

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Eleni Solange de Brito Gomes

Análise do perfil funcional das células dendríticas usadas na imunoterapia do câncer de mama
induzido por células 4T1 em camundongos BALB/c

Uberaba
2024

Eleni Solange de Brito Gomes

Análise do perfil funcional das células dendríticas usadas na imunoterapia do câncer de mama induzido por células 4T1 em camundongos BALB/c

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**

G613a Gomes, Eleni Solange de Brito
Análise do perfil funcional das células dendríticas usadas na imunoterapia
do câncer de mama induzido por células 4T1 em camundongos BALB/c
/ Eleni Solange de Brito Gomes. – 2024.
62 p.: il., fig., graf., tab.

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

1. Imunoterapia. 2. Células dendríticas. 3. Perforina. 4. Receptor fas. 5.
Proteína Ligante Fas. I. Michelin, Márcia Antoniazi. II. Universidade Federal
do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 612.017

Eleni Solange de Brito Gomes

Análise do perfil funcional das células dendríticas usadas na imunoterapia do câncer de mama induzido por células 4T1 em camundongos BALB/c

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 Imunologia Básica e Aplicada.

11 de Março de 2024.

Banca Examinadora:

Dra. Márcia Antoniazi Michelin – Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dra. Fernanda Bernadelli de Vito
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. Marcelo Dias Baruffi
Universidade de São Paulo

Dedico aos meus pais, Maria de Fátima e José Antônio e,
ao meu irmão Edvin, por serem meu incentivo e suporte
diário.

AGRADECIMENTOS

Se eu te perguntar o significado da palavra AGRADECIMENTO, provavelmente você diria algo como: efeito de agradecer, ser grato ou ser grato por tudo que tenho.

E é exatamente isso que sinto por todos que aqui vou agradecer.

Inicio agradecendo aos meus pais, Maria de Fátima Lopes de Brito e José Antônio Gomes, por serem sempre presentes mesmo à distância, por nunca medirem esforços para me verem feliz e realizada, por sempre terem uma palavra de consolo e por saber que sempre posso contar com eles. Nenhum agradecimento será capaz de agradecer tudo o que fazem por mim! Amo vocês!

Agradeço ao meu irmão Edvin Walter Brito Gomes, por sempre me apoiar, me acolher, e por me tranquilizar nos momentos mais tensos da vida. Você é minha pessoa favorita no mundo.

Deixo aqui o meu mais sincero agradecimento, à minha orientadora e mãe científica Márcia Antoniazi Michelin. Agradeço-lhe por me acolher mesmo sem me conhecer, por toda paciência, conhecimento e confiança depositada em mim.

Agradeço a todos os meus colegas/amigos do IPON, Cláudio, Saulo, Murilo, Lucas, Julia, Joyce, Maria Eduarda, Nathália, Carlos, Gabriel, Samara, pela convivência, ajuda e risadas diárias. Sem vocês isso poderia ser possível, mas com certeza não seria do mesmo jeito.

Agradeço às minhas amigas Samantha, Allana, Eulisia, Dionisia e Márcia, que mesmo longe eu sei que poderei sempre contar com elas.

Agradeço aos meus tios e tias, primos (as), amigos e conhecidos, que sempre que possível, perguntam de mim e mandam um abraço.

Agradeço à FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudos, sem dúvida esses dois anos foram mais leves com o apoio.

Por último, mas não menos importante, agradeço à Deus por ter me permitido ter e viver tudo que já escrevi aqui nesta página.

“O mundo pode fazer tudo por você, menos a sua parte.”

Caio Carneiro

RESUMO

As células dendríticas (DCs) são consideradas as melhores apresentadoras de antígenos e, podem desenvolver uma potente atividade citotóxica, caracterizando-as como células dendríticas assassinas. Essas células são frequentemente utilizadas em estudos para o tratamento do câncer, um conjunto de doenças originados pelo crescimento desordenado das células. No passado, as DCs eram utilizadas devido à sua excelente habilidade na apresentação de antígenos; hoje, considera-se também sua capacidade citotóxica. Diante desta outra característica, tornou-se imperativo investigar o destino e a função dessas células, obtidas por meio de um protocolo de diferenciação e maturação padronizado no Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON). Além disso, buscou-se compreender os mecanismos efetores indiretos das DCs no combate às células tumorais. Para realizar esses estudos, camundongos fêmeas BALB/c foram induzidos ao desenvolvimento de câncer de mama utilizando células 4T1. Posteriormente, foram tratados com a imunoterapia de DCs marcadas com CFSE. Durante o período experimental, as DCs foram monitoradas *in vivo*, e após a eutanásia dos animais, foram realizadas marcações nos linfonodos para MHC-II, linfócitos T auxiliares e citotóxicos. Observou-se que as DCs migraram para os órgãos linfáticos, onde desempenham sua função de apresentação de antígenos. Ao analisar as funções efetoras indiretas das DCs nos tumores, por meio da expressão de granzima B, perforina, Fas e FasL utilizando a técnica de imunofluorescência direta, constatou-se uma diminuição significativo da expressão da granzima B, perforina e Fas nos tumores dos animais tratados em comparação com os não tratados. Além disso, observou-se um aumento de FasL no grupo tratado em comparação com o grupo de controle sem tratamento. Além desses resultados, evidenciou-se uma redução no volume tumoral, sugerindo que essa diminuição não foi desencadeada apenas pela granzima B e perforina, mas também pela diminuição de Fas e aumento de FasL nos tumores dos animais tratados. Assim, infere-se que no modelo aqui estudado, as DCs atuaram como excelentes apresentadoras de antígenos, desempenhando não apenas a função de apresentação, mas também contribuindo efetivamente para a resposta citotóxica no ambiente tumoral.

Palavras-chave: Imunoterapia. Célula dendrítica. Perforina. Granzima B. Receptor Fas. Proteína ligante Fas.

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) are considered the best antigen-presenting cells and can develop potent cytotoxic activity, characterizing them as killer dendritic cells. These cells are often used in studies for cancer treatment, a group of diseases originating from the uncontrolled growth of cells. In the past, DCs were used due to their excellent antigen presentation ability; today, their cytotoxic capacity is also considered. Given this other characteristic, it became imperative to investigate the fate and function of these cells, obtained through a standardized differentiation and maturation protocol at the Oncology Research Institute (IPON). Furthermore, efforts were made to understand the indirect effector mechanisms of DCs in combating tumor cells. To conduct these studies, female BALB/c mice were induced to develop breast cancer using 4T1 cells. Subsequently, they were treated with DC immunotherapy labeled with CFSE. During the experimental period, DCs were monitored *in vivo*, and after euthanizing the animals, markings were made on the lymph nodes for MHC-II, helper T cells, and cytotoxic T cells. It was observed that DCs migrated to the lymphatic organs, where they performed their antigen-presenting function. When analyzing the indirect effector functions of DCs in tumors, through the expression of granzyme B, perforin, Fas, and FasL using direct immunofluorescence technique, a significant decrease in the expression of granzyme B, perforin, and Fas was found in the treated animals' tumors compared to the untreated ones. Additionally, an increase in FasL was observed in the treated group compared to the untreated control group. Besides these results, a reduction in tumor volume was evidenced, suggesting that this decrease was not triggered solely by granzyme B and perforin but also by the decrease in Fas and increase in FasL in the treated animals' tumors. Thus, it is inferred that in the model studied here, DCs acted as excellent antigen-presenting cells, not only performing the presentation function but also effectively contributing to the cytotoxic response in the tumor environment.

Keywords: Immunotherapy. Dendritic cells. Perforin. Granzyme B. Fas Receptors; Fas Ligand.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estágios da carcinogênese	16
Figura 2 - Incidência do câncer	17
Figura 3 - Os três principais subtipos de câncer de mama	18
Figura 4 - Maturação das DCs e ativação dos linfócitos	23
Figura 5 - Terapias baseadas em DCs	26
Figura 6 - Delineamento experimental	29
Figura 7 - Produção da vacina de DCs	31
Figura 8 – Imagens da padronização da concentração de CFSE in vitro	32
Figura 9 - Peso dos animais	35
Figura 10 - Peso dos tumores	36
Figura 11 - Volume tumoral	36
Figura 12 - Localização dos linfonodos	37
Figura 13 - Migração das DCs.....	37
Figura 14 - Gráfico de barra da expressão de CD11c.....	38
Figura 15 – Expressão de CD8, CD4 e I-A[d] nos linfonodos.....	39
Figura 16 - Imagem de imunofluorescência para marcação de DCs, CD8, CD4 e IA.....	40
Figura 17 - Gráficos de barra da expressão de granzima B, Perforina, Fas e FasL.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Etapas para realização da técnica de imunofluorescência.....	33
Tabela 2 - Anticorpos	34

LISTA DE SIGLAS

μm - Micrómetro

4T1 - Linhagem celular tumoral murina de células 4T1

μl - Microlitro

APCs - Células Apresentadoras de Antígenos

BSA - Albumina de Soro Bovino

CCL19 – O ligante de quimiocina 19

CCL21 – O ligante de quimiocina 21

CCR7 – Receptor de quimiocina C-C tipo 7

CD – Grupamento de diferenciação (Inglês: *Cluster of differentiation*)

cDC1 – Células dendríticas convencionais do tipo 1

cDC2 - Células dendríticas convencionais do tipo 2

cDCs – Células Dendríticas Convencionais

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CFSE - Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester

cm^2 - Centímetros quadrados

CO_2 - Dióxido de Carbono

DCs – Células Dendríticas

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

Fas/FasL – Fas/ligante Fas

GM-CSF - Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos e Granulócitos

HER2 - Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano

HIF-1 α - Fator 1-alfa induzível por hipóxia

IFN- α – Interferon Alfa

IL – Interleucina

IMDM - Meio de Iscove (Inglês: *Iscove's Modified Dulbecco's Media*)

INCA – Instituto Nacional de Câncer

IPON – Instituto de Pesquisa em Oncologia

mDCs - Células Dendríticas mieloides

MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal

Mm – Massa Molar

mm - Milímetro

mM - milimolar

moDCs - Células Dendríticas Derivadas de Monócitos

ng/ μ L - Nanograma por Microlitro

NK – Célula Natural Assassina (Inglês: *Natural Killer*)

PBS - Solução Salina Tamponada (Inglês: *Phosphate Buffered Saline*)

pDCs - Células Dendríticas Plasmocitóides

PR - Receptor de Progesterona

PRR - Receptores de reconhecimento de padrões moleculares

RE - Receptor de Estrogênio

TCR - Receptor de células T

Th – Célula T auxiliar (Inglês: *T helper*)

TLR - Toll-like receptor

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TRAIL - Ligante Indutor de Apoptose Relacionado a TNF

Treg – Célula T regulatória

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

xg - Força centrífuga relativa

LISTA DE SIMBOLOS

$\gamma\delta$ - Gama Delta

α – Alfa

$^{\circ}\text{C}$ - Grau Celsius

% - Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. CÂNCER DE MAMA	17
1.2. RESPOSTA IMUNOLÓGICA AOS TUMORES	19
1.3. CÉLULAS DENDRÍTICAS	20
1.3.1. Migração das DCs	21
1.3.2. Apresentação de antígenos pelas DCs	22
1.4. LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS	23
1.5. IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS	25
1.6. CÉLULAS DENDRÍTICAS CITOTÓXICAS?	26
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	28
4. METODOLOGIA	29
4.1. ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	29
4.2. INDUÇÃO TUMORAL COM CÉLULAS DA LINHAGEM 4T1	30
4.3. OBTENÇÃO E MATURAÇÃO DAS DCs	30
4.3.1. Marcação das DCs	31
4.3.2. Imunoterapia com DCs marcadas com CFSE	32
4.3.3. Monitoramento do percurso das DCs in vivo	32
4.4. OBTENÇÃO DOS LINFONODOS E TUMORES.....	33
4.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA	33
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5. RESULTADOS	35
5.1. PESO DOS ANIMAIS.....	35
5.2. PESO DOS TUMORES.....	35
5.3. VOLUME TUMORAL.....	36
5.4. MIGRAÇÃO DAS DCs MARCADAS COM CFSE	37
5.5. ANÁLISE DA PRESENÇA DE LINFÓCITO T CITOTÓXICO, LINFÓCITO T AUXILIAR E MHC-II NOS LINFONODOS.	39
5.6. ANÁLISE DA PRESENÇA DE GRANZIMA B, PERFORINA, FAS (CD95) E FASL (CD178) NOS TUMORES	40
6. DISCUSSÃO	42
7. CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
APÊNDICE	53

1. INTRODUÇÃO

“O câncer é uma doença de proliferação descontrolada por células transformadas sujeitas a evolução por seleção natural” (BROWN *et al.*, 2023). As alterações no DNA destas células são desencadeadas pelos proto-oncogenes que são inativos em células normais. A partir do momento que esses genes são ativados eles passam de proto-oncogenes para oncogenes, tornando a célula normal em uma célula tumoral (INCA, 2023).

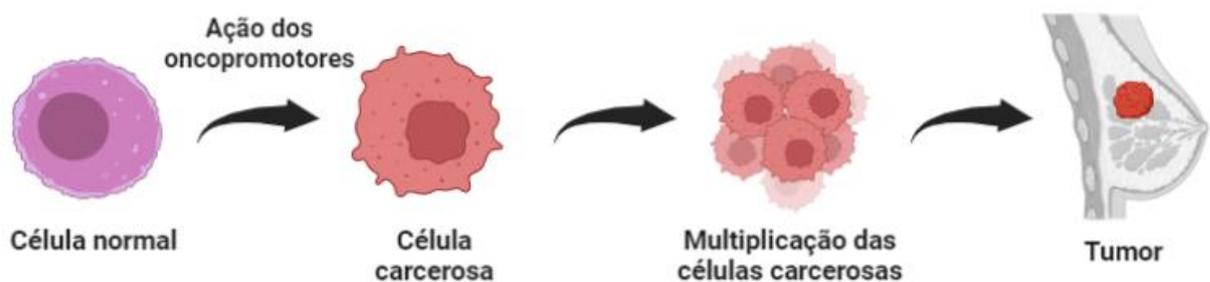
Para que se inicie esse processo de carcinogênese, a célula normal precisa ser exposta por um determinado tempo aos agentes cancerígenos, a fim de causarem danos ao DNA. A Figura 1 apresenta os três estágios do desenvolvimento do tumor:

1º- Estágio de iniciação: estágio em que as células normais sofrem alterações nos seus genes pelos genes cancerígenos, deixando-as capacitadas a seguirem os próximos estágios.

2º- Estágio de promoção: as células que sofreram alterações no DNA, sofrem efeito dos genes chamados de oncopromotores, tornando essa célula com mutações genéticas em uma célula maligna.

3º- Estágio de progressão: as células malignas multiplicam-se de forma descontrolada e irreversível, formando o tumor (INCA, 2023).

Figura 1 - Estágios da carcinogênese



Fonte: Da autora, 2023.

1.1.CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama continua liderando o ranking dos cânceres mais comuns entre as mulheres, sendo estimado cerca de 73.610 novos casos no ano de 2023 (Fig. 2). Além de ser o tipo mais comum, também é o mais letal entre os cânceres que acomete as mulheres (INCA, 2023; LUKASIEWICZ *et al.*, 2021).

Figura 2 - Incidência do câncer

	Localização Primária	Casos	%
 Mulheres	Mama feminina	73.610	30,1%
	Cólon e reto	23.660	9,7%
	Colo do útero	17.010	7,0%
	Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
	Glândula tireoide	14.160	5,8%
	Estômago	8.140	3,3%
	Corpo do útero	7.840	3,2%
	Ovário	7.310	3,0%
	Pâncreas	5.690	2,3%
	Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

Fonte: INCA, 2023.

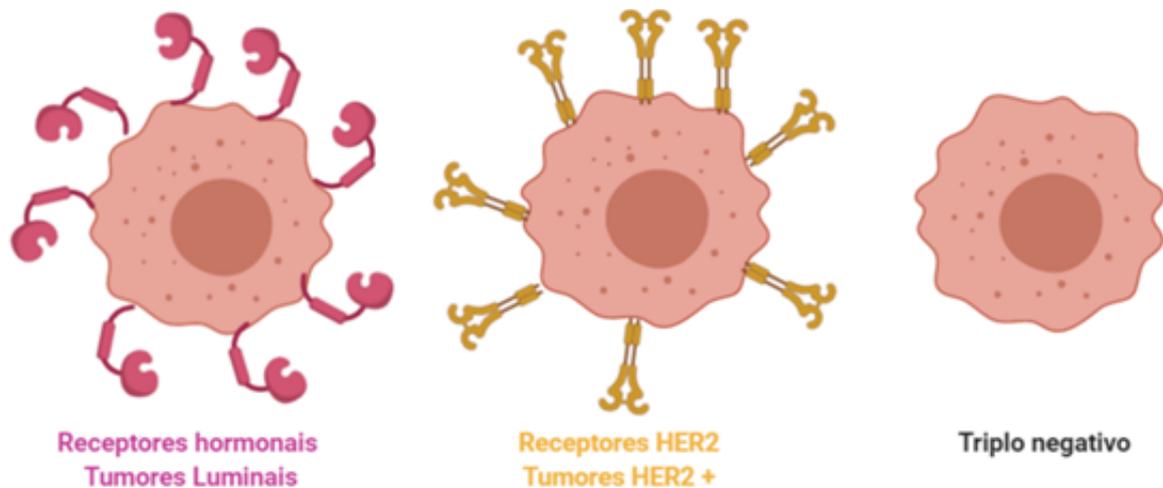
Nota: Incidência estimada conforme a localização primária do tumor em mulheres, para o ano de 2023.

São vários os fatores que fazem com que as mulheres tenham uma maior propensão para o desenvolvimento do câncer de mama quando comparado aos homens. Esses fatores compreendem desde o histórico familiar, mutações genéticas, como também a história reprodutiva. Pelo fato das mulheres possuírem aumento da estimulação hormonal e, por suas células mamárias serem vulneráveis à hormônios como estrogênio e progesterona, o risco do desenvolvimento do câncer de mama é aumentado. São muitos os eventos que acompanham as mulheres ao longo da vida, como a primeira menstruação, gravidez, amamentação e menopausa. Todos esses eventos trazem consigo alterações hormonais, tendo potencial para desencadear a formação do tumor (LUKASIEWICZ *et al.*, 2021).

O prognóstico de câncer de mama envolve informações desde tamanho tumoral ao grau de diferenciação histológica, com presença ou não de metástases. Apesar dessas serem características patológicas clássicas que muitos tumores apresentam, elas possuem comportamentos distintos devido à sua biologia. Pensando no contexto de expressão dos receptores, existem três subtipos principais do câncer de mama que se correlacionam com o

prognóstico (Fig. 3): câncer de mama luminal, câncer de mama HER2 e o câncer de mama triplo negativo (LUKASIEWICZ *et al.*, 2021; SERRA *et al.*, 2014; YIN *et al.*, 2020).

Figura 3 - Os três principais subtipos de câncer de mama



Fonte: ROCKETPIXELS_CIONIC, 2020.

As células de câncer de mama luminal não apresentam o *Human Epidermal growth factor Receptor-type 2* (HER2) na superfície, contudo possuem receptores hormonais de estrogênio (RE) e/ou receptor de progesterona (PR), sendo assim possível a utilização de tratamento de terapia hormonal. Este tipo de câncer é subdividido em luminal A e luminal B, sendo o primeiro associado a melhor prognóstico com altas taxas de sobrevivência e baixas taxas de recorrência em comparação com o luminal B, pois este geralmente é diagnosticado já em estágio mais avançado e com os linfonodos já comprometidos pelas células tumorais (BARRETO-NETO *et al.*, 2014).

