

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: FISILOGIA E FARMACOLOGIA

WALISON NUNES DA SILVA

**PAPEL DAS CÉLULAS DE SCHWANN NA PROGRESSÃO DO MELANOMA
MURINO EXPERIMENTAL**

BELO HORIZONTE-MG

2022

WALISON NUNES DA SILVA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas

- Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Alexander Birbrair

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Sara Santos

BELO HORIZONTE-MG

2022

043

Silva, Walison Nunes da.

Papel das células de Schwann na progressão do melanoma murino experimental [manuscrito] / Walison Nunes da Silva. – 2022.

79 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Alexander Birbrair. Co-orientadora: Prof.^a Dra. Sara Santos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Melanoma. 3. Microambiente Tumoral. 4. Sistema Nervoso Periférico. 5. Células de Schwann. 6. Resposta Imune. I. Birbrair, Alexander. II. Santos, Sara. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO Nº 552 DE WALISON NUNES DA SILVA

Às 09:30 horas do dia **17 do mês de fevereiro de 2022**, transmitida através do Youtube, realizou-se a sessão pública para a defesa da Dissertação de **Walison Nunes da Silva**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Alexander Birbrair**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Ricardo Gonçalves**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Remo de Castro Russo**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, e **Prof. Dr. Alexander Birbrair**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: "**Papel das Células de Schwann Na Progressão do Melanoma Murino Experimental**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA** a Dissertação de Mestrado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 17 de fevereiro de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Remo de Castro Russo, Professor do Magistério Superior**, em 25/02/2022, às 13:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Goncalves, Professor do Magistério Superior**, em 25/02/2022, às 14:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alexander Birbrair, Professor do Magistério Superior**, em 30/04/2022, às 21:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1249922** e o código CRC **C45DBC10**.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Fabiana e Josias, que trabalharam muito para que eu pudesse ter oportunidade de estudo público de qualidade. Vocês se sacrificaram, se dedicaram, abdicaram de tempo e de muitos projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de estudar e de ter uma boa formação profissional, mas também pessoal. Eu devo tudo que sou a vocês, e sinto-me orgulhoso e honrado de ter tido a sorte de ser gerado no ventre da mulher mais inteligente, sensata, humilde, amorosa que eu conheço.

Ao meu irmão despojado e lindo Pedro Henrique, agradeço pelo seu apoio, seu cuidado e por sempre estar ao meu lado, meu muito obrigado, irmão. Somos parceiros, cúmplices, irmãos e melhores amigos. Obrigado por ser minha rocha quando eu preciso.

A minha irmã Valentina, que apesar de ser pequena, seu olhar já me enche de esperança e paz. Sou grato por sua vida.

Ao Jeador Costa, obrigado por toda a paciência, disponibilidade, carinho e atenção, sou grato por estar em nossas vidas.

A Eunice Fernanda, obrigado pelos conselhos atenção, sabedoria e cuidado, sou grato por estar em nossas vidas.

Aos meus avós maternos, Maria Aparecida e José Geraldo, por me ensinarem valores que jamais esquecerei. Vocês moldaram quem eu sou, trabalharam de forma árdua para me oferecer o aconchego, sabedoria e muito carinho. Não existem palavras para descrever o quão grande é minha gratidão e amor por vocês.

A minha querida e amada avó Maria Alves, que infelizmente nos deixou em 2021, sua perda trouxe um vazio e uma saudade que jamais será preenchida. Sinto falta do seu beijo, do seu olhar repleto de ternura. Obrigado, por ter me ensinado a amar, a praticar a fé e colocar a família acima de todas as coisas.

A minha segunda Mãe Daniela, tive a honra de crescer junto com você. Sinto muito carinho por você, titia maravilhosa! Você é, sempre foi e será eternamente minha segunda mãe, a mulher incrível que tive o privilégio de conhecer. O amor que sinto por você e suas filhas Maria Eduarda e Ana Júlia é que me motiva todos os dias obrigado.

Aos meus amados e queridos tios e tias obrigado pela força amor e carinho. Essa conquista é nossa!

À Cássia e toda equipe de manutenção do ICB, por manterem a ordem e a limpeza do nosso ambiente de trabalho e serem uma fonte de inspiração com sua luta diária.

Aos professores do Departamento de Patologia Geral, pelas aulas e ensinamentos aprendidos nesses dois anos. Em especial, aos Profs. Ricardo Gonçalves, Paula Peixoto Campos, Helen Lima Del Puerto e Enio Ferreira.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pelas aulas e ensinamentos aprendidos nesses dois anos. Em especial, aos Profs. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca, Miriam Teresa Paz Lopes, Paula Bargi de Souza e Pedro Pires Goulart Guimarães.

Ao meu orientador, Alexander Birbrair, pelos ensinamentos, discussões, confiança e oportunidades que foram desenvolvidas nesse período.

A pesquisadora, Alexandra Elbakyan muito obrigado pelo desenvolvimento do site *Sci-Hub*, graças a você tenho acesso ao alimento intelectual todos os dias.

Aos amigos do LIB, por ter me dado asilo em alguns momentos e café por tanto tempo.

Aos amigos do Labnano e “FentoLab”, por ter me acolhido e fornecido uma fonte inesgotável de café. Agradeço em especial, Heloísa Athaydes, Ana Castro (Cabrita) e Lays Cordeiro Guimarães (sinta-se abraçada).

Ao Professor e amigo Pedro Augusto (menino Pedro), obrigado por ser meu orientador! Aprendi e continuo aprendendo todos os dias com você. Se as pessoas tivessem uma parcela da sua humildade o mundo seria um lugar melhor. Sem você esta dissertação não seria possível!

A Selma Cristina, obrigado pela paciência e atenção. Desculpe por ter tirado o menino Pedro de você algumas vezes.

A Natália Jordana (meu presente), obrigado por estar sempre ao meu lado, me dando força, carinho e atenção. Você fez os dias difíceis se tornarem suportáveis. Não tem palavras para agradecer e dizer o quão importante sua vida é para mim.

A Mariana A. Oliveira, obrigado por toda sua atenção e preocupação. Você me ensinou e orientou. Você é uma cientista fantástica, a academia tem sorte em ter você. Sem você esta dissertação não seria possível!

A Mariana Souza, agradeço por todos os ensinamentos. Você é uma cientista completa um exemplo de mulher! É um privilégio quando temos ao nosso lado pessoas tão maravilhosas

como você. Nunca terei como agradecer-lhe pelo apoio que você me ofereceu. Daqui uns dias, o Felipe estará no citômetro conosco passando tubo e desenhado painéis.

A Nathália de Sousa, obrigado por todos os ensinamentos. Você é simplesmente excepcional, ou seja, fora do comum, que ocorre além dos limites do estabelecido. Obrigado por me repassar os ensinamentos de Karl Marx.

Aos meus amigos, Anderson Oropeza, Parviz Azimnasab e Maryam Soltani os meus sinceros agradecimentos, aprendi muito com vocês!

Aos meus amigos, Caroline Leonel (Gênia) e Pedro Dias (Mestre) obrigado pela paciência, carinho e toda a preocupação. O maior motivo da minha felicidade é ter amigos como vocês. Agradeço pela parceria de sempre e por esta amizade eterna! Vocês me ensinaram me moldaram, os dias difíceis só foram suportáveis graças a vocês. Me sinto extremamente honrado por ter tido a chance de conhecer os melhores amigos que alguém poderia ter! Sem vocês esta dissertação não seria possível, este trabalho é nosso! O maior motivo da minha felicidade é ter amigos como vocês. Agradeço pela parceria de sempre!

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

Ao Instituto Serrapilheira, pelo apoio financeiro.

A toda comunidade científica, os meus sinceros agradecimentos. Ciência não se faz sozinho!

A todos, o meu muito obrigado!

“O conhecimento é uma ferramenta, e como todas as ferramentas, o seu impacto está nas mãos de quem a usa”.

Dan Brown

RESUMO

As células cancerosas interagem dinamicamente com seus componentes do microambiente tumoral durante a progressão do câncer. Compreender a contribuição dos diferentes componentes celulares no microambiente tumoral é crucial para o sucesso das aplicações terapêuticas. Foi encontrado células PLP1⁺ no microambiente tumoral. Usando sistemas induzidos *in vivo* por Cre/loxP, foi demonstrado que essas células derivam de células de Schwann residentes da pele. A ablação genética de células de Schwann endógenas retardou o crescimento do tumor e a angiogênese. Assim como também induziu um aumento na vigilância imunológica, aumentando os linfócitos antitumorais que se infiltram no tumor, ao mesmo tempo que reduziu as células imunossupressoras. Em conjunto os resultados demonstrados neste estudo, sugere que as células de Schwann regulam a progressão do tumor, indicando que a manipulação das células de Schwann pode fornecer uma ferramenta valiosa para melhorar os resultados dos pacientes com câncer.

Palavras-chave: Melanoma; Microambientes Tumoral; Sistema Nervoso Periférico; Células de Schwann; Resposta Imune.

ABSTRACT

Cancer cells are embedded within the tissue and interact dynamically with its components during cancer progression. Understanding the contribution of cellular components within the tumor microenvironment is crucial for the success of therapeutic applications. Here, we reveal the presence PLP1⁺ cells within the tumor microenvironment. By using *in vivo* inducible Cre/loxP mediated systems, we demonstrated that these cells derive from tissue-resident Schwann cells. Genetic ablation of endogenous Schwann cells slowed down tumor growth and angiogenesis. Schwann cell-specific depletion also induced a boost in the immune surveillance by increasing tumor-infiltrating anti-tumor lymphocytes, while reducing immune-suppressor cells. Collectively, our study suggests that Schwann cells regulate tumor progression, indicating that manipulation of Schwann cells may provide a valuable tool to improve cancer patients' outcomes.

Keywords: Melanoma; Tumor Microenvironments; Peripheral Nervous System; Schwann cells; Immune Response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características do câncer por Hanahan e Weinberg no ano de 2000.....	21
Figura 2. Transformação maligna dos melanócitos.....	23
Figura 3. Taxas estimadas de incidência mundial de melanoma cutâneo, padronizadas por idade, em ambos os sexos e todas as idades.....	24
Figura 4. Heterogeneidade do microambiente tumoral..	25
Figura 5. Novo panorama das características do câncer de 2011.....	26
Figura 6 Regulação neural do microambiente tumoral..	29
Figura 7. Microambiente da Pele.....	30
Figura 8. A lesão cutânea ativa as células de Schwann para induzir a cicatrização de feridas.	32
Figura 9 As células de Schwann estão presentes no microambiente do melanoma.....	33
Figura 10. Visão global do sistema imunológico..	34
Figura 11. Imunoedição de tumores..	36
Figura 12. As células de Schwann estão presentes no microambiente do melanoma.....	45
Figura 13. Diagrama esquemático do modelo experimental de depleção de SC..	47
Figura 14. A ablação genética de SC diminui o crescimento do melanoma.....	49
Figura 15. A depleção das SC promove o aumento de células imunes no tumor.....	52
Figura 16. A expressão de marcadores de <i>checkpoint</i> imunológico é reduzida durante a depleção das células de Schwann.....	54
Figura 17. A ablação de células de Schwann aumenta o número de células dendríticas no tumor.....	56
Figura 18. As SC modulam a resposta de células T reguladoras no microambiente tumoral..	58
Figura 19. A ablação das SC induziu uma melhor resposta das células T efetoras.....	60
Figura 21. Ilustração esquemática resumindo os resultados da ablação das células de Schwann no microambiente do melanoma.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Anticorpos utilizados na análise de citometria de fluxo.	82
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC: *American Type Cell Culture*

BP: *Biological Processes*

CD: *Cluster Differentiation*

CEUA: Comitê de Ética em Cuidado e Uso de Animais

CRH: Hormônio liberador de Corticotropina

CTLA-4: *Cytotoxic T lymphocyte Antigen-4*

DAMPs: Padrões Moleculares Associados a Danos

DAPI: 4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride

DC: *Dendritic Cells* (Células dendríticas)

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA: Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

DT: *Diphtheria Toxin* (Toxina da Diftérica)

DTR: *Diphtheria Toxin Receptor* (Receptor de Toxina Diftérica)

FBS: *Fetal Bovine Serum*

FSC-A: *Forward Scatter Area*

FSC-H: *Forward Scatter Height*

GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein*

GFP: *Green Fluorescent Protein*

GO: *Gene Ontology*

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IFN- γ : *Interferon Gamma*

IL: Interleucina

IL-8: interleucina-8

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IPN: Invasão Perineural

MAT: Microambiente Tumoral

MC1R: Receptor 1 de Melanocortina

MEC: Matriz Extracelular

MHC: Complexo principal de Histocompatibilidade

NGFR: *Nerve Growth Factor Receptor*

NK: *Natural Killer*

OCT: *Tissue-Tek*

p75: *Neurotrophin-75*

PACAP: Ativador de Adenilato Ciclase Hipofisário

PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBS: *Phosphate-Buffered Saline*

PD-1: *Programmed Cell Death Protein 1*

PE: *Phycoerythrin* (Ficoeritrina)

PFA: Paraformaldeído

PLP1: *Proteolipid Protein 1* (Proteína Proteolipídica 1)

SC: *Schwann Cell* (células de Schwann)

SNA: Sistema Nervoso Autônomo

SNP: Sistema Nervoso Periférico

TAMs: Macrófagos Associados ao Tumor

TERT: Transcriptase reversa de Telomerase

TLRs: Receptor *Toll-like*

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UV: Ultravioleta

V: Volume

W: Width

WHO: Organização Mundial da Saúde

WT: *Wild-Type*

α -MSH: Hormônio estimulante de alfa-melanócitos

$\gamma\delta$: *Gamma Delta*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Características das células tumorais	20
2.2 Melanoma	21
2.3 Melanoma: Incidência e Mortalidade	23
2.4 Microambiente tumoral	24
2.5 Sistema Nervoso Periférico: um componente do microambiente tumoral	26
2.6 Microambiente da Pele e as Células de Schwann	29
2.7 Imunovigilância Tumoral	33
3. JUSTIFICATIVA	38
4. OBJETIVOS	39
4.1 Objetivo Geral	39
4.2 Objetivos Específicos	39
5. MATERIAIS E MÉTODOS	40
5.1 Animais	40
5.2 Manutenção dos animais	41
5.3 Administração de tamoxifeno	41
5.4 Depleção por toxina difteria	41
5.5 Linhagens tumorais	41
5.7 Indução tumoral	41
5.8 Imunofluorescência e microscopia	42
5.9 Imunofenotipagem de leucócitos infiltrantes de tumor e medição de citocinas intracelulares	42
6. Análise estatística	43
7. RESULTADOS	44
7.1 As SC estão presentes no microambiente do melanoma	44
7.3 A depleção genética das SC reduz o crescimento do melanoma, a angiogênese e a proliferação tumoral	48
7.4 A depleção genética de células de Schwann afeta a resposta imune tumoral	51
7.5 A depleção de células de Schwann modula a expressão de marcadores de checkpoint imunológico	53
7.5 A depleção das SC promove o aumento de DC infiltrantes no tumor	56
7.6 A depleção das SC reduz o número de células T reguladoras no melanoma	57
8. DISCUSSÃO	61

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
10. REFERÊNCIAS	65
11. APÊNDICE	80
11.1 Protocolo para genotipagem do gene da Cre.	80
12. ANEXOS	82
12.1 Tabela1: Anticorpos utilizados na análise de citometria de fluxo.....	82

1. INTRODUÇÃO

O melanoma é um tipo de câncer que é principalmente na pele, com alto potencial de metastização para o trato gastrointestinal, pulmão e o cérebro (HEISTEIN; ACHARYA, 2020). Essa neoplasia é ocasionada pela mutação dos melanócitos, células produtoras de pigmentos da pele que se derivam da crista neural, e compõem o microambiente da pele. Além da pele (melanoma cutâneo), o melanoma primário também pode surgir nos olhos e em mucosas. (OTT, 2019; TARHINI; ATZINGER; GUPTE-SINGH; JOHNSON *et al.*, 2019).

A exposição, de forma deliberada a radiação solar resulta na gênese do melanoma por meio de duas vias diferentes: a exposição à radiação ultravioleta A (UVA) e a Ultra violeta B (UVB) (NOONAN; ZAIDI; WOLNICKA-GLUBISZ; ANVER *et al.*, 2012). Ao reagir com a melanina, a radiação UVA leva a produção de radicais livres, que causam leão oxidativa ao DNA dos melanócitos (NOONAN; ZAIDI; WOLNICKA-GLUBISZ; ANVER *et al.*, 2012). Já os raios UVB desencadeiam o melanoma por danos diretos ao DNA, independentemente da presença do pigmento melanina (DE FABO; NOONAN; FEARS; MERLINO, 2004; NOONAN; ZAIDI; WOLNICKA-GLUBISZ; ANVER *et al.*, 2012). O melanoma cutâneo é dividido de acordo com suas características histopatológicas e classificado como expansivo superficial (tipo mais comum em indivíduos com pele pouco pigmentada), melanoma nodular, melanoma acral lentiginoso e o melanoma lentiginoso maligno (FILOSA; FILOSA, 2018).

Nos últimos anos, a incidência mundial do melanoma aumentou (ERDEI; TORRES, 2010; LINOS; SWETTER; COCKBURN; COLDITZ *et al.*, 2009; WHITEMAN, D. C.; GREEN, A. C.; OLSEN, C. M., 2016) variando, entre populações de diferentes etnias, localização geográfica, fenótipo da pele, bem como diferenças na exposição ao sol. (APALLA; NASHAN; WELLER; CASTELLSAGUE, 2017; ERDEI; TORRES, 2010; OLSEN; NEALE; GREEN; WEBB *et al.*, 2015). Em 2020, 300.000 novos casos de melanoma e 55.000 mortes foram registrados em todo o mundo, ocupando o 19º lugar entre as neoplasias malignas mais comuns (SUNG; FERLAY; SIEGEL; LAVERSANNE *et al.*, 2021). Quanto a incidência relacionada ao sexo e a idade, o melanoma afeta mulheres e homens de maneira diferente. Em adolescentes e adultos jovens, a doença é mais incidente em mulheres (DIBDEN; OFFMAN; DUFFY; GABE, 2020; WATSON; GELLER; TUCKER; GUY JR *et al.*, 2016), enquanto após

os 40 anos de idade, a incidência de melanoma entre os homens é maior que entre as mulheres (WEIR; MARRETT; COKKINIDES; BARNHOLTZ-SLOAN *et al.*, 2011).

De acordo com, o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de pele corresponde cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no Brasil, e o melanoma representa apenas 3% das neoplasias malignas do órgão. Entretanto, o melanoma é o câncer de pele mais letal. Em 2020, o número de mortes no Brasil foi de 1.978, sendo 1.159 homens e 819 mulheres (2020 - Atlas de Mortalidade por Câncer - SIM). A incidência estimada de novos casos no Brasil em 2020 é de 8.450, sendo 4.200 homens e 4.250 mulheres (2020 - INCA).

O Sistema Nervoso Periférico (SNP), surgiu como um dos componentes importantes no microambiente tumoral e tem sido descrito como um ator principal na progressão de vários tipos de tumores sólidos, como o câncer de próstata, câncer gástrico, carcinoma basocelular e adenocarcinoma ductal pancreático (SALOMAN; ALBERS; LI; HARTMAN *et al.*, 2016; ZAHALKA; FRENETTE, 2020; ZHAO; HAYAKAWA; KODAMA; MUTHUPALANI *et al.*, 2014). Os desafios para compreender a interação entre o microambiente tumoral e o SNP se estende a complexidade das redes neurais e as divisões que compreende esse sistema, sendo estes: os ramos motores, sensoriais e de células gliais de suporte.

O papel do sistema nervoso autônomo, uma das divisões do SNP, foi recentemente relatado na promoção do crescimento e disseminação do tumor de próstata (MAGNON; HALL; LIN; XUE *et al.*, 2013). Outros, estudos demonstram, que a interação do SNP com massas tumorais densamente inervadas com uma expressão aumentada de receptores β adrenérgicos em melanomas humanos, estavam relacionadas a um mau prognóstico para os pacientes acometidos com essa malignidade (MORETTI; MASSI; FARINI; BARONI *et al.*, 2013).

Além da inervação motora e sensorial, as células de Schwann (SC) presentes no microambiente da pele e dos nervos, compreendem a maioria da neuroglia do SNP e estão intimamente associadas com as fibras nervosas, fornecendo suporte trófico e uma estrutura de sinalização para o axônio (GRIFFIN; THOMPSON, 2008; KIDD; OHNO; TRAPP, 2013). Além de sua função clássica descrita anteriormente, estudos demonstraram que as células de Schwann contribuindo para a cicatrização de feridas cutâneas em adultos (PARFEJEVS; DEBBACHE; SHAKHOVA; SCHAEFER *et al.*, 2018; SILVA; LEONEL; PRAZERES; SENA *et al.*, 2018). Entretanto, as investigações das SC no contexto do câncer têm se concentrado principalmente em sua capacidade de promover a dor neuropática e a chamada

Invasão Perineural (IPN) (DEBORDE; OMELCHENKO; LYUBCHIK; ZHOU *et al.*, 2016; MIKA; ZYCHOWSKA; POPIOLEK-BARCZYK; ROJEWSKA *et al.*, 2013). Diante disso, o papel intrínseco das SC na progressão/crescimento tumoral do melanoma ainda não foi explorado. Portanto, o presente estudo tem como objetivo avaliar o papel das células de Schwann no crescimento e progressão do tumor de melanoma em um modelo murino induzido por células B16F10.

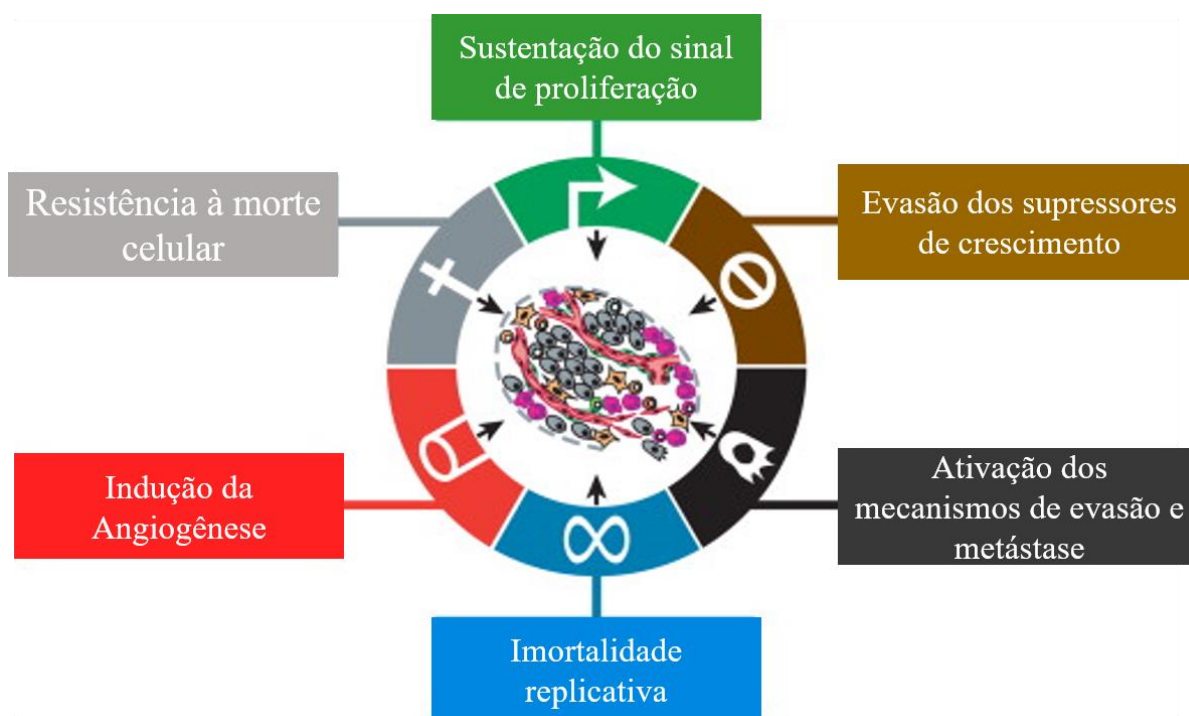
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características das células tumorais

O câncer é definido pelo crescimento celular anormal e descontrolado que culmina na transformação de células normais em células malignas e que muitas das vezes envolve, alterações pré-malignas e tumor *in situ* (MALEY; AKTIPIS; GRAHAM; SOTTORIVA *et al.*, 2017). Na maioria dos casos, ocorrem mudanças na maquinaria genética celular, que ocasionam a ativação de oncogenes e/ou desativação de genes responsáveis pela supressão tumoral que causa o descontrole do ciclo celular e a inativação dos mecanismos de morte celular programada (RUGGIERO; BUSTUOABAD, 2006).

