

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
PATOLOGIA BÁSICA E EXPERIMENTAL

TAUANA CHRISTINA DIAS

**ANÁLISE DO PERFIL DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS OBTIDOS DE
CAMUNDONGOS COM TUMORES DE MAMA INDUZIDOS POR CÉLULAS
4T1 SUBMETIDOS À IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS**

UBERABA-MG
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
PATOLOGIA BÁSICA E EXPERIMENTAL

TAUANA CHRISTINA DIAS

**ANÁLISE DO PERFIL DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS OBTIDOS DE
CAMUNDONGOS COM TUMORES DE MAMA INDUZIDOS POR CÉLULAS
4T1 SUBMETIDOS À IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, área de concentração Patologia Básica e Experimental, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Antoniazi
Michelin (ICBN/UFTM)

Co-orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando
Cândido (ICS/UFTM)

UBERABA-MG
2017

TAUANA CHRISTINA DIAS

**ANÁLISE DO PERFIL DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS OBTIDOS DE
CAMUNDONGOS COM TUMORES DE MAMA INDUZIDOS POR CÉLULAS
4T1 SUBMETIDOS À IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, área de concentração Patologia Básica e Experimental como requisito para obtenção do Título de Mestre sob orientação da Prof^a. Dr^a. Márcia Antoniazi Michelin. Co-orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta.

Dissertação aprovada em: 25 de agosto de 2017

BANCA EXAMINADORA

Professora Orientadora Prof^a. Dr^a. Márcia Antoniazi Michelin
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof^a. Dr^a. Marlene Antônia dos Reis
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof^a. Dr^a Livia Ferreira Oliveira
Universidade Federal de Uberlândia

UBERABA-MG
2017

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

D536a Dias, Tauana Christina
Análise do perfil de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos com tumores de mama induzidos por células 4T1 submetidos à imunoterapia com células dendríticas / Tauana Christina Dias. -- 2017.
66 f. : il., fig., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017
Orientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazzi Michelin
Coorientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta

1. Neoplasias da mama. 2. Células dendríticas. 3. Macrófagos. 4. Imunoterapia. I. Michelin, Márcia Antoniazzi. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 618.19-006

DEDICATÓRIA

Primeiramente dedico este trabalho a Deus e a Nossa Senhora, que através da força e do amor infinito, durante todos os obstáculos da caminhada na vida acadêmica me deram força e perseverança para perseverar.

Aos meus pais João Dias Neto e Divina Maria de Jesus Dias que me apoiaram nessa caminhada, me deram força pra continuar e acreditaram que essa etapa seria importante para minha capacitação profissional, sem vocês nada teria conseguido, vocês são a melhor parte de mim e obrigada por todo amor infinito.

Ao meu namorado e futuro noivo Raphael, meu amor que me apoiou em tudo, em todos os dias que tive que me dedicar e focar na vida acadêmica, e que sempre me deu forças para não desistir, esse trabalho também é fruto da sua dedicação e do seu apoio para comigo.

As minha Orientadora Prof.^a Dr.^a Márcia Antoniazzi Michelin que abriu as portas do Instituto de Pesquisa em Oncologia – IPON, desde a iniciação Científica na graduação, que me mostrou e ensinou os caminhos da ciência e da pesquisa e também da amizade e do companheirismo, você me formou como mestre e também como um ser humano melhor, meu muito obrigada, professora.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu co-orientador Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta, que sempre esteve pronto a me ajudar e orientar quando precisei do seu auxílio e sua experiência.

Agradeço a minha Irmã Taynara Dias, pela força e apoio, pelo tempo que gastou para me ajudar, e por sua disposição.

Agradeço também, à minha família: tios, primos e padrinhos (Pe. Rogério, Maria do Livramento e Maria Luiza) amo vocês.

Agradeço imensamente a todos do Ipon que de algum modo me ajudaram e me apoiaram com suas experiências: Andjara, Alessandra, André, Chamberttan, Carolina, Cláudio, Douglas, Eduardo, George, Larissa, Leticia, Luan, Luciana, Millena, Mara, Renata, Saulo e Thiago.

Agradeço também às queridas Ângela, Jéssica e Polyana, que muito me auxiliaram e ensinaram durante todo o meu período de mestrado, mais que a vida acadêmica, me ensinaram a ver a vida com um olhar melhor. Obrigada por me adotarem como “pupila”.

À minha família Uberabense: Anna Carolina, Caroline Donini, Maria Paula, Giulliane Miranda. Obrigada por sempre se preocuparem e cuidarem de mim, com vocês caminhar foi mais fácil.

Às minhas amadas Lamonise, Karen, Vanessa e Brenda. Obrigada por todas as orações minhas queridas; e aos meus irmãos de coração, Leopoldo, Vitor e Pedro, obrigada por me apoiarem.

Aos meus amados Filhos de Clara e Maanaim, obrigada por todos esses anos de apoio e por acreditarem e confiarem tanto em mim. Só consegui chegar até aqui porque acreditei na fé que cada um de vocês me passou no olhar, no abraço, no colo. Meu muito obrigada.

A todos os funcionários do serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Ambulatório Maria da Glória, e da Disciplina de Imunologia, que direta, que de algum modo contribuíram para o desenvolvimento da minha dissertação.

Aos secretários do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Tuania e André.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), agradeço os recursos financeiros destinados ao desenvolvimento desta pesquisa.

Ó Mestre, Fazei que eu procure mais
Consolar, que ser consolado;
Compreender, que ser compreendido;
Amar, que ser amado.
Pois é dando que se recebe,
é perdoando que se é perdoado,
e é morrendo que se vive para a vida eterna.

São Francisco de Assis

RESUMO

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) traz o câncer de mama como sendo o tipo de neoplasia que será o mais incidente entre as mulheres para o biênio de 2016-2017. O sistema imune possui uma importante capacidade em eliminar células neoplásicas enunciado como a vigilância imunológica, consiste em utilizar os mecanismos da imunidade inata e da imunidade adquirida. Através das células dendríticas juntamente com os macrófagos e monócitos configuram a primeira linha de defesa do organismo. Diante do seu importante papel frente aos tumores, as células dendríticas vêm sendo alvo importante nas pesquisas em imunoterapias. Os macrófagos por sua vez, importantes na vigilância imunológica, porém pouco estudados nas imunoterapias do câncer, são classificados em macrófagos do perfil M1, que podem expressar citocinas de combate ao tumor e os macrófagos do perfil M2 podem expressar algumas citocinas favoráveis ao tumor. Nesse sentido, o presente trabalho propõe analisar o lavado peritoneal de camundongos BALB/c, induzidos ao câncer de mama por células 4T1 e tratados com a vacina de células dendríticas. Foram utilizados 70 camundongos BALB/c, sendo 60 fêmeas e 10 de ambos os gêneros para extração de medula e confecção da vacina de células dendríticas, os animais foram divididos em quatro grupos com um n de 15 por grupo, foram os grupos, controle em que não recebeu nenhum tipo de tratamento, grupo tratado com vacina de células dendríticas, porém sem inoculação de tumor, grupo tumor em que os animais receberam a inoculação da linhagem tumoral 4T1, porém não receberam o tratamento com a vacina de células dendríticas e o grupo tumor tratado em que os animais receberam a inoculação das células de linhagem tumoral 4T1 e posterior tratamento com a vacina de células dendríticas. O lavado peritoneal foi analisado por citometria de fluxo através de marcação CD14 extracelular e intracelular para as citocinas IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-4 e IL-17 e os fatores de transcrição, FOXP3, GATA3, ROR γ T e Tbet. Posteriormente foi desenvolvida a cultura do sobrenadante dos macrófagos peritoneais e mensurada a concentração das citocinas IL-10, IFN- γ , IL-12 e IL-14 pela técnica de ELISA. Os resultados demonstraram que a vacina de célula dendríticas foi capaz de modular o sistema imune desenvolvendo uma resposta antitumoral e de combate ao tumor, com a diminuição da concentração das citocinas pró inflamatórias (IL-12, IL-17, IFN-

γ , TNF α), e de citocinas anti-inflamatórias e pró tumorais (IL-10, IL-4, TGF- β), também se verificou a expressão dos fatores de transcrição podem ser expressos nos macrófagos em todos os grupos experimentais, e possuem a menor expressão no grupo tumor tratado, quando comparado com o grupo tumor. Conclui-se que a vacina de células dendríticas direciona o sistema imune ao combate ao câncer, o qual demonstra uma diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias, diminuindo sistemicamente a inflamação crônica e citocinas pró-tumorais, demonstrando a efetividade e a ação da imunoterapia com células dendríticas.

Palavras-chave: Células Dendríticas, Imunoterapia, Macrófagos, Câncer de Mama, 4T1.

ABSTRACT

The National Cancer Institute (INCA) brings breast cancer as the type of neoplasm that will be the most incident among women for the 2016-2017 biennium. The immune system has an important ability to eliminate neoplastic cells enunciated as immune surveillance, is to use the mechanisms of innate immunity and acquired immunity. Through the dendritic cells along with the macrophages and monocytes they form the first line of defense of the organism. In view of their important role in the face of tumors, dendritic cells have been an important target in immunotherapies research. Macrophages, important in immune surveillance but poorly studied in cancer immunotherapies, are classified into macrophages of the M1 profile, which may express tumor-fighting cytokines and macrophages of the M2 profile may express some tumor-favoring cytokines. In this sense, the present work proposes to analyze the peritoneal lavage of BALB / C mice, induced to breast cancer by 4T1 cells and treated with the dendritic cell vaccine. We used 70 BALB / c mice, 60 females and 10 of both genera for spinal cord extraction and dendritic cell vaccine preparation, the animals were divided into four groups with a n of 15 per group; who received no type of treatment, a group treated with dendritic cell vaccine, but without tumor inoculation, a tumor group in which the animals received the inoculation of the 4T1 tumor line, but did not receive treatment with the dendritic cell vaccine and the group treated tumor in which the animals received the inoculation of 4T1 tumor cell lines and subsequent treatment with the dendritic cell vaccine. The peritoneal lavage was analyzed by flow cytometry through extracellular and intracellular CD14 labeling for IL-10, IL-12, IFN-gamma, TNF-alpha, TGF-beta, IL-4 and IL-17 cytokines and the transcription, FOXP3, GATA3, ROR-gamma T and Tbet. Subsequently, culture of the supernatant of the peritoneal macrophages was performed and the concentration of IL-10, IFN- γ , IL-12 and IL-14 cytokines was measured by the ELISA technique. The results demonstrated that the dendritic cell vaccine was able to modulate the immune system by developing an antitumor and tumor-fighting response with a decrease in the concentration of pro-inflammatory cytokines (IL-12, IL-17, IFN-gamma, TNF-alpha) and anti-inflammatory and pro-tumor cytokines (IL-10, IL-4, TGF-beta), the expression of transcription factors can also be expressed in macrophages in all

experimental groups, and have the lowest expression in the treated tumor group, when compared to the tumor group. It is concluded that the dendritic cell vaccine directs the immune system to combat cancer, which demonstrates a decrease in the expression of pro-inflammatory cytokines, systematically decreasing chronic inflammation and pro-tumor cytokines, demonstrating the effectiveness and action of immunotherapy with dendritic cells.

Keywords: Dendritic Cells, Immunotherapy, Macrophages, Breast Cancer, 4T1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Padrões Celulares de Célula T e citocinas.....	24
Figura 2-	Efeitos imunoterapias nos macrófagos do microambiente tumor.....	29
Figura 3-	Delineamento dos procedimentos e do andamento do experimento conforme descrito no texto.....	35
Figura 4-	Crescimento tumoral mensurado na média de 4 dias. Representação do volume tumoral.....	42
Figura 5-	Concentração de IFN γ em sobrenadante da cultura de macrófagos, após 24 horas de estimulação com lipopolisacarideo (LPS).....	43
Figura 6-	Concentração de TGF β em sobrenadante da cultura de macrófagos, após 24 horas de estimulação com lipopolisacarideo (LPS).....	44
Figura 7-	Concentração de IL-4 em sobrenadante da cultura de macrófagos, após 24 horas de estimulação com lipopolisacarideo (LPS).....	44
Figura 8-	Concentração de IL-10 em sobrenadante da cultura de macrófagos, após 24 horas de estimulação com lipopolisacarideo (LPS).....	45
Figura 9-	Concentração de IL-12 em sobrenadante da cultura de macrófagos, após 24 horas de estimulação com lipopolisacarideo (LPS).....	46
Figura 10-	Marcação de Macrófagos (CD14) obtidos do lavado peritoneal de camundongos Balb/C.....	47
Figura 11-	Marcação de Macrófagos (CD14) extracelular e (IL-12) intracelular obtidos do lavado peritoneal de camundongos Balb/C.....	48
Figura 12-	Marcação de Macrófagos (CD14) extracelular e (IL-10) intracelular obtidos do lavado peritoneal de camundongos Balb/C.....	49
Figura 13-	Marcação de Macrófagos (CD14) extracelular e (TNF α) intracelular obtidos do lavado peritoneal de camundongos Balb/C.....	49
Figura 14-	Marcação de Macrófagos (CD14) extracelular e (IFN γ) intracelular obtidos do lavado peritoneal de camundongos Balb/C.....	50
Figura 15-	Marcação de Macrófagos (CD14) extracelular e (IL-17) intracelular obtidos do lavado peritoneal de camundongos Balb/C.....	51
Figura 16-	Marcação de Macrófagos (CD14) extracelular e (Tbet) intracelular obtidos do lavado peritoneal de camundongos Balb/C.....	52

Figura 17-	Marcação de Macrófagos (CD14) extracelular e (Tbet) intracelular obtidos do lavado peritoneal de camundongos Balb/C.....	53
Figura 18-	Marcação de Macrófagos (CD14) extracelular e (FOXP3) intracelular obtidos do lavado peritoneal de camundongos Balb/C.....	54
Figura 19-	Marcação de Macrófagos (CD14) extracelular e (GATA3) intracelular obtidos do lavado peritoneal de camundongos Balb/C.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Grupos experimentais de acordo com a administração de 4T1 e do tratamento a ser realizado.....	25
------------------	--	----

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µL	Microlitro
4T1	<i>Cell line selected from the 410.4 tumor</i>
APC	<i>Allophycocyanin</i>
APCs	Células apresentadoras de antígenos
BCRA1	<i>Breast Cancer Type 1</i>
BCRA2	<i>Breast Cancer Type 2</i>
CD	Células dendríticas
CD 4	Cluster of Differentiation 4
CD 8	Cluster of Differentiation 8
CD 14	Cluster of Differentiation 14
CHP	Complexo de Histocompatibilidade Principal
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
GM-CSF	Fatores Estimuladores de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FITC	<i>Fluorescein Conjugate</i>
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
GATA3	<i>GATA-binding factor 3</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
IFN γ	Interferon Gama
IL	Interleucina
IMDM	<i>Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium</i>
IPON	Instituto de Pesquisa em Oncologia

LPS	Lipopolissacarideo
NK	<i>Natural Killers</i>
ON	Óxido Nítrico
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PerCP	<i>Peridinin chlorophyll protein complex</i>
RE	Receptores de estrógenos
RP	Receptores de progesterona
ROR γ T	<i>RAR-related orphan receptor gamma on thymus</i>
Tbet	<i>T-box expressed in T cells</i>
TCR	Receptores de célula T
TGF β	Fator de transformação do crescimento
Th	T <i>helper</i> ou T auxiliares
TNF	Fator de necrose tumoral alfa
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	O Câncer de mama.....	20
1.2	Modelos experimentais de tumor 4T1.....	21
1.3	Imunidade frente aos tumores.....	21
1.4	Células Dendríticas.....	24
1.5	Macrófagos.....	26
1.6	Fenótipo dos Macrófagos.....	26
2	OBJETIVOS.....	32
2.1	Objetivo Geral.....	32
2.2	Objetivos Específicos.....	32
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1	Animais.....	34
3.2	Delineamento experimental.....	35
3.3.	Indução de tumores com a linhagem 4T1.....	35
3.4	Obtenção da células dendríticas da medula óssea de camundongos.....	35
3.5	Imunoterapia com células dendríticas.....	36
3.6	Análise do tamanho do tumor de mama em função do tempo.....	36
3.7	Obtenção do lavado peritoneal para cultura de células de citometria de fluxo.....	37

3.8	<i>Enzyme Linked Immunosorbente assay (ELISA)</i>	37
3.9	Citometria de fluxo.....	38
3.10	Análise estatística.....	39
4.	RESULTADOS	41
4.1	Análise do crescimento do tumor de mama induzido pelas células 4T1...41	
4.2	Expressão das citocinas IL-4, L-10, IL-12, TGF β E IFN γ do sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais de camundongos.....	42
4.3	Expressão extracelular de CD14 e Intracelular de IL-12 TNF α , IFN γ , IL-10, IL-17, nos macrófagos peritoneais de camundongos.....	46
4.4	Expressão extracelular de CD14 e intracelular de Tbet, ROR γ T, FOXP3 E GATA3 nos macrófagos peritoneais de camundongos.....	51
5.	Discussão.....	54
6.	Conclusão.....	62
	Referências Bibliográficas.....	63

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) realiza de forma bienal a estimativa de novos casos de câncer que irão ser diagnosticados no Brasil, e para o biênio de 2016/2017, as estimativas indicam mais de 600 mil novos casos na população brasileira, desses casos calcula-se que 57.960 novos casos correspondem ao câncer de mama (28,1%), 16.340 corresponde ao câncer de colo de útero (7,9%), e 6.150 corresponde ao câncer e ovário (3,0%), sendo portanto os tumores de origem ginecológica responsáveis por 39% dos casos de câncer previstos para o biênio de 2016/2017 (INCA, 2016).

