

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Cláudio José Silva

**Estudo de diferentes protocolos de diferenciação
de células dendríticas na ativação de linfócitos T
citotóxicos e gama delta em tumores de mama
experimental**

Uberaba

2024

Cláudio José Silva

**Estudo de diferentes protocolos de diferenciação
de células dendríticas na ativação de linfócitos T
citotóxicos e gama delta em tumores de mama
experimental**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Imunologia Básica e Aplicada”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin

Uberaba

2024

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

S579e Silva, Cláudio José
Estudo de diferentes protocolos de diferenciação de células dendríticas na ativação de linfócitos T citotóxicos e gama delta em tumores de mama experimental / Cláudio José Silva. – 2024.
47 f.: il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2024
Orientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin

1. Neoplasias da mama. 2. Linfócitos T citotóxicos. 3. Células dendríticas.
I. Michelin, Márcia Antoniazi. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro.
III. Título.

CDU 618.19-006

Cláudio José Silva

**Estudo de diferentes protocolos de diferenciação
de células dendríticas na ativação de linfócitos T
citotóxicos e gama delta em tumores de mama
experimental**

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

22 de janeiro de 2024.

Banca Examinadora:

Prof(a): Dra. Márcia Antoniazi Michelin - UFTM

Prof(a): Dra. Ana Paula Espindola - UFTM

Prof: Dr. Hélio Humberto Angotti Carrara – FMRP/USP

Dedico o presente trabalho a todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a sua realização. Ao seu modo podemos aprender algo com todas as pessoas, todos sempre tem algo a ensinar.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho. Realizar um trabalho desta magnitude nos permite crescer tanto da forma intelectual como pessoal. A troca de ideias, discussões, entender outros pontos de vistas nos permite aumentar nosso conhecimento e buscar novos entendimentos.

Agradeço a Deus! Por sempre em minhas fraquezas e dificuldades, ter onde buscar força pra seguir em frente e renovar minha fé diariamente.

Aos meus pais, Sinomário Francisco da Silva (*in memoriam*) que mesmo não estando presente nesse plano, com toda certeza me ajuda e fica feliz por cada conquista. A minha mãe Eliana que mesmo enfrentando batalhas diárias não mede esforços para me ajudar, dando suporte e apoio.

Agradeço a minha esposa Carmen por sempre estar ao meu lado, seja em dias bons ou ruins. Por me completar, por seu amor, pela força e alegria de compartilhar a vida.

Aos meus filhos Arthur e Luísa, por me ensinarem a trilhar o caminho da paternidade. Por vocês tento me superar e ser melhor a cada dia.

Aos meus familiares por sempre estarem presente em minha vida, como meus tios Sebastião, Ivani, Elaine, Gustavo, Rodolfo, Maria, Antônio, Lídia, ao meu avô Sebastião, aos meus primos e todos próximos a mim.

Ao meu cunhado Luís pelo incentivo acadêmico de sempre, minha cunhada Camila, meus sogros José Afonso e Dilma por torcer, apoiar e dar suporte nessa jornada.

À minha orientadora Dra. Márcia Michelin por seus ensinamentos, amizade, sugestões, apoio, confiança e oportunidade. Sempre acreditou em mim.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, por compartilhar seus conhecimentos, pelos desafios propostos que contribuíram para meu desenvolvimento intelectual.

A todos os meus colegas da Pós-Graduação, pois nas aulas podemos trocar várias ideias e conhecimentos e isso me engrandeceu bastante no sentido pessoal e intelectual.

Aos meus colegas e amigos do laboratório IPON pela troca de conhecimentos, experiências, convivência, auxílios, risadas e pela presença, vocês foram importantes nessa caminhada: Eleni, Lucas, Saulo, Murilo, Júlia, Joyce, Maria Eduarda, Carlos, Arthur, Nathália, Samara, Gabriel e Rita.

Gostaria de agradecer aos colegas que já não estão mais presentes no laboratório, mas considero que tiveram grande importância no meu dia a dia e sempre lembro com carinho: Jéssica, Cássia, Carla, Lenílson, Polyana, Renata, Eduardo, Ângela, Tauana, Ana Paula, Kézia, André, Taíssa, Millena, Letícia e Fabiano.

Um agradecimento muito especial à Jéssica e a Eleni por me ajudarem bastante na execução deste trabalho, pois foram fontes de inspiração, suporte e por sempre terem uma palavra de incentivo.

Agradecimento à Universidade Federal do Triângulo Mineiro, por ser uma instituição importante em nossa região e nos oportunizar formas de crescimento pessoal e profissional.

Agradecimento a escola de ensino técnico EFOP por entrar durante a minha jornada do mestrado, por me oportunizar a prática da docência, agradeço aos meus alunos, colegas professores e funcionários da escola por fazerem parte do meu dia a dia.

Enfim como sabemos que a busca do conhecimento é um processo de construção gradual, agradeço a todos que fizeram parte desse capítulo da minha vida. Meu muito obrigado!

“Há sempre uma razão, embora não haja nenhuma explicação.”

Adélia Prado

RESUMO

Atualmente o câncer é uma das grandes preocupações dos órgãos de saúde, devido a sua alta taxa de mortalidade, sendo a principal causa de morte entre os tipos de câncer no sexo feminino além de apresentar um grande risco de metástase para órgãos como fígado, ossos, pulmão e cérebro. As células dendríticas (DCs) surgem como uma importante ferramenta na imunoterapia antitumoral, pois as mesmas são uma população heterogênea de leucócitos que desempenham uma função importante tanto na indução quanto na regulação da resposta imune inata e adaptativa, e por esta capacidade, são consideradas fundamentais na indução da resposta imune antitumoral. Por estas características únicas, atualmente as mesmas tem sido usadas na imunoterapia contra tumores. Contudo, é imprescindível o desenvolvimento de novos protocolos de diferenciação e maturação das DCs, para obtenção de resultados cada vez mais satisfatórios. Neste contexto, os linfócitos T, principalmente os citotóxicos (CD8+) e os gama delta ($\gamma\delta$), tem sido imprescindíveis para uma boa resposta imune antitumoral, visto que os mesmos são ativados pelas DCs. Os linfócitos T gama delta ($\gamma\delta$) têm a capacidade de secretar importantes citocinas como a Interleucina 17 (IL-17) e Interferon gama (IFN- γ) e exercer potente citotoxicidade contra uma ampla variedade de células cancerígenas, assim como os linfócitos T CD8+. Portanto, o objetivo do presente estudo é quantificar a presença de linfócitos T citotóxicos (CD8+) produtores de IFN- γ e a presença de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 e IFN- γ em diferentes protocolos de diferenciação e maturação das DCs, designados neste trabalho como protocolo 1 (maturação com TNF- α) e protocolo 2 (maturação com TNF- α , IL-12 e RANTES). Para isso, camundongos fêmeas *BALB/c* foram tumor-induzidos pela linhagem celular 4T1 e posteriormente os grupos experimentais foram tratados com o protocolo 1 ou protocolo 2. A quantificação dos linfócitos T citotóxicos e linfócitos T $\gamma\delta$ produtores das citocinas IFN- γ e IL-17 foi realizada pela técnica de citometria de fluxo. Como resultado encontramos um maior número de linfócitos T citotóxicos produtores de IFN- γ e de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores das citocinas IFN- γ e IL-17 nos animais tratados com o protocolo 2 em comparação ao protocolo 1. Concluindo que o protocolo 2 se mostrou mais eficiente para a maturação das DCs no tratamento antitumoral e conseqüentemente na indução de uma resposta imune tumoral mais potente.

Palavras-chave: Células dendríticas. Linfócitos T citotóxicos. Linfócitos T $\gamma\delta$. IFN- γ . IL-17.

ABSTRACT

Currently, cancer is one of the major concerns for health agencies, due to its high mortality rate, this cancer is the leading cause of death among female cancers, as well as presenting a high risk of metastasis to organs such as the liver, bones, lungs and brain. Dendritic cells (DCs) emerge as an important tool in antitumor immunotherapy, as they are a heterogeneous population of leukocytes that play an important role in both the induction and regulation of the innate and adaptive immune response, and due to this capacity, they are considered fundamental in inducing the antitumor immune response. Due to these unique characteristics, they have currently been used in immunotherapy against tumors. However, it is essential to develop new protocols for the differentiation and maturation of DCs, to obtain increasingly satisfactory results. In this context, T lymphocytes, especially cytotoxic ones (CD8+) and gamma delta lymphocytes ($\gamma\delta$), have been essential for a good antitumor immune response, since they are activated by DCs. Gamma delta ($\gamma\delta$) T lymphocytes have the ability to secrete important cytokines such as Interleukin 17 (IL-17) and Interferon gamma (IFN- γ) and exert potent cytotoxicity against a wide variety of cancer cells, as well as CD8+ T lymphocytes. Therefore, the objective of the present study is to quantify the presence of cytotoxic T lymphocytes (CD8+) producing IFN- γ and the presence of $\gamma\delta$ T lymphocytes producing IL-17 and IFN- γ in different DC differentiation and maturation protocols, designated in this work as protocol 1 (maturation with TNF- α) and protocol 2 (maturation with TNF- α , IL-12 and RANTES). For this, female BALB/c mice were tumor-induced by the 4T1 cell line and subsequently the experimental groups were treated with protocol 1 or protocol 2. Quantification of cytotoxic T lymphocytes and $\gamma\delta$ T lymphocytes producing the cytokines IFN- γ and IL-17 was performed using the flow cytometry technique. As a result, we found a greater number of cytotoxic T lymphocytes producing IFN- γ and $\gamma\delta$ T lymphocytes producing the cytokines IFN- γ and IL-17 in animals treated with protocol 2 compared to protocol 1. In conclusion, protocol 2 proved to be more efficient for the maturation of DCs in antitumor treatment and consequently in inducing a more potent tumor immune response.

Keywords: Dendritic cells. Cytotoxic T lymphocytes. $\gamma\delta$ T lymphocytes. IFN- γ . IL-17.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Função de apresentação de antígenos de linfócitos T $\gamma\delta$	9
Figura 2 - Delineamento experimental	13
Figura 3 - Volume tumoral	16
Figura 4 - Linfócitos T CD8+ produtores de IFN- γ	17
Figura 5 - Linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IFN- γ	18
Figura 6 - Linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17	18
Figura 7 - Comparação dos níveis de produção de citocinas.	19
Figura 8 - Volume tumoral X Linfócitos T CD8+ produtores de IFN- γ	20
Figura 9 – Volume tumoral x Linfócito T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ	21
Figura 10 - Volume tumoral x Linfócitos T $\gamma\delta$ produtoras da IL-17.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos animais por grupo de estudo.....	12
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

cm² – Centímetros ao quadrado

Dra. - Doutora

mL – Mililitro

mM - Milimolar

ng – Nanogramas

P1 – Protocolo 1

P2 – Protocolo 2

Profa. – Professora

xg – Força centrífuga relativa

µg – Microgramas

µL – Microlitros

LISTA DE SIGLAS

APCs – Células apresentadoras de antígenos
BD – Becton Dickinson
BMDC – Células dendríticas derivadas da medula óssea
CCR7 – receptor de quimiocinas C-C tipo 7
CD – Cluster de diferenciação
CD34- Cluster de diferenciação número 34
CD40L – Ligante de cluster de diferenciação número 40
CD80- Cluster de diferenciação número 80
CD86- Cluster de diferenciação número 86
cDCs – Células dendríticas convencionais
CTLs – Linfócitos T citotóxicos
CXCL4 – Quimiocina fator plaquetário 4
DAMP – padrões moleculares associados a danos
DCs – Células Dendríticas
GM-CSF – Fator estimulador de colônias de macrófagos de granulócitos
HLA-DR – Antígeno leucocitário humano de classe II
IFN- γ – Interferon gama
IL-17 – Interleucina 17
IL-12 – Interleucina 12
IL-2 – Interleucina 2
IL-4 – Interleucina 4
IMDM – Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IPON – Instituto de Pesquisa em Oncologia
LPS – Lipopolissacarídeo
MFI – Média de intensidade de Fluorescência
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
MIP-1 – Proteínas inflamatórias de macrófagos
NK – Natural Killer
PAMP – padrões moleculares associados a patógenos
PBS – Tampão fosfato-salina
pDCs – Células dendríticas plasmocitóides

RANTES - Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted

TCD4 – Linfócito T auxiliar

TCD8 – Linfócito T citotóxico

TCR – Receptor de células T

TCR $\gamma\delta$ – Receptores de células T gama delta

TGF- β – Fator de crescimento transformador beta

Th – T auxiliares

Th1 – T auxiliares do tipo 1

Th17 – T auxiliares do tipo 17

Th2 – T auxiliares do tipo 2

TLR – Receptores Toll-Like.