As neoplasias podem ser divididas em dois grandes grupos de acordo com suas características: sólidas ou hematológicas (não sólidos)(WANG; ZHANG; ZHANG; WANG *et al.*, 2016). O tumor sólido, é caracterizado por uma massa altamente celularizada, irregular e heterogênea formado por tecidos que não contêm cistos ou área líquida (JONES; BANITO; GRUNEWALD; HABER *et al.*, 2019). Existem diferentes tipos de tumores sólidos, que são nomeados de acordo com as características celulares que o formam (RICHARDSON, 1985). Exemplos de tumores sólidos são: sarcomas, carcinomas e linfomas. Já o tipo hematológico, geralmente não forma tumores sólidos e podem ser de origem leucêmicas (neoplasia maligna de leucócitos) (ALLART-VORELLI; PORRO; BAGUET; MICHEL *et al.*, 2015).

Os estudos acerca da complexidade intraclonal das células tumorais não é recente, e já foi descrito por Nowell em 1976. Nesta teoria, Peter Nowell propõe que a maioria das neoplasias se originam de uma única célula maligna mutada, e a progressão tumoral é resultante da variabilidade genética adquirida dentro do clone original, o que permite a seleção de subclones mais agressivos com maior capacidade proliferativa, angiogênica e invasiva (NOWELL, 1976). Anos após os estudos de Peter Nowell, em 2000, Hanahan e Weinberg, destacaram seis principais modificações genéticas que conferem às células tumorais um tipo de vantagem que são comuns a todos tipos de canceres, os chamados *hallmarks of cancer* (características do câncer), sendo essas: sustentação dos sinais de proliferação, evasão de supressores de crescimento, ativação e indução de invasão e metástase, indução de angiogênese, imortalidade replicativa e resistência à morte celular (Figura 1)(HANAHAN; WEINBERG, 2000).



7Figura 1. Características do câncer por Hanahan e Weinberg no ano de 2000. A figura demonstra, as modificações genéticas adquiridas por uma célula cancerosa que confere às células neoplásicas um tipo de vantagem, constituindo assim os *hallmarks* (características) do câncer. Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2000.

2.2 Melanoma

O melanoma é uma neoplasia maligna que surge a partir das mutações genéticas dos melanócitos, células produtoras de pigmentos, que podem ser encontradas na pele, olhos, ouvido interno e leptomeninges (TASDOGAN; FAUBERT; RAMESH; UBELLACKER *et al.*, 2020). Embora o melanoma seja responsável por cerca de 1% de todos os tumores malignos da pele, ele representa a forma mais agressiva e mortal de câncer de pele com alto potencial metastático (SCHADENDORF; FISHER; GARBE; GERSHENWALD *et al.*, 2015). Os queratinócitos presentes no microambiente da pele, produzem o hormônio estimulante de alfa-melanócitos (α -MSH) em resposta ao dano ao DNA induzido pela luz ou pela radiação UV (LIN; FISHER, 2007). Por sua vez, o MSH se liga ao receptor 1 de melanocortina (MC1R) nos melanócitos, que produzem e liberam melanina (Figura 2), que funciona como um escudo para a radiação UV, evitando outras alterações no DNA (CURTIN; FRIDLYAND; KAGESHITA; PATEL *et al.*, 2005). A radiação ultravioleta (UV) proveniente dos raios solares e de fontes artificiais é o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pele (MACK, 1999). O melanoma cutâneo pode ser geralmente classificado na população caucasiana por sua origem

na pele cronicamente ou intermitente exposta ao sol que se traduz em diferentes locais de origem, grau de exposição UV cumulativa, idade ao diagnóstico, tipos de drivers oncogênicos e carga mutacional (CANDIDO; RAPISARDA; MARCONI; MALAPONTE *et al.*, 2014).

Outro fator de risco para o desenvolvimento do melanoma, é o nevo melanocítico (DAMSKY; BOSENBERG, 2017). Os nevos são lesões benignas compostas por uma quantidade concentrada de melanócitos (SCHAFFER, 2015). Isso, leva a formação de uma mancha hiper pigmentada escura na pele devido a grande quantidade de melanina produzida. Os nevos melanocíticos podem ser congênitos ou aparecer tardiamente na pele dependendo de fatores ambientais (DAMSKY; BOSENBERG, 2017). A quantidade massiva de nevos adquiridos ao longo da vida é um fator de risco potente que indica o desenvolvimento de melanoma (BATISTATOU; ZIOGA; PANELOS; MASSI *et al.*, 2007). As alterações de forma, cor ou textura nos nevos é um forte indicador de melanoma maligno, cerca de 81% dos pacientes com melanoma observaram uma alteração do nevo na localização da lesão maligna (RHODES; WEINSTOCK; FITZPATRICK; MIHM *et al.*, 1987). No entanto, é importante ressaltar que nem todos os nevos mutáveis são indicativos de melanoma, e que o mecanismo exato e a causa das alterações ainda não são totalmente elucidados (MACKIE; ENGLISH; AITCHISON; FITZSIMONS *et al.*, 1985).

A compreensão mais profunda do envolvimento e da biologia do melanoma, nos últimos anos vem sendo alcançada (CANDIDO; RAPISARDA; MARCONI; MALAPONTE *et al.*, 2014). Evidenciou-se que o desenvolvimento do melanoma totalmente evoluído a partir de lesões pré-neoplásicas não é representado por um único padrão evolutivo (BASTIAN, 2014). O melanoma e seus subtipos, podem evoluir de diferentes lesões precursoras e pode envolver diferentes mutações gênicas e estágios de transformação (SHAIN; BASTIAN, 2016). Um achado importante, é que o proto-oncogene B-Raf (BRAF) é mutado em até 80% dos nevos benignos, resultando em proliferação limitada de melanócitos por meio da ativação mediada por oncogene da senescência celular (POLLOCK; HARPER; HANSEN; YUDT *et al.*, 2003). Esses nevos, podem permanecer indolentes por décadas, em decorrência da vigilância imunológica (SPEECKAERT; VAN GEEL; VERMAELEN; LAMBERT *et al.*, 2011). Portanto, o BRAF não é suficiente para o desenvolvimento do melanoma e raramente os nevos benignos progridem para uma neoplasia maligna (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). Entretanto, a transição do nevo para melanoma está associada à aquisição de mutações subsequentes em genes-chave, como a Transcriptase Reversa de Telomerase (TERT) ou Inibidor de Cinase dependente de Ciclina 2A (CDKN2A) (HODIS; WATSON; KRYUKOV;

AROLD *et al.*, 2012; KRAUTHAMMER; KONG; HA; EVANS *et al.*, 2012). Diante disso, a compreensão dos determinantes biológicos da evolução do melanoma pode levar a um diagnóstico e ao reconhecimento precoce de lesões com maior risco de progressão e metástese.

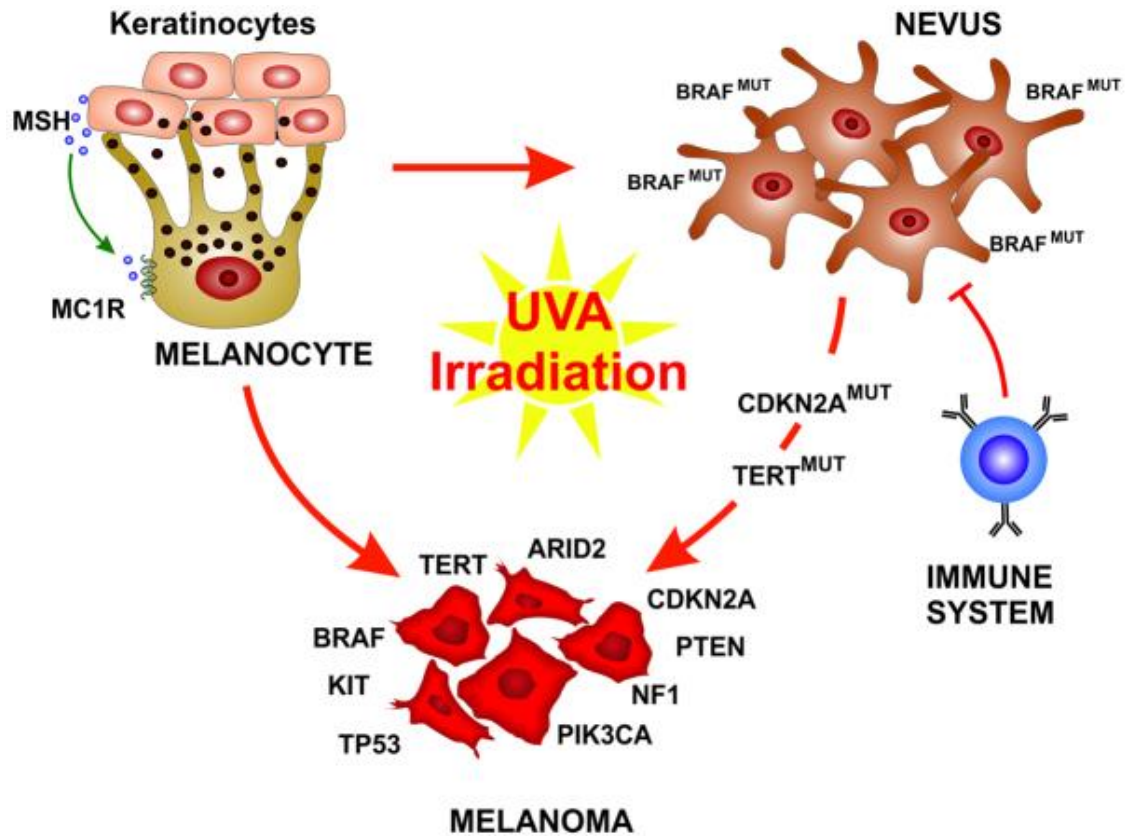


Figura 2. Transformação maligna dos melanócitos. Fisiologicamente, os queratinócitos induzem a proliferação dos melanócitos por meio da produção do hormônio MSH e sua ligação com o MC1R. A irradiação UV-A induz a transformação maligna dos melanócitos por meio de dois mecanismos diferentes: A transformação direta dos melanócitos normais em células neoplásicas por meio de várias mutações que afetam os genes proto-oncogene e supressores de tumor (TP53, NF1, PTEN). Fonte: (LEONARDI; FALZONE; SALEMI; ZANGHÌ *et al.*, 2018).

2.3 Melanoma: Incidência e Mortalidade

A incidência mundial de melanoma tem aumentado constantemente nas últimas décadas (ERDMANN; LORTET-TIEULENT; SCHÜZ; ZEEB *et al.*, 2013; GUPTA; KUMAR, 2017; GUY; THOMAS; THOMPSON; WATSON *et al.*, 2015; LINOS; SWETTER; COCKBURN; COLDITZ *et al.*, 2009; WHITEMAN, DAVID C; GREEN, ADELE C; OLSEN, CATHERINE M, 2016). De acordo, com a Organização Mundial da Saúde (WHO) foi estimado que em 2020 324.635 foram diagnosticados com melanoma maligno (WHO, 2020) (Figura 3). No Brasil,

segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), foram estimados 4.200 em homens e de 4.250 em mulheres.

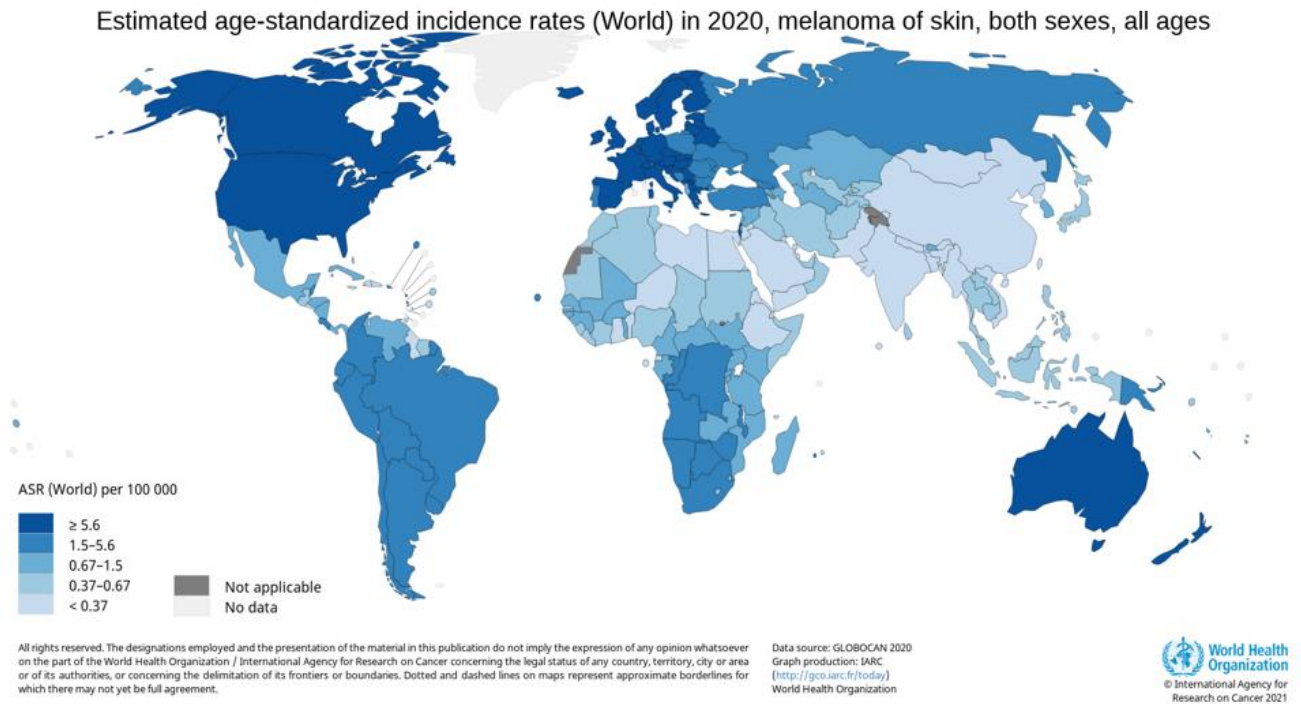


Figura 3. Taxas estimadas de incidência mundial de melanoma cutâneo, padronizadas por idade, em ambos os sexos e todas as idades. As incidências são expressas como o número de casos por 100.000 pessoas por ano. Fonte: (GLOBOCAN, 2020).

A incidência de melanoma varia de acordo com a localização geográfica entre pessoas da mesma etnia (LANCASTER, 1956) (GUY; THOMAS; THOMPSON; WATSON *et al.*, 2015). As diferenças geográficas podem se traduzir em diferenças na absorção atmosférica, latitude, altitude, cobertura de nuvens e estação do ano - todas as variáveis que influenciam a radiação UV incidente (NELSON; NELSON, 1957). Em 1956, Lancaster descobriu taxas crescentes de mortalidade por melanoma com o aumento da proximidade do equador, um fenômeno que ele chamou de “gradiente de latitude”(NELSON; NELSON, 1957). Como observado na Figura 1, a Austrália é o país com maior incidência de melanoma (BAADE; MENG; YOULDEN; AITKEN *et al.*, 2012).

2.4 Microambiente tumoral

O microambiente tumoral (MAT), não consiste apenas em populações heterogêneas de células cancerosas, mas também em uma variedade de células residentes e componentes estromais como: células endoteliais vasculares, fibroblastos associados ao câncer, componentes

de matriz extracelular (MEC) e células imunes infiltradas. Esse conjunto de células e suas interações são conhecidas coletivamente como microambiente tumoral, como pode ser observado na figura 4. A progressão do tumor é profundamente influenciada pelas interações das células cancerosas com seu ambiente (QUAIL; JOYCE, 2013). A constante evolução do microambiente tumoral pelo remodelamento tecidual, alterações vasculares, metabólicas e o recrutamento de células estromais conferem a capacidade das células cancerosas de sobreviver e metastizar para outros órgãos (HANAHAN; COUSSENS, 2012). Quando se fala sobre o MAT, vale ressaltar que há uma distinção entre duas diferentes entidades que devem ser feitas: o microambiente que as células pré-neoplásicas e neoplásicas encontram no tecido de origem, e o microambiente dentro do tumor, que as células cancerosas recrutam para formar a “massa tumoral”(LACONI, 2007; NISHIMURA; SEMBA; AOYAGI; SASAKI *et al.*, 2012). A importância de compreender como o microambiente tumoral comporta-se, foi evidenciada por Stephen Paget (1889). Em seu estudo, Paget utiliza de uma analogia da botânica a “teoria das sementes e do solo” para explicar o princípio da progressão tumoral, que não se concentra apenas em uma única célula neoplásica maligna "na semente", mas também no “solo”, o qual deve estar preparado para que semente possa germinar e dar seus “frutos” as metástases (PAGET, 1989).

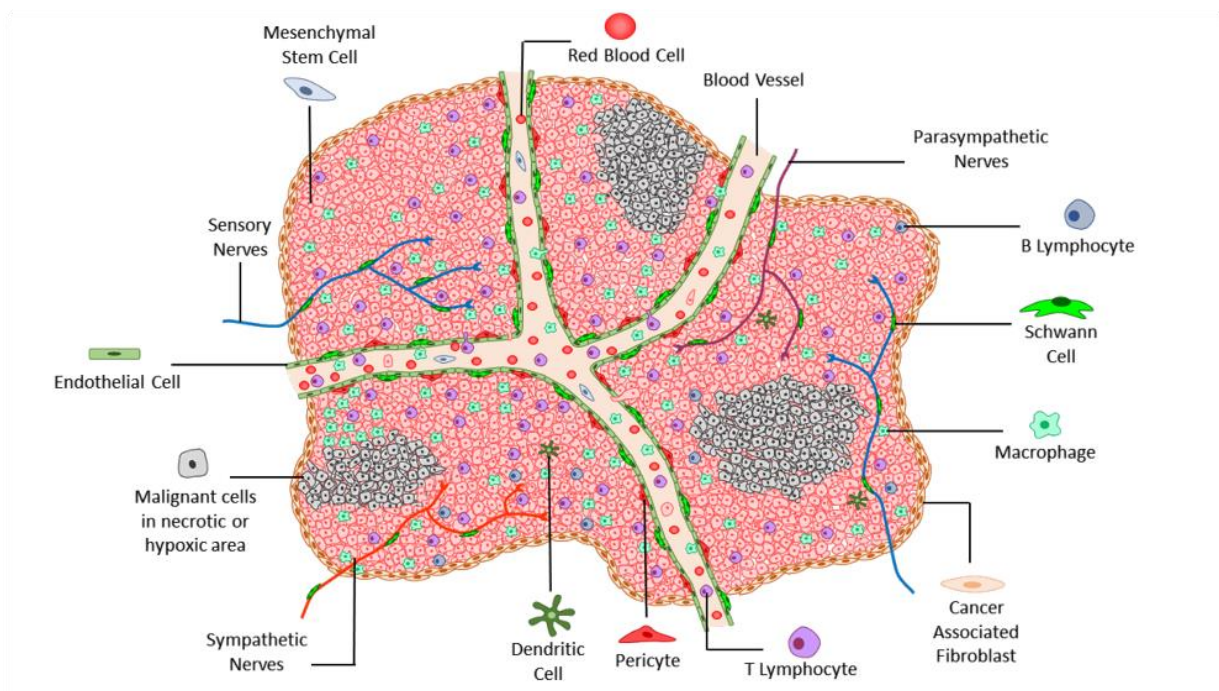


Figura 4. Heterogeneidade do microambiente tumoral. Além das células cancerosas, o MAT contém células do sistema imunológico como: linfócitos B e T, macrófagos, células

dendríticas. Também pode ser observado, vasculatura tumoral e linfática, além de fibroblastos, pericitos e, em alguns casos, adipócitos, e células de Schwann. O MAT também possui inervação provenientes do Sistema Nervoso Periférico, como representado pelos nervos simpáticos, parassimpáticos e sensorial. Fonte: Acervo próprio do Laboratório de Microambiente Tecidual.

Devido ao constante estudo do microambiente tumoral, através do remodelamento tecidual, das alterações metabólicas no tumor e no recrutamento de células estromais, incluindo uma diversidade de células imunes, houve uma necessidade de expansão dos *hallmarks of cancer* (características das células tumorais) propostas por Hanahan & Weinberg em 2000, sendo estes: o escape da resposta imune tumoral e o desequilíbrio energético (Figura 5). Algumas células cancerosas adaptam mecanismos para evitar a detecção e destruição pelo sistema imunológico do hospedeiro. Uma das formas pelas quais as células fazem isso, é sequestrando os mecanismos normais de controle do ponto de verificação imunológico e modulação da resposta imune inata e adaptativa.

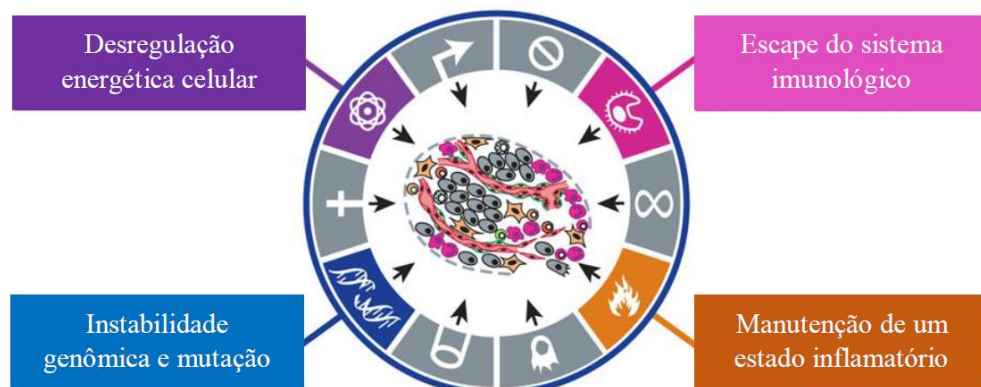


Figura 5. Novo panorama das características do câncer de 2011. Inclusão de “marcas” emergentes para a progressão tumoral. Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.