O diante da importância epidemiológica, se faz necessário entender os mecanismos de desenvolvimento de uma neoplasia, que acontece a partir de uma célula anteriormente normal que por algum motivo intrínseco ou extrínseco realiza uma expansão clonal descontrolada, no entanto uma única mutação raramente levará a formação de um tumor neoplásico, para que aconteça o processo completo de carcinogênese são necessárias de duas a seis modificações no DNA das células, que por sua vez irão interferir nos mecanismos de proliferação, diferenciação e apoptose, que portanto, irão levar ao processo de expansão clonal desenfreada (ONUCCI e CHAMMAS, 2010).

1.1 O CÂNCER DE MAMA

As mamas são estruturas superficiais proeminentes na região anterior da parede torácica, nelas estão presentes as glândulas mamárias, localizadas no tecido subcutâneo anterior aos músculos peitorais. Durante a puberdade, a glândula mamária se desenvolve, sendo ela composta pelos ductos lactíferos formados a partir do brotamento de cada 15 a 20 lóbulos mamários que juntos se abrem na papila mamária. (MOORE, DALLEY e AGUR, 2014).

Estabelecida a neoplasia no tecido mamário, por meio de técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência é possível estabelecer a presença ou ausência de determinados receptores importante no desenvolvimento do tumor e

32 também importantes no estadiamento e na conduta clínica, podendo portanto, ser
33 um tumor que expressa um elevado nível de receptores de estrógenos (RE) ou um
34 tumor de baixo nível de RE com um alto nível de expressão de receptores de
35 progesterona (RP) e ainda podem ser tumores que possuem baixo nível de RP e
36 baixo nível de expressão do oncogene Her2 (TAO et al, 2014; ANDERSON et al,
37 2014).

38 O câncer de mama pode surgir da mutação genética e também epigenética
39 de genes específicos, podem surgir de mutações por exemplo no gene RAB6A que
40 pertence à família RAS de oncogenes, no gene produtor de Fator de Transformação
41 do crescimento (TGF- β), no gene produtor do receptor de TGF- β tipo II e no gene
42 Bcl2. Já em relação às alterações epigenéticas, são consideradas importantes
43 alterações nos genes BRACA1 e BRACA2, nos quais pode acontecer um
44 silenciamento através da hipermetilação do mesmo, elevando o risco de vir a
45 desenvolver o câncer de mama (TAO et al, 2014).

46

47 **1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE TUMOR COM 4T1**

48

49 No início, as pesquisas do câncer de mama em modelos experimentais de
50 camundongos eram estudadas com a indução do tumor a partir de células de câncer
51 da mama da linhagem humana e observou-se que a metástase e o crescimento do
52 microambiente tumoral eram pobres e insuficientes (TAO et al, 2008).

53 Em 1992, Fred Miller desenvolveu um trabalho em que descreve uma
54 linhagem celular tumoral de câncer de mama isoladas dos camundongos da
55 linhagem BALB/c, que foi denominada de 4T1, uma linhagem tumoral de
56 adenocarcinoma triplo negativo de mama, ou seja não possui a marcação para
57 receptor de estrógeno, receptor de progesterona e para o proto-oncogene HER2
58 que também demonstrou um alto poder de metástase para pulmão, fígado, cérebro e
59 demonstrou atingir os últimos estágios do estadiamento tumoral (TAO et al, 2008).

60 A linhagem 4T1 tem o potencial de crescimento em meio de cultura de células
61 e *in vivo* quando inoculadas como tumor primário em camundongos BALB/c,
62 desenvolve uma fisiopatologia semelhante ao que acontece com os humanos, a

63 preferência da inoculação das células se dá via injeção subcutânea na glândula
64 mamaria abdominal dos camundongos, restrito aos camundongos do sexo feminino.
65 É uma linhagem celular de alta performance tumorigênica, que se assemelha muito
66 aos tumores de mama humano, fácil manejo, e grande potencial metastático e
67 frequentemente utilizado em estudos de imunoterapias baseada em células
68 (PULASKI e OSTRANDE-ROSEMBERB, 2001).

69 De um modo considerável, os casos de câncer vêm crescendo cada vez mais
70 na população, se tornando uma das doenças de maior importância e acometimento
71 em um panorama mundial, de modo que se justifica a necessidade do uso de
72 modelos experimentais para o estudo e desenvolvimento de novas terapias e
73 fármacos.

74

75 **1.3 IMUNIDADE FRENTE AOS TUMORES**

76

77 O sistema imunológico possui uma habilidade específica de resposta frente a
78 uma célula tumoral. Essa habilidade foi estabelecida e enunciada como a Vigilância
79 Imunológica ou *immunosurveillance*, como é bem conhecido na literatura científica.
80 Ela é caracterizada como a propriedade que o sistema imunológico tem de identificar
81 e eliminar clones de células que sofreram mutação, controlando o surgimento de
82 uma célula tumoral e o possível desenvolvimento dos tumores (ABBAS et al, 2011;
83 ONUCHIC e CHAMMAS, 2010, SLANEY et al, 2013).

84 A partir dos mecanismos da vigilância imunológica, o sistema imunológico
85 apresenta um papel indispensável para o controle de neoplasias, utilizando tanto dos
86 mecanismos da imunidade inata como os mecanismos da imunidade adaptativa para
87 elaborar uma resposta imune efetiva (RAVAL et al, 2014; MARCUS et al, 2014).
88 Estabelecido o conceito de vigilância imunológica e sua atividade biológica, cada vez
89 mais os mecanismos do sistema imune para manter essa vigilância vêm sendo
90 estudados, inclusive os da imunidade inata, com os mecanismos específicos das
91 células *Natural Killers* (NK), das células fagocitárias (monócitos e macrófagos) e das
92 Células Dendríticas (CD), que também atuam como potente fonte de ligação com a
93 imunidade adaptativa a fim de montar uma resposta específica contra o tumor, de

94 modo que a imunidade inata atua como a primeira linha de defesa diante do
95 surgimento dos tumores (MARCUS et al, 2014; RAVAL et al, 2014; CORRRALES et
96 al, 2016).

97 Ainda dentro da vigilância imunológica, a imunidade adaptativa atua através
98 de mecanismos capazes de realizar uma resposta intensa e expressiva aos agentes
99 agressores, a qual é composta pela imunidade humoral mediada pelos linfócitos B e
100 a imunidade celular mediada pelos linfócitos T e seus subtipos celulares. Os
101 linfócitos T são identificados como os T CD8⁺, conhecidos como citotóxicos, os
102 linfócitos T CD4⁺, conhecidos pelo nome de auxiliares ou *helper*, e os Treg ou
103 regulatórios. Dentro da imunidade frente aos tumores, os linfócitos T CD8⁺ e os T
104 CD4⁺ compõem as principais células que sabidamente possuem uma resposta
105 efetiva contra os tumores (SLANEY et al, 2013; MARCUS et al, 2014; CORRRALES
106 et al, 2016).

107 Para a ativação e posterior ação dos linfócitos T, novamente o sistema imune
108 inato se faz importante através das células apresentadoras de antígenos (APCs). As
109 APCs possuem a habilidade de capturar o antígeno tumoral, processar e apresentar
110 esse antígeno para as células da imunidade adaptativa através do complexo
111 principal de histocompatibilidade (CHP) do tipo I, expresso também em todas as
112 células da resposta imune inata como macrófagos e monócitos. Ademais, as APCs
113 também podem apresentar o antígeno através do CHP do tipo II, expresso
114 especificamente na CD. Assim, as APCs são conhecidas popularmente como as
115 apresentadoras profissionais de antígenos, por possuírem grande habilidade na
116 captura, processamento e apresentação do antígeno através do CHP (SLANEY et
117 al, 2013; FOSTER e SONG, 2014; MARCUS et al, 2014; CORRRALES et al, 2016).

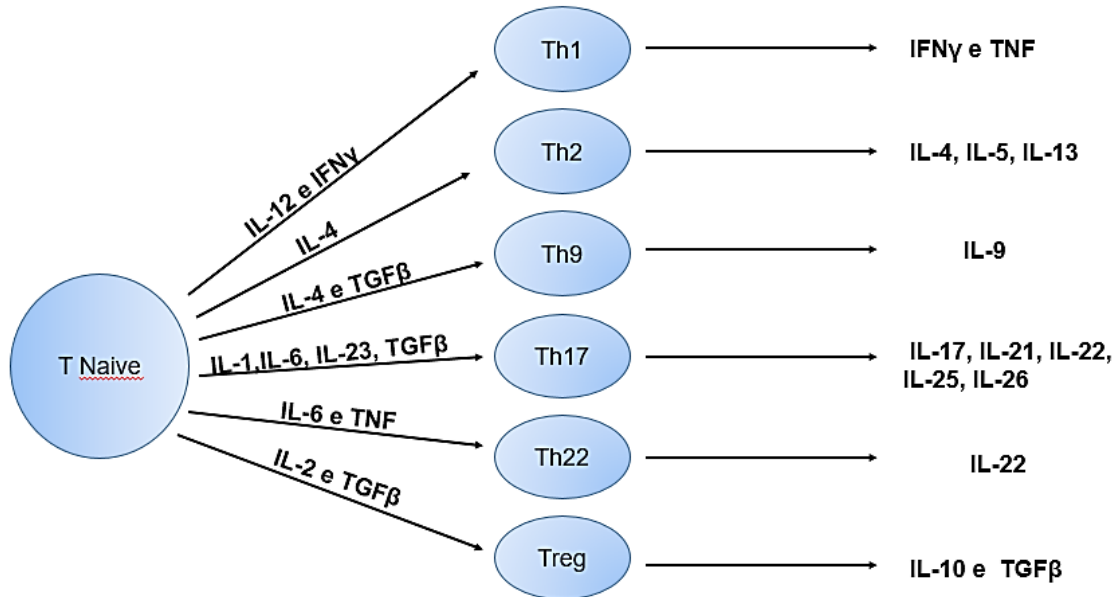
118 Através da apresentação de antígenos via CHP, o linfócito, que até então é
119 considerado um linfócito T virgem ou T *naive*, é ativado através dos receptores de
120 célula T (TCR) e algumas citocinas específicas, que por sua vez ativam vias de
121 sinalização específicas direcionando os linfócitos T auxiliares a se diferenciarem em
122 padrões celulares distintos como Th1, Th2, Th17, Treg e os mais recentes Th22 e
123 Th9 (GOLUBOVSKAYA e WU, 2016).

124

125

126

Figura 1: Padrões Celulares de Célula T e citocinas.



127

128

Fonte: adaptado de GOLUBOVSKAYA, V e WU, L, 2016

129

130 Dentro do microambiente tumoral, algumas células possuem papel
 131 fundamental como as células Treg e os linfócitos Th2, com a expressão de IL-4, IL-5,
 132 IL-13, IL-10 e TGF β , citocinas de características pró tumoral que estimulam a
 133 angiogênese e supressão da resposta imune. Os linfócitos Th1 são importantes na
 134 imunidade contra os tumores a partir da expressão das citocinas IFN γ e TNF α , as
 135 quais irão induzir a destruição de células neoplásicas e a ativação de outras células
 136 da imunidade inata, como os macrófagos, para o combate ao tumor, sendo portanto
 137 as células Th1 possuidoras de um perfil antitumoral (FRIDMAN et al, 2012; PAN,
 138 2012; SMARR et al, 2013; GOLUBOVSKAYA e WU, 2016).

139

140 1.4 CÉLULAS DENDRÍTICAS

141

142

Conhecidas como as apresentadoras de antígenos profissionais de maior importância e maior habilidade, quando comparada às demais APCs, possuem

143 longas projeções da membrana com a habilidade de exercer fagocitose. São
144 provenientes de células da linhagem mielóide da medula óssea que, através de
145 vários eventos moleculares e celulares, se diferencia em célula dendrítica (CD).
146 Possuem a habilidade de capturar o epítipo e processá-lo para a apresentação de
147 antígeno via CHP para os linfócitos T *naive* (PALUCKA et al, 2006; BANCHEREAU e
148 PALUCKA, 2005).

149 A CD está presente em vários tecidos e sistemas do organismo. Ao capturar o
150 epítipo, este migra em direção aos tecidos linfoides e ao baço. Nestes locais a CD
151 irá expressar altos níveis da molécula CHP, sendo que os peptídeos podem ser
152 expressos via CHP de classe I ou CHP de classe II, que posteriormente serão
153 apresentados aos linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺, respectivamente (PALUCKA et al,
154 2006; BANCHEREAU e PALUCKA, 2005, GALATTI, D. et al 2016).

155 A CD ainda possui a habilidade de apresentação cruzada, que é um processo
156 conhecido e específico da mesma: ela possui a habilidade de fagocitar um antígeno
157 exógeno, como os de infecções virais e/ou uma célula neoplásica, e realizar a
158 apresentação via CHP classe I no lugar da ativação que seria do CHP classe II,
159 ativando os linfócitos T CD8⁺ (FLINSENBERG e BOES, 2014; RAVAL et al 2014,
160 GALATTI, D. et al 2016).

161 Diante do papel fundamental que as CDs demonstram exercer sobre a
162 imunidade frente aos tumores, a imunoterapia com CDs – também conhecida como
163 vacina de CDs maduras – vem como uma alternativa ao tratamento convencional do
164 câncer. A terapia consiste em coletar as CDs do sangue periférico do indivíduo, com
165 posterior isolamento, diferenciação e sensibilização das CDs autólogas *in vitro*.
166 Após a maturação, as CDs autólogas são administradas na paciente via subcutânea.
167 (ALEIXO et al, 2013).

168 O potencial terapêutico das CDs está sendo estudado como uma terapia
169 alternativa à terapia convencional ao tratamento ao câncer, e tem sido considerada
170 uma terapia efetiva e de pouco efeito colateral por ter seu sistema de combate
171 altamente específico e direcionado para cada paciente, minimizando
172 imunossupressão (PALUCKA et al, 2012; ALEIXO et al, 2013; MATIAS et al, 2013,
173 GALATTI, D. et al 2016).

174

175

176 **1.5 MACRÓFAGOS**

177 Importantes células da imunidade inata que possuem origem mielocítica na
178 medula óssea – provêm da célula precursora concomitante à das CDs que
179 posteriormente, por estímulos específicos, se diferenciam em monócitos que irão se
180 encontrar circulantes no tecido sanguíneo. Na medida em que esse monócito migra
181 para outro tecido do organismo, este sofre maturação e se transforma em
182 macrófagos, que possuem nomenclaturas diferentes dependendo do tecido em que
183 o macrófago reside (ABBAS et al, 2011).

184 Além da clássica função fagocítica e citotóxica, os macrófagos também têm
185 propriedades de APCs, com a capacidade de processar epítomos e apresenta-los via
186 CHP de classe I. Ademais, expressam citocinas e podem modular o seu ambiente
187 residente – no caso do microambiente tumoral, podem levar à indução ou à
188 supressão do tumor. Além de possuir um importante papel na regulação da resposta
189 inflamatória e de serem fundamentais dentro da imunidade inata, são também
190 considerados o tipo celular mais abundante do microambiente tumoral, contexto no
191 qual são chamados de macrófagos associados ao tumor (MATs) (JIANG, 2015;
192 KOVALEVA et al, 2016).