Já os pacientes diagnosticados com o segundo subtipo de câncer, o HER2 positivo, estão propensos a maior recorrência e metástases quando comparado com o tipo de câncer luminal. Entretanto, esses pacientes respondem bem à terapia alvo biológica anti-HER2.

O câncer de mama triplo negativo é caracterizado pela inexistência do RE, PR e HER2 e, é considerado o mais agressivo, com rápida disseminação e com pior prognóstico, pois devido a ausência desses três receptores, este tipo de câncer não pode ser tratado com terapia hormonal e nem com a terapia alvo HER2 (BARRETO-NETO *et al.*, 2014; YIN *et al.*, 2020). Deste modo, a imunoterapia tem sido uma opção aplicada na prática clínica com resultados promissores. Contudo, a recorrência de metástases em órgãos distantes continua sendo um desafio para o

sucesso do tratamento (WU *et al.*, 2023). Para melhor entendimento deste tipo de câncer, pesquisas continuam sendo feitas, utilizando principalmente a linhagem de células 4T1 (carcinoma mamário murino de células 4T1), que são células de câncer de mama, isoladas de camundongos BALB/c, originalmente por Fred Miller e colaboradores do Karmanos Cancer Institute em 1983. Essas células 4T1 são altamente invasivas e são transplantadas facilmente para a glândula mamária, permitindo assim o crescimento no local anatomicamente correto. Estas características as tornam um modelo experimental adequado para o estudo do câncer de mama humano triplo negativo (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2000).

1.2.RESPOSTA IMUNOLÓGICA AOS TUMORES

Já é bem descrito, que o sistema imune é desenvolvido através de vários mecanismos para reconhecer patógenos potencialmente prejudiciais através de antígenos e, para não responder aos nossos próprios antígenos. Assim como demonstrado anteriormente no tópico câncer, as células cancerígenas sofrem inúmeras mutações e alterações no seu DNA, o que acaba levando a expressão de antígenos específicos que podem ser reconhecidos como antígenos não próprios, o que conseqüentemente desencadeia a ativação do sistema imune (JANSSEN *et al.*, 2017).

Por volta do ano de 1909, o cientista Paul Ehrlich acreditava que o sistema imune seria capaz de reconhecer e eliminar células atípicas, mas com as restrições existentes na época essa informação teria sido esquecida por muitos anos. Na década de 50, dois pesquisadores, Lewis Thomas e Frank MacFarlane Burnet, teriam retomado esse conceito, dando assim início à teoria de imunovigilância tumoral (SILVA *et al.*, 2021).

Teoricamente, quando as células tumorais são eliminadas, os antígenos liberados deveriam ampliar a resposta antitumoral, mas sabemos que nem sempre isso acontece como esperado. Os antígenos tumorais liberados, podem não ser detectados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), indicando que o sistema imune tem influência na seleção de células tumorais que irão sobreviver (CHEN; MELLMAN, 2013; SILVA *et al.*, 2021).

Deste modo, surgiu o conceito de imunoeedição tumoral, que compreende três etapas (SILVA *et al.*, 2021):

1º - Eliminação – as células do sistema imune inato [Células Natural Killer (NK), linfócitos T gama delta ($\gamma\delta$) e macrófagos] e do sistema imune adaptativo [linfócito T citotóxico (CD8+), linfócito T auxiliar (CD4+) e linfócito B] possuem a capacidade de identificar e eliminar as células tumorais antes da sua proliferação.

2° - Equilíbrio – o sistema imune exerce uma pressão seletiva sobre as células que sobreviveram à etapa de eliminação. No caso, o sistema imune consegue conter, mas não de extinguir essas células tumorais.

3° - Evasão – quando as células com menor capacidade imunogênica escapam do sistema imune e proliferam.

O início da interação do sistema imune com o tumor pode ocorrer pelas alterações do estroma que induzem o recrutamento de células imune, e/ou, pelo processamento e apresentação dos antígenos tumorais por meio das APCs, como os linfócitos B, macrófagos e principalmente pelas células dendríticas (DCs) (CHEN; MELLMAN, 2013; SILVA *et al.*, 2021).

1.3.CÉLULAS DENDRÍTICAS

As DCs têm sido amplamente estudadas desde a sua descoberta em 1973 por Ralph Steinman. Originadas na medula óssea a partir de células tronco hematopoiéticas pluripotentes, elas dão origem a duas populações progenitoras: do tipo mieloide, localizada na medula óssea, cordão umbilical e sangue periférico e do tipo linfoide, localizada no timo. Tanto as DCs mieloides quanto os granulócitos e macrófagos vêm do mesmo precursor e, para diferenciação, desenvolvimento e recrutamento destes tipos celulares é necessário a presença de fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) e do fator de necrose tumoral (TNF). Geralmente as DCs mieloides (mDCs) são classificadas em várias subpopulações: DCs convencionais (cDCs), DCs plasmocitóides (pDCs), DCs derivadas de monócitos (moDCs) (CORADO, 2005; LIU *et al.*, 2021).

As cDCs são caracterizadas pela expressão de CD11c e são divididas em cDC1 e cDC2, sendo a primeira especializada no processamento e apresentação de antígeno intracelular como também no processo de apresentação cruzada para ativação dos linfócitos T CD8+ e para a ativação de linfócitos T CD4+. As cDC2 ativam eficientemente os linfócitos T CD4+ estimulando a polarização nos seus diferentes perfis (Th1, Th2, Th17 e Treg). Já as pDCs são importantes para as respostas antivirais e antitumorais, além de serem consideradas as mais potentes células produtoras de interferon do tipo 1, enquanto que as moDCs são originadas pela diferenciação das DCs em resposta a estímulos inflamatórios, sendo elas então recrutadas para o local da inflamação. Existem também as moDCs associadas a tumores, que possuem a função de apresentação de antígenos mas são menos eficientes na ativação de linfócitos T específicos (DEL PRETE *et al.*, 2023; GODOY-TENA; BALLESTAR, 2022).

As DCs linfóides, diferentemente das DCs mielóides, migram para o timo onde se desenvolvem na medula tímica ou migram diretamente para os órgãos linfóides secundários e se desenvolvem na presença da combinação de diversas citocinas. As DCs do timo ou dos órgãos linfóides secundários se localizam em regiões ricas em linfócitos T, sendo estas importantes na seleção negativa dos linfócitos T auto-reativos (CORADO, 2005).

Apesar das diferenças citadas anteriormente entre as DCs mielóides e as DCs linfóides, há muitas características em comum, como a morfologia, expressão de moléculas necessárias para ativação de linfócitos T, receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRR), receptores de quimiocinas, entre outros (CORADO, 2005).

Devido à extensa expressão de receptores, as DCs conseguem patrulhar e identificar sinais de perigo: patógenos e células tumorais. Além disso, quando ativadas, as DCs são essenciais no microambiente tumoral, por desencadearem respostas antitumorais através da ativação dos linfócitos T (DEL PRETE *et al.*, 2023). Com a capacidade de detectar patógenos, fornecer sinais coestimuladores, ativar defesas imunológicas específicas (TIBERIO *et al.*, 2018) e ter papel importante na estimulação da imunidade antitumoral (SADEGHZADEH *et al.*, 2020), as DCs são consideradas as mais potentes células apresentadoras de antígeno (TIBERIO *et al.*, 2018).

Por existir essas diversas subpopulações de DCs, cada uma expressa um perfil único de PRRs, induzindo respostas imunes diferentes. Além disso, cada subtipo segue uma rota diferente, levando a propriedades migratórias diversas assim como funções imunológicas e inflamatórias distintas (DEL PRETE *et al.*, 2023; LIU *et al.*, 2021).

1.3.1. Migração das DCs

As DCs migram através de tecidos linfóides e não linfóides e, essa característica é importante para a ativação das células dependentes das DCs de modo a regular a inflamação e também a imunidade (LIU *et al.*, 2021). Entretanto, para que as DCs exerçam as suas funções de forma bem coordenada, é necessário a sua migração para destinos específicos. Assim, as DCs precisam desenvolver uma rede regulatória complexa envolvendo interações celulares e moleculares (LIU *et al.*, 2021).

A quimiotaxia e a migração das DCs é dependente da interação de quimiocinas com os seus respectivos receptores, sendo a resposta quimiotática mediada principalmente pelo receptor de quimiocina C-C tipo 7 (CCR7). O CCR7 é um receptor acoplado à proteína G que reconhece os ligantes de quimiocina 19 (CCL19) e 21 (CCL21) que estão presentes em altos níveis nos nódulos linfáticos, direcionando assim a migração das células que capturaram o

antígeno para esses tecidos (LIU *et al.*, 2021; RAWAT *et al.*, 2023; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2004). A quimiocina CCL19 é expressa pelas células do estroma nos órgãos linfóides secundários, enquanto que, a CCL21 é expressa pelas células endoteliais linfáticas e, é essencial para que as DCs migram para os linfonodos (SÁNCHEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2004). Quando o CCR7 é ativado, várias vias de sinalização intracelular envolvendo PI3K/AKT, MAPK/NF- κ B e HIF-1 α são ativadas, desencadeando a retroalimentação da migração e capacidade inflamatória das DCs dependendo do contexto (LIU *et al.*, 2021).

Quando a via de sinalização PI3K/AKT é ativada há indução de sobrevivência para a célula, por meio da inativação de moléculas pró-apoptóticas e ativação de sinais de pro-sobrevivência (LIU *et al.*, 2021).

A via de sinalização MAPK/NF- κ B é criticamente importante para a maturação e ativação das DCs induzida pelos receptores do tipo Toll (TLR) por meio de citocinas como a IL-1, IL-6 e TNF. Com a maturação induzida via LPS/MAPK/NF- κ B, as DCs aumentam a sua capacidade migratória pela regulação positiva da expressão de MHC-II, moléculas co-estimuladoras e CCR7 na superfície celular (LIU *et al.*, 2021).

O fator 1-alfa induzível por hipóxia (HIF-1 α) desempenha papéis importantes na resposta imune inata e adaptativa, demonstrando apoiar a migração e funcionalidade das DCs (LIU *et al.*, 2021).

Muitos são os mecanismos intracelulares que regulam essa migração, incluindo modificação de proteínas, reprogramação epigenética, remodelação metabólica e rearranjo do citoesqueleto. Em caso de desregulação na migração destas células, as DCs podem ser ativadas de forma anormal, resultando em um desequilíbrio da resposta imune, interferindo nas respostas autoimunes, infecciosas, alérgicas, patológicas e em tumores (LIU *et al.*, 2021).

1.3.2. Apresentação de antígenos pelas DCs

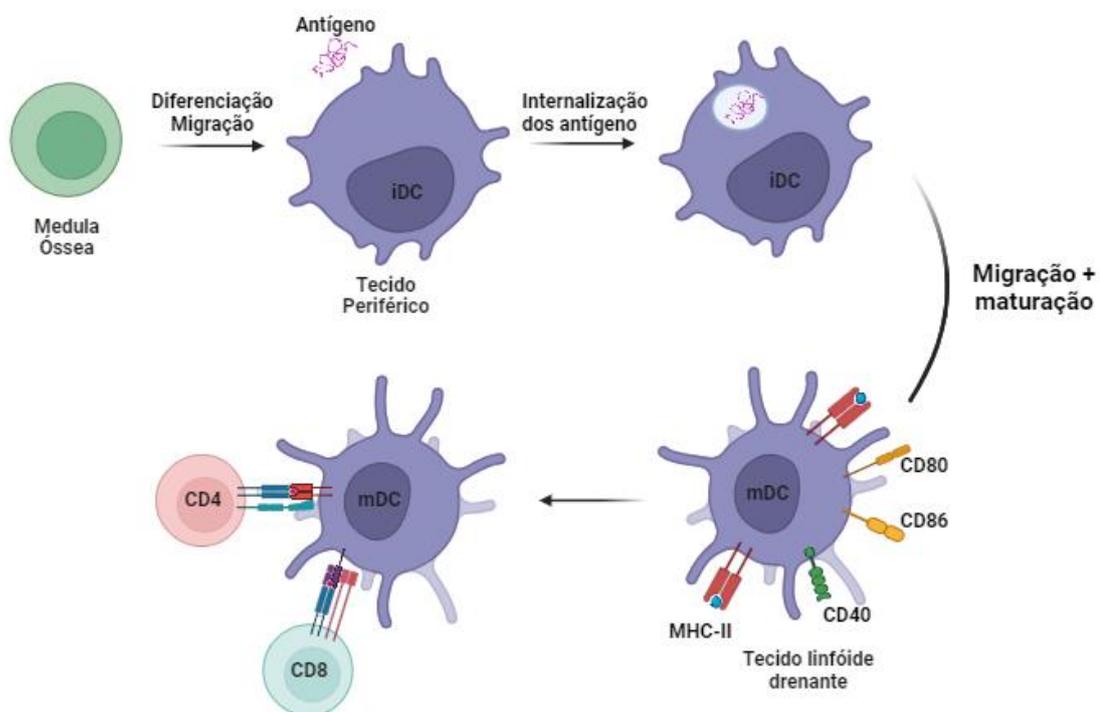
Após as células tumorais serem reconhecidas, há liberação de diferentes citocinas e quimiocinas, para ativação e recrutamento de mais células imunes para o local. As DCs quando ativadas, passam pelo processo de maturação caracterizado pela regulação positiva das moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e CD40, produção de citocinas com consequente migração para os linfonodos regionais (CHEN; MELLMAN, 2013; SILVA *et al.*, 2021; DEL PRETE *et al.*, 2023) (Fig. 4).

Para que as DCs possam ativar os linfócitos T, primeiramente, é necessário o reconhecimento de antígeno ligado à molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e classe II, conhecido como I-A em camundongos. O MHC classe I é expresso

em todas as células de mamíferos e exibe peptídeos de antígenos intracelulares para os linfócitos T CD8+, enquanto que o MHC de classe II é expresso somente em APCs e, exibe peptídeos de antígenos extracelulares para linfócitos T CD4+ (NANDA *et al.*, 2006).

Os linfócitos T identificam peptídeos apresentados nos MHC por meio de seus receptores conhecidos como receptores de células T (TCR). Além deste primeiro sinal, é necessário um segundo sinal, dado pela interação de moléculas co-estimulatórias com os seus respectivos receptores. Para finalizar a ativação, há o estímulo de diferentes citocinas (BOUDREAU *et al.*, 2011; CHEN; FLIES, 2013). Além dos mecanismos de apresentação já citados, existe a chamada apresentação cruzada, na qual a APC apresenta antígenos extracelulares aos linfócitos T CD8+, alertando esses linfócitos da presença de outras células infectadas como também da presença de células tumorais (ROCK; REITS; NEEFJES, 2016).

Figura 4 - Maturação das DCs e ativação dos linfócitos



Fonte: Adaptado de HACKSTEIN; THOMSON, 2004.

1.4.LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS

Os linfócitos T são células com capacidade de reconhecer células infectadas e mutadas e eliminá-las por meio da apoptose ou necrose. Os linfócitos citotóxicos compreendem os linfócitos T CD8+ e as células NK; ambas as células possuem mecanismos semelhantes de

induzir a morte celular, mas diferem-se nos mecanismos de reconhecimento de antígeno e ativação (VOSKOBOINIK; WHISSTOCK; TRAPANI, 2015).

Após a ativação dos linfócitos T CD8+, há conseqüentemente a ativação dos seus mecanismos efetores, como por exemplo, a liberação de grânulos líticos, sendo a perforina e as granzimas o mecanismo mais importante e descrito (MARTÍNEZ-LOSTAO; ANEL; PARDO, 2015).

A perforina é uma molécula formadora de poros, produzida pelos linfócitos citotóxicos e, é conhecida pela sua capacidade de induzir a morte celular por meio da danificação da membrana da célula alvo. Com essa funcionalidade, as perforinas são de suma importância na defesa contra doenças infecciosas e nas malignidades. Os poros por elas formados facilitam a entrada de vários outros grânulos, inclusive das granzimas que compõe uma grande família, com cerca de 11 tipos previamente identificados (BARRY; BLEACKLEY, 2002; MIZUTANI *et al.*, 2022).

Dessas 11, apenas quatro encontram-se onipresentes nas células citolíticas humanas. A granzima B é uma das mais abundantes e melhor caracterizada, atuando por meio da clivagem proteolítica utilizando resíduos de aspartato. Ela utiliza como principal substrato as caspases, moléculas cruciais para a indução da morte celular. Após a clivagem das caspases pelas granzimas, uma cascata de sinalização apoptótica é ativada levando a indução da apoptose da célula alvo. Além da utilização das caspases como substrato, a granzima B pode atuar por vias independentes das caspases, sendo essas vias potentes na indução da morte celular (BARRY; BLEACKLEY, 2002).

Já se sabe que apesar dos linfócitos T CD8+ utilizarem com maior frequência a via dos grânulos (granzima e perforina), essa não é a única forma de morte celular mediada por essas células. Os linfócitos T CD8+ podem induzir apoptose de células alvos por meio dos ligantes de morte: ligante Fas (Fas/FasL) e ligante indutor de apoptose relacionado a TNF (TRAIL) (BARRY; BLEACKLEY, 2002; SORDO-BAHAMONDE *et al.*, 2020). Quando o linfócito T CD8+ é ativado, ele expressa o FasL e o TRAIL na sua superfície, que quando ligados aos seus receptores, comumente presentes em células tumorais, são capazes de induzir a morte das células alvos (MARTÍNEZ-LOSTAO; ANEL; PARDO, 2015).

O FasL, também conhecido como CD178 é expresso em células imunes, principalmente em células NK e linfócitos T CD8+. Além de ser expresso, ele pode também ser secretado e neste caso ele não exerce a sua função citotóxica, podendo muitas vezes inibir a apoptose induzida pelo FasL. Quando o FasL se liga com o seu receptor Fas (CD95), via de morte extrínseca é ativada, sendo capaz de modular a homeostase, regulando a resposta imune e

induzindo a eliminação da célula tumoral (LEE *et al.*, 2018; SORDO-BAHAMONDE *et al.*, 2020).

1.5. IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS

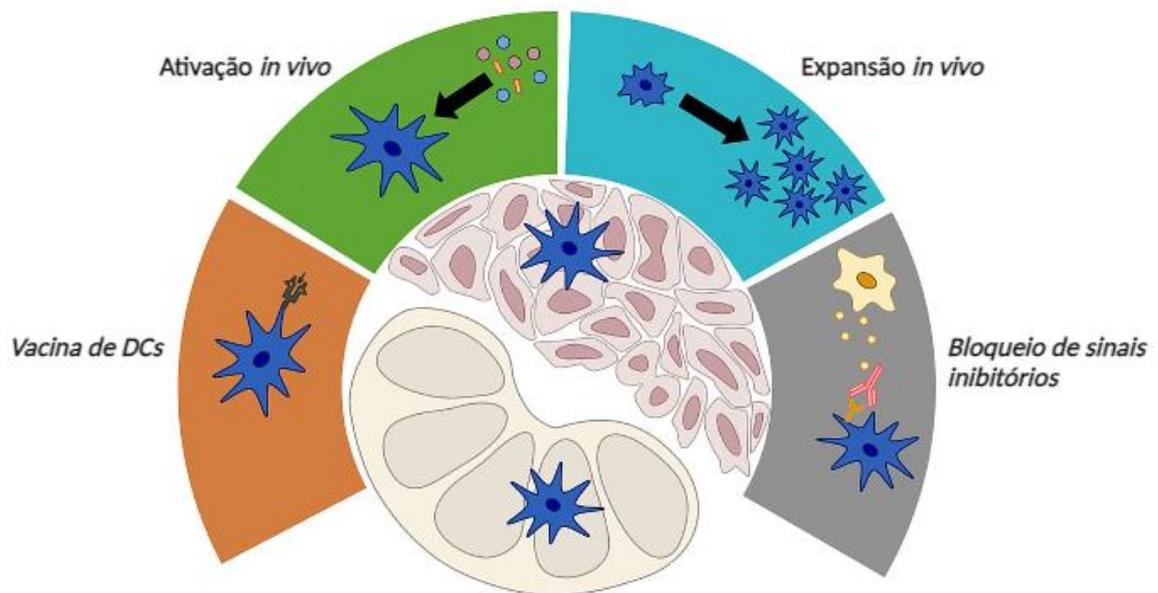
O sistema imunológico é utilizado para o combate de muitas malignidades sólidas e hematológicas, aumentando as possibilidades de benefícios clínicos como também o aumento da sobrevida dos pacientes diagnosticados com a enfermidade (MUNHOZ; POSTOW, 2016). O bloqueio de ponto de controle imunológico, terapia celular adotiva e vacinas, são algumas das estratégias utilizadas na imunoterapia de modo a melhorar as ações dos linfócitos T. Todas essas estratégias se baseiam em um único ponto de partida, que no caso, é a apresentação de antígenos aos linfócitos T (GARDNER; DE MINGO PULIDO; RUFFELL, 2020).

