

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
INSTITUTO DE PESQUISA EM ONCOLOGIA**

ELIAS XAVIER MIRANDA ALVES SILVA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ANTITUMORAL EM MODELOS
EXPERIMENTAIS INDUZIDOS A TUMOR DE MAMA E SUBMETIDOS A
IMUNOTERAPIA COM LINFÓCITOS TUMOR INFILTRANTES**

UBERABA-MG

2022

ELIAS XAVIER MIRANDA ALVES SILVA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ANTITUMORAL EM MODELOS
EXPERIMENTAIS INDUZIDOS A TUMOR DE MAMA E SUBMETIDOS A
IMUNOTERAPIA COM LINFÓCITOS TUMOR INFILTRANTES**

Projeto de Pesquisa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Imunologia Básica e Aplicada, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para defesa.

Orientadora: Dra. Márcia Antonizi Michelin

UBERABA-MG

2022

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

S579a Silva, Elias Xavier Miranda Alves
Avaliação da resposta imune antitumoral em modelos experimentais induzidos a tumor de mama e submetidos a imunoterapia com linfócitos tumor infiltrantes / Elias Xavier Miranda Alves Silva. – 2012.
60 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2012
Orientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin

1. Neoplasias mamárias. 2. Linfócitos do interstício tumoral. 3. Interleucina-2. 4. Imunoterapia. I. Michelin, Márcia Antoniazi. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 618.19-006

ELIAS XAVIER MIRANDA ALVES SILVA

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ANTITUMORAL EM MODELOS
EXPERIMENTAIS INDUZIDOS A TUMOR DE MAMA E SUBMETIDOS A
IMUNOTERAPIA COM LINFÓCITOS TUMOR INFILTRANTES**

Projeto de Pesquisa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Imunologia Básica e Aplicada, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para defesa.

Orientadora: Dra. Márcia Antonizi Michelin

08 de dezembro, 2022

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

Prof. Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Álvaro Ferreira Júnior
Universidade Federal de Goiás

Dedico este trabalho a minha esposa, a razão de sempre correr atrás do melhor para nossa família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por proporcionar absolutamente tudo! A vocês quem leem saibam que sem Deus nada disso seria possível e somente Ele merece toda glória desde trabalho. Grandes feitos têm sido realizados nesse trabalho e sempre a presença d'Ele estava me acompanhando e me auxiliando naquilo que eu estava receoso do que iria acontecer. A presença, o ensino, a calma, a confiança e a certeza de que tudo dará certo, somente veio até mim através de Graça que Deus pode proporcionar. Até mesmo quando as células usadas nesse trabalho não cresceram e, o simples fato de escrever o nome d'Ele na placa como identificação, as células proliferaram no meio de cultura somente embaixo do nome escrito. Testemunhas vivas estão em nosso laboratório para contar a história. À Ele toda glória!

À minha esposa agradeço a confiança que é imposta em mim sobre aquilo que eu faço. Agradeço a ela porque mesmo que algumas coisas fundamentais pareciam impossíveis nesse mestrado, ela estava comigo na angústia e tristeza, e logo após, estava comigo no momento mais inesquecível das nossas vidas. Nosso casamento! Que os frutos colhidos deste título venham ser diretamente direcionados a ela. A qual jamais conseguiria viver sem. Além do mais, em nossa casa, não poderia deixar de mencionar nossa amada Dalila, para nós, Dada. Nossa pequena companheira felina e peludinha, que mesmo em dias sentados no computador trabalhando, ela nunca me deixou só! Nunca!

Agradeço aos meus pais que sempre me deram o suporte necessário para seguir aquilo que eu verdadeiramente queria. Eles sempre foram e tenho a confiança que sempre serão um pilar extremamente forte, indestrutível, em minha vida e na vida da minha família. O desejo do meu coração é que futuramente eles venham colher o melhor desse mundo através de mim e de meu irmão, a qual eles sempre sofreram arduamente para nos dar o que não tinham. E sendo citado, agradeço ao meu irmão que mesmo longe sempre está envolvido, torcendo, extremamente interessado em tudo que desenvolvi neste trabalho. Ainda faremos coisas fantásticas, meu amigo!

Finalizo agradecendo a minha orientadora, Doutora Márcia Antonizi Michelin. Esta que me acolheu de braços abertos desde o primeiro dia que um simples bacharelado veio pedir uma oportunidade. Agradeço todos os ensinamentos, as direções, as explicações que hoje vejo que se hoje evolui na carreira acadêmica e na pesquisa, foi através de tudo aquilo que ela pode me proporcionar. E também, não poderia deixar de mencionar meus colegas do Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON), que estiveram diretamente comigo em todo desenvolver deste trabalho que através da sua companhia me ajudaram a crescer e a união que sempre tivemos tornaram os dias mais leves. A eles eu desejo todas as bençãos que nosso Deus pode proporcionar. Que cada um deles viva a vontade de Deus que sempre é boa, perfeita e agradável.

RESUMO

Os linfócitos tumor infiltrantes (TIL) são células da linhagem linfoide (linfócitos) encontradas nos tecidos tumorais capazes de promover uma resposta antitumoral eficiente contra vários tipos de cânceres. Neste trabalho procuramos compreender como essas células atuam no câncer de mama murino induzido pela linhagem celular 4T1, sendo esta semelhante ao câncer mamário triplo negativo em mulheres, e quais são os mecanismos desencadeados após a imunoterapia com TIL. No presente trabalho foram utilizados 54 camundongos separados em três grupos experimentais: (n=6) grupo controle, (n=12) grupo tumor isento de tratamento e (n=12) grupo TIL recebendo 2 doses da imunoterapia com TIL; e para produção da imunoterapia foram utilizados 24 animais (1 animal por inóculo), induzidos ao câncer de mama murino e após 28 dias de desenvolvimento, os animais foram eutanasiados e as amostras tumorais foram dissecadas mecanicamente para coleta dessas células, e cultivadas posteriormente com IL-2. Ao longo do processo de desenvolvimento tumoral dos grupos experimentais, mensuramos estes volumes tumorais macroscopicamente no intervalo de 2 dias a partir do sétimo dia de indução tumoral, e observamos que a imunoterapia condicionou diminuição estatisticamente significativa do crescimento tumoral no grupo tratado ($p < 0,0001$). Analisamos tanto em tumor como em baço por citometria de fluxo um aumento de linfócitos T totais (CD3+), T auxiliares (CD4+), T citotóxicos (CD8) e a expressão e secreção de CD25, IFN- γ , IL-2, IL-10 e TNF- α por linfócitos T auxiliares e linfócitos T citotóxicos. Observamos também nessas duas linhagens celulares a baixa expressão e secreção significativa de CD25, IL-2, IL-10, e a alta secreção de IFN- γ em amostras tumorais. O TNF- α foi altamente secretado em linfócitos T auxiliares, mas não em linfócitos T citotóxicos, em amostras tumorais; no baço, a secreção dessa citocina apresentou-se aumentada em ambos fenótipos linfocitários. O TGF- β e a IL-12 foram dosados por ELISA em sobrenadante de cultura de células tumorais e ambas citocinas apresentaram altas concentrações no grupo TIL. Através da coloração de H&E, observamos diminuição significativa de focos metastáticos em fígado no grupo tratado em comparação ao grupo tumor. Embora as repostas imunológicas em ambas amostras se comportem diferentes, a imunoterapia obteve resultados significantes contra o câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama. IL-2. Imunoterapia. Linfócitos Tumor-Infiltrantes.

ABSTRACT

Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) are cells of the lymphoid lineage (lymphocytes) found in tumor tissues capable of promoting an efficient antitumor response against various types of cancer. In this work, we tried to understand how these cells act in murine breast cancer induced by the 4T1 cell line, which is similar to triple negative breast cancer in women, and what are the mechanisms triggered after immunotherapy with TIL. In the present study, 54 mice were divided into three experimental groups: (n=6) control group, (n=12) tumor-free group and (n=12) TIL group receiving 2 doses of immunotherapy with TIL; and for the production of immunotherapy, 24 animals were used (1 animal per inoculum), induced to murine breast cancer and after 28 days of development, the animals were euthanized and the tumor samples were mechanically dissected to collect these cells, and later cultured with IL-2. Throughout the tumor development process of the experimental groups, we measured these tumor volumes macroscopically in the 2-day interval from the seventh day of tumor induction, and we observed that immunotherapy conditioned a statistically significant decrease in tumor growth in the treated group ($p < 0,0001$). We analyzed both tumor and spleen by flow cytometry an increase in total T lymphocytes (CD3+), T helper (CD4+), cytotoxic T lymphocytes (CD8) and the expression and secretion of CD25, IFN- γ , IL-2, IL-10 and TNF- α by helper T lymphocytes and cytotoxic T lymphocytes. We also observed in these two cell lines the low expression and significant secretion of CD25, IL-2, IL-10, and the high secretion of IFN- γ in tumor samples. TNF- α was highly secreted in helper T lymphocytes, but not in cytotoxic T lymphocytes, in tumor samples; in the spleen, the secretion of this cytokine was increased in both lymphocyte phenotypes. TGF- β and IL-12 were measured by ELISA in tumor cell culture supernatant and both cytokines showed high concentrations in the TIL group. Through H&E staining, we observed a significant decrease in metastatic foci in the liver in the treated group compared to the tumor group. Although the immune responses in both samples behaved differently, the immunotherapy obtained significant results against breast cancer.

Keywords: Breast cancer. IL-2. Immunotherapy. Lymphocytes Tumor-Infiltrating

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma da produção da imunoterapia	25
Figura 2	Fluxograma grupo tumor e TIL	26
Figura 3	Fluxograma experimental	26
Figura 4	Identificação das glândulas mamárias de camundongos	27
Figura 5	Representação da administração da imunoterapia	28
Figura 6	Estratégia de análise da citometria	31
Figura 7	Fotografia dos modelos experimentais do grupo tumor e grupo TIL induzidos a linhagem celular 4T1 no último dia de desenvolvimento tumoral	33
Figura 8	Influência da imunoterapia com linfócitos tumor infiltrantes em animais submetidos a indução tumoral com a linhagem 4T1 (câncer mamário)	34
Figura 9	Linfócitos totais e seus subtipos em células tumorais de modelos experimentais murinos induzidos ao câncer mamário 4T1	35
Figura 10	Linfócitos totais e seus subtipos em células esplênicas de modelos experimentais murinos induzidos ao câncer mamário 4T1.	36
Figura 11	Distribuição geral dos linfócitos em amostras tumorais e esplênicas de modelos experimentais murinos induzidos ao câncer mamário 4T1.	36
Figura 12	Expressão de CD25 nos subtipos linfocitários CD4 e CD8 em amostras tumorais e esplênicas dos grupos experimentais induzidos ao câncer mamário 4T1	37
Figura 13	Secreção de IFN- γ nos subtipos linfocitários CD4 e CD8 em amostras tumorais e esplênicas dos grupos experimentais induzidos ao câncer mamário 4T1	38
Figura 14	Secreção de IL-2 nos subtipos linfocitários CD4 e CD8 em amostras tumorais e esplênicas dos grupos experimentais induzidos ao câncer mamário 4T1	38

Figura 15	Secreção de IL-10 nos subtipos linfocitários CD4 e CD8 em amostras tumorais e esplênicas dos grupos experimentais induzidos ao câncer mamário 4T1	39
Figura 16	Secreção de TNF- α nos subtipos linfocitários CD4 e CD8 em amostras tumorais e esplênicas dos grupos experimentais induzidos ao câncer mamário 4T1	40
Figura 17	Concentração de TGF- β no sobrenadante de cultura de células tumorais 24 e 48 horas	41
Figura 18	Concentração de IL-12 no sobrenadante de cultura de células tumorais 24 e 48 horas.	42
Figura 19	A imunoterapia com linfócitos tumor infiltrantes (TIL) promove redução de áreas metastáticas hepáticas de camundongos Balb/c induzidos a câncer mamário com 4T1	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Divisão dos grupos experimentais	25
Tabela 2	Marcações intra e extracelulares para células esplênicas e tumorais	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau <i>Celsius</i>
ACT	<i>Adoptive cellular therapy</i> (Terapia celular adotiva)
APC	<i>Allophycocyanin</i>
CAA	Célula apresentadora de antígeno
CD	<i>cluster of differentiation</i> (grupo de diferenciação)
CEUA	Comitê de ética em uso de animais
Cm	Centímetros
LTC	Linfócito T citotóxico
DC	Célula Dendrítica
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
FITC	Isotiacianato de fluoresceína
IFN- γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-7	Interleucina 7
IL-9	Interleucina 9
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-35	Interleucina 35
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPON	Instituto de Pesquisa em Oncologia

MFI	<i>Mean Fluorescence intensity</i> (Médida de intensidade de fluorescência)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mL	mililitros
Nf-kB	<i>Nuclear factor kappa β</i> (fator nuclear kappa β)
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PercpCY 5.5	<i>Peridinin Chlorophyll protein complex</i>
pg	Picograma
PHA	Fitohemaglutinina
px ²	Pixels ao quadrado
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
STAT4	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 4
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i> (Fator transformador beta)
Th1	T helper type 1
Th2	T helper type 2
Th17	T helper type 17
TIL	<i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i>
TME	<i>Tumor microenvironment</i> (microambiente tumoral)
TN	Triplo negativo
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> (Fator de necrose tumoral alfa)
Treg	Linfócito T regulatório
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
USA	The United States of America
μ l	Microlitro
μ m ²	Micrômetro ao quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 MODELOS EXPERIMENTAIS E LINHAGEM CELULAR 4T1.....	10
1.2 RESPOSTA IMUNE A TUMORES	11
1.2.1 ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T SIMULTÂNEA A EXPRESSÃO DE CD25	13
1.2.2 SECREÇÃO E FUNCIONALIDADE DO INTERFERON GAMA (IFN-γ)	14
1.2.3 SECREÇÃO E FUNCIONALIDADE DA INTERLEUCINA 2 (IL-2)	14
1.2.4 SECREÇÃO E FUNCIONALIDADE DA INTERLEUCINA 10 (IL-10) 15	
1.2.5 SECREÇÃO E FUNCIONALIDADE DO TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- α)	16
1.2.6 SECREÇÃO E FUNCIONALIDADE DO TRANSFORMING GROWTH FATOR BETA (TGF-β)	16
1.2.7 SECREÇÃO E FUNCIONALIDADE DA INTERLEUCINA 12 (IL-12) 17	
1.3 LINFÓCITO TUMOR INFILTRANTE (TIL).....	18
1.4 METÁSTASE HEPÁTICA	19
2 JUSTIFICATIVA	21
3 HIPÓTESES	22
4 OBJETIVOS GERAIS	23
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
5 METODOLOGIA	24
5.1 GRUPOS DE ANIMAIS	24
5.2 FLUXOGRAMA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	25
5.3 INDUÇÃO DE TUMORAL COM A LINHAGEM 4T1	26
5.4 PRODUÇÃO DA IMUNOTERAPIA DE LINFÓCITOS TUMOR INFILTRANTES	27
5.5 EUTANÁSIA E COLETA DE AMOSTRAS A SEREM ANALISADAS.....	28
5.6 MENSURAÇÃO DO VOLUME TUMORAL.....	29
5.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA HEPÁTICA	29
5.8 CITOMETRIA DE FLUXO DAS CÉLULAS DO TUMOR E BAÇO	29
5.9 ANÁLISE POR ELISA	31
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
6 RESULTADOS	33
6.1 VOLUME TUMORAL.....	33
6.2 PRESENÇA DOS LINFÓCITOS NO TUMOR E BAÇO.....	34
6.3 <i>CLUSTER OF DIFFERENTIATION 25 (CD25)</i>	37
6.4 <i>INTERFERON GAMMA (IFN-γ)</i>	37

6.5	<i>INTERLEUCINA 2 (IL-2)</i>	38
6.6	<i>INTERLEUCINA 10 (IL-10)</i>	39
6.7	<i>TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF-α)</i>	39
6.8	<i>TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA (TGF-β)</i>	40
6.9	<i>INTERLEUCINA 12 (IL-12)</i>	41
6.10	METÁSTASES HEPÁTICAS.....	42
7	DISCUSSÃO	44
8	CONCLUSÃO	48
9	REFERÊNCIAS	49
	ANEXO A – 23085.008739/2020-23 APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	57

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma enfermidade bem presente no mundo. A incidência de novos casos de câncer de mamas em mulheres no ano de 2020 foi de 2,3 milhões, incluindo homens e mulheres. (INCA, 2022). Sendo assim, é considerado um grande problema crônico e de extrema importância para a saúde pública, o que torna um campo de pesquisa promissor e essencial. (INCA, 2022).