193

194 **1.6 FENÓTIPO DOS MACRÓFAGOS**

195 No início dos anos 2000, após definidos os padrões de linfócitos Th1 e Th2,
196 alguns estudos demonstraram que os macrófagos possuíam dois perfis de ativação
197 diferentes e heterogêneos nos âmbitos funcionais moleculares dos macrófagos
198 (MOSSER et al, 2008; HAN, 2013 KOVALEVA et al, 2016).

199 Os macrófagos do perfil M1 são conhecidos por terem sua polarização
200 ativada pela então estabelecida via clássica, através dos linfócitos Th1. Ao serem
201 ativados, os linfócitos Th1 secretam a citocina interferon γ (IFN γ), que irá encontrar
202 na superfície dos macrófagos receptores para si. Uma vez que o IFN está ligado ao

203 receptor do macrófago indiferenciado, é deflagrada uma via de sinalização,
204 nomeada de ativação clássica. A partir do momento em que o macrófago se
205 compromete com a via clássica de sinalização, ele irá secretar citocinas e
206 quimiocinas importantes como o fator de necrose tumoral (TNF- α), o interferon- γ
207 (INF- γ) e as interleucinas (IL), dentre elas IL-1, IL-6 e IL-12, assim como os Fatores
208 Reativos de Oxigênio (ROS) e o Oxido Nítrico (ON), citocinas essenciais para o
209 processo inflamatório e a ação antitumoral, auxiliando no combate ao tumor junto ao
210 sistema imune como um todo (MOSSER e JUSTIN, 2008; LIU et al, 2014,
211 KOVALEVA et al, 2016; MILLS, LENZ e HARRIS, 2016).

212 O outro perfil de macrófagos é conhecido pela sua polarização pela via
213 chamada de alternativa, conhecidos como os macrófagos M2. Nesse perfil de
214 polarização, os linfócitos Th2 são responsáveis pela indução do perfil M2 através da
215 secreção das citocinas IL-4 e a IL-13, que por sua vez irão atuar em receptores de
216 superfície de macrófagos não polarizados ativando as vias de sinalização
217 específicas para tais. Estes macrófagos, portanto, passam a secretar outra gama de
218 citocinas diferentes das secretadas pelos macrófagos da via clássica, podendo até
219 serem chamados de macrófago de resposta antagônica, com a expressão de IL-10,
220 IL-4, arginase e prostaglandina. Estes mediadores são importantes no processo de
221 combate e controle da inflamação (MOSSER e JUSTIN, 2008; LIU et al, 2014;
222 MARTINEZ et al, 2014).

223 O macrófago M2 também possui um importante papel na progressão tumoral:
224 além de produzir as citocinas que auxiliam na contenção do processo inflamatório,
225 ele também produz outras citocinas, como a fator de transformação do crescimento-
226 β (TGF- β) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Essas citocinas têm
227 importante função na promoção da angiogenese tumoral, sendo este um sinal
228 importante para invasão de mais macrófagos de tipo M2 para o tecido tumoral,
229 facilitando o crescimento tumoral, a metástase e a imunossupressão. Os MATs
230 possuem o mesmo perfil de polarização, ativação, expressão de citocinas e
231 comportamento dos macrófagos M2 (LIU et al, 2014, KOVALEVA et al, 2016; MILLS,
232 LENZ e HARRIS, 2016).

233 Em estudos recentes, uma nova subdivisão foi proposta para os macrófagos
234 ativados pela via alternativa de M2, para M2a, M2b e M2c, que acontecem devido à
235 indução de uma única molécula ou em uma resposta a um microambiente específico
236 (RHEE, 2016).

237 Até pouco, tempo acreditava-se que a presença do fator de transcrição
238 FOXP3 cabia somente às linhagens linfoides hematopoiéticas, porém, com alguns
239 estudos recentes, esses paradigmas vêm mudando e passaram a ser olhados por
240 outra perspectiva. No estudo de Manrique e colaboradores, 2011, foi possível indicar
241 a presença de FOXP3 nos macrófagos que, por sua vez, levam à imunossupressão,
242 como nas células Treg, e auxiliam na promoção do tumor (MANRIQUE et al, 2011;
243 VADASZ e TOUBI, 2016).

244 Os estudos com o fator de transcrição GATA3 também vêm demonstrando
245 uma crescente relação com o seu aumento e a polarização dos macrófagos para o
246 perfil M2 no microambiente tumoral. Zhang e colaboradores, 2016, puderam verificar
247 um aumento na expressão de GATA3 nos MATs concomitante ao aumento de
248 VEGF, que por sua vez irá levar à neovascularização, ao aumento da malignidade
249 do tumor e à promoção da metástase, predizendo, portanto, um pior prognóstico
250 (ZHANG et al, 2016).

251 No estudo de Wu e colaboradores, 2016, foi possível demonstrar que a
252 ausência de ROR γ t resulta na formação incompetente do recrutamento de
253 macrófagos na resposta inflamatória, bem como expor o aumento de macrófagos
254 quando este estava presente nos determinados grupos experimentais (WU et al,
255 2016).

256 Deste modo, os estudos dos macrófagos e o estudo da sua polarização para
257 os perfis M1 e M2 vêm se tornando mais frequentes, de forma a entender o seu
258 comportamento no microambiente tumoral e ainda utilizar de um modo que se torne
259 possível manipular a polarização para o perfil M1 através de imunoterapias como
260 uma alternativa no tratamento do câncer (MILLS, LENZ e HARRIS, 2016).

261

262

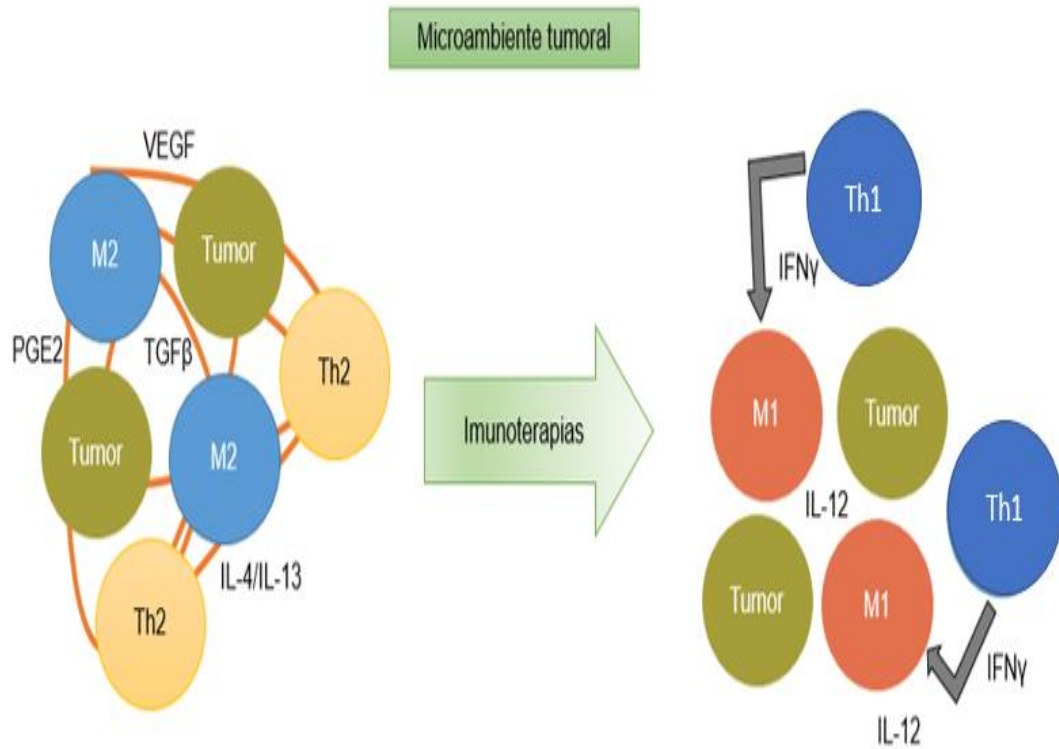
263

264

265

Figura 2: Efeitos imunoterapias nos macrófagos do microambiente tumoral.

266



279

Fonte: Adaptado de MILLS, LENZ e HARRIS, 2016.

280

281

282

283

Diante do avanço nas pesquisas e no tratamento do câncer, a imunoterapia com Células Dendríticas vem agregar um novo panorama no tratamento do câncer. É evidente a capacidade que a vacina de CD possui em modular o sistema imune para um padrão de expressão de citocinas com ação antitumoral.

284

285

286

287

288

289

290

Com o crescente avanço de novos casos de câncer na população mundial a imunoterapia surge como uma alternativa ao tratamento convencional do câncer, com uma atuação direcionada e minimizando os efeitos colaterais que a atual terapia convencional propicia, atuando diretamente nas células neoplásicas. Considera-se que o tratamento com CD possa ativar o sistema imunológico frente às células tumorais e também influenciar na polarização dos macrófagos para um perfil antitumoral de forma eficaz.

291 Desta forma se faz necessário analisar a influência que a vacina de CD
292 exerce sobre os macrófagos do microambiente tumoral *in vivo* através de
293 camundongos induzidos ao tumor de mama. O presente trabalho se propôs a
294 avaliar os mecanismos da imunoterapia com CD, e como ela pode influenciar na
295 polarização dos macrófagos, assim como as secreções de citocinas e alguns fatores
296 de transcrição, após o tratamento com as CD.

297 Este trabalho fundamenta-se na necessidade de verificar o papel da vacina de
298 células dendríticas no microambiente tumoral e o seu potencial em influenciar a
299 polarização dos macrófagos para os perfis M1 e M2 *in vivo*, através da análise por
300 citometria de fluxo dos macrófagos e da dosagem das citocinas da cultura do
301 sobrenadante dos mesmos produzidos por camundongos induzidos ao câncer de
302 mama por células 4T1 e tratados pela vacina de células dendríticas.

303 Em suma, este trabalho vem propor um maior aprofundamento dos
304 conhecimentos sobre a influência da imunoterapia com CD frente ao tumor de mama
305 induzido e sua influência nos macrófagos presentes no microambiente tumoral de
306 modo a produzir uma maior fundamentação sobre os mecanismos da vacina de CD.

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349

Objetivos

350

351 **2. OBJETIVOS**

352

353 **2.1 Objetivo Geral**

354 Verificar se a imunoterapia possui a capacidade de alterar o padrão da
355 resposta imune inata em camundongos Balb/c com tumores de mama induzidos por
356 4T1 e tratados com células dendríticas através da análise dos macrófagos
357 peritoneais obtidos destes animais, e que possuem a capacidade de servirem como
358 mecanismo de escape dos tumores frente a resposta imune.

359 **2.2 Objetivos Específicos**

360 Verificar se a imunoterapia com células dendríticas consegue alterar o padrão da
361 resposta dos macrófagos, comparando dados de animais com câncer de mama
362 tratados ou não, analisando o lavado peritoneal através:

363 1. Das citocinas IL-10, IL-12, IFN- γ e TGF- β do sobrenadante da cultura dos
364 mesmos macrófagos que posteriormente foram analisados pela técnica de
365 ELISA visando mensurar a produção das mesmas pelos macrófagos do tipo
366 M1 e do tipo M2;

367 2. Do marcador extracelular para os macrófagos CD14 pertencendo ao
368 grupamento de diferenciação específico para monócitos e macrófagos, e
369 intracelular a produção das citocinas IL-10 e IL-12, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-4
370 e IL-17 por citometria de fluxo;

371 3. Dos fatores de transcrição FOXP3, GATA3, ROR- γ T e Tbet em células
372 marcadas extracelular para CD14 para determinar a produção dos fatores de
373 transcrição pelos macrófagos M1 e M2, também pela técnica de citometria de
374 fluxo.

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para a realização do estudo experimental foram utilizados 70 camundongos da linhagem Balb/c, sendo 10 camundongos de ambos os sexos utilizados para extração de medula óssea e produção da vacina de células dendríticas e 60 camundongos fêmeas para a realização do estudo. Estes animais foram obtidos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Minas Gerais – UFMG e mantidos no biotério do Instituto de Pesquisa em Oncologia – IPON/UFTM, em gaiolas plásticas (cujas dimensões são 305 x 198 x 133 mm), em ambiente claro/escuro, com temperatura controlada (23°C), alimentação e a água *ad libitum*. Este estudo foi aprovado com o número de protocolo 289 pelo comitê de ética e uso de animais da UFTM (Anexo I e II). Os camundongos foram separados em grupos experimentais (tabela 1) da seguinte maneira:

Tabela 1: Descrição dos grupos experimentais.

Grupos	Inoculação da linhagem tumoral 4T1 (2×10^5 células)	Tratamento realizado	Número de animais
Grupo Controle	-	Não foi realizado.	15
Grupo Controle (CDs)	-	Vacina com CDs	15
Grupo tumor tratado (SF 0,9%)	+	Vacina com SF 0,9%	15
Grupo Tumor Tratado (CDs)	+	Vacina com CDs	15

Tabela 2: Descrição dos grupos experimentais de acordo com a administração de 4T1 e do tratamento a ser realizado. CDs: Células Dendríticas; SF: Solução Fisiológica.

432 3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

433

434

435

436

437

438

439

440

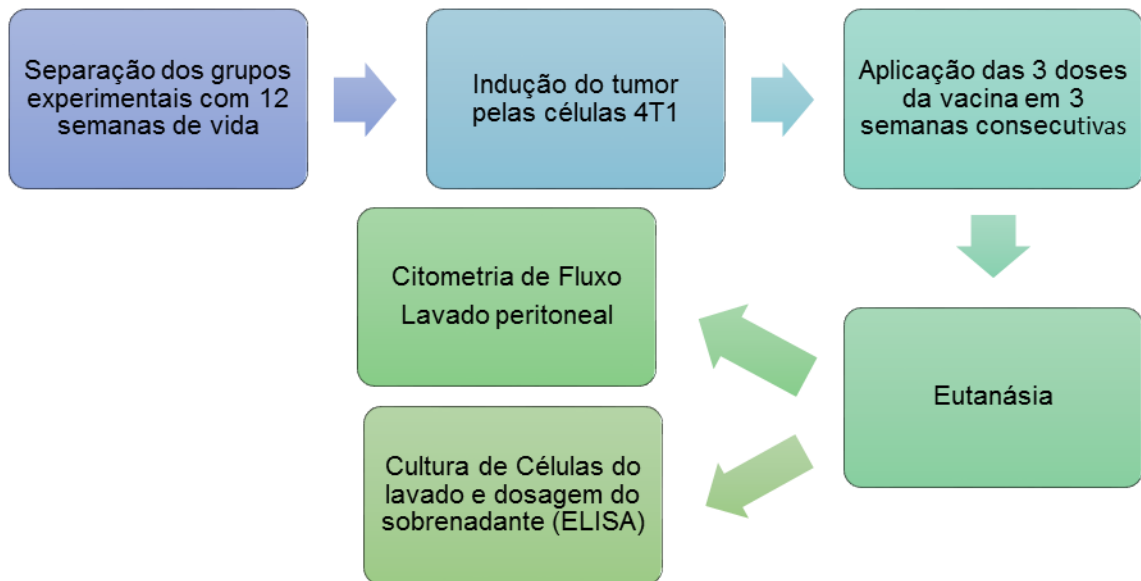
441

442

443

444

445



446 **Figura 3 – Delineamento dos procedimentos e do andamento do experimento conforme descrito no texto.**

447

448

449 3.3 INDUÇÃO DE TUMORES COM A LINHAGEM 4T1

450

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460 3.4 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DA MEDULA ÓSSEA DE 461 CAMUNDONGOS

462

463 Os animais foram eutanasiados com superdosagem dos anestésicos
464 cloridrato de ketamina (90mg/kg) e xilazina (15mg/kg). Posteriormente, as células
465 mononucleares foram obtidas de acordo com o protocolo de Lutz e colaboradores
466 (1999), no qual a medula óssea foi extraída do fêmur e tíbia dos camundongos
467 BALB/c com a ajuda de uma seringa estéril de 13x4,5mm com SF 0,9% e
468 depositadas em placas de petri. Em seguida, as células foram transferidas para
469 tubos plásticos cônicos de 50mL (FALCON) lavadas duas vezes com 30mL de meio
470 IMDM e centrifugadas a 657xg, por 10 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada. Ao
471 final da centrifugação a quantidade de células obtidas foi determinada por contagem
472 em câmara de *Neubauer*. Essas células foram transferidas para garrafas de cultura
473 a uma concentração de $32,5 \times 10^6$ células em um volume de 7,5mL de meio IMDM
474 suplementado. Após dois dias, as células foram estimuladas com GM-CSF (10ng/ μ L)
475 e IL-4 (10ng/ μ L) para diferenciação de células dendríticas. Após cinco dias as
476 células são novamente estimuladas com TNF- α (10ng/ μ L) (todos os estímulos foram
477 obtidos da BD Pharmingen™, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) e 26 μ L de
478 antígenos tumorais de células 4T1 para maturação das CDs.