2.5 Sistema Nervoso Periférico: um componente do microambiente tumoral

O Sistema Nervoso Periférico (SNP), é constituído por todo tecido nervoso: nervos, células de Schwann, gânglios fora do cérebro e da medula espinhal (STERNINI, 1997). A função primária do sistema nervoso periférico é conectar o cérebro e a medula espinhal ao resto do corpo e ao ambiente externo. Desse modo, o SNP coordena a nível molecular e celular processos que permitem ao corpo a manter os controles homeostáticos. Esses sistemas coordenados, ajustam de forma fina as variáveis internas, incluído pressão arterial, pH, metabolismo e está envolvido na transmissão de informações sensoriais e motoras para o

Sistema Nervoso Central (SNC); através de neurônios (nervos) motores eferentes e neurônios sensoriais aferentes (GOLDSTEIN, 2001). Além disso, o SNP subdivide-se em: sistema nervoso somático e sistema nervoso autônomo (LEWIS, 1926). O sistema somático controla as ações voluntárias do corpo, ou seja, aquelas que estão sob controle consciente. O sistema nervoso autônomo (SNA), assim denominado por ser classicamente considerado fora do controle consciente, é subdividido em sistema nervoso simpático (SNS) e sistema nervoso parassimpático (SNPS)(WAXENBAUM; REDDY; VARACALLO, 2021).

A contribuição dos nervos na patogenia e na progressão das neoplasias malignas fez com que emergisse o conceito que a inervação também é uma possível “característica do câncer” (WANG; ZHENG; LU; WANG *et al.*, 2021; ZAHALKA; FRENETTE, 2020). Estudos recentes, mostraram que os nervos periféricos (simpáticos, parassimpáticos e sensoriais) interagem com células tumorais e estromais para promover a iniciação e progressão de uma variedade de doenças malignas sólidas e hematológicas (HIBI; MORI; FUKUMA; YAMAZAKI *et al.*, 2009; HUANG; SU; CUI; SHEN *et al.*, 2014; LIEBIG; AYALA; WILKS; VERSTOVSEK *et al.*, 2009). À medida que às doenças neoplásicas malignas progridem a densidade dos nervos quase duplica em comparação com o tecido saudável (AYALA; DAI; POWELL; LI *et al.*, 2008; ZAHALKA; ARNAL-ESTAPE; MARYANOVICH; NAKAHARA *et al.*, 2017). Além disso, a densidade nervosa se correlaciona com casos mais agressivos, incluindo câncer de próstata, cólon e reto, cabeça e pescoço, mama, pâncreas, estômago e pulmão (AYALA; DAI; POWELL; LI *et al.*, 2008; MAGNON; HALL; LIN; XUE *et al.*, 2013; SHAO; WANG; YAO; PAN *et al.*, 2016).

A inervação no microambiente da próstata, é uma das mais bem estudadas devido a delimitação distinta da inervação simpática e parassimpática do órgão (TABATAI; BOOTH; DE GROAT, 1986). Estudos revelam, que a transecção cirúrgica dos nervos hipogástricos promoveu a regressão do tumor em um modelo de camundongo transplantado com células PC-3 humano e a inibição do crescimento do tumor em uma próstata do modelo murino transgênico Hi-MYC (no qual os camundongos expressam MYC especificamente na próstata)(MAGNON; HALL; LIN; XUE *et al.*, 2013). Outro estudo demonstrou, que a denervação cirúrgica do gânglio celíaco e mesentérico superior, melhora a eficácia da quimioterapia em um modelo de camundongo transgênico de câncer pancreático (RENZ; TAKAHASHI; TANAKA; MACCHINI *et al.*, 2018). No contexto do melanoma, foi visto que a inervação sensorial também exerce um papel importante na progressão tumoral. No estudo realizado por Prazeres e colaboradores em 2020, demonstrou que a depleção da inervação sensorial *in vivo*, em

camundongos geneticamente modificados ($N_{av} 1.8 \text{ Cre}^+; \text{IDTA}^+$) é responsável pelo crescimento do melanoma B16F10, revelando a importância dos nevos sensoriais na modulação do crescimento tumoral (PRAZERES; LEONEL; SILVA; ROCHA *et al.*, 2020). Em um outro estudo, Costa e colaboradores utilizaram a tecnologia de *Designer Receptors Exclusively Activated by a Designer Drug* (DREADD) para inibir ou ativar o disparo dos neurônios sensoriais dentro do melanoma. Os resultados obtidos demonstraram que o crescimento tumoral e a angiogênese foram acelerados após a inibição da atividade dos neurônios sensoriais e reduzidos após a super estimulação desses neurônios (COSTA; SILVA; PRAZERES; PICOLI *et al.*, 2021).

Além da interação dos nervos com microambiente tumoral, as células cancerosas infiltram-se no interior ou ao redor dos nervos em um processo denominado invasão perineural (IPN) (BATSAKIS, 1985; CHATZISTEFANOU; LUBEK; MARKOU; ORD, 2017). A IPN é definida pela presença histológica de células malignas no tecido neural de grandes nervos do sistema nervoso periférico e está presente em muitos tumores sólidos (TAYLOR; NORRIS, 1967). Acredita-se que a presença de IPN esteja correlacionada com agressividade da doença e até mesmo como uma rota potencial de metástase (AMIT; NA'ARA; GIL, 2016).

Uma outra forma de interação que ocorre no microambiente tumoral é através da regulação neural (SEIDL, 2014). Quando os sinais são transmitidos de um neurônio para outro, a precisão temporal é essencial para o processamento adequado de integralização da informação e muito já se sabe sobre esse processo (AGGELOPOULOS; DUKE; EDGLEY, 1995; ALMEIDA; CZOPKA; FFRENCH-CONSTANT; LYONS, 2011; BAKER; STRYKER, 1990; LUTGENDORF; DEGEEST; SUNG; AREVALO *et al.*, 2009). Entretanto, a compreensão mecanística da base molecular da regulação neural no câncer ainda é um desafio. Experimentos in vitro, sugeriram que diferentes neurotransmissores sinalizam diretamente para as células tumorais, promovendo a proliferação, a sobrevivência e a migração celular (COLE; NAGARAJA; LUTGENDORF; GREEN *et al.*, 2015). A inervação direta no compartimento epitelial dos quais os tumores sólidos derivam, desempenha um papel na iniciação e na progressão do câncer gástrico (HAYAKAWA; SAKITANI; KONISHI; ASFAHA *et al.*, 2017). Estudos in vivo, demonstram que há uma interação dinâmica no MAT entre os nervos, o estroma e o compartimento epitelial (FUJIWARA; UEHARA, 1984; LINDSAY; HALVORSON; PETERS; GHILARDI *et al.*, 2006; ZAHALKA; ARNAL-ESTAPE; MARYANOVICH; NAKAHARA *et al.*, 2017). Em um outro estudo, foi demonstrado que os nervos adrenérgicos regulam de forma indireta a proliferação de células tumorais através da regulação da

angiogênese intratumoral e, portanto, a disponibilidade de nutrientes para o MAT (ZAHALKA; ARNAL-ESTAPE; MARYANOVICH; NAKAHARA *et al.*, 2017) Esses mecanismos podem ser observados na (Figura 6).

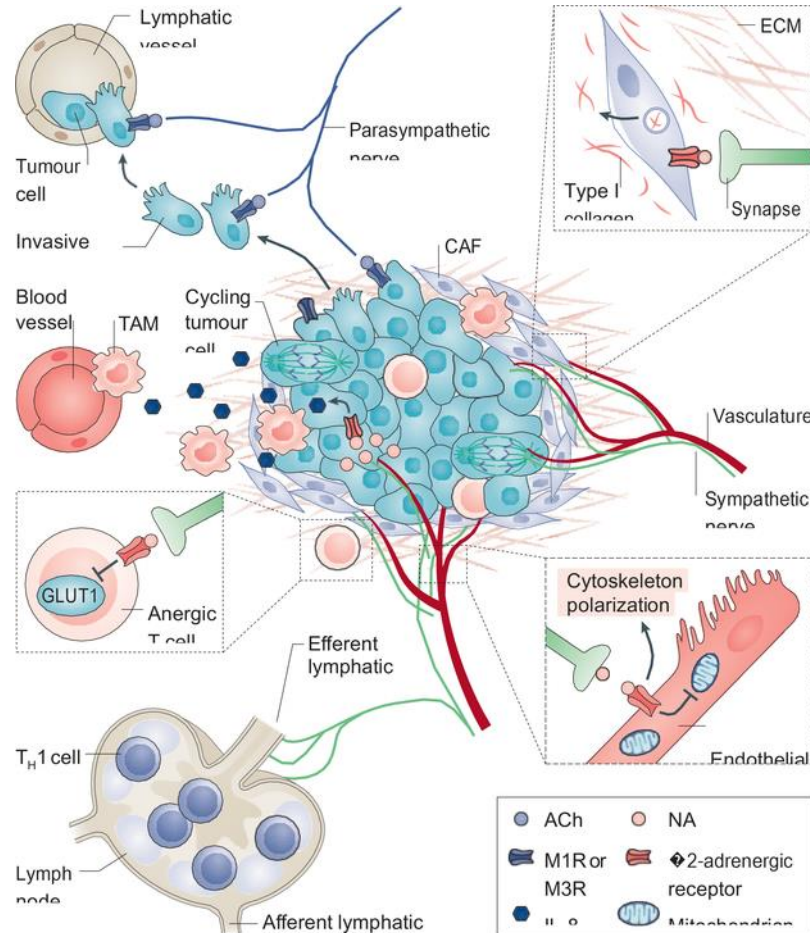


Figura 6. Regulação neural do microambiente tumoral. Os nervos interagem com diversos componentes do estroma e epitélio maligno para promover o crescimento e a disseminação do tumor. A sinalização dos nervos adrenérgicos estimula a liberação de interleucina-8 (IL-8) das células cancerosas, que por sua vez recruta macrófagos associados ao tumor (TAMs) que contribuem para a angiogênese e posterior imunossupressão. A inervação adrenérgica também sinaliza para as células T através do receptor β 2-adrenérgico, suprimindo a ativação metabólica por meio da inibição da expressão do transportador de glicose GLUT1. Fonte: (ZAHALKA; FRENETTE, 2020).

2.6 Microambiente da Pele e as Células de Schwamm

A pele é o maior órgão do organismo humano atua como uma barreira entre o ambiente externo e os tecidos internos (SPENCER; AMONETTE, 1998). O sistema tegumentar, mantém condições fisiológicas viscerais favoráveis, proporcionando um equilíbrio entre a ingestão e a

perda de líquidos, regulando a concentração de eletrólitos, bem como controlando a perda de calor (MACINTYRE; BAIRD, 2006). Histologicamente a pele é composta por três camadas diferentes epiderme, derme e hipoderme (Figura 7)(FUCHS, 2007). Cada região da pele, é formada por vários componentes celulares, incluindo queratinócitos, melanócitos e células de Langerhans, células imunes, fibroblastos, terminações nervosas, células de Schwann, pericitos e células endoteliais (GE; MIAO; GUR-COHEN; GOMEZ *et al.*, 2020).

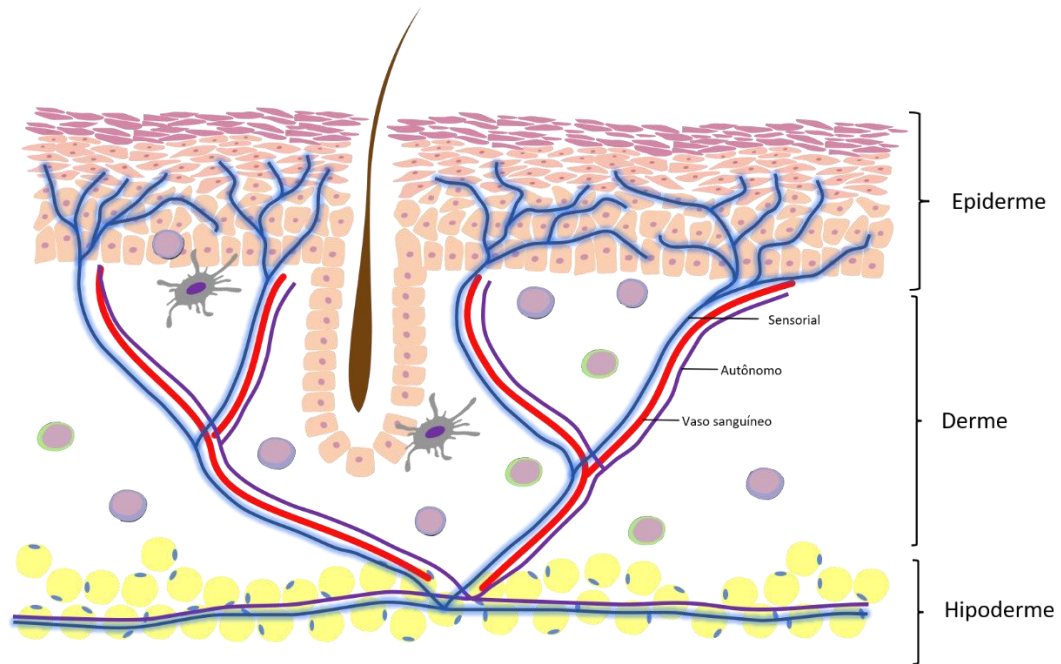


Figura 7. Microambiente da Pele. Ilustração das camadas da pele, essas camadas são fortemente aderidas e formam uma barreira que varia de 50 a 120 μm , dependendo da localização do corpo. Fonte: Elaborado pelo autor.

A pele está intimamente associada ao sistema nervoso periférico, autônomo (SNA) e ao SNC e possui uma função neuroimunoendócrina (ROOSTERMAN; GOERGE; SCHNEIDER; BUNNETT *et al.*, 2006). Vários estímulos ativam o hipotálamo/hipófise dentro do SNC, o que resulta na liberação de neuromediadores, como hormônio liberador de corticotropina (CRH), o hormônio estimulante de alfa-melanócitos (MSH), polipeptídeo ativador de adenilato ciclase hipofisário (PACAP) (SIEMIONOW; GHARB; RAMPAZZO, 2011). A disposição da inervação no microambiente da pele, consiste em fibras nervosas autonômicas (predominantemente simpáticas, e sensorial (ROOSTERMAN; GOERGE; SCHNEIDER; BUNNETT *et al.*, 2006). Essas fibras nervosas, derivam de corpos celulares localizados na raiz dorsal e nos gânglios simpáticos. Já, as fibras nervosas de saída podem ser subclassificadas devido as suas diferentes velocidades de transmissão de sinais, propriedades de percepção e

sinalização e afiliação em " aferente-sensorial" ou / e " eferente-autônomo", bem como em fibras A β , A δ e C (NOLANO; PROVITERA; CAPORASO; STANCANELLI *et al.*, 2013).

Um outro componente do SNP, que exerce um papel importante no microambiente da pele e dos nervos periféricos, são as células de Schwann que revestem as projeções nervosas, protegendo-as e facilitando sua sobrevivência. A pele é um órgão ricamente inervado, com uma variedade de fibras nervosas, incluindo axônios sensoriais e autonômicos, influenciando uma infinidade de funções cutâneas fisiológicas e fisiopatológicas (LAVERDET; DANIGO; GIRARD; MAGY *et al.*, 2015). As células da Crista Neural (NC) dão origem a várias linhagens celulares, incluindo os componentes neurais dos sistemas nervoso periférico e entérico. Estudos realizados por Parfejevs e colaboradores em 2018 revelam que as células de Schwann contribuem para a cicatrização de feridas cutâneas em adultos (GE; MIAO; GUR-COHEN; GOMEZ *et al.*, 2020; PARFEJEVS; DEBBACHE; SHAKHOVA; SCHAEFER *et al.*, 2018). As células de Schwann liberam múltiplas moléculas bioativas capazes de regular o comportamento, a proliferação e a migração de outras populações celulares (TOFARIS; PATTERSON; JESSEN; MIRSKY, 2002; YAMAZAKI; EMA; KARLSSON; YAMAGUCHI *et al.*, 2011). Portanto, as células de Schwann podem induzir um microambiente reparador e regenerativo na pele após a lesão (SILVA; LEONEL; PRAZERES; SENA *et al.*, 2018) (Figura 8). As células de Schwann eram até recentemente consideradas células comprometidas exclusivamente com o destino glial. Surpreendentemente, estudos recentes indicaram que, em condições específicas, as SC também podem se comportar como células-tronco formando outras populações de células (KAUKUA; SHAHIDI; KONSTANTINIDOU; DYACHUK *et al.*, 2014), podendo inclusive se diferenciarem em melanócitos (ADAMEYKO; LALLEMEND; AQUINO; PEREIRA *et al.*, 2009). A variedade das funções desempenhadas pelas células de Schwann é suportada por sua capacidade de desdiferenciar reversivelmente e rediferenciar em subtipos com fenótipos diferentes (JESSEN; MIRSKY, 2005). Após a lesão do nervo, as células de Schwann se desdiferenciam e perdem sua capacidade de mielinização, adquirem a capacidade de migração e a orientação neuronal durante o reparo (DANILOFF; LEVI; GRUMET; RIEGER *et al.*, 1986).

Recentemente, as células de Schwann emergiram como um importante componente do microambiente tumoral. Estudos demonstram que elas promovem a invasão do câncer de pâncreas por meio do contato direto com as células cancerígenas (DEBORDE; OMELCHENKO; LYUBCHIK; ZHOU *et al.*, 2016). Também foi desmontado, que as SC presentes no microambiente do melanoma possuem fenótipo destinado a regeneração nervosa

e a cicatrização de feridas (SHURIN; KRUGLOV; DING; LIN *et al.*, 2019)(Figura 8). Diante disso, as SC compõem o SNP e o microambiente da pele sendo objeto do presente estudo, e o seu papel no desenvolvimento do melanoma será descrito em maior detalhe (Figura 9).

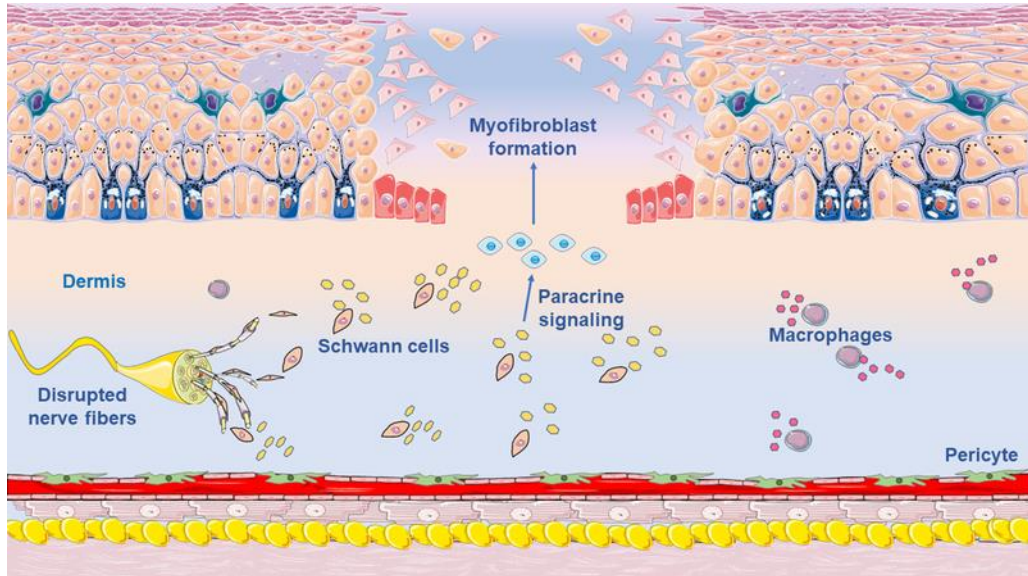


Figura 8. A lesão cutânea ativa as células de Schwann para induzir a cicatrização de feridas. A regeneração da pele envolve a interlocução célula a célula entre vários tipos de células. Decifrar os mecanismos celulares e moleculares que impulsionam o fechamento da ferida é uma questão central na medicina regenerativa. Fonte: (SILVA; LEONEL; PRAZERES; SENA *et al.*, 2018).

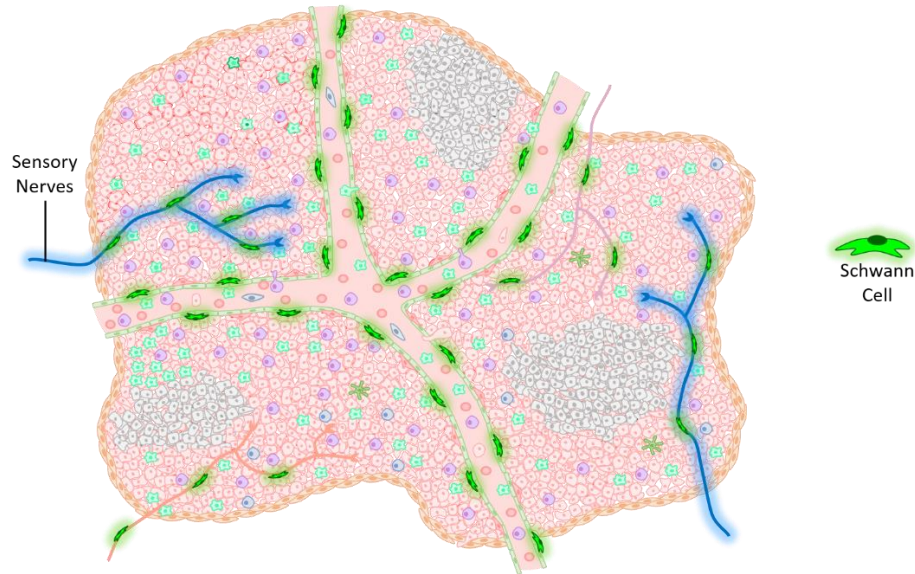


Figura 9 As de células Schwann estão presentes no microambiente do melanoma. As SC emergiram como um componente importante no microambiente tumoral. Fonte: Elaborada pelo autor.

2.7 Imunovigilância Tumoral

O sistema imune, é formado por uma interação de vários tipos de moléculas bioativas, como, citocinas, proteínas e células que formam coletivamente uma rede multifacetada de processos bioquímicos que irão reconhecer e defender o hospedeiro contra proteínas ou antígenos "não-próprios" (JANEWAY JR; TRAVERS; WALPORT; SHLOMCHIK, 2001a); essa interação fornece proteção e mantém a homeostase do organismo. O sistema imunológico, consiste em duas formas de resposta imune: inata e, adaptativa (VESELY; KERSHAW; SCHREIBER; SMYTH, 2011) (Figura 10). A resposta imune inata é inespecífica e de ação rápida contra antígenos estranhos como micróbios patogênicos, antígenos alergênicos ou proteínas ou moléculas não próprias (JANEWAY JR; TRAVERS; WALPORT; SHLOMCHIK, 2001a; WANG; WANG, 2013). Embora a duração da resposta imune inata seja de vida curta e incapaz de gerar memória, ela ainda possui a capacidade de distinguir entre "próprio" e "não-próprio" e de diferentes grupos de patógenos por meio de receptores, como receptores *toll-like* (TLRs) e outros que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (DAMPs ou a dano teciduais (PAMPs) (WANG; WANG, 2013).