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

Treg – Linfócito T regulatório

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

LISTA DE SÍMBOLOS

α – Alfa

β – Beta

γ – Gama

δ – Delta

% - Porcentagem

°C – Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. CÂNCER DE MAMA.....	1
1.2. CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	2
1.3. PROTOCOLOS DE MATURAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DAS DCs.....	3
1.4. CITOCINAS E QUIMIOCINAS IMPORTANTES NA MATURAÇÃO DE DCs.....	4
1.5. IMUNOTERAPIA DE DCs CONTRA TUMORES	5
1.6. MODELO EXPERIMENTAL DE CÉLULAS 4T1.....	6
1.7. LINFÓCITOS T $\gamma\delta$	7
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	10
3. OBJETIVOS	11
3.1. OBJETIVO GERAL	11
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
4.1. ANIMAIS	12
4.2. OBTENÇÃO E MATURAÇÃO DAS DCs	13
4.3. CITOMETRIA DE FLUXO	14
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	15
5. RESULTADOS	16
6. DISCUSSÃO	23
7. CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXO 1.....	32
ANEXO 2.....	33

1. INTRODUÇÃO

O câncer é compreendido como um grupo que abrange mais de 100 doenças, que possui a característica de crescimento celular desordenado, capaz de disseminar-se entre tecidos e órgãos adjacentes (BATISTA; MATTOS; SILVA, 2015).

As células cancerosas se dividem rapidamente e tem a tendência de serem agressivas, pela perda da apoptose e incontroláveis quanto a sua multiplicação e invasão a outros tecidos e órgãos. A divisão desordenada dessas células dá origem a formação de massas tumorais que podem se espalhar por outras partes do corpo a partir de um tumor primário, esse fenômeno é chamado de metástase (INCA, 2023).

1.1. CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é caracterizado pela proliferação anormal de células no tecido mamário, o que o caracteriza como um tumor maligno. Essa doença se desenvolve devido as alterações genéticas nas glândulas mamárias, no entanto, isso não significa que os tumores de mama sejam sempre hereditários. As células da glândula mamária tornam-se defeituosas e se proliferam de maneira desordenada, o que leva à formação de nódulo (caroço) na mama, em tecidos vizinhos (nódulos na axila) ou em outras partes do corpo (metástases à distância). Essas alterações genéticas podem ser determinadas por fatores como exposição a hormônios, excesso de ingestão de gordura saturada, sedentarismo, tabagismo, excesso de peso, entre outros (SBM, 2023).

Sintomas do câncer de mama são variados e podem incluir nódulo palpável endurecido no seio, associado ou não à dor, nódulo palpável na axila (linfonodo), modificações na pele da mama (pele em “casca de laranja”) e saída de secreção pelo mamilo (MAFFUZ-AZIZ *et al.*, 2017).

Este tipo de câncer é o mais comum entre as mulheres, e seu tratamento é baseado em fatores prognósticos para categorizar as pacientes em diferentes grupos de risco. A doença é caracterizada por desenvolver tumores malignos, onde acontece modificações nas células da glândula mamária (MAFFUZ-AZIZ *et al.*, 2017).

De acordo com as últimas pesquisas realizadas pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), a respeito da incidência do câncer de mama, constatou-se que é um dos três tipos com maior incidência, principalmente em mulheres. Existe uma grande preocupação por ser um tipo de câncer com alta taxa de mortalidade se comparado a outros tipos de cânceres.

Hoje no Brasil, mais de 290 mil casos de câncer de mama em mulheres de todo o país (IARC, 2021).

1.2.CÉLULAS DENDRÍTICAS

As células dendríticas (DCs) são uma população heterogênea de leucócitos que desempenham uma função importante tanto na indução quanto na regulação da resposta imune inata e adaptativa. Como iniciadoras e coordenadoras da resposta imune adaptativa, as células dendríticas são consideradas necessárias para induzir a resposta imune antitumoral. Essa capacidade tem sido usada há muito tempo como imunoterapia vacinal para pacientes com câncer (LEE; RADFORD, 2019).

Essas importantes células apresentadoras de antígenos (APCs) surgem de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes que se diferenciam em precursores de macrófagos, posteriormente dando origem a precursores comuns de monócitos e comuns de DCs que dão origem a duas linhagens, a linhagem mieloide, onde estão as subpopulações de DCs convencionais, plasmocitóides e derivadas de monócitos, e também temos a linhagem linfoide (CONTI; SANTIAGO; SFORCIN, 2014).

As DCs apresentam processos citoplasmáticos membranosos do tipo dendritos, sendo essa característica responsável por gerar eficiência na incorporação de material extracelular e apresentam expressão aumentada de moléculas apresentadoras de antígenos e moléculas coestimuladoras. Esta característica morfológica faz com que as DCs possuam alta capacidade fagocítica com processo migratório do sangue para os tecidos periféricos e internalização de antígenos por métodos de fagocitose (PATENTE *et al.*, 2019).

O processamento de antígenos pelas DCs desencadeia a conversão de proteínas em peptídeos que são apresentados nas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC do inglês "*Major Histocompatibility Complex*") reconhecidas pelas células T. De maneira a apresentar plasticidade e capacidade de modulação de respostas efetoras de acordo com o microambiente em que estão inseridas. Embora todas as DCs sejam capazes de captação, processamento e apresentação de antígenos, a plasticidade existente faz com que os seus vários subtipos apresentem atividades imunológicas diferenciadas em razão de distintos marcadores celulares, localização, vias migratórias e dependência de estímulos inflamatórios para sua geração (ABBAS, PILLAI, LICHTMAN, 2015).

As DCs possuem uma heterogeneidade funcional e fenotípica, de maneira a apresentar plasticidade e capacidade de modulação de respostas efetoras de acordo com o microambiente em que estão inseridas. Durante o processo de desenvolvimento para uma resposta imune adaptativa, a função e o fenótipo das DCs desempenham um papel extremamente importante no início da tolerância, memória e ativação de perfis de células T auxiliares (Th do inglês *T-helper*), como T auxiliares do tipo 1 (do inglês “*Th1*”), T auxiliares do tipo 2 (do inglês “*Th2*”) e T auxiliares do tipo 17 (do inglês “*Th17*”) (PATENTE *et al.*, 2019).

A ação antitumoral das DCs acredita-se que em grande parte seja mediada por linfócitos T, visto que as mesmas são capazes de atuar apresentando antígenos para os mesmos. Ao realizar a ativação destes linfócitos ocorre a ativação de alguns clones e o desenvolvimento de outros clones em linfócitos T de memória. Esta memória imunológica é fundamental para que em um próximo contato com o antígeno, ou neste caso, em recidivas ou metástases tumorais, estes clones possam agir muito mais rapidamente e de forma mais eficaz (VIERA *et al.*, 2021).

In vivo, o processo de maturação das DCs é desencadeado por lesão tecidual ou patógenos, enquanto *in vitro*, isso pode ser imitado por estimulação com agonistas de Receptores de Células T (TLRs) ou por um coquetel de citocinas pró-inflamatórias (CONTI; SANTIAGO; SFORCIN, 2014).

1.3.PROTOCOLOS DE MATURAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DAS DCs

A imunoterapia com DC vem sendo muito estudada como uma arma para se obter ativação suficiente de uma resposta imune antitumoral. Uma grande variedade de protocolos e patentes foram e ainda são testados para diferenciação e maturação de DCs em fenótipos e genótipos apropriados para uma imunoterapia eficaz. Os métodos mais utilizados para gerar DCs, incluem expansão *in vivo* de DCs circulantes, diferenciação de precursores de monócitos ou precursores hematopoiéticos CD34 positivos (LUNDBERG *et al.*, 2013).

Desse modo em ensaios *in vitro*, as DCs podem ser propagadas a partir de células derivadas da medula óssea ou do sangue periférico, aonde se utiliza de várias combinações de fatores de crescimento, como Fator estimulador de colônias de macrófagos de granulócitos (GM-CSF) e Interleucina 4 (IL-4). Existem outras formas de obtenção de DCs, essas podem ser diferenciadas, por exemplo, na presença de GM-CSF e interferon alfa (IFN- α) e secretam altas

quantidades de citocinas pró-inflamatórias, de forma a induzir uma resposta efetora antitumoral de linfócitos T auxiliares e citotóxicos (FARKAS; KEMÉNY, 2011).

Protocolos que utilizam o sangue periférico de pacientes, autores descreveram a geração de DCs imaturas diferenciadas em presença apenas de GM-CSF e da junção de GM-CSF e IL-4 (BARSOUM *et al.*, 2013). Estas citocinas foram colocadas em associação com os IFN- β e IFN- α . Além dessas citocinas, hormônios como a melatonina já foi utilizado na diferenciação de DCs (BARBUTO; GONZALEZ, 2007).

Referente a fase de maturação de DCs, uma vez que a diferenciação gera células imaturas, é necessária a utilização de moléculas estimuladoras, como citocinas (TNF- α e IFN- γ), agonistas de TLR, proteínas recombinantes (CD40L), antígenos tumorais (Ag células 4T1) ou coquetéis de maturação. Em estudos já feitos, pôde ser visto o amadurecimento de DCs com coquetéis preparados nas várias combinações (BARSOUM *et al.*, 2013).

Na literatura encontra-se descrito que diferentes estímulos de maturação para indução de células T específicas do tumor, mostrando que a combinação de IFN- γ e Lipopolissacarídeo (LPS) obteve uma resposta mais efetiva. Também foi observado que o disparo simultâneo de diferentes TLRs nas DCs é responsável por efeitos sinérgicos, resultando na "indução" de IL-12, inferindo que os agonistas de TLRs têm o potencial de induzir DCs ideais para estimular uma resposta imune eficaz (VOPENKOVA *et al.*, 2012).

1.4.CITOCINAS E QUIMIOCINAS IMPORTANTES NA MATURAÇÃO DE DCs

As DCs podem ser divididas em dois estados funcionais: maduras e imaturas. Ambas possuem especificidades, no qual as DCs imaturas (presentes nos tecidos não linfoides) possuem maior capacidade em capturar antígenos por endocitose intermediada por receptores como TLRs, lectina e receptores do complemento, mas com diminuída eficiência de estimulação de células T *naive*, baixa expressão superficial de moléculas coestimuladoras, de receptores de quimiocinas e baixa produção de citocinas imunoestimuladoras. Quando ocorre o desenvolvimento em DCs maduras por estímulos pró-inflamatórios, elas diminuem a capacidade de fagocitose, mas aumentam a expressão do receptor de quimiocinas (CCR7), como também a expressão de MHC de classe II e moléculas estimuladoras, como CD80 e CD86, resultando no aumento da função de apresentação de antígenos, como consequência do estímulo da proliferação de linfócitos T primários e estimulação de células B (ABBAS, PILLAI, LICHTMAN, 2015). A maturação das DCs é iniciada com o reconhecimento de mudanças da

homeostase tecidual na forma de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Diferentes estímulos associados a vírus, bactérias, e tecidos danificados podem induzir a ativação e maturação das DCs (VEGLIA; GABRILOVICH, 2017).

