

Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Instituto de Pesquisa em Oncologia

Dissertação de Mestrado

**MOLÉCULAS DE ADESÃO EM METÁSTASES PULMONARES E HEPÁTICAS DE
TUMOR DE MAMA EXPERIMENTAL SUBMETIDOS À IMUNOTERAPIA COM
VACINA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Taíssa Nayara Lemos de Abreu

UBERABA

2022

TAÍSSA NAYARA LEMOS DE ABREU

**MOLÉCULAS DE ADESÃO EM METÁSTASES PULMONARES E HEPÁTICAS DE
TUMOR DE MAMA EXPERIMENTAL SUBMETIDOS À IMUNOTERAPIA COM
VACINA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Concentração em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin
Colaboradora: Dra. Jéssica Ferreira Vieira

UBERABA

2022

TAÍSSA NAYARA LEMOS DE ABREU

**MOLÉCULAS DE ADESÃO EM METÁSTASES PULMONARES E HEPÁTICAS DE
TUMOR DE MAMA EXPERIMENTAL SUBMETIDOS À IMUNOTERAPIA COM
VACINA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em ciências da saúde área de concentração Imunologia Básica e Aplicada.

Membros da banca: Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin
Prof. Dr. Marcos de Lucca Moreira Gomes
Prof. Dr. Helio Humberto Angotti Carrara

UBERABA

2022

Catálogo na fonte:

Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

A145m Abreu, Taíssa Nayara Lemos de
Moléculas de adesão em metástases pulmonares e hepáticas de tumor de mama experimental submetidos à imunoterapia com vacina de células dendríticas / Taíssa Nayara Lemos de Abreu. – 2022.
89 f.: il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2022
Orientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin

1. Neoplasias de mama. 2. Imunoterapia adotiva. 3. Caderinas. I. Michelin, Márcia Antoniazi. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 618.19-006

Mirtes Soares - Bibliotecária CRB6/2181

DEDICATÓRIA

À minha família, principalmente meus avós Lázaro e Dalva, e também minha tia Sirley que não chegou a viver essa vitória comigo, e aos meus amigos, pelo tempo que deixamos de estar juntos.

Aos meus pais, Rivelino e Claudia, e meu irmão Thiago, a eles todos os créditos...

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin, pela dedicação nas correções e orientações neste período de aprendizado. E pelo amparo e carinho nos momentos em que atravessei períodos difíceis nessa fase. Sem ela, essa caminhada não seria possível.

À minha colaboradora Dra. Jéssica Ferreira Vieira, pelo companheirismo, paciência e disponibilidade. Só pude alçar um vôo tão alto, porque me mostrou como usar minhas asas.

Aos meus colegas do IPON Allana, Ana Paula, Eleni, Elias, Gledson, Jhennyfer, João Pedro, Letícia, Lucas, Nathália e Saulo que tornaram um período de longa dedicação em algo divertido, leve e prazeroso. E um agradecimento especial ao meu amigo Lenilson, que não só se tornou alguém conquistado no IPON, como se tornou um presente que a vida me deu. Por todo o incentivo, companheirismo, risadas e surtos sou grata.

Ao técnico do laboratório, Cláudio, pelo apoio e cuidado em me mostrar a forma correta de cada etapa deste projeto, e pelos conselhos que com muito carinho me foram dados.

Meus sinceros agradecimentos também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), fundação que me proporcionou desenvolver de maneira integral esse trabalho.

“Toda mudança, todo salto para um nível maior de energia e consciência, envolve um ritual de passagem. A cada subida para um degrau mais alto na escada da evolução pessoal, devemos atravessar um período de desconforto, de iniciação. Eu nunca conheci uma exceção.”

Dann Millman

RESUMO

Tanto a metástase quanto os processos envolvidos na disseminação de células cancerosas da lesão primária para outros órgãos, abrangem uma variedade de mecanismos que incluem a invasão ou a convivência com o estroma e escape da vigilância do sistema imune que inibe ou associa seus processos antitumorogênicos. As moléculas de adesão têm sido estudadas com o objetivo de compreender seu papel no câncer de mama, com a finalidade de relacionar essas descobertas com o desenvolvimento terapêutico visto que algumas dessas moléculas têm funções de ativação e migração celular que influenciam diretamente a resposta imune pró-inflamatória. Estudos publicados por nosso grupo de pesquisa demonstram que a vacina de células dendríticas administrada de forma preventiva possui a capacidade de reduzir metástases pulmonares e hepáticas. Contudo, resta esclarecer se as moléculas de adesão poderiam estar envolvidas nesta redução. Dentre os objetivos do estudo, procuramos analisar se a presença das moléculas de adesão CD40, CD54, CD62L, CD102, CD106 e CD152 no pulmão e no fígado do grupo vacinado está correlacionado à redução metastática nesses órgãos, bem como avaliar os níveis de óxido nítrico e a concentração das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Para isso, foram utilizadas 25 camundongos fêmeas da linhagem isogênica Balb/c, onde 7 animais foram separados para um grupo controle livre de interferências, e 3 animais foram utilizados para a confecção de vacina de células dendríticas. Os animais restantes foram divididos em 2 grupos, um grupo vacinado profilaticamente (n = 7) e submetido à indução tumoral e outro grupo com animais submetidos apenas à indução tumoral (n = 8), sendo utilizadas amostras de fígado e pulmão desses animais de ambos os grupos, bem como amostras de células esplênicas. As amostras de fígado e pulmão emblocadas em parafina foram posteriormente analisadas por técnica de Imunofluorescência para investigação das moléculas de adesão, enquanto outra parte foi submetida ao processo de extração de proteínas para análise através da técnica de *ELISA*. As dosagens e óxido nítrico foram realizadas no sobrenadante de cultura de células esplênicas. Os resultados demonstraram que a Intensidade Média de Fluorescência (MFI) encontra-se aumentada nas moléculas CD40 (p=0,0023), CD54 (P = 0,0030), e CD152 (p < 0,0001) nos fígados do grupo vacinado e sem significância estatística na molécula CD106 (p = 0,1585) do mesmo grupo. Já as moléculas CD62L (p <0,0001) e CD102 (p <0,0001) se encontravam aumentadas nas amostras de fígado do grupo que não foi vacinado. Quanto às análises de amostra do pulmão, constatou-se o aumento nas moléculas CD62L (p < 0,0001), CD102 (p < 0,0001) e CD152 (p < 0,0001) no grupo vacinado. Não houve estatística significativa em CD40

($p = 0,2876$) e CD106 ($p = 0,8070$) no mesmo grupo. Já o aumento nas amostras de pulmão do grupo não vacinado, foi visto na molécula CD54 ($p = 0,0010$). Com relação aos níveis de óxido nítrico, os valores se encontraram aumentados no grupo vacinado da cultura estimulada com LPS ($p = 0,0576$). Já a citocina IL-1 β estava aumentada no fígado do grupo vacinado ($p < 0,0046$), a citocina IL-6 não mostrou relevância estatística em ambos os órgãos do grupo ($p < 0,4818$) e a citocina TNF- também em ambos os órgãos do grupo ($p < 0,0982$). Esses achados direcionam o entendimento da importância de um mecanismo que promova o equilíbrio da expressão dessas moléculas de adesão no organismo, para que haja um direcionamento leucocitário adequada e eficiente durante o combate antitumoral. E as células dendríticas sendo eficazes mediadoras da resposta ativada por linfócitos T demonstrou envolvimento nesse direcionamento celular. Portanto a vacinação profilática com células dendríticas, possui a capacidade de modular a resposta antitumoral mesmo sem prévia estimulação específica das moléculas de adesão, que por sua vez possuem a capacidade de direcionar o comportamento migratório das células tumorais.

Palavras-chave: Caderinas. Imunoterapia Adotiva. Neoplasias de Mama.

ABSTRACT

Both metastasis and the processes involved in the spread of cancer cells from the primary lesion to other organs encompass a variety of mechanisms that include invasion or coexistence with the stroma and escape from the surveillance of the immune system that inhibits or associates its antitumor processes. Adhesion molecules have been studied in order to understand their role in breast cancer, in order to relate these findings to therapeutic development since some of these molecules have activation and cell migration functions that directly influence the pro-inflammatory immune response. inflammatory. Studies published by our research group demonstrate that preventively administered dendritic cell (DC) vaccine has the ability to reduce lung and liver metastases. However, it remains to be clarified whether adhesion molecules could be involved in this reduction. Among the objectives of the study, we sought to analyze whether the presence of adhesion molecules CD40, CD54, CD62L, CD102, CD106 and CD152 in the lung and liver of the vaccinated group is correlated with the metastatic reduction in these organs, as well as to assess the levels of nitric oxide and the concentration of the cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α . For this, 25 female mice of the isogenic Balb/c strain were used, where 7 animals were separated for a control group free of interferences, and 3 animals were used for the preparation of dendritic cell vaccine. The remaining animals were divided into 2 groups, a group vaccinated prophylactically (n = 7) and submitted to tumor induction and another group with animals submitted only to tumor induction (n = 8), with liver and lung samples from both animals being used. groups, as well as splenic cell samples. The paraffin-embedded liver and lung samples were later analyzed by Immunofluorescence technique to investigate the adhesion molecules, while another part was submitted to the protein extraction process for analysis through the ELISA technique. The dosages and nitric oxide were carried out in the splenic cell culture supernatant. The results showed that the Mean Fluorescence Intensity (MFI) is increased in the molecules CD40 (p=0.0023), CD54 (P=0.0030), and CD152 (p < 0.0001) in the livers of the vaccinated group. and without statistical significance in the CD106 molecule (p = 0.1585) from the same group. On the other hand, CD62L (p <0.0001) and CD102 (p <0.0001) molecules were increased in liver samples from the group that was not vaccinated. As for lung sample analyses, there was an increase in CD62L (p < 0.0001), CD102 (p < 0.0001) and CD152 (p < 0.0001) molecules in the vaccinated group. There was no statistically significant difference in CD40 (p = 0.2876) and CD106 (p = 0.8070) in the same group. The increase in lung samples from the non-vaccinated group was seen in the CD54 molecule (p = 0.0010). Regarding the

levels of nitric oxide, the values were found to be increased in the vaccinated group of the culture stimulated with LPS ($p = 0.0576$). The cytokine IL-1 β was increased in the liver of the vaccinated group ($p < 0.0046$), the cytokine IL-6 did not show statistical relevance in both organs of the group ($p < 0.4818$) and the cytokine TNF- also in both organs in the group ($p < 0.0982$). These findings guide the understanding of the importance of a mechanism that promotes the balance of the expression of these adhesion molecules in the body, so that there is an adequate and efficient leukocyte targeting during the antitumor fight. And dendritic cells being effective mediators of the response activated by T lymphocytes demonstrated involvement in this cellular targeting. Therefore, prophylactic vaccination with dendritic cells (DCs) has the ability to modulate the antitumor response even without prior specific stimulation of adhesion molecules, which in turn have the ability to direct the migratory behavior of tumor cells.

Key Words: Cadherins. Adoptive Immunotherapy. Breast Neoplasms.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau <i>Celsius</i>
µL	Microlitro
4T1	Linhagem celular tumoral murina de células 4T1
A	Símbolo alfa
B	Símbolo beta
B	Linfócito B
Balb/c	Linhagem de camundongo albina e isogênica
BSA	Albumina de soro bovino
C ₃ H ₃ NaO ₃	Piruvato de Sódio
CD102	Molécula de Adesão Intercelular 2
CD106	Proteína 1 de Adesão Celular Vascular
CD152	Proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico
CD154	Receptor por CD40L
CD40	Grupamento de diferenciação 40
CD40L	Ligante de CD40
CD54	Molécula de adesão intercelular-1
CD62L	L-Selectina
CDCs	Células dendríticas (DCs) convencionais
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cm ²	Centímetros quadrados
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTLA-4	Proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico
DC	Célula dendrítica (DC) (Inglês: <i>Dendritic Cell</i>)
Dr	Doutor
Dr ^a	Doutora
<i>Elisa</i>	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FG3	Fígado grupo 3
FG4	Fígado grupo 4
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (Inglês: <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>)

G	Gramas
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (Inglês: <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
H	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
ILs	Interleucinas
IMDM	Meio de Iscove (Inglês: <i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>)
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPON	Instituto de Pesquisa em Oncologia
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MHC	Moléculas do complexo de histocompatibilidade
ml	Mililitro
Mm	Milímetros
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NED	N-(1-Naphthyl) ethylene-diamine dihydrochloride
ng/ μ L	Nanograma por Microlitro
NK	Célula Natural Assassina (Inglês: <i>Natural Killer</i>)
Nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico (Inglês: <i>Nitric Oxide</i>)
NOS	Genes óxido nítrico sintases
P	Probabilidade
PBS	Solução Salina Tamponada (Inglês: <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PE	Ficoeritrina (Inglês: <i>Phycoerythrin</i>)
PFA	Paraformaldeído
PG1	Pulmão grupo 1

PG2	Pulmão grupo 2
PHA	Fitohemaglutinina
Prof ^a	Professora
px^2	Pixel quadrado
ROIs	Regiões de interesse
ROS	Espécies reativas de oxigênio (Inglês: <i>Reactive Oxygen Species</i>)
Rpm	Rotação por minuto
S.D.S	Dodecil sulfato de sódio (Inglês: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SBF	Soro bovino fetal
T	Linfócito T
T CD4	Grupamento de diferenciação 4 dos linfócitos T
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
VCAM-1	Proteína 1 de Adesão Celular Vascular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Cascata metastática.	20
Figura 2. Delineamento experimental.	33
Figura 3: Dimensão de captura de imagem através do software.	35
Figura 4: Dimensão da captura de imagem por pixel.	36
Figura 5: Dados de captura de imagem.	36
Figura 6: Avaliação da molécula CD40 em células pulmonares dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência.	42
Figura 7: Avaliação da molécula CD40 em células hepáticas dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência.	43
Figura 8: Avaliação da molécula CD54 em células pulmonares dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência.	44
Figura 9: Avaliação da molécula CD54 em células hepáticas dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência.	45
Figura 10: Avaliação da molécula CD62L em células pulmonares dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência.	46
Figura 11: Avaliação da molécula CD62L em células hepáticas dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência.	47
Figura 12: Avaliação da molécula CD102 em células pulmonares dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência.	48
Figura 13: Avaliação da molécula CD102 em células hepáticas dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência.	49
Figura 14: Avaliação da molécula CD106 em células pulmonares dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência.	50
Figura 15: Avaliação da molécula CD106 em células hepáticas dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência.	51
Figura 16: Avaliação da molécula CD152 em células pulmonares dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência.	52
Figura 17: Avaliação da molécula CD152 em células hepáticas dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência.	53

Figura 18: Avaliação dos níveis de óxido nítrico por reação de <i>Griess</i> dos grupos vacinados e não vacinados.	54
Figura 19: Dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α por <i>Elisa</i> em células pulmonares e hepáticas dos grupos vacinados e não vacinados.	55
Tabela 1: Descrição de anticorpos utilizados na Imunofluorescência direta	35
Tabela 2: Reagentes utilizados durante o procedimento de análise de óxido nítrico	37
Tabela 3: Reagentes para preparo de soluções	38
Tabela 4: Citocinas	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 CÂNCER	18
1.2 RESPOSTA IMUNE À TUMORES	18
1.3 METÁSTASES	19
1.4 MOLÉCULAS DE ADESÃO	20
1.4.1 Grupamento de diferenciação 40 (CD40)	21
1.4.2 Molécula de adesão intercelular-1 (CD54)	22
1.4.3 L-Selectina (CD62L)	23
1.4.4 Molécula de adesão intercelular 2 (CD102)	23
1.4.5 Proteína 1 de adesão celular vascular (CD106)	24
1.4.6 Proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico (CTLA-4 ou CD152)	24
1.5 ÓXIDO NÍTRICO (NO)	25
1.6 CITOCINAS	25
1.6.1 Interleucina 1 beta (IL-1β)	26
1.6.2 Interleucina 6 (IL-6)	26
1.6.3 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF-α)	26
1.7 IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCS)	26
2. JUSTIFICATIVA	29
3. HIPÓTESE	30
4. OBJETIVOS	31
4.1 OBJETIVO GERAL	31
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
5. MATERIAIS E MÉTODOS	32
5.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	32
5.2 MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA MAMÁRIO	33
5.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA	34
5.4 REAÇÃO DE GRIESS	37
5.5 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA)	38
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
6. RESULTADOS	41

6.1. IMUNOFLUORESCÊNCIA	41
6.1.1 Análise da molécula CD40 em metástases pulmonares e hepáticas	41
6.1.2 Análise da molécula CD54 em metástases pulmonares e hepáticas	43
6.1.3 Análise da molécula CD62L em metástases pulmonares e hepáticas	45
6.1.4 Análise da molécula CD102 em metástases pulmonares e hepáticas	47
6.1.5 Análise da molécula CD106 em metástases pulmonares e hepáticas	49
6.1.6 Análise da molécula CD152 em metástases pulmonares e hepáticas	51
6.2 REAÇÃO DE GRIESS	53
6.2.1 Análise da concentração de óxido nítrico em amostras de cultura de células do baço	53
6.3 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA	54
6.3.1 Análise da dosagem das citocinas IL-1β, IL-6 e TNF-α em células pulmonares e hepáticas	54
7. DISCUSSÃO	55
8. CONCLUSÃO	62
9. REFERÊNCIAS	63
10. ANEXOS	70
10.1 PARECER TÉCNICO (CEUA)	70
10.2 CERTIFICADO DO PROTOCOLO 379 (CEUA)	71
10.3 ARTIGO	72
10.4 COMPROVANTE DE SUBMISSÃO	89

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O câncer, considerado uma questão de saúde pública, também é a segunda causa de morte no país e de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) a tendência nos próximos anos é que haja um crescimento no número de casos. Atualmente o câncer é definido como um conjunto de cerca de 50 doenças com a característica comum de crescimento desordenado de células com uma capacidade de invadir órgãos e tecidos (INCA, 2020).

Existem evidências de cânceres entre os ancestrais do homem moderno há mais de um milhão de anos. Recentemente, acredita-se que foi descoberto o câncer mais antigo do mundo, um osteossarcoma de um metatarso datado em aproximadamente 1,7 milhões de anos (CHENE et al., 2016).

A comunidade científica busca entender a sua origem e compreender mecanismos que podem promover ou inibir seu crescimento há vários séculos (HAUSMAN, 2019).

A tendência de aumento dos casos de pacientes com câncer entre outros motivos, está relacionada ao aumento de comportamentos que corroboram para essa incidência. Atividades como o uso de tabaco, sedentarismo, obesidade e padrões reprodutivos têm relação direta ao aumento desses casos, uma vez que comprometem o bom funcionamento do sistema de defesa imunológica (TORRE et al., 2016).

Um dos tipos mais comuns, é o câncer de mama. Ele acomete cerca de 29,7% de mulheres brasileiras, resultando em mais de 65.000 novos casos por ano (INCA,2021).

1.2 RESPOSTA IMUNE À TUMORES

A progressão do câncer acontece quando o sistema imune não é capaz de eliminar ou até mesmo de controlar o crescimento das células neoplásicas. Essa falha do sistema imune na prevenção dessas malignidades é multifatorial (O'SULLIVAN et al., 2019).

Na paisagem adaptativa do ecossistema de tecidos, o câncer evolui por meio de vários processos genéticos/ epigenéticos de seleção e expansão clonal. Durante décadas, as células tumorais mostraram sua capacidade de utilizar, isolar e destruir os programas celulares que regulam a divisão, sobrevivência e crescimento celular, levando à formação e disseminação de tumores. A causa mais conhecida de transformação maligna é a indução de modificações

genéticas e epigenéticas de propriedades semelhantes às células-tronco, como divisão celular infinita e bloqueio de diferenciação (CASSIM; POUYSSEGUR, 2020).

1.3 METÁSTASES

Tanto a metástase quanto os processos envolvidos na disseminação de células cancerosas, da lesão primária para outros órgãos, são a principal causa para a mortalidade do câncer. Essa disseminação de células tumorais abrange uma variedade de mecanismos que incluem a invasão ou a convivência com o estroma, e escape da vigilância do sistema imune que inibe ou associa seus processos antitumorigênicos (SUHAIL et al.,2019).

A metástase culmina em uma série de etapas sequenciais, que se inicia com a invasão por células que se originaram do tumor primário. Essas células tumorais se disseminam pela corrente sanguínea ou vasos linfáticos para órgãos distantes do local primário do tumor, sofrem a parada do ciclo celular e se aderem aos leitos capilares do órgão alvo, através da ligação á moléculas de adesão, extravasando para o parênquima, proliferando e promovendo o processo de angiogênese dentro desse órgão. Para que todas essas etapas sejam cumpridas com sucesso, as células tumorais devem sobreviver às investidas do sistema imune do hospedeiro bem como os sinais apoptóticos. Caso obtenha sucesso, o processo pode ser repetido produzindo metástases secundárias. Esse processo é chamado de cascata metastática, e está representado na figura 1 (SCULLY et al.,2012).

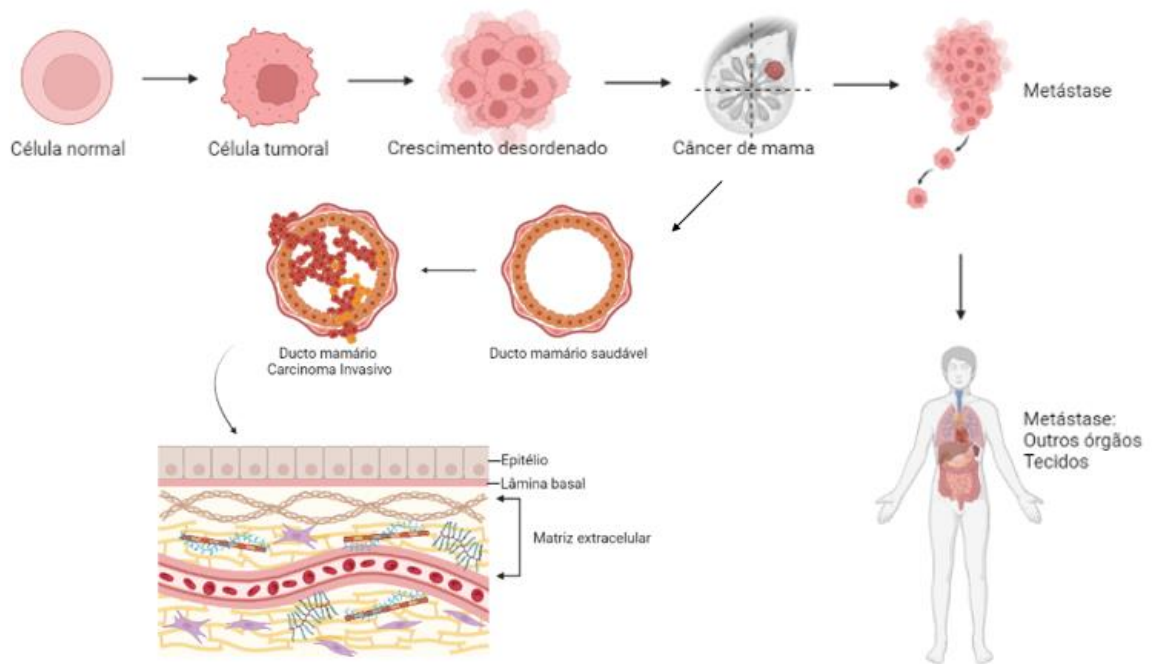


Figura 1: Cascata Metastática.

Fonte: Cascata metastática. Disponível em: <https://app.biorender.com/illustrations/627a9a7fe5d117db7c1ff086>. Acesso em: 10 dez 2022. Adaptado pelo autor.

1.4 MOLÉCULAS DE ADESÃO

As moléculas de adesão são um conjunto muito variado de glicoproteínas, responsáveis pela migração dos diferentes tipos celulares e também dos fatores secretados por essas células. E como é possível imaginar, existem tantas quantas as situações possíveis, desde células tronco-hematopoiéticas que precisam migrar para os tecidos para realizar regenerações, até os diferentes tipos celulares da resposta imune em diferentes estágios de maturação e ativação necessárias para combater infecções ou promover regeneração celular. Além de fundamentais na migração estas moléculas também possuem papel fundamental na ativação e potenciação da função efetora celular (BILGIR et al., 2020).

A maioria das moléculas de adesão possui estrutura formada por três regiões sendo elas, o domínio extracelular, o domínio transmembrana e o domínio intracelular. Essas regiões permitem o funcionamento dessas moléculas como aderentes, além de ser um meio de comunicação. Existem cinco principais classes de moléculas de adesão, sendo elas: as imunoglobulinas, conhecidas pelo papel de apresentação de partículas às células do sistema imune; as integrinas, consideradas a ponte de ligação mais adequada com a matriz extracelular;

as selectinas, especializadas se ligar a açúcares; as caderinas, responsáveis pela ligação das células entre si; e as mucinas, que formam géis em locais como mucosa, com a finalidade de lubrificação, proteção e envolvimento do patógeno (LEWCZUK; PRYCYNICZ; USTYMOWICZ, 2019).

As células da resposta imune, de forma geral, quando ativadas, circulam pelos vasos sanguíneos de todo o corpo e acabam migrando em direção ao tecido. Esta migração depende da adesão destas células ao endotélio vascular, que é mediada por moléculas. Em se tratando de resposta imune a tumores, a adesão ocorre através de selectinas e integrinas presentes na matriz extracelular do tecido nas células endoteliais, que liberam níveis aumentados de quimiocinas aumentando a permeabilidade da matriz, e colaborando para que as células imunes possam invadir o local do tecido tumoral (WADA; KOBAYASHI; TSUNODA, 2022).