Em contraste, a resposta imune adaptativa possui a capacidade de gerar memória imunológica após primeiro contato com antígeno de forma rápida e direcionada aos antígenos-específicos (JANEWAY JR; TRAVERS; WALPORT; SHLOMCHIK, 2001b). Essa resposta, ao longo do tempo, ocorre devido à capacidade de linfócitos indiferenciados (*naive*) como as

células T e B possuem de se diferenciar e amadurecer em células T efectoras ou célula B secretoras de anticorpos (Figura 10) (JANEWAY JR; TRAVERS; WALPORT; SHLOMCHIK, 2001a). Existem dois tipos de células T presentes no sistema imunológico que se diferem pelo tipo de receptor: células T $\alpha\beta$ e células T $\gamma\delta$. As células T $\gamma\delta$ podem reconhecer moléculas "não próprias" por reconhecimento de padrões, não exigindo, portanto, a apresentação de antígenos mediada pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de algumas das moléculas clássicas pela apresentação antigênica para células T $\gamma\delta$ são CD1c e CD1d (CHIEN; JORES; CROWLEY, 1996; DESEKE; PRINZ, 2020). Em contrapartida, as células T $\alpha\beta$ são subdivididas em dois outros subconjuntos conhecidos como células T CD4 + e células T CD8 + (KORETZKY, 2010). A maturação desse subconjunto de células para um perfil efector, envolve a co-estimulação entre o complexo principal de histocompatibilidade II (MHC classe II), que estão presentes apenas em células apresentadoras de antígenos (células B, macrófagos e células dendríticas) e o receptor de células T nas células T CD4 + *naives* (figura 10)(OKOYE; WILSON, 2011). Já as células T CD8 + através do receptor de células T específicas ligam-se aos complexos de antígeno/MHC de classe I nas células apresentadoras de antígeno (ou seja, células-alvo), resultando na liberação de perforina e granzimas das células T CD8 + e morte da célula-alvo (KORETZKY, 2010).

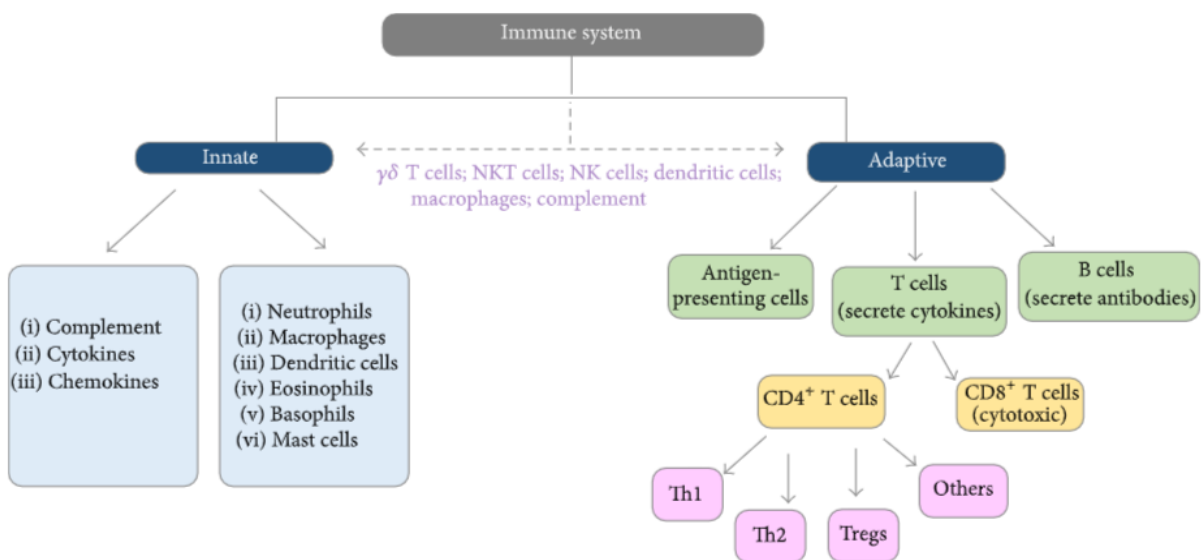


Figura 10. Visão global do sistema imunológico. A resposta imune inatas incluem células que são inespecíficas, e de ação rápida e são as primeiras a responder a inflamação. Por outro lado, a imunidade adaptativa possui componentes mais específica para antígenos alvos capazes de formar memória imunológica. Fonte: (PANDYA; MURRAY; POLLOK; RENBARGER, 2016).

A interação entre o sistema imunológico e o câncer, tem sido amplamente estudada por mais de um século e foi destacada pela primeira vez por Rudolph Virchow há mais de 150 anos (ADAMS; SMOTHERS; SRINIVASAN; HOOS, 2015). A base em torno da relação entre o câncer e a imunidade, envolve três princípios básicos a detecção de antígenos “não próprios” produzidos pelas células malignas que por sua vez, leva ao desenvolvimento da resposta efetora que destrói de forma específica essa célula, protegendo o hospedeiro e levando o desenvolvimento de memória imunológica por meio dos mecanismos imunes (JANEWAY JR; TRAVERS; WALPORT; SHLOMCHIK, 2001a). No decorrer da patogênese do câncer, múltiplos componentes da imunidade inata são ativados em esforço para minimizar a inflamação mediada pelo câncer (CHEN; MELLMAN, 2013). Este processo, também inicia respostas imunes adaptativas para direcionar o câncer por meio de mecanismos imunes mais específicos (DUNN; KOEBEL; SCHREIBER, 2006).

Estudos recentes, sugerem que existe um equilíbrio fino entre a dormência e a progressão tumoral, e esse equilíbrio é a base do princípio da oncologia conhecido como imunoeedição. Por esse processo, o sistema imune é capaz de modular o perfil antigênico do tumor devido à pressão seletiva, baseada nas etapas de eliminação, equilíbrio e evasão tumoral como descrito na Figura 11(SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011). A fase de eliminação é caracterizada por um componente da teoria da imunovigilância do câncer que consiste na capacidade do sistema imune inato e adaptativo de reconhecer e erradicar as células cancerosas (DUNN; KOEBEL; SCHREIBER, 2006). Desse modo, os mecanismos celulares e moleculares pelos quais ocorre a morte das células cancerosas são via secreção de perforina pelas células imunes citolíticas (NK, células NKT, células T $\gamma\delta$ e células T CD8 +)(GOBERT; TREILLEUX; BENDRISS-VERMARE; BACHELOT *et al.*, 2009). A fase de equilíbrio está relacionada com o estado dinâmico das células cancerosas para regular negativamente o sistema imunológico, levando a um bloqueio da fase de eliminação (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004). Por fim, a fase de escape é mediada por diversos mecanismos imunossupressores, os quais incluem a regulação negativa ou superexpressão de MHC de classe I na superfície das células cancerosas o que leva a proteção das funções efetoras e citotóxicas das células da imunidade inata e adaptativa, e portanto, a progressão tumoral (Figura 11)(DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011).

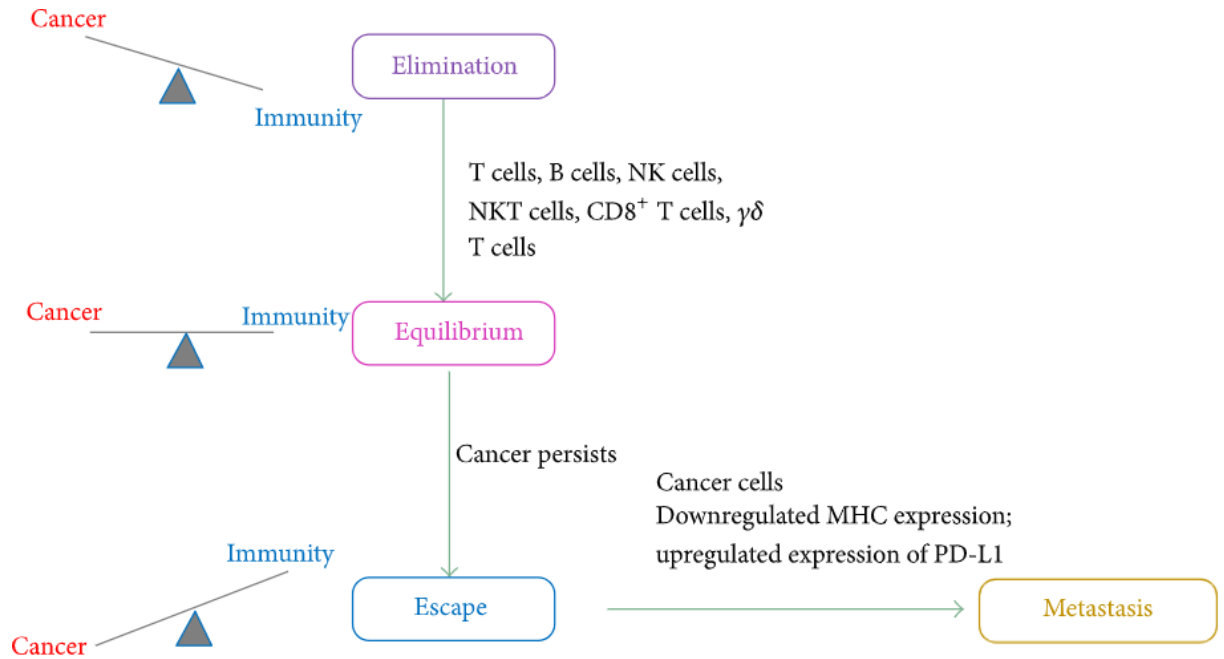


Figura 11. Imunoedição de tumores. A imunoedição é formado por três fases: eliminação, equilíbrio e escape. Na fase de eliminação, a imunidade inata e a adaptativa detectam e eliminam sinergicamente as células tumorais precoces. Na fase de equilíbrio, um equilíbrio é obtido entre a progressão do câncer e a eliminação do câncer pelo sistema imunológico. Se o câncer persistir, ele sobrecarrega a imunidade e escapa para prosseguir e metastatizar para os outros órgãos. Fonte: (PANDYA; MURRAY; POLLOK; RENBARGER, 2016).

Durante o desenvolvimento do melanoma, tanto as células imunes quanto as cancerígenas passam pelo processo de imunoedição que inclui fases interconectadas como eliminação, equilíbrio e escape ou evasão imune (MACCALLI; GIANNARELLI; CAPOCEFALO; PILLA *et al.*, 2016). Estudos revelam que o melanoma regula de forma negativa a expressão de MHC de classe I, evitando a ativação de células T e eliminação do tumor (CABRERA, 2007). O melanoma, possui estratégias para evitar a detecção e ativação de células CD8⁺ (HARLIN; KUNA; PETERSON; MENG *et al.*, 2006). A liberação de citocinas imunossupressoras dentro do MAT e a regulação positivas de moléculas de *checkpoints* nas célula T (WHITESIDE, 2008). Já na fase de disseminação cancerosas, às células do melanoma modulam o MAT para um perfil imunossupressor caracterizado pelo infiltrado de linfócitos T reguladores (Treg), o aumento da expressão de marcadores de *checkpoint* imunológicos como o CTLA-4 e PD-1 e promoção da neoangiogênese (HANAHAN; COUSSENS, 2012) A aquisição dessas características, permite a disponibilidade de nutrientes para atender a alta demanda das células tumorais em proliferação, o que permite a formação de uma rede estromal

e expõe as células T a metabólitos supressores, resultando na exaustão das células T e na redução da eficiência de sua função efetora (CHANG; PEARCE, 2016). Considerando que as células do MAT interagem entre si, neste trabalho investigou-se como a depleção das SC interfere na imunovigilância do melanoma.

3. JUSTIFICATIVA

O conceito de que o sistema nervoso periférico regula a progressão do câncer é novo, e pouco se sabe sobre as células gliais associadas aos nervos periféricos no microambiente tumoral. Durante décadas, as células de Schwann receberam pouca atenção nesse cenário. Diante disso, fazem-se necessários estudos para elucidar o papel dessas células no microambiente tumoral.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Analisar o papel das células de Schwann na progressão tumoral do melanoma murino B16F10 *in vivo*.

4.2 Objetivos Específicos

- Identificar as células Schwann no microambiente do melanoma utilizando o modelo genético PLP1CreER/TdTomato.
- Induzir, o melanoma por meio de injeções de células B16F10 em camundongos PLP1CreER⁺/iDTR⁺;
- Depletar as células de Schwann, utilizando camundongos geneticamente modificados PLP1CreER⁺/iDTR⁺;
- Analisar o efeito da depleção das células de Schwann na progressão do melanoma;
- Avaliar a angiogênese no microambiente tumoral dos animais PLP1CreER⁺/iDTR⁺;
- Identificar se há diferença na taxa de proliferação celular no microambiente tumoral de animais os quais as células de Schwann foram depletadas;
- Avaliar o perfil da resposta imune tumoral em animais nos quais as células de Schwann foram depletadas;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Neste trabalho, foram utilizados camundongos da linhagem PLP1CreER (DOERFLINGER; MACKLIN; POPKO, 2003) (*Jackson Laboratory*, código #005975) mantidos no fundo genético C57BL/6, nos quais a expressão de Cre está sob controle do promotor do gene Proteína Proteolipídica 1 (*PLP1*) e sua atividade está condicionada a ativação de um receptor de estrógeno modificado (ER). PLP1 é um componente predominante da bainha de mielina produzidas pelas SC. Os animais foram genotipados utilizando primers com as sequências: *Forward*: 5'- GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTATC- 3'; *Reverse* 5'- GTG AAA CAG CAT TGC TGT CACTT-3'. Para a visualização das células de Schwann no microambiente tumoral foi realizado o cruzamento entre os modelos PLP1CreER^{+/Flox} e o Rosa26 loxP *STOPcodon loxP/TdTomato*. O modelo TdTomato possui a sequência codificadora de uma proteína que produz fluorescência vermelha inserido em um gene que é expresso em todas as células. A sequência desta proteína é antecedida por um cassete que para a transcrição (*STOPcodon*). Este *STOPcodon* é flanqueado por sequências que são reconhecidas pela enzima Cre recombinase. Desse modo, a Cre recombinase presente nestas células irá reconhecer as sequências que flanqueiam o STOP códon as quais serão clivadas, o que permitirá que a proteína que produz fluorescência vermelha seja expressa nas SC nesse modelo (PLP1CreER/TdTomato). Para a depleção das SC, os camundongos PLP1CreER foram cruzados com animais iDTR, que possuem um gene que codifica o Receptor de Toxina Diftérica (DTR) sob controle do promotor do gene constitutivo Rosa26 (BUCH; HEPPNER; TERTILT; HEINEN *et al.*, 2005). Nesses animais, a expressão do iDTR é impedida por uma sequência loxP-STOP-loxP, que é removida pela Cre recombinase. Em camundongos, PLP1CreEr^{+/Flox} Rosa26 loxP iDTR^{+/Flox} (PLP1CreER^{+/iDTR}⁺) a remoção do cassete loxP-stop-loxP (LSL) ocorre pela atividade da recombinase Cre que é induzida pela administração de tamoxifeno que leva a expressão do DTR nas células que expressam a Cre. Diante disso, após a administração de Toxina Diftérica (TD) apenas as SC que expressarem o receptor de TD sofrerão apoptose. Os camundongos da mesma ninhada heterozigotos para iDTR, mas sem a expressão da recombinase Cre, foram usados como controles (camundongos PLP1CreER^{-/iDTR}⁺).

5.2 Manutenção dos animais

Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas e ambiente controlado com livre acesso a água e ração *ad libitum*, durante todo o período do experimento. Para a realização deste estudo os animais foram divididos em grupos (caixas) com 5 (cinco) animais cada. Os grupos foram denominados de acordo com o genótipo dos animais e como “Teste” ou “Controle” em relação a depleção das células de Schwann e a indução do tumor. Após a divisão dos grupos, os animais foram observados diariamente verificando: mortalidade, sinais clínicos, variações no peso corporal e no consumo de água e ração.

5.3 Administração de tamoxifeno

Para a indução da recombinase Cre, foi realizada a administração de tamoxifeno por via intraperitoneal, diluído em óleo de semente de girassol (ASADA; KUNISAKI; PIERCE; WANG *et al.*, 2017; HERRING; HOGGATT; BURLAK; OFFERMANNNS, 2014). Foram administrados 200 µL / dia contendo 2 mg de tamoxifeno por 5 dias a cada animal (Herring, et al. 2014; Schmit, et al. 2014).

5.4 Depleção por toxina difteria

Para a depleção das células de Schwann, os camundongos PLP1CreEr⁺/iDTR⁺ receberam por via intraperitoneal. Duas doses de TD de 2 µg em dois dias consecutivos, que foi diluída em PBS 1x conforme (NIKOLAKOPOULOU; MONTAGNE; KISLER; DAI *et al.*, 2019). Após a administração da TD, ela se liga aos receptores específicos da superfície celular e é internalizada por endocitose mediada por receptor (BUCH; HEPPNER; TERTILT; HEINEN *et al.*, 2005). Em seguida, a acidificação do endossomo, o fragmento A catalítico da toxina é translocado para o citosol, inibindo a síntese de proteínas pela ribosilação ADP do fator de alongamento 2, o que ocasiona a morte das células que expressam esse receptor (CHA; CHANG; RICHARDSON; EIDELS, 2003).

5.5 Linhagens tumorais

Utilizou-se a linhagem celular B16F10, obtida da *American Type Cell Culture* (ATCC), para indução do melanoma murino. As células foram mantidas em meio RPMI (*Sigma, San Louis, MO*) + 10% de Soro Fetal Bovino (FBS, *Life Technologies, Carlsbad, CA*) incubadas a 37°C com 5% CO₂. Foram utilizadas para experimentos *in vivo* até a 5ª passagem.

5.7 Indução tumoral

Para a implantação tumoral, as células B16F10 foram suspensas em PBS e a verificação da viabilidade celular foi realizada por meio da coloração de azul de tripan. Somente quando a

viabilidade celular era superior a 90%, o lote de células era considerado para injeção. Para aplicação subcutânea, a pele de todos os camundongos com idade de 8-12 semanas foram tricotomizados no local da injeção. Foram injetadas 1×10^5 células em 100 μL de PBS 1x por via subcutânea no flanco direito de cada animal e o crescimento dos tumores foi monitorado até a eutanásia. A progressão tumoral foi avaliada ao longo do tempo com um auxílio do paquímetro, conforme relatado anteriormente (BOHN; RAPP; LUTHER; KLEIN *et al.*, 2018; PRAZERES; LEONEL; SILVA; ROCHA *et al.*, 2020). O comprimento (L) e largura (W) foram medidos para calcular o volume do tumor (V) usando a fórmula $V = 0,5 \times (L \times W^2)$. A área do tumor foi calculada após a eutanásia usando fotografias calibradas de cada tumor utilizando o *software Fiji*®, versão 1.53 (*National Institute of Health, Bethesda, MD*).

5.8 Imunofluorescência e microscopia

Os camundongos foram anestesiados com cloridrato de xylasina (10mg/kg) e cloridrato de ketamina (80mg/kg). Após a eutanásia, os tumores foram dissecados e fixados a 4° C em paraformaldeído tamponado a 4% (PFA, pH = 7,4) *overnight*. Em seguida, foram transferidos para sacarose a 30% em PBS 1x durante 48 horas para posteriormente serem incluídos e congelados em composto de temperatura de corte ideal (OCT, *Tissue - Tek*) e conservados em um freezer à -80° C. Foram realizados cortes em secções de 20 ou 40 μm em criostato da marca Leica modelo CM1850. Para realização da imunofluorescência, as secções foram bloqueadas por 2 horas em BSA a 3% em PBS + Triton a 0,5% e imunomarcadas com os seguintes anticorpos: CD31-PE para angiogênese (diluição 1: 100) (*BioLegend*), Ki67 que marca proliferação celular (diluição 1: 100) (BD Biociências), e anti - *guinea-pig* - *AlexaFluor* - 647 (1: 1000) (*Life Technologies*). Por fim, as secções foram coradas com DAPI para visualização nuclear e montadas em meio de montagem de fluorescência Dako (Dako, Santa Clara, CA). As seções coradas foram fotografadas em um microscópio confocal *Zeiss LSM 880* invertidos (*Oberkochen, Alemanha*). A Área de CD31, diâmetro, comprimento do vaso, número de células Ki67+ e a intensidade média de fluorescência (MFI) foram quantificadas usando o *software Fiji*®, versão 1.53 (*National Institute of Health*).

5.9 Imunofenotipagem de leucócitos infiltrantes de tumor e medição de citocinas intracelulares

Tecidos tumorais foram macerados e filtrados através do *cell strainer* de 40 μm , para isolar as células utilizadas para imunofenotipagem. As células foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS), incubadas com solução *Live/Dead* (*Invitrogen*), para exclusão de células mortas, e com anticorpos monoclonais, lavadas, fixadas e permeabilizadas (conjunto

de tampão de coloração FoxP3, *eBioscience*) de acordo com as instruções do fabricante. Os anticorpos estão listados na Tabela 1. A aquisição foi realizada em um citômetro LSR-FORTESSA. Para análises e exclusão de *debris*, combinações de fluorocromos foram realizadas, para remover *doublets*, adotamos a estratégia de *gating* utilizando *forward scatter area* (FSC-A) versus *forward scatter height* (FSC-H), de modo a ser realizada uma análise de *boolean* de interseção dos *gating* anteriores. Apenas leucócitos vivos foram selecionados através da estratégia de *gating* de *Live/Dead* versus CD45. Avaliamos diferentes subpopulações de células imunes com base em marcadores moleculares de cada subconjunto celular: células T CD4⁺ (CD4⁺ / CD3⁺), células T CD8⁺ (CD8⁺ / CD3⁺), células T $\gamma\delta$ (CD3⁺ / CD4⁻ / CD8⁻ / TCR $\gamma\delta$ ⁺) Células NKT (CD3⁺ / NK⁺), células T regulatórias (Foxp3⁺ / CD4⁺ / CD3⁺), células NK (CD3⁻ / NK⁺). Os leucócitos infiltrantes de tumor foram estimulados com células tumorais autólogas por 4 h na presença de Brefeldina A (*ThermoFisher*) e Monensina (*ThermoFisher*). Leucócitos infiltrantes de tumor foram corados com mAbs específicos para proteínas de superfície antes da fixação e permeabilização. As células permeabilizadas foram então coradas com anti-IFN- γ e anti-IL-17 (LECLERC; VOILIN; GROS; CORGNAC *et al.*, 2019) Ki-67 é um fator nuclear transcrito no final G1, S, G2 e M do ciclo celular, portanto, marca células em proliferação (GERDES; LEMKE; BAISCH; WACKER *et al.*, 1984; SENA; ROCHA; PICOLI; SANTOS *et al.*, 2021). Assim, avaliamos a proliferação em células negativas para CD45 viáveis, sugerindo proliferação das células do microambiente tumoral. *GraphPad Prism V7.0* (*software GraphPad*) e *FlowJo V10.4.11* (*TreeStar*) foram usados para análise de dados e apresentação gráfica. A relação do número absoluto de células foi realizada com base no número total de células (células/ml) vezes a frequência de células adquiridas dividido pela massa tumoral.

6. Análise estatística

Os gráficos foram traçados usando *GraphPad Prism 7* (San Diego, CA). O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi realizado, e o teste t não pareado foi usado para determinar a significância estatística. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como significativos.

7. RESULTADOS

7.1 As SC estão presentes no microambiente do melanoma

Para examinar se as células de Schwann (SC) estão presentes no microambiente do melanoma, foi utilizado o modelo de camundongo PLP1CreER/TdTomato que após administração de tamoxifeno, apenas as SC irão expressar a fluorescência endógena TdTomato (Fig.12A). Conforme avaliado nas marcações por imunofluorescência para GFAP, p75-NGFr, e pela expressão endógena de TdTomato, as células Schwann estão presentes no microambiente tumoral do melanoma (Fig12.B). Os resultados obtidos, foram confirmados pela análise de citometria de fluxo (Fig12.C e D).