A identificação de patógenos ativa uma cascata de sinais responsáveis por mudanças metabólicas celulares e pela transcrição de genes, alterando o metabolismo celular e faz aumentar a motilidade para que seja possível a migração de DCs dos tecidos periféricos para os órgãos linfóides secundários, lugar em que pode ocorrer a apresentação de antígenos ativador dos linfócitos T (MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2010).

A maturação das DCs tem efeito positivo e já foi descrita em diversos estudos que citam várias quimiocinas e citocinas como importantes fatores de estimulação positiva para que as DCs possam exercer sua atividade com a melhor performance. A quimiocina fator plaquetário 4 (CXCL4) é um poderoso quimioatraente para monócitos e um importante regulador que demonstra aumentar a expressão de moléculas MHC, CD86 e CD83 em DCs derivadas de monócitos de doadores saudáveis, desencadeando uma apresentação mais eficiente de antígenos, ativação de células T auxiliares (CD4+) e células T (CD8+), e produção de IFN- γ (SILVA-CARDOSO *et al.*, 2017).

A IL-12, conhecida como uma citocina que induz proliferação, tem função de aumentar a secreção e atividade do IFN- γ pelas células *Natural Killer* (NK) e pelos linfócitos Th1, aumenta as respostas citotóxicas, passo importante para defesa contra tumores. As citocinas inflamatórias ajudam na maturação de DCs que aumentam sua produção de IL-12 e sua capacidade de iniciar células T específicas para antígenos *in vitro* (OLESZYCKA; LAVELLE, 2014).

1.5. IMUNOTERAPIA DE DCs CONTRA TUMORES

Na realização do combate da DCs em diversas neoplasias, a resposta imune antitumoral é executada em função da expressão de estruturas antigênicas existentes na superfície das células tumorais, situação essencial para ressaltar a importância das DCs que apresentam esses antígenos e fornecem sinais de diferenciação e proliferação para os linfócitos T, esses reconhecem uma célula tumoral pelos seus receptores de células T (TCR) resultando na ativação de células T CD4+ e CD8+ (TEIXEIRA *et al.*, 2019).

A imunoterapia contra o câncer baseada em DCs visa a ativação do sistema imunológico e em particular de linfócitos T citotóxicos (CTLs) específicos para tumores e células NK com a participação de IL-12, IL-15 e IFNs para que se tornem capazes de eliminar as células malignas. A eficácia na resposta antitumoral depende do papel crucial que as DCs desempenham na indução de respostas de células T. Ao interagir com as células T CD4+, as DCs podem induzir sua diferenciação em diferentes subconjuntos T auxiliares a partir de citocinas secretadas, como nos perfis Th1, Th2, Treg e Th17 (ANGUILLE *et al.*, 2014).

Os efeitos positivos antitumorais da imunoterapia de DCs podem ter sua eficiência reduzida por vários fatores, seja pela presença de células imaturas (baixa eficiência na apresentação de antígenos) nos locais onde se desenvolve a massa tumoral, diminuída contagem de DCs ou fraca capacidade de migração da mesma para o tumor. É observado pela plasticidade celular que o microambiente do tumor de mama é imunossupressor, DCs presentes induzem a um fenótipo de linfócito T regulatório (Treg) e diminuir sua funcionalidade. A maturação das DCs é de grande importância para permitir a identificação molecular específica de antígenos e induzir imunidade específica contra antígenos tumorais (CUNHA, 2014).

Estudo anterior desenvolvido por nosso grupo de pesquisa – Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON), como o intitulado “Profilaxia por vacina de células dendríticas: avaliação de aspectos da resposta imunológica em camundongos Balb/c com carcinoma de mama induzido por 4T1”, demonstram aumento da síntese de IL-12 e IFN- γ , além do aumento de expressão de interleucina 2 (IL-2) e TNF- α em linfócitos T CD4+ , e de IL-2 em células T CD8+ com imunoterapia utilizando DCs autólogas diferenciadas *in vitro* (VIEIRA *et al.*, 2021).

Também outro estudo do nosso grupo (PEIXOTO; MICHELIN, 2022) demonstraram que estudos indicam que o protocolo de estimulação com TNF- α , IL-12 e CCL5 é capaz de gerar um perfil de células dendríticas maduras e eficazes para ativação de subtipos balanceados de linfócitos T e células NK, importantes na resposta imune antitumoral.

1.6. MODELO EXPERIMENTAL DE CÉLULAS 4T1

As células 4T1 trata-se de uma linhagem celular altamente tumorigênica e invasiva, onde são observadas metástases em diversos órgãos, como pulmão, cérebro, fígado, ossos, baço e linfonodos. As células da linhagem 4T1 simulam em modelos experimentais a condição do câncer de mama triplo negativo humano (SOUZA, 2013).

O crescimento tumoral e a disseminação metastática de células 4T1 em camundongos *BALB/c* assemelha muito próximo ao câncer de mama humano. Este tumor é um modelo para câncer de mama humano estágio IV. Os tumores induzidos por 4T1 podem ser usados como um modelo pré e pós-operatório, bem como um modelo não cirúrgico, pois o tumor induzido por 4T1 metastatiza espontaneamente em ambos os modelos com cinética semelhante. A progressão da doença desse modelo animal é clinicamente semelhante ao câncer de mama maligno avançado em humanos e, como resultado disso, o modelo de metástase de câncer de mama 4T1 é amplamente utilizado em estudos pré-clínicos (PULASKI *et al.*, 2000).

O modelo murino *BALB/c* são isogênicos, semelhantes geneticamente, por isso carcinoma mamário murino 4T1 é um modelo experimental muito utilizado na avaliação e melhor compreensão da biologia dos tumores. Ela apresenta proliferação epitelial maligna em arranjo sólido, com proliferação de células pleomórficas e elevado índice mitótico (YANG *et al.*, 2020).

Pela capacidade metastática espontânea da linhagem de células 4T1, esta acaba atingindo locais como cérebro, ossos, fígado, pulmões e linfonodos, então faz-se necessário o preenchimento das lacunas que culminam no processo que desencadeia essa redução metastática (VIERA *et al.*, 2021).

1.7. LINFÓCITOS T $\gamma\delta$

A imunoterapia é uma das áreas atraídas no desenvolvimento de novas terapias antitumorais. As células T $\gamma\delta$ são um dos três tipos de células imunes que expressam receptores de antígenos. Esse mecanismo contribui para a vigilância antitumoral linfóide e preenchem a lacuna entre a imunidade inata e adaptativa (ZOU *et al.*, 2016).

As células T $\gamma\delta$ têm a capacidade de secretar abundantes citocinas como a Interleucina 17 (IL-17) e IFN- γ além de exercer potente citotoxicidade contra uma ampla variedade de células cancerígenas. Exibem papéis importantes na vigilância e na defesa imunológica contra tumores e tornaram-se células efetoras atraentes para a imunoterapia contra o câncer (ZOU *et al.*, 2016).

Este modelo de células T humanas tem uma diversidade de funções biológicas únicas. Com base em sua distribuição e capacidade de reconhecer antígenos, essa população celular é considerada uma “ponte” entre a imunidade inata e a adaptativa. Um crescente número de

estudos, estão demonstrando um efeito inibitório importante na ocorrência e desenvolvendo tumores, diminuindo significativamente o volume de células tumorais (LIU *et al.*, 2022).

As células T $\gamma\delta$ recentemente receberam atenção significativa após a descoberta de que produzem IL-17 em vários modelos de camundongos de infecção e doença autoimune. Em contraste, a secreção de grandes quantidades de IFN- γ por essa linhagem de células T é conhecida há muito tempo e tem sido ligada à sua função antitumoral (LIU *et al.*, 2022).

As respostas imunes aos tumores envolvem os linfócitos T, que são dotados de propriedades citotóxicas diretas contra células transformadas e, a capacidade de produzir mediadores antitumorais chave, como quimiocinas e citocinas. Estes incluem o IFN- γ , cujo exibe um importante papel na orquestração da resposta imune aos tumores. A mediação da regressão tumoral pelo IFN- γ foi atribuída ao aumento da expressão do MHC de classe I nas células tumorais (e, portanto, à promoção de reconhecer células T CD8+) e à indução de quimiocinas que regulam a infiltração de linfócitos no tumor e a inibição da angiogênese (SILVA, 2010).

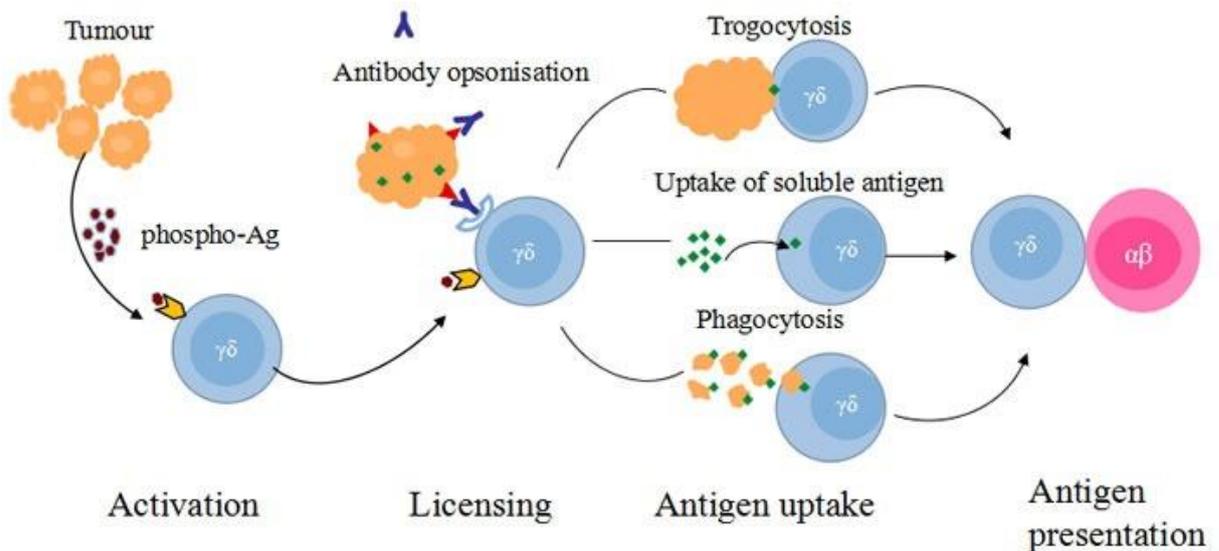
O papel preciso da IL-17 na imunidade tumoral permanece altamente controverso, uma vez que uma série de estudos sugeriram potentes funções antitumorais para subconjuntos de células T produtoras de IL-17. Por exemplo, o crescimento do tumor e a metástase pulmonar foram aumentados em camundongos deficientes em IL-17, e a transferência adotiva de células T CD4⁺ ou CD8⁺ produtoras de IL-17 levou à regressão do tumor em modelos experimentais (WAKITA *et al.*, 2010).

Embora tenha sido demonstrado que IL-17 e células $\alpha\beta$ Th17 se acumulam em vários tumores humanos, a relevância da produção de IL-17 por células T $\gamma\delta$ humanas permanece desconhecida. As razões para as graves discrepâncias entre os estudos que defendem as atividades antitumoral contra a pró-tumoral da IL-17 ainda não estão claras e merecem uma investigação mais aprofundada (ZOU *et al.*, 2016).