Devido às características apresentadas pelas DCs, estas células são interessantes alvos de estudos no intuito de amplificar a população de células T específicas que possuem a capacidade de reconhecer e eliminar as células tumorais (EMENS, 2018). As DCs residentes no tumor regulam a resposta dos linfócitos T dentro dos tumores, além disso, as DCs não residentes transportam os antígenos do tumor para os órgãos linfóides secundários para ativação de linfócitos T, desencadeando o início da resposta imunológica (EMENS, 2018; GARDNER; DE MINGO PULIDO; RUFFELL, 2020).

O avanço com a imunoterapia trouxe ao longo do tempo benefícios sem precedentes para o tratamento de várias neoplasias. Entretanto as taxas de respostas a muitos tumores ainda continuam baixas, demonstrando a necessidade da melhoria das abordagens antitumorais (GARDNER; DE MINGO PULIDO; RUFFELL, 2020; MUNHOZ; POSTOW, 2016).

Em relação à utilização de DCs, estudos continuam sendo feitos para melhorar as suas funções, como também aumentar o seu número, de modo a promover uma resposta antitumoral mais potente. Para melhorar a função das DCs têm-se feito a ativação e expansão *in vivo*, fornecendo sinais de ativação exógenos para reverter a supressão; assim como aumentar o número e a função das DCs intratumorais e bloqueios de sinais inibitórios, que evitam a redução da funcionalidade das DCs. Além desses mecanismos *in vivo*, existe a opção de terapias de DCs que dependem da expansão e maturação exógena de DCs derivadas de monócitos ou de células pluripotentes, precursores de DCs (Fig. 5) (GARDNER; DE MINGO PULIDO; RUFFELL, 2020).

Figura 5 - Terapias baseadas em DCs



Fonte: Adaptado de GARDNER; DE MINGO PULIDO; RUFFELL, 2020.

1.6.CÉLULAS DENDRÍTICAS CITOTÓXICAS?

A ideia inicial de que as células dendríticas eram somente potentes apresentadoras de antígenos está sendo contrariada à medida que novos estudos estão surgindo, demonstrando sua atuação como célula assassina, altamente citotóxica. Dos vários subtipos descritos, os estudos da citotoxicidade das DCs têm sido embasados nas análises das pDCs. Assim como WU *et al.*, 2016, KALB *et al.*, 2012 também demonstraram que as pDCs podem induzir a morte de células tumorais por mecanismos dependente da granzima B e TRAIL *in vitro*. Estudos feitos *in vivo*, pelo WU *et al.*, 2016, levaram a mesma conclusão, de que as pDCs são células assassinas e são capazes de eliminar diretamente as células tumorais. Tal como, em outras células com características citotóxicas, a granzima B e o TRAIL não são os únicos mecanismos envolvidos na morte mediada pelas pDCs, elas podem utilizar de mecanismos adicionais como IFN- α , FasL perforina, granulicina e lisozima (WU *et al.*, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

Com o alto índice de mortalidade e a falta de tratamentos eficazes que possibilitem a cura, o câncer tem sido caracterizado como um problema de saúde pública mundial. Apesar de existirem alguns tipos de tratamentos, o desenvolvimento da imunoterapia contra o câncer representa um dos avanços mais significativos da oncologia, mas assim como esses outros tratamentos existentes, o sucesso da imunoterapia é limitado.

Partindo do princípio que o sistema imune desempenha um papel crucial no combate ao câncer, e que as DCs estabelecem uma ponte entre a imunidade inata e a adaptativa, o estudo mais aprofundado da migração delas contribuiria de forma significativa, principalmente ao que diz respeito a potencialização da imunoterapia utilizando essas células.

Como já evidenciado, as DCs possuem alta capacidade de apresentar antígenos, bem como funções citotóxicas, o que nos leva a necessidade de identificar o destino dessas células após o tratamento. Será que elas ao serem injetadas no animal, iriam para os linfonodos realizar a apresentação de antígenos às células T? Ou será que elas iriam diretamente ao encontro do tumor e, com a capacidade citotóxica que possuem, conseguiriam eliminar as células tumorais diretamente?

Pensando nesses questionamentos, este trabalho foi realizado a fim de identificar qual o perfil migratório e a função das DCs utilizadas na vacina, obtidas do protocolo de maturação já estabelecido no IPON. Com esses dados podemos estabelecer novas estratégias de diferenciação e maturação dessas células, de modo a torná-las mais potentes na realização da função desempenhada, o que consequentemente tornaria a vacina mais eficaz, com maior capacidade de ativação da resposta imune-específica e melhor indução da regressão tumoral. Com isso, teremos um tratamento com menos efeitos colaterais e que melhoraria a condição de vida dos pacientes diagnosticados com câncer.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral:

Analisar o perfil funcional das células dendríticas utilizadas na imunoterapia do câncer de mama induzido por células 4T1, em camundongos BALB/c.

3.2. Objetivos Específicos:

a) Avaliar *in vivo*, a migração das células dendríticas após a administração da imunoterapia.

b) Identificar a presença de marcadores de superfície: CD11c (marcador das células dendríticas), CD95 (Fas - presente nas células tumorais) e CD178 (FasL - presente nas células imunes) e de granzima B e perforina nos tumores dos animais.

c) Identificar a presença de CD11c (célula dendrítica), CD4+ (linfócitos T auxiliares), CD8+ (Linfócitos T citotóxicos) e I-A (MHC-II) nos linfonodos dos animais.

4. METODOLOGIA

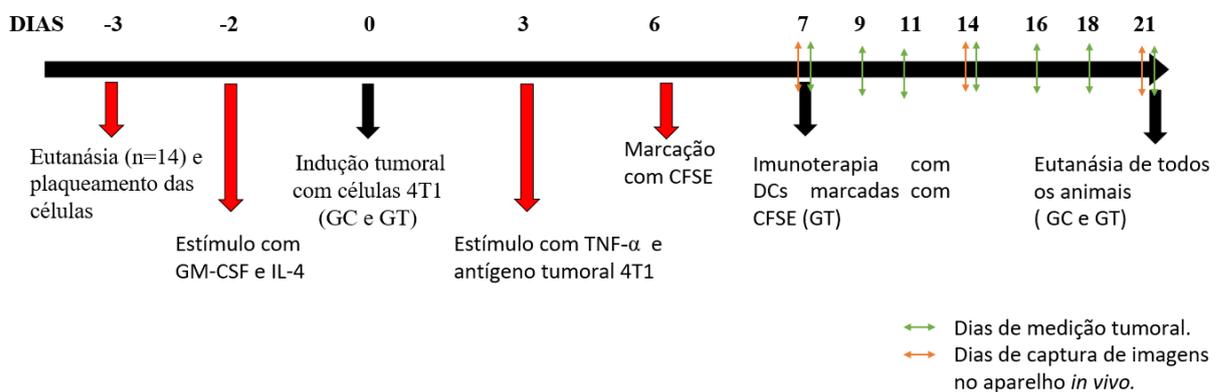
4.1. ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Trata-se de um estudo experimental, no qual foram utilizadas 38 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com idades de 4-6 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brasil. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFTM) sob o número de processo: **23085.010271/2022-08**.

Os animais passaram por habituação no Biotério Setorial do IPON, onde ficaram acomodados em gaiolas com dimensões de 305x198x133 mm, sendo submetidos a ambientes ciclo claro-escuro (12h/12h) em temperatura controlada (22°C +/-2°C).

Dos 38 animais, 24 foram separados em 2 grupos experimentais: Grupo Controle (n=12) composto por animais que foram submetidos ao desenvolvimento tumoral pela linhagem celular 4T1, mas sem tratamento com células dendríticas e Grupo Tratado (n=12) sendo induzidos ao desenvolvimento tumoral pela linhagem celular 4T1 e submetidos à imunoterapia com células dendríticas marcadas com CFSE. Os 14 animais restantes, foram utilizados para preparação da imunoterapia com células dendríticas.

Figura 6 - Delineamento experimental



GC: Grupo Tumor sem tratamento (n=12)

GT: Grupo Tumor tratado com imunoterapia de células dendríticas marcadas com CFSE (n=12)

Fonte: Da autora, 2023.

Nota: As setas na cor vermelha são referentes às etapas para produção das DCs. As setas em preto são referentes ao período experimental com os camundongos.

4.2. INDUÇÃO TUMORAL COM CÉLULAS DA LINHAGEM 4T1

A linhagem celular 4T1 (obtida do banco de células do Rio de Janeiro, código: 0022), é muito utilizada para indução do câncer de mama em modelos experimentais, por ser altamente tumorigênica e com alta capacidade de induzir metástase em órgãos que são afetados pelo câncer de mama humano (linfonodos, fígado, pulmão, cérebro e osso). Por essas características, estas células são consideradas ideais para o estudo do câncer de mama humano (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2000).

As células da linhagem 4T1 foram mantidas em meio RPMI completo em estufa de CO₂ a 5% de umidade a 37°C. As células foram lavadas com solução fisiológica 0,9% a 290 xg, 4°C por 10 minutos em cada lavagem. Os animais foram inoculados com uma única dose de 2,0x10⁵ células 4T1 em um volume de 50 µl de solução fisiológica 0,9%, injetadas via subcutânea na glândula mamária abdominal direita, com o auxílio de uma seringa de 1 ml com agulha de 13x4,5 mm.

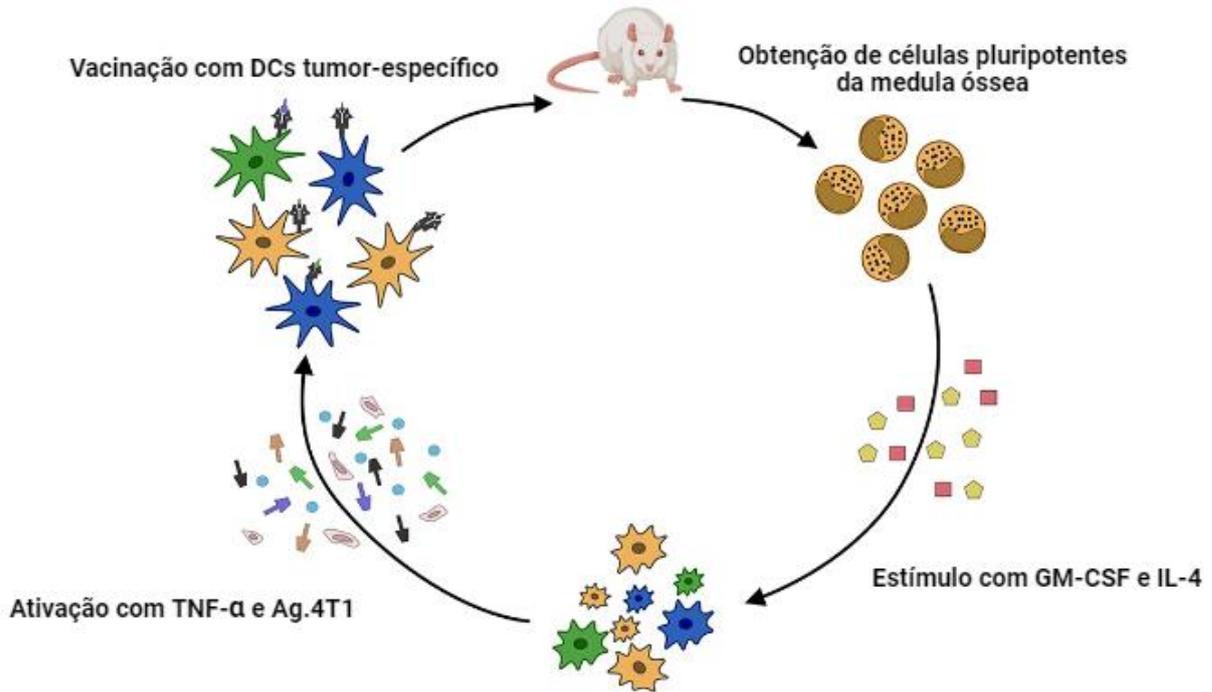
Todos os animais foram pesados (antes da indução tumoral e a cada 2 dias após a indução tumoral) e, tiveram os seus tumores mensurados com o apoio do paquímetro a cada dois dias, sendo o volume tumoral determinado pela fórmula: $[\text{Maior diâmetro} \times (\text{menor diâmetro}^2) / 2]$.

4.3. OBTENÇÃO E MATURAÇÃO DAS DCs

Para a obtenção das DCs, foi realizada a coleta das células da medula óssea dos fêmures e tíbias de 14 camundongos BALB/c com auxílio de uma seringa 13 x 4,5 mm contendo solução fisiológica 0,9%. Essas células pluripotentes foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm², em meio *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM) completo com 0,1 mM de vitaminas: 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de gentamicina, 1 mM de piruvato de sódio e 5% de soro fetal bovino (Sigma). No dia 1 após o plaqueamento, as células foram estimuladas com 10 ng/µL de GM-CSF e 10 ng/µL de IL-4. No dia 5 após o primeiro estímulo, as células foram estimuladas com 10 ng/µL de TNF-α e 10 ng/µL dos antígenos tumorais da linhagem de células 4T1 (obtidos pelo congelamento e descongelamento das células 4T1) (Fig. 7).

Tanto o GM-CSF, quanto a IL-4 e IL-10 utilizados, são da *BD, Biosciences, San Diego, CA, EUA*.

Figura 7 - Produção da vacina de DCs



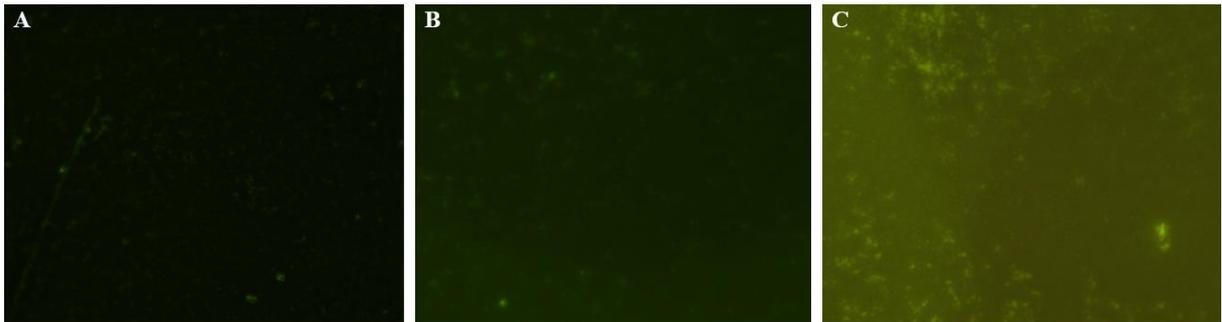
Fonte: Adaptado de GARDNER; DE MINGO PULIDO; RUFFELL, 2020.

4.3.1. Marcação das DCs

Para a marcação das DCs, foi utilizado o fluorocromo intracelular *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE) que se difunde passivamente através das membranas celulares e, é clivado pelas esterases intracelulares das células viáveis. Quando clivado este fluoróforo torna-se altamente fluorescente e liga-se covalentemente a grupos de amina dentro das células através do seu grupo éster de succinimídilo.

Para determinação da quantidade de CFSE a ser utilizado, foram feitos testes *in vitro* em placas de 6 poços (5×10^6 células por poço, tendo cada poço um volume total de 4 ml), testando três volumes diferentes (0,25 μ l, 1,75 μ l e 5 μ l). Os volumes de 1,75 μ l e de 5 μ l, além de marcarem as células, deixaram o meio de cultura totalmente verde. O volume de 0,25 μ l não alterou a coloração do meio e, microscopicamente as células foram marcadas, demonstrando que este volume seria ideal a ser utilizada neste experimento, dentre os volumes testados.

Figura 8 – Imagens da padronização da concentração de CFSE *in vitro*



Fonte: Da Autora, 2023

Nota: (A) Células marcadas com 0,25 µl de CFSE. (B) Células marcadas com 1,75 µl de CFSE. (C) Células marcadas com 5 µl de CFSE.

Três dias após as DCs terem sido estimuladas com TNF- α e antígeno tumoral 4T1, elas foram marcadas com fluorocromo CFSE, sendo adicionado 0,5 µL do fluorocromo em cada garrafa de cultura de 25 cm² (7,5 x 10⁶ células).

4.3.2. Imunoterapia com DCs marcadas com CFSE

Passado 24 horas da adição do CFSE no meio de cultura, as DCs diferenciadas foram lavadas e ressuspensas em solução fisiológica 0,9%. O protocolo de tratamento contou com apenas uma única dose, via subcutânea, de 5,0 x 10⁶ células em um volume de 50 µL de solução fisiológica, no dorso dos animais que anteriormente foram induzidos com células 4T1 ao desenvolvimento do câncer de mama.

4.3.3. Monitoramento do percurso das DCs *in vivo*

O percurso das DCs marcadas com o CFSE foi monitorado a cada sete dias pelo aparelho *In-Vivo MS FX PRO*. Para obtenção das imagens da localização das DCs, foi realizada primeiramente a captura de uma imagem de raio-x do animal e, em seguida, a captura de imagem de imunofluorescência. Após a obtenção das duas imagens (raio-x e imunofluorescência) foi feita a sobreposição das imagens, para que assim, fosse possível observar a localização das DCs.

4.4. OBTENÇÃO DOS LINFONODOS E TUMORES.

Após 21 dias da indução tumoral, os animais foram eutanasiados com o uso de superdosagem de anestésicos, sendo retirados os linfonodos e tumores, de todos os animais. Os tumores retirados foram pesados, medidos e fotografados.

Tanto os linfonodos quanto os tumores foram emblocados em parafina seguindo o seguinte protocolo: 18 horas em formol 10%, desidratação com álcool 70%, álcool 80%, álcool 90%, álcool absoluto I e álcool absoluto II (os órgãos permaneceram por 1 hora em cada solução). Após a desidratação, foi feita a clarificação dos órgãos em xilol I e xilol II (1 hora em cada solução). Para a impregnação os órgãos foram mergulhados em parafina I e parafina II (1 hora em cada parafina na estufa). Depois de todas essas etapas, eles foram emblocados em parafina. Quando seco os blocos de parafinas, seguiu-se com os cortes histológicos de 5 µm no micrótomo e montagem das lâminas para a realização da técnica de imunofluorescência.

4.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para a realização da imunofluorescência foi seguido o protocolo abaixo:

Tabela 1 - Etapas para realização da técnica de imunofluorescência.