O câncer mamário possui propriedades clínicas e patológicas agressivas, e tratamentos diversos (BAI, 2020). O câncer de mama mais agressivo já conhecido, o triplo negativo, compreende até 20% de todos os casos e possui características histológicas de alto grau de invasão, fisiopatogenia agressiva e com alta incidência de metástases (JANSSON S, 2018).

Acredita-se que os tumores mamários tenham um padrão órgão-específico para metástases, sendo que os sítios mais comuns de metástases nesse caso são: ossos, pulmões, cérebro e o fígado, sendo que qualquer órgão pode ser alvo da lesão. (KIM, 2021). A cirurgia, radioterapia e quimioterapia são as três principais medidas de tratamento atualmente contudo, condiciona vários efeitos colaterais expressivos. (NASCIMENTO CS., et al., 2021)

Sendo assim, as pesquisas para combate ao câncer de mama têm sido desenvolvidas mediante a necessidade de compreender os mecanismos envolvidos, usando uma linhagem celular em modelos experimentais que possuam semelhança com a patogenia nos tumores mamários em mulheres (VIEIRA J, et al., 2021).

1.1 MODELOS EXPERIMENTAIS E LINHAGEM CELULAR 4T1

O início das pesquisas em câncer de mama em modelos experimentais foi descrito por TAO (2008), e eram feitas inicialmente a partir das próprias células cancerosas da linhagem humana injetadas nos animais. Contudo, observou-se que o comportamento carcinogênico como a progressão do tumor, metástases ou desenvolvimento do microambiente tumoral eram insuficientes ou pobres em comparação a real patogenia. Ou seja, um modelo falho.

Mediante isso, começou-se a utilização de modelos experimentais mais específicos como os camundongos fêmeas Balb/c, pois a isogenia desses animais leva a padronização e

estabilização do modelo neoplásico (YANG L., et al., 2020). Subsequente ao modelo experimental, inicializou a utilização da linhagem celular 4T1 para câncer de mama específica para este modelo (YANG L., et al., 2020).

Esta linhagem possui propriedades de se desenvolver *in vitro* e *in vivo*, em modelos Balb/c. Por exemplo, YANG L., et al., (2020) demonstraram que tanto o tumor primário desenvolvido pela 4T1 como os mecanismos de metástase crescem exponencialmente quando inoculado na glândula mamária, sendo que nos 18° a 26° dias após indução tumoral o número e volume médio das metástases crescem significativamente.

Portanto, o desenvolvimento tumoral, imunopatologia e carcinogênese começou a ser suficiente para estudos na área (AMANI D., et al., 2021).

1.2 RESPOSTA IMUNE A TUMORES

A presença do sistema imunológico é algo que permeia todos os cânceres, sendo assim, há todo um infiltrado celular que compõe os tumores sólidos ou sistêmicos (COUSSENS et al., 2013). O câncer é visível para as células de defesa e esses antígenos tumorais são classificados como imunogênicos então, possuem capacidade de desencadear uma resposta imunológica, o que leva este sistema ser extremamente importante no combate aos tumores mediante diversos mecanismos e componentes para tentar defender o hospedeiro com eficácia. (PALUCKA A., COUSSENS L. 2016).

Os tecidos tumorais estabelecidos no hospedeiro compõem vastas conexões entre duas linhagens celulares locais ou até mesmo sistêmica que podem compor seu desenvolvimento ou comprometer, sendo essas mieloides e linfoides (PALUCKA A., COUSSENS L. 2016).

Segundo PALUCKA (2016), as células mieloides possuem funções essenciais no desencadear de toda a resposta imunológica antitumoral. Essa linhagem vinda de células pluripotentes, a diferenciam em vários outros tipos celulares diferentes como células dendríticas (DCs), macrófagos, granulócitos e, possuem funções como captura de antígenos, apresentação e funções efetoras nas respostas antitumorais.

Dentre essas células e funções, existe um grupo celular específico denominado de células apresentadoras de antígenos (APCs), composto por células dendríticas, macrófagos e

linfócitos B, que processam e apresentam antígenos proteicos via MHC (*major histocompatibility complex*) I e II aos linfócitos T (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

A linhagem celular linfoide é composta por linfócitos T que recebem essa apresentação antigênica por MHC em seu TCR (receptor de célula T), células natural killer (NK), células T $\gamma\delta$, células NKT (natural killer T) e células B (PALUCKA 2016). Além disso, é bem difundido na imunologia que os linfócitos T possuem tipos e subtipos com funcionalidades diferentes sendo linfócitos T CD8 (linfócitos citotóxicos), linfócitos T CD4+ (linfócitos auxiliar) com comportamento Th1, Th2 e Treg (TAY ER., et al., 2021).

Os linfócitos T CD8 são ativados após a comunicação via MHC do tipo I pelas células apresentadoras de antígenos e moléculas co-estimulatórias (CD80/86), sendo células potencialmente eficazes nas funções efetoras anticancerígenas (VAN DER LEUN AM., et al., 2020). Tais funções possuem um único objetivo de destruir células alvo a partir da secreção de altos níveis de enzimas citotóxicas como granzimas e perforinas (ZHANG G., et al., 2021). Além disso, Appay et al. (2008) nos mostram que essas células possuem capacidade de estabelecer memória imunológica, levando assim cada vez mais a eficácia antitumoral partindo do princípio que essa geração de CTL (linfócito T citotóxico) é ativada mais rapidamente após a reexposição ao antígeno.

Em funcionalidade diferente, os linfócitos T auxiliares não possuem capacidade citotóxica direta pela liberação de enzimas citolíticas, contudo, desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da imunidade antitumoral eficiente, mesmo que certas imunoterapias na atualidade visam ativar a resposta mais acentuada de CTL (TAY et al., 2021). A versatilidade funcional dessas células as torna essenciais na resposta contra o tumor, mas essas são susceptíveis ao TME (microambiente tumoral), e aos sinais presentes neste meio, levando à diferenciação do perfil desses linfócitos auxiliares (TAY et al., 2021).

O perfil Th1 das células T auxiliares está altamente vinculado a respostas contra tumores devida secreção de IFN- γ e TNF- α , levando ao perfil inflamatório conduzido por essas citocinas, e ser considerado o principal perfil antitumoral e alvo das imunoterapias na última década (YIN X., EISENBARTH S. C. 2021). O perfil Th2 está vinculado a resposta do tipo humoral, acúmulo de eosinófilos, produção de IgE e muco pelas células epiteliais pela alta secreção de IL-4, e fora provado em estudos com camundongos que este perfil está associado a evasão imune tumoral (TOSOLINI M., et al., 2011). Por último, o perfil Treg (T regulatório), está associado ao equilíbrio das respostas imunes onde seu principal papel é preservar o hospedeiro de desencadear uma resposta exacerbada frente ao antígeno, levando a expressão de

antígenos autólogos até a autoimunidade (GOSCHL L., et al., 2019). Entretanto, embora essa célula tende a controlar e manter a homeostase imunológica, há relatos de vastos infiltrados dessas células em tecidos tumorais em estado altamente ativo e proliferativo onde a célula tumoral usa ao seu favor modulando toda a resposta, por exemplo: inativando expressões de CD80/86 em células APCs, para que não haja eficiência na apresentação desses antígenos ao linfócitos T *naive*; a vasta expressão de CD25 em Treg no tumor faz com que haja a captura de IL-2 no TME, não deixando esta interleucina ativar outras células potencialmente antitumorais, como T CD8 (fenômeno esse mencionado como “supressão mediada por células Treg”) (TANAKA A., SAKAGUCHI S., 2019). Levando em consideração essas funcionalidades das células regulatórias, Sato et al. (2016) nos mostram que a depleção dessas células no TME é eficiente para tratamento, aumentando a resposta terapêutica, condicionando supressão e até mesmo erradicação tumoral.

1.2.1 ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T SIMULTÂNEA A EXPRESSÃO DE CD25

O *cluster of differentiation 25* (CD25) também conhecido com ILR2A, é um receptor presente na camada externa da membrana citoplasmática dos linfócitos T ativados, principalmente T regulatórios (LI J., et al., 2020). Sendo assim, como marcador de ativação linfocitária, este cluster não é expresso em células T *naive* (não ativadas via MHC/TCR), células T foliculares e até mesmo células T de memória. (PENG Y., et al., 2022).

Em relação a tumores sólidos humanos, estudos abordam que o CD25 muito expresso em Tregs levam estas células a se infiltrarem nesses tumores e condicionam o escape tumoral, invasão no microambiente e até metástases (PENG Y., et al., 2022).

Tratando-se de um receptor, o estímulo feito neste é através do seu ligante IL-2 (interleucina 2), que após a estimulação, condiciona a proliferação e diferenciação de células T (PENG Y., et al., 2022).

Posto isto, a diferenciação desses linfócitos auxiliares e seus fenótipos mencionados anteriormente, são mediados e induzidos a partir dos estímulos que permeiam toda resposta imunológica, sendo esses condicionados pelas citocinas (AKSOYLAR H., et al., 2020).

1.2.2 SECREÇÃO E FUNCIONALIDADE DO *INTERFERON GAMA* (IFN- γ)

O IFN- γ é uma citocina de dupla ação nas respostas imunológicas inatas e adaptativas sendo que, produzida principalmente por células natural killer (NK) na resposta inata; e por células Th1 e citotóxicas na resposta adaptativa (BURKE J. D., YOUNG H. A. 2019). Somando a isso, células T possuem propriedades de secreção autóloga desta citocina, ou seja, através de um feedback positivo, essas células se estimulam constantemente (ALSPACH E., et al., 2019).

Biologicamente considerada uma citocina pleiotrópica, sua nomenclatura como “interferon” se dá pela interferência no RNA viral quando fora descoberta e suas funcionalidades se dão por efeitos antivirais, antitumorais e imunomoduladoras (MENDOZA J. L., et al., 2019).

Considerando esta no microambiente tumoral, o IFN- γ possui propriedades antitumorais diretas onde os estímulos feitos em células adjacentes condicionam o aumento dessa resposta, levando células tumorais a morte (MAIMELA N. R., et al., 2018).

O IFN- γ exerce funcionalidades nos macrófagos, aumentando sua capacidade de resposta a moléculas inflamatórias, capacidade de destruir células tumorais, estimular recrutamento de células T para o tecido tumoral e reduz crescimento tumoral; nas células dendríticas, há regulação positiva dos complexos MHC I e II a qual estimula as funcionalidades de células T, além de evitar a super ativação e exaustão dessas respectivas respostas; nas células T, há estimulação da resposta Th1 e inibição de Th2 e Th17, aumento da citotoxicidade e inibição de Tregs (linfócitos T regulatórios) (JORGOVANOVIC D. et al., 2021).

1.2.3 SECREÇÃO E FUNCIONALIDADE DA *INTERLEUCINA 2* (IL-2)

Morgan., et al (1976), descobriram a interleucina 2 (IL-2), como um fator de proliferação de células T. Ao se tratar de uma citocina pleiotrópica, a IL-2 se destaca por ser secretada por linfócitos T e manter o controle da proliferação e ativação dessas células (ROSS S. H., CANTRELL D. A. 2018).

Possuindo capacidade de imunomodular as células e respostas imunológicas, a IL-2 possui várias funções tanto em células T maduras como imaturas, por exemplo: em células auxiliares *naive*, pode suprimir o efeito proliferativo do perfil T regulatório, imunossupressor e

citocinas como TGF- β e IL-10; no perfil Th1 aumenta capacidade pro-inflamatória por estimular citocinas como IFN- γ e TNF- α ; no perfil Th2, aumenta efeito pro-inflamatório pelas citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 e em linfócitos T citotóxicos aumenta sua capacidade citotóxica ao secretar mais granzimas, perforinas, IFN- γ , IL-2 autólogo e TNF- α (ROSS S. H., CANTRELL D. A. 2018).

Atualmente os estudos sobre a funcionalidade da IL-2 ainda vêm sendo pesquisados na tentativa de descobrir novas atividades pois já é claro que esta citocina possui dupla ação, principalmente em atividades antitumorais ao aumentar a proliferação de células T efetoras e controlar a proliferação de células T regulatórias que podem ser usadas como escape imunológico dos tumores (MULLARD A. 2021).

1.2.4 SECREÇÃO E FUNCIONALIDADE DA INTERLEUCINA 10 (IL-10)

A IL-10 foi descoberta e relatada primeiramente por ser secretada pelos linfócitos T auxiliares do tipo Th2 e demonstrou inibir as funções inflamatórias do perfil Th1, mas atualmente vemos que células citotóxicas e da linhagem mieloide secretam tal citocina em resposta a diferentes estímulos (SARAIVA M. et al., 2020). Macatonia et al (1993), desenvolveram um estudo que demonstrou a atuação da IL-10 em células apresentadoras de antígenos inibindo a produção de citocinas inflamatórias como IFN- γ em células Th1. Embora antagonista a citocinas inflamatórias, já foi relatado que a IL-10 acompanha a produção de IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-13 e IL-17 (SARAIVA M. et al., 2020).

Por todas essas inibições inflamatórias conduzidas pela IL-10, há vários estudos que a denominaram como uma citocina anti-inflamatória, pois viram que esta previne a proliferação de linfócitos T mediante regulação negativa de MHC classe II pelas células apresentadoras de antígenos (OUYANG W., O’GARRA A. 2019).

Em relação aos tumores, a presença da IL-10 em células T regulatórias está associada a contribuição da exaustão das funções efetoras dos linfócitos T citotóxicos, sendo assim, a presença desta citocina foi correlacionada ao mau prognóstico em vários microambientes tumorais (SAWANT D. V., et al., 2019). Contrapondo aos efeitos negativos, vários estudos nos mostram características multifuncionais da IL-10 mediante sua atuação em células mieloides, linfoides, e as diferentes funcionais desencadeadas pelos tipos tumorais diversos (SARAIVA

M. et al., 2020). Por exemplo, estudos nos mostram que a IL-10 pode promover aumento da infiltração de células T CD8 que medeiam a resposta citotóxica, induz a produção de IFN- γ que por feedback aumenta a resposta Th1 inflamatória de linfócitos CD4 e, em modelos de câncer de mama, o bloqueio do receptor de IL-10R α (receptor da IL-10), potencializa a terapêutica da quimioterapia nos pacientes (RUFFELL B. et al., 2014).

1.2.5 SECREÇÃO E FUNCIONALIDADE DO *TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA* (TNF- α)

O fator de necrose tumoral é uma citocina produzida principalmente por macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, linfócitos T, células natural killer (NK) e células tumorais onde a sua secreção é bem acentuada conforme aumenta os estágios do tumor (WANICZEK D., et al 2022; CRUCERIU D., et al 2020).

O TNF- α é considerado um dos principais mediadores inflamatórios e vitais para manutenção da resposta imunológica, contudo, essa citocina pleiotrópica também possui funções efetoras anti-inflamatórias (WANICZEK D., et al., 2022). Fora visto também que quando produzida por células hospedeiras no TME (microambiente tumoral), a inflamação estabelecida leva ao crescimento tumoral, embora já foi relatado casos antitumorais (CRUCERIU D. 2020).

1.2.6 SECREÇÃO E FUNCIONALIDADE DO *TRANSFORMING GROWTH FATOR BETA* (TGF- β)

Esta citocina é uma representação de uma super família de fatores de crescimento beta que contém cerca de mais de quarenta outras citocinas, possuindo diversas sinalizações responsáveis pela transdução dos sinais feitos na membrana celular das células até o núcleo, levando as funcionalidades de proliferação, diferenciação, apoptose, migração e a progressão do câncer (ZHAO M. et al., 2018).

Dentre essas funcionalidades, conseguimos enxergar que em relação ao câncer, essa citocina possui propriedades apoptóticas e progressivas (SYED V. 2016). O TGF- β possui um papel supressor onde o ciclo celular é pausado e a consequência é a apoptose em estágios

iniciais, mas conforme há progressão tumoral, os mecanismos de escape do tumor desencadeiam resistência a este efeito, e tardiamente usa esta citocina para aumentar a angiogênese tumoral, levando a maior fonte de nutrientes e por fim, favorece metástases (XIE F., et al 2018).