As moléculas de adesão têm papel de suma importância em patologias como o câncer, pois nos estágios iniciais do desenvolvimento da integridade tecidual, são as responsáveis pelas interações entre células e componentes da matriz extracelular. A interação leucocitária com o endotélio é ainda mais importante, uma vez que essa ativação endotelial contribui para uma resposta inflamatória sistêmica à bacteremia, provocando um aumento da sua expressão (GOLIAS et al., 2007).

Contudo, além de permitir a migração de células da resposta imune e até mesmo ativando estas células para uma maior ação efetora, dados literatura demonstram que este mesmo mecanismo de migração celular para os tecidos, por meio da interação entre células da corrente sanguínea e das moléculas de adesão presentes no endotélio vascular é utilizado como ferramenta para que as células tumorais possam migrar para os tecidos no intuito de induzir metástases (WADA; KOBAYASHI; TSUNODA, 2022).

1.4.1 Grupamento de diferenciação 40 (CD40)

O CD40 é um dos membros coestimuladores da superfamília do TNFR (receptor do fator de necrose tumoral). Sua primeira caracterização funcional foi realizada em Linfócitos B humanos. A sinalização através do CD40 promove a ativação e proliferação das células B. O CD40 pode afetar diretamente os fenótipos de doenças que dependem da atividade das células B e da produção de anticorpos, e controlar doenças que dependem da ativação efetiva da atividade imunológica mediada por células T (ARGIRIADI et al. 2019; SO; CROFT,2013).

A ativação celular através da via CD40 ocorre após cruzamento do receptor por CD40L (CD154), que é expressa pelo grupamento de diferenciação 4 dos linfócitos T (T CD4) ativadas, ou ainda por plaquetas. Nas células dendríticas (DCs), a ativação do CD40 acaba resultando em dois fenótipos celulares. O primeiro leva à regulação de moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC), assim como o aumento da expressão de moléculas superfamílias (Ig) e suprarregulação de outros ligantes do fator de necrose tumoral (TNF) (VONDERHEIDE, 2020).

No linfoma de Hodgkin, a expressão do CD40 tem mostrado um aumento na proliferação, invasividade e resistência a drogas das células cancerosas, além de promover uma produção autócrina da Interleucina 6, que resultam da ativação da via NF- κ B. Já no câncer de mama, esse aumento da expressão do CD40, seria resultado do fator de crescimento transformador (TGF) (MARCUCCI; RUMIO; CORTI, 2017).

A capacidade de controlar tumores através da estimulação da molécula CD40 foi descrita primeiramente nos estudos de Diehl e seus colaboradores (1999), onde demonstraram que o estímulo de anticorpos agonistas poderiam impedir que se criasse tolerância às vacinas de peptídeos derivados de antígenos tumorais, a partir desse estudo houve outros que mostraram um impulsionamento significativo da resposta de células T CD8+, quando adicionado um agonista à vacina (BULLOCK, 2021).

1.4.2 Molécula de adesão intercelular-1 (CD54)

A molécula de adesão intercelular-1, mais conhecida como ICAM-1 ou ainda CD54, é um membro da superfamília de imunoglobulinas de moléculas de adesão, consistindo em cinco domínios extracelulares que se assemelham à imunoglobulina G (IgG), e possui ainda uma cauda citoplasmática curta. São tidos ainda como marcadores bem caracterizados de processo inflamatório, e embora tenha uma baixa expressão em órgãos normais, sua expressão é alta em alguns tipos de células cancerosas, em sua superfície. Foi descrita ainda como uma molécula chave, envolvida na formação da sinapse imunológica, caracterizada pela reorganização do citoesqueleto em direção à célula-alvo (REINA; ESPEL, 2017; WEI et al., 2020; GRAKOUÏ et al., 1999).

Seu papel fisiológico parece se concentrar no desenvolvimento do sistema nervoso, nas respostas imunológicas e inflamatórias, além do desenvolvimento embrionário. Além do

seu papel como molécula da adesão celular, também participa da transdução de sinal entre as membranas celulares (HUBBARD; ROTHLEIN, 2000).

No câncer colorretal, sua expressão tem sido associada ao bom prognóstico, visto que inibe o crescimento do tumor e as metástases. Entretanto o oposto é relatado em estudos com câncer de mama, correlacionando sua expressão com um fenótipo agressivo e metastático de tumor. Foi sugerido que esse aumento no câncer de mama, se devia graças a interação homofílica entre o ICAM-1, as células tumorais e as células mesenquimais na medula óssea, mediando a expansão da metástase (REINA; ESPEL, 2017).

1.4.3 L-Selectina (CD62L)

A L-Selectina ou CD62L é uma molécula de superfície celular que medeia a ligação de linfócitos às células especializadas do endotélio que estão presentes nas vênulas pós capilares dos nódulos linfáticos e leucócitos com comportamento de rolamento no endotélio vascular em locais de tecido lesionado ou inflamação. Existe ainda a descrição da contribuição de cada domínio dentro da seleção L para a adesão, migração e transdução de sinais (TEDDER; STEEBER; PIZCUETA, 1995; IVETIC; GREEN; HART, 2019).

Embora haja a visão de que essas moléculas estão envolvidas benignamente no direcionamento dos leucócitos para locais de infecção, elas podem ser prejudiciais no processo inflamatório que ocorre no câncer. O aumento de leucócitos nos tecidos pode resultar em sintomas exagerados, que implicariam na progressão do câncer e consequentemente das metástases. As células tumorais exploram os mecanismos dependentes de selectinas que são usados na migração leucocitária, para extravasar as células tumorais, desencadeando a metástase (BARTHEL et al., 2007).

1.4.4 Molécula de adesão intercelular 2 (CD102)

É uma molécula de superfície expressa principalmente em linfócitos, monócitos, plaquetas e células endoteliais. Sua expressão pode se mostrar aumentada em células endoteliais a partir do crescimento de tumores (SIEVERT et al., 2014).

Alguns trabalhos sugerem que a CD102 (ICAM-2), identificada como um ligante da Molécula Intercelular Específica de Células dendríticas (DCs)-3-Não-Integrina-Agarrada(DC-

SIGN) nas células endoteliais, é capaz de regular o tráfego de DCs em doenças como a leucemia. Ainda, que as células tumorais poderiam impedir as funções da DC tendo como alvo a DC-SIGN, resultando na supressão das células dendríticas DCs e conseqüentemente, escapando do mecanismo de vigilância imunológica (JIN et al., 2018).

1.4.5 proteína 1 de adesão celular vascular (CD106)

A Proteína 1 de Adesão Celular Vascular, (VCAM-1 ou CD106) é uma glicoproteína que é predominantemente expressa em células endoteliais. A expressão de VCAM-1 é ativada por citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , e também por ROS. Em níveis altos de inflamação e condições crônicas em algumas doenças, o VCAM-1 também é expresso na superfície de outras células, incluindo macrófagos teciduais, DCs, fibroblastos de medula óssea, mioblastos, oócitos, células *Kupffer*, células de *Sertoli* e células cancerosas. Estruturalmente, o VCAM-1 humano contém um domínio extracelular com seis ou sete domínios semelhantes à Ig, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático, enquanto o VCAM-1 de camundongo tem uma forma de domínio semelhante a três ou sete Ig (KONG et al., 2018).

Em um estudo sobre imunoterapia para pacientes com tumores benignos de mama, foi levantada a sugestão de que por mediar a adesão de leucócitos ao endotélio vascular, as moléculas de adesão celular na forma solúvel, quando extravasada poderia promover a metástase, através do bloqueio de linfócitos citotóxicos (BĘDKOWSKA et al., 2022).

1.4.6 Proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico (CTLA-4 ou CD152)

O receptor de superfície celular CTLA-4 (CD152), é um membro da superfamília de imunoglobulinas com importância funcional. É expresso na superfície de células T regulatórias (Treg), e só pode ser detectado na superfície das células T após sua ativação. Após sua ativação, serve como mecanismo de controle de feedback para resposta imune adaptativa, através da regulação de produção de citocinas, diferenciação de células T, expansão e migração celular (LINGEL; BRUNNER-WEINZIERL, 2019).

As células T regulatórias possuem a capacidade de controlar também células B, células *Natural Killer* (NK), DCs e macrófagos, além das células T. Uma vasta gama de moléculas está envolvida nos mecanismos de supressão imunológica que são mediados por Treg, incluindo-se a CTLA-4 (TANAKA; SAKAGUCHI, 2017)

Nos mais diversos estudos sobre diferentes tipos de câncer, o CTLA-4 é descrito como indicativo de imunossupressão, contribuindo para a persistência e posterior invasão das células tumorais em outros órgãos (MALINGA et al.,2022).

1.5 ÓXIDO NÍTRICO (NO)

O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel, com atividade biológica, capaz de interagir com moléculas que podem mediar reações bactericidas ou citotóxicas (ROBBINS; GRISHAM, 1997).

É uma molécula importante em uma variedade de processos fisiológicos, incluindo vasodilatação, respiração, migração celular, resposta imune e apoptose. Por outro lado, a síntese desregulada é considerada uma contribuinte para uma variedade de condições fisiopatológicas incluindo o câncer. Uma área interessante é o papel do óxido nítrico no crescimento e metástase de tumores sólidos, que parece ter um papel complexo, incluindo inibir e promover a atividade tumoral (CHOUDHARI et al., 2013).

1.6 CITOCINAS

As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular secretadas pelos leucócitos e outras células do corpo. Elas respondem principalmente à estimulação do antígeno e atuam como mensageiros do sistema imunológico. As citocinas recebem nomes específicos, que se referem aos tipos de células que principalmente as sintetizam e seu mecanismo de ação. Portanto, as citocinas principalmente sintetizadas por fagócitos mononucleares são chamadas de monocinas, e as citocinas produzidas principalmente por linfócitos são chamadas de linfocinas. A citocina que atua em leucócitos do sangue é chamada de interleucina (IL). As ILs participam principalmente da reação desencadeada pela apresentação de antígenos por meio de linfócitos T auxiliares, agindo como mediadoras da resposta imune (VIANNA et al., 2011).

1.6.1 Interleucina 1 beta (IL-1 β)

A Interleucina-1 (IL-1) é uma citocina pró-inflamatória pluripotente que ativa respostas de defesa em situações de infecção e lesão, tanto periféricamente quanto no sistema nervoso central. Suas duas principais proteínas alfa (α) e beta (β), são pleiotrópicas. Essa interleucina é abundante em locais tumorais, onde afeta processos como carcinogênese, crescimento tumoral e invasividade, alterando também os padrões existentes entre as interações tumor-hospedeiro (APTE et al., 2006).

1.6.2 Interleucina 6 (IL-6)

A Interleucina 6 (IL-6) é uma citocina sintetizada por fibroblastos, monócitos, macrófagos, células T e células endoteliais, que têm essa síntese e secreção induzidas durante condições inflamatórias (ARRAS; JOHN, 2016).

A regulação da IL-6 junto às moléculas de superfície pode induzir a regulação de células dendríticas (DCs), contribuindo para a homeostase imunológica necessária, por exemplo, em doenças autoimunes e tumores (RAO et al., 2022).

1.6.3 Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α)

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina inflamatória produzida por macrófagos/monócitos durante episódios de inflamação aguda, que possuem atividade antitumorigênica (IDRISS; NAISMITH, 2000).

Entre as citocinas pró-inflamatórias, alguns estudos se concentram no TNF- α pois é um pirógeno endógeno que pode causar inflamação, morte celular apoptótica e mediar várias interleucinas como IL-1 β , IL-6 e IL8 liberadas por macrófagos estimulados. A desregulação, principalmente a superprodução de TNF- α é encontrada numa variedade de doenças incluindo aterosclerose, câncer e doença inflamatória intestinal. (MA; ZHANG; BALOCH, 2016).

1.7 IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCS)

As células dendríticas (DCs) são mediadoras da resposta imune que se inicia através da apresentação via MHC aos linfócitos T. Quando maduras, podem ativar as células T de maneira específica para desempenharem diferentes funções. Podem ainda, iniciar uma interação com os componentes do sistema imune inato, como por exemplo, as NKs e os macrófagos (PALUCKA.BANCHEREAU, 2013).

As DCs derivadas de monócitos, possuem um fenótipo similar às DCs convencionais e podem ser diferenciadas *in vitro* sob estímulo de Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) e Interleucina 4 (IL-4). Esse método tornou-se uma importante ferramenta e vem sendo aplicado como imunoterapia para o câncer (MILDNER; JUNG, 2014).

Além disto, a capacidade de ativação de células T que as células dendríticas convencionais (CDCs) possuem, é tida como base para o ciclo entre câncer e imunidade. E dados da literatura demonstram a associação entre as CDCs e o transporte de antígenos associados ao câncer para o linfonodo drenante (CHEN; MELLMAN, 2013).

A vacinação terapêutica continua sendo alvo extenso de pesquisas de maneira ativa para o câncer, e todas elas necessitam da capacidade de apresentação de antígenos das DCs. Embora estudos minuciosos já tenham sido feitos a respeito da ativação das DCs, os mecanismos imunossupressores que bloqueiam o reconhecimento imunológico das células tumorais ainda precisam ser elucidados (GARDNER; RUFFELL, 2016).

Os mecanismos que desencadeiam a resposta imune antitumoral pelos linfócitos T que são gerados pela vacina de DCs) podem melhorar a ação no tecido alvo. No contexto da neoplasia, proporciona a regressão tumoral, e produz células de memória que criam uma proteção caso haja recidivas da doença (ANGUILLE et al., 2014).

Nosso grupo de pesquisa atua há anos utilizando as DCs como imunoterapia no câncer. Resultados anteriores demonstraram que a vacina de DCs administrada de forma preventiva reduz metástases pulmonares e hepáticas. Os focos metastáticos no pulmão estavam diminuídos no grupo vacinado. A porcentagem de linfócitos T esplênicos estava aumentada, o que indica uma resposta imune sistêmica. Nas amostras hepáticas, houve uma redução de áreas metastáticas no grupo vacinado, além do notável aumento dos linfócitos T totais e citotóxicos, bem como o aumento de citocinas IL-10 e IL-17, demonstrando que a vacinação profilática é capaz de induzir um estado de controle de resposta pró-inflamatória. Os mecanismos

responsáveis pela redução das metástases hepáticas e pulmonares ainda são incertos. Sem dúvida um dos possíveis mecanismos descritos na literatura seria através da modulação das moléculas de adesão (VIEIRA et al., 2021).

2. JUSTIFICATIVA

O câncer é uma das patologias com crescente incidência, que se dá por diversos fatores aos quais estamos expostos diariamente, tais como, estresse, alimentação inadequada, exposição solar prolongada, sedentarismo entre outros fatores.

Existem hoje tratamentos para o câncer, como a radioterapia e a quimioterapia bem como a ressecção cirúrgica, porém, são tratamentos bastante agressivos, que muitas vezes na tentativa de combater à doença, acabam comprometendo o sistema imunológico do paciente, e por vezes esse comprometimento ocasiona o óbito. Diante disso, se faz necessária a busca por alternativas mais eficazes e menos agressivas, e a imunoterapia com células tem-se mostrado promissora.

As moléculas de adesão têm sido estudadas com o objetivo de compreender seu papel no câncer de mama, com a finalidade de relacionar essas descobertas com o desenvolvimento terapêutico, visto que algumas dessas moléculas têm funções de ativação e migração celular que influenciam diretamente a resposta imune pró-inflamatória.

Algumas moléculas de adesão do tipo Caderinas, desempenham papéis importantes no funcionamento celular e na preservação da integridade dos tecidos, mediando assim a adesão celular. Além disto, um ponto muito importante é que as mesmas têm sido alvo de estudos, pois a grande maioria das metástases só é possível pela expressão destas moléculas no endotélio vascular, e conseqüentemente, adesão das células tumorais e invasão do órgão alvo, formando nichos de metástases.

O óxido nítrico por sua vez, proporciona a indução de apoptose das células tumorais, contudo, quando essas concentrações estão baixas, os efeitos contribuem para a sobrevivência dessas células (YANG et al., 2022; BAI et al., 2022).

Já as citocinas, por estarem envolvidas no processo inflamatório, nos direcionam aos mecanismos existentes no sistema imune durante esse processo, que atua incitando ou inibindo a sua liberação a fim de manter o equilíbrio necessário para o combate eficiente do distúrbio que acometeu o organismo.

3. HIPÓTESE

Demonstrar o funcionamento do mecanismo pelo qual as moléculas de adesão contribuem para o sucesso da vacina profilática de DCs no tumor, na redução das metástases pulmonares e hepáticas.

Espera-se encontrar as seguintes afirmativas:

- a) A redução de metástases hepáticas e pulmonares está correlacionada à expressão das moléculas de adesão CD40, CD54, CD62L, CD102, CD106 e CD152 no grupo vacinado.
- b) A redução das metástases hepáticas e pulmonares está correlacionada com os níveis de óxido nítrico nas células esplênicas dos animais do grupo vacinado.
- c) Os níveis de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α através de proteínas extraídas dos pulmões e fígados têm relação com essa redução metastática no grupo vacinado.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito das vacinas preventivas de células dendríticas sobre a expressão das moléculas de adesão em metástases hepáticas e pulmonares de camundongos induzidos ao carcinoma mamário.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar se a redução das metástases hepáticas e pulmonares observada em camundongos Balb/C induzido a câncer de mama pela linhagem celular 4T1 e submetidas a imunoterapia preventiva com DCs correlaciona com:

- a) A expressão das moléculas de adesão CD40, CD54, CD62L, CD102, CD106 e CD152 em células do pulmão e fígado de camundongos Balb/C vacinados e não vacinados
- b) Os níveis de óxido nítrico nas células esplênicas dos animais dos grupos vacinados e não vacinados.
- c) Os níveis de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α através de proteínas extraídas dos pulmões e fígados de camundongos Balb/C vacinados e não vacinados.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 25 camundongos fêmeas da linhagem isogênica Balb/c, provenientes do experimento do Doutorado de Jéssica Ferreira Vieira aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), sob número de registro 379.

As fêmeas adultas da linhagem Balb/c, com idades entre 06 e 08 semanas de vida (média de peso $23g \pm 0,8g$), oriundas do Biotério Central da Universidade Federal do Triângulo Mineiro foram mantidos em gaiolas plásticas, com espaço adequado para sua acomodação, em um sistema fechado de alojamento com ventilação e temperatura controlada ($21 \pm 3^\circ C$), em ciclo claro-escuro de 12h.

Dentre os 25 animais, 22 foram separados em três grupos experimentais: Controle (n=7) com animais sem indução tumoral pela linhagem de células 4T1 e sem vacinação profilática por células dendríticas; grupo Tumor (n=8), com animais submetidos apenas à indução tumoral com células 4T1; e grupo Vacina (n=7), com animais que receberam a profilaxia com vacina de células dendríticas e posterior indução tumoral com a linhagem celular 4T1. Os outros 3 animais foram eutanasiados para a preparação da vacina de células dendríticas.

A eutanásia dos animais se deu através de superdosagem anestésica (Cetamina 300 mg/kg e Xilazina 30 mg/kg) após 36 dias de experimentação. Os órgãos retirados foram colocados em paraformaldeído a 10% e posteriormente foram feitos blocos em parafina dos pulmões, fígados, tumor e baço. Outros órgãos como linfonodos, partes do tumor e do fígado também foram utilizados durante o protocolo de citometria.

5.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Dentre os animais do experimento, 7 foram designados para um grupo controle sem nenhuma intervenção, contudo esse grupo foi utilizado somente no projeto anterior e 3 animais foram eutanasiados para preparação da vacina de DCs. Desses camundongos foram retiradas as células da medula óssea dos fêmures e tíbias com auxílio de solução fisiológica 0,9% e uma seringa 13,4 x 5mm. As células medulares (pluripotentes) foram então cultivadas em garrafas de cultura de 25cm², em meio IMDM suplementado com 0,1mM de vitaminas, 2mM de l-glutamina, 100µg/mL de gentamicina, 1mM de Piruvato de Sódio (C₃H₃NaO₃) e 5% SBF,

incubadas em estufa de CO₂ a 5% de umidade e a 37°C. Após plaqueamento, no dia 1, as células foram estimuladas com 10ng/μL de GM-CSF e 10ng/μL de IL-4. No dia 5 foram estimuladas com 10ng/μL de TNF-α e antígeno tumoral da linhagem de células 4T1 (obtidos pelo congelamento e descongelamento das células 4T1). No dia 07, as DCs diferenciados foram lavadas e ressuspensas em solução fisiológica 0,9%. A avaliação das DCs diferenciadas foi feita qualitativamente, por controle visual através de microscópio óptico. Foram administradas 5,0 x 10⁶ células, em um volume de 50μL de solução fisiológica, em dose única no grupo determinado como DC de forma subcutânea.

Após 8 dias da vacinação profilática do grupo DC, ambos os grupos (DC e T) foram induzidos ao tumor de mama com as células da linhagem tumoral de câncer de mama 4T1. E durante os dias que se seguiram até o fim do experimento, os grupos foram submetidos à medição tumoral. No 36º dia os animais de ambos os grupos foram eutanasiados, e dentre outros órgãos, tiveram seus fígados e pulmões retirados.

A esquematização de confecção da vacina, vacinação, indução tumoral e a divisão dos grupos pode ser observada na figura 2 abaixo mostrada:

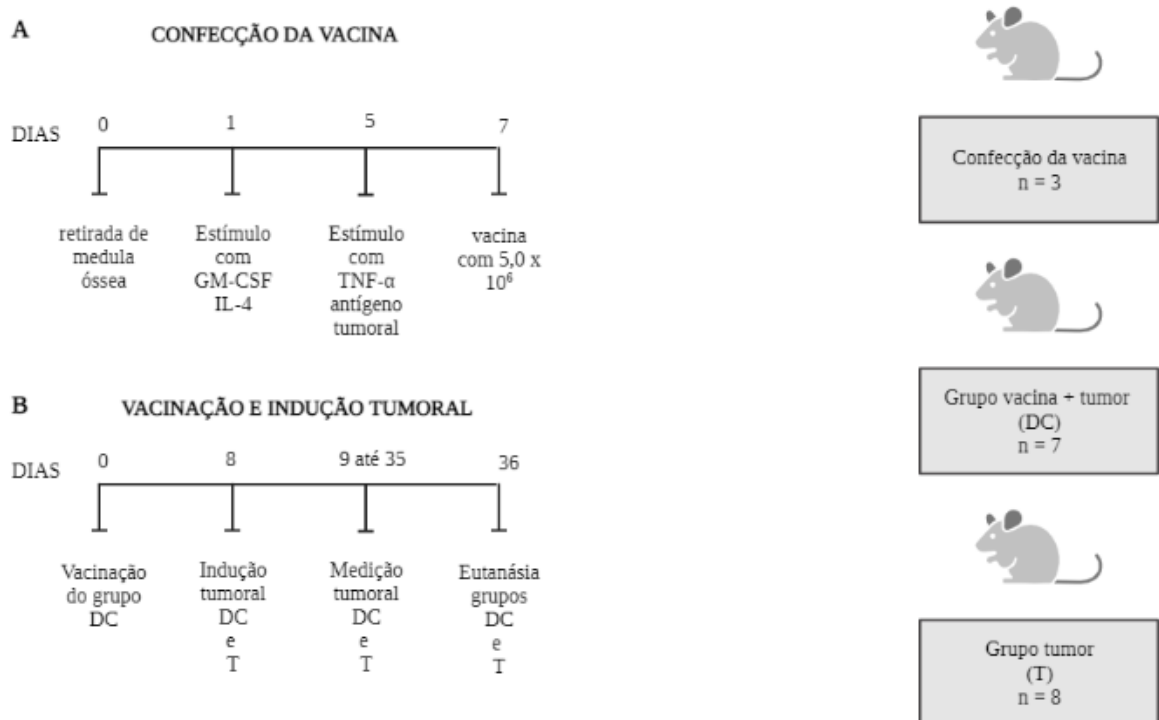


Figura 2: **Delineamento experimental.** **A.** Esquema demonstrando, em uma linha do tempo, os procedimentos realizados para confecção da vacina profilática de células dendríticas (DCs) diferenciadas in vitro e maturadas com GM-CSF, IL-4, TNF-α e antígeno tumoral de 4T1. **B.** Esquema demonstrado em uma linha temporal, o protocolo de vacinação, indução tumoral e eutanásia dos grupos. No delineamento mostra-se também o número de animais utilizados na etapa de confecção da vacina (n=3), os animais que foram designados para o grupo DC

(n=7) que foram vacinados profilaticamente e posteriormente induzidos ao carcinoma mamário e o grupo T (n=8) em que os animais foram submetidos somente à indução do carcinoma mamário.

Os órgãos que foram retirados desses animais foram colocados em recipiente contendo solução com paraformaldeído a 10%, por 24 horas para posterior processamento em parafina.

5.2 MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA MAMÁRIO

A linhagem de células tumorais 4T1 é um modelo pré-clínico para câncer de mama em camundongos BALB/c que melhor se assemelha ao câncer de mama triplo negativo que acomete mulheres de todo o mundo, pela sua capacidade metastática espontânea. A localização primária do tumor e sua disseminação metastática se assemelham muito ao curso clínico do paciente. As células da linhagem 4T1 são utilizadas para estudo de câncer de mama, especificamente o triplo negativo, que não possui a expressão proteica do receptor de estrogênio, receptor de progesterona e receptor 2 do fator de crescimento epidérmico (SCHRÖRS et al., 2020; YANG et al., 2020).

Originalmente isolada por Fred Miler e colegas do *Karmanos Cancer Institute*, a linhagem 4T1 quando introduzida de maneira ortotópica é capaz de desencadear metástases para órgãos como pulmão, fígado e cérebro, além dos ossos (TAO et al., 2008)

5.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os blocos prontos, foram separados em 4 grupos para corte, sendo eles: Pulmão DC, Pulmão Tumor, Fígado DC e Fígado Tumor respectivamente.