Etapas	Duração
Estufa	1 hora
Xilol I	20 minutos
Xilol II	20 minutos
Acetona	mergulhar 10 vezes
Álcool 100%	mergulhar 10 vezes
Álcool 90%	mergulhar 10 vezes.
Álcool 80%	mergulhar 10 vezes
Água destilada	mergulhar 10 vezes
PBS (1X, Ph 7,4)	2 vezes de 5 minutos
Peróxido de hidrogênio 5%	40 minutos
PBS (1X, Ph 7,4)	3 vezes de 5 minutos
Bloqueio com BSA 5%	2 horas
PBS (1X, Ph 7,4)	5 vezes de 5 minutos
PBS (1X, Ph 7,4) + 0,05% Tween 20	30 minutos

Marcação com anticorpo	Overnight
PBS (1X, Ph 7,4)	6 vezes de 5 minutos
Montagem da lâmina com glicerol 2%	
Leitura da lâmina	

Fonte: Protocolo já padronizado no Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON).

Nos linfonodos foi feita marcações para célula dendrítica (CD11c+), linfócito T citotóxico (CD8+), linfócito T auxiliar (CD4+) e MHC-II (I-A[d]+) e, nos tumores foi feita marcações para células dendríticas (CD11c+), Fas (CD95+), FasL (CD178+), granzima B e perforina. Todos os anticorpos foram utilizados numa diluição de 1/1000.

Tabela 2 - Anticorpos

Anticorpo	Marcação	Órgão	Marca	nº catálogo
PE Anti-MO Granzyme B	Granzima B	Tumor	Invitrogen	12-8898-82
PE Anti-MO Perforin	Perforina	Tumor	Invitrogen	12-9392-82
FITC Hamster Anti-Mouse CD95	Fas	Tumor	BD	561979
PE Hamster Anti-Mouse CD178	FasL	Tumor	BD	555293
PE Mouse Anti-Mouse I-A [d]	MHC-II	Linfonodo	BD	553548
PerCP-Cy TM 5.5 Rat Anti-Mouse CD4	Linfócito T auxiliar	Linfonodo	BD	550954
APC Rat Anti-Mouse CD8a	Linfócito T citotóxico	Linfonodo	BD	553035
APC Hamster Anti-Mouse CD11c	Célula dendrítica	Linfonodo e Tumor	BD	550261

Fonte: Elaborada pela Autora, 2023.

As lâminas foram lidas no microscópio *Nikon Eclipse Ti2*, sendo as imagens analisadas e quantificadas pelo *software NIS-Elements (Nikon Analyses)*.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

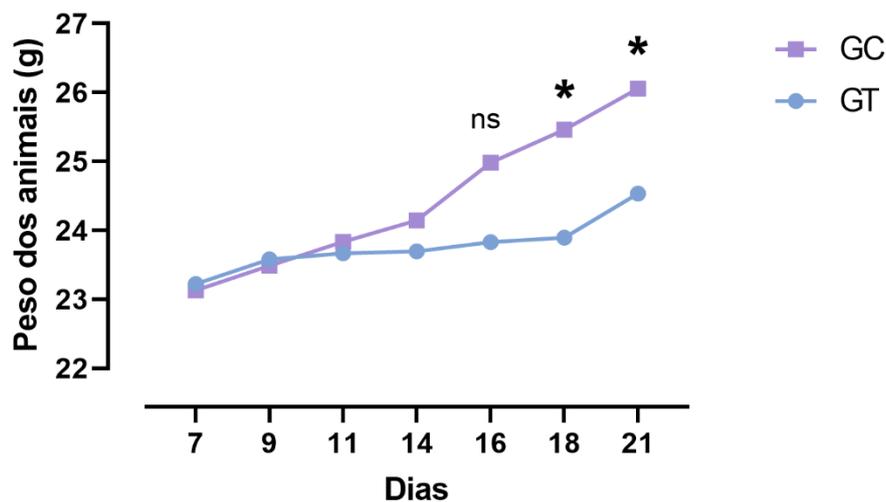
Os resultados obtidos foram analisados pelo *software GraphPad 9.2.0*, onde foi analisada a distribuição dos dados. Para distribuição normal, foi utilizado o pós teste T-Student, e para distribuição não normal foi aplicado o pós teste Mann-Whitney. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade foi menor que 0,05 (5%).

5. RESULTADOS

5.1. PESO DOS ANIMAIS

Para saber se o peso e o volume do tumor interferem no peso dos animais, todos os animais dos grupos experimentais foram pesados a cada dois dias, sendo a primeira pesagem sete dias após a indução tumoral. Quanto ao peso dos animais, observamos diferenças significantes nos dias 18 e 21, quando comparado o grupo de animais tratados com o grupo de animais sem tratamento (Fig. 9).

Figura 9 - Peso dos animais



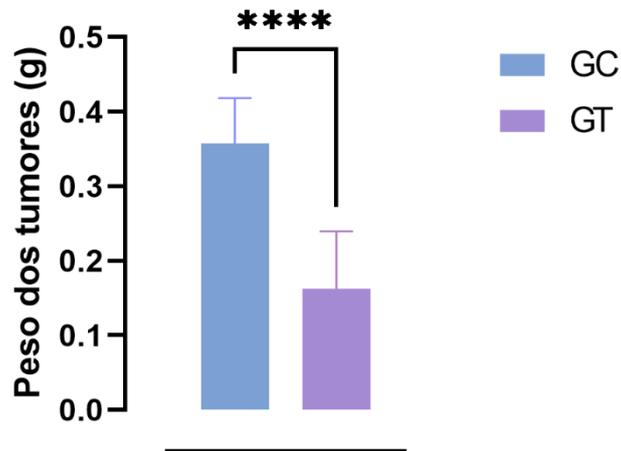
Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

Nota: Os dados analisados foram considerados paramétricos, portanto, foi aplicado o pós teste *T-Student* para cada ponto do gráfico. As análises não demonstraram diferença significativa no dia 7 ($p=0,7701$), dia 9 ($p=0,7290$), dia 11 ($p=0,6332$), dia 14 ($p=0,3066$) e no dia 16 ($p>0,9999$). Entretanto foram significantes no dia 18 ($p=0,0028$) e no dia 21 ($p=0,0216$).

5.2. PESO DOS TUMORES

Avaliando o peso dos tumores quando retirados dos animais, foi observada diminuição significativa no peso dos tumores dos animais do grupo tratado com a imunoterapia de DCs em relação com os tumores do grupo sem tratamento (Fig. 10).

Figura 10 - Peso dos tumores



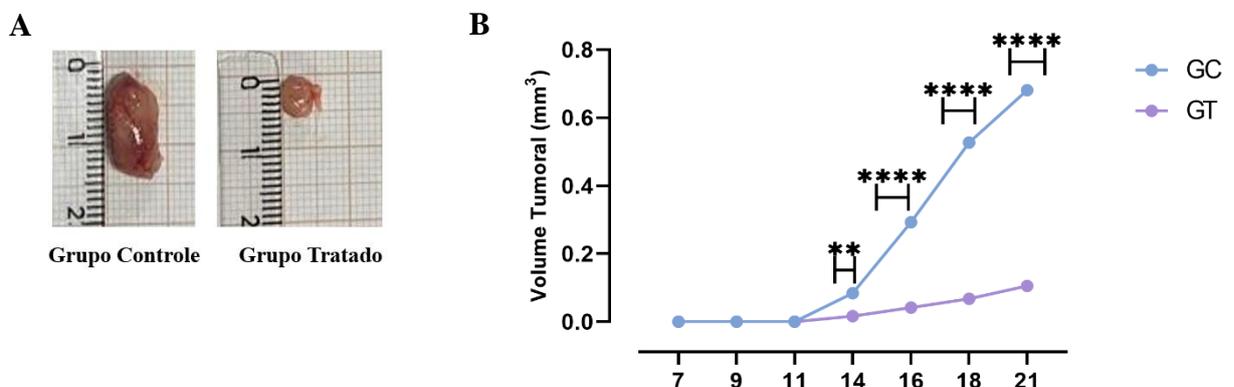
Fonte: Elaborada pela Autora, 2023.

Nota: Os tumores foram pesados após a eutanásia dos animais. Os dados foram considerados paramétricos, com diferença significativa pelo teste *T-Student*, $p < 0,0001$.

5.3. VOLUME TUMORAL

Além do peso, o volume tumoral de todos os tumores foi analisado, tendo demonstrado redução nos animais do grupo tratado com a imunoterapia de células dendríticas, quando comparado com os animais do grupo tumor sem tratamento.

Figura 11 - Volume tumoral



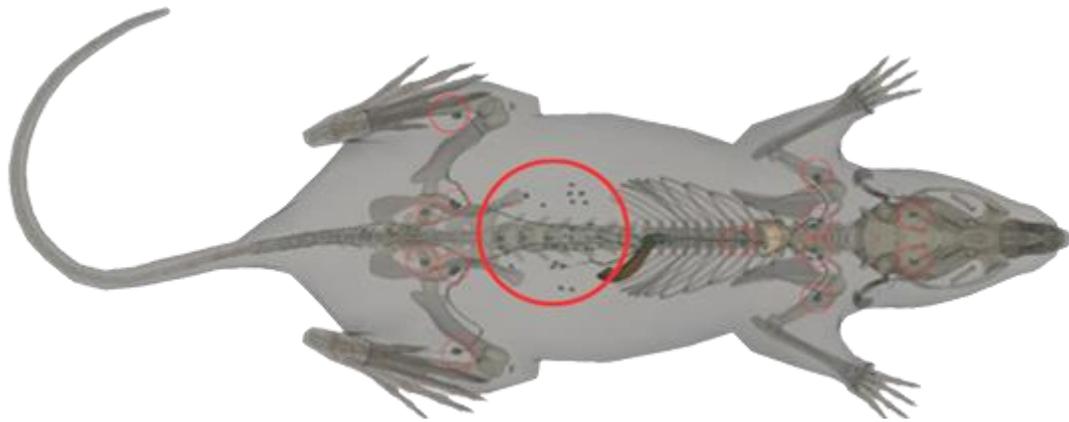
Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

Nota: (A) – Imagem dos tumores do grupo tumor sem tratamento e do grupo tumor tratado com a imunoterapia de DCs. (B) – Gráfico representativo da comparação do volume tumoral dos dois grupos. O volume tumoral foi significativo no dia 14 ($p = 0,0023$), dia 16 ($p < 0,0001$), dia 18 ($p < 0,0001$) e no dia 21 ($p < 0,0001$).

5.4. MIGRAÇÃO DAS DCs MARCADAS COM CFSE

Foi feita o acompanhamento da migração das DCs, podendo observa-las no dorso do animal logo após o tratamento, e ao passar dos dias acompanhar a migração destas células. Baseado na anatomia e na localização dos linfonodos presentes nos camundongos (Fig. 12), podemos ver que as DCs migraram para os linfonodos, com exceção do linfonodo sentinela (Fig. 13).

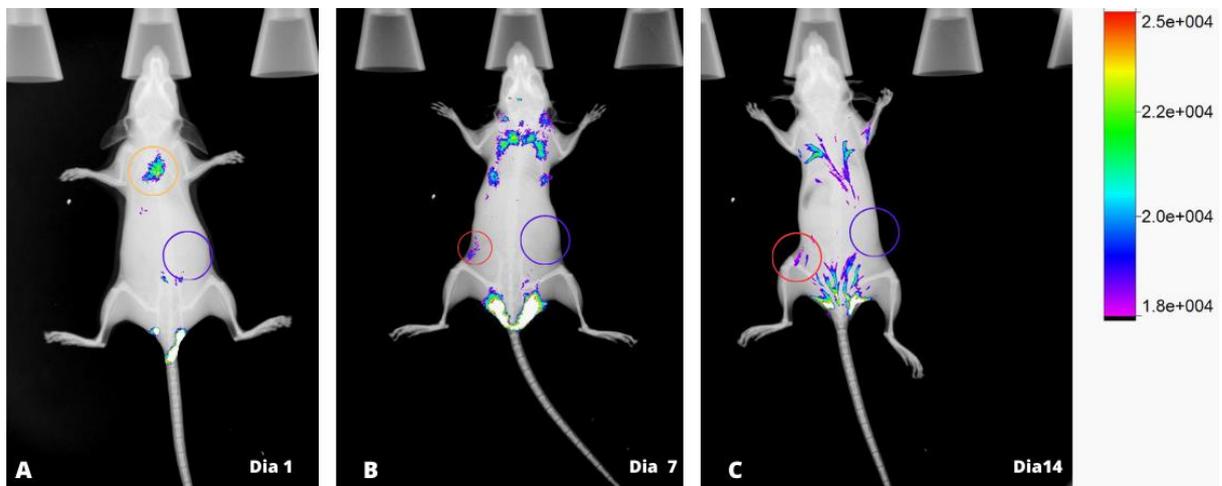
Figura 12 - Localização dos linfonodos



Fonte: Aplicativo 3D Rat Anatomy, 2023.

Nota: Os círculos em vermelho mostram a localização dos linfonodos no animal.

Figura 13 - Migração das DCs



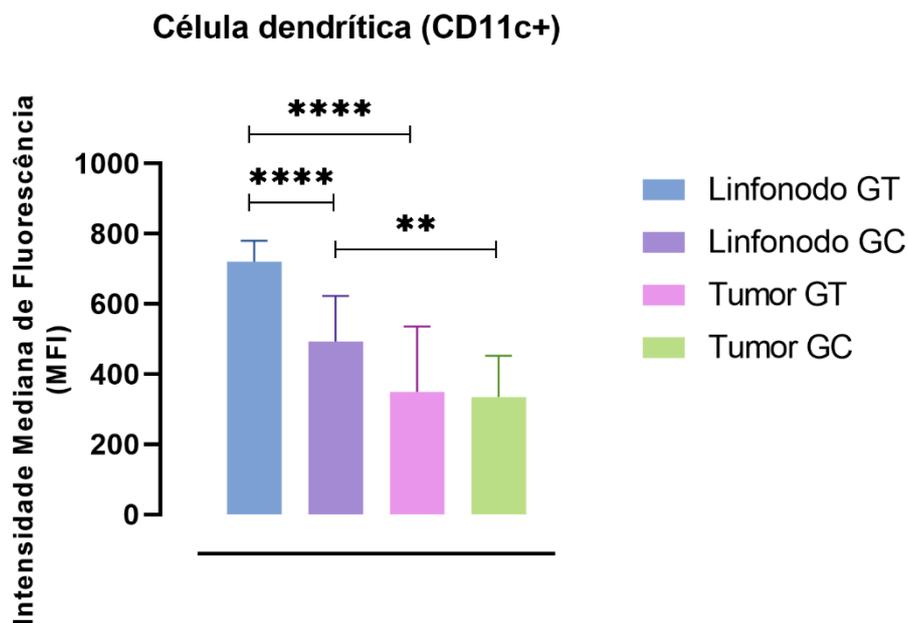
Fonte: Imagens obtidas pelo aparelho *In-Vivo MS FX PRO*.

Nota: Foi realizada a captura de imagens de raio-x e de imunofluorescência no dia 1, dia 7 e dia 14 após o tratamento com células dendríticas marcadas com CFSE. As imagens de raio-x e de imunofluorescência foram sobrepostas para obtenção das imagens ilustradas acima. (A) Imagem obtida logo após o tratamento. O círculo na cor laranja demonstra o local exato da aplicação das células dendríticas. (B) Imagem obtida sete dias após o

tratamento. (C) Imagem obtida 14 dias após o tratamento (momento antes da eutanásia). Círculos vermelhos - células dendríticas nos linfonodos inguinais. Círculo roxo - local do tumor.

Além das imagens *in-vivo* terem demonstrado que as DCs migraram para os linfonodos, esse resultado foi reafirmado através da análise da presença do marcador CD11c nos cortes histológicos dos linfonodos e tumores. Pode-se observar expressão significativa da marcação de CD11c no linfonodo do grupo Tratado em relação ao tumor do grupo Tratado, confirmando a maior presença das DCs no linfonodo. Além disso, foi visto que a imunoterapia conseguiu interferir na quantidade de DCs infiltrantes nos linfonodos, resultado este demonstrado pela significância estatística obtida da análise do linfonodo do grupo Tratado com o linfonodo do grupo controle. Outro dado que ajuda a confirmar a migração das DCs para os linfonodos é a ausência de significância estatística quando analisado os tumores dos dois grupos (Fig. 14). Apêndices A e B – Imagens de imunofluorescência da marcação de CD11c.

Figura 14 - Gráfico de barra da expressão de CD11c



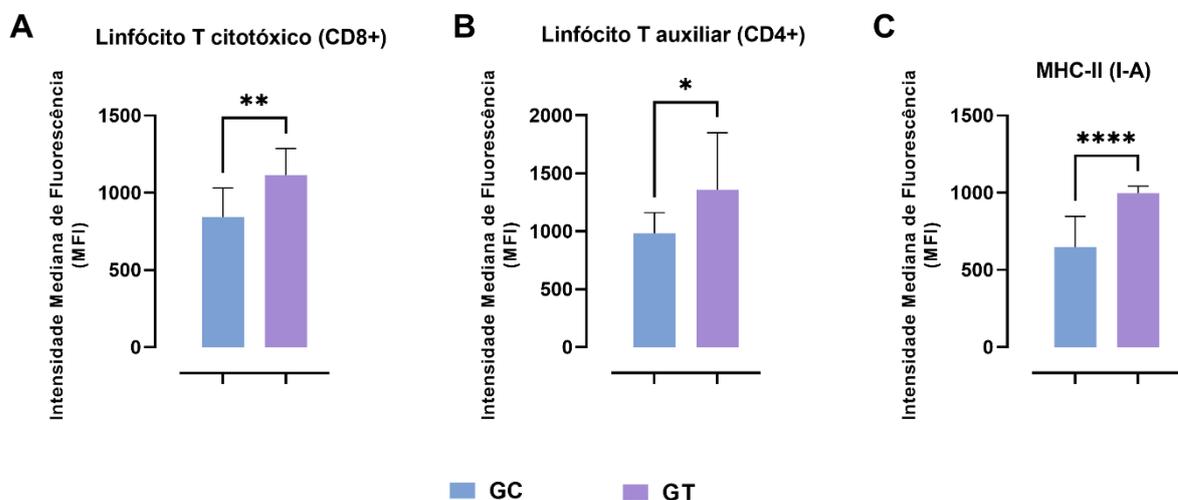
Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

Nota: Os dados foram testados quanto à normalidade, com posterior aplicação do pós teste *T-Student*, demonstrando significância estatística para a comparação do Linfonodo do Grupo Tratado (Linfonodo GT) com o Linfonodo do Grupo Controle (Linfonodo GC) ($p < 0,0001$). Além disso, foi observado significância na comparação do Linfonodo do Grupo Tratado com o Tumor do mesmo grupo ($p < 0,0001$) e do Linfonodo do grupo Controle com o Tumor do grupo Controle ($p = 0,0049$). A comparação entre os tumores dos dois grupos não demonstrou significância estatística ($p = 0,8166$).

5.5. ANÁLISE DA PRESENÇA DE LINFÓCITO T CITOTÓXICO, LINFÓCITO T AUXILIAR E MHC-II NOS LINFONODOS.

Após ter confirmado que as DCs migraram para os linfonodos, foram realizados cortes histológicos deste tecido para análise da expressão de CD4+, CD8+ e I-A[d]+, com possível observação da interação das DCs com os linfócitos. A análise demonstrou incremento significativo da expressão de CD8, CD4 e I-A no grupo de animais tratados com a imunoterapia de células dendríticas quando comparado à expressão desses marcadores nos linfonodos de animais com tumores sem tratamento (Fig. 15A, 15B e 15C). Apêndice C a E – Imagens de imunofluorescência da marcação de CD4+, CD8+ e I-A[d]++.

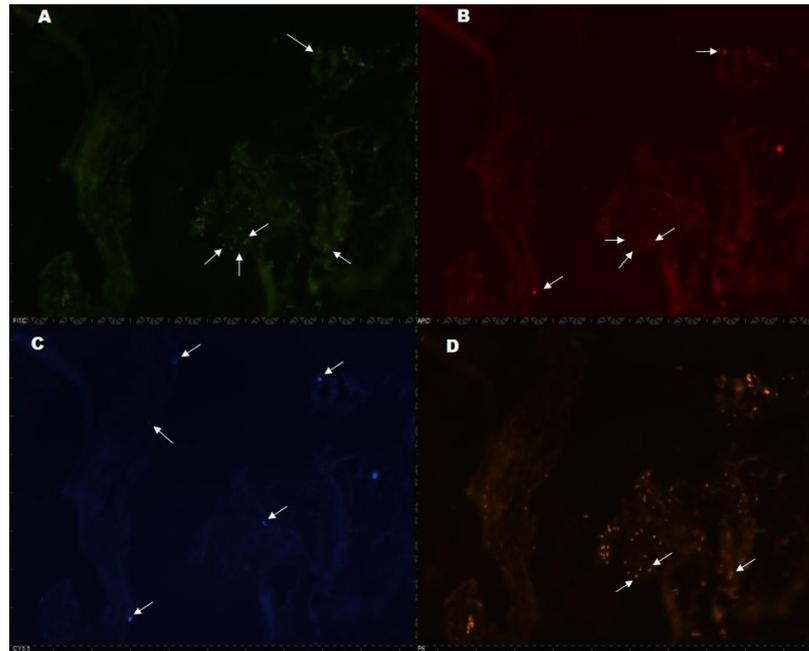
Figura 15 – Expressão de CD8, CD4 e I-A[d] nos linfonodos



Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

Nota: Gráficos representando a intensidade média de fluorescência (MFI) dos marcadores CD8, CD4 e I-A nos linfonodos de animais induzidos ao desenvolvimento tumoral com e sem tratamento com imunoterapia de DCs. Para todas as marcações foi aplicado teste de normalidade seguido do pós teste de *T Student*. (A) Expressão de CD8 nos linfonodos ($p= 0,0012$). (B) Expressão de CD4 nos linfonodos ($P= 0,0208$). (C) Expressão de I-A nos linfonodos ($p<0,0001$).

Figura 16 - Imagem de imunofluorescência para marcação de DCs, CD8, CD4 e IA



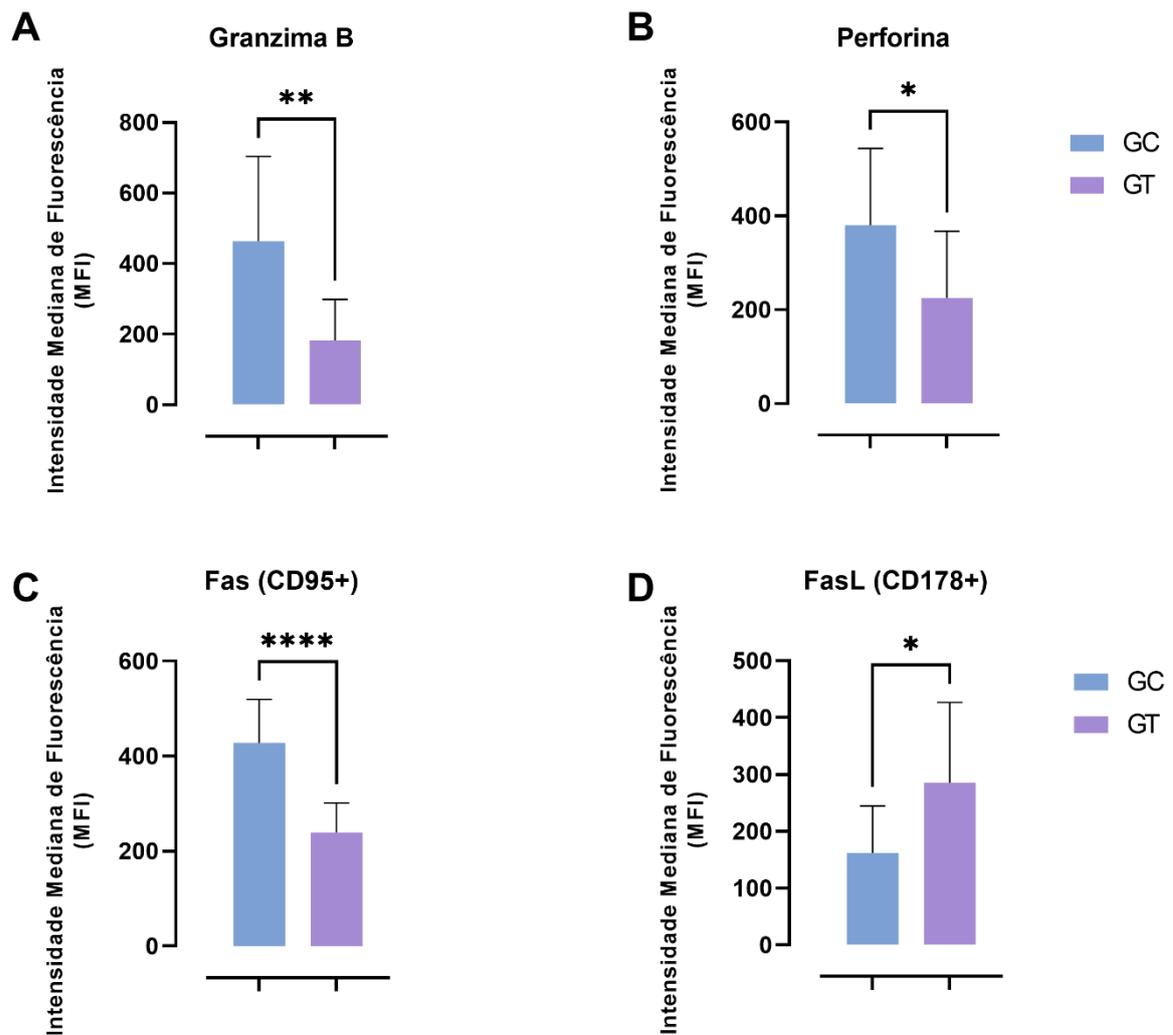
Fonte: Da Autora, 2023.

Nota: Imagens de imunofluorescência para visualização das DCs marcadas com CFSE, e para marcação de CD8, CD4 e I-A nos linfonodos de animais com tumor tratados com a imunoterapia de DCs. (A) – imagem para visualização das DCs. (B) – Imagem com marcação para CD8. (C) – Imagem com marcação para CD4. (D) – Imagem com marcação para I-A.

5.6. ANÁLISE DA PRESENÇA DE GRANZIMA B, PERFORINA, FAS (CD95) E FASL (CD178) NOS TUMORES

Foi observado menor expressão de perforina, Fas e granzima B no grupo de animais tratados com a imunoterapia de células dendríticas quando comparado com o grupo de animais sem tratamento. Além disso, foi observado maior expressão de FasL, no grupo de animais tratados em relação ao grupo tumor sem tratamento (Fig. 17). Apêndice F a I – Imagens de imunofluorescência da marcação de granzima B, perforina, Fas e FasL.

Figura 17 - Gráficos de barra da expressão de granzima B, Perforina, Fas e FasL



Fonte: Elaborado pela Autora, 2023.

Nota: Gráficos representativos da intensidade média de fluorescência de granzima B, perforina, CD95 e CD178.

(A) Gráfico de MFI de granzima B com $p=0,0014$. (B) Gráfico de MFI de perforina com $p=0,0215$. (C) Gráfico de MFI de CD95 com $p<0,0001$. (D) Gráfico de MFI de CD178 com $p=0,0161$.

6. DISCUSSÃO

Desde a descoberta das células dendríticas, o papel atribuído a elas era de apresentação de antígeno. Com o passar dos anos, as descobertas foram demonstrando que estas células poderiam ser ainda mais incríveis, atuando não somente na apresentação de antígeno como também, poderiam ser células citotóxicas, conseguindo eliminar inclusive as células tumorais. As descobertas apontam positividade para perforina e granzima B em mDCs, e positividade para o TRAIL em pDC (STARY *et al.*, 2007).

Pensando nesta outra característica relatada das DCs, tivemos a necessidade de identificar qual o destino e função desempenhada pelas DCs obtidas do protocolo de maturação descrito na metodologia deste projeto. Para explorar esta possibilidade, as DCs foram monitoradas após a sua aplicação, e foi observada a migração delas para os linfonodos, dado este que acompanha os estudos mais antigos que afirmam que as DCs ao capturarem o antígeno, entram nos vasos linfáticos e trafegam até a zona dos linfócitos T nos órgãos linfóides secundários, para iniciar a ativação do sistema imune adaptativo. Várias outras evidências demonstraram que a eficiência da migração das DCs, depende da via de administração e o estado de maturação destas células, sendo que pela via subcutânea, elas migram preferencialmente para os gânglios linfáticos e, essa migração depende destas células estarem maduras (DE WINDE; MUNDAY; ACTON, 2020; EGGERT *et al.*, 1999; RIDOLFI *et al.*, 2004), pois as “DCs imaturas são fortemente aderentes, enquanto as DCs maduras permanecem altamente móveis” (DE VRIES *et al.*, 2003).

Apesar dos nossos resultados serem de estudos em camundongos assim como esses outros já citados, estudos com humanos já foram feitos e ajudam a comprovar a capacidade de DCs maturadas *in vitro* de migrarem para os órgãos linfóides secundários se aplicados pela via subcutânea, demonstrando que a migração das DCs pode mudar drasticamente dependendo da via de administração (MORSE *et al.*, 1999).

Mesmo que os estudos tenham demonstrado que as mDC e pDCs podem migrar para o microambiente tumoral (STARY *et al.*, 2007), este achado não foi observado com as DCs aqui analisadas, que são DCs derivadas de monócitos. Entretanto, o volume tumoral dos animais tratados com a imunoterapia de DCs diminuiu de forma significativa, demonstrando que as DCs obtidas pelo protocolo de maturação aqui descrita, atua na diminuição do volume tumoral de forma indireta, exercendo a primeira função por elas descobertas: a de apresentação de antígenos. Além deste resultado, outros trabalhos publicados pelo nosso grupo, comprovam que as DCs aplicadas seja de forma preventiva como terapêutica, possui alta capacidade de redução

do volume tumoral como também de prevenir metástases (SILVA *et al.*, 2021; VIEIRA *et al.*, 2021).

Além da observação da migração das DCs para os linfonodos, as análises de CD11c, molécula que caracteriza as DCs, ajudam a comprovar a presença destas células nos linfonodos. Não bastando elas terem migrado para este órgão, o aumento de MHC-II ajuda a comprovar a função de ativação de linfócitos, e além deste aumento, os linfócitos T CD8+ e CD4+ também se encontram aumentados. Além disso, é notável a interação dos linfócitos com as DCs, pela proximidade observada nas imagens de imunofluorescência.

Após ter observado que as DCs estariam exercendo a função de apresentação de antígenos, foi investigado os mecanismos efetores indiretos destas células por trás da diminuição do volume tumoral.

Após a ativação, os linfócitos migram para o local da infecção para assim montarem uma resposta imunitária, principalmente pela secreção direcionada de várias proteínas líticas como perforina e granzima (BASU *et al.*, 2016; FINLAY; CANTRELL, 2011). Apoiando-se na ideia de que essas proteínas seriam um mecanismo preferencial dos linfócitos T CD8+ no combate ao câncer, foi pesquisado a presença das duas no microambiente tumoral. Diferentemente do que era esperado, a expressão de perforina e granzima B foi menor nos grupos tratados com a imunoterapia de DCs. Apesar deste resultado ser surpreendente, outros autores já investigaram o papel da granzima B em danos autoinflingidos. Esses autores afirmam que, a produção da granzima e perforina é um risco para a célula que a produz, pois caso acontece o vazamento destes grânulos dentro da célula produtora, ocorre clivagem de alvos citoplasmáticos, mitocondriais e nucleares, resultando na apoptose da célula (LOVO; ZHANG; ASHTON-RICKARDT, 2012; SILVERMAN *et al.*, 2001; SULA KARRECI *et al.*, 2017). Além da comprovação do risco de apoptose, outros autores comprovaram que camundongos com deficiência de granzima B, possuem maior capacidade de eliminação de células tumorais em comparação com camundongos selvagens. Isso se baseia no fato de que linfócitos T regulatórios (Treg) murinos quando ativados expressam elevados níveis de granzima B, e fazem utilização desta proteína para suprimir as respostas imunes antitumorais, pela capacidade dessas células induzirem a morte de linfócitos T CD8+ e NK, assim como de outras células imunes, pela via dependente da granzima B e perforina (CAO *et al.*, 2007; GONDEK *et al.*, 2005; GROSSMAN *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2006). Apesar de neste estudo não ter sido avaliado o infiltrado de células Treg, outro projeto realizado pelo grupo de pesquisa, utilizando o mesmo modelo animal, mesma linhagem de células tumorais e o mesmo protocolo de maturação das DCs, afirma redução da expressão do fator de transcrição FOXP3, nos tumores de animais

tratados com a imunoterapia de DCs (DA SILVA *et al.*, 2020). Sugerindo que a diminuição de perforina e principalmente da granzima B aqui observada, pode ser devido a redução da presença de células Treg no microambiente tumoral.

Baseado no fato de que houve diminuição do volume tumoral, mesmo com a redução da granzima B e perforina, fomos avaliar outra via de indução da morte mediada pelos linfócitos T citotóxicos: a via de receptores da morte - Fas e FasL. Pois, segundo OSÍNSKA; POPKO; DEMKOW, 2014, em condições nos quais a via de granzima e perforina é bloqueada, a via de receptores de Fas/FasL tem ação mais detectável. Apesar deste estudo, os trabalhos avaliando esta via são poucos e muito antigos.

Alguns estudos mais antigos relatam o aumento da expressão do FasL em células tumorais do cólon (BENNETT *et al.*, 2001), melanoma (M. HAHNE *et al.*, 1996) e pulmão (NIEHANS *et al.*, 1997), e relacionam esse aumento com a progressão tumoral, sendo este justificável pelo contra-ataque das células tumorais que expressam o FasL contra as células imunes com expressão de Fas (KIM *et al.*, 2004; M. HAHNE *et al.*, 1996).

Apesar destes relatos, outros estudos feitos no ano de 1996 e 2019 afirmaram que camundongos com deficiência no Fas tiveram retardo no crescimento tumoral, tanto para melanoma quanto para o carcinoma hepatocelular (CUBERO *et al.*, 2019; M. HAHNE *et al.*, 1996). É importante ressaltar que Fas é uma proteína expressa em várias células de origem linfóide e não linfóide, bem como em muitas células malignas e, o FasL é expresso prevalentemente em linfócitos B, linfócitos T ativados (linfócitos T citotóxicos e linfócitos T infiltrantes de tumores), células NK e macrófagos (KIM *et al.*, 2004; M. HAHNE *et al.*, 1996; NAGATA e GOLSTEIN, 1995). Os nossos resultados demonstram que a imunoterapia de DCs consegue aumentar de forma significativa a expressão de FasL nos tumores e, reduzir o volume tumoral dos animais, indicando que, este aumento do FasL pode ser devido à presença de linfócitos T CD8+ no microambiente tumoral (dado não analisado neste projeto) e não pela expressão desta molécula pelas células tumorais. Apesar do infiltrado de células imunes no microambiente tumoral não ter sido analisado neste projeto, outros projetos do grupo de pesquisa confirmam maior presença de linfócitos T CD8+ no microambiente tumoral, após o tratamento com imunoterapia de DCs (SILVA *et al.*, 2021). Até mesmo porque segundo PEYVANDI *et al.*, 2015, a deficiência de FasL auxilia no acúmulo de células supressoras, como macrófagos associados a tumores e células Treg, o que consequentemente se correlaciona com a redução da sobrevivência dos camundongos. Corroborando a este resultado, tivemos diminuição do Fas, reforçando a ideia que, a deficiência desta está relacionada positivamente com o controle do desenvolvimento tumoral.

Contraditoriamente à maioria dos estudos que investigaram as funções efetoras dos linfócitos T CD8+, aqui conseguimos demonstrar que a produção e utilização de grânulos líticos, mais especificamente granzima B e perforina, não foi um mecanismo de indução de morte preferencial utilizado pelos linfócitos T no combate ao modelo de câncer estudado, mesmo após o tratamento com a imunoterapia de DCs. Este resultado pode ser devido à limitação do estudo em estudar esses grânulos apenas no fim do experimento, pois é possível que tais valores possam variar em diferentes momentos. Outra limitação deste trabalho é não abordar outras vias de administração da imunoterapia e também não utilizar mais de um tipo de linhagem celular de câncer de mama como modelo experimental para reforçar ou refutar os resultados obtidos.

7. CONCLUSÃO

No modelo de maturação e diferenciação das células dendríticas utilizadas neste estudo obtivemos resultados que nos permitem concluir que:

- a) Essas células não migram para o tumor, mas sim para os linfonodos, levando a um aumento da expressão do MHC-II, CD4 e CD8 neste órgão.
- b) Além disso, a imunoterapia com essas células leva a diminuição da expressão de Fas, granzima B e perforina assim como, aumento da expressão do FasL quando avaliado os tumores ao fim do período experimental.

Esses dados nos impulsionam na realização de projetos futuros, pensando em novos protocolos que potencializam ainda mais essa característica desempenhada pelas DCs: apresentação de antígenos.

REFERÊNCIAS

- BASU, R.; WHITLOCK, B. M.; HUSSON, J.; LE FLOC'H, A.; JIN, W.; OYLER-YANIV, A.; DOTIWALA, F.; GIANNONE, G.; HIVROZ, C.; BIAIS, N.; LIEBERMAN, J.; KAM, L. C.; HUSE, M. Cytotoxic T cells use mechanical force to potentiate target cell killing. **Cell**, v. 165, n. 1, p. 100–110, 24 mar. 2016.
- BARRETO-NETO, N. J. D. S.; PINHEIRO, A. B.; OLIVEIRA, J. F.; CRUSOÉ, N. S. D. R.; BERTRAND, S. A. B.; MACHADO, M. C. M.; PINTO, R. M. O.; CARVALHO-JUNIOR, J. D.; MACHADO, C. A. C. Perfil epidemiológico dos subtipos moleculares de carcinoma ductal da mama em população de pacientes em Salvador, Bahia. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 24, n. 4, p. 98–102, 12 set. 2014.
- BARRY, M.; BLEACKLEY, R. C. Cytotoxic T Lymphocytes: All Roads Lead to Death. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 6, p. 401–409, jun. 2002.
- BENNETT, M.; O'CONNELL, J.; HOUSTON, A.; KELLY, J.; O'SULLIVAN, G.; COLLINS, J.; SHANAHAN, F. Fas ligand upregulation is an early event in colonic carcinogenesis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, n. 8, p. 598–604, ago. 2001.
- BOUDREAU, J. E.; BONEHILL, A.; THIELEMANS, K.; WAN, Y. Engineering Dendritic Cells to Enhance Cancer Immunotherapy. **Molecular Therapy**, v. 19, n. 5, p. 841–853, maio 2011.
- CAO, X.; CAI, S. F.; FEHNIGER, T. A.; SONG, J.; COLLINS, L. I.; PIWNICA-WORMS, D. R.; LEY, T. J. Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. **Immunity**, v. 27, n. 4, p. 635–646, 26 out. 2007.
- CHEN, D. S.; MELLMAN, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 1–10, 25 jul. 2013.
- CHEN, L.; FLIES, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 4, p. 227–242, abr. 2013.
- CORADO, J. Células dendríticas, respuesta inmunitaria y señales de peligro. **Gaceta Médica de Caracas**, v. 113, n. 4, p. 474–484, dez. 2005.
- CUBERO, F. J.; WOITOK, M. M.; ZOUBEK, M. E.; DE BRUIN, A.; HATTING, M.; TRAUTWEIN, C. Disruption of the FasL/Fas axis protects against inflammation-derived tumorigenesis in chronic liver disease. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 2, p. 115, 8 fev. 2019.
- DA SILVA, S. F. M.; CUNHA, A.; MURTA, E. F. C.; MICHELIN, M. A. Different Roles of Helper T Lymphocytes during Dendritic Cells Vaccine in Experimental Breast Cancer. **Indian Journal of Experimental Biology (IJEB)**, v. 60, n. 06, p. 375–385, 3 jun. 2022.
- DEL PRETE, A.; SALVI, V.; SORIANI, A.; LAFFRANCHI, M.; SOZIO, F.; BOSISIO, D.; SOZZANI, S. Dendritic cell subsets in cancer immunity and tumor antigen sensing. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 20, n. 5, p. 432–447, maio 2023.
- DE VRIES, I. J. M.; KROOSHOP, D. J. E. B.; SCHARENBERG, N. M.; LESTERHUIS, W. J.; DIEPSTRA, J. H. S.; VAN MUIJEN, G. N. P.; STRIJK, S. P.; RUERS, T. J.;

BOERMAN, O. C.; OYEN, W. J. G.; ADEMA, G. J.; PUNT, C. J. A.; FIGDOR, C. G. Effective Migration of Antigen-pulsed Dendritic Cells to Lymph Nodes in Melanoma Patients Is Determined by Their Maturation State¹². **Cancer Research**, v. 63, n. 1, p. 12–17, 1 jan. 2003.

BROWN, J. S.; AMEND, S. R.; AUSTIN, R. H.; GATENBY, R. A.; HAMMARLUND, E. U.; PIENTA, K. J. Updating the Definition of Cancer. **Molecular Cancer Research**, v. 21, n. 11, p. 1142–1147, 1 nov. 2023.

DE WINDE, C. M.; MUNDAY, C.; ACTON, S. E. Molecular mechanisms of dendritic cell migration in immunity and cancer. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 209, n. 4, p. 515–529, 2020.

EGGERT, A. A. O.; SCHREURS, M. W. J.; BOERMAN, O. C.; OYEN, W. J. C.; DE BOER, A. J.; PUNT, C. J. A.; FIGDOR, C. G.; ADEMA, G. J. Biodistribution and Vaccine Efficiency of Murine Dendritic Cells Are Dependent on the Route of Administration¹. **Cancer Research**, v. 59, n. 14, p. 3340–3345, 15 jul. 1999.

EMENS, L. A. Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, v. 24, n. 3, p. 511–520, 1 fev. 2018.

FINLAY, D.; CANTRELL, D. A. Metabolism, Migration and Memory in Cytotoxic T Cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 2, p. 109–117, fev. 2011.

GARDNER, A.; DE MINGO PULIDO, Á.; RUFFELL, B. Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00924>>. Acesso em: 15 ago. 2023.

GODOY-TENA, G.; BALLESTAR, E. Epigenetics of Dendritic Cells in Tumor Immunology. **Cancers**, v. 14, n. 5, p. 1179, 24 fev. 2022.

GONDEK, D. C.; LU, L.-F.; QUEZADA, S. A.; SAKAGUCHI, S.; NOELLE, R. J. Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4+CD25+ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism¹. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 4, p. 1783–1786, 15 fev. 2005.

GROSSMAN, W. J.; VERBSKY, J. W.; BARCHET, W.; COLONNA, M.; ATKINSON, J. P.; LEY, T. J. Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 589–601, 1 out. 2004.

HACKSTEIN, H.; THOMSON, A. W. Dendritic Cells: Emerging Pharmacological Targets of Immunosuppressive Drugs. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 1, p. 24–35, jan. 2004.

HAHNE, M. et al., Activated B cells express functional Fas ligand. **European Journal of Immunology**. 1996.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/como-surge-o-cancer>, 2023.

JANSSEN, L. M. E. et al. The immune system in cancer metastasis: friend or foe? **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v. 5, p. 79, 17 out. 2017.

KALB, M. L.; GLASER, A.; STARY, G.; KOSZIK, F.; STINGL, G. TRAIL+ Human Plasmacytoid Dendritic Cells Kill Tumor Cells In Vitro: Mechanisms of Imiquimod- and IFN- α -Mediated Antitumor Reactivity. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 4, p. 1583–1591, 15 fev. 2012.

KIM, R.; EMI, M.; TANABE, K.; UCHIDA, Y.; TOGE, T. The Role of Fas Ligand and Transforming Growth Factor β in Tumor Progression. **Cancer**, v. 100, n. 11, p. 2281–2291, 2004.

LEE, J.; DIECKMANN, N. M. G.; EDGAR, J. R.; GRIFFITHS, G. M.; SIEGEL, R. M. Fas Ligand localizes to intraluminal vesicles within NK cell cytolytic granules and is enriched at the immune synapse. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 6, n. 2, p. 312–321, 11 abr. 2018.

LIU, J.; ZHANG, X.; CHENG, Y.; CAO, X. Dendritic Cell Migration in Inflammation and Immunity. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 18, n. 11, p. 2461–2471, nov. 2021.

LOVO, E.; ZHANG, M.; ASHTON-RICKARDT, P. G. Serine Protease Inhibitor 6 is required to protect dendritic cells from the kiss of death. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 188, n. 3, p. 1057–1063, 1 fev. 2012.

ŁUKASIEWICZ, S.; CZECZELEWSKI, M.; FORMA, A.; BAJ, J.; SITARZ, R.; STANISŁAWEK, A. Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. **Cancers**, v. 13, n. 17, p. 4287, 25 ago. 2021.

MARTÍNEZ-LOSTAO, L.; ANEL, A.; PARDO, J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 22, p. 5047–5056, 12 nov. 2015.

MILLER, FR. Tumor subpopulation interactions in metastasis. *Invasion Metastasis*. 1983;3(4):234-42.

MIZUTANI, K.; KAWAKAMI, K.; FUJITA, Y.; KATO, T.; TAKAI, M.; KATO, D.; IINUMA, K.; KOIE, T.; ITO, M. Gene Therapy of Prostate Cancer Using Liposomes Containing Perforin Expression Vector Driven by the Promoter of Prostate-Specific Antigen Gene. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1442, 27 jan. 2022.

MORSE, M. A.; COLEMAN, R. E.; AKABANI, G.; NIEHAUS, N.; COLEMAN, D.; LYERLY, H. K. Migration of Human Dendritic Cells after Injection in Patients with Metastatic Malignancies1. **Cancer Research**, v. 59, n. 1, p. 56–58, 1 jan. 1999.

MUNHOZ, R. R.; POSTOW, M. A. Recent advances in understanding antitumor immunity. **F1000Research**, v. 5, p. 2545, 20 out. 2016.

NAGATA, S. and GOLSTEIN, P. The Fas Death Factor. **Science**. v. 267. 1995

NANDA, N. K.; BIRCH, L.; GREENBERG, N. M.; PRINS, G. S. MHC Class I and Class II Molecules Are Expressed in Both Human and Mouse Prostate Tumor Microenvironment. **The Prostate**, v. 66, n. 12, p. 1275–1284, 1 set. 2006.

NIEHANS, G. A.; BRUNNER, T.; FRIZELLE, S. P.; LISTON, J. C.; SALERNO, C. T.; KNAPP, D. J.; GREEN, D. R.; KRATZKE, R. A. Human Lung Carcinomas Express Fas Ligand. **Cancer Research**, v. 57, n. 6, p. 1007–1012, 15 mar. 1997.

OSIŃSKA, I.; POPKO, K.; DEMKOW, U. Perforin: An Important Player in Immune Response. **Central-European Journal of Immunology**, v. 39, n. 1, p. 109, 2014.

PEYVANDI, S.; BUART, S.; SAMAH, B.; VÉTIZOU, M.; ZHANG, Y.; DURRIEU, L.; POLROT, M.; CHOUAIB, S.; BENIHOUD, K.; LOUACHE, F.; KARRAY, S. Fas Ligand Deficiency Impairs Tumor Immunity by Promoting an Accumulation of Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells. **Cancer Research**, v. 75, n. 20, p. 4292–4301, 14 out. 2015.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. **Current Protocols in Immunology**, v. 39, n. 1, p. 1–16, 2000.

RAWAT, K.; TEWARI, A.; LI, X.; MARA, A. B.; KING, W. T.; GIBBINGS, S. L.; NNAM, C. F.; KOLLING, F. W.; LAMBRECHT, B. N.; JAKUBZICK, C. V. CCL5-producing migratory dendritic cells guide CCR5+ monocytes into the draining lymph nodes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 220, n. 6, p. e20222129, 22 mar. 2023.

RIDOLFI, R.; RICCOBON, A.; GALASSI, R.; GIORGETTI, G.; PETRINI, M.; FIAMMENGHI, L.; STEFANELLI, M.; RIDOLFI, L.; MORETTI, A.; MIGLIORI, G.; FIORENTINI, G. Evaluation of in Vivo Labelled Dendritic Cell Migration in Cancer Patients. **Journal of Translational Medicine**, v. 2, n. 1, p. 27, 30 jul. 2004.

ROCK, K. L.; REITS, E.; NEEFJES, J. Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. **Trends in immunology**, v. 37, n. 11, p. 724–737, nov. 2016.

ROCKETPIXELS_CIONIC. **Outubro Rosa - Mês de prevenção ao câncer de mama.Cionc** 1 out. 2020. Disponível em: <<https://cionc.com.br/cionc/outubro-rosa-mes-de-prevencao-ao-cancer-de-mama/>>. Acesso em: 9 nov. 2023.

SADEGHZADEH, M. et al. Dendritic cell therapy in cancer treatment; the state-of-the-art. **Life Sciences**, v. 254, p. 117580, 2020.

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, N.; RIOL-BLANCO, L.; DE LA ROSA, G.; PUIG-KRÖGER, A.; GARCÍA-BORDAS, J.; MARTÍN, D.; LONGO, N.; CUADRADO, A.; CABAÑAS, C.; CORBÍ, A. L.; SÁNCHEZ-MATEOS, P.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, J. L. Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells. **Blood**, v. 104, n. 3, p. 619–625, 1 ago. 2004.

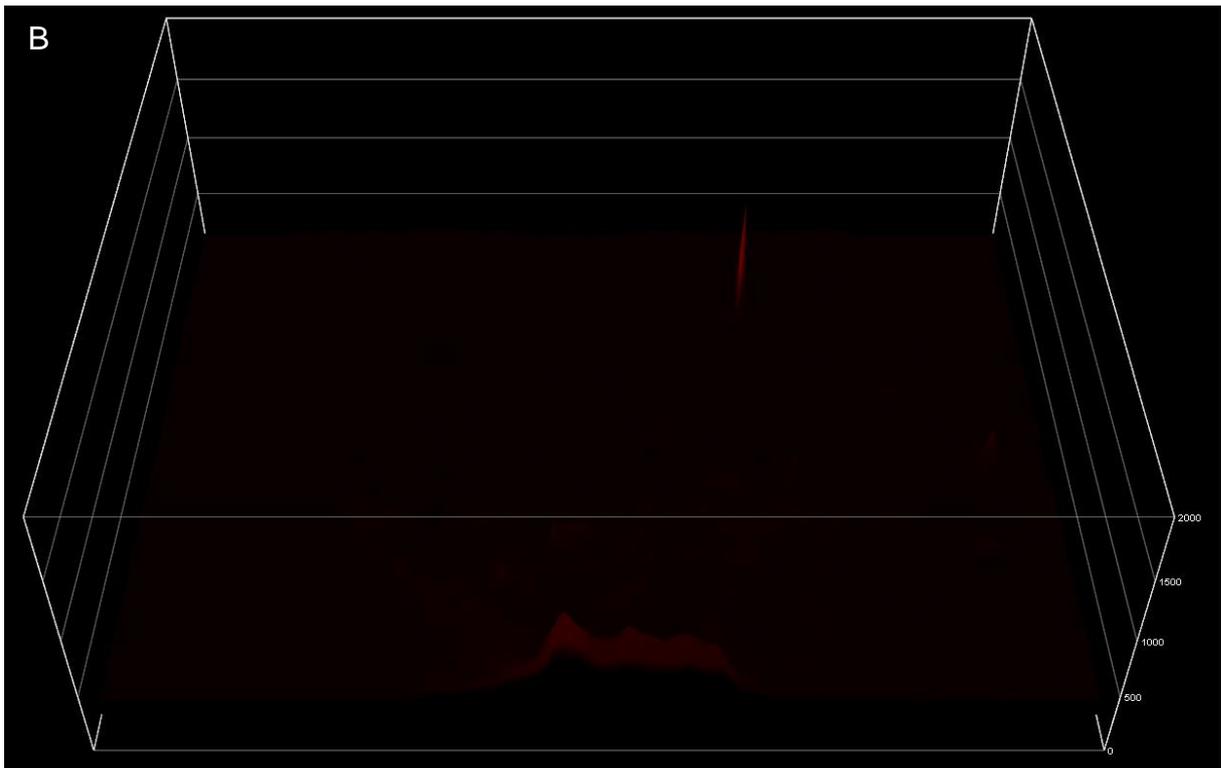
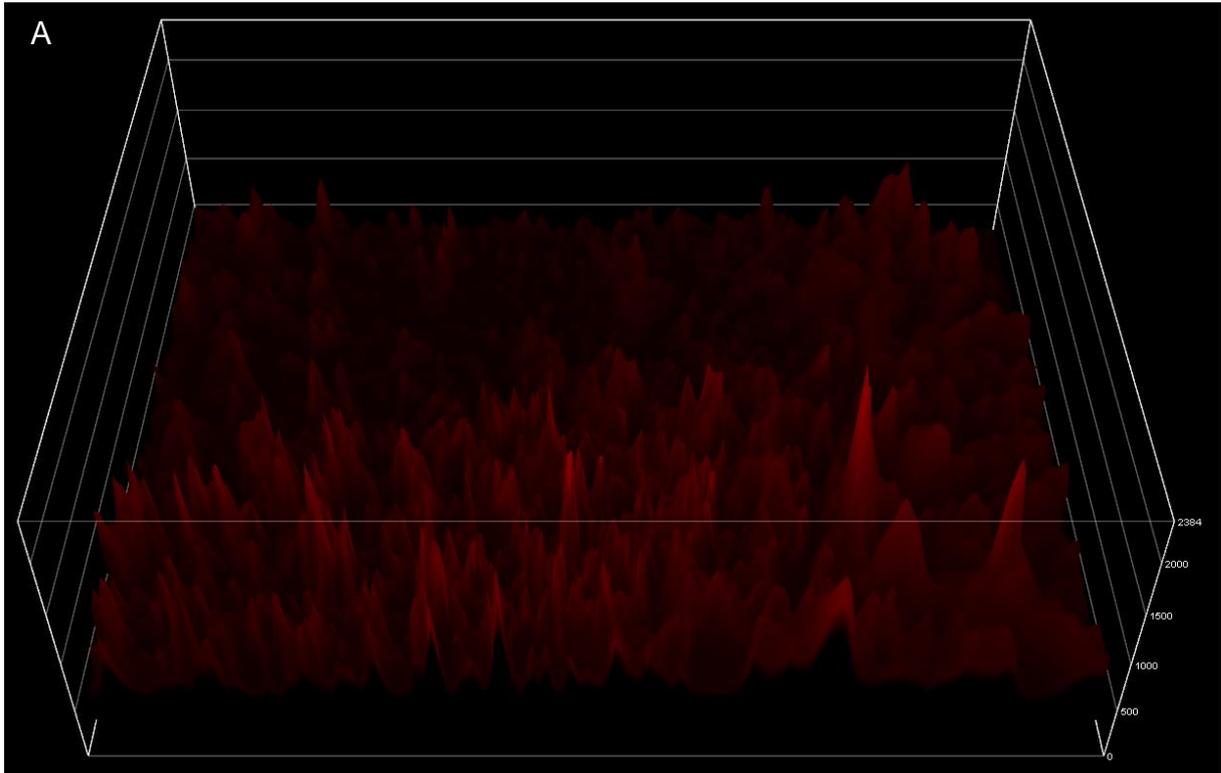
SERRA, K. P.; RAMALHO, S.; TORRESAN, R.; VASSALLO, J.; SARIAN, L. O. Z.; SILVA, G. R. D. P.; DERCHAIN, S. Nova classificação dos carcinomas da mama: procurando o luminal A. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, n. 12, p. 575–580, dez. 2014.

- SILVA, S. F. M. da; MURTA, E. F. C.; MICHELIN, M. A. Dynamic Analysis of the Immunological Response of Balb/c Mice with Experimental Breast Cancer Submitted to Immunotherapy Treatment of Dendritic Cell/ Análise Dinâmica Da Resposta Imunológica de Camundongos Balb/c Com Câncer de Mama Experimental Submetido a Imunoterapia de Células Dendríticas. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 7, p. 66648–66666, 6 jul. 2021.
- SILVA, E. V. D. S.; NASCENTE, E. D. P.; MIGUEL, M. P.; ALVES, C. E. F.; MOURA, V. M. B. D. D. Elucidating Tumor Immunosurveillance and Immunoediting: A Comprehensive Review. **Ciência Animal Brasileira**, v. 22, p. e-68544, 2021.
- SILVERMAN, G. A.; BIRD, P. I.; CARRELL, R. W.; CHURCH, F. C.; COUGHLIN, P. B.; GETTINS, P. G. W.; IRVING, J. A.; LOMAS, D. A.; LUKE, C. J.; MOYER, R. W.; PEMBERTON, P. A.; REMOLD-O'DONNELL, E.; SALVESEN, G. S.; TRAVIS, J.; WHISSTOCK, J. C. The Serpins Are an Expanding Superfamily of Structurally Similar but Functionally Diverse Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 36, p. 33293–33296, 7 set. 2001.
- SORDO-BAHAMONDE, C.; LORENZO-HERRERO, S.; PAYER, Á. R.; GONZALEZ, S.; LÓPEZ-SOTO, A. Mechanisms of Apoptosis Resistance to NK Cell-Mediated Cytotoxicity in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 3726, jan. 2020.
- STARY, G.; BANGERT, C.; TAUBER, M.; STROHAL, R.; KOPP, T.; STINGL, G. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p. 1441–1451, 29 maio 2007.
- SULA KARRECI, E.; ESKANDARI, S. K.; DOTIWALA, F.; ROUTRAY, S. K.; KURDI, A. T.; ASSAKER, J. P.; LUCKYANCHYKOV, P.; MIHALI, A. B.; MAAROUF, O.; BORGES, T. J.; ALKHUHDHAYRI, A.; PATEL, K. R.; RADWAN, A.; GHOBRIAL, I.; MCGRATH, M.; CHANDRAKER, A.; RIELLA, L. V.; ELYAMAN, W.; ABDI, R.; LIEBERMAN, J.; AZZI, J. Human regulatory T cells undergo self-inflicted damage via granzyme pathways upon activation. **JCI Insight**, v. 2, n. 21, p. e91599, [s.d.]
- TIBERIO, L. et al. Chemokine and chemotactic signals in dendritic cell migration review-article. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 15, n. 4, 2018.
- 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.
- VOSKOBOINIK, I.; WHISSTOCK, J. C.; TRAPANI, J. A. Perforin and Granzymes: Function, Dysfunction and Human Pathology. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 6, p. 388–400, jun. 2015.
- WU, J.; LI, S.; YANG, Y.; ZHU, S.; ZHANG, M.; QIAO, Y.; LIU, Y.-J.; CHEN, J. TLR-activated plasmacytoid dendritic cells inhibit breast cancer cell growth in vitro and in vivo. **Oncotarget**, v. 8, n. 7, p. 11708–11718, 28 dez. 2016.
- WU, Q.; MA, X.; JIN, Z.; NI, R.; PAN, Y.; YANG, G. Zhuidu Formula suppresses the migratory and invasive properties of triple-negative breast cancer cells via dual signaling

pathways of RhoA/ROCK and CDC42/MRCK. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 315, p. 116644, 28 out. 2023.

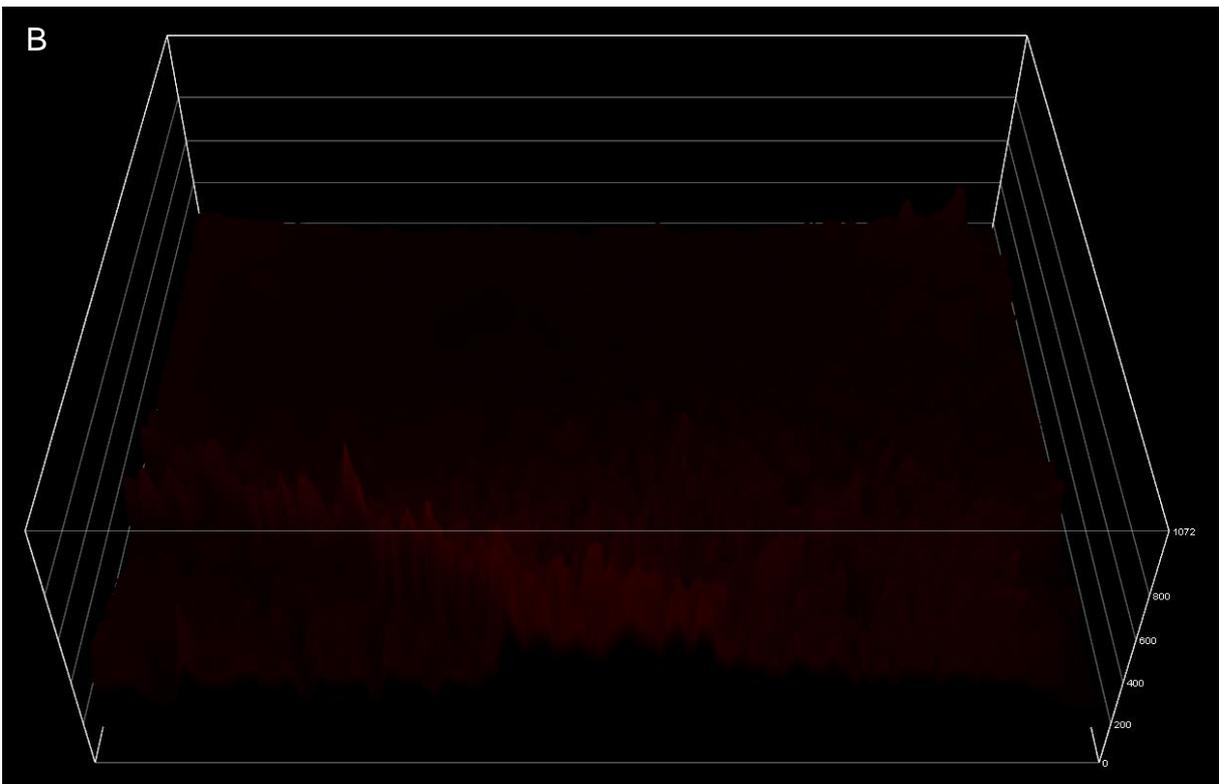
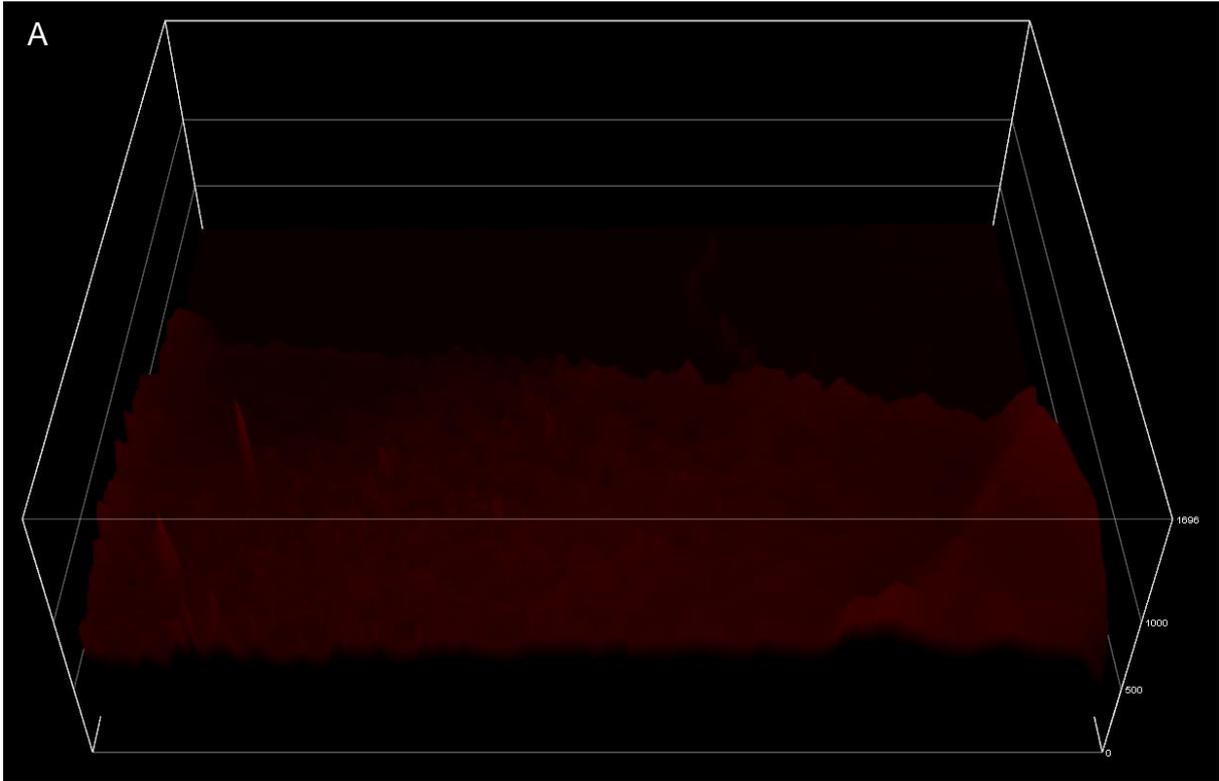
YIN, L. et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research : BCR**, v. 22, p. 61, 2020.

ZHAO, D.-M.; THORNTON, A. M.; DIPAOLO, R. J.; SHEVACH, E. M. Activated CD4⁺CD25⁺ T cells selectively kill B lymphocytes. **Blood**, v. 107, n. 10, p. 3925–3932, 15 maio 2006.

APÊNDICE A – Imagens de imunofluorescência de CD11c nos linfonodos.

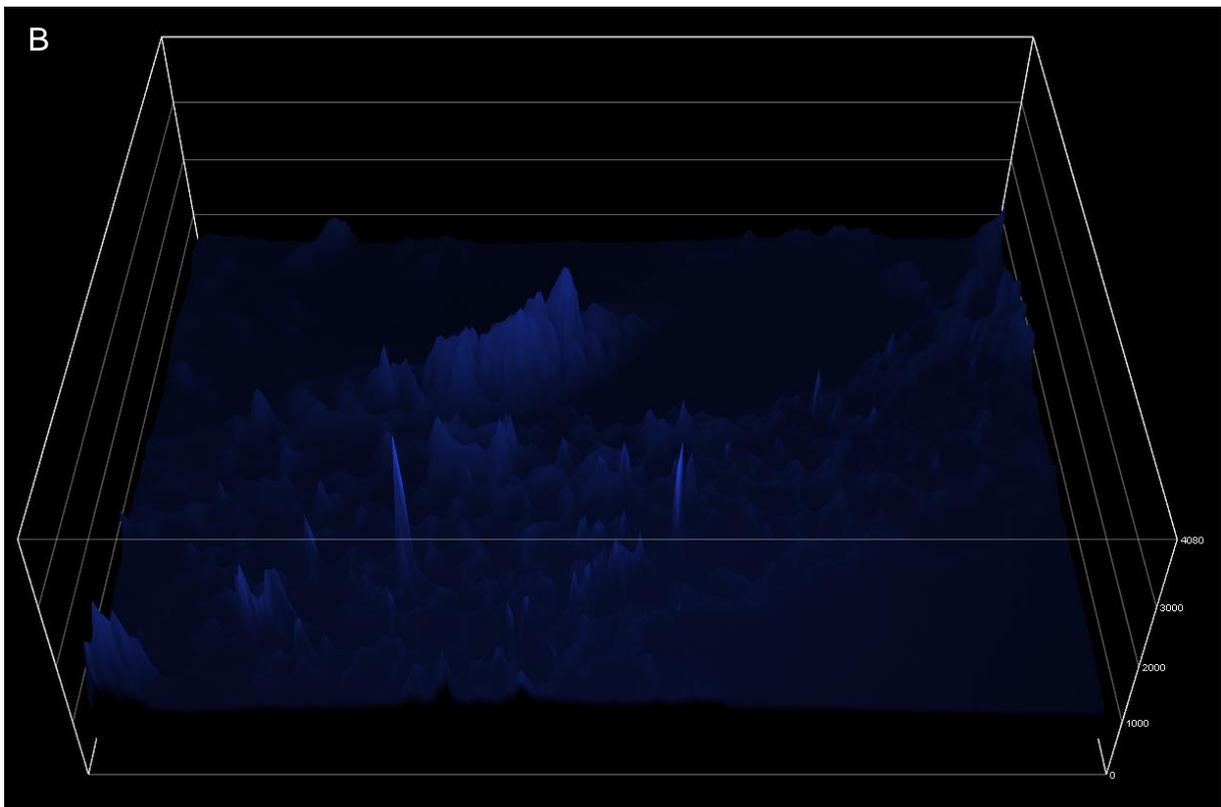
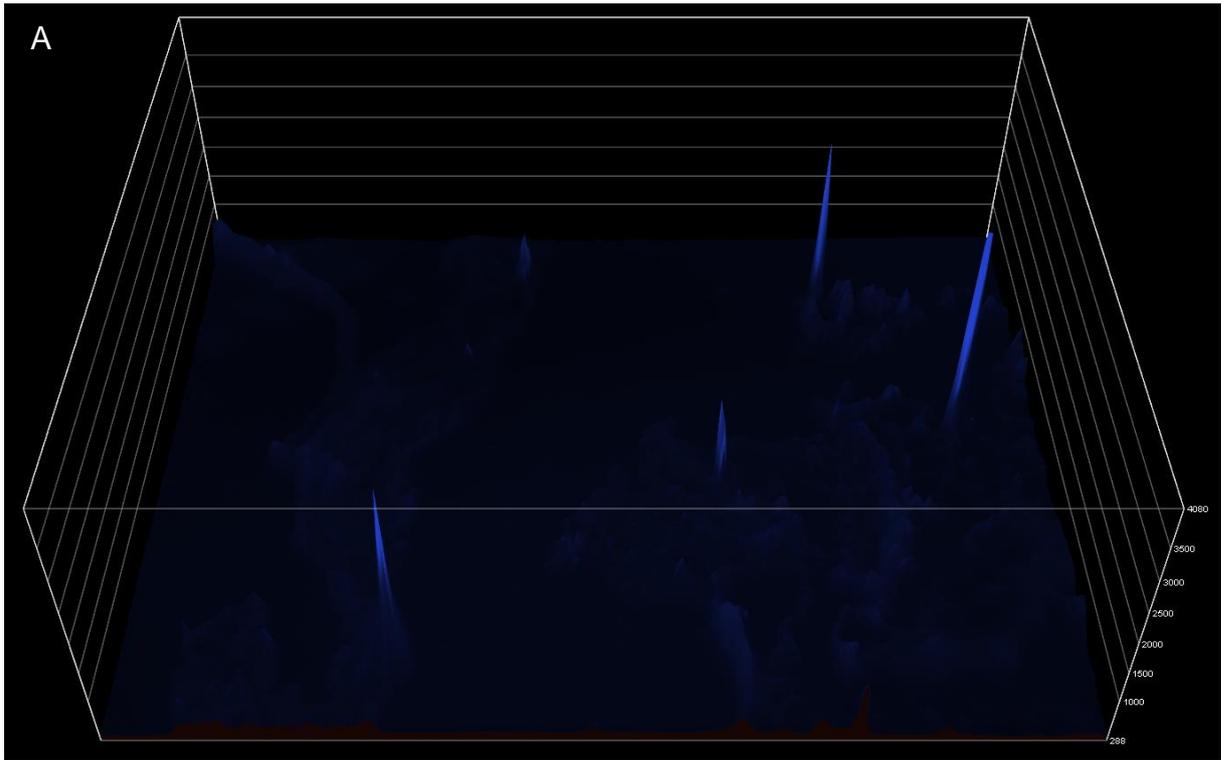
Fonte: Da Autora, 2023.

Nota: Imagens de imunofluorescência da marcação de CD11c nos linfonodos. (A) - Linfonodo de animais com tumor, tratados com a vacina de DCs. (B) – Linfonodo de animais com tumores sem tratamento

APÊNDICE B – Imagens de imunofluorescência de CD11c nos tumores.

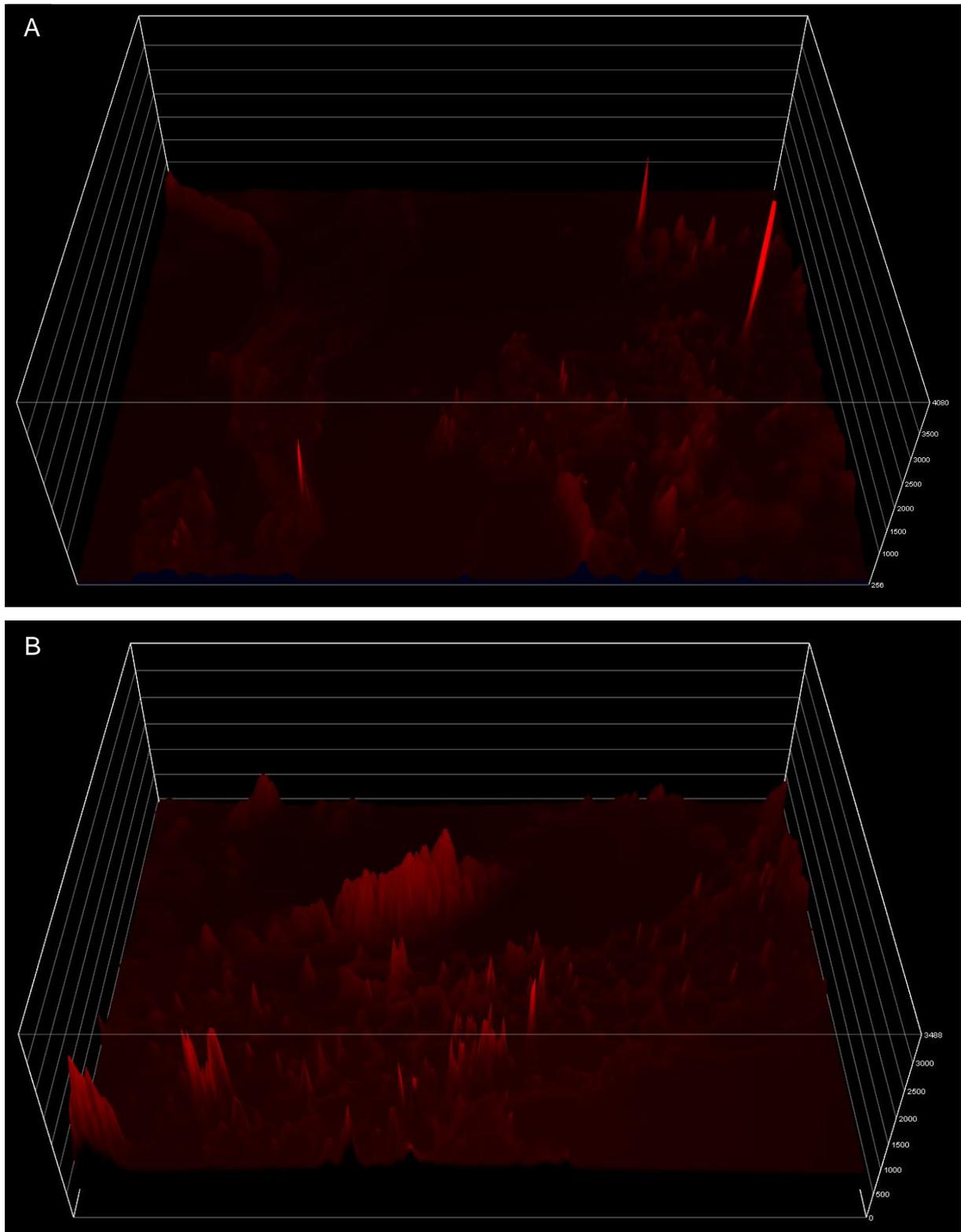
Fonte: Da Autora, 2023.

Nota: Imagens de imunofluorescência da marcação de CD11c nos tumores. (A) - Tumor de animais tratados com a vacina de DCs. (B) – Tumor de animais sem tratamento.

APÊNDICE C – Imagens de imunofluorescência de CD4 nos linfonodos.

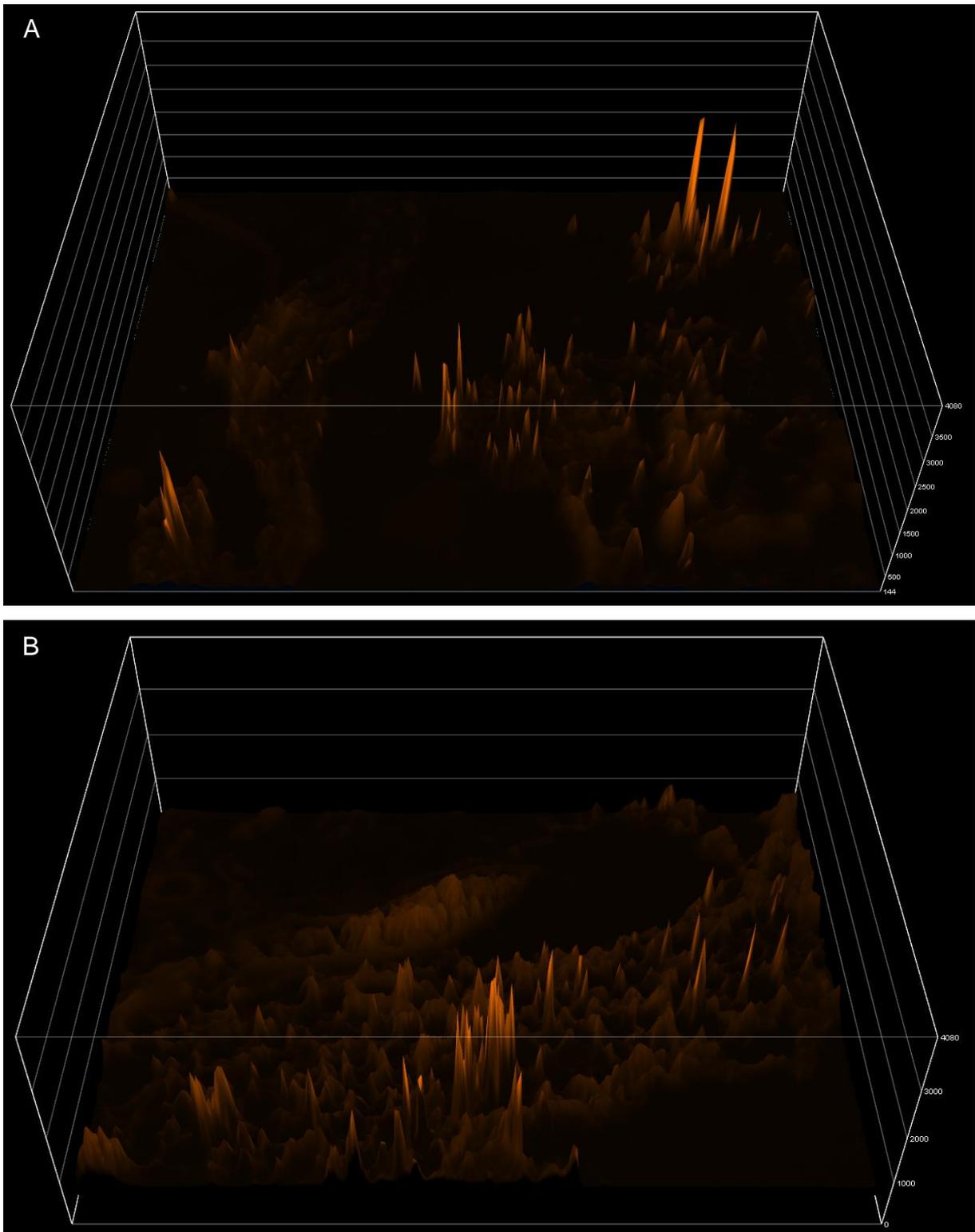
Fonte: Da Autora, 2023.

Nota: Imagens de imunofluorescência da marcação de CD4 nos linfonodos. (A) - Linfonodo de animais com tumores, tratados com a vacina de DCs. (B) – Linfonodo de animais com tumores sem tratamento.

APÊNDICE D – Imagens de imunofluorescência de CD8 nos linfonodos.

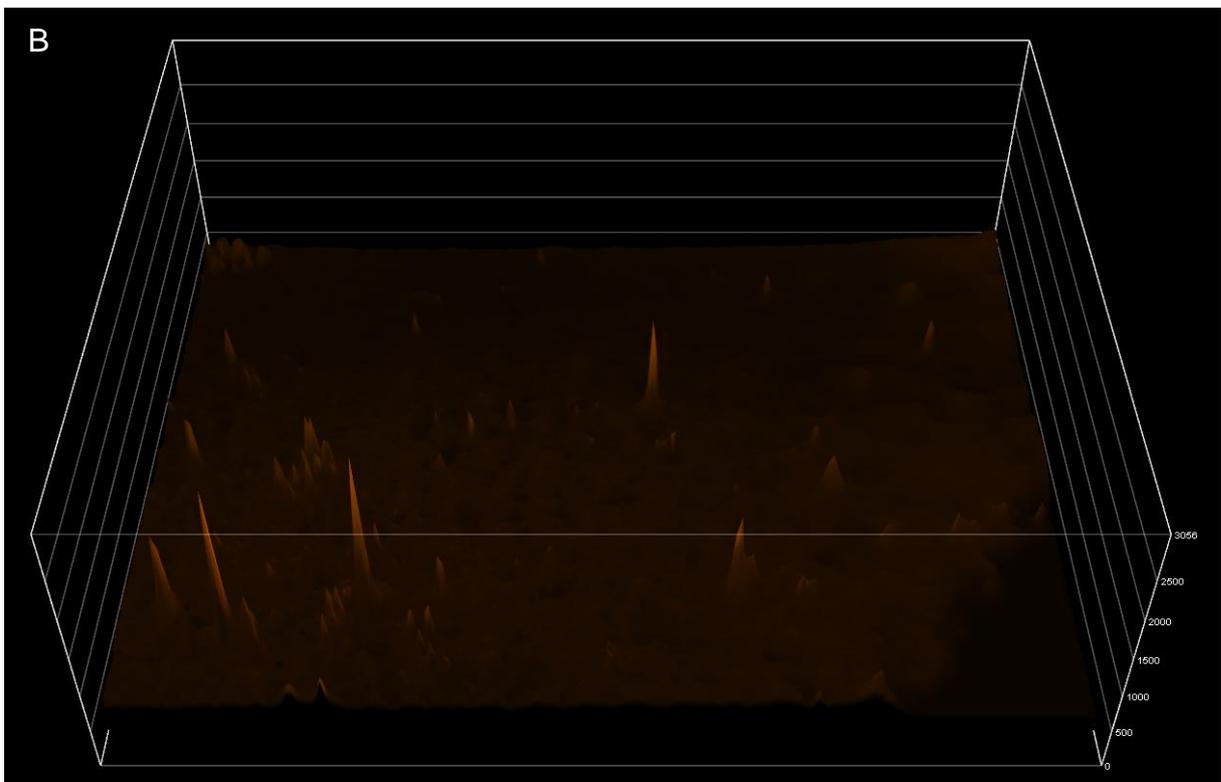
Fonte: Da Autora, 2023.

Nota: Imagens de imunofluorescência da marcação de CD8 nos linfonodos. (A) - Linfonodo de animais com tumores, tratados com a vacina de DCs. (B) – Linfonodo de animais com tumores sem tratamento.

APÊNDICE E – Imagens de imunofluorescência de I-A nos linfonodos.

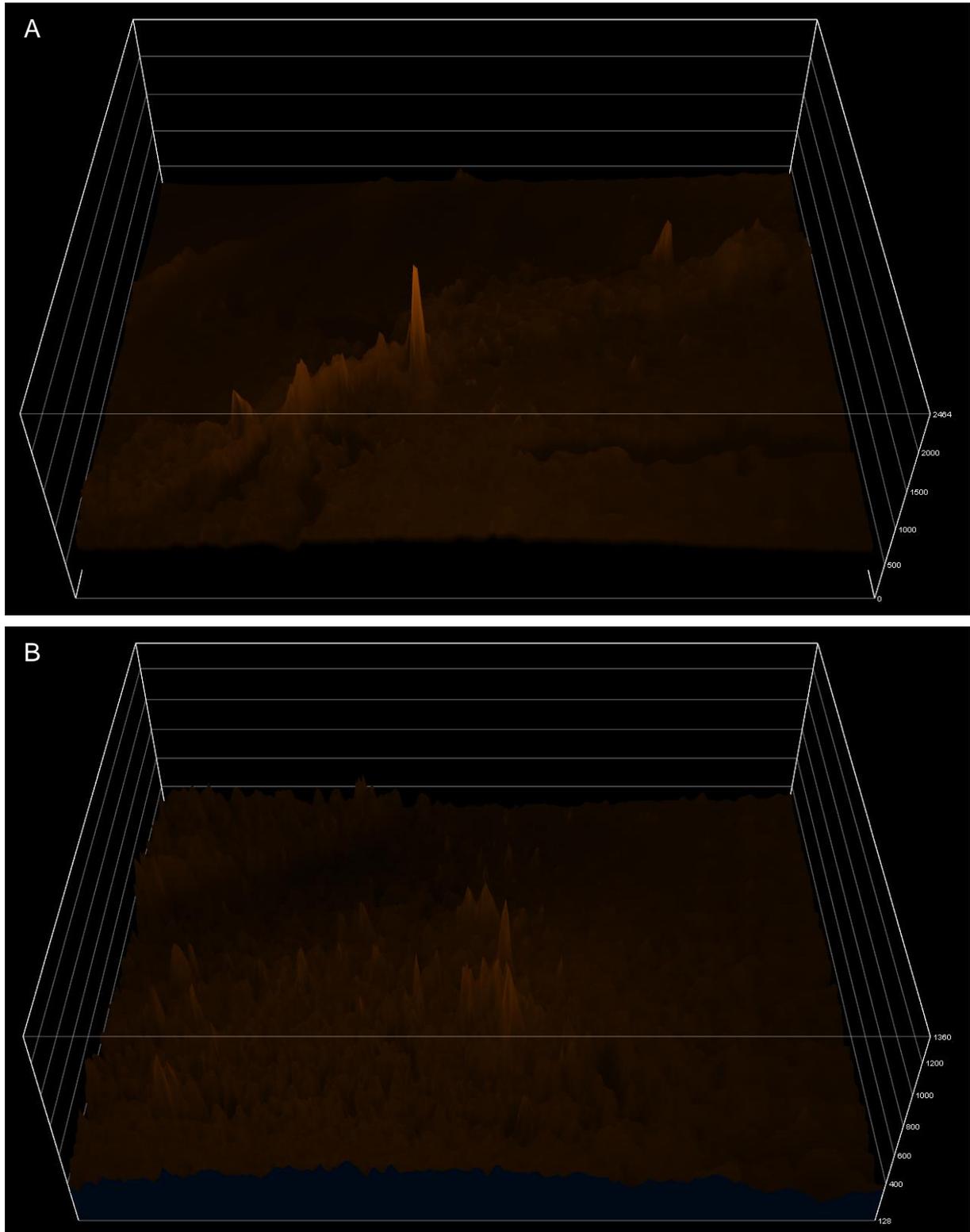
Fonte: Da Autora, 2023.

Nota: Imagens de imunofluorescência da marcação de I-A nos linfonodos. (A) - Linfonodo de animais com tumores, tratados com a vacina de DCs. (B) – Linfonodo de animais com tumores sem tratamento.

APÊNDICE F – Imagens de imunofluorescência de granzima B nos tumores.

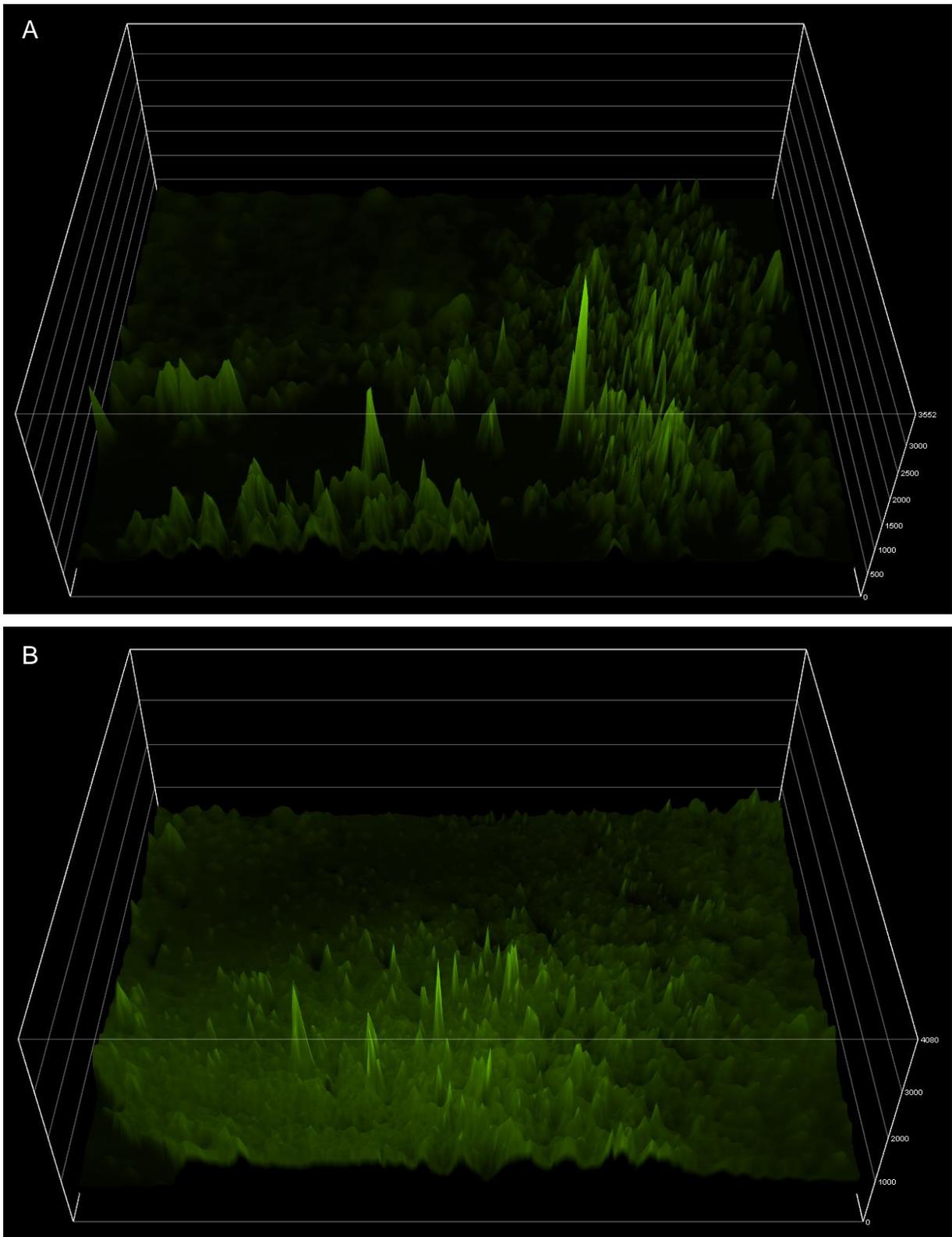
Fonte: Da Autora, 2023.

Nota: Imagens de imunofluorescência da marcação de granzima nos tumores. (A) - Tumor de animais tratados com a vacina de DCs. (B) – Tumor de animais sem tratamento.

APÊNDICE G – Imagens de imunofluorescência de perforina nos tumores.

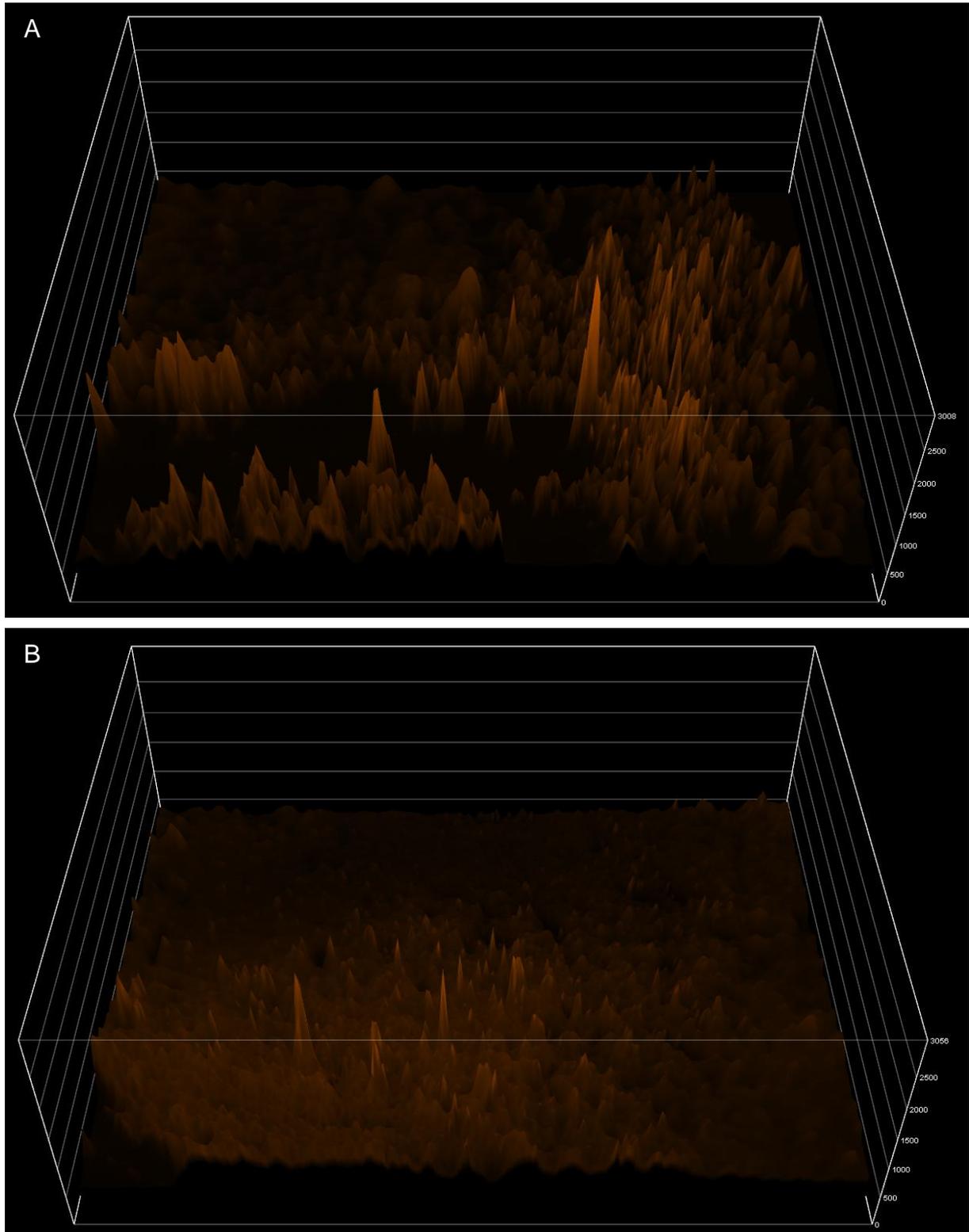
Fonte: Da Autora, 2023.

Nota: Imagens de imunofluorescência da marcação de perforina nos tumores. **A** - Tumor de animais tratados com a vacina de DCs. **B** – Tumor de animais sem tratamento.

APÊNDICE H – Imagens de imunofluorescência de Fas nos tumores.

Fonte: Da Autora, 2023.

Nota: Imagens de imunofluorescência da marcação de Fas (CD95) nos tumores. (A) - Tumor de animais tratados com a vacina de DCs. (B) – Tumor de animais sem tratamento.

APÊNDICE I – Imagens de imunofluorescência de FasL nos tumores.

Fonte: Da Autora, 2023.

Nota: Imagens de imunofluorescência da marcação de FasL (CD178) nos tumores. (A) - Tumor de animais tratados com a vacina de DCs. (B) – Tumor de animais sem tratamento.

Submissão do artigo

The screenshot displays the 'My Articles' section of the Taylor & Francis Group Author Dashboard. At the top right, there is a 'SUBMIT NEW MANUSCRIPT' button. Below this, a table lists the submission details for an article. The table has columns for SUBMISSION, TITLE, JOURNAL, STATUS, and CHARGES. The submission ID is 247307471, the title is 'Lack of Cytotoxic Function in Dendrit...', the journal is 'Cancer Investigation', and the status is 'With Journal Administrator'. Below the table, a vertical timeline shows the submission process steps: 'Submission Created', 'Submission Incomplete', 'Manuscript Submitted', and 'With Journal Administrator', all dated 20 February 2024. A 'CONTACT' button is located at the bottom right of the timeline. A red 'Feedback' button is visible on the right side of the dashboard.

SUBMISSION	TITLE	JOURNAL	STATUS	CHARGES
247307471	Lack of Cytotoxic Function in Dendrit...	Cancer Investigation	With Journal Administrator	

20 February 2024 Submission Created

20 February 2024 Submission Incomplete

20 February 2024 Manuscript Submitted

20 February 2024 With Journal Administrator

Nota: Artigo submetido à revista **Câncer Investigation**.



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, 05 de setembro de 2022

PARECER Nº 22/2022/CEUA/PROPPG
PROCESSO Nº 23085.010271/2022-08
INTERESSADO: COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS, MARCIA ANTONIAZI MICHELIN
ASSUNTO: Parecer técnico: "Análise da migração e função das células dendríticas usadas na imunoterapia do câncer de mama induzido por células 4T1 em camundongos BALB/c."

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Análise da migração e função das células dendríticas usadas na imunoterapia do câncer de mama induzido por células 4T1 em camundongos BALB/c.**", registrada com o **23085.010271/2022-08**, 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 **02-09-2022**.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/10/2022 à 20/09/2024
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo isogênico BALB/c
Nº de animais	48
Peso/idade	12-17 g/ 4-6 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 05/09/2022, às 08:43, 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](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0,



informando o código verificador **0817389** e o código CRC **227B2232**.

Referência: Processo nº 23085.010271/2022-08

SEI nº 0817389