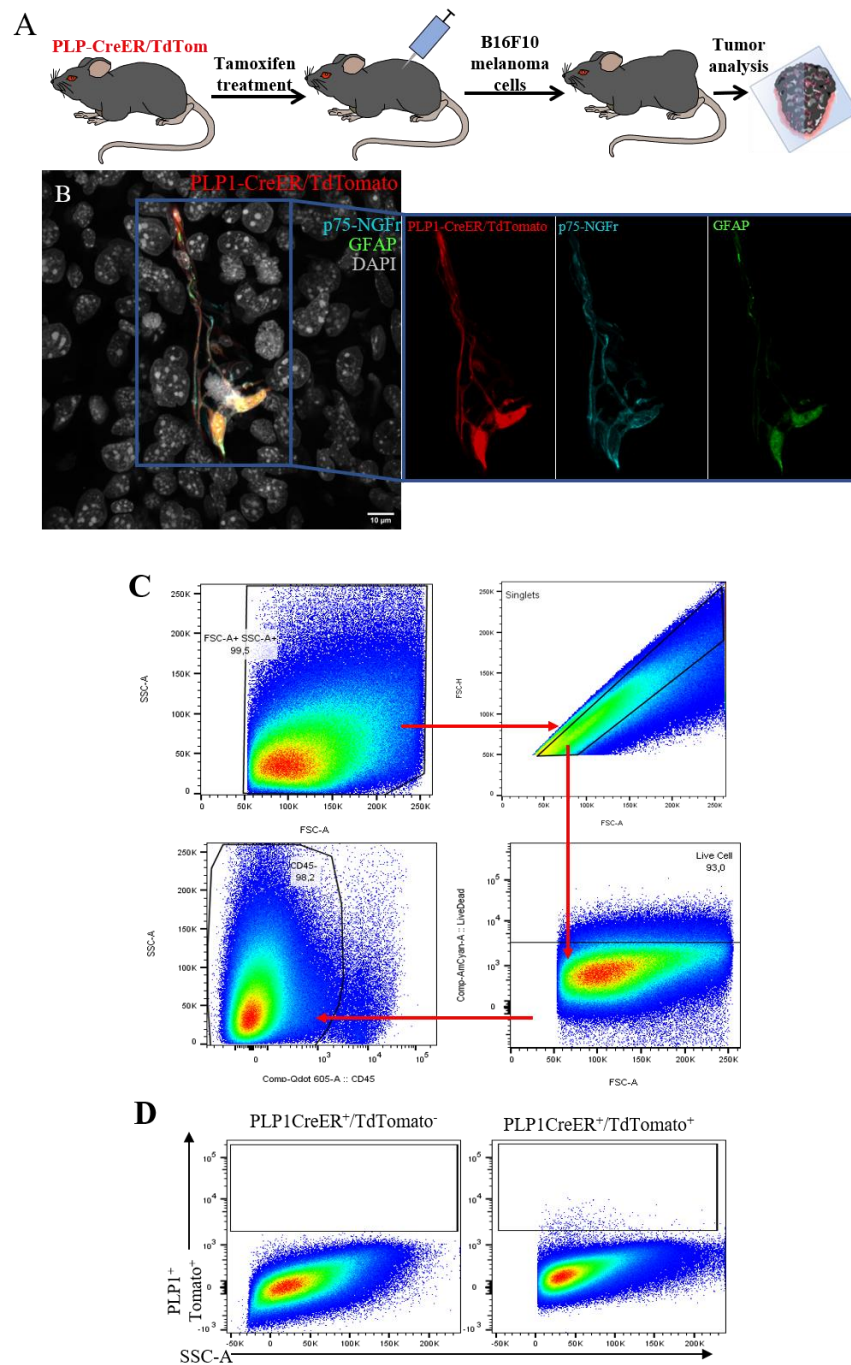


Figura 12. As células de Schwann estão presentes no microambiente do melanoma. **A.** Representação esquemática do crescimento subcutâneo de aloenxerto de melanoma. 1×10^5 células de melanoma B16F10 foram injetadas por via subcutânea em camundongos PLP1CreER/TdTomato, a ressecção tumoral foi realizada 16 dias após. Fotomicrografias representativas de uma seção de tumor de melanoma mostrando células PLP1-TdTomato + que expressam NGFR e GFAP. Barras de escala, $10 \mu\text{m}$. **C e D.** O marcador CD45 foi utilizado para a exclusão de leucócitos. O *gating* inicial foi feito, portanto em células CD45 negativas viáveis (CD45⁻/ Live).

7.2 Geração de um modelo de depleção de SC

Para avaliar a função das células de Schwann no crescimento do melanoma, foi gerado um modelo de depleção genética de SC mediada pela ativação da recombinase Cre e tratamento com toxina diftérica (Fig. 13A). Em seguida, foi realizado o transplante de células de melanoma B16F10 em camundongos com SC depletadas (PLP1CreER⁺/iDTR⁺) e seus controles não depletados (PLP1CreER⁻/iDTR⁺) (Fig. 13B). Os animais foram eutanasiados e os tumores e outros órgãos foram coletados.

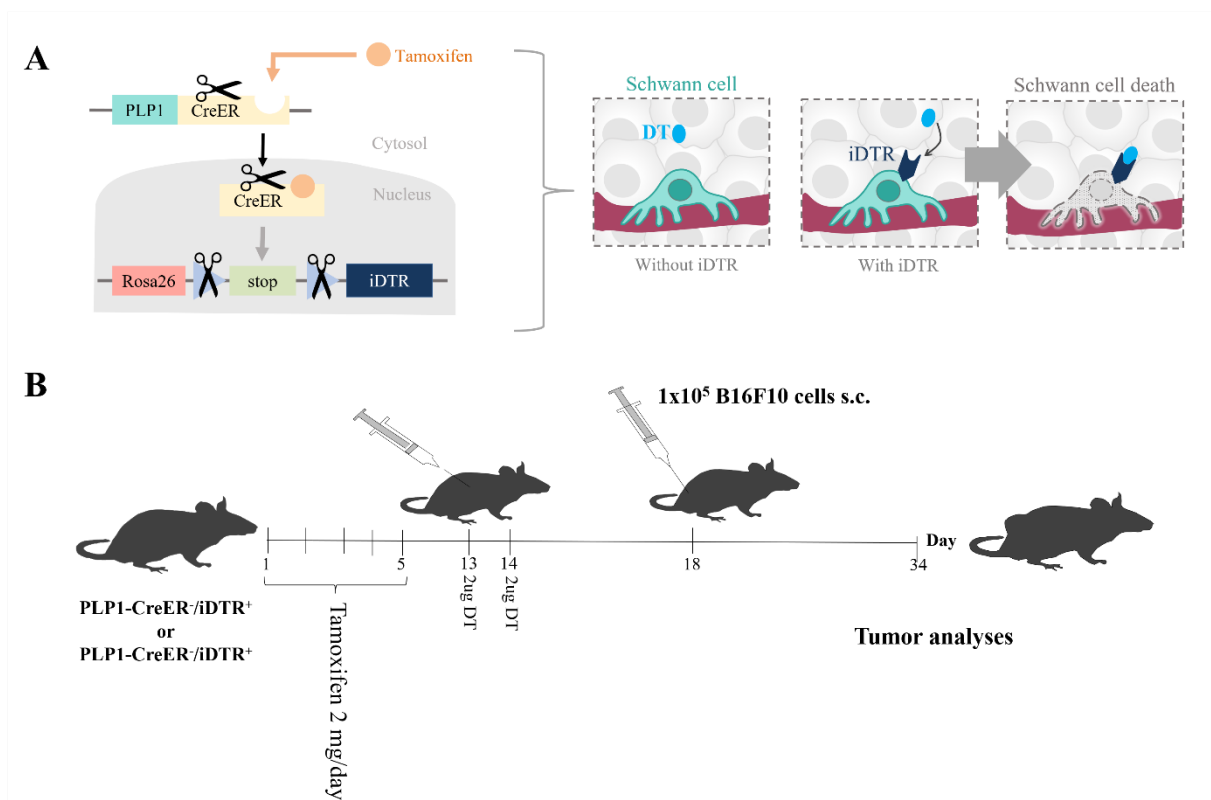


Figura 13. Diagrama esquemático do modelo experimental de depleção de SC. **A.** Indução da atividade da recombinase Cre após a administração de tamoxifeno, direciona a expressão do DTR nas células de Schwann. Em seguida, foi realizada a administração da toxina da diftérica para induzir a depleção de SC em camundongos PLP1CreER⁺/iDTR⁺. **B.** Representação do protocolo para crescimento subcutâneo de melanoma de aloenxerto. Camundongos PLP1CreEr⁻/iDTR⁺ (n = 6) e PLP1CreEr⁺/iDTR⁺ (n = 9) foram tratados por 5 dias com 2 mg/dia de Tamoxifeno diluído em óleo de girassol. Após 8 dias de indução, os camundongos foram tratados com duas doses consecutivas de 2 µg de toxina diftérica. Após 4 dias da administração de TD, os camundongos foram injetados com 1x10⁵ células de melanoma B16F10 por via subcutânea. Os tumores e outros tecidos foram removidos para análises após 16 dias.

7.3 A depleção genética das SC reduz o crescimento do melanoma, a angiogênese e a proliferação tumoral

Após 16 dias do transplante de células cancerosas, houve uma redução no desenvolvimento do melanoma (de $0,90 \pm 0,23$ para $0,30 \pm 0,07$ SEM Fig14. A); peso do tumor por peso corporal reduzido de $0,03 \pm 0,01$ a $0,01 \pm 0,002$; área do tumor reduzida de $2,13 \pm 0,50$ para $0,95 \pm 0,11$ cm^3 , o volume do tumor reduzido de $2,76 \pm 1,07$ para $0,37 \pm 0,05$ mm^3 ; Fig.14B, C e D) nos animais depletados para SC (PLP1CreER⁺/iDTR⁺) em relação aos seus controles não depletados (PLP1CreER⁻/iDTR⁺). Já as análises da área da vasculatura intratumoral revelaram uma redução na angiogênese (de $0,31 \pm 0,01$ a $0,20 \pm 0,03$ μm^2 de área de CD31 + / μm^2 de área do tumor), diminuição do diâmetro dos vasos (de $21,05 \pm 1,16$ a $14,09 \pm 3,04$ μm) e redução do comprimento (de $148,5 \pm 18,3$ a $101,8 \pm 11,59$ $\text{mm} / \mu\text{m}^2$) (Fig. 14F e H). Além disso, a ausência das células de Schwann resultou no decréscimo no número de células em proliferação dentro do tumor (de $27,33 \pm 6,89$ para $8,00 \pm 3,51\%$) como observado análise de imunofluorescência (Fig. 14G e I), e de $59,20 \pm 5,50$ para $31,30 \pm 5,55\%$ como analisado para células não imunes por citometria de fluxo (CD45⁻/Ki67⁺) (Fig.14J). Em conjunto, os dados sugerem que a depleção das células de Schwann reduz o desenvolvimento do melanoma.

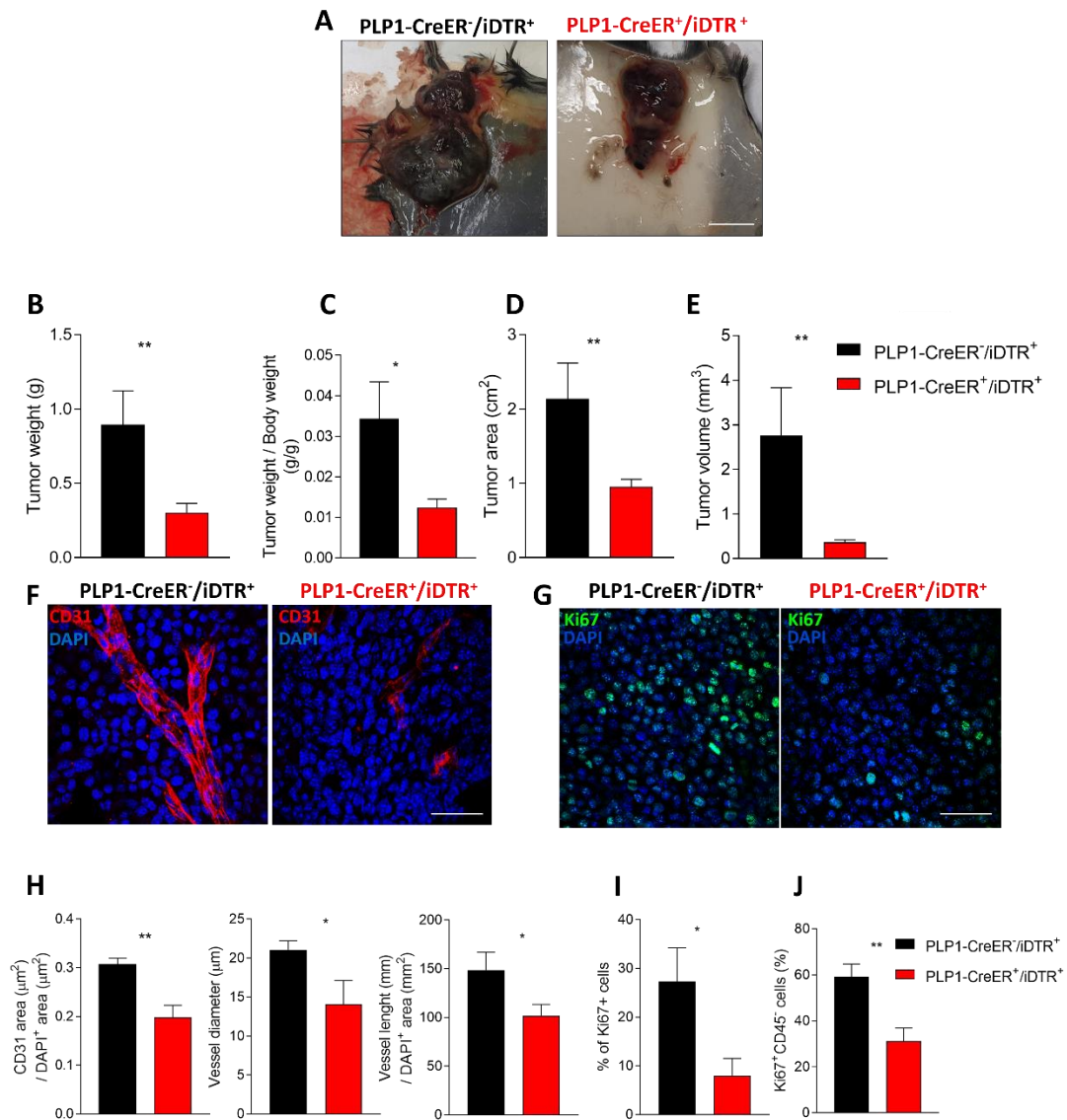


Figura 14. A ablação genética de SC diminui o crescimento do melanoma. A. Imagens macroscópicas representativas de tumores de melanoma B16F10 após dissecação, painel esquerdo (PLP1CreER⁻/iDTR⁺) e painel direito (PLP1CreER⁺/iDTR⁺). **B.** Peso do tumor (PLP1CreER⁻/iDTR⁺: 0,89 ± 0,23 g; PLP1CreER⁺/iDTR⁺: 0,29 ± 0,06 g). **C.** Peso do tumor corrigido pelo peso corporal do animal PLP1CreER⁻/iDTR⁺: 0,03 ± 0,01; PLP1CreER⁺/iDTR⁺: 0,01 ± 0,002). **D.** Área do tumor (PLP1CreER⁻/iDTR⁺: 2,13 ± 0,48 cm²; PLP1CreER⁺/iDTR⁺: 0,95 ± 0,10 cm²). **E.** Volume do tumor (PLP1CreER⁻/iDTR⁺: 2,76 ± 1,069 mm³; PLP1CreER⁺/iDTR⁺: 0,36 ± 0,05 mm³). **F.** Imagens representativas de imunofluorescência de seções tumorais de camundongos PLP1CreER⁻/iDTR⁺ e PLP1CreER⁺/iDTR⁺ marcados para células endoteliais (CD31; vermelho) para identificação de vasos sanguíneos e núcleo (DAPI; azul). **H.** Quantificação da angiogênese intratumoral em animais PLP1CreER⁻/iDTR⁺ e

PLP1CreER⁺/iDTR⁺ por área de vaso sanguíneo, diâmetro e comprimento. **G.** Imagens de imunofluorescência representativas de seções de melanoma de camundongos animais PLP1CreER⁻/iDTR⁺ e PLP1CreER⁺/iDTR⁺ (Ki67; verde) para identificar a proliferação celular e núcleos (DAPI; azul). **I.** Quantificação da proliferação em melanomas de animais PLP1CreER⁻/iDTR⁺ e PLP1CreER⁺/iDTR⁺. **J.** Quantificação da proliferação (Ki67 +) por citometria de fluxo em células CD45⁻ de tumores de camundongos PLP1CreER⁻/iDTR⁺ e PLP1CreER⁺/iDTR⁺. Os dados são apresentados como média ± SEM. Teste t não pareado (ns P > 0,05; * P < 0,05; ** P < 0,01). Barras de escala, 50 µm.

7.4 A depleção genética de células de Schwann afeta a resposta imune tumoral

Com o intuito de avaliar, como a resposta imune tumoral é modulada pelas células de Schwann, foi realizada a análise de imunofenotipagem, por citometria de fluxo. Foi detectado um aumento em número absoluto nas células T CD4 + infiltrantes (de $1,70 \times 10^7 \pm 2,77 \times 10^6$ a $4,42 \times 10^7 \pm 8,44 \times 10^6$ células por mg de tumor), células T CD8 + (de $3,09 \times 10^6 \pm 1,58 \times 10^6$ a $2,87 \times 10^7 \pm 6,62 \times 10^6$ células por mg de tumor), células T $\gamma\delta$ (de $6,20 \times 10^7 \pm 1,47 \times 10^7$ a $1,37 \times 10^8 \pm 2,54 \times 10^7$ células por mg de tumor) (Fig. 15A, B e C), células NKT (de $1,33 \times 10^7 \pm 3,52 \times 10^6$ a $2,68 \times 10^7 \pm 2,76 \times 10^6$ células por mg de tumor) e células NK (de $1,16 \times 10^7 \pm 3,05 \times 10^6$ a $3,40 \times 10^7 \pm 5,20 \times 10^6$ células por mg de tumor) (Fig. 15D e E).

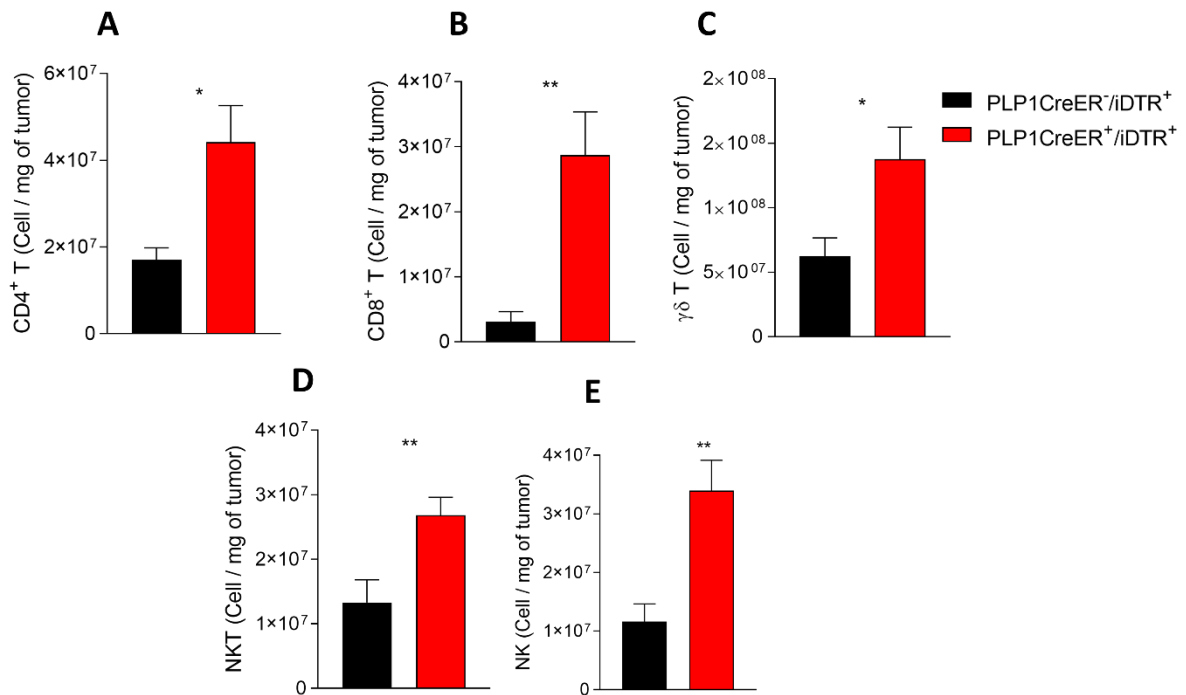


Figura 15. A depleção das SC promove o aumento de células imunes no tumor. Análises *ex-vivo* de linfócitos tumorais em camundongos controle PLP1CreER⁻/iDTR⁺ (n = 6) e com SC depletadas PLP1CreER⁺/iDTR⁺ (n = 9). **A.** Número absoluto de células T CD4 + (PLP1CreER⁻/iDTR⁺: 1,70x10⁷ ± 2,77x10⁶ células por mg de tumor; PLP1CreER⁺/iDTR⁺ 4,42x10⁷ ± 8,44x10⁶ células por mg de tumor). **B.** Células T CD8 + (PLP1CreER⁻/iDTR⁺ ± 1,58x10⁶ células por mg de tumor; PLP1CreER⁺/iDTR⁺: 2,87x10⁷ ± 6,62x10⁶ células por mg de tumor). **C.** Número absoluto de células T γδ (PLP1CreER⁻/iDTR⁺: 6,20x10⁷ ± 1,47x10⁷ células por mg de tumor; PLP1CreER⁺/iDTR⁺: 1,37x10⁸ ± 2,54x10⁷ células por mg de tumor). **D.** NKT células (PLP1CreER⁻/iDTR⁺: 1,33x10⁷ ± 3,52x10⁶ células por mg de tumor; PLP1CreER⁺/iDTR⁺: 2,68x10⁷ ± 2,76x10⁶ células por mg de tumor). **E.** Células NK (PLP1CreER⁻/iDTR⁺: 1,16x10⁷ ± 3,05x10⁶ células por mg de tumor; PLP1CreER⁺/iDTR⁺: 3,40x10⁷ ± 5,20x10⁶ células por mg de tumor) de tumores de camundongos inoculados com B16F10. Os dados são apresentados como média ± SEM. Teste t não pareado (ns P > 0,05; * P < 0,05; ** P < 0,01).