Cada bloco foi colocado no micrótomo (modelo RM2255, marca Leica) para ser cortado na espessura de 0.5 micras, gerando sessões para confecção das lâminas.

Para cada bloco, foram confeccionadas 6 lâminas, para posterior coloração.

Os cortes em parafina foram mergulhados em banho histológico (modelo EP-31-20152, marca Easypath) a 37°C para que aderissem bem às lâminas (Dako, Silanized Slides, lote 10025723).

Após, as lâminas foram deixadas na estufa (modelo MD 1.3, marca *Medicate*) pré-aquecida à 60°C por 40 minutos para que os resíduos de parafina se desprendessem dos cortes.

Após a retirada das lâminas da estufa, as mesmas foram submetidas ao seguinte protocolo de Imunofluorescência: as lâminas ficaram cerca de 40 minutos em paraformaldeído (PFA) a 4%, seguidas de 5 lavagens com PBS 1X de 6 minutos cada lavagem. Seguiu-se colocando-as em albumina de soro bovino (BSA) a 2% por 30 minutos, logo após incubava-se os anticorpos por 2 horas com diluição também em BSA a 2%. Lava-se novamente 5 vezes em PBS 1X por 6 minutos cada lavagem, e finaliza cobrindo as lâminas com entelan e lamínula, mantendo essas lâminas por até 24h na geladeira até a leitura.

E para a análise da expressão dos marcadores foram utilizadas as seguintes diluições dos anticorpos:

Tabela 1: Descrição de anticorpos utilizados na Imunofluorescência direta

Anticorpos	Especificações Marca	Diluição	Nº de catálogo
CD40 PE	BD Bioscience Pharmingen	1/1600	553791
CD54 PE	BD Bioscience Pharmingen	1/400	4339568
CD62L FITC	BD Bioscience Pharmingen	1/400	74057
CD102 PE	BD Bioscience Pharmingen	1/200	2286562
CD106 FITC	BD Bioscience Pharmingen	1/1600	3344948
CD152 PE	BD Bioscience Pharmingen	1/800	6081998

Como critérios de avaliação para definir a diluição que seria utilizada, observou-se a qualidade das marcações fluorescentes em filtros próprios do microscópio de fluorescência, se poderiam ser observadas ou não, a deposição de anticorpo nos tecidos analisados, se era excessiva ou adequada e ainda se o tecido que não recebeu marcação estava evidente.

As fluorescências de cada lâmina foram capturadas pelo microscópio Invertido Eclipse TI-E Nikon®, e analisadas pelo *Software NIS-Elements Advance Research*® da Nikon.

Foram analisados 15 campos de cada um dos cortes, escolhidos de forma aleatória, visualizados e focados na objetiva de 40x, sendo este o padrão adotado para todas as lâminas.

A captura através do software forma as imagens através de pixels, e foi essa à medida que as imagens foram convertidas pela captura. Na figura 3 é demonstrado as dimensões em pixel das imagens que foram capturadas e salvas.

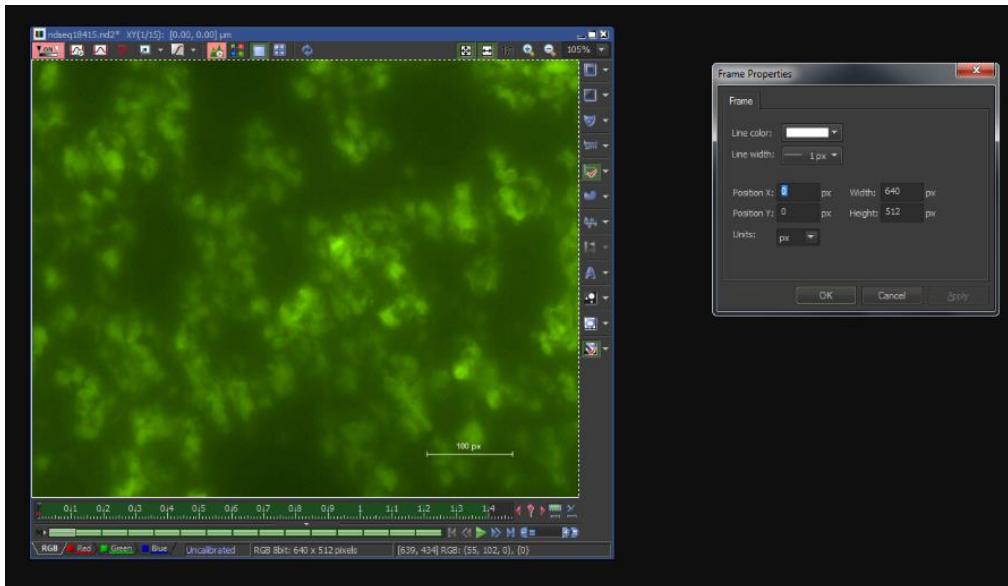


Figura 3: Dimensão de captura de imagem através do software.

Fonte: Imagem adquirida pelo autor.

Na figura 4, é possível entender as dimensões de cada pixel em relação à captura da objetiva a que se refere.

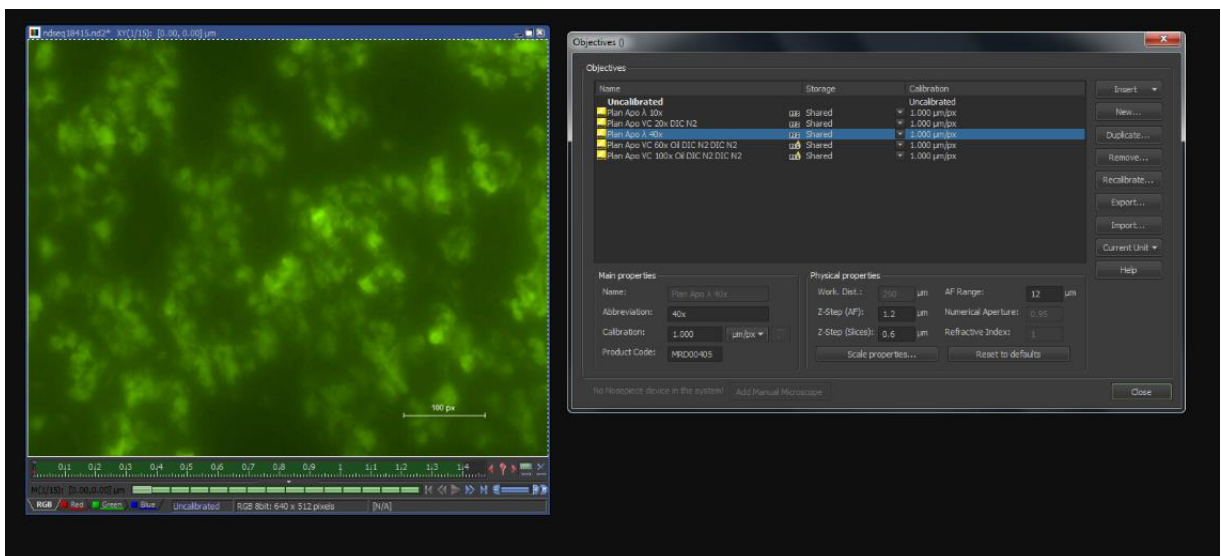


Figura 4: Dimensão da captura de imagem por pixel.

Fonte: Imagem adquirida pelo autor.

Dentre os dados que o software disponibiliza, foram utilizados para análise o *Selected Regions of Interest (ROIs)*, *Area [px²]*, e *Mean intensity*. Como demonstrado na figura 5 a seguir:

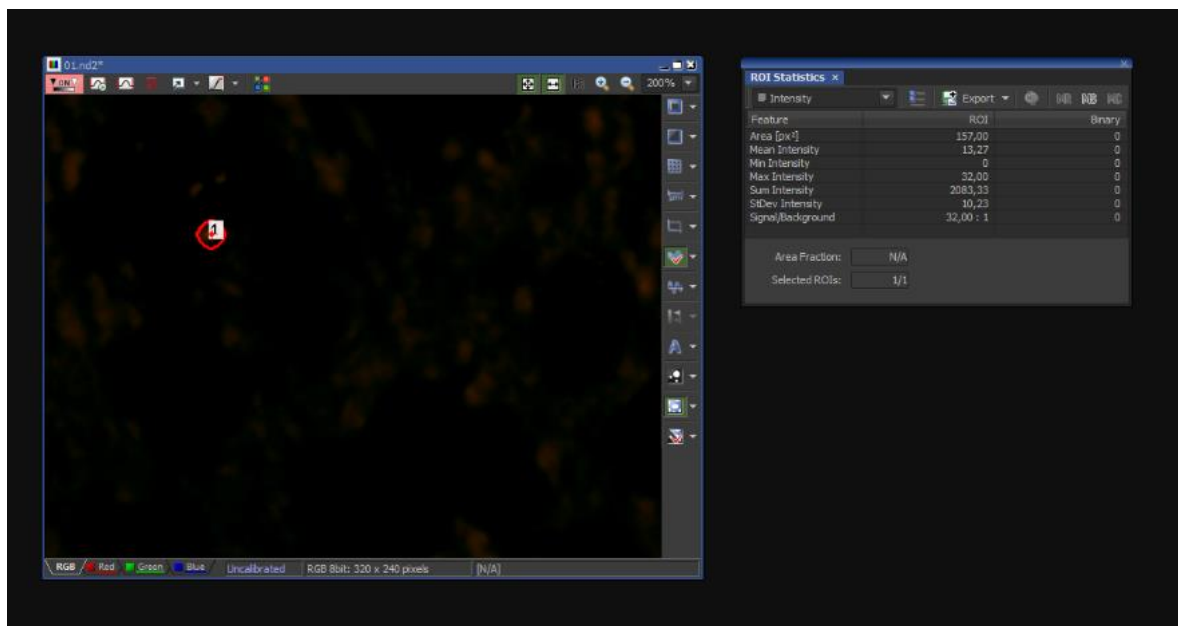


Figura 5: Dados de captura de imagem.

Fonte: Imagem adquirida pelo autor.

As regiões de interesse (ROIs) foram demarcadas manualmente, e como critério de marcação foram observados a presença da fluorescência no filtro ao qual pertencia a marcação (PE por exemplo) em relação aos outros filtros que o microscópio comporta (FITC, APC, etc.). Constatada a fluorescência, a marcação se ateu somente ao ponto onde a fluorescência se concentrava, desconsiderando estruturas adjacentes ou sinais de arraste de marcação fluorescente no tecido analisado. A ausência de sobreposição de tecido também foi considerada como padrão para todas as marcações.

A área [px^2] englobou o valor total de todas as marcações consideradas adequadas na captura da imagem.

E por fim, a média de intensidade dessas marcações fluorescentes, nomeada como Média de intensidade de fluorescência ou em inglês *Mean Fluorescent Intesity* (MFI) também foi analisada considerando-se todas as marcações adequadas.

5.4 REAÇÃO DE GRIESS

Após o período de experimentação do projeto inicial que antecede esse estudo, os animais eutanasiados tiveram retirados seus baços, e através dessas amostras foi feita cultura de células dentro de 12h, 24h e 36h, algumas com estímulos de Lipopolissacarídeo (LPS) outros

com Fitohemaglutinina (PHA) e outros permaneceram sem estímulo. Esse procedimento ocorreu em ambos os grupos vacinados ou não com a vacina preventiva de células dendríticas (DCs).

Algumas informações técnicas a respeito dos reagentes que foram utilizados na análise de óxido nítrico através da reação de *Griess*, estão descritas na tabela 2.

Tabela 2: Reagentes utilizados durante o procedimento de análise de óxido nítrico

Reagente	Fabricante	Lote
Sulfanilamida	Sigma	125K0178
Ácido fosfórico	Nuclear	07020179
N-(1-Naphthyl) ethylene-diamine dihydrochloride / NED	Sigma	036K0666
Nitrito de sódio (NaNO ₂)	Sigma	016K0671

A técnica da Reação de Griess consiste na curva padrão de diluição seriada com o padrão devidamente homogeneizadas e transferidos de maneira que todos os poços contenham o volume final de 200 µL, sendo 100 µL de água (mili-Q) e 100 µL da transferência da diluição, e após adiciona-se os reagentes. E para as amostras esse volume deve ser de 100 µL (50 µL da amostra e 50 µL dos reagentes).

A análise dos dados da reação de Griess foram lidas no equipamento *SpectraMax Plus 384* da *Molecular Devices*, através do *Software Softmax Pro 5.2* desenvolvido pela *Molecular Devices Corporation*.

5.5 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA)

Para obtenção das proteínas para realização deste ensaio, foram usadas as mesmas 30 amostras descritas no item acima, utilizadas para a análise de imunofluorescência, sendo 15 amostras de fígado e 15 amostras de pulmão. Contudo, essas amostras foram desparafinizadas através de 3 lavagens com xilol seguidas de 10 minutos na estufa e centrifugação para retirada de sobrenadante e uma última lavagem foi feita utilizando-se álcool 100%. Após as lavagens, as amostras foram colocadas na geladeira para que os microtubos secassem e pudesse ser adicionado o trizol para o processo de extração de proteína.

Para os processos de extração e posteriormente para o *Elisa* foram utilizados os protocolos sugeridos pelos fabricantes, e os reagentes utilizados estão listados na quarta tabela, que se encontra descrita abaixo.

Observação: Foi utilizada em todas as análises feitas em amostras contidas em microtubos, a *Centrifuge 5415 R* da marca *Eppendorf* (Nº de série: 5426XL025542).

Tabela 3: Reagentes para preparo de soluções

Reagente	Fabricante	Lote
Álcool 100% (Ethanol)	Sigma	SHBB1113V
TMB Substrate Reagent Set	BD Bioscience Pharmingen	3283643
Trizol Reagent	Ambion by Life Technologies	119704
Álcool isopropílico	Sigma	SHBD6403V
Xileno P.A/ACS	Neon	32696

Em uma placa 384 foram delimitados os poços para preenchimento com o padrão e as 30 amostras de proteínas provenientes de fígado e pulmão.

A placa foi sensibilizada com o anticorpo de captura contido no kit diluído em *Coating Buffer* preparado previamente e mantida em ambiente a 4° C durante 12 (doze) horas. Após esse período foi feita a lavagem 3 vezes com solução de *Wash Buffer*. O bloqueio com proteína foi realizado com a solução *Assay Diluent* preparada previamente, e a placa foi mantida em temperatura ambiente por 1 (uma) hora. Após esse período a placa foi lavada 3 vezes com solução de *Wash Buffer*. Posteriormente foi preparado o padrão e as amostras em *Assay Diluent*, e a placa foi mantida em temperatura ambiente por 2 (duas) horas. Após esse período a placa foi lavada 5 vezes com solução de *Wash Buffer*. Foi adicionada à placa solução conjugada de anticorpo de detecção e enzima diluída em *Assay Diluent*, e a placa foi mantida em temperatura ambiente por 2 (duas) horas. Após esse período houve lavagem 5 vezes com solução de *Wash Buffer*. Adicionou-se à placa substrato contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e tetrametilbenzidina (TMB), e manteve-a em temperatura ambiente por 30 minutos. Para realizar a parada da oxidação do cromógeno TMB foi utilizado o ácido fosfórico (H₃PO₄).

A análise dos dados do ensaio de imunoabsorção enzimática (*ELISA*), foram lidas no equipamento *SpectraMax Plus 384* da *Molecular Devices*, através do *Software Softmax Pro 5.2* desenvolvido pela *Molecular Devices Corporation*.

As citocinas que foram analisadas através da técnica se encontram descritas na tabela abaixo:

Tabela 4: Citocinas

Citocina	Especificações marca	Nº catálogo
IL-1 β	BD Bioscience Pharmingen	557953
IL-6	BD Bioscience Pharmingen	555220
TNF- α	BD Bioscience Pharmingen	555212

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através dos testes de normalidade *Anderson-Darling*, *D'Agostino & Pearson*, *Shapiro Wilk* e *Kolmogorov-Smirnov* e a distribuição não foi considerada normal, logo para imunofluorescência e Reação de *Griess* realizou-se teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. E para Ensaio de imunoabsorção enzimática realizou-se teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*. Os resultados foram expressos em mediana, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Para a análise de tais dados foi utilizado o *Software GraphPad Prism 8.0*.

6. RESULTADOS

6.1. IMUNOFLUORESCÊNCIA

6.1.1 Análise da molécula CD40 em metástases pulmonares e hepáticas

Nas análises pulmonares entre os grupos vacinados (n=7) e não vacinados (n=8), notamos que não existe diferença estatística entre os grupos ($p = 0,8687$) com relação ao tamanho das áreas marcadas, tampouco a análise da intensidade de fluorescência dessas marcações, mostrou diferenças ($p= 0,2876$). Contudo a diferença entre os grupos fica bastante evidente quando analisamos isoladamente o número de regiões que foram contabilizadas na marcação. Existe um número muito maior de marcações de CD40 no grupo vacinado se comparado com o grupo não vacinado ($p < 0,0001$). (figura 3)

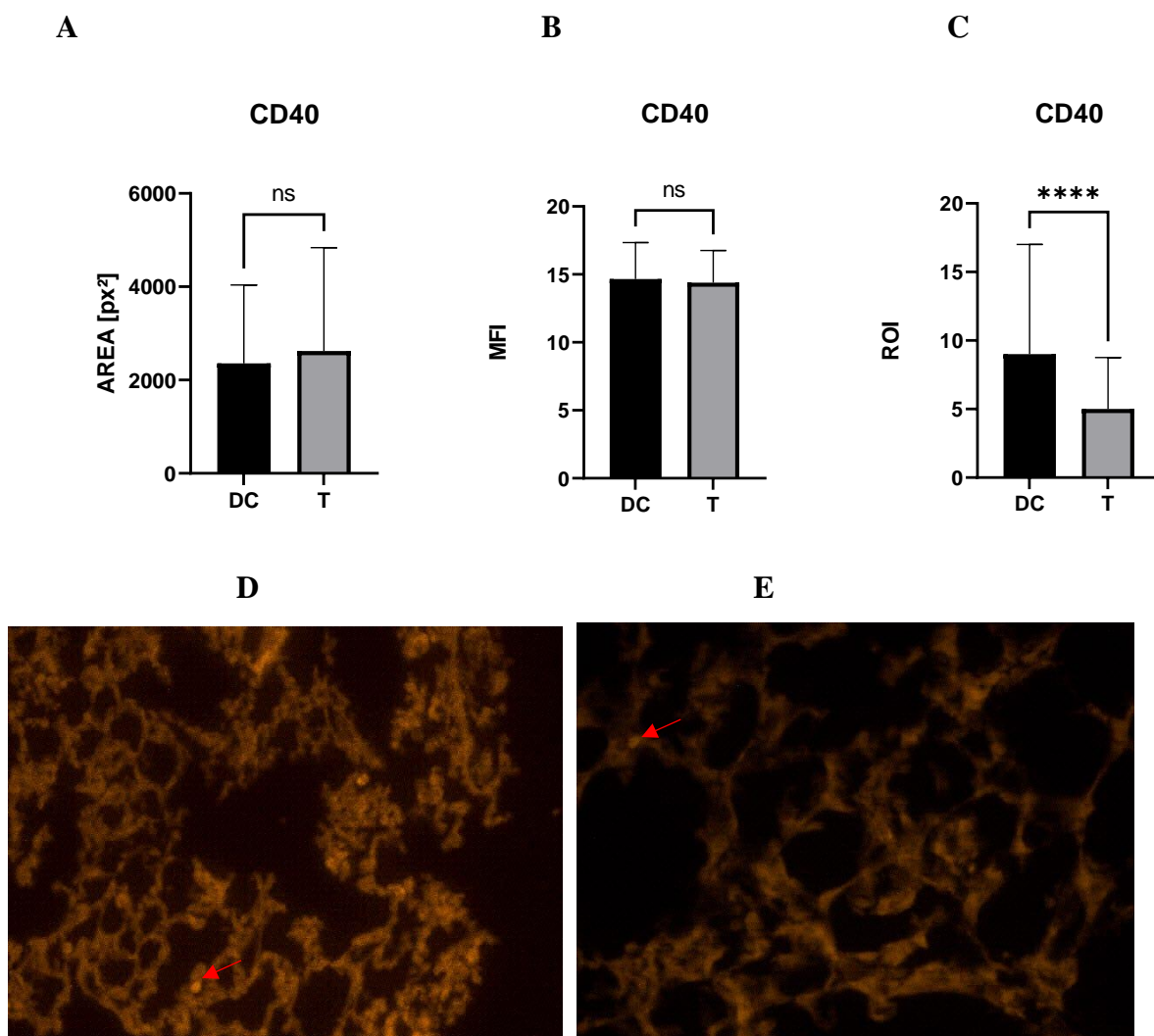


Figura 6: Avaliação da molécula CD40 em células pulmonares dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência. (A) Análise de tamanho das áreas de marcação dos grupos DC e T ($p = 0,8687$). (B) Análise da média de intensidade de fluorescência dos grupos DC e T ($p = 0,2876$). (C) Análise das regiões de interesse dos grupos DC e T ($p < 0,0001$). (D) marcações com técnica de imunofluorescência DC. (E) marcações com técnica de imunofluorescência T.

Quando analisamos os mesmos parâmetros nas amostras de fígado, os resultados são muito mais evidentes. Na análise de áreas marcadas, o grupo não vacinado mostrou um aumento significativo em relação ao grupo vacinado ($p = 0,0098$). Na análise de intensidade de fluorescência, também houve o aumento no grupo vacinado em relação ao grupo não vacinado ($p = 0,0023$). E quando analisamos as regiões marcadas esse aumento fica muito mais evidenciado no grupo vacinado ($p < 0,0001$).

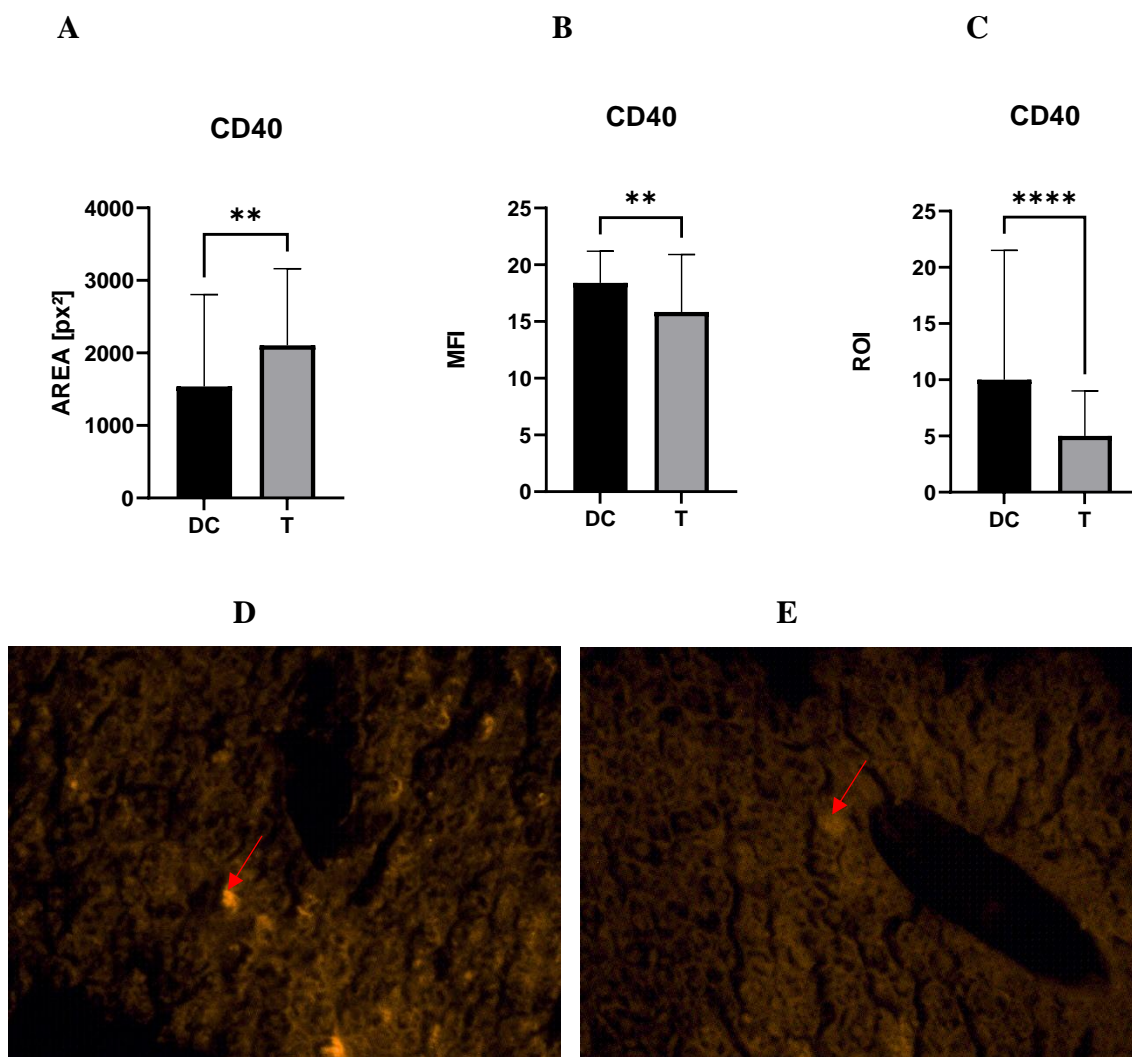


Figura 7: Avaliação da molécula CD40 em células hepáticas dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência. (A) Análise de tamanho das áreas de marcação dos grupos DC e T ($p = 0,0098$). (B) Análise da média de intensidade de fluorescência dos grupos DC e T ($p = 0,0023$). (C) Análise das regiões de interesse dos grupos DC e T ($p < 0,0001$). (D) marcações com técnica de imunofluorescência DC. (E) marcações com técnica de imunofluorescência T.