Em imunoterapia contra tumores, os linfócitos T $\gamma\delta$ têm um importante papel. A imunoterapia adotiva é realizada pela expansão das células imunes efectoras *in vitro* e pela transferência das células imunes ativadas para os hospedeiros, que visam contra as células tumorais ou estimulam a resposta imune para eliminar as células tumorais.

As células T $\gamma\delta$ têm vários papéis na resposta imunológica antitumoral. As funções são de toxicidade como também, de produção de citocinas e quimiocinas, tais como perforina-granzima. No local do tumor essas células têm a capacidade de absorver o antígeno diretamente por trogocitose, fagocitose e pinocitose e fazer a apresentação cruzada do antígeno exógeno as células T $\gamma\delta$ (Figura 1). Outro papel importante que as células T $\gamma\delta$ possuem, é a regulação das respostas imunes por meio da interação com outras células, como os linfócitos do tipo B que produzem anticorpos IgA, IgG e IgM, que desempenham uma função reguladora da imunidade humoral (ZOU *et al.*, 2016).

Figura 1 - Função de apresentação de antígenos de linfócitos T $\gamma\delta$



Fonte: ZOU *et al.*, 2016.

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Desenvolver novas formas, alternativas ou que somem aos tratamentos já estabelecidos, são de extrema importância para o processo de combate e controle das neoplasias. Nessa perspectiva, as vacinas com células dendríticas tem sido utilizada, em diferentes protocolos e formas de obtenção, para o tratamento do câncer em modelos experimentais, assim como em ensaios clínicos randomizados controlados.

O interesse surgiu da alta capacidade que essas células apresentam em estimular os linfócitos T, estabelecendo uma ponte entre os mecanismos imunes inatos e adaptativos. Os mecanismos antitumorais fornecidos pelos linfócitos T após o tratamento com DCs, tem demonstrado por meio dos estudos, ações importantes e pontuais no tumor alvo ou sítio metastático, regressão tumoral, assim como a produção de células de memória que geram a proteção nos casos de recidiva.

Os resultados clínicos da atuação do tratamento levam em consideração aspectos das condições dos protocolos de obtenção e cultivo das células dendríticas, como a escolha da subpopulação a ser utilizada, o estágio de maturação do preparo das células em meio de cultura, citocinas utilizadas, os meios de cultura, o processo de ativação dessas células, assim como a via de administração, a dose de administração. Desta forma, diferentes protocolos têm sido desenvolvidos na tentativa de otimizar e melhorar o processo de obtenção da vacina com células dendríticas (VIERA *et al.*, 2021).

Também podemos observar o papel das células T $\gamma\delta$, pois as mesmas têm a capacidade de secretar abundantes citocinas como a Interleucina 17 (IL-17) e IFN- γ e exercer uma função importante na imunoterapia contra tumores.

Dados preliminares *in vitro* do grupo IPON evidenciaram um maior desempenho das células dendríticas maturadas com uso de TNF- α , 4T1, IL-12 e RANTES, quando comparado às células dendríticas maturadas com TNF- α e 4T1.

Os resultados levantam à hipótese de que tais evidências também possam ser observadas *in vivo*, mais especificamente no perfil leucocitário do tumor primário, como a maior presença de células e citocinas do perfil Th1.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Comparar dois protocolos de diferenciação das células dendríticas no processo de ativação dos linfócitos T citotóxicos e linfócitos T $\gamma\delta$ em camundongos com tumor induzidos a câncer de mama.

3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em grupos experimentais de camundongos Balb/c tumor de mama induzidos pela linhagem 4T1 e submetidos a diferenciação por dois protocolos distintos, protocolo 1 (TNF- α) ou protocolo 2 (TNF- α , IL-12 e RANTES), no ambiente intratumoral e por citometria de fluxo:

- a) Quantificar a presença de linfócitos T citotóxicos (CD8+) produtores de IFN- γ ;
- b) Quantificar linfócitos T gama-delta produtores de IFN- γ e IL-17;
- c) Correlacionar os achados com o volume tumoral.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Registrado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 23085.005932/2022-75, 48 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, com idade entre 6 e 8 semanas, provenientes do Biotério Central da UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro; ficaram acomodados em gaiolas plásticas com dimensões de 305x198x133mm, com acesso livre a água e comida, e foram submetidos a ambiente sob ciclo claro-escuro, com temperatura controlada (22°C +/-2°C).

Os camundongos foram separados, conforme a **tabela 1**, em três grupos experimentais:

- 1- Grupo controle positivo (Tumor): 12 camundongos tumor induzidos e não tratados.
- 2- Grupo protocolo 1 (P1): 12 camundongos tumor induzidos e submetidos a terapia com células dendríticas regidas pelo protocolo 1 (diferenciação somente com TNF- α).
- 3- Grupo protocolo 2 (P2): 12 camundongos tumor induzidos e submetidos a terapia com células dendríticas regidas pelo protocolo 2 (diferenciação com TNF- α , IL-12 e RANTES).

Outros 12 camundongos foram doadores de medula óssea para confecção das vacinas (cada camundongo nos proporciona 4 aplicações vacinais).

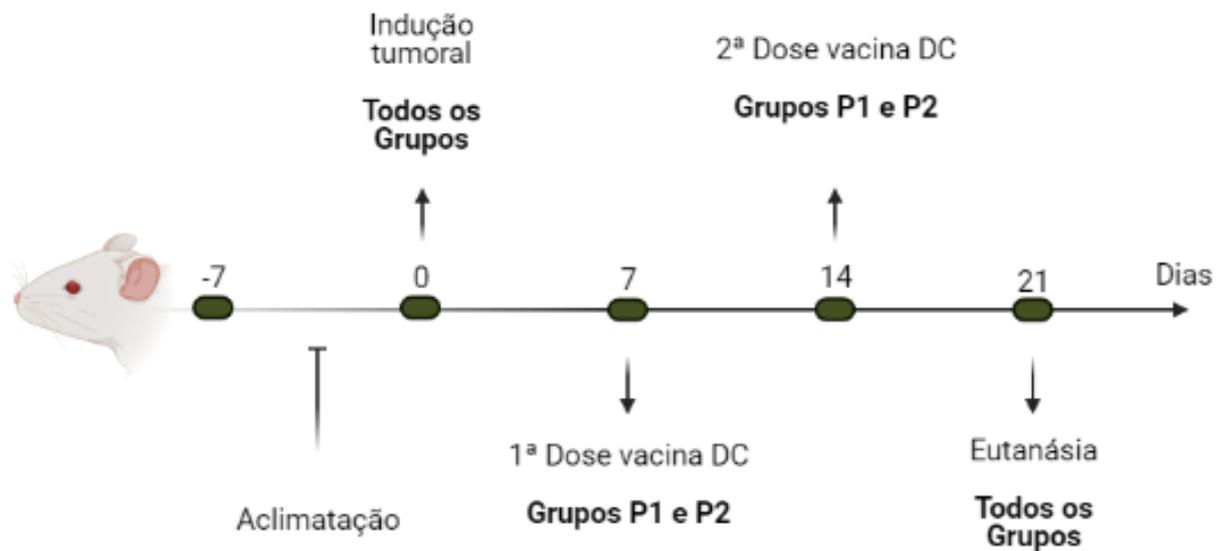
Após 21 dias de indução tumoral, os animais foram eutanasiados, e tiveram seus tumores (quando presentes) retirados, nos quais foram submetidos ao protocolo de citometria de fluxo.

Tabela 1 - Distribuição dos animais por grupo de estudo

Grupos	Inoculação 4T1	Tratamento com DCs	nº de animais
Tumor	Sim	Não	12
Protocolo 1 (P1)	Sim	Sim	12
Protocolo 2 (P2)	Sim	Sim	12

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

Figura 2 - Delineamento experimental



Fonte: Do Autor, 2023.

Nota: Esquema representativo do período de realização experimental.

O volume tumoral foi mensurado com auxílio de um paquímetro, a cada dois ou três dias e foi determinado pela fórmula $[\text{maior diâmetro} \times (\text{menor diâmetro})^2] \times 0,5$ (ROLAND, *et al.*, 2009), onde foram feitas as medidas látero-lateral e crânio-caudal do tumor. O delineamento experimental está representado na **figura 2**.

4.2. OBTENÇÃO E MATURAÇÃO DAS DCs

Foram utilizados 6 camundongos fêmeas *BALB/c*, do grupo destinado à confecção de vacinas, para cada etapa. As vacinas de cada etapa foram confeccionadas a partir de células da medula óssea de fêmures e tíbias, no que chamaremos de dia 0. As medulas dos fêmures e das tíbias foram retiradas com auxílio de solução fisiológica 0,9% e uma seringa 13,4 x 5 mm. As células medulares (pluripotentes) foram, então, cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm², estas divididas em protocolo 1 e protocolo 2, em meio IMDM suplementado com 0,1 mM de vitaminas, 2 mM de l-glutamina, 100 µg/mL de gentamicina, 1 mM de Piruvato de Sódio (C3H3NaO3) e 5% SBF, incubadas em estufa de CO₂ a 5% de umidade e a 37°C. Após 24h, no dia 1, as células foram estimuladas para diferenciação nas garrafas de cultura de ambos os protocolos, com 10 ng/µL de GM-CSF e 10 ng/µL de IL-4. Neste mesmo dia, dia 1, também foi feita a indução tumoral dos camundongos do grupo tumor, P1 e P2, por aplicação de $2,0 \times 10^5$ células 4T1 em 50µl de solução fisiológica 0,9%, na glândula mamária abdominal direita.

No dia 5, as células das garrafas de cultura foram novamente estimuladas, a fim de potencializá-las, com 10 ng/ μ L de TNF- α , no caso das células do protocolo 1, e 10 ng/ μ L de TNF- α , IL-12 e RANTES, no caso das células do protocolo 2. Após dois dias da diferenciação com estes dois protocolos, foi adicionado antígeno tumoral de 4T1 as culturas para ativação específicas destes tipos celulares.

O protocolo de tratamento foi realizado com duas doses de células dendríticas, aplicadas nos dias 7 e 14 após a indução tumoral, por via subcutânea, com 5×10^6 células homogeneizadas em 50 μ l soro fisiológico 0,9%.

4.3.CITOMETRIA DE FLUXO

As amostras de tumor dos grupos experimentais foram analisadas por citometria de fluxo em citômetro *FACS Calibur™* (BD, Biosciences, San Diego, CA, EUA). A técnica foi executada de acordo com recomendações do fabricante, fazendo uso de anticorpos *BD Pharmigen™* para marcações extracelulares, CD8 APC e TCR $\gamma\delta$ PE, e marcações intracelulares IFN- γ FITC e IL-17 PercP-Cy5.5.

As células leucocitárias intratumorais foram obtidas por centrifugação após uso de solução de lise (*FACS Lysing Solution, BD Biosciences*), na proporção de 1:20mL e incubação por 20 minutos a temperatura ambiente. Foram então lavadas por 3x em solução salina tamponada com fosfato (PBS), sendo que entre cada lavagem, era realizada centrifugação a 290c, 10 minutos, 4°C, conservando sempre o precipitado celular ao término de cada lavagem. A esse precipitado celular foi acrescido 2,5mL de proteína transportadora inibitória (*BD Golgistop™*), seguindo de incubação a 4°C, 20 minutos. Posteriormente, as células foram submetidas a mais uma lavagem com PBS, sob mesmas especificações descritas logo acima, ficando o precipitado celular ressuspensão em 1mL de PBS. As células foram então distribuídas, após contagem em câmara de Neubauer, em 1×10^6 células por tubo e foram realizadas as marcações extracelulares com os anticorpos, seguindo de incubação a 4°C, 30 minutos, na ausência de luz. Em seguida, as células foram lavadas 2x com PBS, e incubadas com solução permeabilizadora e fixadora (*BD Cytofix/Cytoperm™*), por 20 minutos, 4°C, ao abrigo de luz. Então as células foram lavadas 2x com solução tampão de *BD Perm/Wash™* Buffer e marcadas intracelularmente com os anticorpos, seguindo com incubação por 4°C, 30 minutos, ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram novamente lavadas mais 2x com a solução tampão, ficando as células ressuspensas em 50 μ L de PBS para leitura no citômetro.

