated Immune Cells. **J Mol Med (Berl)**., v. 91, n. 4, p. 411-429, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23515621>>. Acesso em 16 jan. 2019;

SPIEGEL, A. et al. Neutrophils suppress intraluminal NK-mediated tumor cell clearance and enhance extravasation of disseminated carcinoma cells. **Cancer Discov.**, v. 6, n. 6, p. 630–649, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27072748>>. Acesso em 17 jan. 2019.

STAMBROOK, P. J.; MAHER J.; FARZANEH F. Cancer Immunotherapy: Whence and Whither. **Mol Cancer Res.**, v. 15, n. 6, p. 635–650, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28356330>>. Acesso em 30 jan. 2019;

SUN, B. et al. Neutrophil Suppresses Tumor Cell Proliferation via Fas /Fas Ligand Pathway Mediated Cell Cycle Arrested. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 14, n. 14, p. 2103-2113, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30585273>>. Acesso em: 20 fev. 2019;

TODORIC, J.; ANTONUCCI, L.; KARIN, M. Targeting Inflammation in Cancer Prevention and Therapy. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 9, n. 12, p. 895–905, 2016. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5142754/pdf/nihms826968.pdf>>. Acesso em 21 jan. 2019;

URRA, F. A e ARAYA-MATURANA, R. Targeting Metastasis with Snake Toxins: Molecular Mechanisms. **Toxins**, v. 9, n. 390, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29189742>>. Acesso em 20 jan. 2019;

VITALI, R. et al. Slug (SNAI2) Down-Regulation by RNA Interference Facilitates Apoptosis and Inhibits Invasive Growth in Neuroblastoma Preclinical Models. **Clin Cancer Res.**, v. 14, n. 14, p. 4622-4630, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18628477>>. Acesso em: 20 fev. 2019;

WISLEZ, M. et al. Hepatocyte Growth Factor Production by Neutrophils Infiltrating Bronchioloalveolar Subtype Pulmonary Adenocarcinoma: Role in Tumor Progression and Death. **Cancer Res.**, v. 63, n. 6, p. 1405–1412, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12649206> > Acesso em 30 jan. 2019;

YU, H.; PARDOLL, D.; JOVE, R. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 11, p. 798–809, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19851315>>. Acesso 15 jan. 2019;

ZHANG, J.; ENDRES, S.; KOBOLD, S. Enhancing tumor T cell infiltration to enable cancer immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 11, p. 201–213, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.2217/imt-2018-0111>>. Acesso em 22 jan. 2019.

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido

Eu, _____
_____ (nome completo), _____ (nacionalidade), _____ anos,
_____ (estado civil), _____ (profissão), portador do
RG _____, aceito participar do estudo denominado: Efeito
direto e indireto de neutrófilos tratados com BJcuL sobre a capacidade de migração e
invasão de células de neuroblastoma *in vitro*, cujos objetivos e justificativas são:
avaliar se neutrófilos (células do sangue) tratados com BJcuL (toxina proveniente do
veneno de jararaca) produzem substâncias capazes de interferir no poder de migração
e invasão de células de neuroblastoma *in vitro*. Uma vez que esse tumor infantil tem
alta taxa de mortalidade em grupos de alto risco, um composto como a BJcuL, capaz
de estimular células do sistema de defesa humano, poderia ser um caminho na
potencialização da imunoterapia contra esse câncer.

A minha participação no estudo será no sentido de permitir a coleta de dados
cadastrais, fornecer dados verdadeiros sobre o meu estado de saúde, e, por fim,
submeter-se à coleta de sangue para prosseguimento desse experimento.

Estou ciente de que o procedimento de coleta pode trazer pequenos danos
como: hematoma, edema e desconforto locais.

Fui informado de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome
ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar,
será mantido em sigilo.

Recebi o esclarecimento de que posso me recusar a participar do estudo, ou
retirar minha permissão a qualquer momento, sem precisar de justificativa.

Espaço para rubrica pesquisador

Paciente

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são Jéssica Ohana Lemes Carneiro Goetten, mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Escola de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, e Selene Elíffio-Esposito (orientadora), e com eles poderei manter contato pelos telefones (41) 999027361 (Jéssica); (041) 988722665 (Selene).

É garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo.

Finalmente, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

No entanto, caso eu tenha qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, haverá ressarcimento na forma seguinte de dinheiro. De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei.