6.1.2 Análise da molécula CD54 em metástases pulmonares e hepáticas

Nas análises pulmonares entre os grupos vacinados ($n=7$) e não vacinados ($n=8$), notamos que existem áreas maiores marcadas no grupo que foi vacinado em relação ao grupo que não recebeu a vacina de células dendríticas (DCs) ($p = 0,0173$). Porém quando analisamos a intensidade de fluorescência dessas marcações, notamos que existe um aumento no grupo não vacinado em relação ao grupo vacinado ($p = 0,0010$). Essa diferença fica bastante evidente quando analisamos isoladamente o número de regiões que foram contabilizadas na marcação.

Existe um número muito maior de marcações de CD54 no grupo vacinado se comparado com o grupo não vacinado ($p < 0,0001$).

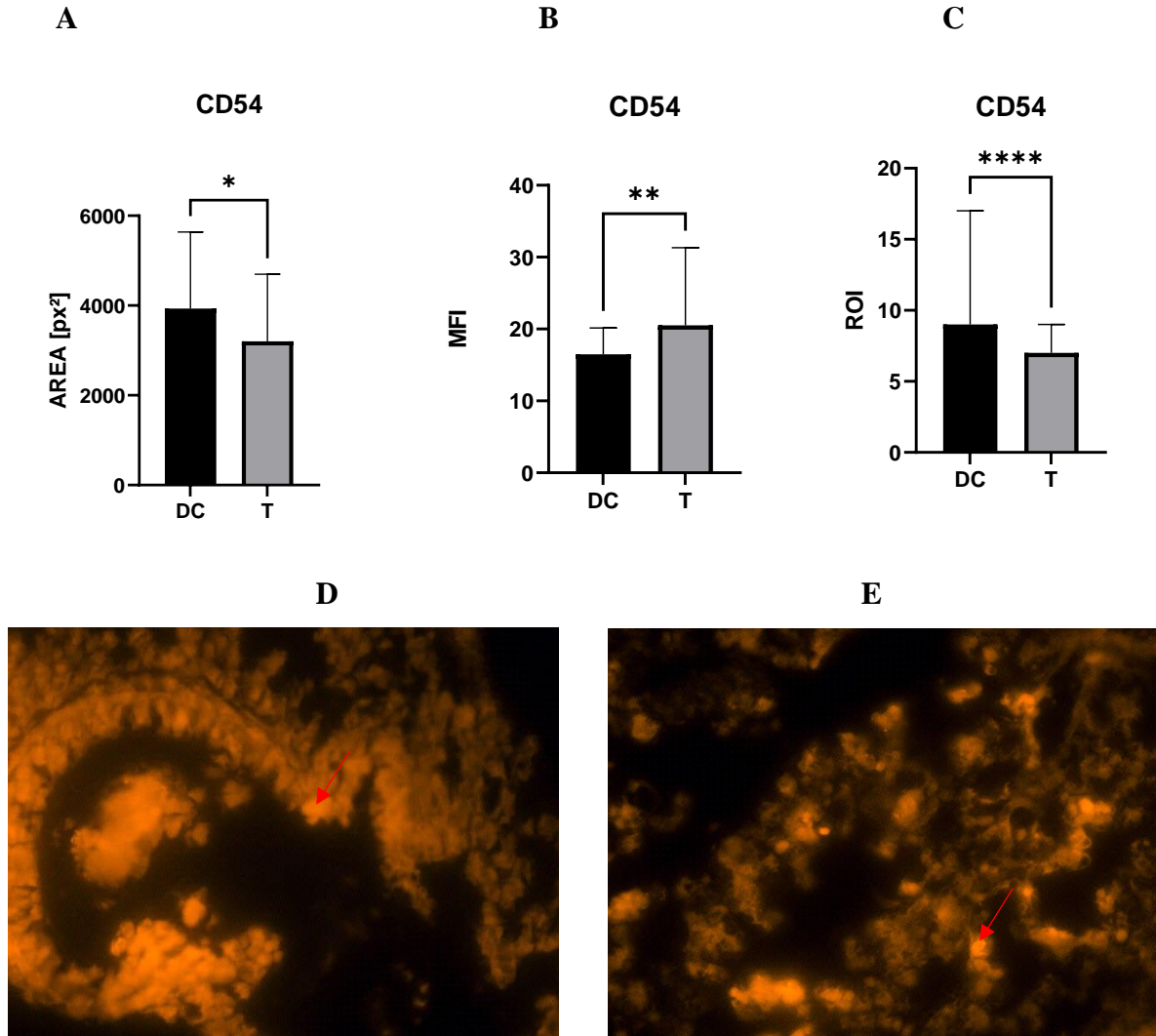


Figura 8: Avaliação da molécula CD54 em células pulmonares dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência. (A) Análise de tamanho das áreas de marcação dos grupos DC e T ($p = 0,0173$). (B) Análise da média de intensidade de fluorescência dos grupos DC e T ($p = 0,0010$). (C) Análise das regiões de interesse dos grupos DC e T ($p < 0,0001$). (D) marcações com técnica de imunofluorescência DC. (E) marcações com técnica de imunofluorescência T.

Quando analisamos os mesmos parâmetros nas amostras de fígado, os resultados são de áreas marcada sem significância estatística entre os grupos ($p = 0,7426$). Na análise de intensidade de fluorescência houve o aumento no grupo vacinado em relação ao grupo não vacinado ($p = 0,0030$). E quando analisamos as regiões marcadas também não houve significância estatística entre os grupos ($p = 0,0804$).

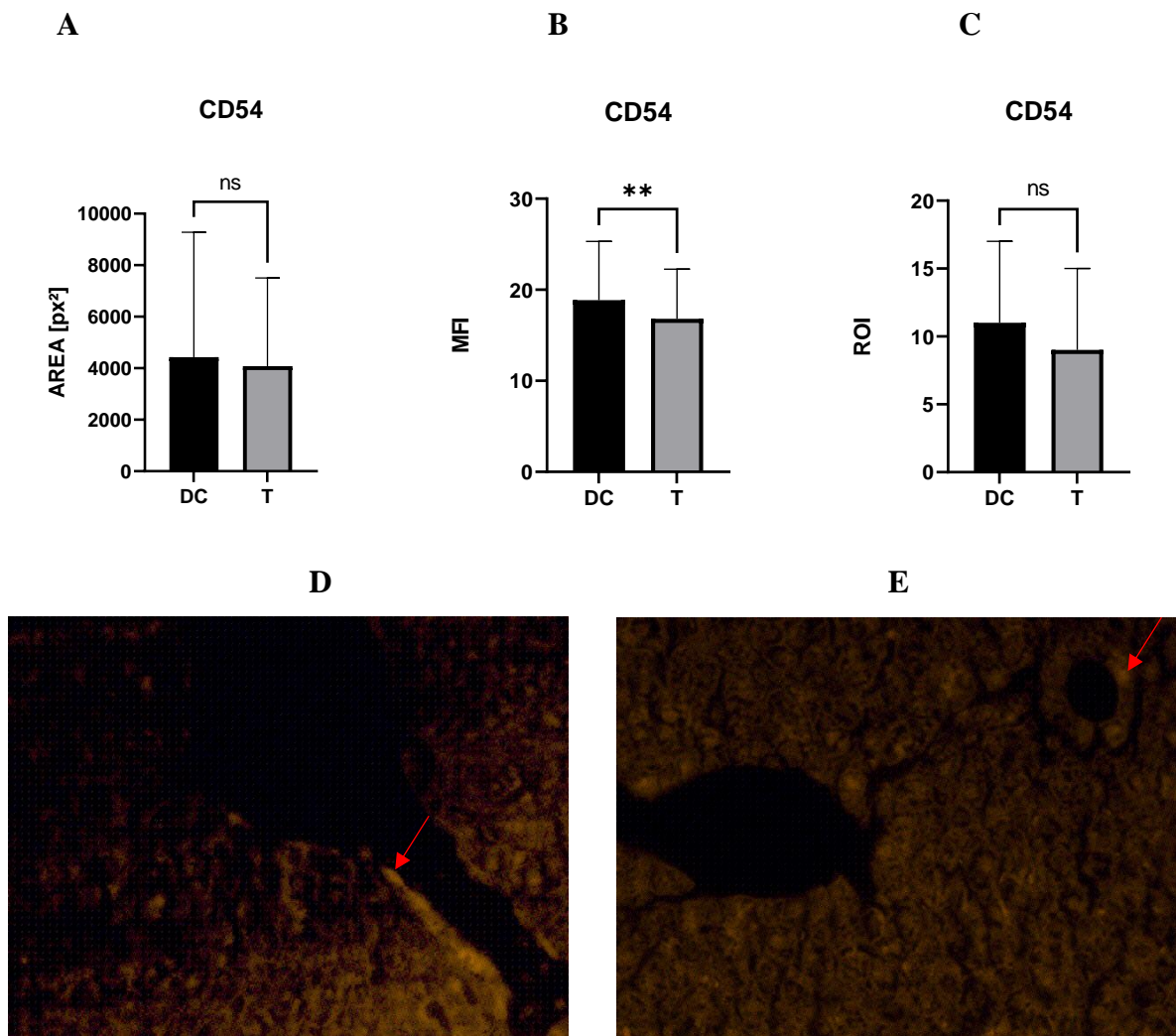


Figura 9: Avaliação da molécula CD54 em células hepáticas dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência. (A) Análise de tamanho das áreas de marcação dos grupos DC e T ($p = 0,7426$). (B) Análise da média de intensidade de fluorescência dos grupos DC e T ($p = 0,0030$). (C) Análise das regiões de interesse dos grupos DC e T ($p = 0,0804$). (D) marcações com técnica de imunofluorescência DC. (E) marcações com técnica de imunofluorescência T.

6.1.3 Análise da molécula CD62L em metástases pulmonares e hepáticas

Nas análises pulmonares entre os grupos vacinados ($n=7$) e não vacinados ($n=8$), não houve significância na análise do tamanho das áreas marcadas ($p = 0,9656$). E quando analisamos a intensidade de fluorescência dessas marcações, notamos que existe um aumento significativo no grupo vacinado em relação ao grupo não vacinado ($p < 0,0001$). Essa diferença fica bastante evidente quando analisamos isoladamente o número de regiões

que foram contabilizadas na marcação. E com relação ao número de marcações de CD62L, também não houve significância estatística entre os grupos. ($p = 0,8881$).

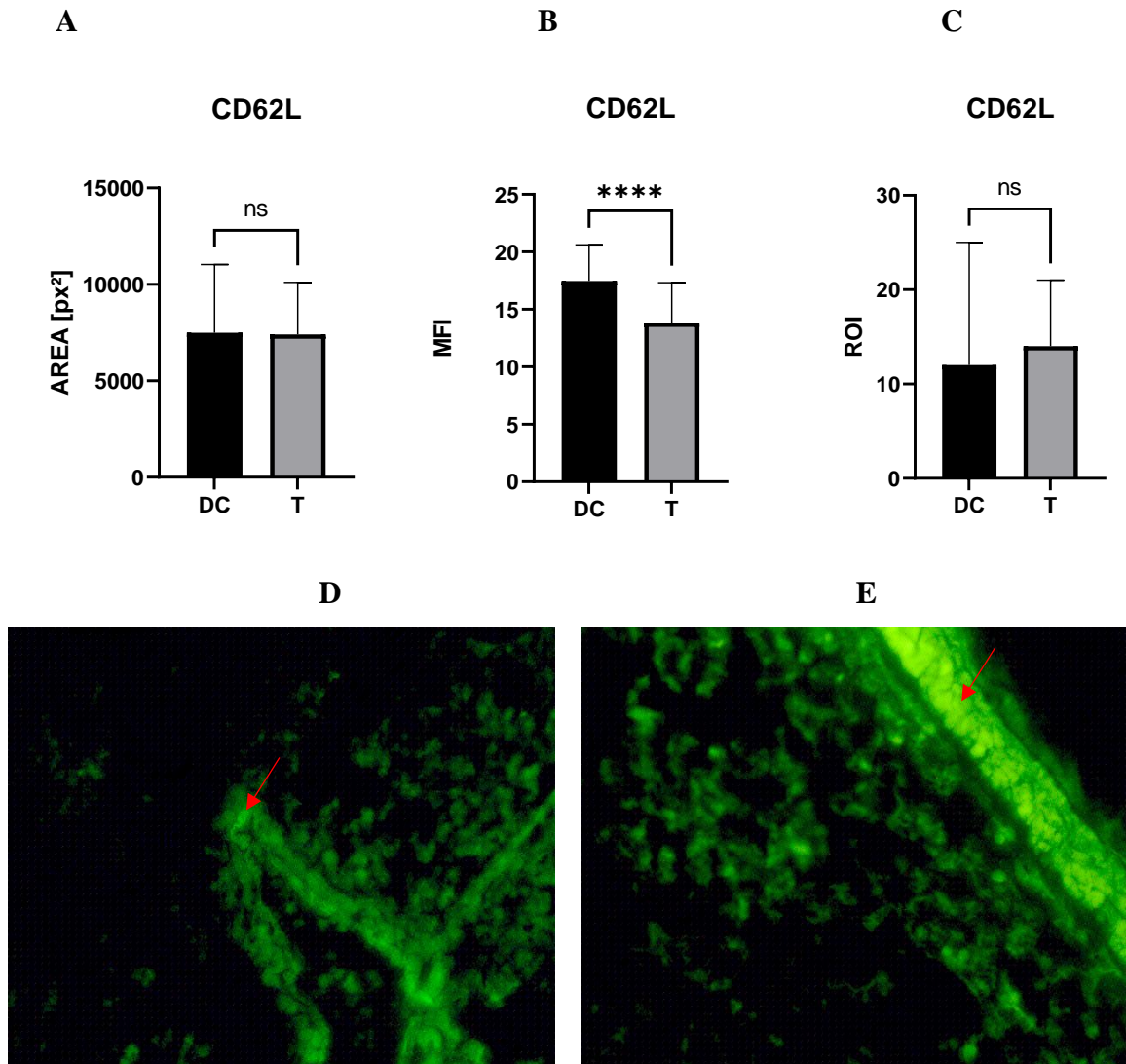


Figura 10: Avaliação da molécula CD62L em células pulmonares dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência. (A) Análise de tamanho das áreas de marcação dos grupos DC e T ($p = 0,9656$). (B) Análise da média de intensidade de fluorescência dos grupos DC e T ($p < 0,0001$). (C) Análise das regiões de interesse dos grupos DC e T ($p = 0,8881$). (D) marcações com técnica de imunofluorescência DC. (E) marcações com técnica de imunofluorescência T.

Analisando esses mesmos parâmetros nas amostras de fígado, os resultados são de áreas marcada sem diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,5509$). Na análise de intensidade de fluorescência houve o aumento no grupo não vacinado em relação ao grupo vacinado ($p < 0,0001$). E quando analisamos as regiões marcadas existe o aumento significativo no grupo não vacinado ($p = 0,0002$).

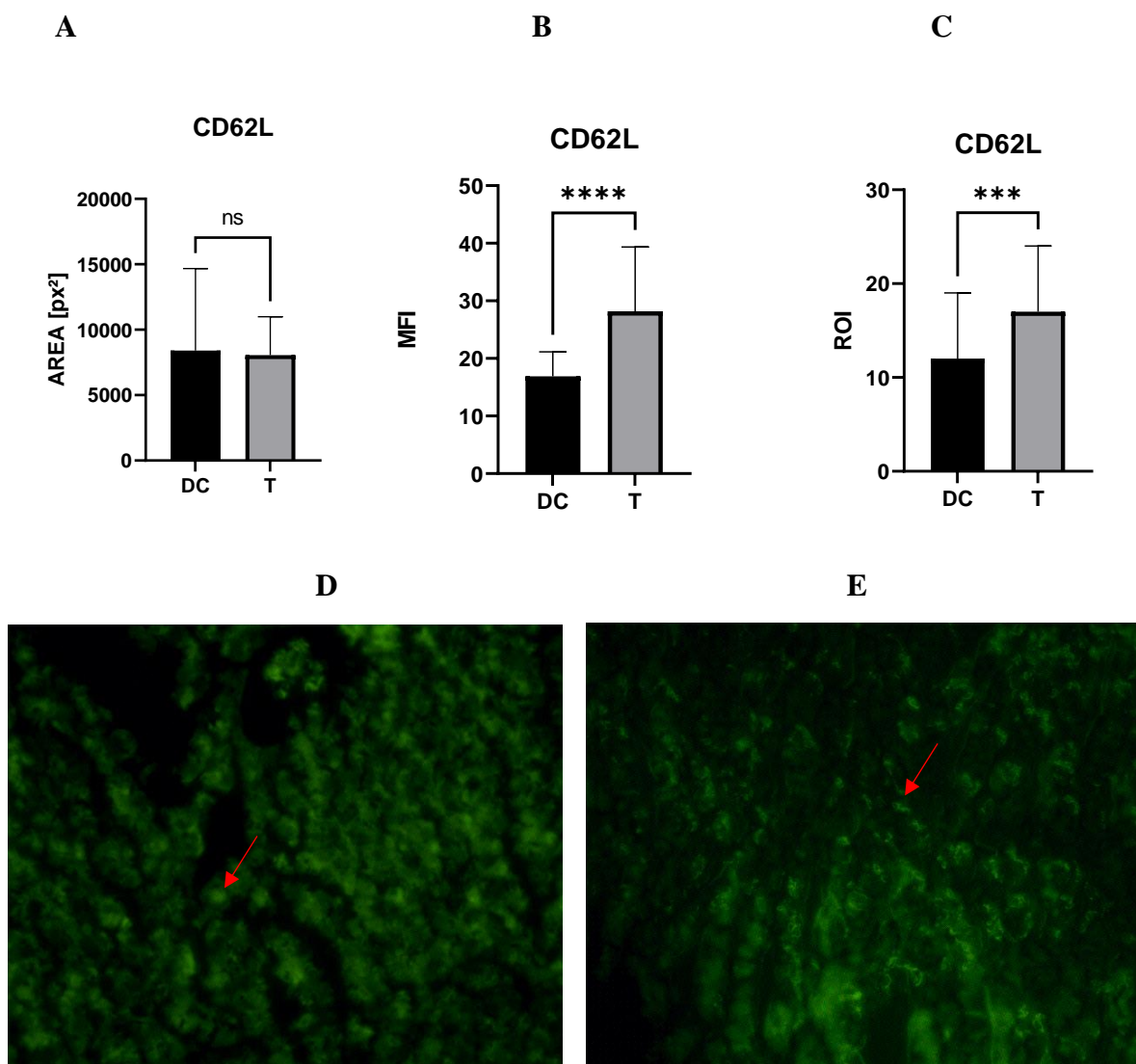


Figura 11: Avaliação da molécula CD62L em células hepáticas dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência. (A) Análise de tamanho das áreas de marcação dos grupos DC e T ($p = 0,5509$). (B) Análise da média de intensidade de fluorescência dos grupos DC e T ($p < 0,0001$). (C) Análise das regiões de interesse dos grupos DC e T ($p = 0,0002$). (D) marcações com técnica de imunofluorescência DC. (E) marcações com técnica de imunofluorescência T.

6.1.4 Análise da molécula CD102 em metástases pulmonares e hepáticas

Nas análises pulmonares entre os grupos vacinados ($n=7$) e não vacinados ($n=8$), notamos que existem áreas maiores marcadas no grupo que não foi vacinado em relação ao grupo vacinado ($p = 0,0199$). E quando analisamos a intensidade de fluorescência dessas marcações, notamos que existe um aumento significativo no grupo vacinado em relação ao grupo não vacinado ($p < 0,0001$). A diferença quando analisamos isoladamente o número de

regiões que foram contabilizadas na marcação de CD102 se concentra no grupo não vacinado se comparado com o grupo vacinado ($p = 0,0003$).

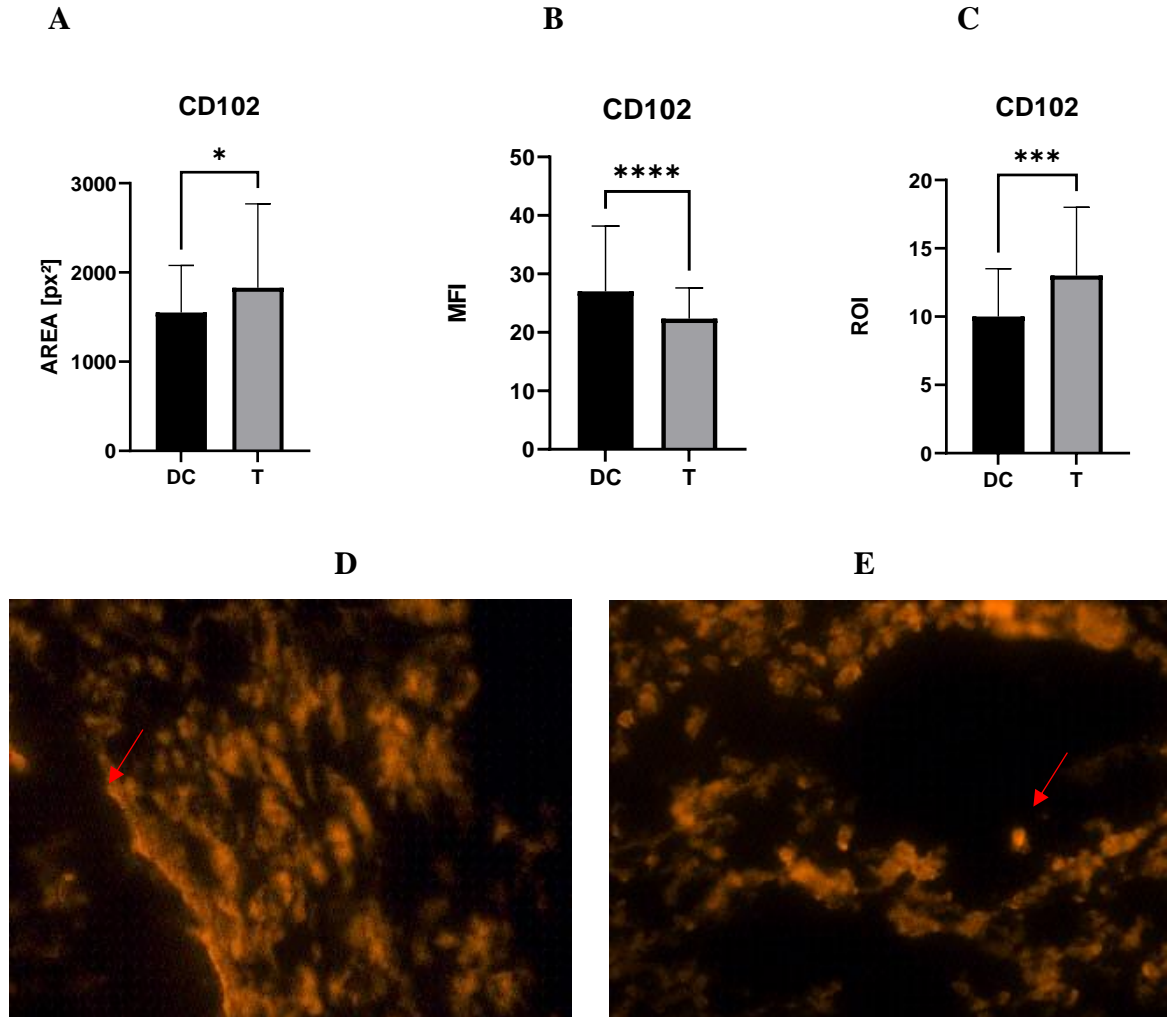


Figura 12: Avaliação da molécula CD102 em células pulmonares dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência. (A) Análise de tamanho das áreas de marcação dos grupos DC e T ($p = 0,0199$). (B) Análise da média de intensidade de fluorescência dos grupos DC e T ($p < 0,0001$). (C) Análise das regiões de interesse dos grupos DC e T ($p = 0,0003$). (D) marcações com técnica de imunofluorescência DC. (E) marcações com técnica de imunofluorescência T.

Analisando esses mesmos parâmetros nas amostras de fígado, os resultados são de áreas marcada com um significativo aumento no grupo não vacinado em relação ao grupo vacinado ($p = 0,0006$). Na análise de intensidade de fluorescência também houve o aumento no grupo não vacinado em relação ao grupo vacinado ($p < 0,0001$). E quando analisamos as regiões marcadas o aumento continua concentrado no grupo não vacinado ($p < 0,0001$).