7.5 A depleção de células de Schwann modula a expressão de marcadores de *checkpoint* imunológico

Realizada a análise por meio de citometria de fluxo afim de avaliar se as células SC são capazes de modular expressão dos marcadores de *checkpoint* imunológico. Os resultados obtidos demonstram que a depleção de células de Schwann reduziu a expressão dos marcadores de *checkpoint* imunológicos (Fig. 16). A porcentagem de linfócitos CD4⁺ que expressam CTLA-4 diminuiu de: $50,05 \pm 8,19\%$ em animais controles (PLP1-CreER⁻/iDTR⁺), para $22,66 \pm 5,21\%$ em animais depletados (PLP1CreEr⁺/iDTR⁺) (Fig. 16A). De maneira semelhante, a porcentagem de linfócitos CD4⁺ que expressam PD-1 diminuiu de $12,25 \pm 2,98\%$ em camundongos controle PLP1CreER⁻/iDTR⁺ para $2,62 \pm 1,52\%$ em camundongos depletados PLP1CreER⁺/iDTR⁺ (Fig. 16B). A porcentagem de linfócitos citotóxicos CD8⁺ que expressam PD-1 também diminuiu de $21,7 \pm 9,91\%$ em animais controles (PLP1-CreER⁻/iDTR⁺) para $6,51 \pm 1,28\%$ em animais depletados (Fig. 16E), enquanto a expressão de CTLA-4 não variou nestas células (Fig. 16D). A porcentagem de células $\gamma\delta$ T que expressam PD-1 diminuiu de $27,58 \pm 5,69\%$ em camundongos controle PLP1CreER⁻/iDTR⁺ para $6,52 \pm 1,12\%$ em camundongos depletados PLP1CreER⁺ iDTR⁺ (Fig. 16H); da mesma forma, a porcentagem de células NKT que expressam PD-1 diminuiu de $3,75 \pm 0,74\%$ em animais controles (PLP1-CreER⁻/iDTR⁺) para $2,13 \pm 0,51\%$ em camundongos depletados (PLP1CreER⁺ iDTR⁺) (Fig. 16K). A porcentagem de células NK que expressam CTLA-4 diminuiu de $39,45 \pm 4,51\%$ em animais controles (PLP1-CreER⁻/iDTR⁺) para $21,41 \pm 2,66\%$ em camundongos depletados (PLP1CreER⁺ iDTR⁺) (Fig. 16M); da mesma forma, a porcentagem de células NK que expressam PD-1 diminuiu de $9,20 \pm 3,69\%$ em animais controles (PLP1-CreER⁻/iDTR⁺) para $1,57 \pm 1,12\%$ em camundongos depletados (PLP1CreER⁺ iDTR⁺) (Fig. 16N). No geral, nossos dados sugerem que a ablação de células de Schwann induz melhora das funções efetoras das células T no microambiente tumoral.

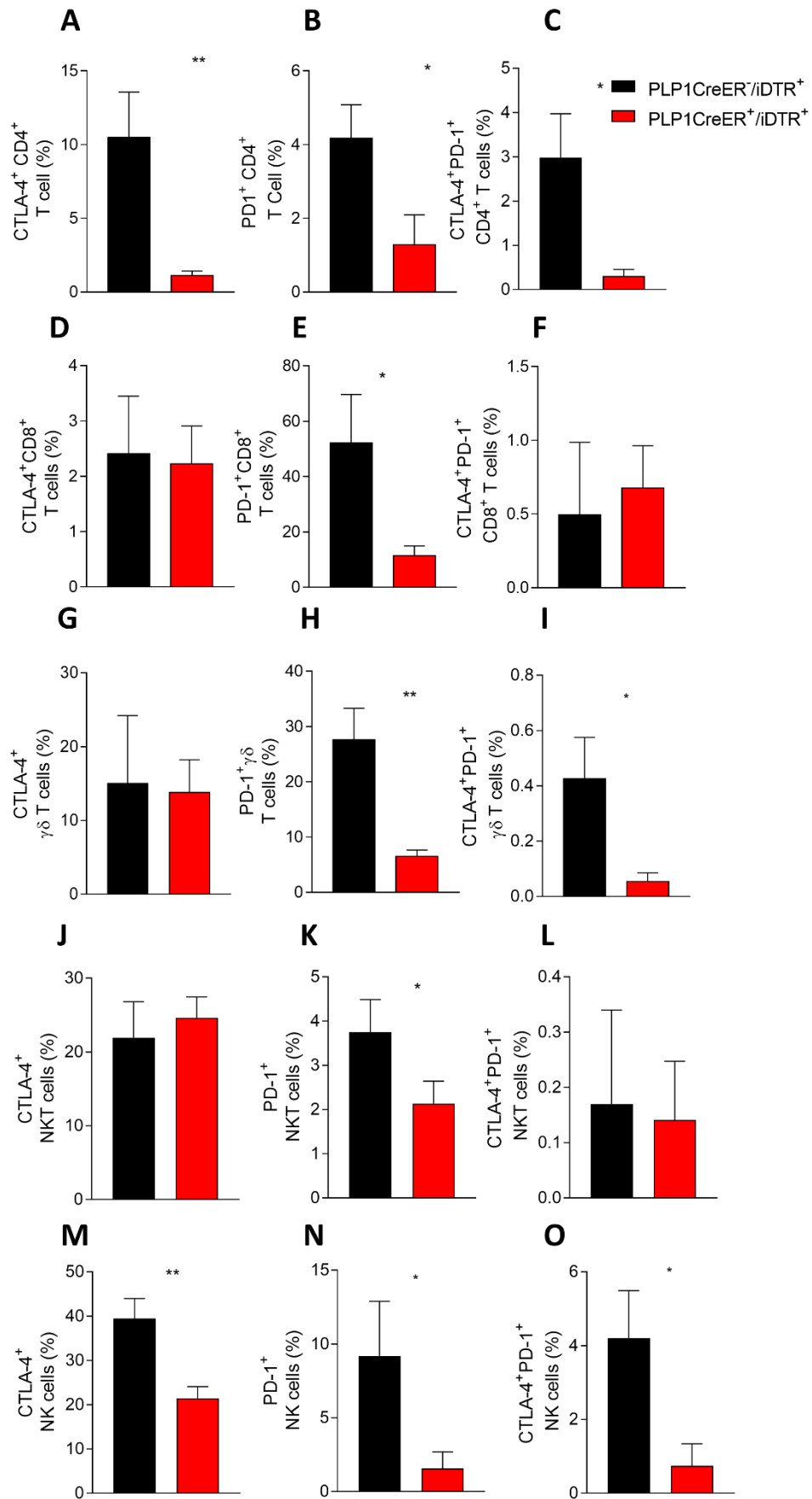


Figura 16. A expressão de marcadores de *checkpoint* imunológico é reduzida durante a depleção das células de Schwann. As células T CD4+, T CD8+, T $\gamma\delta$, NKT e NK intratumorais de camundongos inoculados com B16F10 foram analisadas *ex vivo* em animais controle PLP1CreER⁻/iDTR⁺ (n = 6) e com SC depletadas PLP1CreER⁺/iDTR⁺ (n = 9). Os gráficos de colunas mostram a expressão CTLA-4 (**A, D, G, J, e M**), PD-1 (**B, E, H, K, e N**) e coexpressão de CTLA-4 e PD-1 (**C, F, I, L, e O**) em células T CD4 + (**A, B, C**), células T CD8 + (**D, E, F**), células T $\gamma\delta$ (**G, H, I**), células NKT (**J, K, L**), células NK (**M, N, O**). Os dados são apresentados como média \pm SEM, teste t não pareado, * P <0,05; ** P <0,01.

7.5 A depleção das SC promove o aumento de DC infiltrantes no tumor

Estudos demonstram que os linfócitos são estimulados por células dendríticas (DCs) para iniciar algumas de suas respostas antitumorais no microambiente do melanoma (ALVAREZ-DOMINGUEZ; CALDERON-GONZALEZ; TERAN-NAVARRO; SALCINES-CUEVAS *et al.*, 2017). Diante disso, foi avaliado se as SC modulariam no número de DC infiltrantes no tumor. Os resultados obtidos, revelaram que houve um aumento no número de DC infiltrantes (de $2,72 \times 10^6 \pm 7,40 \times 10^5$ para $8,60 \times 10^6 \pm 2,21 \times 10^6$ células por mg de tumor; Fig. 17).

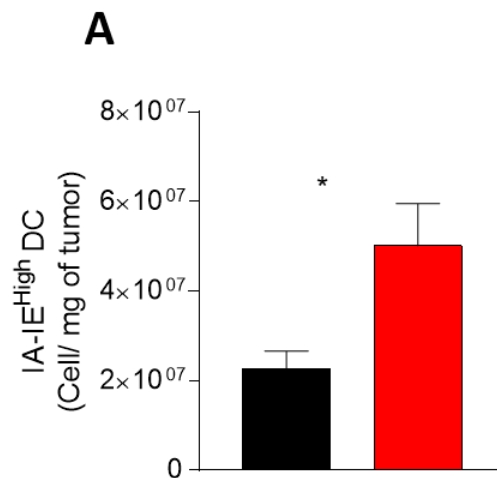


Figura 17. A ablação de células de Schwann aumenta o número de células dendríticas no tumor. As células dendríticas foram analisadas *ex-vivo* em camundongos controles não depletados PLP1CreER⁻/iDTR⁺ (n = 6) e depletados PLP1CreER⁺/iDTR⁺ (n = 9). **A.** Número absoluto de células dendríticas dos melanomas de camundongos inoculados com B16F10 (PLP1CreER⁻/iDTR⁺: $2,72 \times 10^6 \pm 7,40 \times 10^5$ células por mg de tumor; PLP1CreER⁺/iDTR⁺: $8,60 \times 10^6 \pm 2,21 \times 10^6$ células por mg de tumor). Os dados são apresentados como média \pm SEM teste t não pareado, * P < 0,05.

7.6 A depleção das SC reduz o número de células T reguladoras no melanoma

Com objetivo de analisar se SC seriam capazes de modular o número de células T reguladoras dentro do tumor, foi realizada a análise de imunofenotipagem. Houve uma redução de células T reguladoras (de $4,25 \times 10^6 \pm 7,18 \times 10^5$ para $1,48 \times 10^6 \pm 4,20 \times 10^5$ células por mg de tumor) (Fig. 18A). Além disso, avaliamos a expressão de marcadores de *checkpoint* imunológico, como antígeno de linfócito T citotóxico 4 (CTLA-4) e morte celular programada 1 (PD-1). Os resultados obtidos, demonstram que houve um aumento na expressão de PD-1 em células Treg, entretanto, não foi observado diferença na expressão de CTLA-4, bem como coexpressão destas moléculas PD-1 e CTLA-4 (Fig. 5B e D).

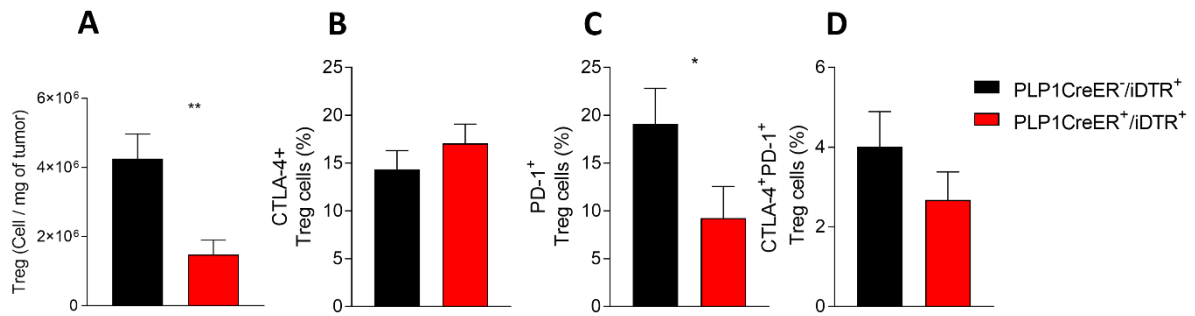


Figura 18. As SC modulam a resposta de células T reguladoras no microambiente tumoral. Células T reguladoras de camundongos inoculados com B16F10 foram analisadas ex vivo em PLP1CreER⁺/iDTR⁺ (n = 6) e PLP1CreER⁺/iDTR⁺ (n = 9) camundongos. **A.** Número absoluto de células Treg dos melanomas de camundongos inoculados com B16F10 (PLP1CreER⁺/iDTR⁺ 4,25x10⁶ ± 7,18x10⁵ células por mg de tumor; PLP1CreER⁺/iDTR⁺: 1,48x10⁶ ± 4,20x10⁵ células por mg de tumor). Os gráficos de colunas mostram proporção de CTLA-4 (**B**), PD-1 (**C**) e coexpressão de CTLA-4 / PD-1 (**D**) de tumores de camundongos inoculados com B16F10. Os dados são apresentados como média ± SEM teste t não pareado, *.01 < P < .05; **.001 < P < .

7.7 A ablação das SC induz funções efetoras melhoradas no microambiente tumoral

Relatado que linfócitos CD4 + e CD8 + secretando IL-17 e interferon- γ (IFN- γ) promovem a regressão do melanoma (MARTIN-OROZCO; MURANSKI; CHUNG; YANG *et al.*, 2009; MURANSKI; BONI; ANTONY; CASSARD *et al.*, 2008). Aqui, detectamos em resposta à depleção de células de Schwann um aumento nas células T CD4 + intratumorais produtoras de IL-17 (de $2,18 \times 10^7 \pm 5,29 \times 10^6$ a $6,01 \times 10^7 \pm 1,08 \times 10^7$ células por mg de tumor), bem como células T CD8 + produtoras de IL-17 (de $2,58 \times 10^6 \pm 1,37 \times 10^6$ a $2,54 \times 10^7 \pm 9,83 \times 10^6$ células por mg de tumor) e células T CD8 + produtoras de IFN- γ (de $4,98 \times 10^6 \pm 2,17 \times 10^6$ a $1,84 \times 10^7 \pm 4,76 \times 10^6$ células por mg de tumor) (Fig. 19A). Além disso, avaliamos a secreção de IL-17 e interferon- γ (IFN- γ) pelas células T $\gamma\delta$, NKT e NK (Fig. 19B). Detectamos em resposta à depleção de células de Schwann um aumento nas células T $\gamma\delta$ intratumorais produtoras de IL-17 (de $3,92 \times 10^6 \pm 1,19 \times 10^6$ a $5,32 \times 10^7 \pm 1,16 \times 10^7$ células por mg de tumor), nas células NKT produtoras de IL-17 (de $3,35 \times 10^7 \pm 4,75 \times 10^6$ a $1,30 \times 10^7 \pm 1,78 \times 10^6$ células por mg de tumor) bem como nas células NK + produtoras de IL-17 (de $4,10 \times 10^7 \pm 6,43 \times 10^6$ a $1,72 \times 10^7 \pm 6,07 \times 10^7$ células por mg de tumor) (Fig. 17B). Ao todo, nossos dados sugerem que a ablação genética das células de Schwann altera a vigilância imunológica o que favorece a produção de citocinas e afeta o desenvolvimento do melanoma.

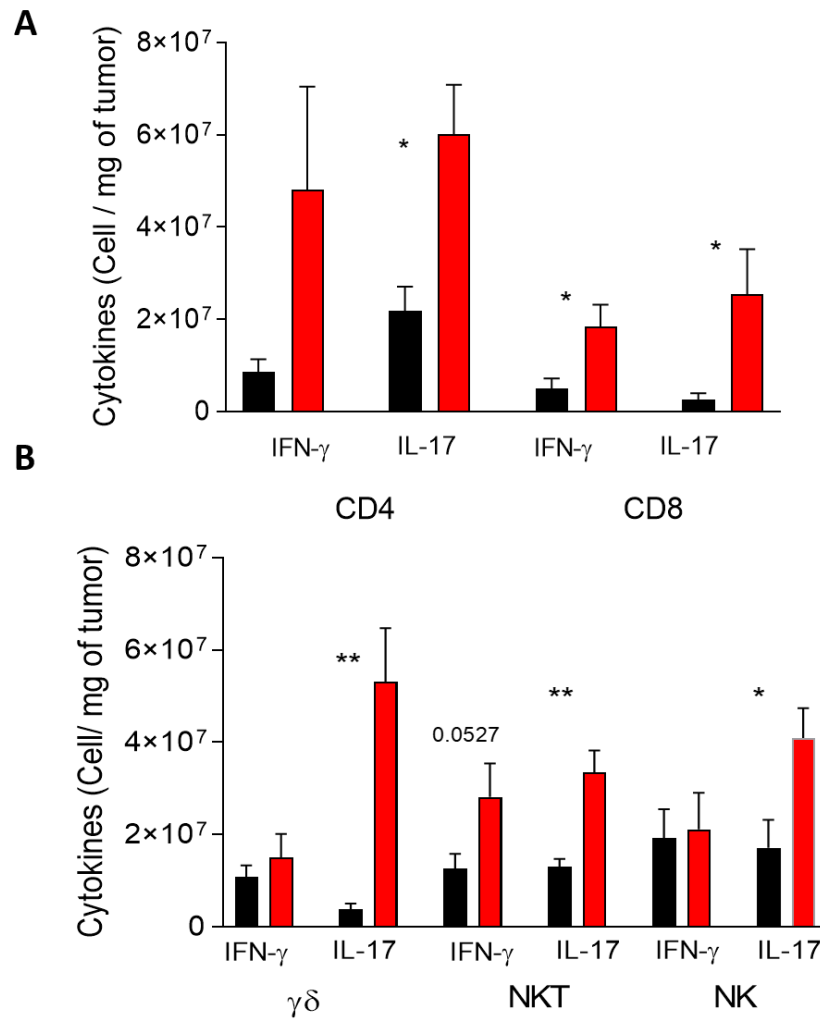


Figura 19. A ablação das SC induziu uma melhor resposta das células T efetora.

Os tumores dos camundongos inoculados com B16F10 foram analisados após 4 horas de cultura. **A.** Os gráficos de colunas mostram números absolutos de células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ e IL-17. Os níveis de citocinas foram medidos em células isoladas de tumores de animais PLP1-CreER⁻/iDTR⁺ e PLP1-CreER⁺/iDTR⁺ inoculados com B16F10. **B.** As células T $\gamma\delta$, células NKT e células NK que produzem IFN- γ e IL-17. Os níveis de citocinas foram medidos em células isoladas de tumores de camundongos PLP1-CreER⁻/iDTR⁺ e PLP1-CreER⁺/iDTR⁺. Os dados são apresentados como média \pm SEM, teste t não pareado, * 0,01 <P <0,05; **. 001 <P <.01.

8. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi demonstrado que a ablação genética das células de Schwann induziu a regressão do melanoma com diminuição no crescimento do tumor e na formação de novos vasos sanguíneos, bem como um reforço na vigilância imunológica antitumoral. Este trabalho indica que o direcionamento de células PLP1 + no microambiente tumoral representa um novo caminho de estudo que poderá contribuir para o desenvolvimento futuro de terapias direcionadas para o tratamento do câncer.

Os tumores são estruturas semelhantes a órgãos complexos contendo uma variedade de tipos de células, incluindo células cancerosas diferenciadas, células iniciadoras de câncer, células imunes, adipócitos, fibroblastos, células endoteliais, pericitos e outros; todos os quais têm a capacidade de interagir reciprocamente, impactando o resultado da doença oncológica (KAPLAN; RIBA; ZACHAROULIS; BRAMLEY *et al.*, 2005; MCALLISTER; GIFFORD; GREINER; KELLEHER *et al.*, 2008). Aqui, identificamos células de Schwann intratumorais identificadas pela expressão dos marcadores GFAP e PLP1. Estudos futuros devem explorar se é como essas células interagem com todos os outros componentes celulares do microambiente tumoral.

As populações de células heterogêneas dentro do tumor são altamente plásticas, alterando sua expressão gênica, morfologia e função em resposta ao ambiente do microambiente tumoral (KAPLAN; RIBA; ZACHAROULIS; BRAMLEY *et al.*, 2005; MCALLISTER; GIFFORD; GREINER; KELLEHER *et al.*, 2008). As células de Schwann podem ser ativadas por uma variedade de condições (CAMPANA, 2007; RODELLA; NEGRO; SCORZETO; BERGAMIN *et al.*, 2017). Embora a capacidade das células de Schwann ativadas de se desprender das fibras nervosas tenha sido descrita anteriormente, como durante a degeneração Walleriana (YANG; ZHANG; MAK; BONDER *et al.*, 2008) os gatilhos moleculares que recrutam as células de Schwann residentes na pele em direção aos microabinete do melanoma e a importância da comunicação entre as diferentes populações de células intratumorais ainda precisam ser exploradas (CRISAN; CORSELLI; CHEN; PEULT, 2012; WANJARE; KUSUMA; GERECHT, 2013).

Aqui, mostramos que a deleção genética de células de Schwann endógenas reduz o crescimento do melanoma. Estudos anteriores, usando células de Schwann mielinizantes isoladas de nervos ciáticos, sugeriram que o transplante dessas células de Schwann estimula o

crescimento do tumor (SHURIN; KRUGLOV; DING; LIN *et al.*, 2019). Além disso, os resultados aqui obtidos revelam que a deleção das células de Schwann afeta a resposta imunológica antitumoral. Dessa forma, progressão do tumor é afetada pela complexa interação entre as células cancerosas e os diferentes componentes do sistema imunológico (BHATIA; KUMAR, 2011). As células cancerosas podem causar a interrupção da imunidade do organismo para ultrapassar e escapar do controle do sistema imunológico (MITTAL; GUBIN; SCHREIBER; SMYTH, 2014; PASSARELLI; MANNAVOLA; STUCCI; TUCCI *et al.*, 2017). Com isso, o papel das células de Schwann nessas interações permanece completamente desconhecido, já que os linfócitos são os elementos imunológicos dominantes encontrados infiltrando o microambiente tumoral. Sua composição se correlaciona com a sobrevivência dos pacientes (CLARK; ELDER; GUERRY; BRAITMAN *et al.*, 1989; CLEMENTE; MIHM; BUFALINO; ZURRIDA *et al.*, 1996; HUSSEIN; ELSERS; FADEL; OMAR, 2006).

Embora as células T CD8 +, células T CD4 +, células T $\gamma\delta$ e células NK tenham demonstrado agir contra as células malignas, as células T reguladoras desempenham papéis pró-tumorigênicos (FRIDMAN; PAGES; SAUTES-FRIDMAN; GALON, 2012; GERBER; MUNST; SCHLAPBACH; SHAFIGHI *et al.*, 2014; GIRARDI; OPPENHEIM; STEELE; LEWIS *et al.*, 2001; GOODEN; DE BOCK; LEFFERS; DAEMEN *et al.*, 2011; HE; HAO; DONG; GAO *et al.*, 2010; HUNTINGTON; VOSSHENRICH; DI SANTO, 2007; KOBAYASHI; HIRAOKA; YAMAGAMI; OJIMA *et al.*, 2007; ROSENBERG; PACKARD; AEBERSOLD; SOLOMON *et al.*, 1988). Os resultados aqui demonstrado, revelam um aumento de células T CD8 +, células T CD4 +, células T $\gamma\delta$ e células NK e uma redução de células T reguladoras no infiltrado tumoral durante a redução do tumor desencadeada pela ablação genética das células de Schwann (ZU HÖRSTE; HU; HARTUNG; LEHMANN *et al.*, 2008). Além disso, foi observado um aumento de células dendríticas com mais expressão de MHC-II em animais com menor desenvolvimento tumoral, o que indica maior capacidade de apresentação antigênica para células que apresentaram menor frequência de marcadores de disfunção celular (ZHANG; SHURIN; KHOSRAVI; KAZI *et al.*, 2020). Estudos demonstram que a expressão de moléculas de *checkpoint* imunológico como, PD-1 e CTLA-4 são frequentemente expressas por células tumorais e atuam como poderosos indutores de tolerância imunológica (WALDMAN; FRITZ; LENARDO, 2020). Estratégias terapêuticas de utilização de anticorpos monoclonais direcionados a essas moléculas foram desenvolvidas como um método de impedir a sinalização inibitória nas células T CD8+ e, assim, habilitar a atividade citotóxica a tumores (FRITZ; LENARDO, 2019; PARDOLL, 2012). Descobrimos que as

células imunes infiltradas no tumor diminuem sua expressão de PD1 e CTLA-4, possivelmente indicando que essas células estão "menos exaustas" no microambiente do melanoma após a depleção das células de Schwann. Os fenótipos mais ativos de linfócitos têm sido associados ao aumento na produção de citocinas. Uma variedade de linfócitos é capaz de produzir IL-17, corroborado com os resultados obtidos neste trabalho (BUONOCORE; AHERN; UHLIG; IVANOV *et al.*, 2010; CIRIC; EL-BEHI; CABRERA; ZHANG *et al.*, 2009; CUPEDO; CRELLIN; PAPAZIAN; ROMBOUTS *et al.*, 2009). Assim, nossos achados gerais sugerem que a deleção das células de Schwann contribui para o aumento da resposta imune contra o tumor. Estudos futuros precisarão explorar os mecanismos moleculares exatos envolvidos nas interações das células de Schwann e células do sistema imunológico no microambiente tumoral.