479

480 **3.5 IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS**

481

482 A imunoterapia com células dendríticas consistiu na aplicação de três doses
483 de vacina. Cada dose continha 5×10^6 células em 50 μ l de SF 0,9%, que foram
484 aplicadas uma vez por semana, durante três semanas consecutivas. A vacina de
485 células dendríticas foi administrada nos grupos II (controle tratado) e IV (tumor
486 tratado) sendo a primeira dose aplicada uma semana após a indução do tumor nos
487 grupos determinados. No grupo III (grupo tumor tratado com solução salina 0,9%)
488 foram administradas três doses de 50 μ l de solução fisiológica a 0,9% durante três
489 semanas consecutivas, também uma semana após a indução do tumor. A aplicação
490 da vacina foi realizada no camundongo BAIB/c via subcutânea.

491

492 **3.6 ANÁLISE DO TAMANHO DO TUMOR DE MAMA EM FUNÇÃO DO TEMPO**

493

494 A análise do tamanho tumoral foi realizada através da medição, com a análise
495 em função do tempo utilizando paquímetro universal analógico 150mm nos sentidos
496 crânio-caudal e látero-lateral do tumor de mama, a partir do momento em que o
497 tumor de mama se tornou palpável, e acompanhado a cada quatro dias até o dia
498 anterior à eutanásia. O volume do tumor foi obtido segundo Faustino-Rocha et al.
499 (2013), por meio da fórmula $v=a.b^2/2$ onde (v) representa volume em cm³, (a)
500 representa o diâmetro maior e (b) o diâmetro menor.

501

502 **3.7 OBTENÇÃO DO LAVADO PERITONEAL PARA CULTURA DE CÉLULAS E** 503 **CITOMETRIA DE FLUXO**

504

505 Para a obtenção do lavado peritoneal foram injetados 5mL de SF 0,9% no
506 abdome dos camundongos dos grupos experimentais, afim de realizar a retirada de
507 monócitos/macrófagos presentes no peritônio. As células obtidas através desta
508 técnica foram utilizadas para realização da cultura de células e citometria de fluxo.
509 Para a cultura, as células foram lavadas duas vezes com meio *Roswell Park*
510 *Memorial Institute* (RPMI-1640) e centrifugadas a 657xg, por 10 minutos, a 4°C. Em
511 seguida essas células foram contadas na câmara de Neubauer e distribuídas em
512 placas de cultura de 12 poços na concentração de 1×10^6 células em 1mL de meio
513 RPMI (Sigma-Aldrich®), contendo 0,24% de HEPES, 10% de SBF, 1% de L-
514 glutamina, 1% de gentamicina/estreptomicina, 0,1% de 2-mercaptoetanol, 0,22% de
515 bicarbonato e piruvato de sódio a 0,1%. Estas células foram estimuladas após 4
516 horas com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e mantidas em cultura por 12, 24 e
517 48 horas. Após os períodos de incubação mencionados, o sobrenadante da cultura
518 de células foi coletado e armazenado em *ependorfs* no freezer -80°C para posterior
519 análise por ELISA das citocinas IL-10, IL-12, IL-4, INF- γ e TGF- β . Para a citometria
520 de fluxo, as células foram avaliadas quanto à expressão dos marcadores de
521 superfície CD14, das citocinas IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α , TGF- β e dos fatores
522 de transcrição FOXP3, GATA3, ROR γ T e Tbet.

523

524

525 **3.8 ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)**

526

527 Para a dosagem das citocinas do sobrenadante da cultura de macrófagos
528 peritoneais foi utilizada a técnica de ELISA do tipo sanduíche para quantificar as
529 concentrações de IL-10, IL-12, IFN- γ e TGF- β . As citocinas foram dosadas utilizando
530 pares de anticorpos monoclonais comerciais disponibilizados pela BD OptEIA™. O
531 procedimento foi realizado conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Placas de
532 384 poços foram sensibilizadas com 25 μ l de anticorpos monoclonais específicos
533 para a captura da citocina desejada diluída em *coating buffer*. Posteriormente em
534 cada placa foram adicionados 25 μ l de citocina padrão recombinante seguindo
535 diluições seriadas 1:2 em *assay diluent* a partir das concentrações iniciais indicadas.
536 Nas outras fileiras foram adicionados 25 μ L/poço dos sobrenadantes de macrófagos
537 peritoneais.

538 As placas foram incubadas à temperatura ambiente por duas horas e
539 lavadas por cinco vezes com uma solução contendo PBS-*Tween* 20%.
540 Posteriormente, foram adicionados 25 μ L/poço do anticorpo detector da citocina a ser
541 dosada. As placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e novamente
542 lavadas por cinco vezes em PBS-*Tween* 20%. Na sequência, foram adicionados
543 25 μ L/poço de TMB *Substrate Reagent Set* (BD OptEIA™) e, após 30 minutos, foram
544 adicionados 12,5 μ L/poço de ácido fosfórico 1M. Após adição do ácido, foi realizada
545 a leitura da placa de ELISA através do leitor automático *Spectramax 384 Plus* sendo
546 os resultados obtidos pela diferença entre as absorbâncias 450 e 570 nm.

547

548 **3.9 CITOMETRIA DE FLUXO**

549

550 Os macrófagos foram preparados como descrito acima e avaliados por
551 citometria de fluxo (Citômetro *BD FACS Calibur*). O protocolo de citometria ocorre
552 em conformidade com o sugerido pelo fabricante, com anticorpos monoclonais
553 específicos para cada marcador. As células do lavado peritoneal foram distribuídas
554 em tubos cônicos (FALCON) de 50ml. Aos tubos foram adicionados 10mL de
555 solução de lise (BD *Biosciences - FACSTM Lysing Solution*) para cada 1mL de
556 células, e incubados à temperatura ambiente por 20 minutos, seguido da
557 centrifugação por 10 minutos, à temperatura de 4°C, em uma rotação de 657xg.
558 Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado cuidadosamente, conservando
559 o precipitado de células.

560 O precipitado de células foi submetido à três lavagens com 30mL de solução
561 salina tamponada com fosfato (PBS) em cada lavagem, e centrifugados à 4°C, a
562 657xg por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e, em seguida, foi adicionado
563 2µL de proteína transportadora inibitória (*BD Golgistop*TM) e realizada a incubação
564 por 20 minutos a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas e centrifugadas com
565 30mL de PBS para retirar o excesso de proteína.

566 Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, preservando apenas o
567 precipitado e então, as células foram ressuspensas em 1mL de PBS e logo em
568 seguida foi determinada a quantidade de células obtidas por contagem através da
569 câmara de *Neubauer* respeitando a concentração de 1×10^6 células. Para marcação
570 extracelular foram usados o anticorpo anti-CD14 FITC e incubado a 4°C durante 30
571 minutos. Em seguida, as células foram lavadas para remoção do excesso de
572 anticorpos e permeabilizadas com 100µL de solução permeabilizadora (*BD*
573 *Cytofix/Cytoperm*TM) e incubadas por 20 minutos a 4°C. Durante a incubação foi
574 diluída a solução tampão (*BD Perm/Wash*TM *Buffer*) a uma concentração de 1x. Após
575 a incubação as células foram lavadas duas vezes com o tampão *Perm/Wash*TM
576 *Buffer* e centrifugado por 10 minutos, 4°C e 657xg.

577 Posteriormente os tubos foram marcados com anticorpos intracelulares anti-
578 IL-12 PE, anti-TNF-α PE, anti-IL-10 FITC, anti-IFN-γ FITC, anti-IL-17 Percp-c7 5.5,
579 anti-Tbet Alexa 488, anti-RORγT PE, anti-GATA3 PE e FOXP3 Alexa 488. Após a
580 marcação intracelular as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C no escuro e
581 lavadas 2 vezes com tampão *Perm/Wash*TM *Buffer*. Na última lavagem foi retirado o
582 máximo de *Perm/Wash*TM *Buffer*, e por fim as células foram ressuspensas em
583 500µL de PBS, ficando prontas para a leitura no citômetro de fluxo *BD FACS*
584 *Calibur*TM.

585

586 **3.10 ANÁLISE ESTÁTISTICA**

587

588 Os resultados obtidos foram analisados quanto à sua distribuição, sendo os
589 dados não-Gaussianos avaliados por meio do teste Kruskal-Wallis e pelo Test T de
590 *Student* sendo os resultados expressos em mediana ± mínimo e máximo. As
591 diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. A

592 análise estatística e os gráficos foram realizados com o auxílio do *software*
593 *GraphPad Prism Versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA)*.

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632

633

634

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

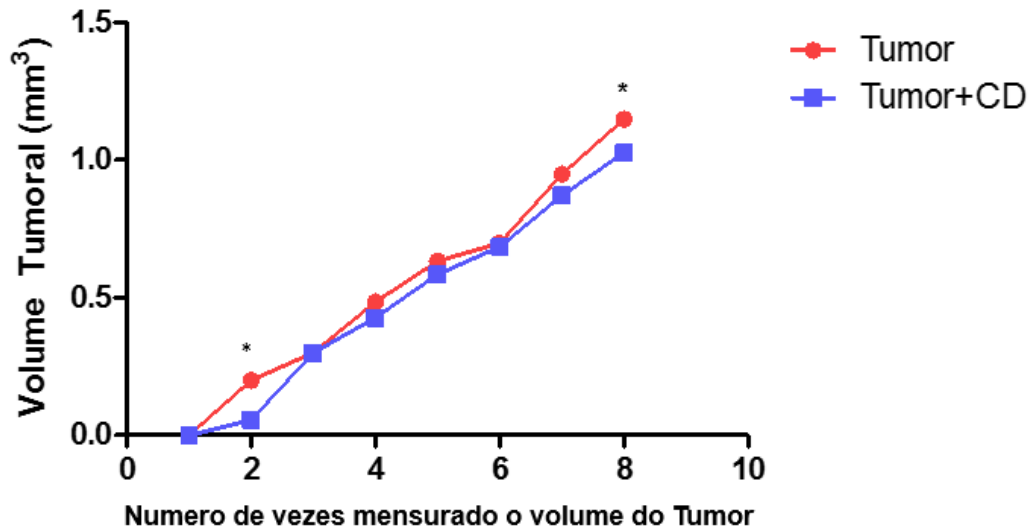
Resultados

653

654

655

656 4. RESULTADOS

657 4.1 ANÁLISE DO CRESCIMENTO DO TUMOR DE MAMA INDUZIDO PELAS
658 CÉLULAS 4T1.

667

668 **Figura 4: Crescimento tumoral mensurado na média de 4 dias.** Representação do volume tumoral
 669 mensurado por meio da formula $V=a.b^2/2$ onde **a** é o maior diâmetro e **b** menor diâmetro. Os valores
 são expressos em média utilizando foi utilizado o teste *T-Test* As diferenças observadas foram
 consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%) e apresentadas pelo símbolo *.

670 Na figura 4 é demonstrado no gráfico as linhas com o crescimento tumoral, o
 671 qual foi mensurado na média de 4 dias até realização da eutanásia. Os animais
 672 tumor-induzidos e sob tratamento com a vacina de CDs apresentam um menor
 673 volume tumoral, comparado aqueles sem tratamento (Figura 4). A análise estatística
 674 destes dados, através do teste T demonstrou que o tamanho dos tumores dos
 675 animais do grupo submetido à imunoterapia é menor e também estatisticamente
 676 significativo, ($p=0,0397$) quando comparados aos animais com tumores induzidos
 677 por 4T1 e não submetidos a nenhum tipo de tratamento.

678

679

680

681 **4.2 EXPRESSÃO DAS CITOCINAS IL-4 IL-10, IL-12, TGF β E IFN γ DO**
 682 **SOBRENADANTE DA CULTURA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE**
 683 **CAMUNDONGOS**

684 Para avaliar a dosagem da concentração das citocinas IL-10, IL-12, IFN γ e
 685 TGF β na cultura do sobrenadante foi utilizada a técnica de ELISA do tipo sanduíche
 686 após o estímulo com LPS. O horário de 12h, 24h e 48h foi estabelecido de acordo
 687 com o maior pico de cinética após a estimulação com o LPS, conforme determinado
 688 em estudo anterior (CUNHA et al, 2016).

689 Na Figura 5 observamos a concentração em pg/ml do sobrenadante na
 690 cultura de macrófagos de 24h da citocina IFN γ o qual apresentou valores da
 691 mediana significativamente maior no grupo controle (136,5) quando comparado com
 692 o grupo CD (21,92) ($p = <0.0001$) e o grupo Tumor+CD (14,99) ($p = <0.0001$). O IFN γ
 693 também apresentou a mediana com aumento da sua expressão significativamente
 694 maior no grupo tumor (36,83) quando comparado com o grupo CD (21,92) ($p =$
 695 <0.0001). e o grupo Tumor+CD (14,99) ($p = <0.0001$).

696

697

698

699

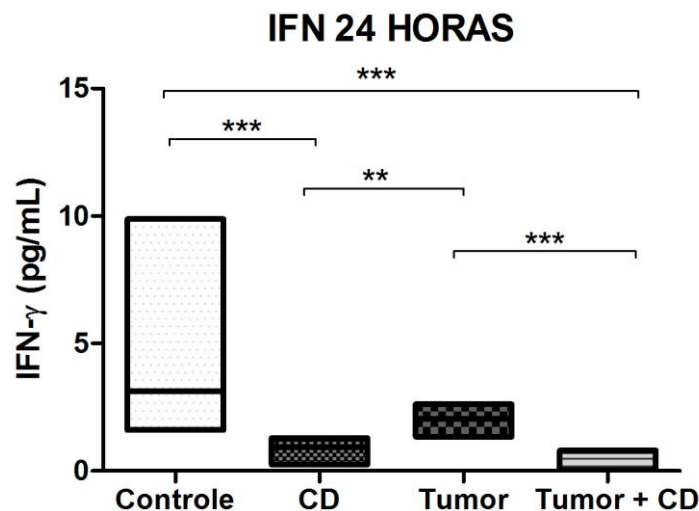
700

701

702

703

704



705

706

707

708

Figura 5: Concentração de IFN γ em sobrenadante da cultura de macrófagos, após 24 horas de estimulação com lipopolisacarídeo (LPS). Os resultados foram expressos em mediana e valores máximo e mínimo de Concentração (pg/mL). Os resultados foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis e para o pós teste utilizou-se o teste de "Dun". As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,0006$ e *** $p < 0,0001$

709 Na Figura 6 é demonstrada a concentração em pg/ml da citocina TGF β no
 710 sobrenadante da cultura de macrófagos, na qual não foi observada significância
 711 estatística na produção da citocina, porém, no pico cinético de 12 horas é possível
 712 ver um aumento da mediana do grupo Tumor (258,6) quando comparado com o
 713 grupo Tumor Tratado (185,4)