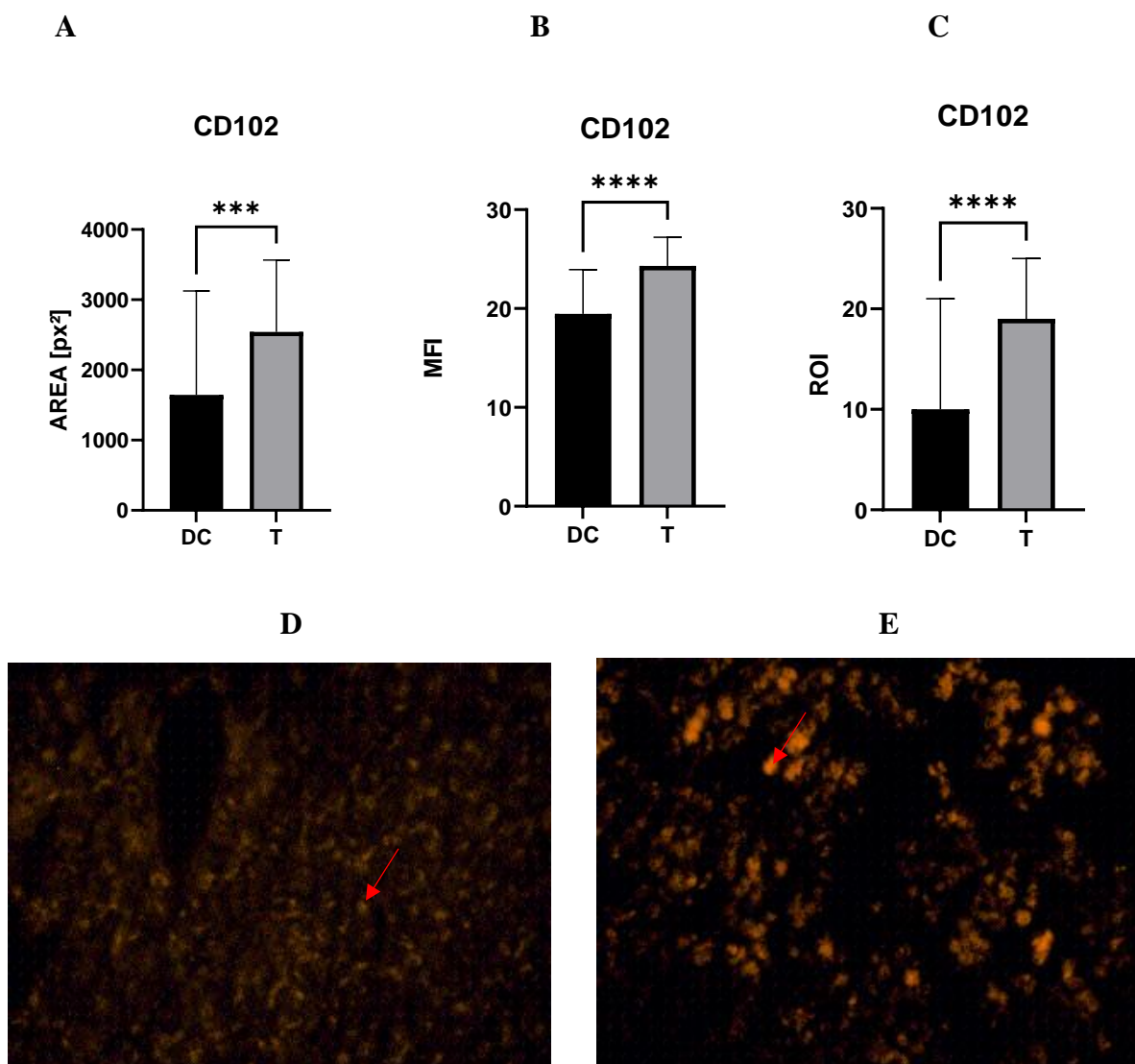


Figura 13: Avaliação da molécula CD102 em células hepáticas dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência. (A) Análise de tamanho das áreas de marcação dos grupos DC e T ($p = 0,0006$). (B) Análise da média de intensidade de fluorescência dos grupos DC e T ($p < 0,0001$). (C) Análise das regiões de interesse dos grupos DC e T ($p < 0,0001$). (D) marcações com técnica de imunofluorescência DC. (E) marcações com técnica de imunofluorescência T.

6.1.5 Análise da molécula CD106 em metástases pulmonares e hepáticas

Nas análises pulmonares entre os grupos vacinados ($n=7$) e não vacinados ($n=8$), notamos que existe um aumento de áreas maiores marcadas no grupo que não foi vacinado em relação ao grupo vacinado ($p = 0,0451$). E quando analisamos a intensidade de fluorescência dessas marcações, não existem diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,8070$). Com

relação ao número de regiões marcadas, também não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0851$).

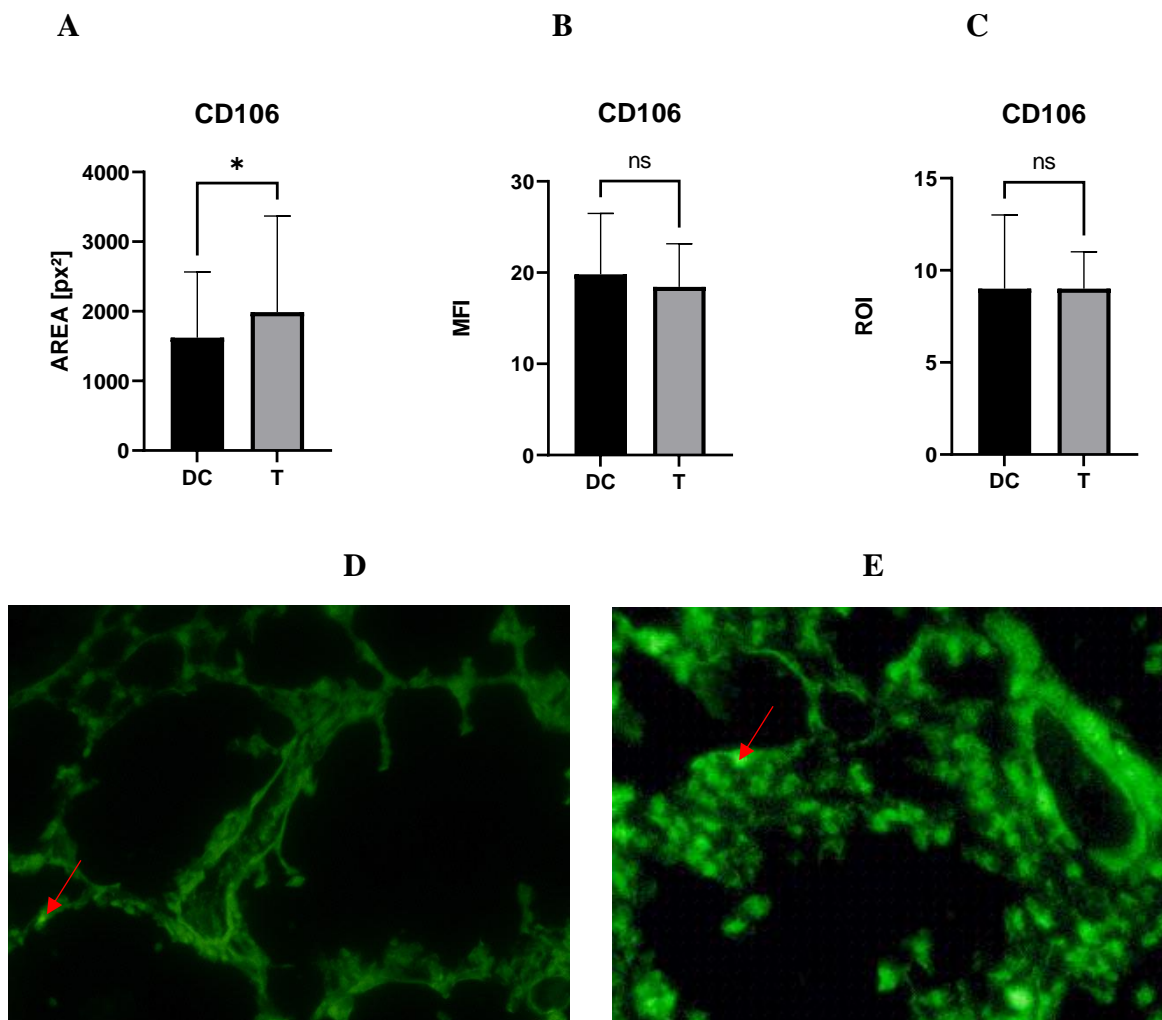


Figura 14: Avaliação da molécula CD106 em células pulmonares dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência. (A) Análise de tamanho das áreas de marcação dos grupos DC e T ($p = 0,0451$). (B) Análise da média de intensidade de fluorescência dos grupos DC e T ($p = 0,8070$). (C) Análise das regiões de interesse dos grupos DC e T ($p = 0,0851$). (D) marcações com técnica de imunofluorescência DC. (E) marcações com técnica de imunofluorescência T.

Analisando esses mesmos parâmetros nas amostras de fígado, os resultados são de áreas marcadas sem diferença significativa entre os grupos ($p = 0,6582$). Na análise de intensidade de fluorescência também não houve significância estatística entre os grupos ($p = 0,1585$). E quando analisamos as regiões marcadas também não é possível demonstrar significância estatística entre os grupos vacinado e não vacinado ($p = 0,2048$).

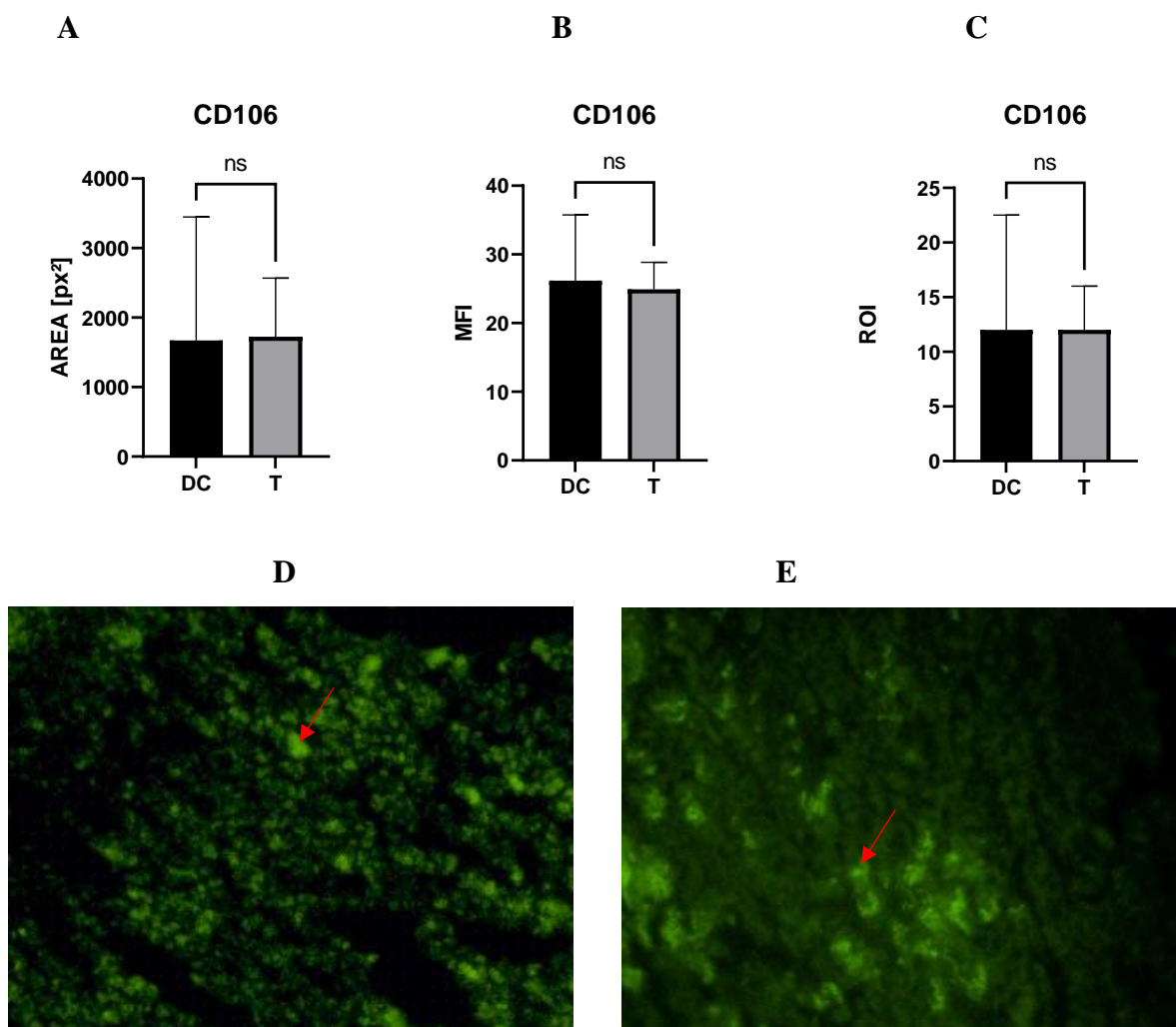


Figura 15: Avaliação da molécula CD106 em células hepáticas dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência. (A) Análise de tamanho das áreas de marcação dos grupos DC e T ($p = 0,6582$). (B) Análise da média de intensidade de fluorescência dos grupos DC e T ($p = 0,1585$). (C) Análise das regiões de interesse dos grupos DC e T ($p = 0,2048$). (D) marcações com técnica de imunofluorescência DC. (E) marcações com técnica de imunofluorescência T.

6.1.6 Análise da molécula CD152 em metástases pulmonares e hepáticas

Nas análises pulmonares entre os grupos vacinados ($n=7$) e não vacinados ($n=8$), não houve significância estatística entre os grupos ($p = 0,0898$). E quando analisamos a intensidade de fluorescência dessas marcações, notamos que existe o aumento significativo no grupo vacinado em relação ao grupo não vacinado ($p < 0,0001$). A diferença quando analisamos isoladamente o número de regiões que foram contabilizadas na marcação de CD152 ainda se concentra no grupo vacinado se comparado com o grupo não vacinado ($p < 0,0001$).

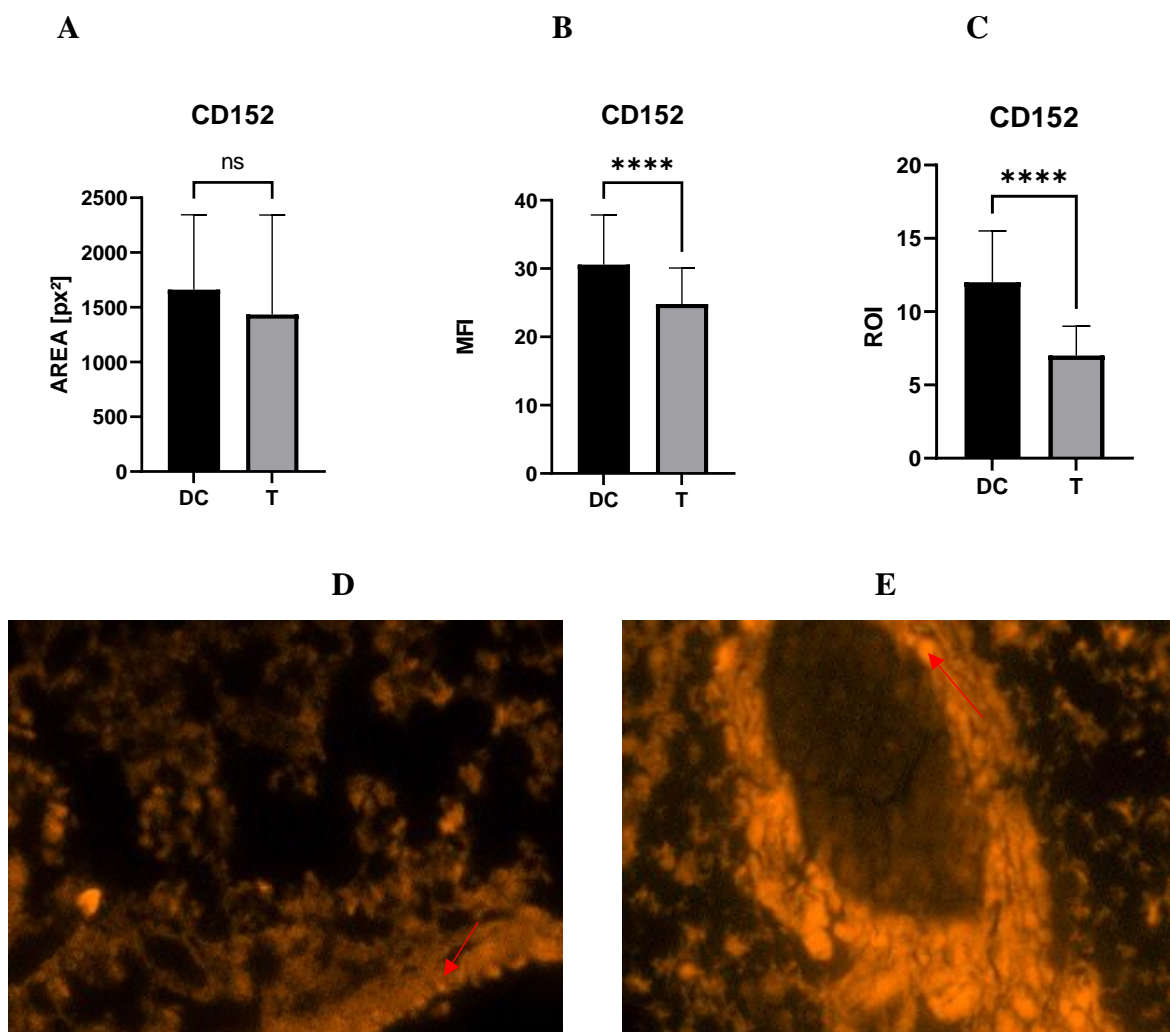


Figura 16: Avaliação da molécula CD152 em células pulmonares dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência. (A) Análise de tamanho das áreas de marcação dos grupos DC e T ($p = 0,0898$). (B) Análise da média de intensidade de fluorescência dos grupos DC e T ($p < 0,0001$). (C) Análise das regiões de interesse dos grupos DC e T ($p < 0,001$). (D) marcações com técnica de imunofluorescência DC. (E) marcações com técnica de imunofluorescência T.

Analisando esses mesmos parâmetros nas amostras de fígado, os resultados são de áreas marcadas sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,4463$). Já na análise de intensidade de fluorescência também se nota o aumento no grupo vacinado em relação ao grupo não vacinado ($p < 0,0001$). E quando analisamos as regiões marcadas o aumento continua concentrado no grupo vacinado ($p = 0,0002$).

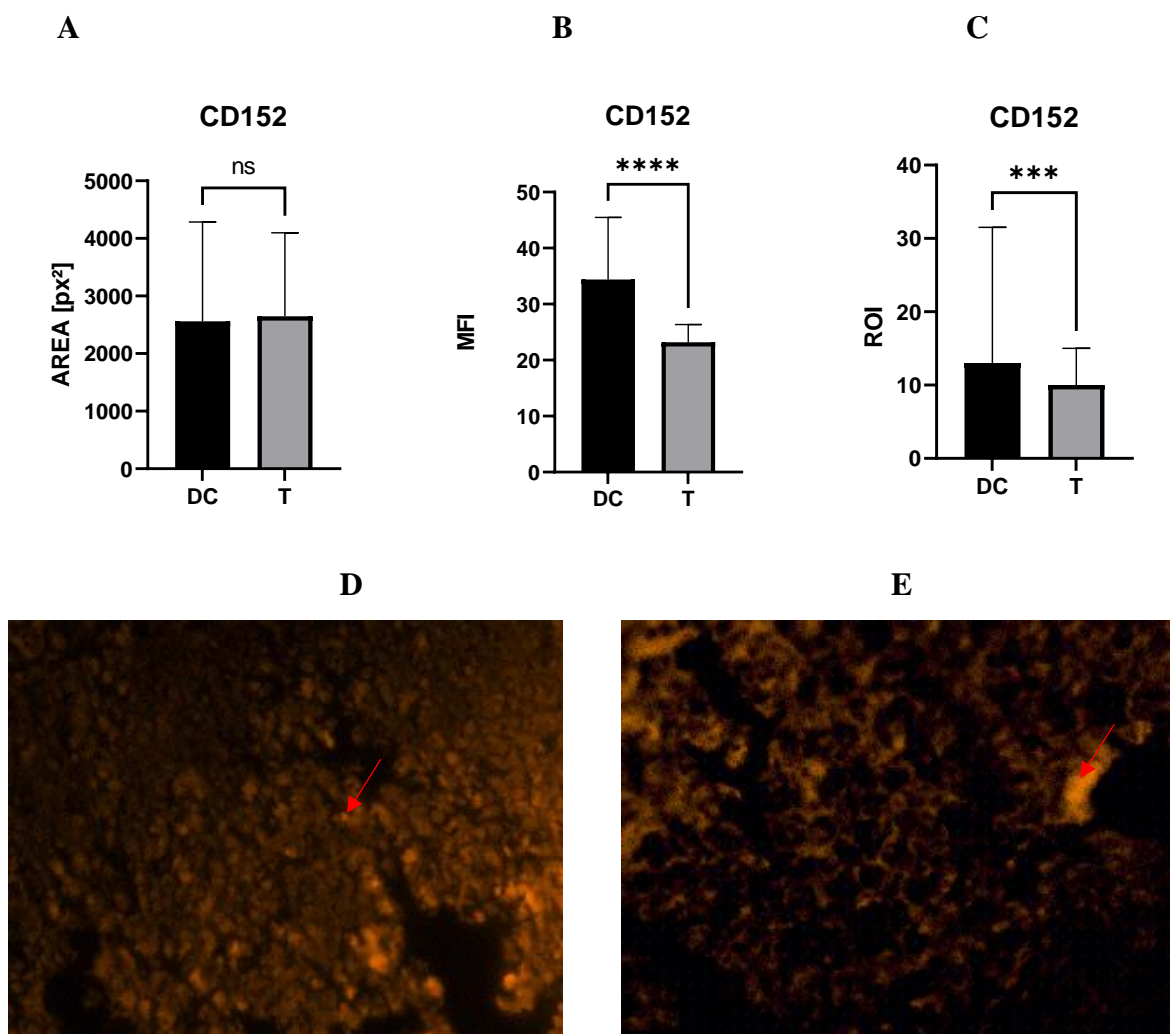


Figura 17: Avaliação da molécula CD152 em células hepáticas dos grupos vacinados e não vacinados por imunofluorescência. (A) Análise de tamanho das áreas de marcação dos grupos DC e T ($p = 0,4463$). (B) Análise da média de intensidade de fluorescência dos grupos DC e T ($p < 0,0001$). (C) Análise das regiões de interesse dos grupos DC e DC ($p = 0,0002$). (D) marcações com técnica de imunofluorescência DC. (E) marcações com técnica de imunofluorescência T.

6.2 REAÇÃO DE GRIESS

6.2.1 Análise da concentração de óxido nítrico em amostras de cultura de células do baço

Na análise de concentração de óxido nítrico, foi observado que a cultura de células esplênicas do grupo controle (não estimulada), mostrou valores aumentados no grupo tumor em todos os tempos ($p < 0,0001$).

Já na cultura que foi estimulada com LPS, pode-se observar o aumento na concentração de óxido nítrico na cultura que foi coletada após 24h de estímulo. Aumento esse, próximo de ser estatisticamente significante nas culturas de 12h e de 36h ($p = 0,0576$).

E na cultura que foi estimulada com PHA, pode-se observar o aumento na concentração de óxido nítrico no grupo tumor em todos os tempos analisados ($p < 0,0001$).

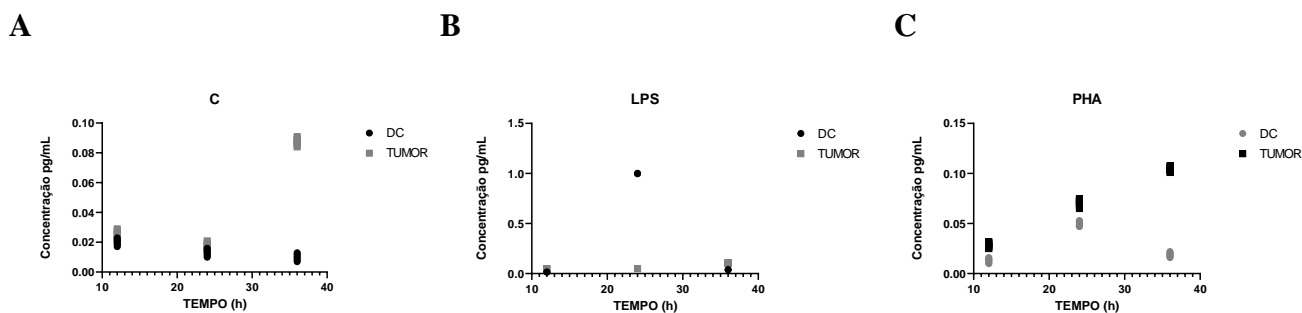


Figura 18: Avaliação dos níveis de óxido nítrico por reação de Griess dos grupos vacinados e não vacinados. (A) Grupo controle ($p < 0,0001$). (B) grupo LPS ($p = 0,0576$). (C) Grupo PHA ($p < 0,0001$).

6.3 ENSAIO DE IMUNOABSORÇÃO ENZIMÁTICA

6.3.1 Análise da dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α em células pulmonares e hepáticas

Na análise da citocina IL-1 β não houve diferença estatística na concentração das amostras pulmonares entre os grupos. Já nas amostras hepáticas vê-se um aumento significativo da concentração dessa citocina no grupo vacinado ($p = 0,0046$). Na análise da citocina IL-6 tanto nas amostras pulmonares, quanto nas hepáticas não houve diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,4818$). E na análise da citocina TNF- α também não houve significância estatística na diferença entre os grupos quando analisadas as amostras de fígado ou de pulmão dos animais ($p=0,0982$).

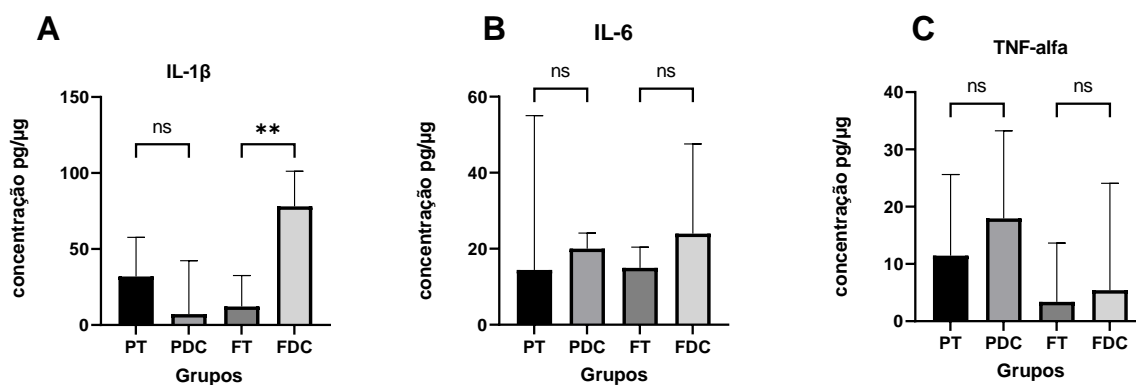


Figura 19: Dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α por *Elisa* em células pulmonares e hepáticas dos grupos vacinados e não vacinados. (A) análise da citocina IL-1 β entre os grupos ($p = 0,0046$) (B) análise da citocina IL-6 entre os grupos ($p = 0,4818$) (C) análise da citocina TNF- α entre os grupos ($p = 0,0982$).