Em relação aos linfócitos citotóxicos, esta citocina pode proporcionar supressão da ativação dessas células, bem como a produção de IFN- γ , granzimas B e perforinas mediante regulação do fator de transcrição Nf-k β (UNGEFRORN H. 2019). Além disso, o CD4+ Foxp3+ (T regulatório), intratumoral pode ser induzido e mantido por essa citocina. De caráter antitumoral, o TGF- β participa da ativação dessas células pelo aumento da proliferação do receptor de IL-7, que por sua vez estimulado controla a diferenciação de células T CD8 (MARUYAMA T., et al., 2022). Já em linfócitos auxiliares, foi demonstrado que após estimulação desses fatores de crescimento beta, a produção IL-9 e diferenciação celular neste perfil melhora a imunidade antitumoral (ROY S., et al., 2021).

1.2.7 SECREÇÃO E FUNCIONALIDADE DA INTERLEUCINA 12 (IL-12)

A citocina heterodimérica IL-12, produzida por células apresentadoras de antígenos na resposta antitumoral, é descrita funcionalmente favorável à diferenciação de linfócitos auxiliares ao perfil Th1, além de induz a produção de IFN- γ pelas células NK e células T, e aumentar a geração e atividade de linfócitos citotóxicos pela ativação de proteínas transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição STAT4 (LIASKOU E. et al., 2018).

A atuação dessa interleucina é importante em células linfoides pois a secreção dessa citocina promove um impacto significativo na resposta imunológica local, ativando as células T CD8 a exercerem seu papel citotóxico e recrutando mais células imunes inatas (NOVAIS F. O., et al., 2018). No microambiente tumoral, a presença da IL-12 pode potencializar a vascularização do tecido aumentando moléculas de adesão, promovendo recrutamento de mais leucócitos e pela inibição de neovascularização por intermédio de IFN- γ (LU X., 2017). O envolvimento dessa citocina em linfócitos T auxiliares e citotóxicos proporciona aumento tanto de suas funcionalidades efetoras como também de memória, potencializando os efeitos antitumorais e aumentando a sensibilidade desses linfócitos em iniciar uma resposta imunológica mais rápida (AHRENDTS T. et al., 2019).

1.3 LINFÓCITO TUMOR INFILTRANTE (TIL)

Os linfócitos tumor infiltrantes (TIL) são células da linhagem linfoide, mononucleares, heterogêneas, com capacidade de infiltrar no microambiente tumoral (KAZEMI M. H., et al., 2022).

Segundo Stanton e Disis (2016), todos os subtipos de câncer de mama têm tumores com infiltrado de TIL baixo, intermediário ou alto. As respostas imunológicas nos tecidos tumorais são impulsionadas pelas funções específicas dessas células, levando então a serem mediadores fortes no prognóstico de pacientes oncológicos (DA SILVA P., et al 2019; SASAGU K., et al., 2019)

O câncer de mama triplo-negativo (NT) tem maior probabilidade de desenvolver tumores com infiltração linfocítica (> 50%), ou seja, câncer de mama dominado por linfócitos, e cada aumento de 10% no TIL, pode obter o maior benefício de sobrevivência (STANTON, E. S; DISIS M. L 2016). Quanto maior presença e ativação de linfócitos T, melhor a resposta, contrapondo isso, a exaustão dessas células modula negativamente as respostas imunológicas antitumorais (CANALE F. P., 2018)

As células linfocitárias em tecidos tumorais possuem funções citotóxicas e moduladoras para matar células tumorais, sendo então alvo de imunoterapias (KAZEMI M. H., et al., 2022). O tratamento com essas células é chamado de terapia celular adotiva (ACT), onde os linfócitos tumor infiltrantes são ressecados cirurgicamente, cultivados e ativados *in vitro*, e reinfundidos no paciente (HALL M. et al., 2016).

A essência dessa imunoterapia com linfócitos tumor infiltrantes tem como objetivo a ativação dessas células de maneira *in vitro* pelo cultivo das mesmas estimulas com IL-2, uma citocina autóloga específica para proliferação e ativação de linfócitos e mesmo que fora do hospedeiro, os TIL isolados de tecidos mamários malignos possuem capacidades antitumorais pela secreção de citocinas frente as células tumorais (KAZEMI M. H., et al., 2022). A estimulação dos TIL condicionada por essa citocina, tende a aumentar fatores de sobrevivência para essas células infundidas, a qualidade de ativação, a quantidade celular e seu reconhecimento ao antígeno a ser combatido (GEUKES FOPPEN M. H. et al., 2015)

Os perfis de linfócitos são amplamente encontrados nos infiltrados, mas o acúmulo de células T reguladoras inibem as funções efetoras e a composição clonal de linfócitos T citotóxicos, levando comprometimentos significantes no combate ao câncer. (NOYES D., et al., 2022). Portanto, reduzir tal perfil comprometedor tende a melhorar a eficácia da imunoterapia (KAZEMI M. H., et al., 2022). Estudos atualmente mostram que TIL expandidos *in vitro* possuem capacidade de reprogramação celular, levando a atuarem como linfócitos efetores de uma resposta antitumoral positiva (HALL M. et al., 2016)

1.4 METÁSTASE HEPÁTICA

Metástase por definição é o desprendimento de células tumorais do foco primário, e por seleção específica, migram e infiltram em órgãos distantes e finalizam em tumores secundários (HU Z., CURTIS C. 2020). Mediante carcinogênese e agressividade no tumor de mama triplo negativo, as metástases são consideradas a segunda principal causa de morte por neoplasias (SCHITO L., REY S. 2017). O processo metastático envolve diferentes etapas, como escape de células cancerosas do tumor primário, intravasamento, sobrevivência, extravasamento no local secundário e crescimento (MAJIDPOOR J., MORTEZAEI K. 2021).

O processo inicial de escape e disseminação dessas células necessita que essas modifiquem seu fenótipo invasivo e perfil de fixação, onde geralmente as células tumorais mamárias são disseminadas como fitas multicelulares mantendo ainda a adesão célula a célula devidas características de invasão coletiva (LO H. C., et al., 2020). O processo de intravasamento depende da capacidade dessas células tumorais fazerem a transição epitélio-mesenquimal (EMT) e produzir proteases, como fatores intrínsecos; e atividade de neutrófilos tipo N2, fibroblastos e macrófagos M2, como fatores extrínsecos (ANDERSON R. L., et al., 2019). Após o desprendimento do foco primário, essas células vão para a corrente sanguínea até a chegada no órgão secundário, porém, embora haja nutrientes na corrente sanguínea, essas células enfrentam estresse oxidativo, forças de cisalhamento e a resposta imunológica (GARCIA-JUMENEZ C., GODING C. R. 2019). O extravasamento metastático depende da interação de células tumorais na corrente sanguínea com as moléculas de adesão tanto nas células como nos órgãos alvo de metástases (BERSINI S, et al., 2018). Embora a maioria das células cancerosas são condenadas a morrer, quando há essa invasão, as sobreviventes entram

em estados de dormência ou proliferação, sendo capazes de ficarem inativas por um tempo ou desenvolver os tumores secundários (BIRKBAK N. J, MCGRANAHAN N. 2020).

A metástase hepática possui um prognóstico negativo e explorar os novos modelos de terapia contra tumores primário e consequentemente, secundários no fígado, torna-se alvo importante de pesquisas (YING X, et al., 2021).

2 JUSTIFICATIVA

É importante entender e estudar a abrangência dos mecanismos imunológicos para pesquisar intervenções terapêuticas que resultam em melhores prognósticos no controle das neoplasias. Portanto, esse trabalho busca analisar os efeitos imunológicos da imunoterapia celular adotiva, utilizando linfócitos tumor infiltrantes (TIL), sobre modelo experimental de câncer mamário em murinos Balb/c, induzido pela linhagem celular 4T1.

Os camundongos Balb/c são isogênicos, ou seja, geneticamente idênticos. Sendo assim, justificando a escolha desse modelo experimental devida resposta imunológica frente ao tumor ser idêntica entre os animais, e possuir 95% de semelhança com as respostas em humanos, trazendo então fidedignidade nos resultados. Além do mais, a utilização da linhagem celular 4T1 que induz o câncer mamário nesses animais se justifica pois a fisiopatologia, carcinogênese e agressividade são semelhantes ao câncer mamário mais agressivo em mulher, o triplo negativo.

Mediante este estudo, uma nova abordagem terapêutica eficiente pode ser estudada com a finalidade de avaliar seus efeitos positivos contra o câncer de mama. O foco é desenvolver e contribuir de uma forma direta no tratamento de novos casos, de uma maneira eficiente e com efeitos colaterais mínimos, colaborando então com o serviço a saúde à população, gerando um impacto social mundial tendo em vista que a taxa de incidência desse câncer na humanidade é elevada.

3 HIPÓTESES

Espera-se encontrar resultados que comprovem que a imunoterapia com linfócitos tumor infiltrantes é eficaz contra o câncer de mama.

Essa busca se deve a própria fisiopatologia do câncer, que com característica imunossupressoras, inibem o sistema imunológico da sua ação antitumoral. Neste contexto, os linfócitos auxiliares e citotóxicos atuam no combate às células tumorais após a apresentação desses antígenos e a secreção de citocinas moduladoras. Algumas citocinas, como a IL-2, fazem parte da proliferação e ativação de linfócitos e automaticamente, aumento dos efeitos exercidos por essas células. Sendo assim, nosso trabalho se fundamenta na hipótese de que reinfundir esses linfócitos que estão localizados no tumor sólido, ativados sob influência da IL-2, se tornam capazes de modular uma resposta antitumoral efetiva.

Sendo assim, presumimos que essa imunoterapia consiga obter efeitos antitumorais eficientes onde diminuem o desenvolvimento tumoral, modulam as respostas imunológicas no microambiente tumoral e sistemicamente, e reduzem áreas metastáticas.

4 OBJETIVOS GERAIS

Este estudo tem por objetivo avaliar a eficácia da imunoterapia com linfócitos tumor infiltrantes em camundongos Balb/c submetidos a indução de câncer de mama pela linhagem celular 4T1, ao analisar a progressão tumoral, marcadores e citocinas que permeiam a resposta antitumoral e quantificar áreas metastáticas.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar o volume tumoral dos grupos tratados e não tratados;
- Analisar por citometria a expressão de CD3+, CD4+ e CD8+ em amostras tumorais e esplênicas;
- Analisar por citometria CD25+, IFN- γ +, IL-2+, IL-10+, TNF- α + expressos e secretados por células T CD4+ (auxiliares) e CD8+ (citotóxicas), em tumor e baço;
- Quantificar por ELISA TGF- β e IL-12 no sobrenadante de células tumorais 24 e 48 horas nos grupos tratados e não tratados;
- Quantificar áreas metastáticas em fígado dos grupos tratados e não tratados.

5 METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética no uso de Animais – CEUA, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, sob número de processo 23085.008739/2020-24.

Para a realização do experimento foram utilizados 54 camundongos (30 grupo experimental, 24 produção da imunoterapia), fêmeas da linhagem Balb/c com idade de seis semanas, provenientes do Biotério Central da UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Os animais passaram por habituação no Biotério Setorial do Instituto de Pesquisa em Oncologia – IPON, onde ficaram acomodados em gaiolas com dimensões de 305x198x133 mm, separados em diferentes grupos experimentais, sendo submetidos a ambientes ciclo claro-escuro (12 em 12 horas), em temperatura controlada (22 °C +/-2 °C), alimentação e água *ad libitum*.

5.1 GRUPOS DE ANIMAIS

O grupo de estudo experimental foi composto por 30 camundongos Balb/c fêmeas adultas e foram divididos em três grupos experimentais: (n=6) Grupo Controle (GC), isentos de indução tumoral com a linhagem 4T1 e tratamento com a imunoterapia com linfócitos T infiltrantes; (n=12) Grupo Tumor (GT), submetidos a indução tumoral e isentos de tratamento; (n=12) Grupo Tratado (TIL), submetidos a indução tumoral e ao tratamento.

Tabela 1 – Divisão dos grupos experimentais.

Grupos	Quantidade de animais (n)	4T1 (2×10^5 células/inóculo)	Tratamento TIL ($5,0 \times 10^6$ células/inóculo)
GC	6	-	-
GT	12	+	-
TIL	12	+	+

5.2 FLUXOGRAMA DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

O desenvolver do experimento foi realizado em duas etapas descritas abaixo: fluxograma para produção da imunoterapia e fluxograma experimental (grupos experimentais)

Primeiramente, os 24 animais compondo o grupo da produção da imunoterapia, foram induzidos a linhagem celular 4T1 para obtenção das doses, seguindo um padrão de 1:1 (animal/dose). Os animais foram eutanasiados por superdosagem anestésica (Cetamina 300 mg/kg e Xilazina 30 mg/kg intraperitoneal), após 28 dias de indução tumoral e a cultura das células do tumor foi feita, com uma única estimulação por IL-2 (10 µg/mL). Após 14 dias em cultura, a imunoterapia foi finalizada.

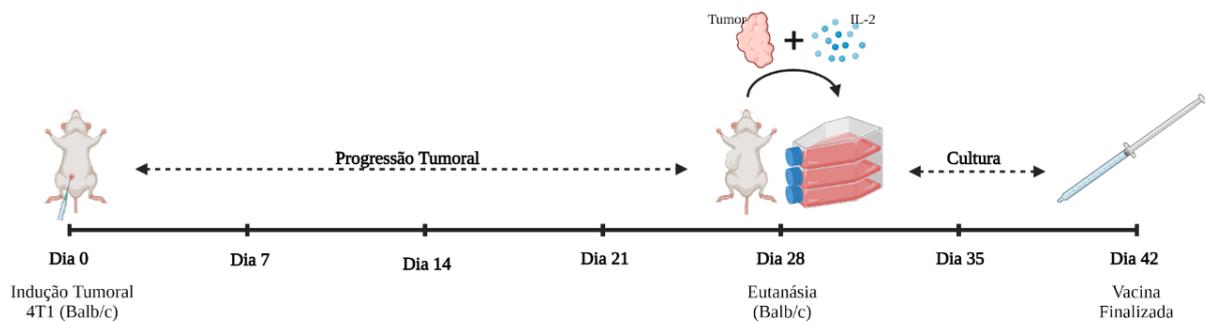


Figura 1: Fluxograma da produção da imunoterapia. Descrição ilustrativa do fluxo da produção da imunoterapia com a apresentação dos processos e dias envolvidos.

Os 12 animais compondo o grupo TIL, foram submetidos a linhagem 4T1 e submetidos a imunoterapia com linfócitos tumor infiltrantes 14 e 21 dias após a indução tumoral. O grupo tumor foi composto por 12 animais unicamente submetidos a indução tumoral. Os animais de ambos grupos foram eutanasiados por superdosagem anestésica (Cetamina 300 mg/kg e Xilazina 30 mg/kg intraperitoneal), e as amostras de tumor, baço e fígado foram levadas para análises.

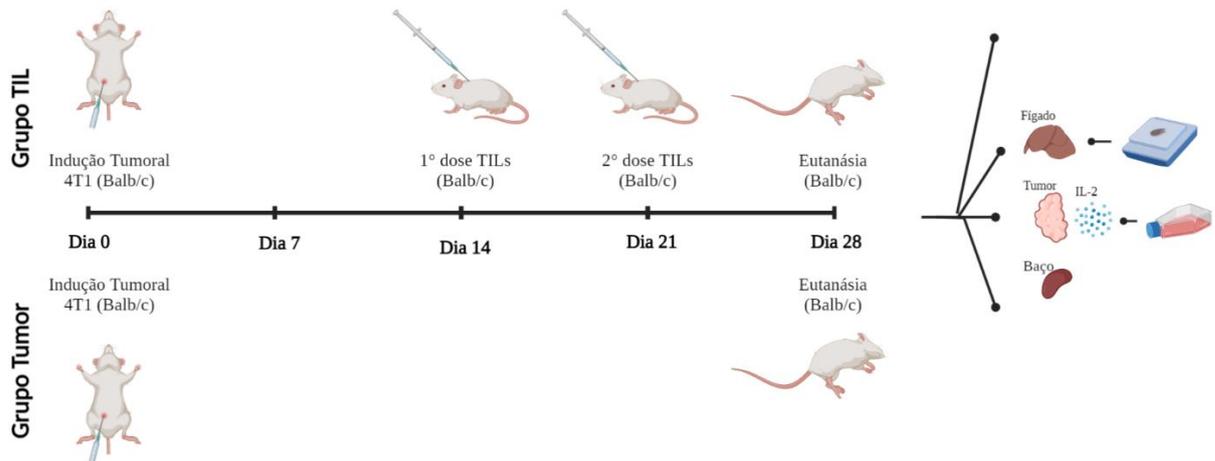


Figura 2: Fluxograma grupo tumor e TIL. Descrição ilustrativa do fluxo do grupo tratado com TIL e apresentação dos processos e dias envolvidos na imunoterapia com linfócitos tumor infiltrantes.