Para a análise, os linfócitos foram inicialmente selecionados com base no tamanho e granularidade, pelos padrões *FSC x SSC*. Em seguida, sobre a população de linfócitos T CD8+ com IFN- γ e Linfócitos T $\gamma\delta$ TCR com IFN- γ e IL-17, foi feita a análise por % de gate.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados quanto a distribuição pelo teste *Shapiro-Wilk*. Para as distribuições paramétricas das variáveis, foi utilizado teste *One-way Anova* com pós-teste de Tukey para comparações entre mais de 2 grupos/variáveis. Os resultados com valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. A correlação do volume tumoral com as células produtoras de citocinas, foi utilizado o teste de *Pearson*. Para a análise de tais dados foi utilizado o *Software GraphPad Prism 8.0*.

5. RESULTADOS

Todos os animais do estudo tiveram os volumes tumorais mensurados a cada dois dias a partir do sétimo dia após a injeção com células tumorais até o momento da eutanásia. Na **figura 3** é possível visualizar a representação gráfica do volume tumoral. Onde observa-se maior crescimento do volume tumoral no grupo de animais tumor induzidos sem tratamento. O grupo de animais que foram tratados com o protocolo 2 demonstrou um menor crescimento do volume tumoral em relação ao grupo protocolo 1.

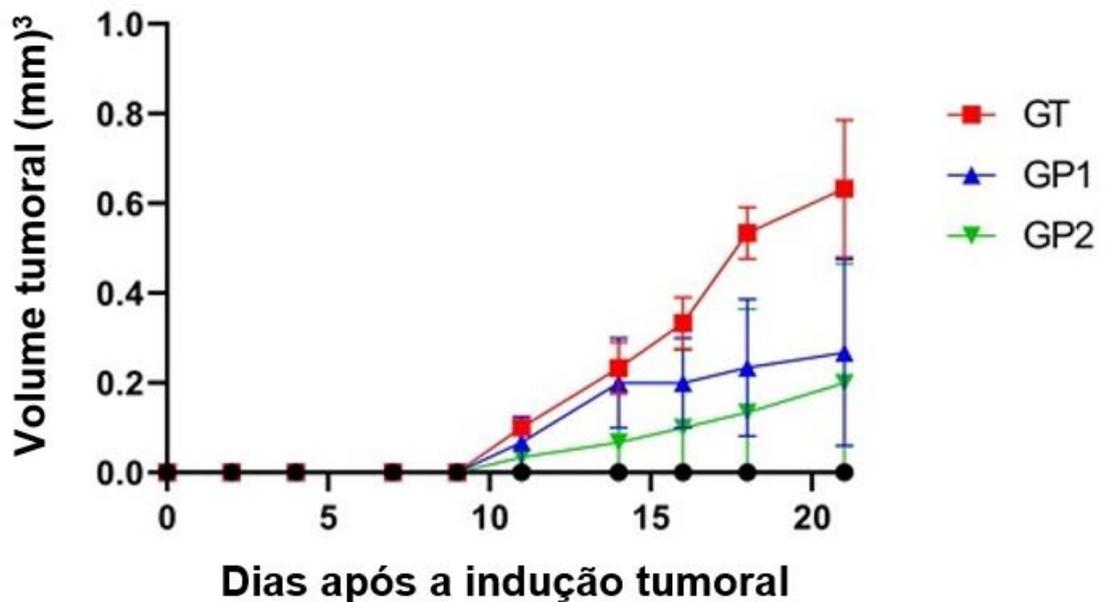


Figura 3 - Volume tumoral

Fonte: Do Autor, 2023.

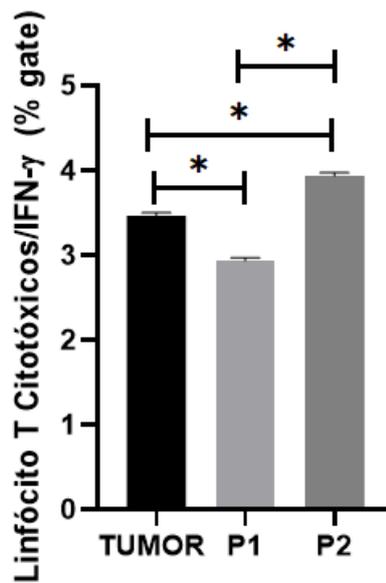
Nota: A medição tumoral iniciou-se 7 dias após a indução e terminou no último dia do experimento. Sendo o grupo Tumor – animais com tumores sem tratamento, P1 – animais com tumores e com tratamento pelo protocolo 1 e, P2 – animais com tumores tratados pelo protocolo 2.

5.1. QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS T CITOTÓXICAS (CD8+) PRODUTORAS DE IFN- γ

Visando comparar a expressão de linfócitos T CD8+ nos tumores dos camundongos submetidos à imunoterapia com células dendríticas maturadas com TNF- α (Protocolo 1 - P1) e camundongos submetidos à imunoterapia com células dendríticas maturadas com TNF- α , IL-12 e RANTES (Protocolo 2 - P2), foi realizada por citometria de fluxo a quantificação da presença de linfócitos T citotóxico produtores de IFN- γ .

Foi observado um aumento significativo de linfócitos T CD8+ IFN- γ no protocolo 2, em relação ao protocolo 1 e ao controle positivo, com um $p < 0,0001$ (**figura 4**). E também foi observado um valor maior de linfócitos T CD8+ IFN- γ do grupo tumor em relação ao protocolo 1.

Figura 4 - Linfócitos T Citotóxicos CD8+ produtores de IFN- γ

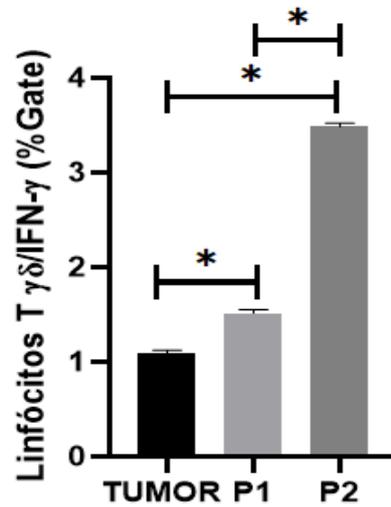


Fonte: Do Autor, 2023.

Nota: Avaliação da presença de linfócitos T citotóxicos produtores de IFN- γ nos grupos experimentais analisados. Todas as análises demonstraram ser significativas com $p = 0,0001^*$. Teste utilizado *One-way Anova*.

5.2. QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T $\gamma\delta$ PRODUTORES DE IFN- γ

Foi observado um aumento significativo de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IFN- γ no protocolo 2, em relação ao protocolo 1 e ao controle positivo com um $p < 0,0001$ (**figura 5**).

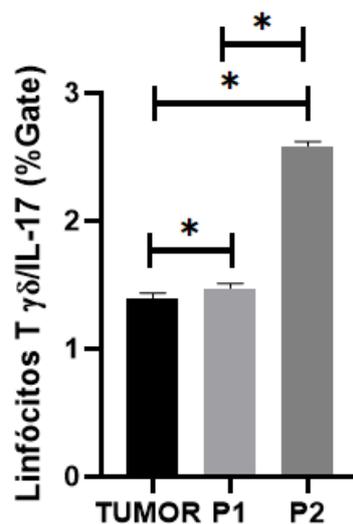
Figura 5 - Linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IFN- γ 

Fonte: Do Autor, 2023.

Nota: Avaliação da presença de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IFN- γ nos grupos experimentais analisados. Todas as análises demonstraram ser significativas com $p = 0,0001^*$. Teste utilizado *One-way Anova*.

5.3. QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T $\gamma\delta$ PRODUTORES DE IL-17

Foi observado um aumento significativo de células T $\gamma\delta$ e produtores de IL-17 no protocolo 2, em relação ao protocolo 1 e ao controle positivo, com um $p < 0,0001$ (**figura 6**). Também observamos o protocolo 1 maior que o grupo tumor.

Figura 6 - Linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17

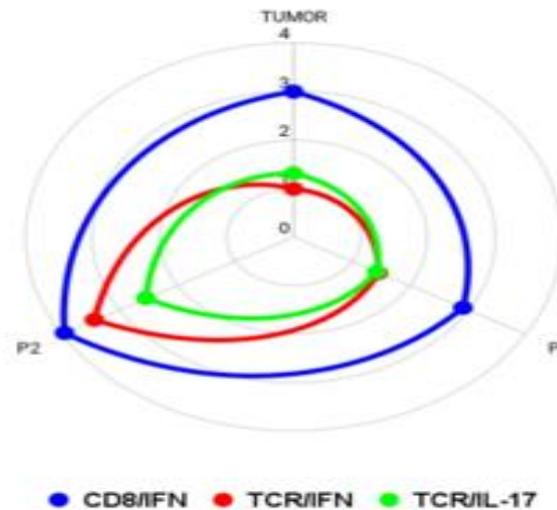
Fonte: Do Autor, 2023.

Nota: Avaliação dos subtipos celulares receptores de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 nos grupos. No gráfico observa-se um aumento da produção dos receptores de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 no protocolo 2. Todas as análises demonstraram ser significativas com $p=0,0001^*$. Teste utilizado *One-way Anova*.

5.4. PRODUÇÃO DE CITOCINAS

O gráfico da **figura 7** demonstra a tendência da maior expressão dos subtipos celulares no protocolo 2 em relação ao protocolo 1 e o grupo tumor.

Figura 7 - Comparação dos níveis de produção de citocinas.



Fonte: Do Autor, 2023.

Nota: Ilustração da produção de citocina pelos tipos de linfócitos T $\gamma\delta$ e $\alpha\beta$. Em azul representando a produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD8+ (CD8/IFN), em vermelho linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IFN- γ (TCR/IFN) e em verde linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 (TCR/IL-17).

5.5. CORRELAÇÃO DO VOLUME TUMORAL E LINFÓCITOS T CD8+ PRODUTORES DE IFN- γ

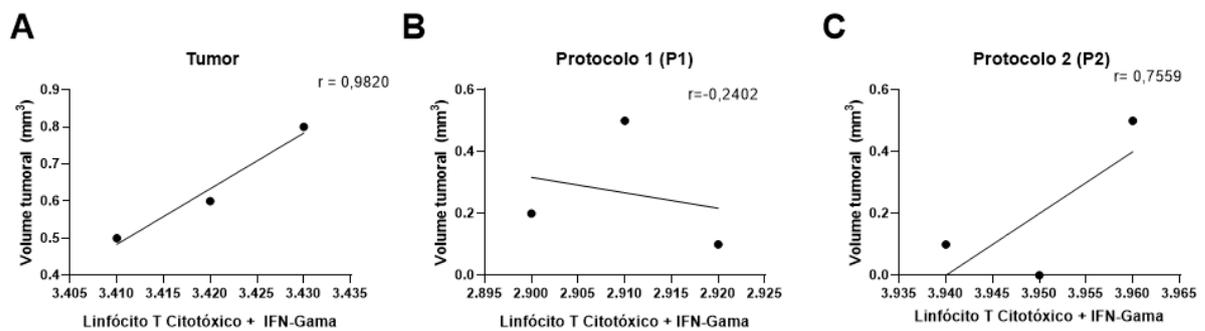
Podemos observar a correlação do volume tumoral com a produção de Interferon gama (IFN- γ) nos três grupos experimentais: Tumor (controle), Protocolo 1 (P1) e Protocolo 2 (P2).