7. DISCUSSÃO

Um componente importante no microambiente tumoral, são as células endoteliais, que acabam fornecendo fatores e proteínas que direcionam o comportamento das células tumorais (SHARMA et al., 2017).

A progressão tumoral e a ocorrência de metástases, depende de diversas interações entre as células estromais (CE) e o tumor. Essas células estão localizadas de maneira central, para que possam direcionar o comportamento das células tumorais, uma vez que as CEs não só formam vasos sanguíneos, como também podem fornecer moléculas que agem diretamente nas células tumorais, remodelando e recrutando células para o microambiente tumoral.

Trabalhos anteriores de nosso grupo demonstraram que a vacina de DCs administrada de forma preventiva foi capaz de inibir o surgimento de metástases pulmonares e hepáticas (VIEIRA et al, 2021).

A expressão de CD106 em células estromais têm a capacidade de promover a sinalização de células tumorais após a ocorrência de recrutamento das células do sistema imune (WIELAND et al., 2017).

Algumas moléculas de adesão celular como por exemplo CD106 e CD54, têm sido encontradas no câncer de mama metastático por desempenharem papéis na adesão celular endotelial, e serem responsáveis pela disseminação tumorais de células para outros locais do organismo. O CD106 é uma molécula importante para que ocorra o recrutamento de leucócitos para o local de inflamação, e estes leucócitos são ativados por TNF- α , IL-1 e IL-6. Esse recrutamento possui papel de suma importância em doenças que são inflamatórias crônicas, como é o caso do câncer (SHARMA et al., 2017).

Dos resultados encontrados, a concentração de IL-1 foi a mais significativa, e isso se deve, nesse caso, à ativação de células da imunidade inata devido à sua sinalização de processo inflamatório. Isso ocasiona um impulsionamento dos perfis Th1 e Th17, pela polarização de células T CD4+. A IL-1 possui diversos papéis biológicos, e para tornar precisa a sua função é necessária uma análise conjunta de fatores e estruturas diferentes. Houve uma redução do volume tumoral e do número de metástases dos camundongos que foram vacinados profilaticamente, então a relação de expressão de CD106 e citocinas pró-inflamatórias. Expressão essa que foi impulsionada pela presença de células dendríticas provenientes da vacinação profilática.

O óxido nítrico, sendo um mediador de vasoproteção endotelial, acaba inibindo a adesão de células tumorais às células endoteliais, contrapondo a promoção da invasividade provocada pela ativação de algumas vias de sinalização de inflamação nas células tumorais (LU et al., 2014).

A enzima responsável por sintetizar óxido nítrico, é conhecida como óxido nítrico sintase (NOS) e sua isoforma (iNOS) induzida por citocinas e LPS no endotélio e na musculatura lisa vascular pode atuar em células tumorais ou ainda em parasitas. Essa isoforma requer síntese proteica para que ocorra sua expressão e a atividade resultante pode persistir por mais de 24 horas, quando induzida por LPS juntamente com citocinas como TNF- α e IL-1 β . A interação entre o superóxido e o óxido nítrico parece prover a regulação da aderência de leucócitos ao endotélio (CERQUEIRA; YOSHIDA,2002).

Os valores de óxido nítrico encontrados nas análises corroboram com a literatura no entendimento de síntese induzida por citocinas, e a promoção de aderência leucocitária, uma vez que outras moléculas envolvidas nessa promoção também estavam aumentadas.

A molécula CD40 é conhecida por ser expressa em células como monócitos e células dendríticas (DCs), onde acaba por promover a sobrevivência da célula, sinalização e também a produção de citocinas que vão influenciar a resposta celular das células endoteliais, epiteliais, fibroblastos além de células neuronais (KARNELL et al., 2019).

Junto à sinalização do receptor de célula B (BCR), a molécula CD40 coopera na estimulação de citocinas pró-inflamatórias que incluem IL-6 e TNF- α . Sendo consideradas uma ponte entre a imunidade inata e a adaptativa, as DCs apresentam os antígenos às células T, resultando na efetivação de sua função celular. Efetivação essa, que também depende da expressão das moléculas coestimulatórias presentes nas DCs. A participação da CD40 nas DCs, através de seu ligante, pode tanto aumentar a expressão do MHC quanto coestimular as moléculas CD80 e CD86, resultando na maturação dessas DCs que sustentarão a efetividade das células T (KARNELL et al., 2019).

A expressão elevada de CD40 é vista no endotélio vascular, leucócitos e no epitélio, além de ser relatado em locais de inflamação crônica, monócitos CD40+ e DCs. Interromper essa via de sinalização reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias e inibe a ativação do macrófago (ARGIRIADI et al., 2019).

Por causa desse amplo eixo de impacto, a expressão da CD40 e seu ligante têm sido alvos de terapias regulatórias para manter uma adequada resposta imune, uma vez que a

superexpressão desse ligante têm relação com um mal prognóstico que inclui, entre outros fatores, uma diminuição de remissões (KARNELL et al., 2019).

Pela relação entre a expressão da molécula CD40 e a resposta imune do tipo I, os dados encontrados sugerem que a diminuição do tumor primário e dos focos metastáticos nos órgãos analisados está intimamente ligada à presença aumentada da molécula nesses locais.

Os macrófagos são elementos-chave para que o processo de inflamação seja iniciado e controlado, e estudos recentes mostraram que as células estromais mesenquimais (MSCs) podem inibir a maturação, bem como a função das DCs, e ativar macrófagos. Os macrófagos ativados pela via clássica (M1) induzidos por Interferon gama (IFN- γ) e LPS, apresentam entre outros achados, alta produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico. E a interação entre a CD54 e os macrófagos pró-inflamatórios, aumenta a função imunossupressora das MSCs (ESPAGNOLLE et al., 2017).

O óxido nítrico é mediador de vários fenômenos, entre eles a citotoxicidade através dos macrófagos, e sua atividade foi relatada no endotélio e nas células epiteliais do pulmão entre outros locais, sendo ainda, responsável pela vasodilatação que é vista na angiogênese em caso de tumores (CERQUEIRA;YOSHIDA,2002).

As moléculas coestimulatórias podem ser divididas em moléculas positivas ou negativas. Uma molécula negativa que inibe a superativação das células T, é a CD152, e seu papel na indução de tolerância imunológica é indicada junto a proteína de morte celular programada 1 (PD-1), que também é uma molécula coestimulatória negativa (LIU et al., 2014).

Estudos anteriores mostraram que o aumento da sinalização de células T, pode estar relacionado à CD62L, sugerindo que essa molécula possui papéis que vão além do tráfego. E embora possa atuar como uma molécula coestimulatória específica para resposta leucocitária, esse direcionamento de resposta sem estímulo prévio acaba sendo moroso, dificultando a elucidação do seu papel na contribuição para a morte de tumores (IVETIC; GREEN; HART, 2019).

Uma resposta de células T citotóxicas contra células cancerígenas começa quando os receptores de células T reconhecem antígenos tumorais específicos na superfície das células cancerígenas. Isso é frequentemente seguido pela liberação de partículas tóxicas que elimina as células alvo. Em respostas citolíticas contra tumores, a adesão entre linfócitos citotóxicos e células alvo não é dependente de LFA-1. Os linfócitos infiltrantes de tumor (TIL) interferem na adesão das células T LFA-1 ao CD54 presente nas células alvo, devido à presença da rede

de galectina que cobre a superfície do TIL. Essas galectinas prejudicam o recrutamento e a ativação de LFA-1 dentro da sinapse imune formada entre os TILs e as células tumorais, e a extensão da interação LFA-1 e CD54 ocasionada pelos TILs, afeta a secreção das citocinas (REINA; ESPEL, 2017).

Identificou-se um aumento da atividade da molécula CD40 nos pulmões e nos fígados do grupo vacinado, sugerindo que houve ativação da via celular que é expressa pelos linfócitos T CD4. Correlacionando esse resultado ao aumento das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , acredita-se que houve a ativação das DCs tanto no pulmão quanto no fígado desses animais, uma vez que um dos fenótipos celulares dessa ativação ocasiona a suprarregulação do TNF. Nos resultados obtidos anteriormente a esse estudo, houve evidência da ativação e aumento das células T CD4 e seus fatores de transcrição, analisados através de citometria.

No pulmão do grupo que não foi vacinado, podemos notar um aumento da expressão da molécula CD54, contrapondo seu aumento no fígado do grupo vacinado. Por se tratar de um marcador de processo inflamatório, sua expressão está aumentada na superfície de células cancerosas. O estudo anterior mostrou que havia uma redução nas áreas de metástases no fígado dos animais vacinados. Essa redução também foi vista no pulmão, porém não com o mesmo grau de significância, o que corrobora com os achados evidentes de atividade diminuída no fígado.

Analisando a molécula CD62L notamos que sua expressão estava aumentada nos pulmões do grupo vacinado, contudo, nos fígados, esse aumento era evidente no grupo não vacinado. Esse achado também corrobora com os resultados anteriores, que mostram que houve uma diminuição do número de áreas de metástases no fígado. Esse achado se relaciona ao envolvimento da CD62L na progressão tumoral e desencadeamento de metástase quando sua contribuição na migração leucocitária está exacerbada.

Quanto à molécula CD102, sua expressão nos pulmões foi vista mais no grupo vacinado. Em contrapartida, no fígado o grupo que detinha esse aumento era o não vacinado. Essa expressão é relatada principalmente em células epiteliais em decorrência de tumores, contudo, estudos recentes têm sugerido que essa molécula possui relação com o deslocamento de DCs em algumas doenças.

Na análise da molécula CD106, havia uma tendência de aumento na expressão do grupo vacinado, tanto nos pulmões, quanto nos fígados analisados. O aumento dessa molécula, se deve ao aumento das citocinas pró-inflamatórias, uma vez que sua expressão é ativada por essas citocinas. Por estar presente tanto em DCs como em células cancerosas, nesse estudo

acredita-se que seu papel tenha sido benéfico, visto que houve redução de metástases no grupo vacinado.

Já na análise da molécula CD152, o aumento evidente nos pulmões e fígados, se encontrava no grupo vacinado. A presença dessa molécula indica o processo de imunossupressão da resposta imune. Porém, o controle da expressão de algumas moléculas envolvidas é necessário, pois a expressão exacerbada pode levar ao aparecimento de doenças autoimunes, condição prejudicial para o tratamento do câncer. Mesmo tendo um papel imunossupressor, nesse contexto, pareceu um mecanismo modulador interessante para a imunoterapia.

Dentre as moléculas analisadas, a que demonstra um comportamento mais intrigante é a CD40. A molécula CD40, pelo envolvimento em diversos mecanismos como sobrevivência da célula, sinalização e produção de citocinas, influencia de maneira direta a resposta celular.

Por estar envolvida também na maturação das DCs, sustentam a efetividade das células T e a ativação do macrófago. E esses macrófagos ativados pela via clássica, entre outros achados, apresentam alta produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico. Logo, diante de todo o exposto, acredita-se que o comportamento das outras moléculas de adesão, bem como da citocinas e óxido nítrico, direta ou indiretamente foi moldado pela expressão da CD40, no grupo vacinado.

Um dos sinais de progressão do câncer é a perda da integridade epitelial. Nesse contexto, o desequilíbrio das moléculas de adesão afeta as estruturas epiteliais que estão associadas à transição epitelio mesenquimal, mecanismo que auxilia na progressão tumoral que termina na disseminação de células para outros órgãos (SANTAROSA; MAESTRO, 2021).

O contexto da vacinação profilática, apresentada no estudo, possui como alvo principal, mitigar o nicho primário, e quando existentes, as metástases, através de mecanismos de ativação das células T e do direcionamento migratório das células sejam elas células neoplásicas ou células da resposta imune de forma eficiente no panorama antitumoral.

Portanto, acredita-se que os resultados alcançados estejam coerentes com o objetivo inicial da experimentação, contudo, aprimoramentos se fazem necessários para que a estratégia se torne eficiente.

Acredita-se que o melhoramento do protocolo existente de maturação de DCs usadas na imunoterapia, e a sua associação com fatores epigenéticos, regulando eventos moleculares que podem ativar ou silenciar os genes, possui o potencial necessário para oferecer eficiência terapêutica.

As moléculas de adesão possuem um papel indiscutivelmente importante no contexto tumoral. Mesmo sem prévia estimulação, essas moléculas podem definir o direcionamento das células tumorais através do mecanismo de migração leucocitária. Em grande parte das moléculas analisadas tanto no pulmão quanto no fígado, pode-se observar um aumento de atividade dessas moléculas no grupo que foi vacinado profilaticamente. E como consequência do aumento da atividade dessas moléculas, também vemos o aumento da produção de citocinas, associadas à essas moléculas, que podem regular a adesão leucocitária ao endotélio, bem como promover o perfil pró-inflamatório, estimulando os leucócitos ativados por essas citocinas.

8. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados e discutidos conclui-se a respeito dos questionamentos levantados na hipótese:

- a) A redução das metástases pulmonares e principalmente as metástases hepáticas, está correlacionada à modulação de expressão das moléculas de adesão CD40, CD106 e CD152 envolvidas na regulação da resposta imune, que se encontraram aumentadas tanto no pulmão quanto no fígado desses animais vacinados.
- b) Os níveis de óxido nítrico encontrados no grupo vacinado estão relacionados à via de sinalização e a produção de citocinas pró-inflamatórias que é ocasionado pela presença da molécula CD40 e células dendríticas (DCs) no local de inflamação. Logo, seus níveis aumentados no grupo vacinado são consequência e não causa.
- c) O aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α no grupo vacinado está relacionada à ativação de células dendríticas (DCs) no pulmão e fígado desses animais. A presença dessas citocinas está relacionada ao recrutamento leucocitário, então observa-se que o aumento dessas citocinas influencia de maneira benéfica o mecanismo responsável pela adesão leucocitária. A adesão leucocitária é um dos componentes do microambiente tumoral capaz de direcionar o comportamento migratório das células tumorais.

9. REFERÊNCIAS

ANGUILLE, S; SMITS, E.L; LION, E; TENDELOO, V.F.V; BERNEMAN, Z.N. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. **The Lancet Oncology**, [S. l.], v. 15, n. 7, p. 257-267, 1 jun. 2014. DOI [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(13\)70585-0](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(13)70585-0). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24872109/>. Acesso em: 11 abr. 2022.

APTE, R.N; DOTAN, S; ELKABETS, M; WHITE, M.R; REICH, E; CARMİ, Y; SONG, X; DVOZKIN, T; KRELIN, Y; VORONOV, E. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. **Cancer and Metastasis Reviews**, [S. l.], v. 25, p. 387–408, 17 out. 2006. DOI 10.1007/s10555-006-9004-4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10555-006-9004-4>. Acesso em: 21 mar. 2022.

ARRAS, D.S; JOHN, S.R. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. **Journal of Hepatology**, [S. l.], v. 64, n. 6, p. 1403-1415, 16 maio 2016. DOI <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.004>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26867490/>. Acesso em: 21 mar. 2022.

ARGIRIADI, M.A; BENATUIL, L; DUBROVSKA, I; EGAN, D.A; GAO, L; GREISCHAR, A; HARDMAN, J; H, J; IYER, R.B; JUDGE, R.A; LAKE, M; PERRON, D.C; SADHUKHAN, R; SIELAFF, B; SOUSA, S; WANG, R; MCRAE, B.L. CD40/anti-CD40 antibody complexes which illustrate agonist and antagonist structural switches. **BMC Molecular and Cell Biology**, [S. l.], v. 20(1), n. 29, p. 1-13, 5 ago. 2019. DOI <https://doi.org/10.1186/s12860-019-0213-4>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31382872/>. Acesso em: 21 mar. 2022.

BAI, R; ZHU, J; BAI, Z; MAO, Q; ZHANG, Y; HUI, Z; LUO, X; YE, X.Y; XIE, T. Second generation β -elemene nitric oxide derivatives with reasonable linkers: potential hybrids against malignant brain glioma. **Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 379–385, 10 jan. 2022. DOI <https://dx.doi.org/10.1080%2F14756366.2021.2016734>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35012394/>. Acesso em: 25 abr. 2022.

BARTHEL, S.R; GAVINO, J.D; DESCHENY, L; DIMITROFF, C.J. Targeting selectins and selectin ligands in inflammation and cancer. **Expert Opin Ther Targets**, [S. l.], v. 11, n. 11, p. 1473-1491, 1 nov. 2007. DOI <https://doi.org/10.1517/14728222.11.11.1473>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18028011/>. Acesso em: 10 abr. 2022.

BĘDKOWSKA, W.B; FRANCUZ, P.C; CISOŃ, S.J; OWCZAREK, A.J; FRANCUZ, T; CHUDEK, J. The Predictive Role of Serum Levels of Soluble Cell Adhesion Molecules (sCAMs) in the Therapy of Advanced Breast Cancer-A Single-Centre Study. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, [S. l.], v. 58, n. 2, p. 153, 19 jan. 2022. DOI <https://doi.org/10.3390/medicina58020153>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35208477/>. Acesso em: 10 abr. 2022.

BULLOCK, T.N.J. CD40 stimulation as a molecular adjuvant for cancer vaccines and other immunotherapies. **Cellular & Molecular Immunology**, [S. l.], v. 19, p. 14–22, 19 jul. 2021. DOI <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00734-4>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34282297/>. Acesso em: 10 abr. 2022.

CASSIM, S; POYSSEGUR, J. Tumor Microenvironment: A Metabolic Player that Shapes the Immune Response. **Internacional Journal of Molecular Scienses**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 157, 1 jan. 2020. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms21010157>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/1/157>. Acesso em: 9 mar. 2022.

CERQUEIRA, N.F; YOSHIDA, W.B. Nitric oxide: review. **Acta Cirúrgica Brasileira**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 417-423, 8 out. 2002. DOI <https://doi.org/10.1590/S0102-86502002000600011>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/acb/a/MQrjXffSZQTpGZy3fqrLNH/>. Acesso em: 22 mar. 2022.

CHEN, D.S; MELLMAN, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. **Immunity**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 1-10, 1 jul. 2013. DOI [10.1016/j.immuni.2013.07.012](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23890059/>. Acesso em: 7 mar. 2022.

CHENE, G; LAMBLIN, G; LE BAIL-CARVAL, K; BEAUFILS, E; CHABERT, P; GAUCHERAND, P; MELLIER, G; COPPENS, Y. Lucy's cancer(s): A prehistorical origin?. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, [S. l.], v. 44, n. 12, p. 690-700, 12 set. 2016. DOI [10.1016/j.gyobfe.2016.10.001](https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2016.10.001). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27839715/>. Acesso em: 7 mar. 2022.

CHOUDHARI, S.K; CHAUDHARY, M; BAGDE, S; GADBAIL, A.R; JOSHI, V. Nitric oxide and cancer: a review. **World journal of surgical oncology**, [S. l.], v. 11, n. 118, p. 1-11, 30 maio 2013. DOI [10.1186/1477-7819-11-118](https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-118). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3669621/>. Acesso em: 21 mar. 2022.

COTRAN, Ramzi S.; KUMAR, Vinay; COLLINS, Tucker; ABBAS, Abul K.; ROBBINS, Stanley Leonard. **Robbins Pathologic Basis of Disease**. 6. ed. [S. l.]: W.B. Saunders Co, 1999. 1425 p. ISBN 9780721673356. Disponível em: <http://www1.lasalle.edu/~frizzell/metastasis.htm>. Acesso em: 9 mar. 2022.

ESPAGNOLLE, N; BALGUERIE, A; ARNAUD, E; SENSEBÉ, L; VARIN, A. CD54-Mediated Interaction with Pro-inflammatory Macrophages Increases the Immunosuppressive Function of Human Mesenchymal Stromal Cells. **Stem Cell Reports**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 961–976, 11 abr. 2017. DOI <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.stemcr.2017.02.008>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28330617/>. Acesso em: 2 abr. 2022.

GARDNER, A; RUFFELL, B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. **Trends in Immunology**, [S. l.], v. 37, n. 12, p. 855-865, 26 out. 2016. DOI [10.1016/j.it.2016.09.006](https://doi.org/10.1016/j.it.2016.09.006). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27793569/>. Acesso em: 7 mar. 2022.

GOLIAS, C; CHARALABOPOULOS, A; STAGIKAS, D; CHARALABOPOULOS, K; BATISTATOU, A. The kinin system--bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system--bradykinin. **Hippokratia**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 124-128, 1 jul. 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2658795/>. Acesso em: 9 mar. 2022.

GRAKOU, U; BROMLEY, S.K; SUMEN, C; DAVIS, M; SHAW, U.S; ALLEN, P.M; DUSTIN, M.L. The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. **Science**, [S. l.], v. 285, n. 5425, p. 221-227, 9 jul. 1999. DOI 10.1126/science.285.5425.221. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10398592/>. Acesso em: 21 mar. 2022.

HAUSMAN, D.M. What Is Cancer?. **Perspectives in Biology and Medicine**, [S. l.], v. 62, n. 4, p. 778-784, 21 nov. 2019. DOI 10.1353/pbm.2019.0046. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31761807/>. Acesso em: 7 mar. 2022.

IDRISS, H.T; NAISMITH, J.H. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). **Microscopy Research & Technique**, [S. l.], v. 50, n. 3, p. 184-195, 1 ago. 2000. DOI [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000801\)50:3%3C184::aid-jemt2%3E3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000801)50:3%3C184::aid-jemt2%3E3.0.co;2-h). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10891884/>. Acesso em: 21 mar. 2022.

IVETIC, A; GREEN, H.L.H; HART, S.J. L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], ano 1068, v. 10, p. 1-22, 14 maio 2019. DOI 10.3389/fimmu.2019.01068. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31139190/>. Acesso em: 21 mar. 2022.

JIN, X; BU, Q; ZOU, Y; FENG, Y; WEI, M. Lewis-antigen-containing ICAM-2/3 on Jurkat leukemia cells interact with DC-SIGN to regulate DC functions. **Glycoconjugate Journal**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 287-297, 1 jun. 2018. DOI <https://doi.org/10.1007/s10719-018-9822-y>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29671117/>. Acesso em: 10 abr. 2022.

KARNELL, J.L; RIEDER, S.A; ETTINGER, R; KOLBECK, R. Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 141, p. 92-103, 15 fev. 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.005>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30552917/>. Acesso em: 2 abr. 2022.

KONG, D.H; KIM, Y.K; KING, M.R; JANG, J.H; LEE, S. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 1057, 2 abr. 2018. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms19041057>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29614819/>. Acesso em: 7 mar. 2022.

LEWCZUK, Łukasz; PRYCZYNICZ, Anna; USTYMOWICZ, Katarzyna Guzińska. Cell adhesion molecules in endometrial cancer - A systematic review. **Advances in Medical Sciences**, [S. l.], v. 64, n. 2, p. 423-429, 2 set. 2019. DOI <https://doi.org/10.1016/j.advms.2019.08.003>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31539810/>. Acesso em: 21 jul. 2022.

LINGEL, H; BRUNNER-WEINZIERL, M.C. CTLA-4 (CD152): A versatile receptor for immune-based therapy. **Seminars in Immunology**, [S. l.], ano 101298, v. 42, p. 1-9, 1 jan. 2019. DOI 10.1016/j.smim.2019.101298. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31604536/>. Acesso em: 7 mar. 2022.

LIU, Z; YU, X; REN, W; ZHANG, M; WANG, H.O; SUN, Y; JIN, L; WANG, F; SHI, M. CD152 and PD-1 down-regulation on CD8 T cells is associated with human acute liver allograft rejection. **Transplantation Proceedings**, [S. l.], v. 46, n. 10, p. 3511-3514, 1 dez. 2014. DOI <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.06.079>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25498082/>. Acesso em: 2 abr. 2022.

LU, Y; YU, T; LIANG, H; WANG, J; XIE, J; SHAO, J; GAO, Y; YU, S; CHEN, S; WANG, M; JIA, L. Nitric Oxide Inhibits Hetero-adhesion of Cancer Cells to Endothelial Cells: Restraining Circulating Tumor Cells from Initiating Metastatic Cascade. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 4, n. 4344, p. 1-9, 11 mar. 2014. DOI [10.1038/srep04344](https://doi.org/10.1038/srep04344). Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep04344>. Acesso em: 21 mar. 2022.

MALINGA, N.Z; SIWELE, S.C; STEEL, H.C; KWOFIE, L.L.I; MEYER, P.W.A; SMIT, T; ANDERSON, R; RAPOPORT, B.L; KGOKOLO, M.C.M. Systemic levels of the soluble co-inhibitory immune checkpoints, CTLA-4, LAG-3, PD-1/PD-L1 and TIM-3 are markedly increased in basal cell carcinoma. **Translational Oncology**, [S. l.], v. 19, n. 101384, p. 1-7, 4 mar. 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101384>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35255355/>. Acesso em: 10 abr. 2022.

MARCUCCI, F; RUMIO, C; CORTI, A. Tumor cell-associated immune checkpoint molecules - Drivers of malignancy and stemness. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [S. l.], v. 1868, n. 2, p. 571-583, 1 dez. 2017. DOI <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.10.006>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29056539/>. Acesso em: 10 abr. 2022.