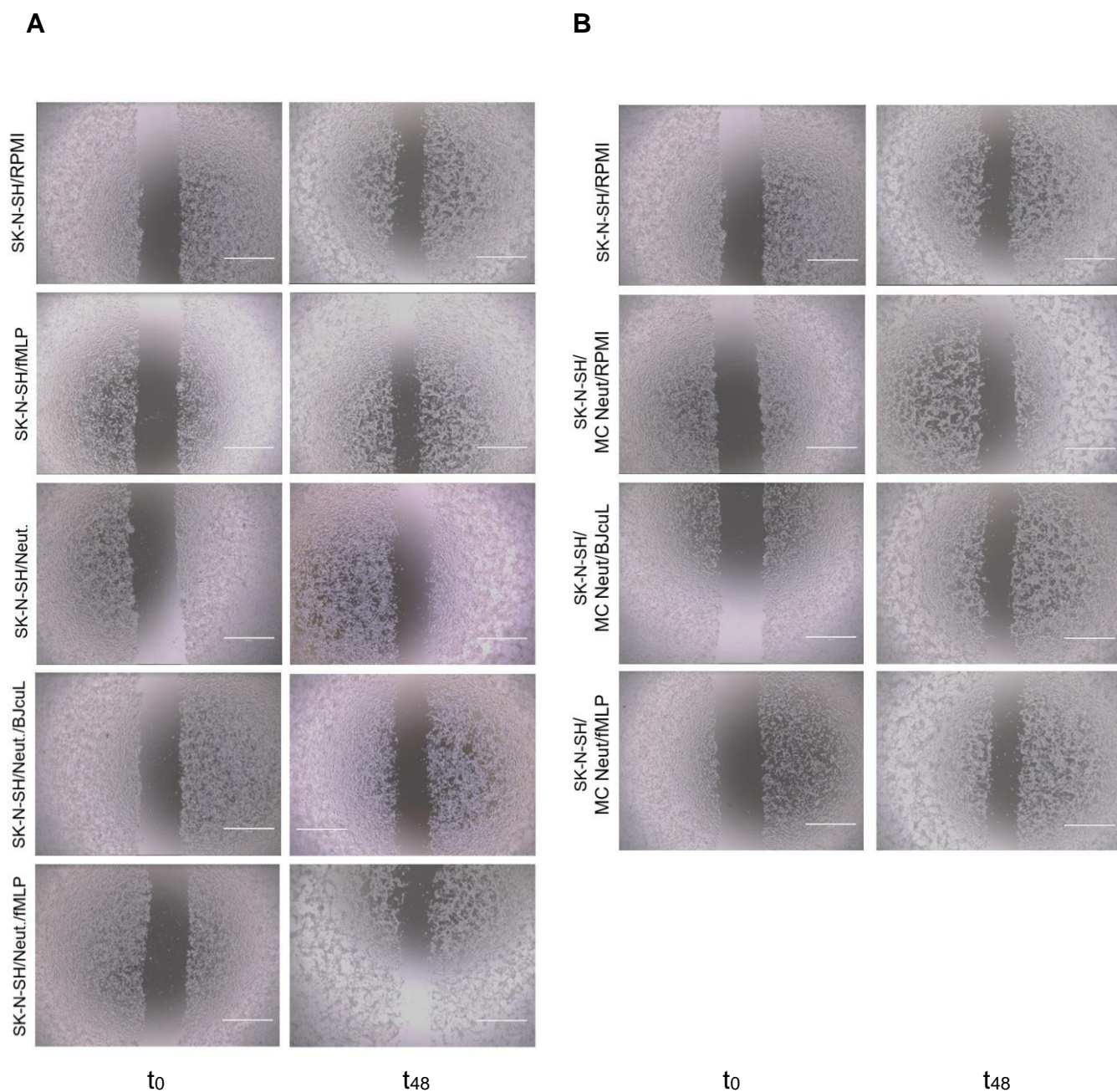
Em caso de reclamação ou qualquer tipo de denúncia sobre este estudo devo ligar para o CEP PUCPR (41) 3271-2292 ou mandar um *email* para nep@pucpr.br

Curitiba, _____ de _____ de 2018.

Nome e assinatura do sujeito da pesquisa

Nome(s) e assinatura(s) do(s) pesquisador(es) responsável(responsáveis)

APÊNDICE B – Imagens do ensaio de migração de células SK-N-SH com neutrófilos (direto e indireto)



APÊNDICE B. Migração das células SK-N-SH. Imagens obtidas pelo Microscópio EVOS® XL do ensaio *in vitro* de *Schatch Wound Healing*. (A) Co-cultivo de SK-N-SH com neutrófilos estimulados por 1h e (B) Meios condicionados de neutrófilos estimulados por 1h. Não foi possível acrescentar as imagens do ensaio de 24h.

APÊNDICE C – Financiamento e colaborações desta pesquisa

O presente trabalho foi financiado pela Fundação Araucária sob CP 09/2016 Programa Institucional de Pesquisa Básica e aplicada Pontifícia Universidade Católica do Paraná Subprojeto 4.

Contou ainda com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/ Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições Comunitárias de Educação (CAPES/PROSUC) na forma de bolsa de mestrado.

A isenção de pagamento devido à Pontifícia Universidade Católica do Paraná referente ao curso de pós-graduação em Ciências da Saúde *Lato Sensu* se deu inicialmente através do Prêmio Marcelino Champagnat recebido em 2015 durante a finalização da graduação em Farmácia nessa mesma instituição.

Além do apoio financeiro, esta pesquisa contou com a colaboração do Laboratório Experimental Multiusuário (LEM) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Curitiba).

APÊNDICE D – Outros Resultados

CONGRESSO

47ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (Joinville, Santa Catarina)

GOETTEN, J. O. L. C; DIAS-NETIPANYJ, M.F; RODRIGUES, B.S.; ELÍFIO-ESPOSITO, S. Functional characterization of the snake venom lectin BJcuL: macrophages modulation and indirect effect upon neuroblasts migration *in vitro*, 2018. (Apresentação de Pôster).

ORIENTAÇÃO DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO

Bruna Santos Rodrigues. Leucócitos ativados por BJcuL afetam a migração de células de neuroblastoma *in vitro*, 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

ORIENTAÇÃO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO

Lucas Gabriel Tais. Confeção de lâminas com alterações morfogenéticas, 2017. Estágio Supervisionado (Graduação em Ciências Biológicas) - Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

PUBLICAÇÃO

Participação em artigo de revisão como co-autora

COGO, S. C.; NASCIMENTO, T. G. F. C.; PINHATTI, F. A. B.; CARNEIRO, J. O. L.; ELÍFIO-ESPOSITO, S. *Neuroblastoma cell lines as biological models for the study of cancer*. Artigo de Revisão a ser submetido à Revista *Cancer Letters* (Fator de Impacto: 6,49).