Os animais do grupo controle (n=6), foram submetidos somente a adaptação obrigatória no biotério regional e logo após, eutanasiados isentos de quaisquer procedimentos, seja indução tumoral ou na imunoterapia com linfócitos tumor infiltrantes. Assim como aos outros grupos, no grupo controle também foi coletado baço e fígado dos animais para análises.

Sendo assim, todos os fluxogramas dos grupos foram organizados em um único fluxo experimental.

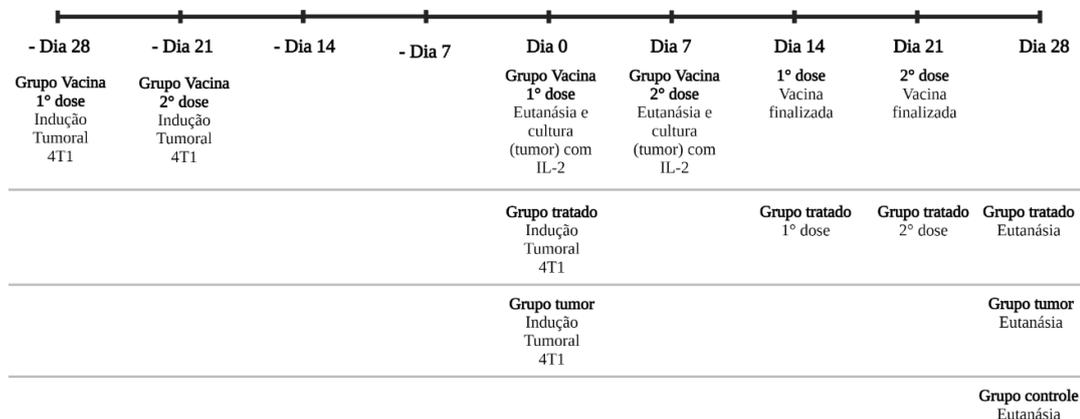


Figura 3: Fluxograma experimental. Descrição ilustrativa do fluxo experimental total contendo todos os grupos de maneira organizada para execução de todo projeto.

5.3 INDUÇÃO DE TUMORAL COM A LINHAGEM 4T1

As células da linhagem 4T1 foram mantidas em meio RPMI 1640 completo em estufa de CO₂ a 5% de umidade e à 37 °C. As células foram lavadas com solução fisiológica 0,9% a

290 xg, 4 °C por 10 minutos em cada lavagem. Posteriormente foram injetadas com o auxílio de uma seringa de 1mL, agulha 13x4,5 mm, em alta concentração celular de 2×10^5 células 4T1 em 50 μ L de solução fisiológica (NaCl 0,85% estéril) na glândula mamária abdominal direita dos animais dos grupos que receberam indução tumoral (GT, TIL), isentos de anestesia.

Para a viabilidade das células tumorais em cultura, foi acompanhado diariamente por visualização microscópica para verificar se as células estavam saudáveis, com suas características próprias de proliferação e ativação.

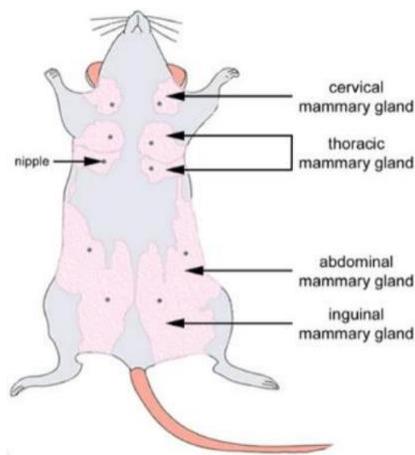


Figura 4: Identificação das glândulas mamárias de camundongos. Representação anatômica das glândulas mamárias dos camundongos, retirado de *HONVO-HOUE TO E., TRUCHET S. 2015.*

5.4 PRODUÇÃO DA IMUNOTERAPIA DE LINFÓCITOS TUMOR INFILTRANTES

Para produção da imunoterapia com linfócitos tumor infiltrantes (TIL) ativados, foram utilizados 24 camundongos da linhagem Balb/c submetidos a indução tumoral e eutanasiados por superdosagem anestésica (Cetamina 300mg/kg e Xilazina 30 mg/kg), após 28 dias de progressão tumoral, para retirada de TIL. Em seguida, o tecido tumoral foi divulsionado em placa de Petri contendo solução fisiológica 0,9%. Depois, essas amostras foram peneiradas em um único tubo Falcon 15 mL por um “separador celular” (70 μ m nylon), lavado 2 vezes com meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640 incompleto) e 1 vez com RPMI 1640 completo por centrifugação a 290 xg, 10 minutos a 4 °C. Em seguida, foram contadas na câmara de Neubauer e distribuídos em garrafas de 15 mL na proporção 15×10^6 células em 1 mL, estimulados com IL-2 (10 μ g/ml) e levados à estufa 37 °C e 5% de CO₂. Após 14 dias em cultura, os linfócitos ativados para imunoterapia foram lavados 3 vezes nas mesmas especificações já citadas, com solução fisiológica, contadas na câmara de Neubauer e

administrados no grupo tumor tratado (TIL) um volume celular total de $5,0 \times 10^6$ TIL, via subcutânea (dorso), em 50 μL de solução fisiológica 0,9%. Em relação as aplicações, foram administradas duas doses a partir do 14º dia de indução do grupo tumor tratado (TIL), com intervalo de 07 dias (dia 14 e dia 21).



Figura 5: Representação da administração da imunoterapia. Ilustração da técnica envolvida para tratamento dos animais. Retirado do BioRender.

5.5 EUTANÁSIA E COLETA DE AMOSTRAS A SEREM ANALISADAS

Os grupos experimentais foram induzidos ao desenvolvimento tumoral pela linhagem celular 4T1 e eutanasiados após 28 dias por superdosagem anestésica (Cetamina 300 mg/kg e Xilazina 30 mg/kg intraperitoneal). As amostras tumorais e esplênicas foram fragmentadas dos grupos experimentais e destinadas para citometria de fluxo (descrito posteriormente) e cultura de células. Já o fígado foi submetido ao processo de parafinização, destinado a histopatologia.

Para cultura de células, os órgãos foram dissecados e divulsionados mecanicamente em placa de Petri contendo 0,9% de solução fisiológica (NaCl 0,85% estéril) e peneiradas em um tubo Falcon 50 mL. Após duas centrifugações a 290 xg, 10 minutos a 4 °C, as células foram contadas em câmara de Neubauer e distribuídos em garrafas de 15 mL na proporção 15×10^6 células em 1 mL, estimulados com fitohemaglutinina (PHA) (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após 24 e 48 horas em estufa com 5% de CO_2 a 37 °C, o sobrenadante foi coletado e armazenado -80 °C para posterior análise por ELISA.

Em relação a parafinização, os fígados após a eutanásia foram submersos em formalina tamponada a 10% durante 24h e posteriormente, essas amostras passaram 30 minutos em cada % de etanol, sendo 70%, 80%, 90%, 100% e xilol absoluto, nesta ordem. Em seguida, submetidas a 20 minutos em xilol I, II e III, finalizando então em três banhos de parafina em um intervalo de 20 minutos cada.

5.6 MENSURAÇÃO DO VOLUME TUMORAL

Para análise do volume tumoral, o desenvolvimento tumoral foi mensurado utilizando paquímetro, a cada dois dias após 07 dias a indução tumoral, e foi determinado usando a seguinte fórmula: $[\text{Maior diâmetro} \times (\text{menor diâmetro}^2) / 2]$.

5.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA HEPÁTICA

Em relação aos fígados, após a parafinização já descrita, a microtomia dos órgãos foi executada com 10 μm de espessura por corte e corado com hematoxilina-eosina.

As amostras foram capturadas pelo microscópico Invertido Eclipse TI-E Nikon®, e analisadas pelo Software NIS-Elements Advance Research ® da Nikon. Foram analisados 10 campos de cada corte, escolhidos de forma aleatória, visualizados e capturados na objetiva de 40x, sendo este o padrão adotado para todas as lâminas. Dentre os dados que o *software* disponibiliza, foram utilizados para análise a Area [px^2], sendo 1,83 $\mu\text{m}^2/\text{px}^2$, e representado graficamente em μm^2 .

Os critérios fenotípicos para avaliação foram estabelecidos mediante comparação entre caráter de invasão das células tumorais e células normais. Aquelas possuem característica invasiva disseminada e desordenada, enquanto estas possuem organização em toda estrutura do tecido (VIEIRA J, et al., 2021).

5.8 CITOMETRIA DE FLUXO DAS CÉLULAS DO TUMOR E BAÇO

Os tumores e baços imediatamente após eutanásia foram divulgionados (1/3 de órgão por animal), em placa de Preti com solução fisiológica, foram transferidos para tubos cônicos de 50mL. Apenas na amostra do baço, foi adicionado no tubo solução de lise (BD Biosciences – FACSTM Lysing Solution) na proporção de 1:10 durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante até que sobrasse somente o pellet rico em células e depois lavado três vezes com 30 mL de PBS em cada lavagem, a 290 xg, a 4 °C por 10 minutos. Foi adicionado 1 mL de PBS (0,1M, pH 7,2, não estéril) no precipitado celular mais 2 uL da proteína transportadora inibitória (BD Golgistop™) para cada 3 mL de solução.

Incubou-se por 20 minutos em geladeira a 4 °C seguido pela centrifugação com 30 mL de PBS para retirar os excessos de proteína.

Assim que centrifugado, foi retirado mais uma vez o sobrenadante e mantido o pellet rico em células, e adicionado 1 mL de PBS para ressuspender as células, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer. Depois, separado para os tubos de ensaio, foram realizadas as marcações extracelulares com auxílio de pipeta 2 µL e incubadas na geladeira 4 °C por 30 minutos, no escuro. Posteriormente, foi feita a lavagem para retirada do excesso de anticorpo, foi adicionada solução de permeabilização e fixação (BD Cytotfix/Cytoperm™), a 4 °C por 20 minutos, no escuro, para preparar as células para marcações intracelulares.

Após as marcações intracelulares, as células foram novamente incubadas a 4 °C por 30 minutos, no escuro e lavadas com a solução tampão (BD Perm/Wash™Buffer), 3 vezes, para remoção do excesso dos marcadores. Finalizando então nas células ressuspensas em 500 µL de PBS para leitura no citômetro BD FACSCalibur™.

Tabela 2 – Marcações intra e extracelulares para células esplênicas e tumorais

Tubos	Descrição	Marcação extracelular	Marcação intracelular
1	Isotipo 1	Ham IgG1 FITC	Mouse IgG2b PE
		Mouse IgG1 PercpCY 5.5	Rat IgG2a APC
2	Isotipo 2	Rat IgG1 FITC	Rag IgG2b PercpCY 5.5
		Rat IgG2b PE	Ham IgG1 APC
3	Isotipo 3	Mouse IgG1 FITC	Rat IgG2ak Alexa Fluor 488
4	Isotipo 4	Rat IgG2b FITC	Rat IgG1 APC
		Rat IgG2a PE	
5		CD4 PerCP CY 5.5	IFN-γ Alexa Fluor 488
		CD3e APC	IL-10 FITC
			TNF-α PE
6		CD25 PE	IL-2 Alexa Fluor 488
			IFN-γ PercpCY 5.5
7		CD8a APC	IL-10 FITC
			TNF-α PE

Nota: *Fluorescein Conjugate* (FITC), 495-521nm; *Phycoerythrin* (PE), 488-578nm; *Allophycocyanin* (APC), 633-661nm; *Peridinin Chlorophyll protein complex*, (PercpCY) 5.5, 482-678nm; Alexa Fluor 488, 490-525nm.

O método de análise dos resultados utilizado foi baseado em Dot Plot para moléculas CD8 e CD4, histograma para CD3, TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-2, e CD25. Submetido à amostra o isotipo de cada respectivo marcador, foi obtido os resultados em MFI (Intensidade média de fluorescência).

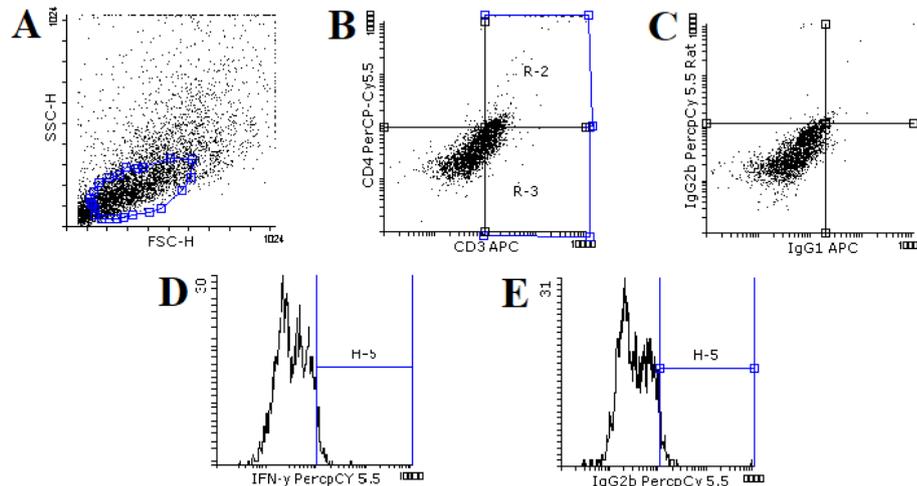


Figura 6: Estratégia de análise da citometria. Representação do método utilizado na análise dos dados obtidos da citometria dos grupos experimentais do perfil de linfócitos. População dos linfócitos delineadas em R1 em (A), representadas em (B), considerado o isotipo em (C) e delineado R2 para Linfócito Auxiliar e R3 para Linfócito Citotóxico. A partir disso, as populações linfocitárias foram isoladas separadamente pelas demais marcações feitas e análise por histograma representado em (D), considerado o isotipo do respectivo marcador em (E).

5.9 ANÁLISE POR ELISA

A técnica de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), do tipo captura foi feita exclusivamente para visualizar as concentrações das citocinas TGF- β e IL-12, no sobrenadante de células tumorais 24 e 48 horas dos camundongos induzidos com 4T1 tratados (TIL) e não tratados (GT).

Estas citocinas foram dosadas com a utilização de anticorpos monoclonais da BD OptEIA™. A realização da técnica teve com base nas informações oferecidas pelo fabricante, inicialmente com a sensibilização da placa com 100 μ l de anticorpos específicos de cada marcação em Coating Buffer. Em cada placa foi feita a diluição seriadas em Assay Diluent da respectiva citocina de interesse. As fileiras que foram utilizadas para as amostras, foram adicionadas 100 μ l/poço do sobrenadante de células tumorais 24 e 48 horas e incubadas a temperatura ambiente, e posteriormente lavadas em solução PBS-Tween 20%. Logo após, os anticorpos de detecção foram adicionados em volume de 100 μ l/poço e incubadas novamente

em temperatura ambiente, e posteriormente, realizado 5 lavagens em PBS-T. Finalizando então com a adição de 100 µl/poço de TMB Substrate Reagent Set (BD OptEIA™), e depois de 30 minutos, adicionado 50 µl/poço de ácido fosfórico 2N e levado a leitura da placa no equipamento automático Spectra 384 Plus, nas absorvâncias de 450 e 570nm.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos dos diferentes testes foram analisados na utilização do software GraphPad Prism Versão 8.0 (GraphPad Software, Inc). Estes foram testados para verificar a distribuição normal e sendo de caráter paramétrico, foram utilizados testes paramétricos “t de Student” para comparação entre 2 grupos, e ANOVA para 3 grupos, sendo estes representados em média e desvio padrão; quando a distribuição não foi normal, foi utilizado o teste de Mann Whitney entre 2 grupos. As diferenças observadas foram consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade for menor que 0,05.

6 RESULTADOS

6.1 VOLUME TUMORAL

Realizada a análise do volume tumoral desses animais quando eles ainda estavam em desenvolvimento da doença, ao observarmos o tumor macroscopicamente *in vivo* e *post mortem*, conseguimos diferença entre os grupos tumor e tumor tratado após 28 dias de desenvolvimento. A Figura 7 (A) e (B), nos mostra a diferença dos modelos experimentais induzidos com 4T1 com 28 dias de desenvolvimento *in vivo* ($p < 0,0001$).