INCA. MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **O que é câncer?** [S. l.], 30 nov. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 7 mar. 2022.

INCA. MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). **Estatísticas de câncer**: Incidência estimada conforme a localização primária do tumor e sexo. [S. l.], 10 jun. 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 7 mar. 2022.

MILDNER, A; JUNG, S. Development and function of dendritic cell subsets. **Immunity**, [S. l.], v. 40, n. 5, p. 642-656, 15 maio 2014. DOI <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.016>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24837101/>. Acesso em: 11 abr. 2022.

O'SULLIVAN, D; SANIN, D.E; PEARCE, E.J; PEARCE, E.L. Metabolic interventions in the immune response to cancer. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 324-335, 28 fev. 2019. DOI [10.1038/s41577-019-0140-9](https://doi.org/10.1038/s41577-019-0140-9). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30820043/>. Acesso em: 7 mar. 2022.

RAO, Q; MA, G.C; WU, H; LI, M; XU, W; WANG, G.J; WANG, D; ZHANG, C.E; MA, Z.J; ZHANG, Z.T. Dendritic cell combination therapy reduces the toxicity of triptolide and ameliorates colitis in murine models. **Drug Delivery**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 679-691, 28 fev. 2022. DOI <https://dx.doi.org/10.1080%2F10717544.2022.2044935>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35225120/>. Acesso em: 10 abr. 2022.

REINA, M; ESPEL, E. <https://doi.org/10.1007/s00259-020-04784-0>. **Cancers**, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 153, 3 nov. 2017. DOI 10.3390/cancers9110153. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6694/9/11/153>. Acesso em: 7 mar. 2022.

ROBBINS, R.A; GRISHAM, M.B. Nitric Oxide. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 857-860, 1 jun. 1997. DOI [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(96\)00167-7](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(96)00167-7). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272596001677>. Acesso em: 21 mar. 2022.

RUBBARD, A.K; ROTHLEIN, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 28, n. 9, p. 1379-1386, 1 maio 2000. DOI [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00223-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00223-9). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10924857/>. Acesso em: 21 mar. 2022.

SCHRÖRS, B; BOEGEL, S; ALBRECHT, C; BUKUR, T; BUKUR, V; HOLTSTRÄTER, C; RITZEL, C; MANNINEN, K; TADMOR, A.D; VORMEHR, M; SAHIN, U; LÖWER, M. Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 10, p. 1-14, 1 jul. 2020. DOI 10.3389/fonc.2020.01195. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32793490/>. Acesso em: 10 mar. 2022.

SCULLY, O.J; BAY, B.H; YIP, G; YU, Y. Breast cancer metastasis. **Cancer Genomics Proteomics**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 311-20, 24 abr. 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22990110/>. Acesso em: 7 mar. 2022.

SIEVERT, W; TAPIO, S; BREUNINGER, S; GAIPL, U; ANDRATSCHKE, N; TROTT, K.R; MULTHOFF, G. Adhesion molecule expression and function of primary endothelial cells in benign and malignant tissues correlates with proliferation. **PLoS One**, [S. l.], ano e91808, v. 9, n. 3, p. 1-12, 14 mar. 2014. DOI 10.1371/journal.pone.0091808. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24632811/>. Acesso em: 7 mar. 2022.

SHARMA, R; SHARMA, R; KHAKET, T.P; DUTTA, C; CHAKRABORTY, B; MUKHERJEE, T.K. Breast cancer metastasis: Putative therapeutic role of vascular cell adhesion molecule-1. **Cellular Oncology**, [S. l.], v. 40, p. 199–208, 22 maio 2017. DOI 10.1007/s13402-017-0324-x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28534212/>. Acesso em: 22 mar. 2022.

SO, T; CROFT, M. Regulation of PI-3-Kinase and Akt Signaling in T Lymphocytes and Other Cells by TNFR Family Molecules. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 4, n. 139, p. 1-11, 6 maio 2013. DOI 10.3389/fimmu.2013.00139. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23760533/>. Acesso em: 21 mar. 2022.

SUHAIL, Y; CAIN, M.P; VANAJA, K; KURYWCHAK, P.A; LEVCHENKO, A; KALLURI, R; KSHITIZ, A. Systems Biology of Cancer Metastasis. **Cell Systems**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 109-127, 28 ago. 2019. DOI 10.1016/j.cels.2019.07.003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31465728/>. Acesso em: 7 mar. 2022.

TANAKA, A; SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. **Cell Research**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 109–118, 1 jan. 2017. DOI 10.1038/cr.2016.151. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27995907/>. Acesso em: 10 mar. 2022.

TAO, K; FANG, M; ALROY, J; SAHAGIAN, G.G. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. **BMC Cancer**, [S. l.], v. 8, n. 228, p. 1-20, 9 ago. 2008. DOI 10.1186/1471-2407-8-228. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2529338/>. Acesso em: 7 mar. 2022.

TEDDER, T.F; STEEBER, D.A; PIZCUETA, P. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. **Journal of experimental medicine**, [S. l.], v. 181, n. 6, p. 2259–2264, 1 jun. 1995. DOI 10.1084/jem.181.6.2259. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7539045/>. Acesso em: 7 mar. 2022.

TORRE, L.A; SIEGEL, R.L; WARD, E.M; JEMAL, A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 16-27, 1 jan. 2016. DOI 10.1158/1055-9965.EPI-15-0578. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26667886/>. Acesso em: 8 mar. 2022.

VIANNA, H.R; SOARES, C.M.B.M; TAVARES, M.S; TEIXEIRA, M.M; SILVA, A.C.S. Inflammation in chronic kidney disease: the role of cytokines. **Brazilian Journal of Nephrology**, [S. l.], v. 33, n. 3, p. 351-364, 1 set. 2011. DOI <https://doi.org/10.1590/S0101-28002011000300012>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbn/a/gwSqdy8T56xTkjzmm7L87y/>. Acesso em: 21 mar. 2022.

VIEIRA, Jéssica Ferreira. Profilaxia por vacina de células dendríticas (DCs): avaliação de aspectos da resposta imunológica em camundongos Balb/c com carcinoma de mama induzido por 4T1. 2021. Tese. (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2021.

VIEIRA, J.F; PEIXOTO, A.P; MURTA, E.F.C; MICHELIN, M.A. Prophylactic Dendritic Cell Vaccination in Experimental Breast Cancer Controls Immunity and Hepatic Metastases. **Anticancer Research**, [S. l.], v. 41, n. 7, p. 3419-3427, 14 jul. 2021. DOI <https://doi.org/10.21873/anticancer.15129>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34230137/>. Acesso em: 12 abr. 2022.

VIEIRA, J.F; PEIXOTO, A.P; ABREU, T.N.L; MURTA, E.F.C; MICHELIN, M.A. Imunoterapia profilática com células dendríticas (DCs) reduz metástases pulmonares em modelo de câncer de mama experimental. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 47401-47414, 12 maio 2021. DOI DOI:10.34117/bjdv7n5-241. Disponível em: <https://brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/29645/23369>. Acesso em: 12 abr. 2022.

VONDERHEIDE, R.H. CD40 Agonist Antibodies in Cancer Immunotherapy. **Annual Review of Medicine**, [S. l.], v. 71, p. 47-58, 27 jan. 2020. DOI 10.1146/annurev-med-062518-045435. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31412220/>. Acesso em: 7 mar. 2022.

WADA, S; KOBAYASHI, S; TSUNODA, T. Future prospects for cancer immunotherapy - Strategies for ineffective cancers. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 2031699, 25 jan. 2022. DOI <https://doi.org/10.1080/21645515.2022.2031699>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35077339/>. Acesso em: 12 abr. 2022.

WEI, W; JIANG, D; LEE, H.J; LI, M; KUTYREFF, C.J; ENGLE, J.W; LIU, J; CAI, W. Development and characterization of CD54-targeted immunoPET imaging in solid tumors. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging** volume, [S. l.], v. 47, p. 2765–2775, 11 abr. 2020. DOI <https://link.springer.com/article/10.1007/s00259-020-04784-0>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00259-020-04784-0>. Acesso em: 7 mar. 2022.

WIELAND, E; VITA, J.R; LIEBLER, S.S; MOGLER, C; MOLL, I; HERBERICH, S.E; ESPINET, E; HERPEL, E; MENUCHIN, A; CLAUDE, J.C; HOFFMEISTER, M; GEBHARDT, C; BRENNER, H; TRUMP, A; SIEBEL, C.W; HECKER, M; UTIKAL, J; SPRINZAK, D; FISCHER, A. Endothelial Notch1 Activity Facilitates Metastasis. **Cancer Cell**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 355-367, 13 mar. 2017. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.01.007>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28238683/>. Acesso em: 2 abr. 2022.

YANG, L; YONG, L; ZHU, X; FENG, Y; FU, Y; KONG, D; LU, W; ZHOU, T. Disease progression model of 4T1 metastatic breast cancer. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, [S. l.], v. 47, p. 105–116, 22 jan. 2020. DOI [10.1007/s10928-020-09673-5](https://doi.org/10.1007/s10928-020-09673-5). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31970615/>. Acesso em: 7 mar. 2022.

YANG, X; LI, Y; LIU, G; ZHA, W; LIU, Y. Cadherin-16 inhibits thyroid carcinoma cell proliferation and invasion. **Oncology Letters**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 145, 15 mar. 2022. DOI <https://dx.doi.org/10.3892%2Fol.2022.13265>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35350592/>. Acesso em: 25 abr. 2022.

10. ANEXOS

10.1 PARECER TÉCNICO (CEUA)



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

Uberaba, 13 de novembro de 2018

PARECER N.º 37/2018/CEUA/PROPPG
PROCESSO N.º 23085.010283/2018-48
INTERESSADO: MARCIA ANTONIAZI MICHELIN

ASSUNTO: **Parecer da CEUA sobre pedido de alteração do protocolo 379**

Senhora Prof.ª Dr.ª Márcia Antoniazi Michelin,

1. Confirmamos o recebimento do Memorando 58/2018/DMIP/CBN (0121314) que solicita alteração no protocolo 379 - "Avaliação da resposta imunológica em camundongos com câncer de mama submetidos a imunoterapia preventiva com vacina de células dendríticas."
2. O pedido de alteração foi apreciado em reunião da CEUA realizada no dia 9/11/2018 e considerado **aprovado**. Desta forma, fica aprovada a alteração do biotério de fornecimento dos 30 camundongos fêmeas Balb/c, que passa a ser o Biotério Central da UFTM.

À consideração superior.

Aldo Rogelis Aquiles Rodrigues
Coordenador da CEUA



Documento assinado eletronicamente por ALDO ROGELIS AQUILES RODRIGUES, Coordenador(a) da Comissão de Ética no Uso de Animais, em 13/11/2018, às 15:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#), e no art. 14 da [Resolução nº 34, de 28 de dezembro de 2017](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/cei/controlador_externo.php?acao=ver_documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=01, informando o código verificador 0122051 e o código CRC A0D1451E.

10.2 CERTIFICADO DO PROTOCOLO 379 (CEUA)




Ministério da Educação
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Rua Madre Maria José, nº122 – Unidade Administrativa Temporária II - Bairro Abadia
CEP: 38025-100 – Uberaba - MG - Telefone: (034) 37006764 - E-mail: ceua@pesqpg.uftm.edu.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Avaliação da resposta imunológica em camundongos com câncer de mama submetidos à imunoterapia preventiva com vacina de células dendríticas”, registrada com o nº 379, sob a responsabilidade de Márcia Antoniazzi 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 (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em 25/07/2016.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2016 à 01/08/2020
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongos Isogênicos Balb/c
Nº de animais	55
Peso/idade	20 à 30g/ 6 à 8 semanas
Gênero	Fêmeas
Origem	Biotério Setorial do Instituto de Pesquisa em Oncologia - UFTM


Prof. Dr. Carlo José Freire de Oliveira
Coordenador da CEUA

10. 3 ARTIGO

Prophylatic dendritic cell vaccine promotes regulation of molecules involved in cell migration

Taíssa Nayara Lemos de Abreu^a, Jéssica Ferreira Vieira^a, Elias Xavier Miranda Alves Silva^a, Eddie Fernando Cândido Murta^{a, b} and Márcia Antoniazi Michelin^{a, c, @}

^a Oncology Research Institute (IPON), Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brazil

^bDiscipline of gynecology and osbtetrics, UFTM, Uberaba, Minas Gerais, Brazil

^c Professor / Discipline of immunology, UFTM, Uberaba, Minas Gerais, Brazil

[@] Corresponding Author: Professora Márcia A. Michelin, Discipline of immunology, Oncology Research Institute, Federal University of Triângulo Mineiro, Avenue Guilherme Ferreira n°1940, CEP 38022-200, District São Benedito, Uberaba, Minas Gerais, Brazil. E-mail: marcia.michelin@uftm.edu.br, ORCID: 0000-0003-0842-8805.

Information about the Other authors:

Taíssa Nayara Lemos de Abreu, Brazil, e-mail: taissanayarabio@gmail.com, ORCID: 0000-0003-3321-2571.

Jéssica Ferreira Vieira, Brazil, e-mail: jessica.vieira@uftm.edu.br; ORCID: 0000-0003-3556-9849.

Elias Xavier Miranda Alves Silva, Brazil, e-mail: elias.xavier1@hotmail.com, ORCID: 0000-0002-7184-2286.

Eddie Fernando Cândido Murta, Brazil, e-mail: eddiemurta@mednet.com.br, ORCID: 0000-0003-4014-1345

Abstract

Introduction: Adhesion molecules have been studied in order to understand their role in the tumor environment and their relationship with therapeutic improvement, as some molecules act on cell migration, directly influencing the antitumor response and metastatic spread to sites far from the primary niche Where the neoplasm is affected.. **Objective:** To analyze the effects of

the prophylactic dendritic cell vaccine related to cell migration, by studying the molecules ICAM-1, ICAM-2 and CTLA-4 in lung and liver cells in an experimental model, also evaluating the levels of nitric oxide and the concentration of the cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α . **Methods:** Two groups were separated, being vaccinated (DC) and non-vaccinated (T). The molecules were evaluated by Immunofluorescence. To analyze the level of nitric oxide, the Griess reaction was used. For cytokine measurement, The ELISA technique was used. **Results:** The results obtained through immunofluorescence showed no increase in ICAM-1 and CTLA-4 molecules in the lung cells of the vaccinated mice, while ICAM-2 was decreased. And in the liver cells of these animals no increase in CTLA-4 and a decrease in ICAM-2 were seen. In the dosage of nitric oxide, samples stimulated with LPS for 24h demonstrate no increase in the vaccinated group. As for cytokine dosage, there was no increase in IL-1 β , IL-6 and TNF- α in liver cells, and in lung cells there was no increase in IL-6 and TNF- α . **Conclusion:** These findings represent the importance of adhesion molecules in the behavioral targeting of migratory cells, and the influence of this targeting on the metastatic cascade. These molecules potentiate the antitumor response, reducing metastatic triggering by modulating cellular migratory behavior, and increasing levels of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines.

Keywords: Immunotherapy. Dendritic Cell. Adhesion Molecules. Prophylaxis

INTRODUCTION

In the adaptive landscape of the tissue ecosystem, cancer evolves through various genetic/epigenetic processes of selection and clonal expansion. For decades, experiments have shown the ability of tumor cells to utilize, isolate and destroy cellular programs that regulate cell division, survival and growth, triggering the formation and spread of tumors. The best-known cause of malignant transformation is the induction of genetic and epigenetic modifications of stem cell-like properties, such as infinite cell division and blockage of differentiation [4]. Metastasis and the processes involved in the spread of cancer cells from the primary lesion to other organs are the main cause of cancer mortality. This dissemination of tumor cells encompasses a variety of mechanisms that include invasion or coexistence with the stroma, and escape from the surveillance of the immune system that inhibits or associates its antitumor processes [23].

Adhesion molecules can regulate cell function as well as tissue integrity and homeostasis. Adherence of these receptors not only mediates cell-cell interactions, but can

trigger intracellular signaling in response to specific events and locations. They further help form epithelial barriers by signal transduction capacity and homotypic interactions at cell junctions, while providing structural support for binding to the extracellular matrix [12]. Adhesion molecules are important in pathologies such as cancer, in addition to inflammatory diseases, as they play a role in the early stages of tissue integrity development, being responsible for interactions between cells or between cells and components of the extracellular matrix [9].

Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1 or CD54) is a glycoprotein found on the cell surface and is expressed at low basal levels in immune, endothelial and epithelial cells, but when there is an inflammatory response, this expression is stimulated. The main function of this molecule has been studied in transendothelial migration, where it acts by regulating the interactions between leukocytes and adherent elements with the vessel wall [10].

The role of CD54 is reported in breast cancer studies, correlating its expression with an aggressive and metastatic tumor phenotype. It has been suggested that this increase in breast cancer was due to the homophilic interaction between CD54, tumor cells and mesenchymal cells in the bone marrow, mediating the expansion of metastasis [20].

The Intercellular Adhesion molecule 2 (ICAM-2 or CD102) is a surface molecule expressed primarily on lymphocytes, monocytes, platelets and endothelial cells. Its expression may be increased in endothelial cells from tumor growth [22].

In the most diverse studies on different types of cancer, protein 4 associated with cytotoxic T lymphocyte (CTLA-4 or CD152) is described as indicative of immunosuppression, contributing to the persistence and subsequent invasion of tumor cells in other organs [17].

Nitric oxide mediates several phenomena, including cytotoxicity through macrophages, and its activity has been reported in the endothelium and epithelial cells of the lung, among other sites, and is also responsible for the vasodilation seen in angiogenesis in tumors [5]. NO is synthesized by three nitric oxide enzymes encoded by the nitric oxide synthase (NOS) genes. It is produced by mammalian cells at a suitable amplitude and rate and is an important molecule in a variety of physiological processes, including vasodilation, respiration, cell migration, immune response, and apoptosis. An interesting area is the role of nitric oxide in the growth and metastasis of solid tumors, which appears to have a complex role, including inhibiting and promoting tumor activity [7].

The cytokine that acts on other white blood cells is called interleukin (IL). ILs mainly participate in the reaction and presentation of antigens through T helper lymphocytes [25]. Interleukin-1 (IL-1) is abundant in tumor sites, where it affects processes such as

carcinogenesis, tumor growth and invasiveness, also altering the existing patterns between tumor-host interactions [2].

Interleukin 6 (IL-6) together with surface molecules can induce the regulation of dendritic cells, contributing to the necessary immune homeostasis, for example, in autoimmune diseases and tumors [19].

Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is an inflammatory cytokine produced by macrophages/monocytes during episodes of acute inflammation, which has antitumorogenic activity [14].

The 4T1 tumor cell line is a preclinical model for breast cancer in BALB/c mice that best resembles the triple negative breast cancer that affects women around the world, due to its spontaneous metastatic capacity [27]. Originally isolated by Fred Miller and colleagues at the Karmanos Cancer Institute, the 4T1 strain, when introduced orthotopically, is capable of triggering metastases to organs such as the lung, liver and brain, in addition to bones [24].

Dendritic cells (DCs) mediate the immune response that begins through MHC presentation to T lymphocytes. When mature, they can activate T cells in a specific way to perform different functions. They can also initiate an interaction with components of the innate immune system, such as Natural Killer (NK) cells and macrophages [13]. Furthermore, the ability to activate T cells that conventional dendritic cells (DCs) (CDCs) possess is considered to be the basis for the cycle between cancer and immunity. And literature data demonstrate the association between CDCs and the transport of cancer-associated antigens to the draining lymph node [6].

Therapeutic vaccination remains an extensive target of active cancer research, all of which require the ability to present antigens from dendritic cells (DCs). Although detailed studies have already been carried out regarding the activation of dendritic cells (DCs), the immunosuppressive mechanisms that block the immune recognition of tumor cells still need to be elucidated [8]. The mechanisms that trigger the antitumor immune response by T lymphocytes that are generated by the dendritic cell (DC) vaccine may improve the action on the target tissue. In the context of neoplasia, it provides tumor regression, and produces memory cells that create protection in case of disease recurrence [1].

In previous analyzes carried out by our research group, it was possible to observe a decrease in the primary tumor, as well as a decrease in the incidence of liver and lung metastases through a mechanism of control of the inflammatory response in animals that underwent prophylactic vaccination with DCs [26].

In this study, we sought to analyze the effect of the prophylactic vaccine on the expression of adhesion molecules in liver and lung metastases, also evaluating the levels of nitric oxide and the cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α in both groups, vaccinated and unvaccinated. These findings provided us with information to elucidate part of the mechanism that makes dendritic cell immunotherapy applied prophylactically in metastases and recurrences efficient.

METHODS

Liver, lung and splenic cell culture samples were used for analysis. The sample identification, their respective groups and the type of intervention performed, as well as the technique used to analyze these samples is described in table 1 below:

Sample	Groups	Intervention	Techniques used
Lung	PT	Tumoral Induction	Immunofluorescence Griess Reaction
	PDC	Prophylaxis with Dendritic Cells and Tumor Induction	Immunofluorescence Griess Reaction
Lver	FT	Tumoral Induction	Immunofluorescence Griess Reaction
	FDC	Prophylaxis with Dendritic Cells and Tumor Induction	Immunofluorescence Griess Reaction
Spleen	TUMOR	Tumoral Induction	ELISA
	DC	Prophylaxis with Dendritic Cells and Tumor Induction	ELISA

Table 1: Groups of vaccinated (n=7) and non-vaccinated (n=8) animals. The animals of both groups had their lungs, livers and splenic cells removed. To evaluate the adhesion molecules in the lung and liver of these animals, the immunofluorescence technique was used, and to evaluate the levels of nitric oxide, the Griess reaction was used. In the splenic cell culture, the cytokine dosage was analyzed using the ELISA technique.

Animals

The initial project included female mice of the isogenic strain Balb/c, from an experiment approved by the Ethics Committee for the Use of Animals (CEUA), at the Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), under registration number 379.

Dendritic Cell Vaccine

Among the animals, 3 were euthanized to prepare the dendritic cell vaccine. Bone marrow cells were removed from the femurs and tibias with the aid of 0.9% saline solution and a 13.4 x 5mm syringe. The medullary (pluripotent) cells were then cultured in 25cm² culture bottles in IMDM medium supplemented with 0.1mM vitamins, 2mM l-glutamine, 100µg/mL gentamicin, 1mM Sodium Pyruvate (C₃H₃NaO₃) and 5% SBF, incubated in a CO₂ study at 5% humidity and 37°C. After plating, on day 1, cells were stimulated with 10ng/µL of GM-CSF and 10ng/µL of IL-4. On the 5th day, they were stimulated with 10ng/µL of TNF-α and tumor antigen from the 4T1 cell line (obtained by freezing and thawing 4T1 cells). On day 07, the differentiated dendritic cells were washed and resuspended in 0.9% saline. 5.0 x 10⁶ cells were administered, in a volume of 50µL of saline solution, in a single dose. The evaluation of differentiated dendritic cells was carried out qualitatively, through an optical microscope, since previous analyzes demonstrated effectiveness in this differentiation process.

Immunofluorescence

Samples were captured by Nikon ® Inverted Eclipse TI-E microscope, and analyzed by Nikon's NIS-Elements Advance Research ® Software. Fifteen fields from each of the slices were analyzed, randomly chosen, visualized and focused on the 40x objective, which is the standard adopted for all slides. Among the data available in the software, the Selected Regions of Interest (ROIs) was used for analysis, which corresponds to the fluorescent labeling considered suitable for evaluation.

Griess reaction

The Griess Reaction technique consists of the standard curve of serial dilution with the standard properly homogenized and transferred so that all wells contain a final volume of 200 µL, with 100 µL of water (milli-Q) and 100 µL of the transfer of the dilution, and then the reagents are added. And for samples, this volume must be 100 µL (50 µL of sample and 50 µL of reagents). The analysis of the Griess reaction data were read in the Molecular Devices SpectraMax Plus 384 equipment, through the Softmax Pro 5.2 Software developed by Molecular Devices Corporation.

ELISA

The protocol used follows the recommendations of the manufacturer BD Bioscience Pharmingen to which the reagents used belong. The plate was sensitized with the capture antibody contained in the kit diluted in Coating Buffer, blocking with protein was performed with the previously prepared Assay Diluent solution. Subsequently, the standard and samples were prepared in Assay Diluent. Detection antibody and enzyme conjugate solution diluted in Assay Diluent was added to the plate. Substrate containing hydrogen peroxide (H₂O₂) and tetramethylbenzidine (TMB) was added to the plate. To stop the oxidation of the TMB chromogen, phosphoric acid (H₃PO₄) was used.

The analysis of the enzyme immunosorbent assay (ELISA) data were read on the Molecular Devices SpectraMax Plus 384 equipment, through the Softmax Pro 5.2 Software developed by Molecular Devices Corporation.

Statistical analysis

All data were analyzed using the Anderson-Darling, D'Agostino & Pearson, Shapiro Wilk and Kolmogorov-Smirnov normality tests. And the value considered significant was $p < 0.05$ for all analyses. Immunofluorescence data were considered to be non-normally distributed, and the nonparametric Mann-Whitney test was continued. Results were expressed as median. The data of the Griess Reaction, it happened in the same way. And the Elisa data were considered to have a non-normal distribution, and we proceeded using the non-parametric Kruskal-Wallis test. For such analyses, the GraphPad Prism 8.0 Software was used.

RESULTS

The 4T1 lineage mammary carcinoma model that was used has the spontaneous ability to generate metastases in several organs, including the liver and lungs.

Lung

In figure 1, through immunofluorescence in lung cells we obtained the analysis of the CD54 molecule where it was possible to observe this increase in marked areas in the vaccinated group ($p < 0.0001$). In the analysis of the CD102 molecule, the increase in the number of areas was evident in the group that was not vaccinated ($p = 0.0003$). Finally, the analysis of the CD152 molecule showed an increase in these marked areas in the vaccinated group ($p < 0.0001$).