Observamos no gráfico A da **figura 8** a correlação entre o volume tumoral e linfócitos T CD8+ produtoras de IFN- γ grupo Tumor, sendo a correlação positiva ($r=0,9820$), considerada uma correlação muito forte, indicando que com o aumento do volume tumoral aumenta a expressão de linfócitos T citotóxicos produtores de IFN- γ .

Já no gráfico B da **figura 8** é observado a correlação no grupo protocolo 1 (P1), demonstrando a existência de uma correlação negativa ($r = -0,2402$), sendo considerado uma correlação negativa fraca, onde significa que o aumento da expressão de linfócitos T citotóxicos produtores de IFN- γ , indicando a diminuição do volume tumoral.

No gráfico C da **figura 8** observamos o grupo protocolo 2 (P2), no qual existe uma correlação positiva ($r = 0,7559$), que pelo valor é considerada forte, indicando que com o aumento do volume tumoral, ocorre o aumento da expressão de linfócitos T citotóxicos produtores de IFN- γ , como uma forma de tentar combater as células tumorais e diminuir o volume das células tumorais.

Figura 8 - Volume tumoral X Linfócitos T CD8+ produtores de IFN- γ



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

Nota: Gráficos que demonstram as correlações do volume tumoral (mm^3) em relação a expressão de linfócitos T citotóxicos produtores de IFN-Gama. No gráfico A demonstra a correlação positiva muito forte ($r=0,9820$) no grupo Tumor. O gráfico B evidenciou uma correlação negativa fraca ($r=-0,2402$) no grupo protocolo 1. Já no gráfico C observamos uma correlação positiva forte ($r=0,7559$) no grupo protocolo 2. Foi utilizado teste de *Pearson*.

5.6. CORRELAÇÃO DO VOLUME TUMORAL E LINFÓCITOS T $\gamma\delta$ PRODUTORES DE IFN- γ

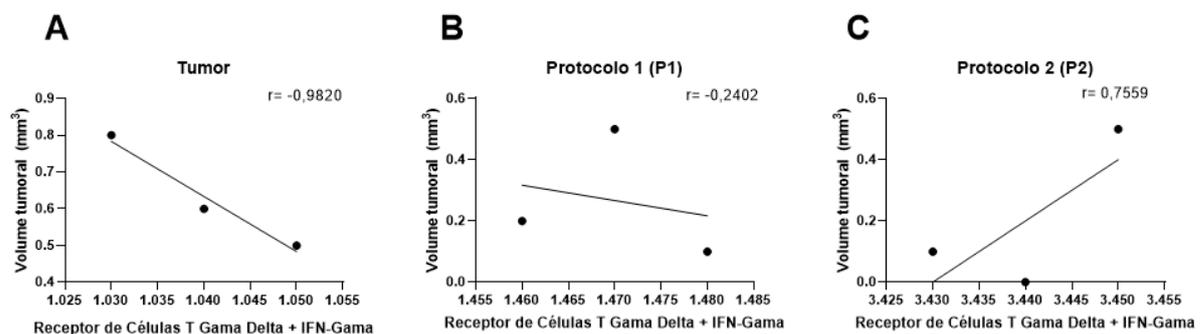
Podemos observar a correlação do volume tumoral com linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de Interferon gama (IFN- γ) nos três grupos experimentais: Tumor (controle), Protocolo 1 (P1) e Protocolo 2 (P2).

No gráfico A da **figura 9**, observamos no grupo Tumor uma correlação muito forte negativa ($r=-0,9820$), onde ocorre o aumento da expressão de IFN- γ em linfócitos T $\gamma\delta$ de acordo com a diminuição do tamanho do volume tumoral.

Podemos observar no grupo do protocolo 1, ilustrado no gráfico B da **figura 9**, uma correlação fraca negativa ($r=-0,2402$), indicando que à medida que o tumor diminui, ocorre o aumento da expressão de IFN- γ em linfócitos T $\gamma\delta$.

Observamos no gráfico C da **figura 9**, o grupo protocolo 2, onde temos uma correlação positiva forte ($r=0,7559$), onde ocorre um aumento da produção de IFN- γ em linfócitos T $\gamma\delta$ de acordo com o aumento do volume tumoral, essa maior positividade de células e com o objetivo de combate as células tumorais.

Figura 9 – Volume tumoral x Linfócito T $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

Nota: Gráficos que demonstram as correlações do volume tumoral (mm^3) em relação a expressão de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IFN-Gama. No gráfico A demonstra uma correlação negativa muito forte ($r=-0,9820$) no grupo Tumor. O gráfico B evidenciou uma correlação negativa fraca ($r=-0,2402$) no grupo protocolo 1. Já no gráfico C observamos uma correlação positiva forte ($r=0,7559$) no grupo protocolo 2. Foi utilizado teste de *Pearson*.

5.7. CORRELAÇÃO DO VOLUME TUMORAL E LINFÓCITOS T $\gamma\delta$ PRODUTORAS DE IL-17

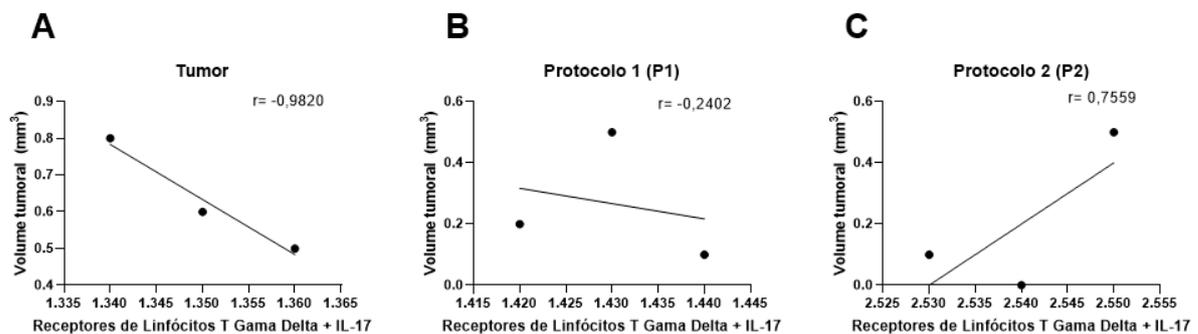
Podemos observar a correlação do volume tumoral com linfócitos T $\gamma\delta$ produtores da Interleucina 17 (IL-17) nos três grupos experimentais: Tumor (controle), Protocolo 1 (P1) e Protocolo 2 (P2).

No gráfico A da **figura 10**, observamos no grupo Tumor uma correlação negativa muito forte ($r = -0,9820$), onde ocorre um aumento da expressão de IL-17 em linfócitos T $\gamma\delta$ de acordo com a diminuição do volume tumoral.

Podemos observar no grupo do protocolo 1, ilustrado no gráfico B da **figura 10**, uma correlação negativa fraca ($r = -0,2402$), demonstrando que com a diminuição do tamanho do tumor, ocorre um aumento da expressão de IL-17 em linfócitos T $\gamma\delta$.

Observamos no gráfico C da **figura 10**, o grupo protocolo 2, onde temos uma correlação positiva forte ($r = 0,7559$), onde ocorre um aumento da produção de IL-17 em linfócitos T $\gamma\delta$ de acordo com o aumento do volume tumoral.

Figura 10 - Volume tumoral x Linfócitos T $\gamma\delta$ produtoras da IL-17



Fonte: Elaborado pelo Autor, 2023.

Nota. Gráficos que demonstram as correlações do volume tumoral (mm^3) com linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17. No gráfico A demonstra a correlação negativa muito forte ($r = -0,9820$) no grupo Tumor. O gráfico B evidenciou uma correlação negativa fraca ($r = -0,2402$) no grupo protocolo 1. Já no gráfico C observamos uma correlação positiva forte ($r = 0,7559$) no grupo protocolo 2. Foi utilizado teste de *Pearson*.

6. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram uma validação de nossa hipótese, pois obtivemos resultados interessantes do grupo protocolo 2 em comparação aos grupos experimentais.

Na última década, diferentes estratégias, tem sido avaliadas em modelos pré-clínicos de animais para o tratamento do câncer. Em uma dessas perspectivas, as vacinas celulares com células dendríticas são avaliadas em diferentes contextos, levando em consideração suas propriedades especiais de coordenação das respostas imunes.

Em convergência a esses estudos, a identificação de protocolos que resultem em uma resposta imune potente, robusta e duradoura que promova a regressão e/ou erradicação de tumores, tem sido foco desses diferentes estudos. Portanto, compreender os mecanismos imunes no microambiente tumoral dessas diferentes estratégias, claro, associado aos estudos de mecanismos, biologia, função e metabolismo das DCs, ajudar-nos-ia a explorar melhor esta ferramenta, apoiando a ideia da sua utilização da interrupção/controlado do desenvolvimento tumoral, por meio da articulação de mecanismos imunes.

As células dendríticas (DCs) são reguladores centrais da resposta imune adaptativa e, como tal, são necessárias para a imunidade ao câncer mediada por células T. Em particular, as respostas antitumorais dependem de um subconjunto especializado de DCs convencionais que transportam antígenos tumorais para a drenagem dos gânglios linfáticos e apresentam antígenos cruzados para ativar linfócitos T citotóxicos. A maturação das DC é necessária para fornecer sinais coestimulatórios às células T, mas embora a maturação das DC ocorra dentro dos tumores, é muitas vezes insuficiente para induzir uma imunidade potente, particularmente à luz dos mecanismos supressivos dentro dos tumores. A imunoterapia de DCs vem sendo muito testada com protocolos diferentes para se alcançar uma forma mais eficiente e eficaz para o tratamento de tumores, o direcionamento terapêutico das DCs continua a ter potencial de tradução em abordagens combinatórias (GARDNER; RUFFELL, 2016).

Desta forma, o presente estudo, avaliou a influência de um protocolo alternativo de maturação de células dendríticas no microambiente tumoral, sob os aspectos de volume tumoral e os tipos celulares como os linfócitos T citotóxicos que produzem interferon-gama e também as células T $\gamma\delta$ que expressam interferon-gama e IL-17. O protocolo alternativo (P2) se diferencia do protocolo tradicional (P1) em relação a maturação das DCs, no caso com uso de IL-12 e RANTES.

Em nosso estudo, o grupo experimental tratado com o protocolo 2 teve uma maior expressão de linfócitos T citotóxicos produtores de IFN- γ se comparados ao grupo tumor e ao grupo tratado com o protocolo 1. Isso demonstra que há produção de uma maior quantidade de IFN- γ . O IFN- γ apoia os linfócitos T citotóxicos, estimulando a maturação das células dendríticas e aumentando a sua capacidade de processar e apresentar antígenos. Essa citocina é de grande importância no combate antitumoral (MIAR *et al.*, 2020).

Segundo o trabalho de VIEIRA *et al.*, (2021), nas células cancerígenas, o IFN- γ precisa ser ativado, pois há a necessidade de recrutar células dendríticas para o combate aos tumores e desencadear respostas antitumorais de células T em combinação com o bloqueio do ponto de controle imunológico. Essa citocina foi produzida em maior quantidade no grupo do protocolo 2, como uma forma de tentar fazer a defesa antitumoral, isso pode indicar um dos motivos do volume tumoral do grupo protocolo 2 ser menor em relação aos outros grupos.