714

TGF BETA 12 HORAS

715

716

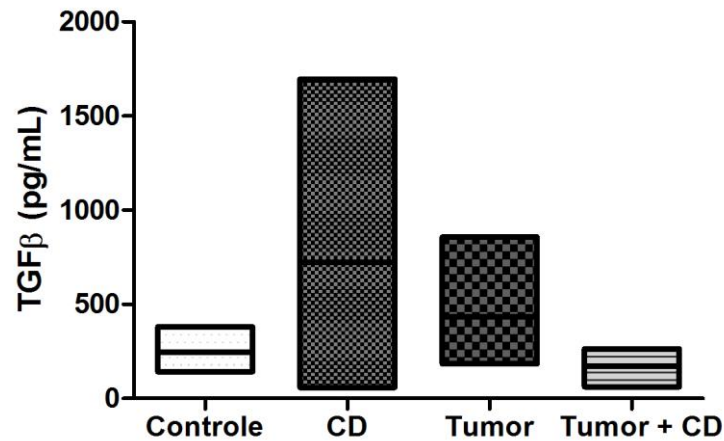
717

718

719

720

721



722

723 **Figura 6: Concentração de TGF β em sobrenadante da cultura de macrófagos, após 12 horas**
 724 **de estimulação com lipopolisacarídeo (LPS).** Avaliação pela técnica de ELISA do sobrenadante da
 725 cultura de macrófagos após 12 horas de estimulação em LPS demonstrados em pg/mL. Os resultados
 726 foram expressos em mediana e valores máximo e mínimo de Concentração (pg/mL). Os resultados foram
 analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis e para o pós teste, utilizou-se o teste de "Dun". As
 diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,0006$
 e *** $p < 0,0001$

726

727

IL4 24 HORAS

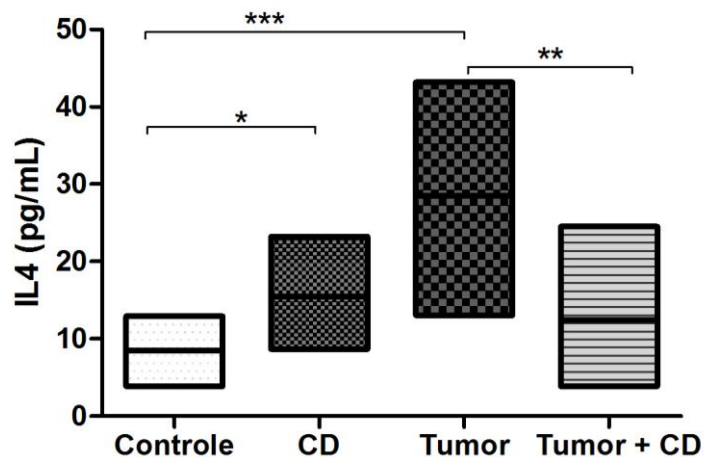
728

729

730

731

732



733

734 **Figura 7: Concentração de IL-4 em sobrenadante da cultura de macrófagos, após 24 horas**
 735 **de estimulação com lipopolisacarídeo (LPS).** Avaliação pela técnica de ELISA do sobrenadante da
 cultura de macrófagos após 24 horas de estimulação em LPS demonstrados em pg/mL. Os resultados
 foram expressos em mediana e valores máximo e mínimo de Concentração (pg/mL). Os resultados foram
 analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis e para o pós teste utilizou-se o teste de "Dun". As diferenças
 observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,0006$ e
 *** $p < 0,0001$

736

737 Na figura 7 foi demonstrada a mediana de concentração em pg/ml da citocina
 738 IL-4 no pico cinético de 24h. A mediana foi significativa no grupo controle (8,575)
 739 quando comparado com o grupo tumor (29,22) ($p = <0.0001$) e o grupo CD (14,49)
 740 ($p = <0.0001$); a mediana também foi significativa quando comparada ao grupo tumor
 741 (29,22) com o grupo Tumor+CD (9,025) ($p = <0.0001$), demonstrando uma
 742 diminuição desta citocina no grupo tratado quando comparado com o grupo não
 743 tratado.

744 Na figura 8 são demonstradas as medianas de concentração dos grupos
 745 experimentais em pg/ml da citocina IL-10 no pico cinético de 48h. O grupo controle
 746 foi o grupo que apresentou o menor valor significativo da mediana (14,03) de
 747 concentração de IL-10 quando comparado com os grupos tumor (56,88) ($p =$
 748 <0.0001) e o grupo Tumor+CD (67,49) ($p = <0.0001$). O grupo CD (16,40) também
 749 possui um menor valor de mediana estatisticamente significativo quando comparado
 750 com o grupo Tumor+CD (67,49) ($p = <0.0001$), e o grupo Tumor+CD (67,49) possui o
 751 maior valor de mediana significativo quando comparado com o grupo tumor (56,88)
 752 ($p = <0.0001$).

753

754

755

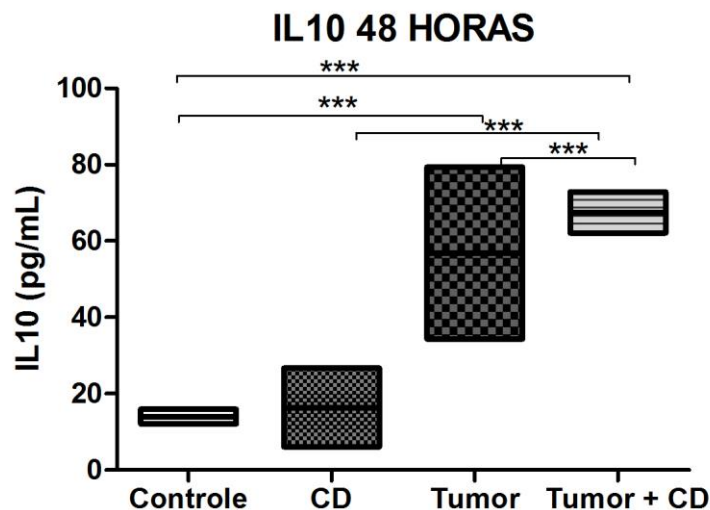
756

757

758

759

760



761

Figura 8: Concentração de IL-10 em sobrenadante da cultura de macrófagos, após 48 horas de estimulação com lipopolisacarídeo (LPS). Avaliação pela técnica de ELISA do sobrenadante da cultura de macrófagos após 48 horas de estimulação em LPS demonstrados em pg/mL. Os resultados foram expressos em mediana e valores máximo e mínimo de Concentração (pg/mL). Os resultados foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis e para o pós teste utilizou-se o teste de "Dun". As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,0006$ e *** $p < 0,0001$

764

765 Na figura 9 são demonstrados os valores de mediana para a citocina IL-12 no
 766 pico cinético de 48h, o qual obteve a concentração (pg/ml) significativamente maior
 767 no grupo Tumor+CD (2,663) quando comparado com o grupo controle (2,020) ($p=$
 768 <0.0001). e o grupo Tumor+CD (1,672) ($p= <0.0001$)..

769

770

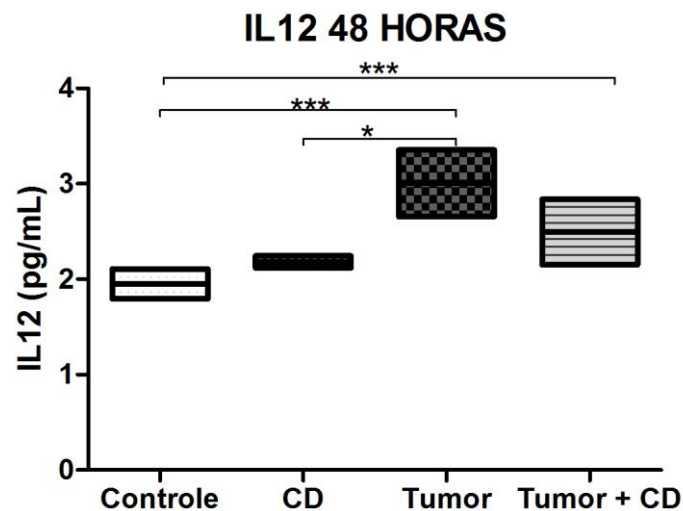
771

772

773

774

775



776

Figura 9: Concentração de IL-12 no sobrenadante da cultura de macrófagos, após 24 horas

777 **de estimulação com lipopolisacarídeo (LPS).** Avaliação pela técnica de ELISA do sobrenadante da
 778 cultura de macrófagos após 24 horas de estimulação em LPS demonstrados em pg/mL. Os resultados
 779 foram expressos em mediana e valores máximo e mínimo de Concentração (pg/mL). Os resultados foram
 analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis e para o pós teste utilizou-se o teste de "Dun". As
 780 diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,0006$
 e *** $p < 0,0001$

780

781

782

783

784

785

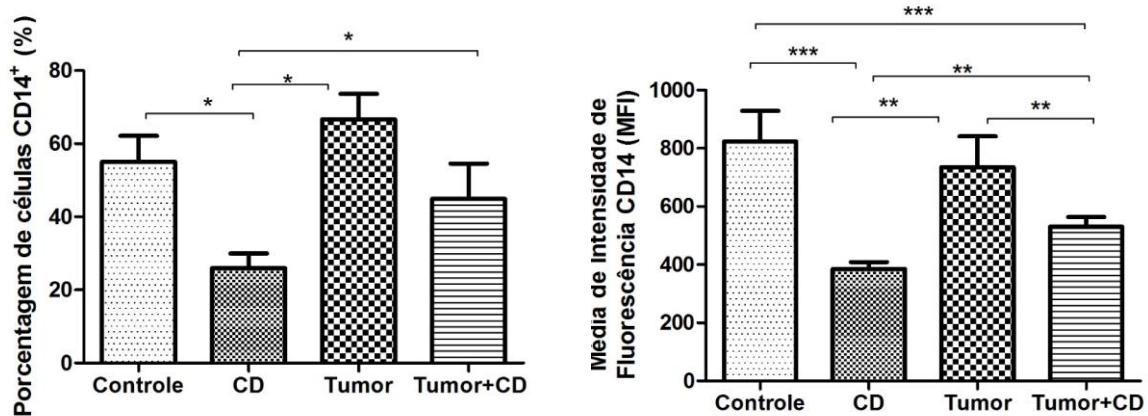
786

787

788

789 **4.3 EXPRESSÃO EXTRACELULAR DE CD14 E INTRACELULAR DE IL-12**
 790 **TNF α , IFN γ , IL-10, IL-17, NOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE**
 791 **CAMUNDONGOS.**

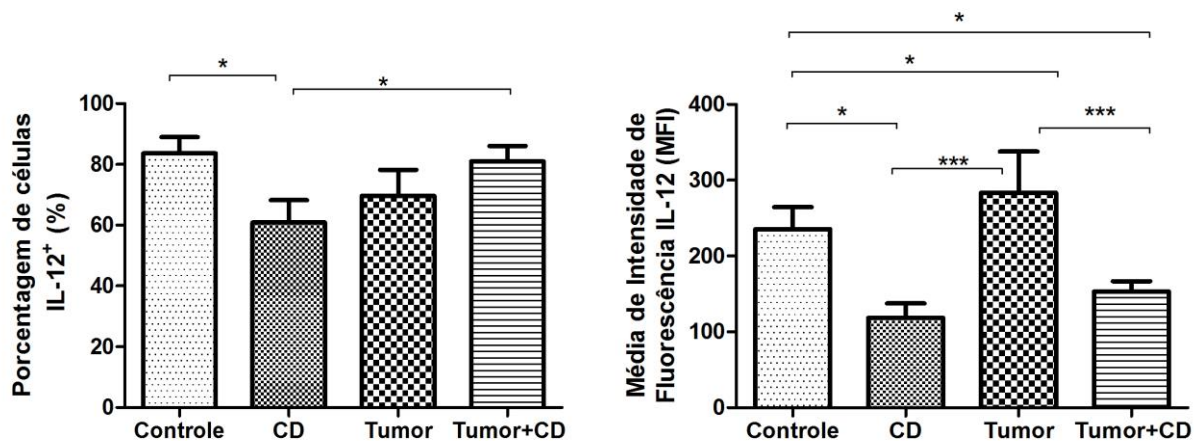
792



799 **Figura 10: Porcentagem e média de intensidade fluorescência em macrófagos CD14⁺.**
 800 Avaliação por citometria de fluxo da porcentagem de macrófagos CD14⁺ obtidos do lavado
 801 peritoneal de camundongos Balb/C saudáveis ou com tumor de mama induzidos pelas células 4T1
 802 submetidos ou não a imunoterapia com CD. Os resultados foram expressos em mediana, valores
 803 máximo e mínimo. Os resultados foram analisados utilizando teste T. As diferenças observadas
 804 foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,0006$ e *** $p < 0,0001$.
 805 %: Porcentagem de células; MFI: Média de intensidade de Fluorescência

802

803 Na figura 10 é demonstrada a porcentagem de células com marcação positiva
 804 para CD14, marcações que configuram fenótipo de macrófagos, no qual é possível
 805 observar que houve diferença de significância estatística menor na porcentagem de
 806 células do grupo CD (15,28) quando comparado com os demais grupos, sendo eles
 807 Controle (44,21) ($p = 0,0018$), Tumor (68,24) ($p = < 0,0001$) e Tumor+CD (22,39) ($p =$
 808 $0,0024$). A figura demonstra a média de intensidade de fluorescência (MFI) e nela é
 809 possível observar que a MFI do grupo CD (323,3) é significativamente menor
 810 quando comparado com os demais grupos Controle (712,0) ($p = 0,0009$), Tumor
 811 (515,2) ($p = 0,0054$) e Tumor+CD (614,5) ($p = 0,0016$), o Tumor+CD possui a MFI
 812 significativamente menor quando comparado com o grupo Tumor e o grupo
 813 Controle.



814 **Figura 11: Porcentagem e média de intensidade fluorescência de IL-12⁺ em macrófagos CD14⁺.**
 815 Avaliação por citometria de fluxo da porcentagem de macrófagos CD14⁺/IL-12⁺ obtidos do lavado
 816 peritoneal de camundongos Balb/C saudáveis ou com tumor de mama induzidos pelas células 4T1
 817 submetidos ou não a imunoterapia com CD. Os resultados foram expressos em mediana, valores
 818 máximo e mínimo. Os resultados foram analisados utilizando teste T. As diferenças observadas foram
 819 consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,0006$ e *** $p < 0,0001$. %:
 820 Porcentagem de células; MFI: Média de intensidade de Fluorescência.

817

818 Na dupla marcação, extracelular para CD14 e intracelular, verificou-se que
 819 houve uma menor porcentagem de células que realizaram a expressão de IL-12
 820 (figura 11) significativa estatisticamente no grupo CD (41,63) quando comparado
 821 com os grupos Tumor+CD (87,68) ($p = 0,0329$) e Controle (95,90) ($p = 0,0192$); já a
 822 média de intensidade de fluorescência apresentou diferenças estatísticas em
 823 variados grupos: o grupo CD (67,56) apresentou um valor de mediana
 824 significativamente menor quando comparado com os grupos Controle (257,4) ($p =$
 825 $0,0024$) e Tumor (231,6) ($p = 0,0106$), o grupo Controle (257,4) apresentou um valor
 826 significativamente menor quando comparado com o grupo Tumor (231,6) ($p =$
 827 $0,0239$), e outro valor significativamente maior quando comparado com o grupo
 828 Tumor+CD (175,0) ($p = 0,0178$), e o grupo Tumor+CD (175,0) com uma MFI
 829 significativamente menor, quando comparado com o grupo Tumor (231,6) ($p = <$
 830 $0,0001$).

831 Na figura 12 são demonstrados os resultados da mediana da porcentagem de
 832 células que produziram IL-10 e quando comparado grupo Controle (74,49) com o
 833 grupo Tumor (54,23) ($p = 0,0364$). Esses apresentam uma diferença do valor da
 834 mediana estatisticamente significante. Os demais grupos não apresentaram
 835 significância estatística na porcentagem de células que produzem a citocina IL-10,

836 porém, já na Média de intensidade de fluorescência, mais grupos apresentaram
 837 significância estatística, como o grupo Controle (237,7) que quando comparado com
 838 o grupo CD (149,0) ($p= 0,0012$) e Tumor+CD (273,6) ($p= 0,0030$) possui a maior
 839 MFI, e grupo Tumor (335,4) quando comparado com o grupo Tumor+CD (273,6) ($p=$
 840 $0,0002$) e CD (149,0) ($p= < 0.0001$) possui uma menor expressão da MFI.