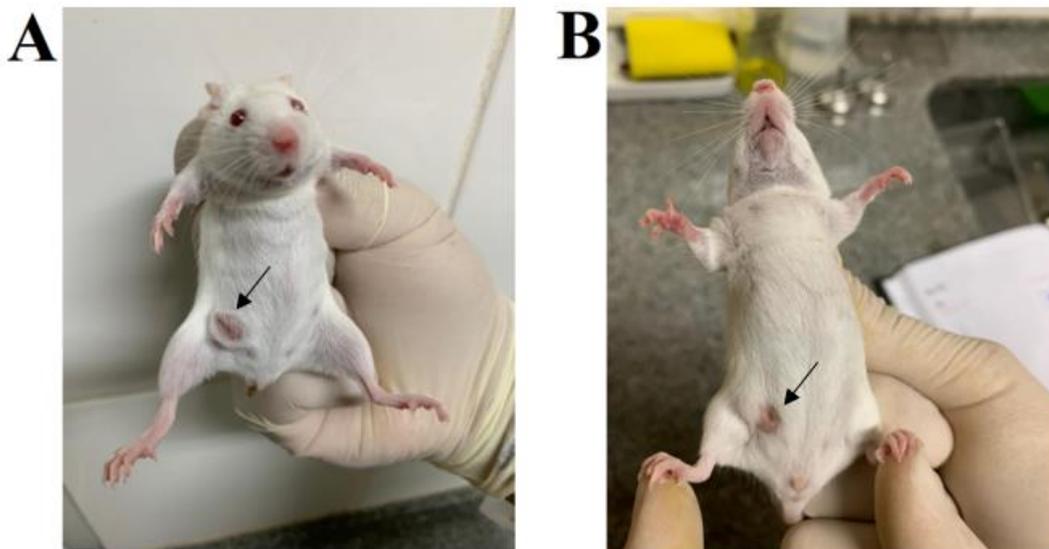


Figura 7: Fotografia dos modelos experimentais do grupo tumor e grupo TIL induzidos a linhagem celular 4T1 no último dia de desenvolvimento tumoral. Ilustração de dois modelos experimentais induzidos a linhagem celular 4T1 para o desenvolvimento do câncer mamário. Ambos animais na figura estão no 28º dia de desenvolvimento tumoral. (A) animal grupo tumor submetido unicamente ao tumor; (B) animais grupo TIL submetido ao tumor e a imunoterapia de linfócito tumor infiltrantes. Setas indicam o tumor sólido em ambos modelos experimentais. Do autor.

Avaliando a Figura 7, conseguimos evidenciar diferença significativa no tamanho tumoral entre o grupo tratado e não tratado. Sendo assim, analisamos na Figura 8 o desenvolvimento desses animais ao longo do tempo e conseguimos observar significância dos dados de desenvolvimento tumoral ($p < 0,0001$). O grupo tumor obteve crescimento tumoral mais acentuado comparado ao grupo tratado ($p < 0,0001$).

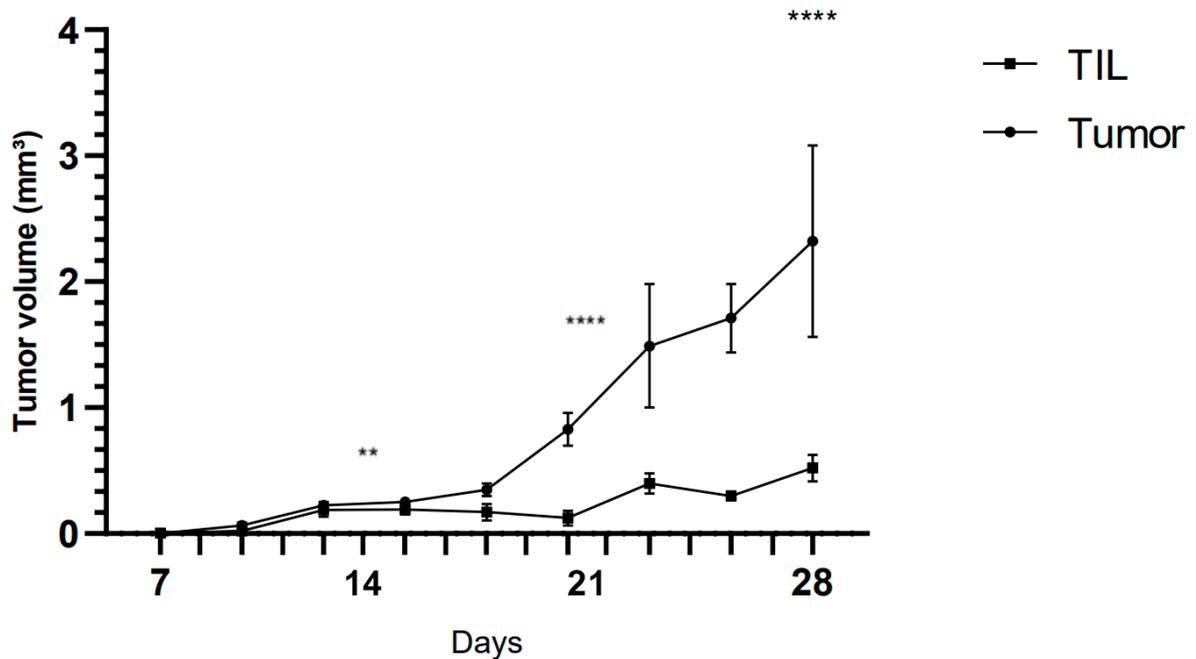


Figura 8: Influência da imunoterapia com linfócitos tumor infiltrantes em animais submetidos a indução tumoral com a linhagem 4T1 (câncer mamário). Visualização da diferença entre grupos: grupo tumor (azul) e grupo TIL (vermelho). Os resultados foram analisados usando o teste *2way ANOVA* para análise do desenvolvimento tumoral correlacionado com o tempo de 28 dias de indução, entre os grupos. Dados estatisticamente significativos $p < 0,0001$ ****

6.2 PRESENÇA DOS LINFÓCITOS NO TUMOR E BAÇO

Ao realizarmos a tipagem celular CD3+/CD4+ CD3+/CD4-, conseguimos enxergar diferença entre as células no microambiente tumoral com as células esplênicas, nos mostrando a resposta imunológica local e sistêmica.

Na Figura 9 observamos o comportamento dos linfócitos no microambiente tumoral. Os linfócitos totais (CD3+) e auxiliares (CD4+), apresentaram aumento significativo no grupo TIL em comparação ao grupo tumor ($p < 0,0001$). Em contrapartida, os linfócitos citotóxicos (CD8), não obtiveram diferença significativa entre os grupos.

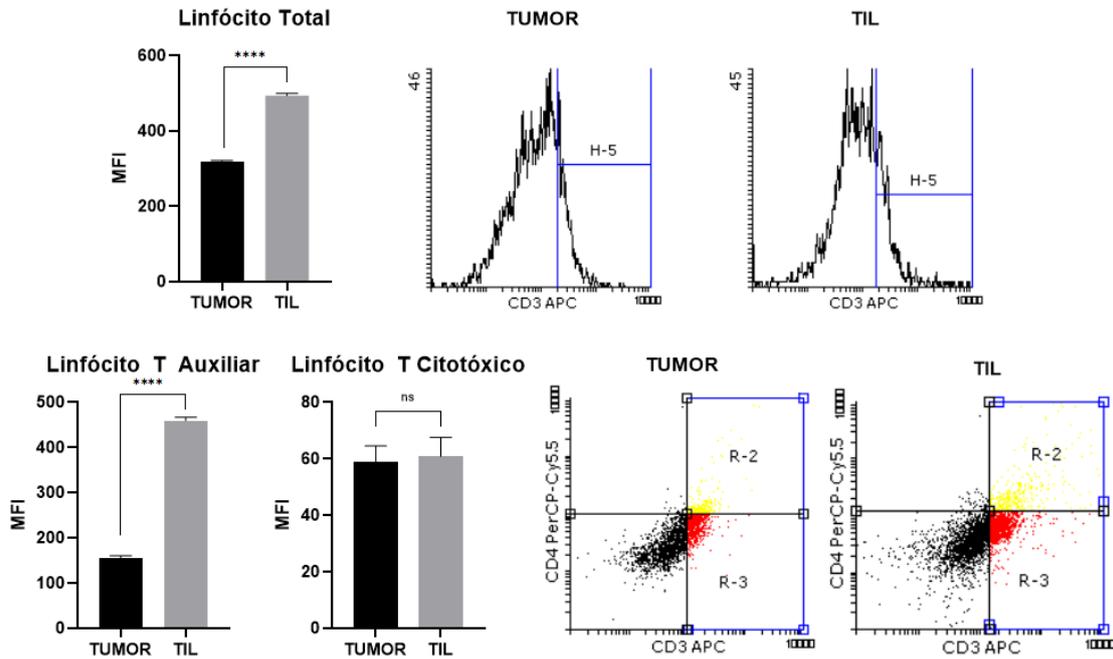


Figura 9: Linfócitos totais e seus subtipos em células tumorais de modelos experimentais murinos induzidos ao câncer mamário 4T1. Representação gráfica e ilustrativa do infiltrado de linfócitos e seus subtipos em tumores sólidos de câncer mamário, por citometria. Diferença estatisticamente significativa dos linfócitos totais ($p < 0,0001$); linfócitos auxiliares ($p < 0,0001$) e linfócitos citotóxicos não significantes (ns). (H-5) representado extensão linfocitária total da amostra no grupo tumor e grupo TIL; (R-2) representando população de células delimitadas CD3+ e CD4+ (Linfócitos Auxiliares); (R-3) representando população de células delimitadas CD3+ e CD4- (Linfócitos Citotóxicos), ambas delimitações (“gate”), representam os fenótipos a serem analisados no presente estudo. MFI: Intensidade Média de Fluorescência.

A nível sistêmico, em células esplênicas, os linfócitos e seus fenótipos se comportaram de maneira diferente. Observando a Figura 10, os linfócitos totais (CD3+) no grupo tratado estava significativamente aumentado em relação ao grupo tumor ($p < 0,0004$), e controle ($p < 0,0001$). Essa mesma contagem linfocitária foi encontrada de maneira significativa entre o grupo tumor e controle ($p = 0,0013$). Em relação aos linfócitos auxiliares (CD4+), houve aumento significativo no grupo TIL em comparação ao grupo tumor ($p < 0,0001$) e grupo controle ($p < 0,0001$). Porém, não houve estatística significativa desses linfócitos entre o grupo tumor e controle. Em relação aos linfócitos citotóxicos (CD8+), o grupo tratado obteve aumento significativo em comparação ao grupo tumor ($p < 0,0001$).

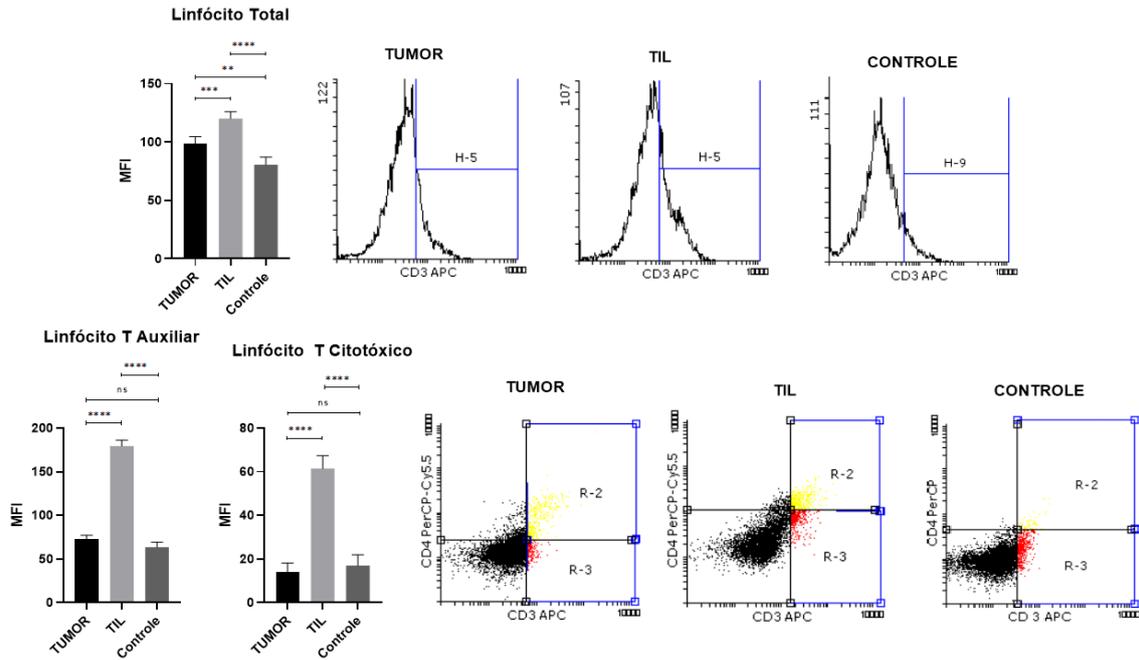


Figura 10: Linfócitos totais e seus subtipos em células esplênicas de modelos experimentais murinos induzidos ao câncer mamário 4T1. Representação gráfica e ilustrativa do infiltrado de linfócitos e seus subtipos em células esplênicas em modelos experimentais induzidos ao câncer mamário, por citometria. Diferença estatisticamente significativa entre linfócitos totais do grupo tumor e grupo TIL ($p < 0,0001$); grupo TIL e grupo controle ($p < 0,0001$); grupo tumor e grupo controle ($p = 0,0013$). Linfócitos auxiliares significantes entre grupo tumor e grupo TIL ($p < 0,0001$); grupo TIL e grupo controle ($p < 0,0001$); e não significativa entre grupo tumor e controle (ns). Linfócitos citotóxicos significantes entre grupo tumor e grupo TIL ($p < 0,0001$); grupo TIL e grupo controle ($p < 0,0001$); e não significativa entre grupo tumor e controle (ns). (H-5) representado extensão linfocitária total da amostra em todos os grupos; (R-2) representando população de células delineadas CD3+ e CD4+ (Linfócitos Auxiliares); (R-3) representando população de células delineadas CD3+ e CD4- (Linfócitos Citotóxicos), ambas delineações (“gate”), representam os fenótipos a serem analisados no presente estudo. MFI: Intensidade Média de Fluorescência.

Na Figura 11, todos os tipos celulares linfocitários presentes em tumor e baço nos mostram aumento significativo após tratamento, resultando então que imunoterapia com TIL aumenta a população desses linfócitos no tecido tumoral e esplênico.

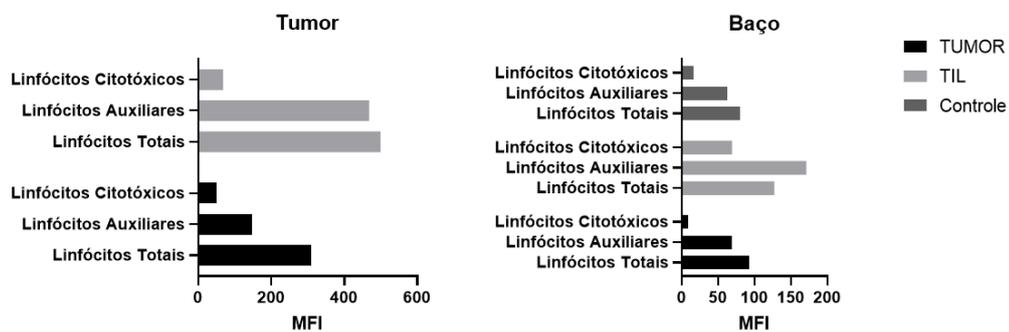


Figura 11: Distribuição geral dos linfócitos em amostras tumorais e esplênicas de modelos experimentais murinos induzidos ao câncer mamário 4T1. Representação da distribuição de linfócitos totais (CD3+), auxiliares (CD4+) e citotóxicos (CD8+) nas amostras tumorais e esplênicas, por citometria. MFI: Intensidade Média de Fluorescência.

6.3 CLUSTER OF DIFFERENTIATION 25 (CD25)

No Figura 12 observamos significativamente que os linfócitos CD4+CD25+ (auxiliares) e CD8+CD25+ (citotóxicos), no tumor dos animais tratados estão diminuídos em comparação ao grupo tumor ($p < 0,0001$). No baço, os linfócitos CD4+CD25+ e CD8+CD25+ apresentaram aumento significativo em relação aos grupos tumor e controle ($p < 0,0001$). Embora os linfócitos auxiliares obtiveram aumento significativo no grupo controle em comparação ao grupo tumor ($p < 0,0001$), os linfócitos citotóxicos não obtiveram significância entre estes grupos, no baço.