Nossos resultados demonstraram que o grupo tumor apresentou uma maior positividade de linfócitos T citotóxicos em relação ao grupo protocolo 1. Isso nos faz pensar que não seria os linfócitos T citotóxicos que fazem o volume tumoral diminuir.

Destacamos também na imunoterapia contra o câncer as células T $\gamma\delta$ que expressam receptores de antígenos e contribuem para a vigilância antitumoral linfóide e preenchem a lacuna entre a imunidade inata e a adaptativa. As células T $\gamma\delta$ têm a capacidade de secretar citocinas abundantes e exercer potente citotoxicidade contra uma ampla gama de células cancerígenas e exibem papéis importantes na vigilância imunológica e na defesa imunológica contra tumores e tornaram-se células efetoras atraentes para a imunoterapia contra o câncer. Recentemente, as células T $\gamma\delta$ estão entrando em ensaios clínicos e demonstraram que a imunoterapia baseada em células T $\gamma\delta$ é bem tolerada e eficiente.

No nosso estudo também foi observado um aumento significativo de receptores de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IFN- γ no protocolo 2, em relação ao grupo do protocolo 1 e ao grupo do controle positivo (Tumor). Esse resultado pode se inferir na corroboração juntamente com a produção de IFN- γ pelo linfócito T citotóxico da diminuição do volume tumoral dos animais do grupo protocolo 2 em comparação aos outros grupos.

A principal citocina produzida pelas células T $\gamma\delta$ é o IFN- γ , que é uma citocina central nas respostas imunes antitumorais. O IFN- γ desempenha um papel importante na imunidade antiviral, antibacteriana e antitumoral. As células T $\gamma\delta$ conferem resistência a regimes

particulares de carcinogênese química e a certos tumores que surgem espontaneamente em camundongos transgênicos (VANTOUROUT; HAYDAY, 2013).

Em nossos resultados também encontramos o aumento da expressão de IL-17 por linfócitos T $\gamma\delta$ no grupo de animais do protocolo 2 se comparado aos outros animais dos grupos Tumor e do protocolo 1. A maior produção de IL-17 no grupo protocolo 2, pode também ajudar a explicar a diminuição do volume tumoral neste grupo testado quando comparado aos outros grupos.

Segundo o estudo de CORPUZ *et al.*, (2016), as células T $\gamma\delta$ respondem a moléculas reguladas positivamente após infecção ou estresse celular usando moléculas de TCR e não-TCR. A importância dos sinais inatos *versus* a ligação do TCR varia muito. Tanto os subconjuntos de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 como os subconjuntos de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IFN- γ ajustam a sensibilidade de seu TCR após o desenvolvimento do timo, permitindo respostas robustas a citocinas inflamatórias na periferia. As células T $\gamma\delta$ convencionais restantes mantêm alta capacidade de resposta do TCR.

No trabalho de LOPES; SANTOS (2021), é relatado que os linfócitos T $\gamma\delta$ podem exibir uma infinidade de funções imunológicas, em múltiplos modelos de doenças, como fontes de citocinas pró-inflamatórias, IL-17A (IL-17) e IFN- γ . Estes são produzidos por subconjuntos distintos de células T $\gamma\delta$ efectoras murinas que divergem durante o desenvolvimento de células T $\gamma\delta$ tímicas. Entre as múltiplas funções que esses subconjuntos desempenham nos tecidos periféricos, uma divisão marcante emergiu no ambiente intra-tumoral: enquanto os linfócitos T $\gamma\delta$ que expressam IFN- γ inibem o crescimento das células tumorais, os linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IL-17 promovem a progressão do tumor e a formação de metástases, isso gera um conflito entre a produção das duas citocinas no combate as células tumorais. Os estudos quando envolvem essas citocinas visam a compreensão de como as fontes e vias metabólicas podem impactar o equilíbrio da quantidade entre os linfócitos T $\gamma\delta$ que expressam IFN- γ e linfócitos T $\gamma\delta$ que expressam IL-17 no microambiente tumoral, o balanço dessas citocinas vão levar o sucesso do combate das células tumorais, o que abre um novo caminho interessante para explorar em direção à aplicação de células T $\gamma\delta$ na imunoterapia contra o câncer.

Em relação a correlação do volume tumoral com linfócitos T citotóxicos que produzem IFN- γ mostra uma correlação positiva forte no grupo do protocolo 2, ou seja, conforme o volume do tumor vai aumentando, a produção IFN- γ também aumenta com o objetivo dessa citocina combater as células tumorais. Já no grupo protocolo 1 foi demonstrada uma correlação

negativa, conforme o volume tumoral diminui a produção de IFN- γ é aumentada nesse grupo. Isso demonstra uma maior eficiência do protocolo 2 em produzir a citocina IFN- γ e conseqüentemente o combate tumoral.

De acordo com o artigo de BERGAMASCHI *et al.*, (2020), os linfócitos T citotóxicos positivos intratumorais apresentaram características de ativação com maior produção de IFN- γ , e essa citocina por sua vez ajuda no combate do crescimento e erradicação das células tumorais.

Em nosso estudo também encontramos uma correlação do volume tumoral em relação a produção IFN- γ por linfócitos T $\gamma\delta$. Encontramos uma correlação positiva no grupo do protocolo 2, ou seja, a produção da citocina IFN- γ por linfócitos T $\gamma\delta$ aumenta à medida que o volume tumoral aumenta. Nos grupos de animais tumor e protocolo 1 encontramos uma correlação negativa, conforme o tumor diminui seu volume a produção IFN- γ por linfócitos T $\gamma\delta$ por esses grupos aumentam.

É demonstrado no trabalho de CHEN *et al.*, (2019), múltiplas citocinas encontradas em microambiente tumoral imunorreativo, sendo uma das principais o IFN- γ , que podem induzir a expressão de mecanismos para o combate a células tumorais. Podemos inferir no nosso trabalho que o aumento do volume tumoral, faz com que a citocina IFN- γ produzida pelos linfócitos T $\gamma\delta$ aumente também sua expressão com objetivo de combater as células neoplásicas no microambiente tumoral.

Outra correlação que realizamos, foi do volume tumoral em relação a produção de IL-17 por linfócitos T $\gamma\delta$. Vimos que no grupo do protocolo 2 temos uma correlação positiva, ou seja, conforme o tamanho do volume aumenta, também aumenta a produção de IL-17. Já nos grupos tumor e protocolo 1 temos uma correlação negativa, conforme o volume tumoral se diminui seu tamanho temos o aumento da expressão de linfócitos T $\gamma\delta$ que produzem IL-17.

A produção de IL-17 por certos subconjuntos de linfócitos T $\gamma\delta$ recruta células imunossupressoras, como células supressoras derivadas de mieloides ou pequenos macrófagos peritoneais, que podem promover angiogênese, crescimento de células tumorais e diferenciação de células T regulatórias. A IL-17 produzida por linfócitos T $\gamma\delta$ pode ter comportamentos distintos em diferentes tipos de câncer, como promover o aumento tumoral no caso de um câncer gástrico ou de imunossupressor de células cancerosas, apresentando um bom prognóstico em câncer de mama (LIU *et al.*, 2022).

Em contrapartida o trabalho de COFFET *et al.*, (2015), demonstrou mecanicamente que a interleucina IL-1 β provoca a expressão de IL-17 em células T $\gamma\delta$, resultando em alterações sistêmicas, expansão e polarização dependente do fator estimulador de colônias de granulócitos de neutrófilos em camundongos portadores de tumores mamários. Foi demonstrado neste trabalho que a presença da expressão de IL-17 em células T $\gamma\delta$ no microambiente tumoral maximizam sua chance de metástase, evocando uma cascata inflamatória sistêmica em modelos de camundongos com metástase espontânea de câncer de mama.

Em nosso trabalho podemos inferir que o protocolo 2 é mais eficiente se comparado ao protocolo 1 e ao grupo tumor em relação a produção de IFN- γ por linfócitos T citotóxicos e linfócitos T $\gamma\delta$. A diferença entre maior eficiência do protocolo 2 em relação ao protocolo1, pode ser explicada pelo uso da citocina RANTES no processo de maturação da imunoterapia com células dendríticas.

Segundo o trabalho de WERTEL (2011), os níveis de RANTES foram correlacionados com células dendríticas mieloides e linfóides. A concentração de RANTES no plasma foram elevadas nos pacientes com câncer de ovário maligno quando comparados aos pacientes com tumor benigno. Onde foi concluído que a concentração de RANTES é diferente de acordo com o tipo de malignidade das células, e essa citocina pode aumentar em caso de células malignas.

Nosso trabalho demonstrou que o protocolo 2 se mostrou mais eficiente em relação ao protocolo 1. Pois os animais do grupo tratado com DCs maturadas com o protocolo 2 apresentaram maior quantidade de linfócitos T citotóxicos produtores de IFN- γ e também uma maior quantidade de linfócitos T $\gamma\delta$ produtores de IFN- γ e IL-17. Podemos inferir que os animais tratados com o protocolo 2 tiveram uma melhor resposta ao tratamento antitumoral, pois esses animais tiveram uma redução do volume tumoral se comparado ao grupo tumor e protocolo1. Sugerimos mais estudos para endossar ou refutar nossos resultados. E também precisamos de mais estudos para entender a relação do IL-17 no combate antitumoral, para entender seu benefício ou malefício.

7. CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que os animais tratados com células dendríticas maturadas com o protocolo 2 tem um maior número de linfócitos T citotóxicos produtores de IFN- γ , se comparado aos animais do grupo tumor e protocolo 1.

Se comparamos os animais do grupo tumor, protocolo 1 e protocolo 2, também foi demonstrado que no protocolo 2 temos um maior número de linfócitos T $\gamma\delta$ expressando IFN- γ e IL-17.

Quando correlacionamos o volume tumoral com a produção de citocinas, houve correlação positiva, demonstrando que o grupo protocolo 2 por ter maior expressão IFN- γ e IL-17, ou seja, melhora o combate antitumoral.