841

842

843

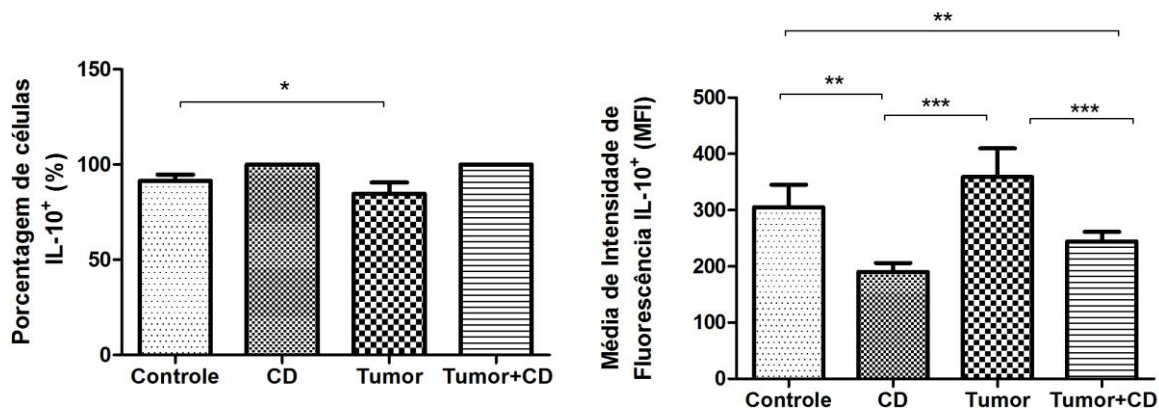
844

845

846

847

848



849

850

851

852

853

854

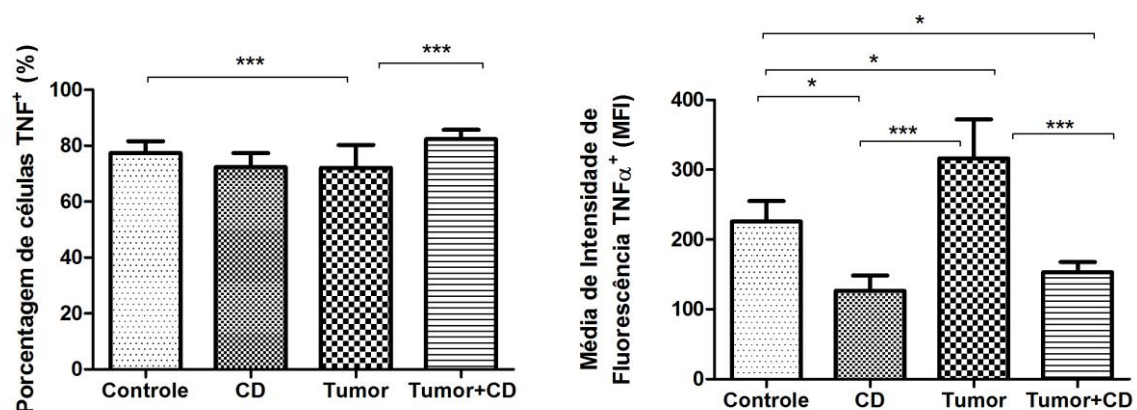
855

856

857

858

859



860

861

862

863

864

Figura 13: Porcentagem e média de intensidade fluorescência de TNF α ⁺ em macrófagos CD14⁺. Avaliação por citometria de fluxo da porcentagem de macrófagos CD14⁺/ TNF α ⁺ obtidos do lavado peritoneal de camundongos Balb/C saudáveis ou com tumor de mama induzidos pelas células 4T1 submetidos ou não a imunoterapia com CD. Os resultados foram expressos em mediana, valores máximo e mínimo. Os resultados foram analisados utilizando teste T não paramétrico. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,0006$ e *** $p < 0,0001$. %: Porcentagem de células; MFI: Média de intensidade de Fluorescência.

865 Na figura 13 é demonstrada a porcentagem de células CD14 que produziram
 866 TNF α , na qual foi possível inferir que a produção de TNF α é significativamente
 867 menor no grupo Tumor (89,91) quando comparado com os grupos Controle (67,73)
 868 ($p= 0,0002$) e Tumor+CD (73,89) ($p= 0,0017$). Também foi demonstrada a mediana
 869 da MFI, a qual é significativamente menor no grupo CD (68,28) quando comparado
 870 com o grupo Tumor (319,5) ($p= 0,0013$) e Controle (255,0) ($p= 0,0113$). No grupo
 871 Tumor+CD (181,4) a mediana se apresenta significativamente menor quando
 872 comparado com o grupo Tumor (319,5) ($p= < 0.0001$) e o grupo Controle (255,0) ($p=$
 873 < 0.0001).

874

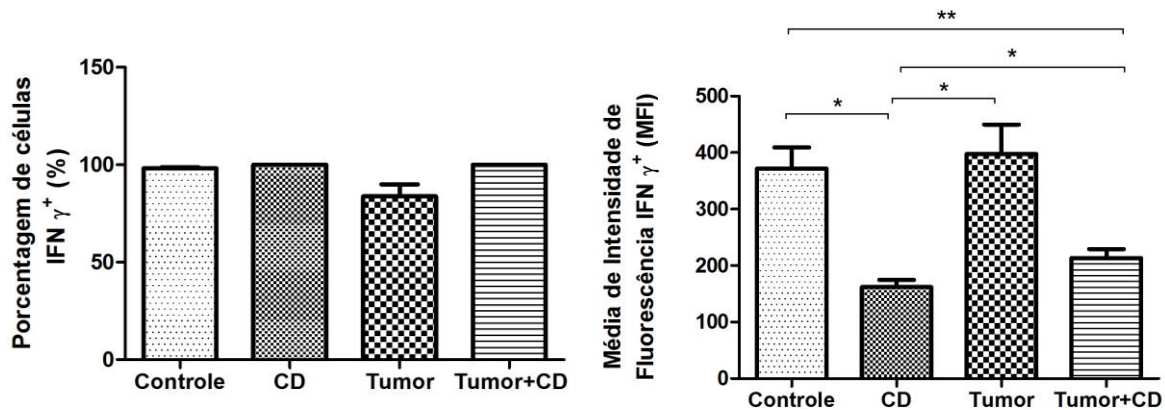
875

876

877

878

879



880

Figura 14: Porcentagem e média de intensidade fluorescência de IFN γ^+ em macrófagos CD14 $^+$.

881

Avaliação por citometria de fluxo da porcentagem de macrófagos CD14 $^+$ / IFN γ^+ obtidos do lavado peritoneal de camundongos Balb/C saudáveis ou com tumor de mama induzidos pelas células 4T1 submetidos ou não a imunoterapia com CD. Os resultados foram expressos em mediana, valores máximo e mínimo. Os resultados foram analisados utilizando teste T. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,0006$ e *** $p < 0,0001$. %: Porcentagem de células; MFI: Média de intensidade de Fluorescência.

882

883

884

885

886

887

888

889

890

891

892

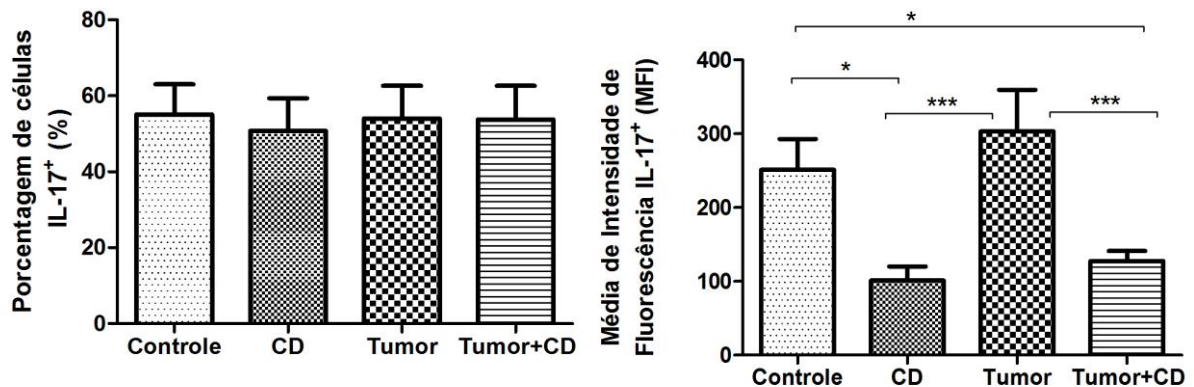
893

Na figura 14 é demonstrada a porcentagem de células que expressam IFN γ na qual pode se observar uma alta produção da citocinas pelas células marcadas com CD14, porém, esta não demonstra uma significância estatística entre os demais grupos. No gráfico que demonstra MFI é possível observar que o grupo CD (127,6) possui uma menor mediana de valor quando comparado com os demais grupos Controle (445,1) ($p= 0,0003$), Tumor (467,9) ($p= 0,0005$) e Tumor+CD (183,8) ($p= 0,0172$). Também é possível ver que o grupo Tumor+CD (183,8) possuiu um menor valor de mediana significativo quando comparado com o grupo Controle (445,1).

Na figura 15 é possível visualizar a porcentagem de células que produziram IL-17. É possível visualizar que a produção de IL-17 na maioria das células em todos

os grupos, porém, não demonstra significância estatística entre eles. No gráfico que demonstra o valor da mediana da Média de Intensidade de Fluorescência é possível visualizar que o grupo controle possui um valor de mediana significativamente maior no grupo Controle (269,5) quando comparado com os grupos Tumor+CD (161,0) ($p=0,0002$) e grupo CD (50,88) ($p=0,0064$), e também significativamente maior no grupo Tumor quando (282,4) comparado com o grupo CD (50,88) ($p=0,0002$) e Tumor+CD (161,0) ($p<0,0001$).

901
902
903
904
905
906
907



908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923

Figura 15: Porcentagem e média de intensidade fluorescência de IFN γ ⁺ em macrófagos CD14⁺. Avaliação por citometria de fluxo da porcentagem de macrófagos CD14⁺/IFN γ ⁺ obtidos do lavado peritoneal de camundongos Balb/C saudáveis ou com tumor de mama induzidos pelas células 4T1 submetidos ou não a imunoterapia com CD. Os resultados foram expressos em mediana, valores máximo e mínimo. Os resultados foram analisados utilizando teste T. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p<0,05$ (5%), onde * $p<0,05$; ** $p<0,0006$ e *** $p<0,0001$. %: Porcentagem de células; MFI: Média de intensidade de Fluorescência.

924 **4.4 EXPRESSÃO EXTRACELULAR DE CD14 E INTRACELULAR DE Tbet,**
 925 **ROR γ T, FOXP3 E GATA3 NOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE**
 926 **CAMUNDONGOS.**

927

928

929

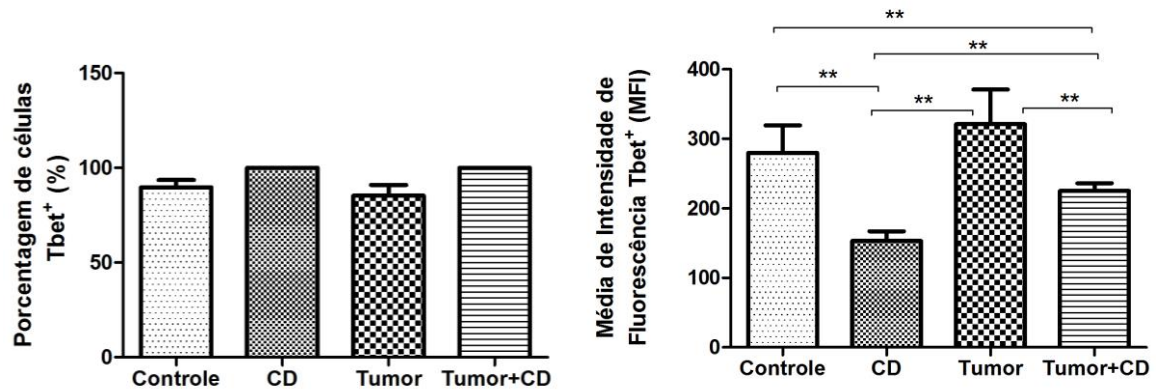
930

931

932

933

934



935

Figura 16: Porcentagem e média de intensidade fluorescência de Tbet⁺ em macrófagos CD14⁺. Avaliação por citometria de fluxo da porcentagem de macrófagos CD14⁺/ Tbet⁺ obtidos do lavado peritoneal de camundongos Balb/C saudáveis ou com tumor de mama induzidos pelas células 4T1 submetidos ou não a imunoterapia com CD. Os resultados foram expressos em mediana, valores máximo e mínimo. Os resultados foram analisados utilizando teste T. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,0006$ e *** $p < 0,0001$. %: Porcentagem de células; MFI: Média de intensidade de Fluorescência.

938

939

940

941

942

943

944

945

946

947

Na figura 16 podemos observar as células que possuem produção intracelular do Fator de Transcrição Tbet. É possível observar que ele é produzido por todos os grupos, porém, não apresenta valor de mediana estatisticamente significativo entre eles. Não obstante, na Média de Intensidade de fluorescência é possível inferir que o grupo CD (117,0) possui a MFI significativamente menor quando comparado aos demais grupos Controle (200,9) ($p = 0,0075$), Tumor (260,6) ($p = 0,0051$) e Tumor+CD (226,7) ($p = 0,0041$). O grupo Tumor (260,6) é significativamente maior quando comparado como grupo CD (117,0) ($p = 0,0051$) e o grupo Tumor+CD (226,7) ($< 0,0001$).

948

949

950

951

952

953

Na figura 17 é possível observar nos grupos as células que produzem o fator de transcrição ROR γ T, e é possível demonstrar que a produção dessa citocina pelo grupo Tumor+CD (78,84) é maior quando comparado com os demais grupos Controle (54,36) ($p = 0,0125$), CD (58,00) ($p = 0,0355$) e Tumor (71,96) ($p = 0,0380$). Na Média de Intensidade de Fluorescência o grupo CD (90,20) possui o valor de mediana significativamente menor quando comparado com o grupo Controle (250,1),

954 Tumor (71,96) ($p= 0,0123$) e Tumor+CD (164,6) ($p= 0,0069$). O grupo Tumor (71,96)
 955 também possui valor de mediana significativamente maior quando comparado com o
 956 grupo Tumor+CD (164,6) ($p= 0,00271$) e o grupo CD (58,00) ($p= 0,0015$), além de
 957 do grupo Controle já dito anteriormente.