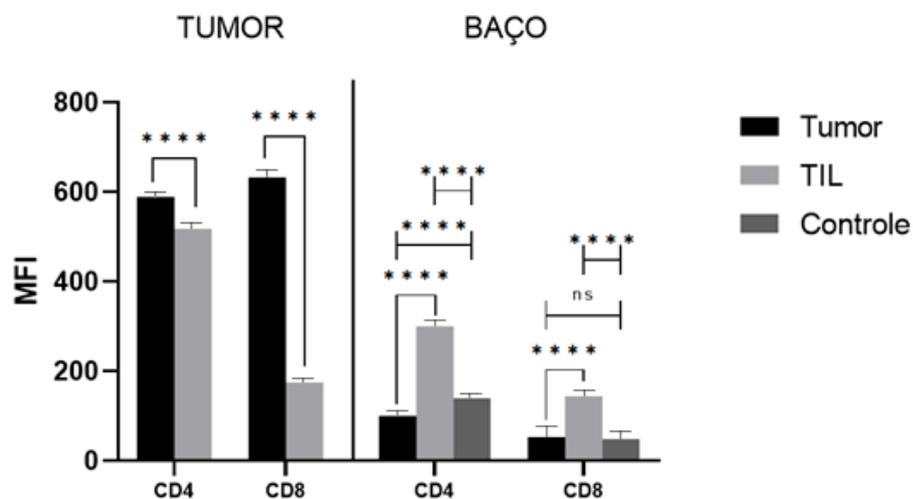


Figura 12: Expressão de CD25 nos subtipos linfocitários CD4 e CD8 em amostras tumorais e esplênicas dos grupos experimentais induzidos ao câncer mamário 4T1. Representação gráfica da marcação de CD25 com CD4 e CD8. Os resultados foram expressos em MFI (Intensidade Média de Fluorescência). Os resultados foram analisados usando o teste “t de Student” para 2 grupos (tumor); e ANOVA para 3 grupos (baço). ****($p < 0,0001$); ns (não significante).

6.4 INTERFERON GAMMA (IFN- γ)

No Figura 13, tanto os linfócitos CD4+ ($p < 0,0001$), como CD8+ ($p < 0,0001$), demonstraram aumento significativo da secreção dessa citocina no grupo tratado em comparação com o grupo tumor, em amostra tumoral. No baço, igualmente ao tumor, ambos linfócitos no grupo tratado apresentaram um aumento significativo desta citocina em relação ao grupo tumor ($p < 0,0001$). Conseguimos enxergar também que os linfócitos citotóxicos de ambos grupos no baço, apresentaram uma redução da secreção dessa citocina em comparação ao grupo controle ($p < 0,0001$).

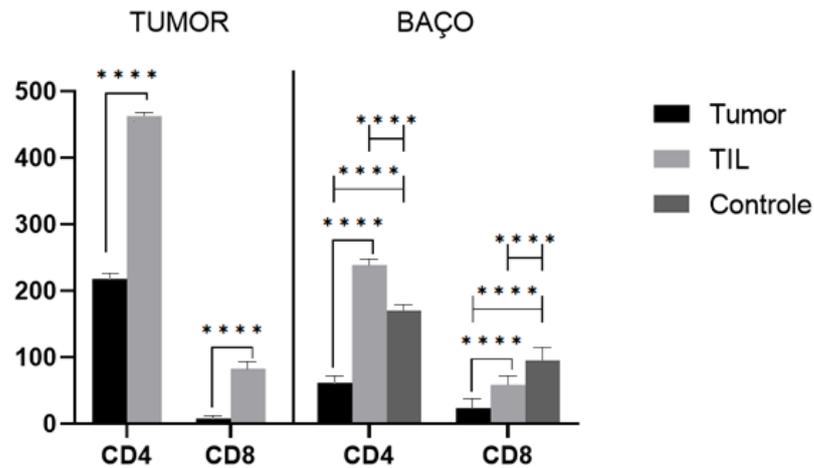


Figura 13: Secreção de IFN- γ nos subtipos linfocitários CD4 e CD8 em amostras tumorais e esplênicas dos grupos experimentais induzidos ao câncer mamário 4T1. Representação gráfica da marcação de IFN- γ com CD4 e CD8. Os resultados foram expressos em MFI (Intensidade Média de Fluorescência). Os resultados foram analisados usando o teste “t de Student” para 2 grupos (tumor); e ANOVA para 3 grupos (baço). ****($p < 0,0001$).

6.5 INTERLEUCINA 2 (IL-2)

Em relação a IL-2, vemos na Figura 14 uma diminuição significativa ($p < 0,0001$) no grupo TIL em comparação ao grupo tumor em ambas populações de linfócitos. Do contrário, no baço conseguimos ver que há uma secreção significativa de IL-2 no grupo tratado ($p < 0,0001$) em comparação ao grupo tumor e controle, em ambos linfócitos. No baço, o grupo tumor obteve secreções significativas em relação ao grupo controle, em ambos linfócitos ($p < 0,0001$).

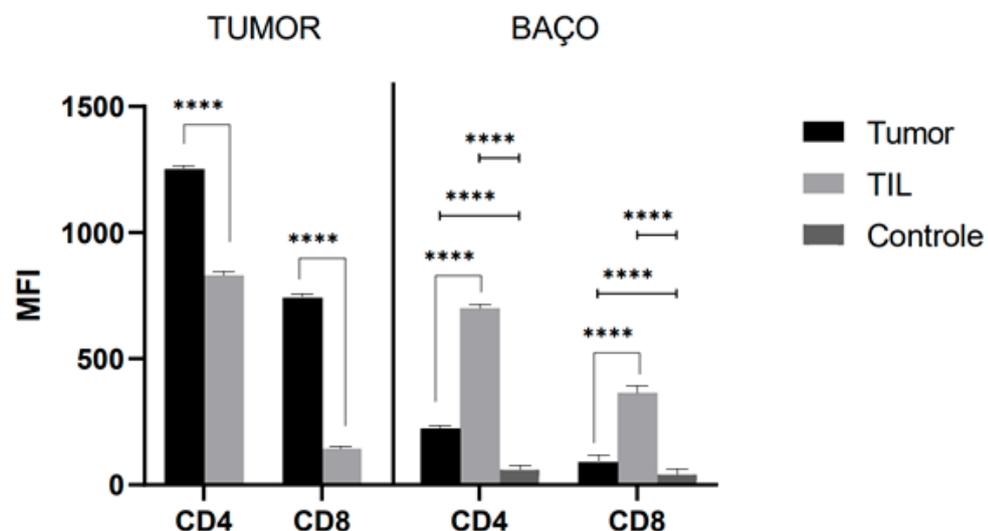


Figura 14: Secreção de IL-2 nos subtipos linfocitários CD4 e CD8 em amostras tumorais e esplênicas dos grupos experimentais induzidos ao câncer mamário 4T1. Representação gráfica da marcação de IL-2 com CD4

e CD8. Os resultados foram expressos em MFI (Intensidade Média de Fluorescência). Os resultados foram analisados usando o teste “t de Student” para 2 grupos (tumor); e ANOVA para 3 grupos (baço). ****($p < 0,0001$).

6.6 INTERLEUCINA 10 (IL-10)

No Figura 15 observamos em linfócitos auxiliares e citotóxicos que a IL-10 diminuiu significativamente no grupo tratado em comparação ao grupo tumor, em amostra tumoral ($p < 0,0001$). De outra forma, no baço, o comportamento desta citocina foi diferente ao visualizarmos aumento significativo no grupo TIL em comparação ao grupo tumor e controle ($p < 0,0001$). Ainda em amostra esplênica, no grupo tumor e controle, os linfócitos CD4+ não obtiveram diferença significativa (ns), mas os CD8+ apresentaram significativamente aumentados no grupo tumor em comparação ao grupo controle ($p < 0,0001$).

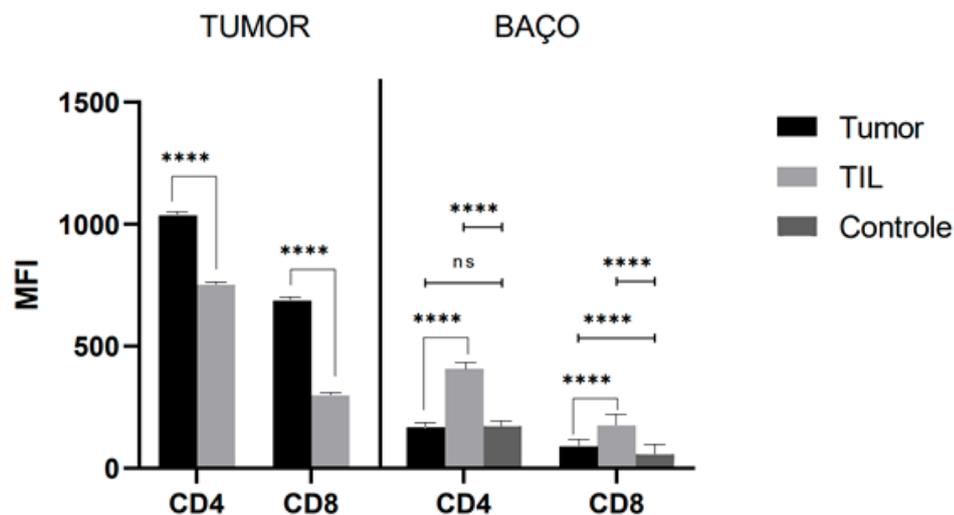


Figura 15: Secreção de IL-10 nos subtipos linfocitários CD4 e CD8 em amostras tumorais e esplênicas dos grupos experimentais induzidos ao câncer mamário 4T1. Representação gráfica da marcação de IL-10 com CD4 e CD8. Os resultados foram expressos em MFI (Intensidade Média de Fluorescência). Os resultados foram analisados usando o teste “t de Student” para 2 grupos (tumor); e ANOVA para 3 grupos (baço). ****($p < 0,0001$); ns (não significante).

6.7 TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA (TNF- α)

Analisando o TNF- α , pode-se observar que há várias variações de sua secreção em todos os tipos celulares diferentes, tanto em tumor como no baço, representados no Figura 16. No tumor, a secreção dessa citocina em linfócitos CD4+ está significativamente aumentado no

grupo TIL, em comparação ao tumor ($p < 0,0001$); em contraste, os linfócitos CD8⁺ estão significativamente diminuídos no grupo tratado em comparação ao grupo tumor ($p < 0,0001$). Já em amostra esplênica, o TNF- α está significativamente aumentado em linfócitos citotóxicos no grupo TIL, em comparação ao grupo tumor e grupo controle ($p < 0,0001$); contudo, em linfócitos auxiliares, o grupo tumor aumentou significativamente a secreção de TNF- α em comparação ao tumor ($p < 0,0001$), mas não em comparação ao grupo controle ($p < 0,0001$).

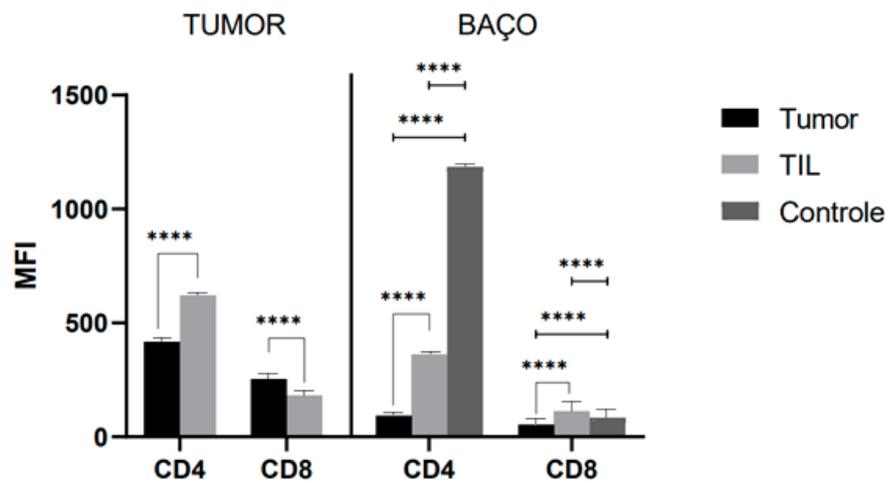


Figura 16: Secreção de TNF- α nos subtipos linfocitários CD4 e CD8 em amostras tumorais e esplênicas dos grupos experimentais induzidos ao câncer mamário 4T1. Representação gráfica da marcação de TNF- α com CD4 e CD8. Os resultados foram expressos em MFI (Intensidade Média de Fluorescência). Os resultados foram analisados usando o teste “t de Student” para 2 grupos (tumor); e ANOVA para 3 grupos (baço). ****($p < 0,0001$).

6.8 TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA (TGF- β)

Em análise no Figura 17, vemos que a secreção de TGF- β está significativamente aumentada no grupo TIL em relação ao grupo tumor em ambos padrões de coleta (24 e 48h) ($p < 0,0001$).

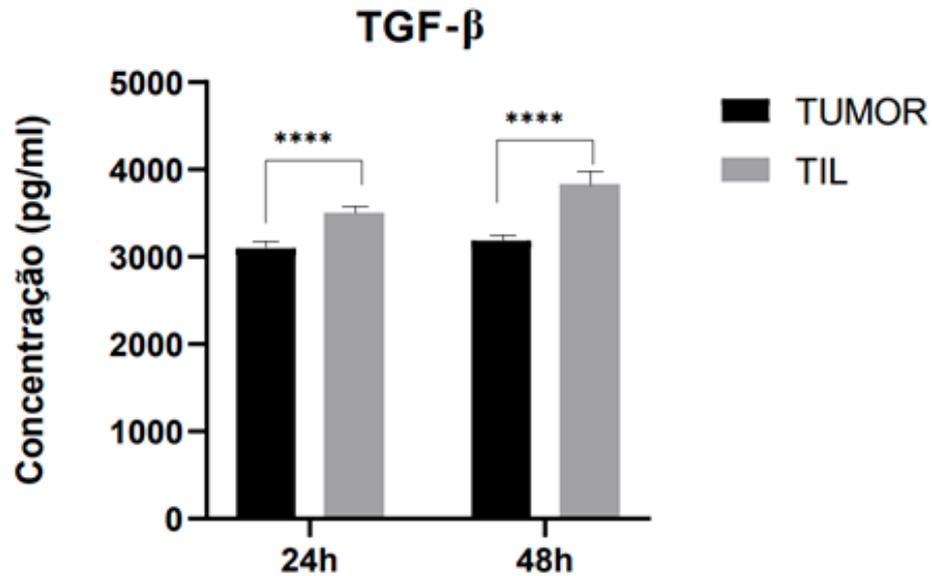


Figura 17: Concentração de TGF- β no sobrenadante de cultura de células tumorais 24 e 48 horas. Representação gráfica da dosagem de TGF- β por ELISA em cultura de células tumorais após 24 e 48 horas de estimulação com fitohemaglutinina. Os resultados foram expressos em média dos valores de Concentração (pg/mL). Os resultados foram analisados usando o teste “t de Student” para 2 grupos (tumor). ****($p < 0,0001$).

6.9 INTERLEUCINA 12 (IL-12)

A IL-12 foi dosada e representada a seguir no Figura 18 e notamos que possui cinética diferente. Esta interleucina demonstrou aumento significativo nas amostras de 24 horas, no grupo TIL em comparação ao tumor ($p < 0,0001$); contudo, no sobrenadante de 48 horas, embora seja significativo, a IL-12 está mais presente no grupo tumor em comparação ao grupo TIL ($p = 0,0016$).

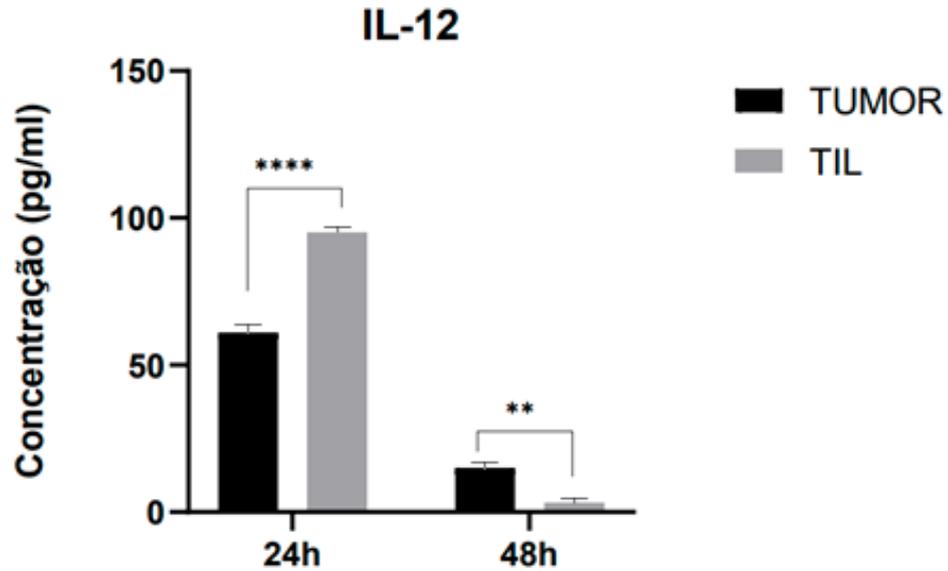


Figura 18: Concentração de IL-12 no sobrenadante de cultura de células tumorais 24 e 48 horas. Representação gráfica da dosagem de IL-12 por ELISA em cultura de células tumorais após 24 e 48 horas de estimulação com fitohemaglutinina. Os resultados foram expressos em média dos valores de Concentração (pg/mL). Os resultados foram analisados usando o teste “t de Student” para 2 grupos (tumor). ****($p < 0,0001$); **($p = 0,0016$).