Concluimos que o protocolo 2 onde usamos TNF- α , IL-12 e RANTES para diferenciação e maturação das DCs é mais eficaz em relação ao protocolo 1. Com isso temos uma nova alternativa para ser estudada e possivelmente aplicada em tratamentos oncológicos para nossa sociedade.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8^a.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015
- ANGUILLE, S.; SMITS, E. L.; LION, E.; VAN TENDELOO, V. F.; BERNEMAN, Z. N. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. **The lancet oncology**, v. 15, n. 7, p. e257-e267, 2014.
- BARBUTO, J.A.M.; GONZALEZ, R.P. Process for obtaining dendritic cell vaccine and immunomodulator or product employing these dendritic cells. PI0504559-2A, 2007.
- BARSOUM, A.L.; ROHRER, S.; SEGERS, C.C.; COGGIN, J.R. JOSEPH, H. Vaccines with oncofetal antigen/iLRP-loaded autologous dendritic cells and uses thereof. **U.S. Patent Application** No 13/383,103, 2013.
- BATISTA, D. R. R.; MATTOS, M. D.; SILVA, S. F. D. Convivendo com o câncer: do diagnóstico ao tratamento. **Revista de Enfermagem da UFSM**, v. 5, n. 3, p. 499–510, 1 out. 2015.
- BERGAMASCHI, C.; PANDIT, H.; NAGY, B. A.; STELLAS, D.; JENSEN, S. M.; BEAR, J.; CAM, M.; VALENTIN, A.; FOX, B. A.; FELBER, B. K.; PAVLAKIS, G. N. Heterodimeric IL-15 Delays Tumor Growth and Promotes Intratumoral CTL and Dendritic Cell Accumulation by a Cytokine Network Involving XCL1, IFN- γ , CXCL9 and CXCL10. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 8, n. 1, p. e000599, maio 2020.
- BCRJ - BANCO DE CÉLULAS DO RIO DE JANEIRO. Disponível em: <https://bcry.org.br/celula/4t1/>, 2023.
- CHEN, S.; CRABILL, G. A.; PRITCHARD, T. S.; MCMILLER, T. L.; WEI, P.; PARDOLL, D. M.; PAN, F.; TOPALIAN, S. L. Mechanisms Regulating PD-L1 Expression on Tumor and Immune Cells. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer**, v. 7, n. 1, p. 305, dez. 2019.
- CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. B.; SFORCIN, J. M. Células dendríticas: mini-revisão Dendritic cells: a short review. v. 16, n. 1, 2014.
- CORPUZ, M.; STOLP J.; KIM H.O.; *et al.* Differential Responsiveness of Innate-like IL-17- and IFN- γ -Producing $\gamma\delta$ T Cells to Homeostatic Cytokines. **Journal of immunology**. v. 196, n. 2, p. 645-654, 2016.
- CUNHA, A. D. Pattern Response of Dendritic Cells in the Tumor Microenvironment and Breast Cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 5, n. 3, p. 495, 2014.
- FARKAS, Á.; KEMÉNY, L. Interferon- α in the generation of monocyte-derived dendritic cells: recent advances and implications for dermatology. **British Journal of Dermatology**, v. 165, n. 2, p. 247-254, 2011.
- GARDNER, A.; RUFFELL, B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. **Trends Immunol**, v. 37, n. 12, p.855-865, 2016.
- INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>, 2023.
- International Agency for Research on Cancer. Geneva: World Health Organization. Disponível em:<https://gco.iarc.fr/>,2021.

- LEE, Y.S.; RADFORD, K.J. The role of dendritic cells in cancer. **International review of cell and molecular biology**, v. 348, p. 123-178, 2019
- LIU, B.; HE, X.; WANG, Y.; HUANG, J.; ZHENG, Y.; LI, Y.; LU, L. Bibliometric Analysis of $\Gamma\delta$ T Cells as Immune Regulators in Cancer Prognosis. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 874640, 14 abr. 2022.
- LOPES, N.; SILVA-SANTOS, B. Functional and metabolic dichotomy of murine $\gamma\delta$ T cell subsets in cancer immunity. **European journal of immunology**, v. 51, n. 1, p.17-26, 2021.
- LUNDBERG, K.; ALBREKT, A. S.; NELISSEN, I.; SANTEGOETS, S.; DE GRUIJL, T. D.; GIBBS, S. et al. Transcriptional profiling of human dendritic cell populations and models-unique profiles of in vitro dendritic cells and implications on functionality and applicability. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e52875, 2013.
- MAFFUZ-AZIZ, A.; LABASTIDA-ALMENDARO, S.; ESPEJO-FONSECA, A.; RODRÍGUEZ-CUEVAS, S. Características clinicopatológicas del cáncer de mama en una población de mujeres en México. **Cirugía y Cirujanos**, v. 85, n. 3, p. 201–207, maio 2017.
- MATIAS, B. F.; DE OLIVEIRA, T. M.; RODRIGUES, C. M.; ABDALLA, D. R.; MONTES, L.; MURTA, E. F. C.; MICHELIN, M. A. Influence of Immunotherapy with Autologous Dendritic Cells on Innate and Adaptive Immune Response in Cancer. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v. 7, p. CMO.S12268, jan. 2013.
- MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. D.; CRUVINEL, W. D. M.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. D. Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552–580, out. 2010.
- MIAR, A.; ARNAIZ, E.; BRIDGES, E. Hypoxia Induces Transcriptional and Translational Downregulation of the Type I IFN Pathway in Multiple Cancer Cell Types. **Cancer research**, v. 80, n. 23, p. 5245-5256, dez. 2020.
- OLESZYCKA, E.; LAVELLE, E. C. Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum. **Current opinion in immunology**, v. 28, p. 1-5, 2014.
- PATENTE, T. A.; PINHO, M. P.; OLIVEIRA, A. A.; EVANGELISTA, G. C. M.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; BARBUTO, J. A. M. Human Dendritic Cells: Their Heterogeneity and Clinical Application Potential in Cancer Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3176, 21 jan. 2019.
- PULASKI B.A., CLEMENTES V.K., PIPELING M.R., OSTRAND-ROSEMBERG S. Immunotherapy with vaccines combining MHC class II/CD80+ tumor cells with interleukin-12 reduces established metastatic disease and stimulates immune effectors and monokine induced by interferon gamma. **Cancer Immunol Immunother**. v. 49, p. 34-45, mar 2000.
- ROLAND, C. L. *et al.* Inhibition of vascular endothelial growth factor reduces angiogenesis and modulates immune cell infiltration of orthotopic breast cancer xenografts. **Molecular Cancer Therapeutics**. v. 8, n. 7, p. 1761–1771, 1 jul. 2009.

SILVA, S. B. Promoting angiogenesis within the tumor microenvironment: the secret life of murine lymphoid IL-17-producing gammadelta T cells. **Eur J Immunol**. n. 7:p.1873-1876, 2010.

SILVA, S. C.; AFFANDI, A. J.; SPEL, L.; COSSU, M.; VAN ROON, J. A., BOES, M. et al. CXCL4 exposure potentiates TLR-driven polarization of human monocyte-derived dendritic cells and increases stimulation of T cells. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 1, p. 253-262, 2017.

SBM - SOCIEDADE BRASILEIRA DE MASTOLOGIA. Disponível em: <https://www.sbmastologia.com.br/>, 2023.

SOUZA, C. M. **Carcinoma mamário murino 4T1: características morfológicas, imunofenotípicas, bioquímicas e ensaios pré-clínicos com talidomida/ carboplatina. Tese (Doutorado em Patologia)** - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 138. 2013.

TEIXEIRA, H. C.; DA SILVA DIAS, L.; MENÃO, T. L.; ESTEVES DE OLIVEIRA, E. Proteínas de checkpoint imunológico como novo alvo da imunoterapia contra o câncer: revisão da literatura. **HU Revista**, v. 45, n. 3, p. 325–333, 28 nov. 2019.

VANTOUROUT, P.; HAYDAY, A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. **Nat Rev Immunol**. v.13, n. 2, p. 88-100, 2013.

VEGLIA, F.; GABRILOVICH, D. I. Dendritic cells in cancer: the role revisited. **Current opinion in immunology**, v. 45, p. 43-51, 2017.

VIEIRA, J. F.; PEIXOTO, A. P.; ABREU, T. N. L.; MURTA, E. F. C.; MICHELIN, M.A. Imunoterapia profilática com células dendríticas reduz metástases pulmonares em modelo de câncer de mama experimental. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 5, 12 maio, 2021.

VOPENKOVA, K.; MOLLOVA, K.; BURESOVA, I.; MICHALEK, J. Complex evaluation of human monocyte-derived dendritic cells for cancer immunotherapy. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 16, n. 11, p. 2827-2837, 2012.

WERTEL, I. Relationship between RANTES and Dendritic Cells in Ovarian Cancer Patients. **Frontiers in Bioscience**, v. E3, n. 1, p. 227–232, 2011.

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**, v. 47, n. 1, p. 105–116, fev. 2020.

Zou C., Zhao P., Xiao Z., Han X., Fu F., Fu L. $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy. **Oncotarget**. n. 8: p. 8900-8909, 2016.

ANEXO 1 - CEUA

11/07/2022 16:16

SEI/UFTM - 0778984 - Parecer Técnico



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

Uberaba, 08 de julho de 2022

PARECER Nº 15/2022/CEUA/PROPPG
PROCESSO Nº 23085.005932/2022-75
INTERESSADO: COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS, MARCIA ANTONIAZI MICHELIN
ASSUNTO: Parecer técnico “Novo Protocolo de Maturação de Células Dendríticas como Ferramenta para Imunoterapia de Tumores *Uso in vivo*”

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Novo Protocolo de Maturação de Células Dendríticas como Ferramenta para Imunoterapia de Tumores *Uso in vivo***”, registrada com o **23085.005932/2022-75**, sob a responsabilidade de Márcia Antoniazi Michelin – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em reunião de **08-07-2022**. Foi também decidido pela Comissão, a necessidade de acompanhamento dos animais submetidos à administração de células tumorais por médico veterinário da instituição. Embora o protocolo de indução tumoral seja compatível com a literatura e outros projetos do mesmo grupo terem sido aprovados dessa forma, a Comissão entendeu que esse monitoramento (em conjunto com os pesquisadores) ajudará na detecção precoce de dor ou distresse e definição de pontos para uma intervenção humanitária visando prevenir ou aliviar sofrimentos desnecessários.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2022 à 30/07/2024
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo isogênico BALB/c
Nº de animais	58
Peso/idade	15-18 g/ 6-8 semanas
Gênero	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFTM

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 11/07/2022, às 09:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).

ANEXO 2 – SUBMISSÃO DO ARTIGO

Immunology Letters

ACTION OF GAMMA DELTA T LYMPHOCYTES IMPROVED BY A NEW PROTOCOL OF DIFFERENTIATION OF DENDRITIC CELLS IN AN EXPERIMENTAL BREAST CANCER MODEL

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	IMLET-D-23-00555
Article Type:	Research Paper
Keywords:	Dendritic cells. Cytotoxic T lymphocytes. $\gamma\delta$ T lymphocytes. IFN- γ . IL-17
Corresponding Author:	Marcia Antoniazi Michelin, PhD Federal University of Mineiro Triangle Uberaba, Minas Gerais BRAZIL
First Author:	Claudio Silva
Order of Authors:	Claudio Silva Murilo Porfirio Aguiar Marcia Antoniazi Michelin, PhD
Abstract:	Breast cancer is the leading cause of death among female cancer types, in addition to the high risk of metastasis. Dendritic cells (DCs) emerge as an essential tool in anti-tumor immunotherapy; as initiators and coordinators of the adaptive immune response, dendritic cells are necessary to induce the immune response. DC maturation protocols are tested to seek the best performance in the activity of these cells. Another tool that has demonstrated importance is gamma delta ($\gamma\delta$) T lymphocytes, which can secrete abundant cytokines such as Interleukin 17 (IL-17) and Interferon gamma (IFN- γ) and exert potent cytotoxicity against a wide variety of cells. Therefore, the objective of the present study is to quantify the presence of cytotoxic T lymphocytes (CD8+) producing IFN- γ and the presence of $\gamma\delta$ T lymphocytes producing IL-17 and IFN- γ in different DC differentiation and maturation protocols, designated in this work as protocol 1 (maturation with TNF- α) and protocol 2 (maturation with IL-12 and RANTES). For this, female BALB/c mice were separated into groups: Tumor (n=12), Protocol 1 (n=12) and Protocol 2 (n=12). These animals were induced to develop tumors using the 4T1 cell line, and subsequently, the experimental groups were treated with protocol one or protocol 2. The quantification of cytotoxic T lymphocytes and $\gamma\delta$ T lymphocytes producing the cytokines IFN- γ and IL-17 was done using flow cytometry. We found a more significant number of cytotoxic T lymphocytes producing IFN- γ and $\gamma\delta$ T lymphocytes producing the cytokines IFN- γ and IL-17 in animals treated with protocol 2 compared to protocol 1. Protocol 2 proved to be more efficient for the maturation of DCs in anti-tumor treatment. However, as it is an experimental study, further investigations are needed to elucidate and better understand a protocol for the maturation of dendritic cells in addition to the balance of the cytokines IL-17 and IFN- γ in combating the cell tumors.