958

959

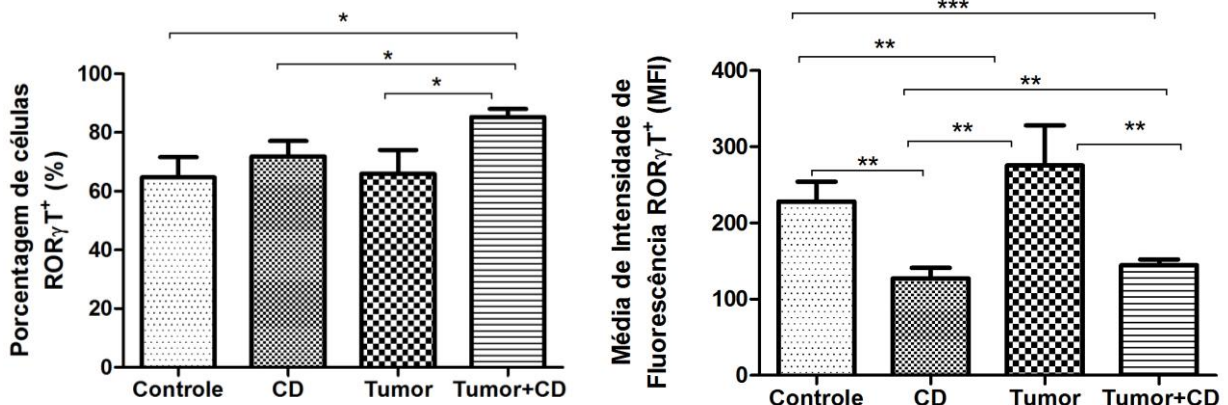
960

961

962

963

964



965

966

967

968

969

970

971

972

973

974

975

976

977

978

979

980

981

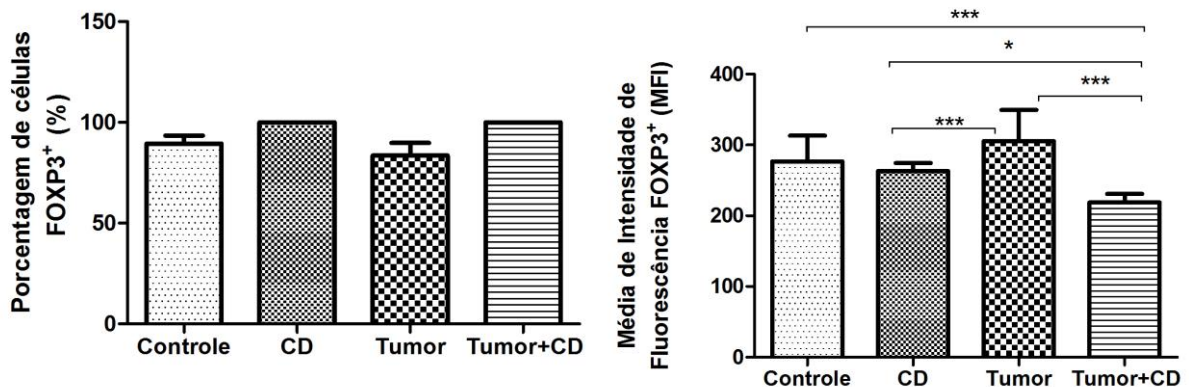
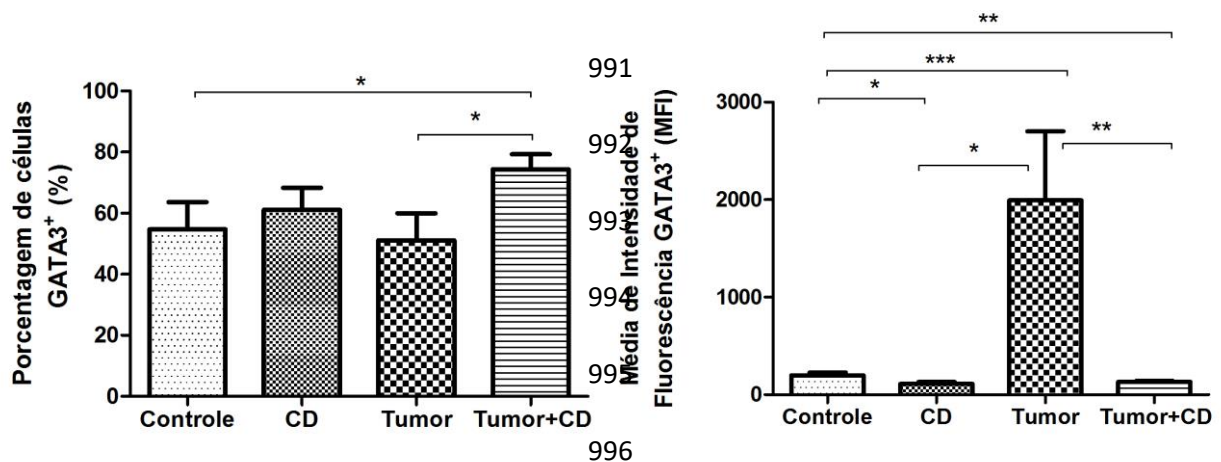


Figura 17: Porcentagem e média de intensidade fluorescência de ROR γ T⁺ em macrófagos CD14⁺. Avaliação por citometria de fluxo da porcentagem de macrófagos CD14⁺/ IFN γ ⁺ obtidos do lavado peritoneal de camundongos Balb/C saudáveis ou com tumor de mama induzidos pelas células 4T1 submetidos ou não a imunoterapia com CD. Os resultados foram expressos em mediana, valores máximo e mínimo. Os resultados foram analisados utilizando teste T. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,0006$ e *** $p < 0,0001$. %: Porcentagem de células; MFI: Média de intensidade de Fluorescência.

Figura 18: Porcentagem e média de intensidade fluorescência de FOXP3⁺ em macrófagos CD14⁺. Avaliação por citometria de fluxo da porcentagem de macrófagos CD14⁺/ FOXP3⁺ obtidos do lavado peritoneal de camundongos Balb/C saudáveis ou com tumor de mama induzidos pelas células 4T1 submetidos ou não a imunoterapia com CD. Os resultados foram expressos em mediana, valores máximo e mínimo. Os resultados foram analisados utilizando teste T. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,0006$ e *** $p < 0,0001$. %: Porcentagem de células; MFI: Média de intensidade de Fluorescência.

982 Na figura 18 é possível visualizar a produção do fator de transcrição FOXP3
 983 por todas as células de todos os grupos experimentais, porém, não houve
 984 significância estatística entre os grupos. Já na média de Intensidade de
 985 fluorescência é possível ver que o grupo Tumor+CD (233,0) é significativamente
 986 menor que os demais grupos Controle (207,2) ($p= 0,0002$), CD (233,0) ($p= 0,0121$) e
 987 Tumor (261,3) ($p= < 0.0001$). O grupo Tumor (261,3) também apresenta um valor de
 988 mediana significativamente maior quando comparado com o grupo CD (233,0) ($p= <$
 989 0.0001).

990



997 **Figura 18: Porcentagem e média de intensidade fluorescência de GATA3+ em macrófagos**
 998 **CD14+.** Avaliação por citometria de fluxo da porcentagem de macrófagos CD14+/ GATA3+ obtidos do
 999 lavado peritoneal de camundongos Balb/C saudáveis ou com tumor de mama induzidos pelas células
 4T1 submetidos ou não a imunoterapia com CD. Os resultados foram expressos em mediana,
 valores máximo e mínimo. Os resultados foram analisados utilizando teste T. As diferenças
 observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%), onde * $p < 0,05$; ** $p < 0,0006$ e
 *** $p < 0,0001$. %: Porcentagem de células; MFI: Média de intensidade de Fluorescência.

1000 Na Figura 19 é possível ver a porcentagem de células que produziram o fator
 1001 de transcrição GATA3. É possível observar que o grupo Tumor+CD (65,99) possui
 1002 um valor estatístico significativamente maior quando comparado com o grupo Tumor
 1003 (39,51) ($p= 0,0316$) e o grupo Controle (46,62) ($p= 0,0346$). Já na análise da Média
 1004 de intensidade de Fluorescência podemos observar que o grupo Tumor (193,0)
 1005 possui maior valor de mediana quando comparado com o grupo Tumor+CD (153,9)
 1006 ($p= 0,0019$), Controle (188,9) ($p= 0,0011$) e CD (60,12) ($p= 0,0187$). O grupo controle
 1007 também possui um maior valor de mediana significante quando comparado com o
 1008 grupo CD (60,12) ($p= 0,0241$) e Tumor+CD (153,9) ($p= 0,0018$).

1009

1010

1011

1012

1013

1014

1015

1016

1017

1018

1019

1020

1021

1022

1023

1024

1025

1026

1027

1028

1029

1030

Discussão

1031

1032 **5. DISCUSSÃO**

1033 Atualmente, o câncer de mama é o tipo de neoplasia mais incidente entre as
1034 pessoas do sexo feminino, mostrando cada vez mais a importância da pesquisa
1035 nessa área. Desse modo, a imunoterapia vem trazer uma nova abordagem
1036 terapêutica no tratamento do câncer, e ainda dentro das imunoterapias a vacina de
1037 CD é abordada com o objetivo de modular a fisiologia do sistema imune através de
1038 citocinas que fazem com que os linfócitos TCD4+ *naive* ao serem ativados deixem
1039 de apresentar uma maior quantidade de fenótipo padrão Th2 para uma maior
1040 quantidade do fenótipo padrão Th1, deste modo o próprio organismo será induzido a
1041 expressar citocinas que irão auxiliar na destruição do câncer sendo com a ação anti-
1042 tumoral, portanto, cada vez mais importante as pesquisas científicas que abordam
1043 essa temática (ALEIXO et al, 2013; MATIAS et al, 2013; COHN e DELMARRE, 2014;
1044 DUBROT et al, 2014; INCA, 2016; MILLS, LENZ e HARRIS, 2016).

1045 A indução do perfil Th1 dos linfócitos T CD4+ pelas CD favorece a polarização
1046 dos macrófagos para o perfil M1 de células através da expressão do INF γ , o qual
1047 ativa vias de sinalizações nos macrófagos que irão por fim realizar a expressão de
1048 citocinas antitumorais, ou seja, que irão atuar na eliminação de células neoplásicas
1049 expressando citocinas como INF γ , TNF α e IL-12, e diminuindo a polarização dos
1050 macrófagos para o perfil M2 de modo que a expressão de citocinas pró-tumorais
1051 como VEGF β , TGF β e IL-10 também terão o nível de expressão diminuído,
1052 demonstrando que a vacina de células dendríticas através da modulação do
1053 linfócitos Th1 terminam por influenciar a troca de perfil de outras células do sistema
1054 imune, como no caso dos macrófagos (MOSSER et al, 2008; ALEIXO et al, 2013;
1055 LIU et al, 2014; MILLS, LENZ e HARRIS, 2016; CUNHA, MICHELIN e MURTA,
1056 2016).

1057 No presente estudo visualmente foi possível verificar que a imunoterapia
1058 utilizando a vacina de CD continua trazendo benefícios na redução do volume
1059 tumoral quando a mesma é administrada comparada com o grupo tumor, ou seja,
1060 que não recebeu a terapia com CD, assim como visto nos estudos trazidos pela

1061 literatura que também administraram a imunoterapia com CD em seus tratamentos.
1062 (ALEIXO et al, 2013; CUNHA, MICHELIN e MURTA, 2016).

1063 O presente estudo também constatou através da técnica de citometria de
1064 fluxo a diminuição tanto da porcentagem quanto da média de intensidade de
1065 fluorescência das células com marcação para CD14 no grupo Tumor+CD, sendo
1066 esse um grupamento ou *cluster* de diferenciação específico para macrófagos, neste
1067 caso podemos deduzir a imunoterapia com CD que pode ter atuado auxiliando na
1068 redução de macrófagos do perfil M2 e por sua vez os macrófagos associados ao
1069 tumor que conforme é descrito na literatura tem um comportamento pró-tumoral na
1070 produção de suas quimiocinas e citocinas. (ALEIXO et al, 2013; LENZ e HARRIS,
1071 2016).

1072 Porém células CD14 com a polarização para o perfil M1 também podem ter
1073 diminuído no grupo Tumor+CD quando comparado com o grupo Tumor, a vacina de
1074 CD tem o objetivo de direcionar o sistema imune a um comportamento anti-tumoral
1075 conforme descrito anteriormente, ao ser estimulada na cultura de células com o
1076 antígeno tumoral específico, no caso a antígeno tumoral das células 4T1, as CD em
1077 cultura que vão ser inoculadas nos camundongos irão atuar, portanto no sistema
1078 imune como um todo. É bem estabelecido pela literatura que o câncer e o processo
1079 inflamatório crônico estão intimamente ligados, sendo o processo inflamatório
1080 contínuo, produtor de citocinas, quimiocinas e importantes fatores de crescimento
1081 tumoral, e de angiogênese que vão auxiliar na promoção tumoral. (BARRETO et al,
1082 2011)

1083 No presente estudo foi possível observar através das citocinas pró
1084 inflamatórias analisadas como o TNF α , IL-12, INF γ e a IL-17 que houve uma menor
1085 proporção da porcentagem de células CD14 que produziram essas citocinas como
1086 também na média de intensidade de fluorescência quando se compara o grupo
1087 Tumor+CD com o grupo Tumor, de modo que quando é correlacionado com a
1088 redução do volume tumoral no grupo Tumor+CD é sugerido que a imunoterapia de
1089 CD pode estar atuando no processo inflamatório através da redução dos macrófagos
1090 do perfil M1 do lavado peritoneal e por tanto levando a uma diminuição da

1091 inflamação sistêmica, desenvolvendo a ação antitumoral esperada pela imunoterapia
1092 com CD.

1093 Neste trabalho também foi possível detectar a diminuição da expressão de IL-
1094 10 na cultura do sobrenadante de macrófagos, como também a sua redução na
1095 porcentagem de células que expressaram essa citocina e na média de intensidade
1096 de fluorescência no grupo Tumor/CD quando comparado com o grupo Tumor, a
1097 citocina IL-10 é uma importante citocina que participa da promoção tumoral
1098 destacando, portanto a ação da vacina no potencial de modulação do sistema imune
1099 conduzindo o mesmo para uma ação antitumoral, reduzindo, então a ação
1100 imunossupressora que a IL-10 tem mediante o microambiente tumoral.

1101 O atual trabalho também verificou a citocina TGF β , importante na
1102 angiogênese e na progressão tumoral expressão na cultura de sobrenadante de
1103 células, que obteve uma redução na sua expressão no grupo Tumor/CD quando
1104 comparado com o grupo tumor que poderá reduzir os efeitos de TGF β no
1105 microambiente tumoral, demonstrando que a terapia com célula dendrítica possui
1106 potencial terapêutico e imunomodulador.

1107 Aleixo et al (2013), em seu estudo utilizando camundongos Balb/c com câncer
1108 de mama induzidos por células da linhagem tumoral DMBA e também tratados com
1109 vacinas de células dendríticas, demonstrou o aumento da expressão de citocinas do
1110 perfil M1 (IL-12 e IFN- γ) e redução das citocinas do perfil M2 (IL-4, IL-10 e TGF- β) na
1111 dosagem de citocinas dos macrófagos do lavado peritoneal de modo que este
1112 trabalho é relevante para o presente estudo que também demonstra um perfil de
1113 polarização M1 dos macrófagos do lavado peritoneal após o tratamento com a vacina
1114 de Células Dendríticas.

1115 Na literatura é pouco descrito sobre os fatores de transcrição FOXP3, GATA3,
1116 ROR γ T e Tbet em macrófagos, eles são mais amplamente descritos nos linfócitos e
1117 nas séries celulares hematopoiéticas, porém recentemente alguns trabalhos
1118 demonstraram a presença desses fatores de transcrição nos macrófagos e que
1119 podem ser essenciais no direcionamento da polarização dos mesmos quando estes

1120 estão presentes no microambiente tumoral e em demais doenças (MANRIQUE et al,
1121 2011; VADASZ e TOUBI, 2016, ZHANG et al, 2016, WU et al, 2016).

1122 Manrique e seus colaboradores (2011) concluíram em seus trabalhos, que a
1123 presença de FOXP3 nos macrófagos os direciona para um comportamento
1124 imunossupressivo, como o que acontece nas células Treg, em nosso estudo na
1125 técnica de citometria de fluxo na análise da porcentagem de células CD14 não
1126 houve significância, porem na análise da média de intensidade de fluorescência o
1127 FOXP3 possui um valor de media inferior no grupo Tumor/CD quando comparado
1128 om o grupo Tumor, sugerindo uma possível atuação da imunoterapia de CD
1129 direcionando as células para a supressão da produção de FOXP3, porem como são
1130 poucos os estudos na literatura sobre esse fator de transcrição nos macrófagos,
1131 mais estudo são sugeridos.

1132 Quanto ao fator de transcrição GATA3, existem alguns estudos que dizem ser
1133 esse fator de transcrição que influencia na polarização do macrófago para o perfil
1134 M2, perfil esse pró-tumoral diante do microambiente tumoral, Zhang e colaboradores
1135 (2016) em seus estudos com camundongos analisaram os MATs, verificando que a
1136 presença de GATA3 ocasionou o aumento de VEGF e, portanto, pode levar ao
1137 aumento da neovascularização. Em nosso estudo foi possível verificar um aumento
1138 de GATA3 no grupo Tumor/CD na porcentagem de células CD14 com marcação
1139 para GATA3, porém a média de intensidade de fluorescência é menor no grupo
1140 Tumor+CD quando comparado com o grupo tumor, esse achado sugere que a
1141 vacina pode estar influenciando na expressão do GATA3, demonstrando que a
1142 célula CD14 possui o fator de transcrição, exigindo mais mecanismos ainda não bem
1143 descritos para a sua expressão.

1144 Ainda não foram descritos na literatura estudos que trouxessem a relação do
1145 fator de transcrição Tbet com os macrófagos, porém é bem estabelecida a
1146 importância desse fator de transcrição nos linfócitos TCD4+ para a diferenciação no
1147 linfócito de padrão Th1 e para a produção e expressão de INF γ (WANG, COLLINS e
1148 KUCHROO, 2015; GOLUBOVSKAYA e WU, 2016).

1149 No presente estudo foi demonstrado que a média de intensidade de
1150 fluorescência de Tbet, nos macrófagos do grupo tumor tratado (SF 0,9%) é
1151 significativamente maior quando comparado com o grupo tumor tratado (CDs),
1152 sugerindo que esse pode estar envolvido na redução do padrão inflamatório, que por
1153 sua vez estão atuando na diminuição da inflamação crônica e na redução do volume
1154 tumoral.