Além disso, as células de Schwann estão no centro do processo regenerativo do SNP principalmente por causa de sua capacidade de se transdiferenciar em um fenótipo reparador (BALAKRISHNAN; BELFIORE; CHU; FLEMING *et al.*, 2020; JESSEN; MIRSKY; LLOYD, 2015). Estudos revelaram que as células malignas induzem alterações na expressão gênica das células Schwann para um perfil reparador (DEBORDE; OMELCHENKO; LYUBCHIK; ZHOU *et al.*, 2016; SHURIN; KRUGLOV; DING; LIN *et al.*, 2019). Embora alguns estudos *in vitro* sugiram que as células de Schwann podem induzir a progressão do câncer pela produção de moléculas pró-tumorigênicas (FERDOUSHI; LI; GRIFFIN; FAULKNER *et al.*, 2020; ROGER; MARTEL; BERTRAND-CHAPEL; DEPOLLIER *et al.*, 2019; SALVO; TU; SCHEFF; DUBEYKOVSKAYA *et al.*, 2021), permanece desconhecido quais moléculas são essenciais para o papel das células de Schwann endógenas no microambiente tumoral *in vivo*. Portanto, estudos futuros devem explorar completamente os mecanismos moleculares pelos quais as células de Schwann endógenas promovem o crescimento do tumor, por depleção genética de moléculas individuais especificamente das células de Schwann *in vivo* e *in vitro* por exemplo, usando tecnologias sofisticadas de Cre/loxP em combinação com modelos tumorais *in vivo*.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste trabalho, implicam que as células Schwann são um componente importante do microambiente tumoral. Também foi demonstrado que a ablação genética dessas células induz a regressão do tumor e uma resposta imune antitumoral mais efetiva. Compreender a capacidade das células de Schwann de modular a resposta imune tumoral têm implicações importantes para desvendar o microambiente tumoral. Nesse intuito, os conhecimentos obtidos a partir dessas interações permitirão o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos mais precisos no combate ao câncer.

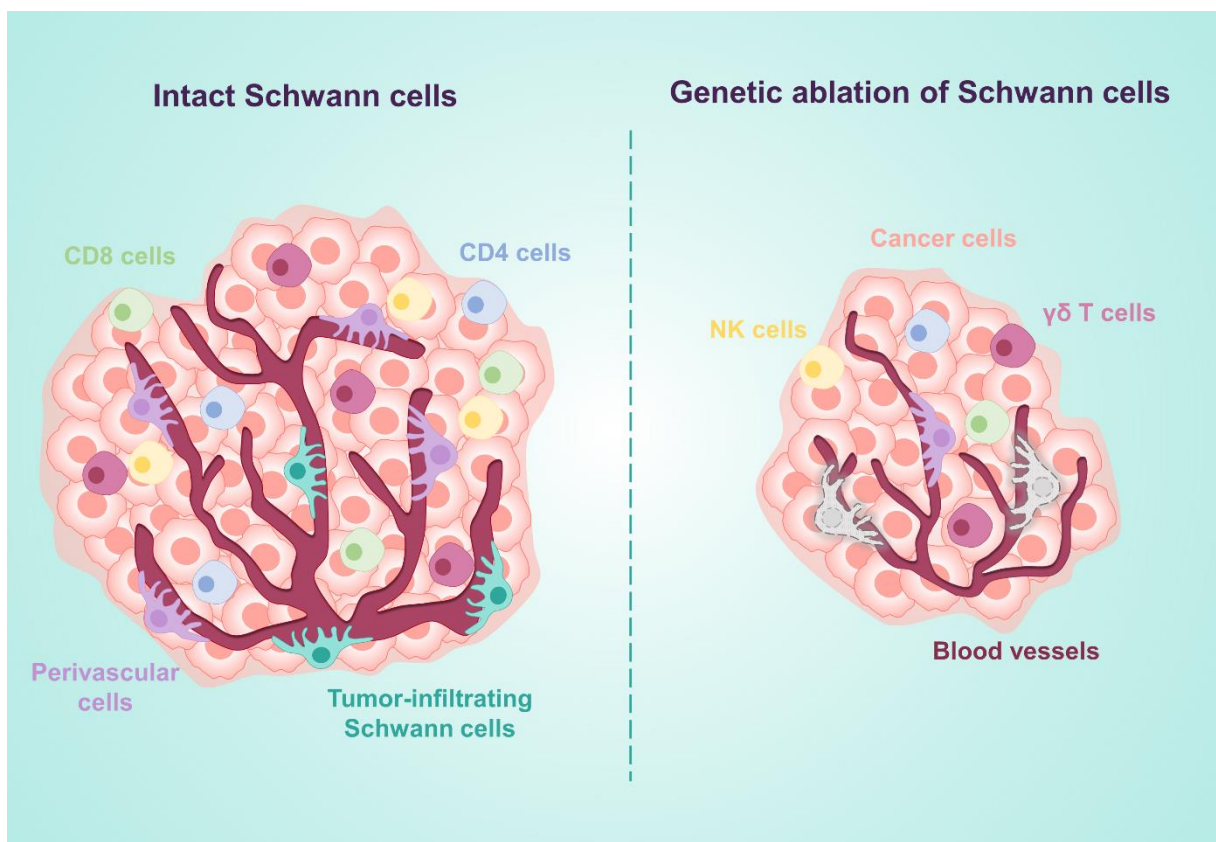


Figura 20. Ilustração esquemática resumindo os resultados da ablação das células de Schwann no microambiente do melanoma.

10. REFERÊNCIAS

ADAMEYKO, I.; LALLEMEND, F.; AQUINO, J. B.; PEREIRA, J. A. *et al.* Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. **Cell**, 139, n. 2, p. 366-379, Oct 16 2009.

ADAMS, J. L.; SMOTHERS, J.; SRINIVASAN, R.; HOOS, A. Big opportunities for small molecules in immuno-oncology. **Nat Rev Drug Discov**, 14, n. 9, p. 603-622, Sep 2015.

AGGELOPOULOS, N. C.; DUKE, C.; EDGLEY, S. A. Non-uniform conduction time in the olivocerebellar pathway in the anaesthetized cat. **J Physiol**, 486 (Pt 3), p. 763-768, Aug 1 1995.

ALLART-VORELLI, P.; PORRO, B.; BAGUET, F.; MICHEL, A. *et al.* Haematological cancer and quality of life: a systematic literature review. **Blood Cancer J**, 5, p. e305, Apr 24 2015.

ALMEIDA, R. G.; CZOPKA, T.; FFRENCH-CONSTANT, C.; LYONS, D. A. Individual axons regulate the myelinating potential of single oligodendrocytes in vivo. **Development**, 138, n. 20, p. 4443-4450, Oct 2011.

ALVAREZ-DOMINGUEZ, C.; CALDERON-GONZALEZ, R.; TERAN-NAVARRO, H.; SALCINES-CUEVAS, D. *et al.* Dendritic cell therapy in melanoma. **Ann Transl Med**, 5, n. 19, p. 386, Oct 2017.

AMIT, M.; NA'ARA, S.; GIL, Z. Mechanisms of cancer dissemination along nerves. **Nat Rev Cancer**, 16, n. 6, p. 399-408, Jun 2016.

APALLA, Z.; NASHAN, D.; WELLER, R. B.; CASTELLSAGUE, X. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. **Dermatol Ther (Heidelb)**, 7, n. Suppl 1, p. 5-19, Jan 2017.

ASADA, N.; KUNISAKI, Y.; PIERCE, H.; WANG, Z. *et al.* Differential cytokine contributions of perivascular haematopoietic stem cell niches. **Nat Cell Biol**, 19, n. 3, p. 214-223, Mar 2017.

AYALA, G. E.; DAI, H.; POWELL, M.; LI, R. *et al.* Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer. **Clin Cancer Res**, 14, n. 23, p. 7593-7603, Dec 1 2008.

BAADE, P.; MENG, X.; YOULDEN, D.; AITKEN, J. *et al.* Time trends and latitudinal differences in melanoma thickness distribution in Australia, 1990–2006. **International Journal of Cancer**, 130, n. 1, p. 170-178, 2012.

BAKER, G. E.; STRYKER, M. P. Retinofugal fibres change conduction velocity and diameter between the optic nerve and tract in ferrets. **Nature**, 344, n. 6264, p. 342-345, 1990.

BALAKRISHNAN, A.; BELFIORE, L.; CHU, T. H.; FLEMING, T. *et al.* Insights Into the Role and Potential of Schwann Cells for Peripheral Nerve Repair From Studies of Development and Injury. **Front Mol Neurosci**, 13, p. 608442, 2020.

BASTIAN, B. C. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. **Annu Rev Pathol**, 9, p. 239-271, 2014.

BATISTATOU, A.; ZIOGA, A.; PANELOS, J.; MASSI, D. *et al.* A new concept of melanocytic neoplasia pathogenesis based on the phenotype of common acquired nevi. **Med Hypotheses**, 69, n. 6, p. 1334-1339, 2007.

BATSAKIS, J. G. Nerves and neurotropic carcinomas. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, 94, n. 4 Pt 1, p. 426-427, Jul-Aug 1985.

BHATIA, A.; KUMAR, Y. Cancer-immune equilibrium: questions unanswered. **Cancer Microenviron**, 4, n. 2, p. 209-217, Aug 2011.

BOHN, T.; RAPP, S.; LUTHER, N.; KLEIN, M. *et al.* Tumor immunoevasion via acidosis-dependent induction of regulatory tumor-associated macrophages. **Nat Immunol**, 19, n. 12, p. 1319-1329, Dec 2018.

BUCH, T.; HEPPNER, F. L.; TERTILT, C.; HEINEN, T. J. *et al.* A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. **Nat Methods**, 2, n. 6, p. 419-426, Jun 2005.

BUONOCORE, S.; AHERN, P. P.; UHLIG, H. H.; IVANOV, II *et al.* Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. **Nature**, 464, n. 7293, p. 1371-1375, Apr 29 2010.

CABRERA, C. M. The double role of the endoplasmic reticulum chaperone tapasin in peptide optimization of HLA class I molecules. **Scand J Immunol**, 65, n. 6, p. 487-493, Jun 2007.

CAMPANA, W. M. Schwann cells: activated peripheral glia and their role in neuropathic pain. **Brain Behav Immun**, 21, n. 5, p. 522-527, Jul 2007.

CANDIDO, S.; RAPISARDA, V.; MARCONI, A.; MALAPONTE, G. *et al.* Analysis of the B-RafV600E mutation in cutaneous melanoma patients with occupational sun exposure. **Oncol Rep**, 31, n. 3, p. 1079-1082, Mar 2014.

CHA, J. H.; CHANG, M. Y.; RICHARDSON, J. A.; EIDELS, L. Transgenic mice expressing the diphtheria toxin receptor are sensitive to the toxin. **Mol Microbiol**, 49, n. 1, p. 235-240, Jul 2003.

CHANG, C.-H.; PEARCE, E. L. Emerging concepts of T cell metabolism as a target of immunotherapy. **Nature immunology**, 17, n. 4, p. 364-368, 2016.

CHATZISTEFANOY, I.; LUBEK, J.; MARKOU, K.; ORD, R. A. The role of perineural invasion in treatment decisions for oral cancer patients: A review of the literature. **J Craniomaxillofac Surg**, 45, n. 6, p. 821-825, Jun 2017.

CHEN, D. S.; MELLMAN, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. **Immunity**, 39, n. 1, p. 1-10, Jul 25 2013.

CHIEN, Y.-h.; JORES, R.; CROWLEY, M. P. Recognition by γ/δ T cells. **Annual review of immunology**, 14, n. 1, p. 511-532, 1996.

CIRIC, B.; EL-BEHI, M.; CABRERA, R.; ZHANG, G. X. *et al.* IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8⁺ T cells. **J Immunol**, 182, n. 9, p. 5296-5305, May 1 2009.

CLARK, W. H., Jr.; ELDER, D. E.; GUERRY, D. t.; BRAITMAN, L. E. *et al.* Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. **J Natl Cancer Inst**, 81, n. 24, p. 1893-1904, Dec 20 1989.

CLEMENTE, C. G.; MIHM, M. C., Jr.; BUFALINO, R.; ZURRIDA, S. *et al.* Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. **Cancer**, 77, n. 7, p. 1303-1310, Apr 1 1996.

COLE, S. W.; NAGARAJA, A. S.; LUTGENDORF, S. K.; GREEN, P. A. *et al.* Sympathetic nervous system regulation of the tumour microenvironment. **Nat Rev Cancer**, 15, n. 9, p. 563-572, Sep 2015.

COSTA, P. A.; SILVA, W. N.; PRAZERES, P. H.; PICOLI, C. C. *et al.* Chemogenetic modulation of sensory neurons reveals their regulating role in melanoma progression. **Acta neuropathologica communications**, 9, n. 1, p. 1-41, 2021.

CRISAN, M.; CORSELLI, M.; CHEN, W. C.; PEULT, B. Perivascular cells for regenerative medicine. **J Cell Mol Med**, Aug 8 2012.

CUPEDO, T.; CRELLIN, N. K.; PAPAZIAN, N.; ROMBOUTS, E. J. *et al.* Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells. **Nat Immunol**, 10, n. 1, p. 66-74, Jan 2009.

CURTIN, J. A.; FRIDLYAND, J.; KAGESHITA, T.; PATEL, H. N. *et al.* Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **N Engl J Med**, 353, n. 20, p. 2135-2147, Nov 17 2005.

DAMSKY, W. E.; BOSENBERG, M. Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. **Oncogene**, 36, n. 42, p. 5771-5792, Oct 19 2017.

DANILOFF, J. K.; LEVI, G.; GRUMET, M.; RIEGER, F. *et al.* Altered expression of neuronal cell adhesion molecules induced by nerve injury and repair. **J Cell Biol**, 103, n. 3, p. 929-945, Sep 1986.

DE FABO, E. C.; NOONAN, F. P.; FEARS, T.; MERLINO, G. Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma. **Cancer research**, 64, n. 18, p. 6372-6376, 2004.

DEBORDE, S.; OMELCHENKO, T.; LYUBCHIK, A.; ZHOU, Y. *et al.* Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion. **J Clin Invest**, 126, n. 4, p. 1538-1554, Apr 1 2016.

DESEKE, M.; PRINZ, I. Ligand recognition by the $\gamma\delta$ TCR and discrimination between homeostasis and stress conditions. **Cellular & Molecular Immunology**, 17, n. 9, p. 914-924, 2020.

DIBDEN, A.; OFFMAN, J.; DUFFY, S. W.; GABE, R. Worldwide Review and Meta-Analysis of Cohort Studies Measuring the Effect of Mammography Screening Programmes on Incidence-Based Breast Cancer Mortality. **Cancers (Basel)**, 12, n. 4, Apr 15 2020.

DOERFLINGER, N. H.; MACKLIN, W. B.; POPKO, B. Inducible site-specific recombination in myelinating cells. **Genesis**, 35, n. 1, p. 63-72, Jan 2003.

DUNN, G. P.; KOEBEL, C. M.; SCHREIBER, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. **Nat Rev Immunol**, 6, n. 11, p. 836-848, Nov 2006.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The three Es of cancer immunoediting. **Annu. Rev. Immunol.**, 22, p. 329-360, 2004.

ERDEI, E.; TORRES, S. M. A new understanding in the epidemiology of melanoma. **Expert Rev Anticancer Ther**, 10, n. 11, p. 1811-1823, Nov 2010.

ERDMANN, F.; LORTET-TIEULENT, J.; SCHÜZ, J.; ZEEB, H. *et al.* International trends in the incidence of malignant melanoma 1953–2008—are recent generations at higher or lower risk? **International journal of cancer**, 132, n. 2, p. 385-400, 2013.

FERDOUSHI, A.; LI, X.; GRIFFIN, N.; FAULKNER, S. *et al.* Schwann Cell Stimulation of Pancreatic Cancer Cells: A Proteomic Analysis. **Front Oncol**, 10, p. 1601, 2020.

FILOSA, A.; FILOSA, G. Melanoma Diagnosis: The Importance of Histopathological Report. **Dermatopathology (Basel)**, 5, n. 1, p. 41-43, Jan-Mar 2018.

FRIDMAN, W. H.; PAGES, F.; SAUTES-FRIDMAN, C.; GALON, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nat Rev Cancer**, 12, n. 4, p. 298-306, Mar 15 2012.

FRITZ, J. M.; LENARDO, M. J. Development of immune checkpoint therapy for cancer. **J Exp Med**, 216, n. 6, p. 1244-1254, Jun 3 2019.

FUCHS, E. Scratching the surface of skin development. **Nature**, 445, n. 7130, p. 834-842, Feb 22 2007.

FUJIWARA, T.; UEHARA, Y. The cytoarchitecture of the wall and the innervation pattern of the microvessels in the rat mammary gland: a scanning electron microscopic observation. **Am J Anat**, 170, n. 1, p. 39-54, May 1984.

GE, Y.; MIAO, Y.; GUR-COHEN, S.; GOMEZ, N. *et al.* The aging skin microenvironment dictates stem cell behavior. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 117, n. 10, p. 5339-5350, Mar 10 2020.

GERBER, A. L.; MUNST, A.; SCHLAPBACH, C.; SHAFIGHI, M. *et al.* High expression of FOXP3 in primary melanoma is associated with tumour progression. **Br J Dermatol**, 170, n. 1, p. 103-109, Jan 2014.

GERDES, J.; LEMKE, H.; BAISCH, H.; WACKER, H. H. *et al.* Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. **J Immunol**, 133, n. 4, p. 1710-1715, Oct 1984.

GIRARDI, M.; OPPENHEIM, D. E.; STEELE, C. R.; LEWIS, J. M. *et al.* Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. **Science**, 294, n. 5542, p. 605-609, Oct 19 2001.

GOBERT, M.; TREILLEUX, I.; BENDRISS-VERMARE, N.; BACHELOT, T. *et al.* Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. **Cancer research**, 69, n. 5, p. 2000-2009, 2009.

GOODEN, M. J.; DE BOCK, G. H.; LEFFERS, N.; DAEMEN, T. *et al.* The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. **Br J Cancer**, 105, n. 1, p. 93-103, Jun 28 2011.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, 445, n. 7130, p. 851-857, Feb 22 2007.

GRIFFIN, J. W.; THOMPSON, W. J. Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. **Glia**, 56, n. 14, p. 1518-1531, Nov 1 2008.

GUPTA, B.; KUMAR, N. Worldwide incidence, mortality and time trends for cancer of the oesophagus. **Eur J Cancer Prev**, 26, n. 2, p. 107-118, Mar 2017.

GUY, G. P., Jr.; THOMAS, C. C.; THOMPSON, T.; WATSON, M. *et al.* Vital signs: melanoma incidence and mortality trends and projections - United States, 1982-2030. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, 64, n. 21, p. 591-596, Jun 5 2015.

HANAHAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer Cell**, 21, n. 3, p. 309-322, Mar 20 2012.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000.

HARLIN, H.; KUNA, T. V.; PETERSON, A. C.; MENG, Y. *et al.* Tumor progression despite massive influx of activated CD8(+) T cells in a patient with malignant melanoma ascites. **Cancer Immunol Immunother**, 55, n. 10, p. 1185-1197, Oct 2006.

HAYAKAWA, Y.; SAKITANI, K.; KONISHI, M.; ASFAHA, S. *et al.* Nerve growth factor promotes gastric tumorigenesis through aberrant cholinergic signaling. **Cancer cell**, 31, n. 1, p. 21-34, 2017.

HE, W.; HAO, J.; DONG, S.; GAO, Y. *et al.* Naturally activated V gamma 4 gamma delta T cells play a protective role in tumor immunity through expression of eomesodermin. **J Immunol**, 185, n. 1, p. 126-133, Jul 1 2010.

HEISTEIN, J. B.; ACHARYA, U. Cancer, Malignant Melanoma. *In: StatPearls*. Treasure Island (FL), 2020.

HERRING, B. P.; HOGGATT, A. M.; BURLAK, C.; OFFERMANN, S. Previously differentiated medial vascular smooth muscle cells contribute to neointima formation following vascular injury. **Vasc Cell**, 6, p. 21, 2014.

HIBI, T.; MORI, T.; FUKUMA, M.; YAMAZAKI, K. *et al.* Synuclein- γ is closely involved in perineural invasion and distant metastasis in mouse models and is a novel prognostic factor in pancreatic cancer. **Clinical Cancer Research**, 15, n. 8, p. 2864-2871, 2009.

HODIS, E.; WATSON, I. R.; KRYUKOV, G. V.; AROLD, S. T. *et al.* A landscape of driver mutations in melanoma. **Cell**, 150, n. 2, p. 251-263, Jul 20 2012.

HUANG, D.; SU, S.; CUI, X.; SHEN, X. *et al.* Nerve fibers in breast cancer tissues indicate aggressive tumor progression. **Medicine (Baltimore)**, 93, n. 27, p. e172, Dec 2014.

HUNTINGTON, N. D.; VOSSHENRICH, C. A.; DI SANTO, J. P. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. **Nat Rev Immunol**, 7, n. 9, p. 703-714, Sep 2007.

HUSSEIN, M. R.; ELSERS, D. A.; FADEL, S. A.; OMAR, A. E. Immunohistological characterisation of tumour infiltrating lymphocytes in melanocytic skin lesions. **J Clin Pathol**, 59, n. 3, p. 316-324, Mar 2006.

JANEWAY JR, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. Principles of innate and adaptive immunity. *In: Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition:* Garland Science, 2001a.

JANEWAY JR, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. Structural variation in immunoglobulin constant regions. *In: Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition:* Garland Science, 2001b.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. **Nat Rev Neurosci**, 6, n. 9, p. 671-682, Sep 2005.

JESSEN, K. R.; MIRSKY, R.; LLOYD, A. C. Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 7, n. 7, p. a020487, May 8 2015.

JONES, D. T. W.; BANITO, A.; GRUNEWALD, T. G. P.; HABER, M. *et al.* Molecular characteristics and therapeutic vulnerabilities across paediatric solid tumours. **Nat Rev Cancer**, 19, n. 8, p. 420-438, Aug 2019.

KAPLAN, R. N.; RIBA, R. D.; ZACHAROULIS, S.; BRAMLEY, A. H. *et al.* VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. **Nature**, 438, n. 7069, p. 820-827, Dec 8 2005.

KAUKUA, N.; SHAHIDI, M. K.; KONSTANTINIDOU, C.; DYACHUK, V. *et al.* Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. **Nature**, 513, n. 7519, p. 551-554, Sep 25 2014.

KIDD, G. J.; OHNO, N.; TRAPP, B. D. Biology of Schwann cells. **Handb Clin Neurol**, 115, p. 55-79, 2013.

KOBAYASHI, N.; HIRAOKA, N.; YAMAGAMI, W.; OJIMA, H. *et al.* FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. **Clin Cancer Res**, 13, n. 3, p. 902-911, Feb 1 2007.