6.10 METÁSTASES HEPÁTICAS

Em relação as metástases hepáticas, na Figura 19, visualizamos mais áreas de metástases hepática nos animais do grupo tumor em comparação com os do grupo TIL ($p < 0,0001$).

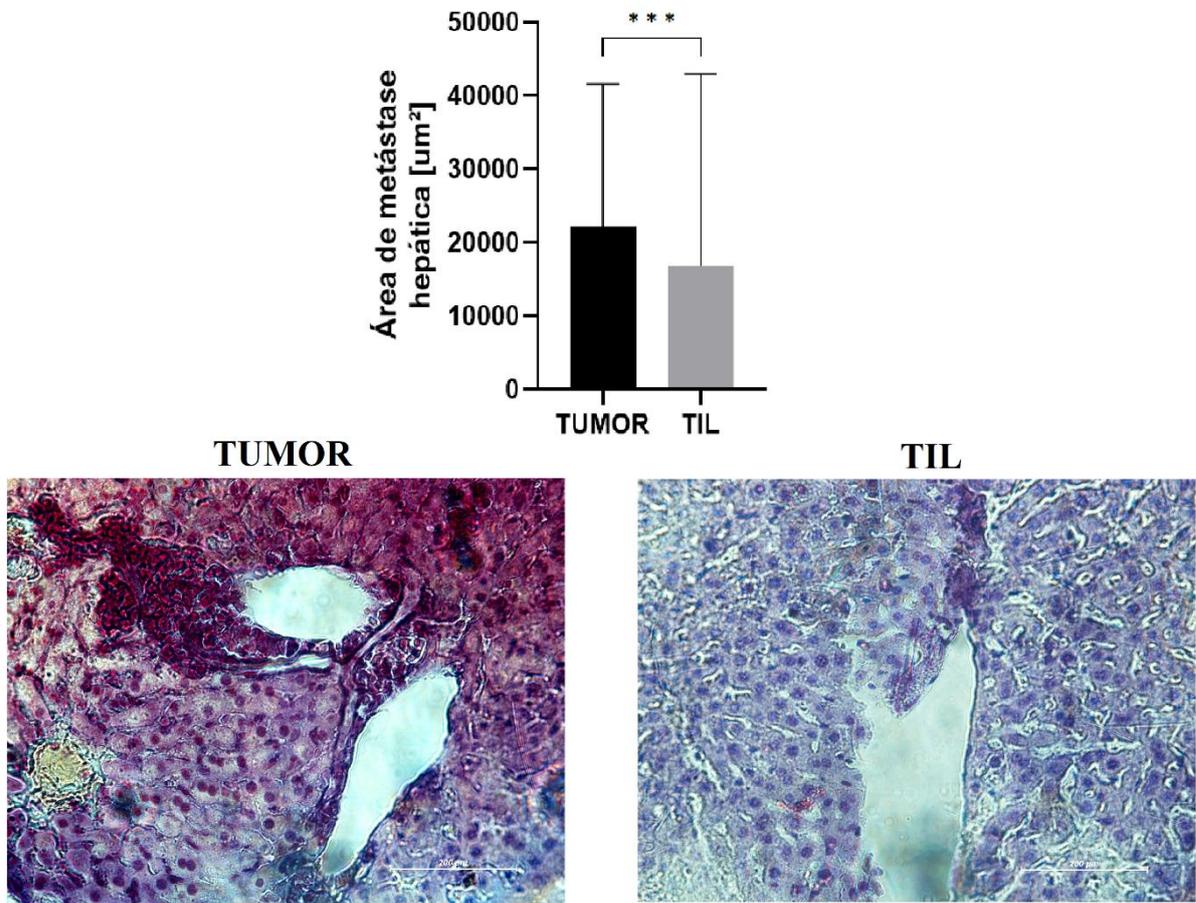


Figura 19: A imunoterapia com linfócitos tumor infiltrantes (TIL) promove redução de áreas metastáticas hepáticas de camundongos Balb/c induzidos a câncer mamário com 4T1. Análise das áreas de metástases hepáticas com as áreas mensuradas em μm^2 . As áreas foram medidas com o uso da ferramenta *Polygon Select* pertencente ao microscópio Nikon Eclipse Ti2, *software* NIS Element. Os resultados foram analisados usando o teste *Mann Whitney* para 2 grupos não paramétricos. Coloração H&E. Focadas na objetiva de 40x. ***($p=0,0001$).

7 DISCUSSÃO

Nosso estudo evidenciou que a imunoterapia com linfócitos tumor infiltrantes obteve relevância significativa ao combate tumoral mamário como demonstrado *in vivo*. Das várias respostas possíveis condicionadas pelo tratamento, observamos através da citometria de fluxo que infiltrar linfócitos autólogos expandidos *in vitro* desencadeia uma resposta mais acentuada de linfócitos T auxiliares (CD4+), ao invés dos linfócitos T citotóxicos (CD8+) intratumoral (amostra de tumor), e sistêmica (amostra baço). Zacharakis N. et al (2018), utilizou o protocolo de expansão clonal dos linfócitos tumor infiltrantes mediante estímulo em cultura com IL-2 para produção da imunoterapia com TIL em seu estudo, e demonstrou em humanos maior eficácia da imunoterapia antitumoral em tumores com altas mutações somáticas, como melanoma; mas contrário aos nossos resultados, eles não obtiveram grande efeito em câncer epitelial comum, como mama. Entretanto, cerca de 62,5% das células infundidas nos pacientes eram linfócitos T CD4, até mesmo com memória, mas com tratamento proposto de inocular uma dose da imunoterapia. Sendo assim, a proposta do nosso estudo em inocular 2 doses da imunoterapia ao invés de uma, obteve resultados significativos ao diminuir a progressão do tumor de mama.

Zhang L. et al (2015) desenvolveram um estudo utilizando a infusão de TIL CD8+ somente, modificados para secretar IL-12 em nove pacientes humanos e eles observaram em seu ensaio clínico randomizado que mesmo os linfócitos citotóxicos ativados *in vitro*, estes não aumentaram a resposta antitumoral eficiente. Esse resultado em melanoma metastático possui uma possível semelhança ao modelo de câncer de mama utilizado em nosso trabalho, onde observamos que este fenótipo linfocitário está mais reduzido em todas as amostras.

O câncer de mama possui vários tipos celulares interagindo no microambiente tumoral, incluindo os macrófagos (LEE S. S., CHEAH 2019). Mediante essa interação, Nalio Ramos et al (2022) desenvolveram um estudo para aprofundar nas interações de macrófagos com células T CD8. Eles mostram em amostras tumorais de câncer de mama em humanos e camundongos dois genes diferentes pertencentes a macrófagos intratumorais, sendo eles FOLR2 e TREM2; este fora comprovado que está altamente ligado a presença de linfócitos T CD8, aquele é ausente em tecidos glandulares mamários normais, mas aumenta conforme a progressão tumoral. O presente estudo nos mostra por citometria de fluxo que a presença de células T citotóxicas no tumor não há significância entre os grupos, sendo assim, possivelmente os macrófagos não estão envolvidos nos efeitos antitumorais condicionados pela imunoterapia com TIL.

Vale ressaltar que embora a população total dos linfócitos esteja aumentada, não necessariamente estejam manifestando receptores de ativação, como CD25. Paralelo ao nosso estudo, Sun Z. et al (2019) induziu a linhagem celular 4T1 em modelos murinos, contudo o protocolo do tratamento desses animais foi utilizado como sendo somente 1 dose e 3 dias antes da eutanásia para analisar o infiltrado desse tipo celular. Eles analisaram o perfil desses linfócitos pós tratamento, e a expressão de CD25 está mais acentuada em células Treg, potencializando os efeitos imunossupressores. Possivelmente, os linfócitos infiltrados no tumor condicionados pela imunoterapia com TIL podem estar vinculados ao Treg, necessitando de análise mais específica de fatores de transcrição como Foxp3. Contudo, em comparação ao estudo de Sun Z. et al (2015), nossos resultados demonstraram que mesmo a expressão CD25 esteja vinculada a Treg, o protocolo proposto em nosso estudo utilizando 2 doses condicionou a diminuição significativa desse receptor nas células linfóides, conseqüentemente desfavorecendo o escape tumoral e aumentando o efeito antitumoral.

Algo intrigante que deve ser ressaltado é a metodologia de ativação de TIL *in vitro* mediada pelo estímulo de IL-2 e a secreção desta citocina no microambiente tumoral após imunoterapia. Vários estudos utilizam e relatam a proliferação e ativação dos linfócitos T mediante presença de IL-2, mas esta citocina não demonstrou altas concentrações no microambiente tumoral em nosso estudo. A grande questão é como isso é possível? Não havendo dados na literatura a fim de correlacionar com o microambiente tumoral do câncer de mama, foi testado em um estudo a correlação da IL-2 e receptores inibitórios da resposta imune em melanoma metastático. Liu Yuing et al. (2021), demonstraram em modelos experimentais murinos que inesperadamente a influência de IL-2 pode colaborar para exaustão de células T CD8 infiltrantes por evidenciar uma regulação positiva de receptores inibitórios e diminuindo secreção de citocinas efetoras, granzimas e perforinas. Sendo assim, há possibilidade desse mecanismo ser semelhante ao câncer de mama utilizado em nosso estudo. A progressão tumoral deficiente e a baixa secreção de IL-2 obtidos em nossos resultados, favorecem essa probabilidade. Neste estudo a imunoterapia diminuiu significativamente os níveis de IL-2, mas ao mesmo tempo as funções dos linfócitos antitumorais foram evidentemente preservadas devido resultado do volume tumoral.

As expressões de IL-10 nos linfócitos foram significativamente reduzidas em amostras tumorais, semelhante ao trabalho feito por Sawant et al. (2019), onde demonstraram através de um estudo com camundongos induzidos ao melanoma, pela linhagem celular B16 e tratados com TIL, através da criação de um sistema experimental, foram comparando animais

responsivos e não responsivos a IL-10 e IL-35. Dentre esses, os animais não responsivos a estas citocinas obtiveram uma resposta antitumoral mais significativa e conseqüentemente um crescimento reduzido do tumor. Sugerindo que a imunoterapia em nosso estudo ao manter baixa secreção de IL-10 no tumor, manteve o efeito antitumoral funcional.

As funções efetoras dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ demonstraram que nem sempre estão concordando entre si. Respostas imunológicas de ambas as células tendem a ser diferentes mediante funcionalidades diferentes (FARHOOD et al 2019; BORST J., et al 2018). Sendo assim, nossos resultados mostram que o TNF- α se comportou diferente em ambos perfis de linfócitos. Embora não haja relatos desta citocina em camundongos induzidos ao câncer de mama e tratados com TIL, Van Astan (2021), demonstrou em um experimento realizado em humanos, onde expandiu-se os TIL, e mesmo que ativados por fármacos, tendem a secretar menos TNF- α . Rizzo A. et al. (2014), mostraram em câncer colorretal tratado com a imunoterapia com linfócitos tumor infiltrantes que as células CD4 podem expressar IL-17A que caracteriza uma resposta Th17, sendo este perfil não tão indicado ao combate tumor, mas baseado na comparação entre camundongos super expressivos e não expressivos para Smad7, cujo conduz ao perfil Th17, sugere que fontes maiores de TNF- α são necessárias para resposta antitumoral eficiente. Mediante a necessidade da alta secreção de TNF- α pelas células T CD4 para conduzir aos efeitos antitumorais, no presente trabalho sugerimos que a utilização da imunoterapia com TIL com 2 doses consegue aumentar significativamente a secreção dessa citocina no microambiente tumoral e os efeitos antitumorais.

Como efeito negativo da imunoterapia com TIL, o TGF- β aumentou em comparação ao grupo tumor, sendo que esta citocina possui caráter anti-inflamatória (TZAVLAKI K., MOUSTAKAS A., 2020). Este fator de crescimento ainda está relatado em estudos semelhantes contudo, Hirai I. et al. (2020) relataram um paciente que recebeu TIL ao tratar melanoma de mucosa e concluíram que a baixa secreção de TGF- β aumenta a infiltração de linfócitos T CD8 *in vivo* e a secreção da quimiocina CXCL9 em células APCs. Supostamente nossos dados demonstram haver certa semelhança ao trabalho de Harai I, pois a alta secreção de TGF- β encontrada na dosagem por ELISA pôde ocasionar o desfavorecimento da infiltração dessas células T CD8⁺ no microambiente tumoral.

Um estudo realizado por Zhang L. et al. (2015) mencionado anteriormente, teve por metodologia modificar geneticamente TIL para codificarem IL-12. Em seus resultados, primeiro foi demonstrado que após administração dessas células, raramente essa citocina persistia; segundo, observaram que após a administração de TIL modificados para secretarem

IL-12 em pacientes com metástases, obteve-se regressão completa contínua em 38 meses, levando a probabilidade do aumento de secreção de IL-12 em nossos resultados possuírem interação com a regressão tumoral e conseqüentemente as metástases. Em um estudo desenvolvido por Zhang L. et al., (2015), eles discutem seus resultados dizendo que a terapia de TIL geneticamente modificada para secretar IL-12 somente obteve-se tais resultados na ausência de administração de altas doses de IL-2, sugerindo então que a IL-2 poderia de certa forma prejudicar a funcionalidade da interleucina-12. Logo, nossos resultados nos possibilitam sugerir que em modelos de câncer de mama isso também acontece, onde comparando as secreções de IL-12 e IL-2, estas estão antagônicas. Enquanto em amostras tumorais tratadas com TIL há uma alta secreção de IL-12 e a diminuição de IL-2, no grupo tumor há uma baixa secreção de IL-12 e alta secreção de IL-2. Levando então nossos resultados sugerirem que mesmo que não haja modificações genéticas associadas a secreção de IL-12 no presente trabalho, a metodologia usada e principalmente o protocolo de tratamento, promoveram concentrações significativas de IL-12 e seus efeitos antitumorais na ausência de IL-2, onde esta suprime aquela.

Sendo assim, os efeitos antitumorais da imunoterapia demonstraram estar presentes na regressão tumoral, como também em órgãos específicos de metástases derivadas do câncer mamário humano. Stevanovic S. et al. (2019), demonstraram os efeitos clínicos da imunoterapia ACT, utilizando TIL, em um paciente de 60 com câncer de orofaringe a qual já havia sido submetido a cinco agentes anticancerígenos com presentes focos metastáticos no tórax sem resultado que, somente após a imunoterapia com linfócitos tumor infiltrantes todos os locais da doença tiveram regressão completa, sem vestígios de reversão do quadro durante 51 meses. Em contraposição aos nossos resultados obtidos de amostras hepáticas após o tratamento com TIL, vimos que embora haja uma regressão significativa, os focos metastáticos não foram regredidos totalmente. Sugere-se então que a imunoterapia com linfócitos tumor infiltrantes pode levar a regressão do câncer epitelial mamário e após novos estudos e aprimoramento da técnica, possivelmente pode conduzir a regressão completa e duradoura, a qual pode ser de caráter curativo para o câncer de mama.

8 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou a eficácia da imunoterapia de linfócitos tumor infiltrantes (TIL) como imunoterapia antitumoral em camundongos Balb/c induzidos ao câncer mamário pela linhagem celular 4T1, diminuindo a progressão tumoral e combatendo focos metastáticos condicionados pela agressividade do câncer mamário.

Evidenciamos que esta imunoterapia celular adotiva condicionou um aumento da infiltração de linfócitos totais no microambiente tumoral como no baço, contudo, o infiltrado de linfócitos auxiliares é mais expressiva do que linfócitos citotóxicos. Foi observado que a imunoterapia potencializou de forma mais significativa a atividade desses linfócitos CD4 ao secretarem citocinas e manter a homeostase da resposta antitumoral do que a atividade citotóxica direta dos linfócitos CD8.