1155 Também é pouco descrito sobre ROR γ T e sua relação com os macrófagos,
1156 contudo é conhecida a importante relação do fator de transcrição ROR γ T na
1157 diferenciação do linfócito T no padrão Th17, Wu e colaboradores (2016) realizaram
1158 um experimento com camundongos no qual eles conseguiram demonstrar que a
1159 ausência do fator de transcrição nos macrófagos leva a um recrutamento falho dos
1160 mesmos para a resposta inflamatória levando a hipótese de que o ROR γ T é um fator
1161 de transcrição importante para ação inflamatória e, portanto pode atuar diretamente
1162 na via de ativação e sinalização de ação e promoção antitumoral.

1163 Em outro trabalho Ye e Colaboradores (2014) verificaram que a atenuação da
1164 produção de IL-10 pode levar a supressão do fator de transcrição ROR γ T, que por
1165 sua vez pode levar a diminuição do perfil de polarização M1. No presente estudo o
1166 fator de transcrição ROR γ T possui uma maior porcentagem de células que o produz
1167 no grupo Tumor+CD quando comparado com os demais grupos, porém possui uma
1168 média de intensidade fluorescência menor quando comparado com os demais
1169 grupos. No presente trabalho a porcentagem de células que expressaram o ROR γ T
1170 na técnica da citometria de fluxo no grupo Tumor/CD foi maior quando comparado
1171 com o grupo Tumor, supondo que a terapia com as células dendríticas possa de
1172 alguma maneira estar influenciado na ativação desse e também dos outros fatores
1173 de transcrição.

1174 O atual estudo se mostrou relevante, demonstrando dados importantes
1175 alcançados com a aplicação da vacina de células dendríticas, demonstrando o
1176 importante potencial que a vacina pode alcançar no tratamento clínico, de encontro
1177 aos achados presentes na literatura. O atual trabalho sugere uma importante ação
1178 antitumoral desta imunoterapia, diante da supressão de importantes citocinas pró-
1179 tumorais e a potencialização de um perfil de citocinas antitumorais. Também foi
1180 demonstrado a importância de maiores estudos com os fatores de transcrição

1181 FOXP3, GATA3, ROR γ T e Tbet, se trata de dados relevantes, com tudo é algo que
1182 ainda foi pouco abordado e de pouca informação na literatura, e se faz necessários
1183 maiores estudos para o aprofundamento da presença desses fatores de transcrição
1184 nos macrófagos.

1185

1186

1187

1188

1189

1190

1191

1192

1193

1194

1195

1196

1197

1198

1199

1200

1201

1202

1203

1204

1205

1206

1207

1208

1209

1210

1211

1212

1213

1214

1215

1216

1217

1218

1219

1220

1221

1222

1223

1224

1225

1226

1227

1228

1229

1230

1231

1232

1233

1234

1235

1236

1237

1238

1239

1240

1241

1242

1243

1244

1245

Conclusão

1246 6. CONCLUSÕES

1247 Considerando os resultados obtidos no presente trabalho, em relação à
1248 influência da vacina com células dendríticas em camundongos Balb/c submetidos à
1249 indução de tumores experimentais de mama, com posterior imunoterapia aplicadas
1250 em três doses, sendo uma dose por semana, em um período de 03 semanas
1251 consecutivas e seguida pela cultura e análise dos macrófagos do lavado peritoneal,
1252 conclui-se que:

1253 - A vacina atua na redução visível do volume tumoral no grupo que foi tratado com a
1254 vacina de célula dendrítica quando este é comparado com o grupo tumor, sendo que
1255 é possível efetivamente dizer que a imunoterapia com CD atuou diretamente com
1256 uma ação antitumoral no microambiente tumoral.

1257 - A imunoterapia com células dendríticas direcionou uma redução da concentração
1258 da porcentagem dos macrófagos (CD14) e consecutivamente das citocinas IFN γ ,
1259 TNF α , IL-12 e IL-17, diminuindo a resposta inflamatória sistêmica, e também
1260 diminuindo as citocinas pró-tumoral como a IL-10 e o TGF.

1261 - A expressão dos fatores de transcrição FOXP3, GATA3, ROR γ T e Tbet nas células
1262 CD14 é relevante o aumento da porcentagem de células CD14 com ROR γ T no
1263 grupo Tumor/CD quando comparado com o grupo tumor relevante, assim como as
1264 médias de intensidade de fluorescência FOXP3, GATA3, ROR γ T e Tbet, porém
1265 pouco foi descrito na literatura e mais estudos são necessários.

1266 Deste modo, pode-se sugerir através do presente estudo que a imunoterapia
1267 parece ser capaz de modular o perfil de polarização dos macrófagos para um perfil
1268 M1 e potencializar a sua resposta para um perfil de expressão de citocinas para uma
1269 resposta antitumoral, no atual modelo experimental proposto mediante ao tumor de
1270 mama induzido pela linhagem celular 4T1, em fêmeas de camundongos.

1271 O presente trabalho mostrou-se relevante, os seus resultados demonstraram
1272 a importância da imunoterapia com células dendríticas, evidenciando o potencial que
1273 a vacina pode demonstrar no tratamento clínico.

1274

1275

1276

1277

1278 **Referências Bibliográficas**

- 1279 ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7a.
1280 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 389-405. 2011.
- 1281 ALEIXO, A. A.R.; MICHELIN, M. A.; MURTA, E.F. C.; Immunotherapy with dendritic
1282 cells as a cancer treatment: perspectives and therapeutic potential. **Recent patents**
1283 **on endocrine, metabolic & immune drug discovery**, v. 7, n. 3, p. 226-232, 2013.a
- 1284 ANDERSON, W.F.; ROSENBERG, P.S., PRAT, A., PEROU, C.M., & SHERMAN,
1285 M.E. How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or
1286 more?. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 8, p. dju165, 2014.
- 1287 BANCHEREAU, J.; PALUCKA, K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against
1288 cancer. **Nature**.v. 5, 2005.
- 1289 BARRETO, R.C.; PEREIRA, G.A.S.; COSTA, L.J.; CAVALCANTI, H.R.B.B. O duplo
1290 papel da inflamação no surgimento das lesões cancerígenas. **Rev Brasileira de**
1291 **Ciências da Saúde**. vol. 14, n.4, p. 1-7-104, 2011
- 1292 CORALLES, L.; MATSON, V.; FLOOD, B.; SPRANGER, S.; GAJEWSKI, T.F. Innate
1293 immune signaling and regulation in câncer immunotherapy. **Cell Research**,
1294 advanced online publication, p.1-13, 2016.
- 1295
- 1296 CUNHA, A.; MICHELIN, M.A.; MURTA, E.F.C.; PHENOTYPIC PROFILE OF
1297 DENDRITIC AND T CELLS IN THE LYMPH NODE OF BALB/C MICE WITH
1298 BREAST CANCER SUBMITTED TO DENDRITIC CELLS IMMUNOTHERAPY.
1299 **Immunology Letters**, Accepted Manuscript. 2016
- 1300
- 1301 FAUSTINO-ROCHA, A. ET AL. Estimation_of_rat_mammary_tumo.pdf. **Lab Animal**,
1302 v. 42, n. 6, p. p.217, 2013.
- 1303
- 1304 FLISENBERG, T.W.; BOES, M. Application of antigen cross-presentation research
1305 into patient care. **Frontiers in immunology**. v.5, n.287, p.1-3, 2014.

- 1306 FRIDMAN, W.H.; PAGÈS, F.; SAUTÈS-FRIDMAN, C.; GALON, J. The immune
1307 contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nature Reviews Cancer**,
1308 v. 12, n. 4, p. 298-306, 2012.
- 1309 FOSTER, A.E.; SONG, X.T. Modification of T lymphocytes to express tumor
1310 antigens. **Methods in molecular biology**, v.1139, p. 169-70, 2014.
- 1311 GALATI, D.; CORAZZELLI, G.; FILLIPPI, R.; PINTO, A. Dendritic cells in
1312 hematological malignancies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 108, p.
1313 86-96, 2016.
- 1314
- 1315 GOLUBOVSKAYA, V e WU, L, Different Subsets of T Cells, Memory, Effector
1316 Functions, and CAR-T Immunotherapy, **Cancers**. v.8, p.36, 2016.
- 1317
- 1318 INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Incidência do Câncer no**
1319 **Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação**
1320 **de Prevenção e Vigilância. 2016.** Rio de Janeiro. Disponível
1321 <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>. Acesso em 26/09/2016, v. 20, 2016.
- 1322 JIANG, X. Macrophage-produced IL-10 limits the chemotherapy efficacy in breast
1323 cancer. **Journal of Zhejiang University. Science**. v. 16, n. 1, p. 44-45, 2015.
- 1324 KOVALEVA, O.V.; SAMILOVA, D.V.; SHITOVA, M.S.; GRATCHEV. A. Tumor
1325 Associated Macrophages in Kidney Cancer. **Analytical Cellular Pathology**. v.2016,
1326 p.1-6, 2016.
- 1327 LIU, Y.C.; ZOU, X.B.; CHAI, Y.F.; YAO, Y.M. Macrophage Polarization in
1328 Inflammatory Diases. **International Journal of Biological Sciences**. v. 10, n. 15,
1329 p.520-529, 2014.
- 1330 MARCUS, A.; GOWEN, B.G.; THOMPSON, T.W.; IANNELLO, A.; ARDOLINO, M.;
1331 DENG, W.; WANG, LIN.; SHIFRIN, N.; RAULET, D.H.; Recognition of tumors by the
1332 innate immune system and natural killer cells. **Advances in immunology**, v. 122, p.
1333 91, 2014.

- 1334 MANRIQUE, S.Z.; CORREA, M.A.D.; HOELZINGER, D.B.; DOMINGUEZ, A.L.;
1335 MIRZA, N.; LIN, H.H.; STEIN-STREILEIN, J.; GORDON, S.; LUTSGARTEN. Foxp3-
1336 positive macrophages display immunosuppressive properties and promote tumor
1337 growth. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 208, n. 12, p. 2561, 2016.
- 1338 MARTINEZ, F.O.; GORDON, S.; The M1 and M2 paradigm macrophage action: time
1339 for reassessment. **F1000 Prime Reports**. v. 3, p. 6-13, Mar, 2014.
- 1340 MATIAS, B.F.; OLIVEIRA, T.M.; RODRIGUES, C.M.; ABDALLA, D.R.; MONTES, L.;
1341 MURTA, E.F.C.; MICHELIN, M.A. Influence of immunotherapy with autologous
1342 dendritic cells on innate and adaptive immune response in cancer. **Clinical Medicine**
1343 **Insights. Oncology**, v. 7, p. 165, 2013.
- 1344 MOORE, K.L.; DALLEY, A. F.; AGUR, A.M.R.; **Anatomia orientada para a clínica**.
1345 Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2014. 7a. ed.
- 1346 MOSSER, D.M.; JUSTIN, P.E.; Eploring the full spectrum of macrophage activation.
1347 **Nature Reviews Immunology**. v.8, n. 12, p.958-69., Dez, 2008.
- 1348 MILLS, C.D.; LENZ, L.L.; ROBERT, A.H. A Breakthrough: Macrophage-Directed
1349 Cancer Immunotherapy. **Cancer Research**. v. 17, 2016.
- 1350
- 1351 ONUCHIC A.C., CHAMMAS R. Câncer e o microambiente tumoral. **Rev Med (São**
1352 **Paulo)** v.89, n.1, p. 21-31, 2010.
- 1353 PALUCKA, A.K., UENO, H., CONNOLLY, J., KERNEIS-NORVELL, F., BLANCK,
1354 J.P., JOHNSTON, D.A., FAY, J. & BANCHEREAU, J. Dendritic cells loaded with
1355 killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1
1356 specific CD8+ T-cell immunity. **J Immunother**. v. 29 p. 545–557, 2006.
- 1357 PULASKI, B.A.; OSTRAND-ROSENBERG. Mouse 4T1 Breast Model. **Current**
1358 **Protocols in Immunology**. p. 20.2.1 – 2.16.
- 1359 PAN, X.Q.; The mechanism of the anticancer function of M1 macrophages and their
1360 use in the clinic. **Chinese Journal of Cancer**. v. 31, N.12, p.557-563. Dec. 2012.
- 1361

- 1362 RAVAL, R.R.; SHARABI, A.B.; WALKER, A.J.; DRAKE, C.G.; SHARMA, P.; Tumor
1363 immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. **J**
1364 **Immunother Cancer**. v.14, p.2-14, 2014.
- 1365 RHEE, I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. **Archives of**
1366 **Pharmacal Research**, 2016
- 1367 SLANEY, C.Y.; RAUTELA, J.; PARKER, B. S. The emerging role of
1368 immunosurveillance in dictating metastatic spread in breast cancer. **Cancer**
1369 **research**, v. 73, n. 19, p. 5852-5857, 2013.
- 1370 TAO, K.; FANG, M.; ALROY, J.; SAHAGIAN, G.; Imagable 4T1 model for the study of
1371 late stage breast cancer. **BMC cancer**, v. 8, n. 1, p. 228, 2008.
- 1372 TAO, Z.; SHI, A.; LU, C.; SONG, T.; ZHANG, Z.; ZHAO, J. Breast Cancer:
1373 Epidemiology and Etiology. **Cell biochemistry and biophysics**, p. 1-6, 2014.
- 1374 VADASZ, Z.; TOUBI, E. FoxP3 Expression in Macrophages, Cancer, and B Cells—Is
1375 It Real? **Clinical review Allergy and Immunology**. v. 016., p. 8572, 2016.
1376
- 1377 VO, J.L.; YANG, L.; KURTZ, S.L.; SMITH, S.G.; KOPPOLU, B.P.;
1378 RAVINDRANATHAN, S.; ZAHAROFF, D.A.; Neoadjuvant immunotherapy with
1379 chitosan and interleukin-12 to control breast cancer metastasis. **Oncoimmunology**,
1380 v.3, n.2, jan 2015.
1381
- 1382 YE, L.; WEN, Z.; LI, Y.; CHEN, B.; YU, T.; LIU, L.; ZHANG, J; MA., Y.; XIAO, S.;
1383 DING. L.; LI, L.; HUANG, Z. Interleukin-10 attenuation of collagen-induced arthritis is
1384 associated with suppression of interleukin-17 and retinoid-related orphan receptor γ
1385 production in macrophages and repression of classically activated macrophages.
1386 **Arthritis Research & Therapy**. v.16, n. r96, 2014.
- 1387
- 1388
- 1389
- 1390
- 1391

1392

1393

1394

1395

1396

1397

1398

1399

1400

1401

1402

1403

1404

1405

1406

1407

1408

1409

1410

1411

1412

1413

1414

1415

1416

1417

1418


Anexos

1419

1420

1421
1422

ANEXO I COMPROVANTE DE PROTOCOLO NO CEUA/UFTM



Ministério da Educação
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Av. Frei Paulino nº 30 – 2º andar - Sala A1 – CEA-Centro Educacional e Administrativo – Bairro Abadia
CEP: 38025-180 – Uberaba-MG - Tel: (034) 3318 5082 - E-mail: ceua@proppaq.uftm.edu.br

Comprovante de protocolo na CEUA – UFTM

() Ensino (X) Pesquisa

Número do protocolo: 289

Recebido por: *Paula Maria*
Secretária da CEUA/UFTM
25/06/13

Consulte o andamento do protocolo no site da UFTM (ensino>pós-graduação>pesquisa CEUA>listagem de projetos)

1423
1424
1425
1426
1427
1428
1429

ANEXO II COMPROVANTE DE APROVAÇÃO NO CEUA/UFTM

287 25/06/2013	Efeito da pressão sonora no bem estar animal	Afonso Pelli	Aprovado 06/09/2013
288 25/06/2013	Avaliação de mecanismos da apoptose no coração na doença de Chagas experimental	Virmondes Rodrigues Junior	Aprovado 07/02/2014
289 25/06/2013	Avaliação do infiltrado tumoral em camundongos induzidos a tumor de mama tratadas com células dendríticas.	Eddie Fernando Candido Murta	Aprovado 18/10/2013
290 25/06/2013	Análise da expressão de fatores de transcrição ligados aos perfis TH1, TH2, TH17 e Treg, em camundongos com tumor de mama tratados com células dendríticas.	Márcia Antoniazzi Michelin	Aprovado 18/10/2013
291 26/06/2013	Formação de sistema tampão em águas de aquários com guaru, <i>Poecilia reticulata</i> Peters, 1859.	Afonso Pelli	Retirado 14/03/2014