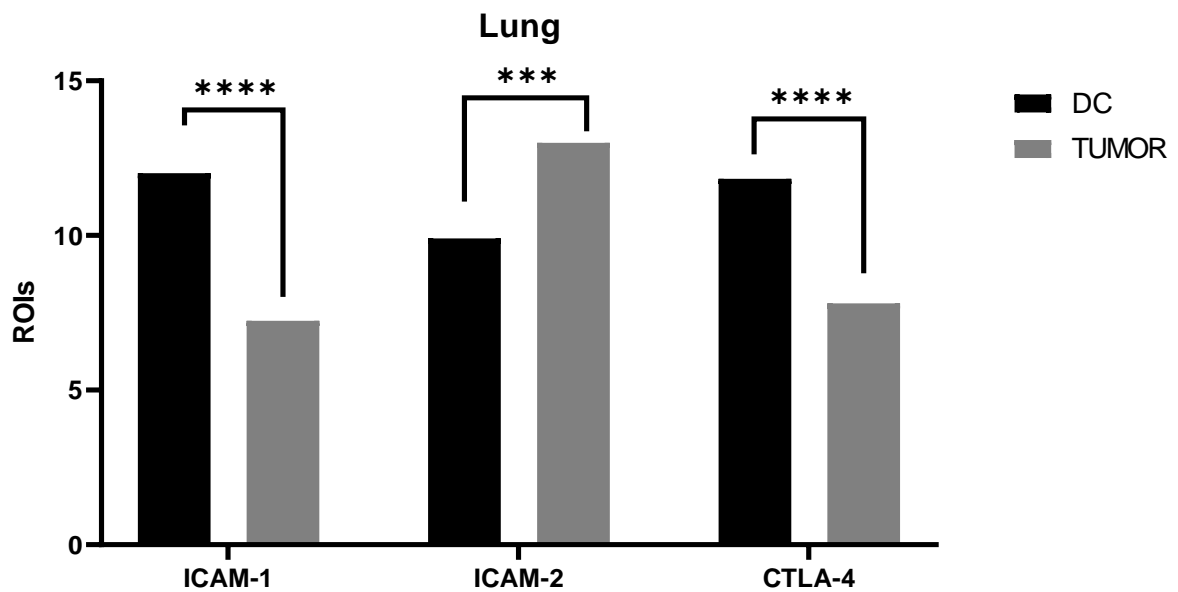


Figure 1: Evaluation of molecules in lung cells of the vaccinated and non-vaccinated groups by immunofluorescence. The analysis of the amount of selected areas of interest (Selected Regions of Interest -ROIs) showed an increase in CD54 ($p < 0.0001$) and CD152 ($p < 0.0001$) molecules in the vaccinated group, and decreased values in compared to the non-vaccinated group on the CD102 molecule ($p = 0.0003$).

Liver

In figure 2, the analysis of the CD54 molecule there was no statistical difference in the amount of marked areas ($p = 0.0804$) in the vaccinated group. The analysis of the CD102 molecule ($p < 0.0001$) shows reduced values in this group, when we analyze the amount of marked areas. Finally, the analysis of the CD152 molecule in the liver showed an increase in the amount of marked areas in the vaccinated group ($p = 0.0002$).

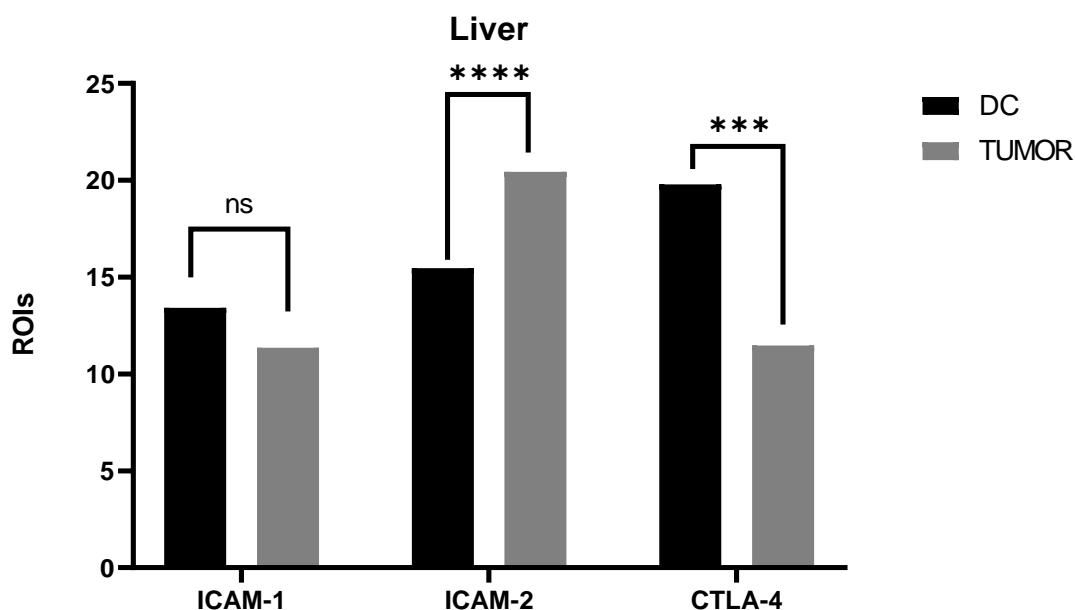


Figure 2: Evaluation of molecules in liver cells of the vaccinated and non-vaccinated groups by immunofluorescence. The analysis of the amount of selected areas of interest (Selected Regions of Interest -ROIs) showed an increase in the CD152 molecule in the vaccinated group ($p = 0.0002$), and decreased values in relation to the non-vaccinated group in the CD102 molecule ($p < 0.0001$). While the analyzes of the CD54 molecule ($p = 0.0804$) did not show statistical significance.

In figure 3, the analysis of nitric oxide concentration revealed an increase in the activity of the vaccinated group only when stimulated with LPS after 24h ($p = 0.0576$). In the control group ($p < 0.0001$) and in the group stimulated with PHA ($p < 0.0001$), the concentration of nitric oxide levels remained concentrated in the non-vaccinated group, regardless of the stimulus time.

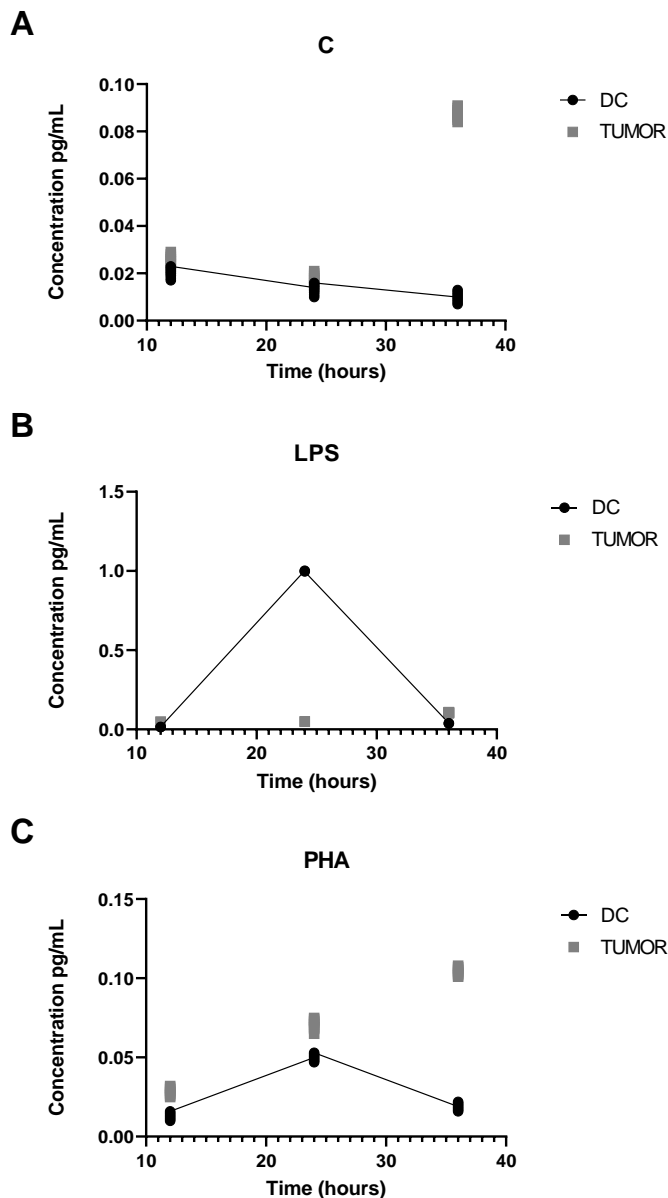


Figure 3: Assessment of nitric oxide levels by Griess reaction of the vaccinated and non-vaccinated groups. (A) In the control samples, the difference between the concentrations of the groups proved to be relevant ($p < 0.0001$) and it was possible to observe that the Tumor group had higher concentrations of nitric oxide. (B) In the samples that were stimulated with LPS, an inversion of concentrations between the groups was observed, which was more evident in the vaccinated group ($p = 0.0576$). (C) The behavior pattern of the samples stimulated with PHA is similar to the behavior of the control samples where the Tumor group has higher concentrations in relation to the vaccinated group ($p < 0.0001$).

In figure 4, the analysis using the Elisa technique shows that it was not possible to observe statistical differences in liver and lung cells in the concentration of cytokines IL-6 ($p =$

0.4818) and TNF- α ($p = 0.0982$) in the group that was vaccinated. In the analysis of the cytokine IL-1 β , a significant increase in liver cells ($p = 0.0046$) was seen in the vaccinated group, a behavior not found in lung cells.

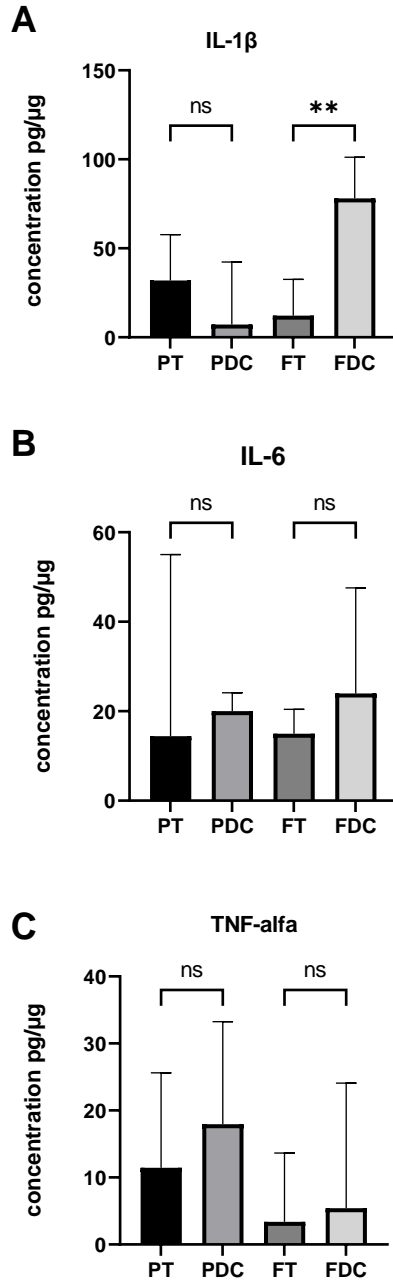


Figure 4: Measurement of cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α by Elisa in lung and liver cells of the vaccinated and non-vaccinated groups. (A) Analysis of IL-1 β concentration between groups showed a difference in concentration in the DC group in the liver samples compared to the Tumor group ($p = 0.0046$). (B) Analysis of IL-6 concentration between groups did not show significant relevance between groups in both lung and liver samples ($p = 0.4818$). (C) Analysis

of TNF- α concentration between groups also did not show significant results between CD and Tumor ($p = 0.0982$).

DISCUSSION

From the results found in the analysis of ICAM-1, we found an increase in the expression in the lung cells of the group that was vaccinated and these findings are related to the expression of this molecule in epithelial cells, induced by NF- κ B in response to the stimulus of TNF- α and IL-1 during the inflammatory process [18].

It has been suggested that the increased expression of this molecule in breast cancer is due to the interaction between ICAM-1, tumor cells and mesenchymal cells in the bone marrow, thus mediating metastatic expansion [20].

Studies with macrophage stimulation assays with LPS induced an energetic regulation of the ICAM-1 molecule, comparing with the result of stimuli with TNF- α and IL-1 β . Also in these studies in mouse polymorphonuclear neutrophils, LPS-induced ICAM-1 expression was associated with a generation of reactive oxygen species and specialized phagocytes [21].

In addition, the regulation of the epithelial barrier has also been associated with ICAM-1, since in addition to mediating leukocyte adhesion, this molecule also serves as a signaling receptor for external signal transduction. This signaling occurs through the interaction of its cytoplasmic domain with the actin cytoskeleton, which is the structure responsible for cell shape, membrane protein distribution and intracellular traffic [3].

In the analysis of the ICAM-2 molecule, we saw that its expression was increased in the liver cells of the vaccinated group. This expression is mainly reported in epithelial cells resulting from tumors, however, recent studies have suggested that this molecule is related to the displacement of dendritic cells in some diseases and in tissues, ICAM-2 showed an exacerbated expression in vascular endothelium [13].

Studies carried out through the application of an analysis system of interactions between leukocytes and endothelial and epithelial cells identified the role of ICAM-2 as a regulatory mechanism of these interactions, being still involved during the process of epithelial mesenchyme transit [11].

However, some works suggest that ICAM-2, which can be identified as a ligand for the Dendritic Cell-Specific Intercellular Molecule-3-Non-Integrin-Grasping (DC-SIGN) in endothelial cells, is able to regulate the trafficking of dendritic cells in diseases such as leukemia. Furthermore, tumor cells could impede dendritic cell functions by targeting DC-

SIGN, resulting in dendritic cell suppression and consequently escaping the immune surveillance mechanism [15].

In the analysis of the CTLA-4 molecule, the increased expression in lung and liver cells of the vaccinated group suggests a modulating mechanism of the immune response. The exacerbated expression of other molecules would lead to the appearance of autoimmune diseases, a condition that could significantly undermine the response in cancer patients.

The CTLA-4 cell surface receptor is a member of the immunoglobulin superfamily with functional importance. It is expressed on the surface of regulatory T cells (Treg), and can only be detected on the surface of T cells after activation. After its activation, it serves as a feedback control mechanism for adaptive immune response, through the regulation of cytokine production, T cell differentiation, cell expansion and migration [16]. In the previous study, an increase in Treg cells was observed through markers analyzed by flow cytometry, supporting their immunoregulatory function in the experimente [26].

The increased levels of nitric oxide in the LPS group may be related to its isoform. The enzyme responsible for synthesizing nitric oxide is known as nitric oxide synthase (NOS) and its isoform (iNOS) induced by cytokines and LPS in the endothelium and vascular smooth muscle can act on tumor cells or even on parasites. This isoform requires protein synthesis for its expression to occur and the resulting activity can persist for more than 24 hours when induced by LPS together with cytokines such as TNF- α and IL-1 β . The interaction between superoxide and nitric oxide seems to regulate the adhesion of leukocytes to the endothelium [5].

Adhesion molecules have an indisputably important role in the tumor context. Even without previous stimulation, these molecules can define the direction of tumor cells through the leukocyte migration mechanism.

Prophylactic vaccination, presented in the study, has as its main target, to mitigate the primary niche, and when existing, metastases in early or mild stages of the disease and cell migration is the mechanism to which we pay attention. It is believed that the improvement of the existing protocol of maturation of dendritic cells used in immunotherapy with the addition of LPS during the stimulation phase, will trigger the robust functioning of these adhesion molecules involved in cell migration, offering the necessary potential for the therapeutic efficiency in cases of metastasis and disease recurrence.

Based on the above, it was concluded that the analyzes demonstrate the functioning of an immunoregulatory mechanism for the expression of ICAM-1, ICAM-2 and CTLA-4

molecules, as well as the cytokines IL-1, IL-6 and TNF- involved in the inflammatory response. This mechanism was triggered by the action of dendritic cells administered prophylactically in animals, transporting cancer-associated antigens to the draining lymph node, or by activating specialized T cells that potentiate the antitumor response, acting in the primary niche and inhibiting the migration of neoplastic cells.

REFERENCES

1. Anguille, S; Smits, E.L; Lion, E; Tendeloo, V.F.V; Berneman, Z.N. (2014). Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 7, p. 257-267. DOI [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(13\)70585-0](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(13)70585-0).
2. Apte, R.N; Dotan, S; Elkabets, M; White, M.R; Reich, E; Carmi, Y; Song, X; Dvozkin, T; Krelm, Y; Voronov, E. (2006). The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 25, p. 387–408. DOI <https://doi.org/10.1007/s10555-006-9004-4>.
3. Barreiro, O; Mo, M.Y; Serrador, J. M; Montoya, M.C; Manzanares, M.V; Tejedor, R; Furthmayr, H; Madrid, F.S. (2002). Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. **The Journal of Cell Biology**, v.7, p.1233-1245. DOI <https://doi.org/10.1083/jcb.200112126>.
4. Cassim, S; Poyssegur, J. (2020). Tumor Microenvironment: A Metabolic Player that Shapes the Immune Response. **Internacional Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 157. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms21010157>.
5. Cerqueira, N.F; Yoshida, W.B. (2002). Nitric oxide: review. **Acta Cirúrgica Brasileira**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 417-423. DOI <https://doi.org/10.1590/S0102-86502002000600011>.
6. Chen, D.S; Mellman, I. (2013). Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 1-10. DOI <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>.
7. Choudhari, S.K; Chaudhary, M; Bagde, S; Gadbail, A.R; Joshi, V. (2013). Nitric oxide and cancer: a review. **World journal of surgical oncology**, v. 11, n. 118, p. 1-11. DOI <https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-118>.
8. Gardner, A; Ruffell, B. (2016). Dendritic Cells and Cancer Immunity. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 12, p. 855-865. DOI <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.09.006>.

9. Golias, C; Charalabopoulos, A; Stagikas, D; Charalabopoulos, K; Batistatou, A. (2007). The kinin system--bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system--bradykinin. **Hippokratia**, v. 11, n. 3, p. 124-128.
10. Gorina, R; Lyck, R; Vestweber, D; Engelhardt, B. (2014). β 2 integrin-mediated crawling on endothelial ICAM-1 and ICAM-2 is a prerequisite for transcellular neutrophil diapedesis across the inflamed blood-brain barrier. **Journal of Immunology**, v.192, n.1, p. 324-327. DOI <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300858>.
11. Halai, K; Whiteford, J; Ma, B; Nourshargh, S; Woodfin, A. (2014). ICAM-2 facilitates luminal interactions between neutrophils and endothelial cells in vivo. **Journal of Cell Science**, v.127 (pt.3), p. 620-629. DOI <https://doi.org/10.1242/jcs.137463>.
12. Harjunpaa, h; Asens, M.L; Guenther, C; Fagerholm, S.C. (2019). Cell Adhesion molecules and their roles and regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. **Frontiers in Immunology**, v.10, p 1-24. DOI <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01078>.
13. Hart, D.N; Prickett, T.C. (1993). Intercellular adhesion molecule-2 (ICAM-2) expression on human dendritic cells. **Cellular Immunology**, v.148, n.2, p.447-454. DOI <https://doi.org/10.1006/cimm.1993.1126>.
14. Idriss, H.T; Naismith, J.H. (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). **Microscopy Research & Technique**, v. 50, n. 3, p. 184-195. DOI <https://doi.org/10.1002/1097-0029>.
15. Jin, X; Bu, Q; Zou, Y; Feng, Y; Wei, M. (2018). Lewis-antigen-containing ICAM-2/3 on Jurkat leukemia cells interact with DC-SIGN to regulate DC functions. **Glycoconjugate Journal**, v. 35, n. 3, p. 287-297. DOI <https://doi.org/10.1007/s10719-018-9822-y>.
16. Lingel, H; Brunner-Weinzierl, M.C. (2019). CTLA-4 (CD152): A versatile receptor for immune-based therapy. **Seminars in Immunology**, ano 101298, v. 42, p. 1-9. DOI <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101298>.
17. Malinga, N.Z; Siwele, S.C; Steel, H.C; Kwofie, L.L.I; Meyer, P.W.A; Smit, T; Anderson, R; Rapoport, B.L; Kgokolo, M.C.M. (2022). Systemic levels of the soluble co-inhibitory immune checkpoints, CTLA-4, LAG-3, PD-1/PD-L1 and TIM-3 are markedly increased in basal cell carcinoma. **Translational Oncology**, v. 19, n. 101384, p. 1-7. DOI <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101384>.
18. Philpott, J.R. (2008). Antisense inhibition of ICAM-1 expression as therapy provides insight into basic inflammatory pathways through early experiences in IBD. **Expert Opin Biol Ther**, n. 8, p.1627- 1632. DOI <https://doi.org/10.1517/14712598.8.10.1627>.

19. Rao, Q; Ma, G.C; Wu, H; LI, M; Xu, W; Wang, G.J; Wang, D; Zhang, C.E; Ma, Z.J; Zhang, Z.T. (2022). Dendritic cell combination therapy reduces the toxicity of triptolide and ameliorates colitis in murine models. **Drug Delivery**, v. 29, n. 1, p. 679–691. DOI <https://doi.org/10.1080%2F10717544.2022.2044935>.
20. Reina, M; EspeL, E. (2017). <https://doi.org/10.1007/s00259-020-04784-0>. **Cancers**, v. 9, n. 11, p. 153. DOI <https://doi.org/10.3390/cancers9110153>.
21. Sakurada, S; Kato, T; Okamoto, T. (1996). Induction of cytokines and ICAM-1 by proinflammatory cytokines in primary rheumatoid synovial fibroblasts and inhibition by N-acetyl-L-cysteine and aspirin. **Int Immunol**, n.8: 1483- 1493. DOI <https://doi.org/10.1093/intimm/8.10.1483>.
22. Sievert, W; Tapio, S; Breuninger, S; Gaipf, U; Andratschke, N; Trott, K.R; Multhoff, G. (2014). Adhesion molecule expression and function of primary endothelial cells in benign and malignant tissues correlates with proliferation. **PLoS One**, e91808, v. 9, n. 3, p. 1-12. DOI <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091808>.
23. Suhail, Y; Cain, M.P; Vanaja, K; Kurywachak, P.A; Levchenko, A; Kalluri, R; Kshitiz, A. (2019). Systems Biology of Cancer Metastasis. **Cell Systems**, v. 9, n. 2, p. 109-127. DOI <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.07.003>.
24. Tao, K; Fang, M; Alroy, J; Sahagian, G.G. (2008). Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. **BMC Cancer**, v. 8, n. 228, p. 1-20. DOI <https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-228>.
25. Vianna, H.R; Soares, C.M.B.M; Tavares, M.S; Teixeira, M.M; Silva, A.C.S. (2011). Inflammation in chronic kidney disease: the role of cytokines. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 33, n. 3, p. 351-364. DOI <https://doi.org/10.1590/S0101-28002011000300012>.
26. Vieira, J.F; Peixoto, A.P; Murta, E.F.C; Michelin, M.A. (2021). Prophylactic Dendritic Cell Vaccination in Experimental Breast Cancer Controls Immunity and Hepatic Metastases. **Anticancer Research**, v. 41, n. 7, p. 3419-3427. DOI <https://doi.org/10.21873/anticancer.15129>.
27. Yang, L; Yong, L; Zhu, X; Feng, Y; Fu, Y; Kong, D; Lu, W; Zhou, T. (2020). Disease progression model of 4T1 metastatic breast cancer. **Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics**, v. 47, p. 105–116. DOI <https://doi.org/10.1007/s10928-020-09673-5>.

STATEMENTS AND DECLARATIONS

Authors' contribution:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Taíssa Nayara Lemos de Abreu, Jéssica Ferreira Vieira, Elias Xavier Miranda Alves Silva and Eddie Fernando Cândido Murta. The first draft of the manuscript was written by Taíssa Nayara Lemos de Abreu and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval

This study was performed in line with the ethics principles. Approval was granted by the Ethics Committee for the use of Animals of Federal University of Triângulo Mineiro (2018/No 379).

Interest Conflicts:

The authors declare that there are no conflicts of interest.

10. 4 COMPROVANTE DE SUBMISSÃO

26/09/2022 14:47

E-mail de UFTM - Universidade Federal do Triângulo Mineiro - Cancer Immunology, Immunotherapy - Receipt of Manuscript ...



MARCIA ANTONIAZI MICHELIN <marcia.michelin@uftm.edu.br>

Cancer Immunology, Immunotherapy - Receipt of Manuscript 'Prophylatic dendritic cell...'

1 mensagem

Cancer Immunology, Immunotherapy <karthiga.anbalagan@springernature.com>
Para: marcia.michelin@uftm.edu.br

26 de setembro de 2022 14:46

Ref: Submission ID 91a9648e-c1bb-411b-9670-4c2b945f4abc

Dear Dr Michelin,

Thank you for submitting your manuscript to Cancer Immunology, Immunotherapy.

Your manuscript is now at our initial Quality Check stage, where we look for adherence to the journal's submission guidelines, including any relevant editorial and publishing policies. If there are any points that need to be addressed prior to progressing we will send you a detailed email. Otherwise, your manuscript will proceed into peer review.

You can check on the status of your submission at any time by using the link below and logging in with the account you created for this submission:

https://researcher.nature.com/your-submissions?utm_source=submissions&utm_medium=email&utm_campaign=confirmation-email&journal_id=262

Kind regards,

Editorial Assistant
Cancer Immunology, Immunotherapy

Cancer Immunology, Immunotherapy is a transformative journal. This means it offers a hybrid publication model. When the journal accepts research for publication, the article may be published using either immediate gold open access or the subscription publishing route. For further information please visit <https://www.springernature.com/gp/open-research/transformative-journals>