KORETZKY, G. A. Multiple roles of CD4 and CD8 in T cell activation. **The journal of immunology**, 185, n. 5, p. 2643-2644, 2010.

KRAUTHAMMER, M.; KONG, Y.; HA, B. H.; EVANS, P. *et al.* Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. **Nat Genet**, 44, n. 9, p. 1006-1014, Sep 2012.

LACONI, E. The evolving concept of tumor microenvironments. **Bioessays**, 29, n. 8, p. 738-744, Aug 2007.

LANCASTER, H. Some geographical aspects of the mortality from melanoma in Europeans. **Medical Journal of Australia**, 1, n. 26, p. 1082-1087, 1956.

LAVERDET, B.; DANIGO, A.; GIRARD, D.; MAGY, L. *et al.* Skin innervation: important roles during normal and pathological cutaneous repair. **Histol Histopathol**, 30, n. 8, p. 875-892, Aug 2015.

LECLERC, M.; VOILIN, E.; GROS, G.; CORGNAC, S. *et al.* Regulation of antitumour CD8 T-cell immunity and checkpoint blockade immunotherapy by Neuropilin-1. **Nat Commun**, 10, n. 1, p. 3345, Jul 26 2019.

LEONARDI, G. C.; FALZONE, L.; SALEMI, R.; ZANGHÌ, A. *et al.* Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy. **International journal of oncology**, 52, n. 4, p. 1071-1080, 2018.

LEWIS, T. The blood vessels of the human skin. **British medical journal**, 2, n. 3418, p. 61, 1926.

LIEBIG, C.; AYALA, G.; WILKS, J.; VERSTOVSEK, G. *et al.* Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. **Journal of clinical oncology**, 27, n. 31, p. 5131, 2009.

LIN, J. Y.; FISHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, 445, n. 7130, p. 843-850, Feb 22 2007.

LINDSAY, T. H.; HALVORSON, K. G.; PETERS, C. M.; GHILARDI, J. R. *et al.* A quantitative analysis of the sensory and sympathetic innervation of the mouse pancreas. **Neuroscience**, 137, n. 4, p. 1417-1426, 2006.

LINOS, E.; SWETTER, S. M.; COCKBURN, M. G.; COLDITZ, G. A. *et al.* Increasing burden of melanoma in the United States. **J Invest Dermatol**, 129, n. 7, p. 1666-1674, Jul 2009.

LUTGENDORF, S. K.; DEGEEST, K.; SUNG, C. Y.; AREVALO, J. M. *et al.* Depression, social support, and beta-adrenergic transcription control in human ovarian cancer. **Brain Behav Immun**, 23, n. 2, p. 176-183, Feb 2009.

MACCALLI, C.; GIANNARELLI, D.; CAPOCEFALO, F.; PILLA, L. *et al.* Immunological markers and clinical outcome of advanced melanoma patients receiving ipilimumab plus fotemustine in the NIBIT-M1 study. **Oncoimmunology**, 5, n. 2, p. e1071007, Feb 2016.

MACINTYRE, L.; BAIRD, M. Pressure garments for use in the treatment of hypertrophic scars—a review of the problems associated with their use. **Burns**, 32, n. 1, p. 10-15, 2006.

MACK, T. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. **N Engl J Med**, 341, n. 10, p. 766; author reply 766-767, Sep 2 1999.

MACKIE, R. M.; ENGLISH, J.; AITCHISON, T. C.; FITZSIMONS, C. P. *et al.* The number and distribution of benign pigmented moles (melanocytic naevi) in a healthy British population. **Br J Dermatol**, 113, n. 2, p. 167-174, Aug 1985.

MAGNON, C.; HALL, S. J.; LIN, J.; XUE, X. *et al.* Autonomic nerve development contributes to prostate cancer progression. **Science**, 341, n. 6142, p. 1236361, Jul 12 2013.

MALEY, C. C.; AKTIPIS, A.; GRAHAM, T. A.; SOTTORIVA, A. *et al.* Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms. **Nat Rev Cancer**, 17, n. 10, p. 605-619, Oct 2017.

MARTIN-OROZCO, N.; MURANSKI, P.; CHUNG, Y.; YANG, X. O. *et al.* T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. **Immunity**, 31, n. 5, p. 787-798, Nov 20 2009.

MCALLISTER, S. S.; GIFFORD, A. M.; GREINER, A. L.; KELLEHER, S. P. *et al.* Systemic endocrine instigation of indolent tumor growth requires osteopontin. **Cell**, 133, n. 6, p. 994-1005, Jun 13 2008.

MIKA, J.; ZYCHOWSKA, M.; POPIOLEK-BARCZYK, K.; ROJEWSKA, E. *et al.* Importance of glial activation in neuropathic pain. **Eur J Pharmacol**, 716, n. 1-3, p. 106-119, Sep 15 2013.

MITTAL, D.; GUBIN, M. M.; SCHREIBER, R. D.; SMYTH, M. J. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. **Curr Opin Immunol**, 27, p. 16-25, Apr 2014.

MORETTI, S.; MASSI, D.; FARINI, V.; BARONI, G. *et al.* beta-adrenoceptors are upregulated in human melanoma and their activation releases pro-tumorigenic cytokines and metalloproteases in melanoma cell lines. **Lab Invest**, 93, n. 3, p. 279-290, Mar 2013.

MURANSKI, P.; BONI, A.; ANTONY, P. A.; CASSARD, L. *et al.* Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. **Blood**, 112, n. 2, p. 362-373, Jul 15 2008.

NELSON, H.; NELSON, J. Sunlight as a cause of melanoma: a clinical survey. **Medical Journal of Australia**, 1, n. 14, p. 452-456, 1957.

NIKOLAKOPOULOU, A. M.; MONTAGNE, A.; KISLER, K.; DAI, Z. *et al.* Pericyte loss leads to circulatory failure and pleiotrophin depletion causing neuron loss. **Nat Neurosci**, 22, n. 7, p. 1089-1098, Jul 2019.

NISHIMURA, K.; SEMBA, S.; AOYAGI, K.; SASAKI, H. *et al.* Mesenchymal stem cells provide an advantageous tumor microenvironment for the restoration of cancer stem cells. **Pathobiology**, 79, n. 6, p. 290-306, 2012.

NOLANO, M.; PROVITERA, V.; CAPORASO, G.; STANCANELLI, A. *et al.* Cutaneous innervation of the human face as assessed by skin biopsy. **Journal of anatomy**, 222, n. 2, p. 161-169, 2013.

NOONAN, F. P.; ZAIDI, M. R.; WOLNICKA-GLUBISZ, A.; ANVER, M. R. *et al.* Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. **Nature communications**, 3, n. 1, p. 1-10, 2012.

NOWELL, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, 194, n. 4260, p. 23-28, 1976.

OKOYE, I. S.; WILSON, M. S. CD4+ T helper 2 cells--microbial triggers, differentiation requirements and effector functions. **Immunology**, 134, n. 4, p. 368-377, Dec 2011.

OLSEN, C. M.; NEALE, R. E.; GREEN, A. C.; WEBB, P. M. *et al.* Independent validation of six melanoma risk prediction models. **J Invest Dermatol**, 135, n. 5, p. 1377-1384, May 2015.

OTT, P. A. Intralesional Cancer Immunotherapies. **Hematol Oncol Clin North Am**, 33, n. 2, p. 249-260, Apr 2019.

PAGET, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. **Cancer Metastasis Rev**, 8, n. 2, p. 98-101, Aug 1989.

PANDYA, P. H.; MURRAY, M. E.; POLLOK, K. E.; RENBARGER, J. L. The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches. **J Immunol Res**, 2016, p. 4273943, 2016.

PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nat Rev Cancer**, 12, n. 4, p. 252-264, Mar 22 2012.

PARFEJEVS, V.; DEBBACHE, J.; SHAKHOVA, O.; SCHAEFER, S. M. *et al.* Injury-activated glial cells promote wound healing of the adult skin in mice. **Nat Commun**, 9, n. 1, p. 236, Jan 16 2018.

PASSARELLI, A.; MANNAVOLA, F.; STUCCI, L. S.; TUCCI, M. *et al.* Immune system and melanoma biology: a balance between immunosurveillance and immune escape. **Oncotarget**, 8, n. 62, p. 106132-106142, Dec 1 2017.

POLLOCK, P. M.; HARPER, U. L.; HANSEN, K. S.; YUDT, L. M. *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. **Nat Genet**, 33, n. 1, p. 19-20, Jan 2003.

PRAZERES, P.; LEONEL, C.; SILVA, W. N.; ROCHA, B. G. S. *et al.* Ablation of sensory nerves favours melanoma progression. **J Cell Mol Med**, Jul 20 2020.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med**, 19, n. 11, p. 1423-1437, Nov 2013.

RENZ, B. W.; TAKAHASHI, R.; TANAKA, T.; MACCHINI, M. *et al.* β 2 adrenergic-neurotrophin feedforward loop promotes pancreatic cancer. **Cancer cell**, 33, n. 1, p. 75-90. e77, 2018.

RHODES, A. R.; WEINSTOCK, M. A.; FITZPATRICK, T. B.; MIHM, M. C., Jr. *et al.* Risk factors for cutaneous melanoma. A practical method of recognizing predisposed individuals. **JAMA**, 258, n. 21, p. 3146-3154, Dec 4 1987.

RICHARDSON, R. C. Solid tumors. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, 15, n. 3, p. 557-567, May 1985.

RODELLA, U.; NEGRO, S.; SCORZETO, M.; BERGAMIN, E. *et al.* Schwann cells are activated by ATP released from neurons in an in vitro cellular model of Miller Fisher syndrome. **Dis Model Mech**, 10, n. 5, p. 597-603, May 1 2017.

ROGER, E.; MARTEL, S.; BERTRAND-CHAPEL, A.; DEPOLLIER, A. *et al.* Schwann cells support oncogenic potential of pancreatic cancer cells through TGFbeta signaling. **Cell Death Dis**, 10, n. 12, p. 886, Nov 25 2019.

ROOSTERMAN, D.; GOERGE, T.; SCHNEIDER, S. W.; BUNNETT, N. W. *et al.* Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. **Physiological reviews**, 86, n. 4, p. 1309-1379, 2006.

ROSENBERG, S. A.; PACKARD, B. S.; AEBERSOLD, P. M.; SOLOMON, D. *et al.* Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. **N Engl J Med**, 319, n. 25, p. 1676-1680, Dec 22 1988.

RUGGIERO, R. A.; BUSTUOABAD, O. D. The biological sense of cancer: a hypothesis. **Theor Biol Med Model**, 3, p. 43, Dec 15 2006.

SALOMAN, J. L.; ALBERS, K. M.; LI, D.; HARTMAN, D. J. *et al.* Ablation of sensory neurons in a genetic model of pancreatic ductal adenocarcinoma slows initiation and progression of cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 113, n. 11, p. 3078-3083, 2016.

SALVO, E.; TU, N. H.; SCHEFF, N. N.; DUBEYKOVSKAYA, Z. A. *et al.* TNFalpha promotes oral cancer growth, pain, and Schwann cell activation. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 1840, Jan 19 2021.

SCHADENDORF, D.; FISHER, D. E.; GARBE, C.; GERSHENWALD, J. E. *et al.* Melanoma. **Nat Rev Dis Primers**, 1, p. 15003, Apr 23 2015.

SCHAFFER, J. V. Update on melanocytic nevi in children. **Clin Dermatol**, 33, n. 3, p. 368-386, May-Jun 2015.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, 331, n. 6024, p. 1565-1570, Mar 25 2011.

SEIDL, A. H. Regulation of conduction time along axons. **Neuroscience**, 276, p. 126-134, Sep 12 2014.

SENA, I. F. G.; ROCHA, B. G. S.; PICOLI, C. C.; SANTOS, G. S. P. *et al.* C(3)1-TAg in C57BL/6 J background as a model to study mammary tumor development. **Histochem Cell Biol**, May 18 2021.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nat Rev Cancer**, 16, n. 6, p. 345-358, Jun 2016.

SHAO, J. X.; WANG, B.; YAO, Y. N.; PAN, Z. J. *et al.* Autonomic nervous infiltration positively correlates with pathological risk grading and poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. **Thorac Cancer**, 7, n. 5, p. 588-598, Sep 2016.

SHURIN, G. V.; KRUGLOV, O.; DING, F.; LIN, Y. *et al.* Melanoma-Induced Reprogramming of Schwann Cell Signaling Aids Tumor Growth. **Cancer Res**, 79, n. 10, p. 2736-2747, May 15 2019.

SIEMIONOW, M. Z.; GHARB, B. B.; RAMPAZZO, A. The face as a sensory organ. **The Know-How of Face Transplantation**, p. 11-23, 2011.

SILVA, W. N.; LEONEL, C.; PRAZERES, P.; SENA, I. F. G. *et al.* Role of Schwann cells in cutaneous wound healing. **Wound Repair Regen**, 26, n. 5, p. 392-397, Sep 2018.

SPEECKAERT, R.; VAN GEEL, N.; VERMAELEN, K. V.; LAMBERT, J. *et al.* Immune reactions in benign and malignant melanocytic lesions: lessons for immunotherapy. **Pigment Cell Melanoma Res**, 24, n. 2, p. 334-344, Apr 2011.

SPENCER, J. M.; AMONETTE, R. Tanning beds and skin cancer: artificial sun + old sol = real risk. **Clin Dermatol**, 16, n. 4, p. 487-501, Jul-Aug 1998.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin**, 71, n. 3, p. 209-249, May 2021.

TABATAI, M.; BOOTH, A. M.; DE GROAT, W. C. Morphological and electrophysiological properties of pelvic ganglion cells in the rat. **Brain Res**, 382, n. 1, p. 61-70, Sep 10 1986.

TARHINI, A.; ATZINGER, C.; GUPTE-SINGH, K.; JOHNSON, C. *et al.* Treatment patterns and outcomes for patients with unresectable stage III and metastatic melanoma in the USA. **J Comp Eff Res**, 8, n. 7, p. 461-473, May 2019.

TASDOGAN, A.; FAUBERT, B.; RAMESH, V.; UBELLACKER, J. M. *et al.* Metabolic heterogeneity confers differences in melanoma metastatic potential. **Nature**, 577, n. 7788, p. 115-120, Jan 2020.

TAYLOR, H. B.; NORRIS, H. J. Epithelial invasion of nerves in benign diseases of the breast. **Cancer**, 20, n. 12, p. 2245-2249, Dec 1967.

TOFARIS, G. K.; PATTERSON, P. H.; JESSEN, K. R.; MIRSKY, R. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. **J Neurosci**, 22, n. 15, p. 6696-6703, Aug 1 2002.

VESELY, M. D.; KERSHAW, M. H.; SCHREIBER, R. D.; SMYTH, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. **Annu Rev Immunol**, 29, p. 235-271, 2011.

WALDMAN, A. D.; FRITZ, J. M.; LENARDO, M. J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. **Nat Rev Immunol**, 20, n. 11, p. 651-668, Nov 2020.

WANG, H.; ZHENG, Q.; LU, Z.; WANG, L. *et al.* Role of the nervous system in cancers: a review. **Cell Death Discov**, 7, n. 1, p. 76, Apr 12 2021.

WANG, X. W.; WANG, J. X. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. **Fish Shellfish Immunol**, 34, n. 4, p. 981-989, Apr 2013.

WANG, Y.; ZHANG, B.; ZHANG, X.; WANG, X. *et al.* Detection and Identification of Hematologic Malignancies and Solid Tumors by an Electrochemical Technique. **PLoS One**, 11, n. 4, p. e0153821, 2016.

WANJARE, M.; KUSUMA, S.; GERECHE, S. Perivascular cells in blood vessel regeneration. **Biotechnol J**, 8, n. 4, p. 434-447, Apr 2013.

WATSON, M.; GELLER, A. C.; TUCKER, M. A.; GUY JR, G. P. *et al.* Melanoma burden and recent trends among non-Hispanic whites aged 15–49 years, United States. **Preventive medicine**, 91, p. 294-298, 2016.

WAXENBAUM, J. A.; REDDY, V.; VARACALLO, M. Anatomy, Autonomic Nervous System. *In: StatPearls*. Treasure Island (FL), 2021.

WEIR, H. K.; MARRETT, L. D.; COKKINIDES, V.; BARNHOLTZ-SLOAN, J. *et al.* Melanoma in adolescents and young adults (ages 15–39 years): United States, 1999–2006. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 65, n. 5, p. S38. e31-S38. e13, 2011.

WHITEMAN, D. C.; GREEN, A. C.; OLSEN, C. M. The growing burden of invasive melanoma: projections of incidence rates and numbers of new cases in six susceptible populations through 2031. **Journal of Investigative Dermatology**, 136, n. 6, p. 1161-1171, 2016.

WHITEMAN, D. C.; GREEN, A. C.; OLSEN, C. M. The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. **J Invest Dermatol**, 136, n. 6, p. 1161-1171, Jun 2016.

WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, 27, n. 45, p. 5904-5912, Oct 6 2008.

YAMAZAKI, S.; EMA, H.; KARLSSON, G.; YAMAGUCHI, T. *et al.* Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. **Cell**, 147, n. 5, p. 1146-1158, Nov 23 2011.

YANG, D. P.; ZHANG, D. P.; MAK, K. S.; BONDER, D. E. *et al.* Schwann cell proliferation during Wallerian degeneration is not necessary for regeneration and remyelination of the peripheral nerves: axon-dependent removal of newly generated Schwann cells by apoptosis. **Mol Cell Neurosci**, 38, n. 1, p. 80-88, May 2008.

ZAHALKA, A. H.; ARNAL-ESTAPE, A.; MARYANOVICH, M.; NAKAHARA, F. *et al.* Adrenergic nerves activate an angio-metabolic switch in prostate cancer. **Science**, 358, n. 6361, p. 321-326, Oct 20 2017.

ZAHALKA, A. H.; FRENETTE, P. S. Nerves in cancer. **Nat Rev Cancer**, 20, n. 3, p. 143-157, Mar 2020.

ZHANG, S. H.; SHURIN, G. V.; KHOSRAVI, H.; KAZI, R. *et al.* Immunomodulation by Schwann cells in disease. **Cancer Immunol Immunother**, 69, n. 2, p. 245-253, Feb 2020.

ZHAO, C. M.; HAYAKAWA, Y.; KODAMA, Y.; MUTHUPALANI, S. *et al.* Denervation suppresses gastric tumorigenesis. **Sci Transl Med**, 6, n. 250, p. 250ra115, Aug 20 2014.

ZU HÖRSTE, G. M.; HU, W.; HARTUNG, H.-P.; LEHMANN, H. *et al.* The immunocompetence of Schwann cells. **Muscle & nerve**, 37, n. 1, p. 3-13, 2008.

11. APÊNDICE

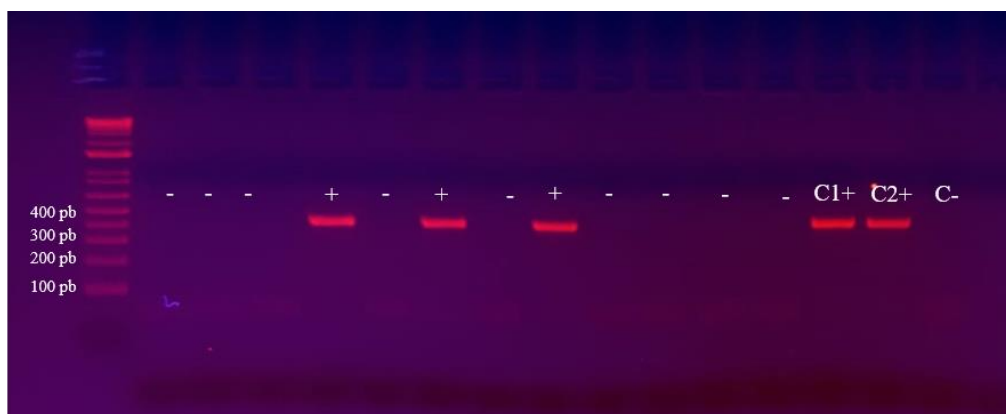
11.1 Protocolo para genotipagem do gene da Cre.

Protocol Primers

PRIMER	5' LABEL	SEQUENCE 5' → 3'	3' LABEL	PRIMER TYPE	REACTION	NOTE
oIMR1084		GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC		Transgene Forward	A	Cre F
oIMR1085		GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT		Transgene Reverse	A	Cre R
oIMR7338		CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT		Internal Positive Control Forward	A	
oIMR7339		GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C		Internal Positive Control Reverse	A	

Cycling

STEP	TEMP °C	TIME	NOTE
1	94.0	--	
2	94.0	--	
3	65.0	--	-0.5 C per cycle decrease
4	68.0	--	
5		--	repeat steps 2-4 for 10 cycles (Touchdown)
6	94.0	--	
7	60.0	--	
8	72.0	--	
9		--	repeat steps 6-8 for 28 cycles
10	72.0	--	
11	10.0	--	hold



11.1 Aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "PAPEL DAS CÉLULAS DE SCHWANN NA PROGRESSÃO DO MELANOMA MURINO EXPERIMENTAL", protocolo do CEUA: 216/2020 sob a responsabilidade de Alexander Birbrair que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 07/12/2020.

Vigência da Autorização	07/12/2020 a 06/12/2025
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / C57BL/6-PLP1-creER-:Tomato+:iDTR+
Nº de animais	3
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério do departamento de Patologia Gerral - F3 sala 313
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / C57BL/6-PLP1-creER+:Tomato:iDTR+
Nº de animais	3
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério do departamento de Patologia Gerral - F3 sala 313
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / C57BL/6-PLP1-creER
Nº de animais	3
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério do departamento de Patologia Gerral - F3 sala 313
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / C57BL/6 - LSL-TdTomato (+/+)
Nº de animais	3
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do departamento de Patologia Gerral - F3 sala 313
*Espécie/linhagem	Camundongo transgênico / C57BL/6 - LSL-iDTR(+/+)
Nº de animais	3
Peso/Idade	25g / 8(semanas)

12. ANEXOS

12.1 Tabela1: Anticorpos utilizados na análise de citometria de fluxo

Antigen	Fluorochrome	Clone	Company
CD3	eFluor450	145-2C11	ThermoFisher
CD8a	eFluor 450	53-6.7	ThermoFisher
CD11c	eFluor 450	N418	ThermoFisher
LIVE/DEAD	Acqua		ThermoFisher
Streptavidin	Pacific Orange		ThermoFisher
CD45	Super Bright 600	30-F11	ThermoFisher
TCR gamma/delta	Super Bright 645	eBioGL3	ThermoFisher
CD4	Alexa Fluor 488	GK1.5	ThermoFisher
F4/80	FITC	BM8	Hycult
NK1.1	PE-eFluor 610	PK136	ThermoFisher
CD8a	PerCP-Cyanine5.5	53-6.7	ThermoFisher
Ly-6G	PerCP-eFluor 710	1A8-Ly6g	ThermoFisher
IL-17A	PerCP-Cyanine5.5	eBio17B7	ThermoFisher
CTLA-4	PE-Cyanine7	UC10-4B9	ThermoFisher
FoxP3	Alexa Fluor 647	3G3	ThermoFisher
CD3e	Cyanine5	500A2	ThermoFisher
Ki67	AlexaFluor 700	SolA15	ThermoFisher
PD-1	APC-eFluor 780	J43	ThermoFisher
Ly-6C	APC-eFluor 780	HK1.4	ThermoFisher
IFN- γ	APC-eFluor 780	XMG1.2	ThermoFisher
CD11b	Biotin	M1/70	Biologend