As citocinas tendenciaram a agir de forma diferente. Algumas destas como IL-2 e a expressão de CD25, descritas e solidificadas na literatura como sendo antitumorais pela ativação de linfócitos, apresentaram-se diminuídas após indução de linfócitos tumor infiltrantes como imunoterapia.

No fígado, houve a redução significativa dos focos metastáticos após aplicação da imunoterapia de linfócitos tumor infiltrantes. Pesquisas para aprofundar os mecanismos envolvidos diretos na eliminação das metástases no foco hepático ainda são necessárias.

Concluimos assim que a resposta antitumoral após a imunoterapia com linfócitos tumor infiltrantes foi desencadeada de diferentes formas, indicando que ainda precisa ser melhor elucidado todas as interações celulares e moleculares que condicionam a resposta antitumoral ter sido significativamente eficaz no combate ao câncer de mama mediado pela imunoterapia com a imunoterapia com linfócitos tumor infiltrantes.

9 REFERÊNCIAS

AHRENDTS, T., et al. CD4⁺ T cell help creates memory CD8⁺ T cells with innate and help-independent recall capacities. **Nature communications**, v.10(1), p.5531, 2019.

AKSOYLAR H.I., et al. T Cell Metabolism in Cancer Immunotherapy. **Immunometabolism**. v.2(3), 2020. DOI: 10.20900/immunometab20200020

ALSPACH, E., et al. Interferon γ and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v.11(3), 2019, DOI: 10.1101/cshperspect.a028480

ANDERSON, R. L. A framework for the development of effective anti-metastatic agents. **Nature reviews. Clinical oncology**, v.16(3), p.185–204, 2019.

APPAY V, et al. Eficácia das células T CD8⁺ na vacinação e na doença. **Nature Medicine**. v.14, p.623-628, 2008.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, p. 245–252, 1998.

BERSINI, S., et al. A combined microfluidic-transcriptomic approach to characterize the extravasation potential of cancer cells. **Oncotarget**, v.9(90), p.36110–36125, 2018.

BIRKBAK, N. J.; MCGRANAHAN, N. Cancer Genome Evolutionary Trajectories in Metastasis. **Cancer cell**, v.37(1), p.8–19, 2020.

BORST, J., et al. CD4⁺ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. **Nature reviews. Immunology**, v.18(10), p.635–647, 2018.

BURKE JD, YOUNG HA. IFN- γ : uma citocina na hora certa, está no lugar certo. **Semin Immunol**. v43, p.1–8, 2019.

CANALE, F. P., et al. CD39 Expression Defines Cell Exhaustion in Tumor-Infiltrating CD8⁺ T Cells. **Cancer research**, v.78(1), p.115–128, 2018.

COUSSENS, L. M., et al. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet?. **Science** v.339(6117), p.286–291, 2013.

CRUCERIU, D., et al. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. **Cellular oncology**, v.43(1), p.1–18, 2020.

DA SILVA, P., et al. FOXP1 negatively regulates tumor infiltrating lymphocyte migration in human breast cancer. **EBioMedicine**, v.39, p.226–238, 2019.

FARHOOD, B., et al. CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. **Journal of cellular physiology**, v.234(6), p.8509–8521, 2019.

GARCÍA-JIMÉNEZ, C.; GODING, C. R. Starvation and Pseudo-Starvation as Drivers of Cancer Metastasis through Translation Reprogramming. **Cell metabolism**, v.29(2), p.254–267, 2019.

GEUKES FOPPEN, M. H., et al. Tumor-infiltrating lymphocytes for the treatment of metastatic cancer. **Molecular oncology**, v.9(10), p.1918–1935, 2015.

GÖSCHL, L., et al. Treg cells in autoimmunity: from identification to Treg-based therapies. **Seminars in immunopathology**, v.41(3), p.301–314, 2019.

GÖSCHL, L., et al. Treg cells in autoimmunity: from identification to Treg-based therapies. **Seminars in immunopathology**, v.41(3), p.301–314, 2019.

HALL M, et al. Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) from human pancreatic tumors. **Journal of Immunotherapy of Cancer**. v.4, p.61, 2016.

HIRAI, I., et al. Adoptive cell therapy using tumor-infiltrating lymphocytes for melanoma refractory to immune-checkpoint inhibitors. **Cancer science**, v.112(8), p.3163–3172, 2021.

HU, Z.; CURTIS, C. Looking backward in time to define the chronology of metastasis. **Nature Communication** v.11, p.3213, 2020.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=2>>. Acesso em 03 mar. 2022.

JORGOVANOVIC, D., SONG, M., WANG, L. et al. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. **Biomark Res** v.8, p.49, 2020.

KAZEMI, M. H., et al. Decrease of Tumor-infiltrating Regulatory T Cells Using Pentoxifylline: An Ex Vivo Analysis in Triple-negative Breast Cancer Mouse Model. **Iranian journal of allergy, asthma, and immunology**, v.21(2), p.167–177, 2022.

KIM M. Y. Breast Cancer Metastasis. **Advances in experimental medicine and biology**, v.1187, p.183–204, 2021.

LEE, S. S.; CHEAH, Y. K. The Interplay between MicroRNAs and Cellular Components of Tumour Microenvironment (TME) on Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) Progression. **Journal of immunology research**, v.2019, id.3046379, 2019.

LI J., et al. Role of CD25 expression on prognosis of acute myeloid leukemia: A literature review and meta-analysis. **PLoS One**. v.15(7), 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0236124

LIASKOU, E., et al. Increased sensitivity of Treg cells from patients with PBC to low dose IL-12 drives their differentiation into IFN- γ secreting cells. **Journal of autoimmunity**, v.94, p.143–155, 2018.

LIU, Y., et al. A IL-2 regula a exaustão das células T CD8⁺ reativas ao tumor , ativando o receptor de hidrocarboneto aril. **Nature Immunology**. v.22 , p.358-369, 2021.

LO, H. C., et al. Resistance to natural killer cell immunosurveillance confers a selective advantage to polyclonal metastasis. **Nature Cancer**. v.1, p.709–722, 2020.

LU X. Impact of IL-12 in Cancer. **Current cancer drug targets**, v.17(8), p.682–697, 2017.

MAIMELA, N. R., et al. Fates of CD8⁺ T cells in Tumor Microenvironment. **Computational and structural biotechnology journal**, v.17, p.1–13, 2018.

MAJIDPOOR, J.; MORTEZAEE, K. Steps in metastasis: an updated review. **Medical oncology**. v.38(1), p.3, 2021.

MARUYAMA, T., et al. TGF- β and Cancer Immunotherapy. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v.45(2), p.155–161, 2022.

MENDOZA, J. L., et al. Structure of the IFN γ receptor complex guides design of biased agonists. **Nature**, v.567(7746), p.56–60, 2019.

MULLARD A. Restoring IL-2 to its cancer immunotherapy glory. **Nature reviews. Drug discovery**, v.20(3), p.163–165, 2021.

NALIO RAMOS, R., et al. Tissue-resident FOLR2⁺ macrophages associate with CD8⁺ T cell infiltration in human breast cancer. **Cell**, v.185(7), p.1189–1207.e25, 2022.

NASCIMENTO, C. S., et al. Immunotherapy for cancer: effects of iron oxide nanoparticles on polarization of tumor-associated macrophages. **Nanomedicine**. v.16(29), p.2633–2650, 2021.

NEUMANN, C., et al. Functions and regulation of T cell-derived interleukin-10. **Seminars in immunology**, v.44, p.101344, 2019.

NI, J., et al. Single-Cell RNA Sequencing of Tumor-Infiltrating NK Cells Reveals that Inhibition of Transcription Factor HIF-1 α Unleashes NK Cell Activity. **Immunity**, v.52(6), p.1075–1087.e8, 2020.

NI, J., et al. Single-Cell RNA Sequencing of Tumor-Infiltrating NK Cells Reveals that Inhibition of Transcription Factor HIF-1 α Unleashes NK Cell Activity. **Immunity**, v.52(6), p.1075–1087, 2020.

NOVAIS, F. O., et al. CD8⁺ T Cells Lack Local Signals To Produce IFN- γ in the Skin during Leishmania Infection. **Journal of immunology**. v.200(5), p.1737–1745, 2018.

NOYES, D., et al. Tumor-associated Tregs obstruct antitumor immunity by promoting T cell dysfunction and restricting clonal diversity in tumor-infiltrating CD8⁺ T cells. **Journal for immunotherapy of cancer**, v.10(5), e004605, 2022.

OUYANG, W.; O'GARRA, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. **Immunity**, v.50(4), p.871–891, 2019.

PALUCKA, A. K.; Coussens, L. M. The Basis of Oncoimmunology. **Cell**, v.164(6), p.1233–1247, 2016.

PENG, Y., et al. CD25: A potential tumor therapeutic target. **International journal of cancer**, 10.1002/ijc.34281, 2022.

PENG, Y., et al. CD25: A potential tumor therapeutic target. **International journal of cancer**, 2020, DOI: 10.1002/ijc.34281

RIZZO, A., et al. Smad7 induces plasticity in tumor-infiltrating Th17 cells and enables TNF-alpha-mediated killing of colorectal cancer cells. **Carcinogenesis**, v.35(7), p.1536–1546, 2014.

ROSENBERG, S. A., et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. **Journal of the National Cancer Institute**, v.86(15), p.1159–1166, 1994.

ROSS, S. H.; CANTRELL, D. A. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. **Annual review of immunology**, v.36, p.411–433, 2018.

ROY, S. EGFR-HIF1 α signaling positively regulates the differentiation of IL-9 producing T helper cells. **Nature communications**, v.12(1), p.3182, 2021.

RUFFELL, B., et al. Macrophage IL-10 blocks CD8⁺ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. **Cancer cell**, v.26(5), p.623–637, 2014.

SARAIVA, M. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. **The Journal of experimental medicine**, v.217(1), e20190418, 2020.

SASAGU K., et al. Prognostic significance of tumour-infiltrating lymphocytes for oestrogen receptor-negative breast cancer without lymph node metastasis. **Oncol Lett**. v.17(3), p. 2647–2656, 2019.

SATO, K., et al. Spatially selective depletion of tumor-associated regulatory T cells with near-infrared photoimmunotherapy. **Sci. Trad. Med.** v.8(352), p. 352ra110, 2016.

SAWANT, D. V., et al. Adaptive plasticity of IL-10⁺ and IL-35⁺ T_{reg} cells cooperatively promotes tumor T cell exhaustion. **Nature immunology**, v.20(6), p.724–735, 2019.

SAWANT, D. V., et al. Adaptive plasticity of IL-10⁺ and IL-35⁺ T_{reg} cells cooperatively promotes tumor T cell exhaustion. **Nature immunology**, v.20(6), p.724–735, 2019.

SCHITO, L.; REY, S. Hypoxic pathobiology of breast cancer metastasis. *Biochimica et biophysica acta*. **Reviews on cancer**, p.1868(1), v.239–245, 2017.

SILK, A. W.; MARGOLIN, K. Cytokine Therapy. **Hematology/oncology clinics of North America**, v.33(2), p.261–274, 2019.

STANTON, E. S; DISIS M. L. Clinical significance of tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer. **Journal for Immunotherapy of Cancer**. v.4, p.59, 2016.

STEVANOVIĆ, S., et al. A Phase II Study of Tumor-infiltrating Lymphocyte Therapy for Human Papillomavirus-associated Epithelial Cancers. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v.25(5), p.1486–1493, 2019.

STEVANOVIĆ, S., et al. A Phase II Study of Tumor-infiltrating Lymphocyte Therapy for Human Papillomavirus-associated Epithelial Cancers. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v.25(5), p.1486–1493, 2019.

SUN, Z., et al. A next-generation tumor-targeting IL-2 preferentially promotes tumor-infiltrating CD8⁺ T-cell response and effective tumor control. **Nature communications**, v.10(1), p.3874, 2019.

SYED V. TGF-β Signaling in Cancer. **Journal of cellular biochemistry**, v.117(6), p.1279–1287, 2016.

TANAKA A., SAKAGUCHI S. Alvejando células Treg na imunoterapia do câncer. **European Journal of Immunology**. v.49(8), p.1140-1146, 2019.

TAY R.E., et al. Revisitando o papel das células T CD4⁺ na imunoterapia do câncer – novos insights sobre velhos paradigmas. **Cancer Gene Therapy**. v.28, p.5-17, 2021.

TOSOLINI, M., et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. **Cancer research**, v.71(4), p.1263–1271, 2011.

TZAVLAKI, K.; MOUSTAKAS, A. TGF- β Signaling. **Biomolecules**, v.10(3), p.487, 2020.

UNGEFROREN H. Blockade of TGF- β signaling: a potential target for cancer immunotherapy? **Expert Opin Ther Targets**. v.23(8), p.679–93, 2019.

VAN ASTEN, S. D., et al. T cells expanded from renal cell carcinoma display tumor-specific CD137 expression but lack significant IFN- γ , TNF- α or IL-2 production. **Oncoimmunology**, v.10(1), id.1860482, 2021.

VAN DER LEUN A.M., et al. CD8⁺ T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis. **Nature Reviews Cancer**. v.20(4), p.218-232, 2020.

VIEIRA, J. F., et al. Prophylactic Dendritic Cell Vaccination in Experimental Breast Cancer Controls Immunity and Hepatic Metastases. **Anticancer research**, v.41(7), p.3419–3427, 2021.

WANICZEK, D., et al. Salivary Concentrations of Chemerin, α -Defensin 1, and TNF- α as Potential Biomarkers in the Early Diagnosis of Colorectal Cancer. **Metabolites**, v.12(8), p.704, 2022.

XIE, F., et al. TGF- β signaling in cancer metastasis. **Acta biochimica et biophysica Sinica**, v.50(1), p.121–132, 2018.

YANG, L., et al. Disease progression model of 4T1 metastatic breast cancer. **Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics**. v.47(1), p.105–116, 2020.

YIN, X., et al. Dendritic Cell Regulation of T Helper Cells. **Annual review of immunology**, v.39, p.759–790, 2021.

YING, X., et al. Research progress on the molecular mechanisms of hepatic metastasis in lung cancer: a narrative review. **Annals of palliative medicine**, v.10(4), p.4806–4822, 2021.

ZACHARAKIS, N., et al. Immune recognition of somatic mutations leading to complete durable regression in metastatic breast cancer. **Nature medicine**, v.24(6), p.724–730, 2018.

ZHANG, G. et al. Granzyme B and perforin produced by SEC2 mutant-activated human CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells induce apoptosis of K562 leukemic cells by the mitochondrial apoptotic pathway. **International journal of biological macromolecules**, v.90, p.284–290, 2021.

ZHANG, L., et al. Tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma. **Clinical cancer research**, v.21(10), p.2278–2288, 2015.

ZHAO M, et al. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. **International Journal of Biological Sciences**. v.14(2), p.111-123, 2018.

ANEXO A – 23085.008739/2020-23 APROVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Comissão de Ética no Uso de Animais
R. Conde Prados, nº 191 - Bairro Abadia Uberaba/MG CEP 38025-260
(34) 3700-6802 E-mail: ceua@uftm.edu.br

Uberaba, 21 de abril de 2021

PARECER Nº 1/2021/CEUA/PROPPG
PROCESSO Nº 23085.008739/2020-24
INTERESSADO: COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS, MARCIA ANTONIAZI MICHELIN, NÚCLEO DE BIOTÉRIOS
ASSUNTO: Parecer de aprovação da proposta - Influência da vacina de células dendríticas e linfócitos tumor infiltrantes nas respostas imunológicas de tumores experimentais em camundongos induzidos por linhagens celulares B16-F10 e 4T1

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Influência da vacina de células dendríticas e linfócitos tumor infiltrantes nas respostas imunológicas de tumores experimentais em camundongos induzidos por linhagens celulares B16-F10 e 4T1”, registrada com o nº 23085.008739/2020-24, sob a responsabilidade de **Márcia Antoniazi Michelin** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em reunião de **06/11/2020**. A justificativa da geração desse laudo técnico no presente momento é a liberação do Biotério Setorial do IPON pelo Médico Veterinário responsável em virtude das adequações devidas terem sido realizadas nessa instalação.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/10/2020 à 30/09/2022
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongos Balb/c e C57/BL
Nº de animais	120 Balb/c e 120 C57/BL
Peso/idade	10 a 15 g/ 4 a 6 semanas - para ambas linhagens
Gênero	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFTM.