

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

Lucas Marques Soares da Silva

**Avaliação da expressão dos fatores de transcrição em células tumorais e esplênicas de camundongos com carcinoma mamário induzido por 4T1 e submetidos à imunoterapia de células dendríticas associada com linfócitos T infiltrantes**

Uberaba  
2024

Lucas Marques Soares da Silva

**Avaliação da expressão dos fatores de transcrição em células tumorais e esplênicas de camundongos com carcinoma mamário induzido por 4T1 e submetidos à imunoterapia de células dendríticas associada com linfócitos T infiltrantes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência 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**

S581a	<p>Silva, Lucas Marques Soares da Avaliação da expressão dos fatores de transcrição em células tumorais e esplênicas de camundongos com carcinoma mamário induzido por 4T1 e submetidos à imunoterapia de células dendríticas associada com linfócitos T infiltrantes/ Lucas Marques Soares da Silva. -- 2023. 54 f. : il., fig., graf., tab.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2023 Orientadora: Profa. Dra. Marcia Antoniazzi Michelin</p> <p>1. Neoplasias mamárias. 2. Células dendríticas. 3. Imunoterapia. I. Michelin, Marcia Antoniazzi. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 618.19-006</p>
-------	---

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM  
CÉLULAS TUMORAIS E ESPLÊNICAS DE CAMUNDONGOS COM  
CARCINOMA MAMÁRIO INDUZIDO POR 4T1 E SUBMETIDOS À  
IMUNOTERAPIA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS ASSOCIADA COM  
LINFÓCITOS T INFILTRANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Imunologia Básica e Aplicada” (Linha de Pesquisa: Imunobiologia e Imunoterapia das Doenças) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Uberaba, 23 de julho de 2024

**Banca Examinadora:**

Dra. Márcia Antoniazi Michelin – Orientador Universidade  
Federaldo Triângulo Mineiro

Dra. Ana Paula Espíndula  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. Marcelo Dias Baruffi  
Universidade de São Paulo



Documento assinado eletronicamente por **MARCIA ANTONIAZI MICHELIN**, Professor do Magistério Superior, em 26/08/2024, às 11:43, 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 215, de 16 de julho de 2024](#).



Documento assinado eletronicamente por **ANA PAULA ESPINDULA**, Técnico-Administrativo em Educação, em 26/08/2024, às 14:30, 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 215, de 16 de julho de 2024](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Dias Baruffi**, Usuário Externo, em 26/08/2024, às 14:49, 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 215, de 16 de julho de 2024](#).



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](http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 1317429 e o código CRC 8F3C7E31.

Dedico o presente trabalho a todas as pessoas, que de uma forma direta e indireta contribuíram e vem contribuindo para a minha formação profissional, pessoal e espiritual.

## AGRADECIMENTOS

Durante a vida somos testados diariamente a todo o momento passando por provações e dificuldades, mas pelo propósito de Deus ou destino, pessoas aparecem em nossas vidas tornando os dias leves e tranquilos, dando vida e cor aos dias pálidos e cinzentos e para estas pessoas eu dedico os meus mais sinceros agradecimentos.

Primeiramente quero agradecer a minha mãe, Elaine, a mulher guerreira, a mulher que me concedeste a vida, que abdicou de parte de sua vida para que esta etapa fosse concluída, reconheço todo seu esforço por mim, e como forma de agradecer estarei do seu lado na sua nova etapa.

Ao meu pai, Gutemberg, para você eu não tenho palavras que possam mensurar a tamanha gratidão que tenho por ti, que sempre foi meu maior incentivador, não só na pesquisa, mas principalmente na vida, me apoiando e sendo meu suporte, estando do meu lado nos mais difíceis dias de minha vida, gratidão apenas gratidão.

Aos meus avós maternos Alcides e Maria, e paternos Inácio (*in memoriam*) e Mercês (*in memoriam*) por desde pequeno me incentivarem a seguir o caminho dos estudos.

A todos meus familiares que de alguma forma sempre me incentivaram e acreditaram em mim. Um agradecimento especial aos meus primos Yoham e Ryan, que em meu coração são meus irmãos, muito obrigado pelo companheirismo e pelos momentos de brincadeiras e risadas, quando estou com vocês sempre lembro o lado bom de ser jovem, com vocês meu coração se enche de alegria. As minhas primas Thais, Maria Eduarda por crescerem junto comigo, e topando todas as loucuras.

A minha orientadora Dra. Márcia Antoniazi Michelin, minha mãe científica, pessoa responsável por fazer meus olhos brilharem para pesquisa, que me guiou e orientou em cada passo desta etapa.

Também agradeço por todas as pessoas que passaram e/ou estão no Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) que de alguma forma contribuíram ou estiveram presentes comigo (Allana, Arthur, Carlos, Débora, Felipe, Gabriel, João Pedro, Joyce, Julia, Lenilson, Maria Eduarda, Murilo, Nathalia, Samara, Saulo e Taissa), e em especial meus amigos Claudio e Eleni que entraram nesta jornada junto comigo e contribuíram para meu aprimoramento científico e se tornaram grandes amigos.

Aos meus amigos pessoais Ângela, Breno, Gabriel, Thamy, Marcelo, Murilo e Victor Hugo. Agradeço por sempre se disponibilizarem sua amizade e atenção nas noites de bebedeiras e por serem sinceros e transparentes em nossa amizade. A Amanda minha grande amiga que desde o início me incentivou e acreditou em mim, mesmo que hoje sigamos caminhos diferentes, seu apoio foi fundamental para realização deste trabalho, minha eterna gratidão por tudo.

Agradeço a Faculdade de Talentos Humanos a qual me concedeu o grau de biomédico e a todos os meus professores da graduação.

A Universidade Federal do Triângulo Mineiro por me dar a oportunidade de me aperfeiçoar profissionalmente, e pelas excelentes aulas da pós graduação que serão de grande valia.

Por fim, agradeço a Deus por me dar a oportunidade de viver tudo isso. Em tudo daí graças, porque esta é a vontade de Deus em Cristo Jesus para convosco (1 Tessalonicenses 5:18).

*"Os circuitos de consagração social serão tanto mais eficazes quanto maior a distância do objeto consagrado"*

*PIERRE BOURDIE*

## RESUMO

Por definição o câncer é uma doença na qual algumas células do corpo crescem incontrolavelmente e se espalham para outras partes do corpo. Essa situação é atribuída à formação de metástases, em que células tumorais se desprendem do local primário e migram para outras regiões, o que impacta negativamente o prognóstico e afeta diretamente a sobrevivência dos pacientes. Os desafios no tratamento da doença persistem, e uma alternativa promissora é a imunoterapia, que oferece a esperança para melhorar a sobrevivência daqueles que não respondem aos tratamentos convencionais. As células dendríticas, ao apresentarem antígenos, desempenham um papel crucial na estimulação do sistema imunológico com a ativação dos linfócitos no combate antitumoral. A proposta é integrar essas duas células para otimizar os efeitos gerais das imunoterapias em um modelo experimental de carcinoma mamário induzido por células 4T1. Foram utilizadas 70 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com idade de 6 semanas, separadas em 4 grupos: controle, tumor, tumor tratado com TIL, tumor tratado com DC+TIL. Ao final da fase experimental, os camundongos foram eutanasiados. O tumor, baço e fígado foram retirados para a avaliação. Foi notada a influência sobre o volume tumoral, tendo os animais seus tumores mensurados por paquímetro durante a fase experimental. Os animais tratados com as imunoterapias apresentaram um volume tumoral menor em comparação àqueles que não foram submetidos a tal intervenção. Avaliamos por citometria de fluxo a presença de linfócitos dos perfis Th1, Th2, Treg e Th17, por meio da presença dos fatores de transcrição T-bet, GATA3, FOXP3 e ROR $\gamma$ T, respectivamente, no baço e tumor. Foi possível avaliar o comportamento distinto entre a imunidade sistêmica e local, os grupos que receberam as imunoterapias obtiveram valores maiores de T-bet, no microambiente tumoral, fator determinante para o perfil Th1, o qual possui grande capacidade para o combate tumoral. Observamos a redução de área metastática nas células hepáticas por HE, nos grupos tratados. O estudo destacou a eficácia da imunoterapia com TILs isoladamente em camundongos BALB/c com carcinoma mamário induzido por células 4T1. Além disso, evidenciou uma potencialização quando combinada com imunoterapia de células dendríticas, o qual resultou na regressão do volume tumoral e pontos metastáticos no fígado.

**Palavras chave:** Imunoterapia. Células Dendríticas. Linfócitos Infiltrantes de Tumor.

## ABSTRACT

By definition, cancer is a disease in which some cells in the body grow uncontrollably and spread to other parts of the body. This situation is attributed to the formation of metastases, in which tumor cells detach from the primary site and migrate to other regions, which has a positive impact on prognosis and directly affects patient survival. Challenges in treating the disease persist, and a promising alternative is immunotherapy, which offers hope for improving survival for those who do not respond to conventional treatments. Dendritic cells, when presenting antigens, play a crucial role in stimulating the immune system with the activation of lymphocytes in the anti-tumor fight. The proposal is to integrate these two cells to improve the general effects of immunotherapies in an experimental model of mammary carcinoma induced by 4T1 cells. 70 female BALB/c mice aged 6 weeks were used, divided into 4 groups: control, tumor, tumor treated with TIL, tumor treated with DC+TIL. At the end of the experimental phase, the mice were euthanized. The tumor, spleen and liver were removed for evaluation. The influence on tumor volume was noted, with the animals having their tumors measured using a caliper during the experimental phase. Animals treated with immunotherapy had a smaller tumor volume compared to those that were not subjected to such intervention. We evaluated by flow cytometry the presence of lymphocytes of the Th1, Th2, Treg and Th17 profiles, through the presence of the transcription factors T-bet, GATA3, FOXP3 and ROR $\gamma$ T, respectively, in the spleen and tumor. It was possible to evaluate the different behavior between systemic and local immunity, the groups that received immunotherapies obtained higher T-bet values, in the tumor microenvironment, a determining factor for the Th1 profile, which has a great capacity to combat tumors. We observed a reduction in the metastatic area in liver cells by HE in the treated groups. The study highlighted the efficacy of immunotherapy with TILs alone in BALB/c mice with 4T1 cell-induced mammary carcinoma. Furthermore, it showed an enhancement when combined with dendritic cell immunotherapy, which resulted in the regression of tumor volume and metastatic points in the liver.

**Keywords:** Immunotherapy, Dendritic Cells, Tumor-Infiltrating Lymphocytes.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Célula Dendrítica apresentando antígeno e ativando linfócitos .....	26
Figura 2: Fluxograma da fase experimental .....	31
Figura 3: Fluxograma da produção da imunoterapia de TILs .....	32
Figura 4: Fluxograma da produção da imunoterapia de DCs .....	33
Figura 5: Avaliação do volume tumoral por mm <sup>3</sup> de camundongos não vacinados e vacinados. ....	38
Figura 12: Avaliação de metástases hepáticas .....	39
Figura 6: Avaliação do fator de transcrição T-bet em linfócitos T auxiliares intratumorais e esplênicos.....	41
Figura 7: Avaliação do fator de transcrição GATA3 em linfócitos T auxiliares intratumorais e esplênicos.....	42
Figura 8: Avaliação do fator de transcrição FOXP3 em linfócitos T auxiliares intratumorais e esplênicos.....	43
Figura 9: Avaliação do fator de transcrição ROR $\gamma$ T em linfócitos T auxiliares intratumorais e esplênicos.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Etapas para realização da parafinização.....	34
Tabela 2 - Etapas para realização da coloração .....	35

## LISTA DE ABREVIATURA

$\mu\text{l}$ : Microlitro

$\mu\text{m}^2$ : Micrometros quadrados

$\text{cm}^2$ : Centímetros quadrados

Dra.: Doutora

mL: Mililitro

ng: Nanograma

$\text{ng}/\mu\text{L}$  – Nanograma por Microlitro

Profa. – Professora

## LISTA DE SIGLAS

ACT: Terapia Celular Adotiva

APCs: Células Apresentadoras de Antígenos

APC: *Allophycocyanin*

BSA: Albumina de Soro Bovino

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

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CO<sub>2</sub>: Dióxido de Carbono

DCs: Células Dendríticas

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

FITC: *Fluorescein Conjugate*

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

IFN- $\alpha$ : 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

MHC: Complexo de Histocompatibilidade Principal

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

OMS: Organização Mundial da Saúde

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

PE: *Phycoerythrin*

Percyp5.5: *Peridinin Chlorophyll protein complex*

rpm: Rotações por minuto

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

TBNC: Câncer de Mama Triplo Negativo

TCR: Receptor de células T

TGF: Fator de Crescimento Transformador

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

TIL: Linfócitos Infiltrantes de Tumor

TME: Microambiente Tumoral

TNF: Fator de Necrose Tumoral

Treg: Célula T regulatório

UFTM: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

4T1 - Linhagem celular tumoral murina de células 4T1

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

°C - Grau Celsius

$\alpha$  – Alfa

## SUMÁRIO

### Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 O CÂNCER .....	19
CARCINOMA MAMÁRIO .....	19
1.2 MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA MAMÁRIO.....	20
1.3 METÁSTASE HEPÁTICA .....	21
1.4 RESPOSTA IMUNE A TUMORES.....	22
1.5 CÉLULAS DENDRÍTICAS .....	22
1.6 ATIVAÇÃO DE LINFOCITOS T E GERAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO ....	24
1.7 IMUNOTERAPIA COM LINFÓCITOS T INFILTRANTES DE TUMOR.....	26
2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	28
3. OBJETIVOS .....	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 AMOSTRA .....	30
4.2 INDUÇÃO TUMORAL .....	31
4.3 IMUNOTERAPIA DE LINFÓCITO T INFILTRANTES DE TUMOR.....	32
4.4 IMUNOTERAPIA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS .....	33
4.5 MEDIDA TUMORAL.....	34
4.6 EUTANÁSIA E COLETA DE ORGÃOS .....	34
4.7 PARAFINIZAÇÃO, CORTES HISTOLÓGICOS E COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA.....	34
4.8 CITOMETRIA DE FLUXO.....	36
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	37
5. RESULTADOS .....	38
5.1 VOLUME TUMORAL.....	38
5.2 METÁSTASES HEPÁTICAS .....	39
5.3 ANÁLISE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO T-BET EM LINFÓCITOS T AUXILIARES EM TUMOR E BAÇO .....	41
5.4 ANÁLISE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO GATA3 EM LINFÓCITOS T AUXILIARES EM TUMOR E BAÇO .....	42
5.5 ANÁLISE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXP3 EM LINFÓCITOS T AUXILIARES EM TUMOR E BAÇO .....	43

5.6 ANÁLISE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO ROR $\gamma$ T EM LINFÓCITOS T AUXILIARES EM TUMOR E BAÇO.....	43
5.7 EXPRESSÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO NO BAÇO E TUMOR .....	44
6. DISCUSSÃO .....	46
7. CONCLUSÃO .....	50
REFERÊNCIAS.....	51
8. ANEXO I.....	57
8.1 SUBMISSÃO DO ARTIGO .....	57
8.2 ARTIGO .....	58

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 O CÂNCER

Por definição é uma doença na qual algumas células do corpo crescem incontrolavelmente e se espalham para outras partes do corpo (BROWN *et al.*, 2023). Se tornou um problema de saúde pública em escala global por ser a maior causa de morte no mundo com incidências cada vez maiores, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) o câncer foi responsável pela morte de pessoas com a faixa etária abaixo dos 70 anos em aproximadamente 91 de 172 países, e ainda, em mais 22 países segue entre os líderes da lista de doenças que mais levam ao óbito (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017; SUNG *et al.*, 2021). Em dados mais atuais, publicados na Revista Brasileira de Cancerologia do Instituto Nacional de Câncer estima-se que para o triênio de 2023 à 2025 é esperado cerca de 704 mil novos casos (SANTOS *et al.*, 2023)

Em relação ao câncer de mama, para cada ano do triênio é estimado 73.610 novos casos, e se torna o mais incidente em mulheres, estima-se 41,89 novos casos a cada 100.000 mulheres (SANTOS *et al.*, 2023).

## CARCINOMA MAMÁRIO

É classificado como uma doença heterogênea com comportamento diferente na apresentação e no acompanhamento clínico, isto é, possui distintas manifestações clínicas e morfológicas, diferentes assinaturas genéticas e acarretam uma variação nas respostas terapêuticas devido à heterogeneidade deste tumor (DELMONICO; ALVES; AMARAL, 2015; TAN; LE, 2021).

As taxas de sobrevivência de pacientes com câncer de mama primário melhoraram significativamente devido ao aumento da conscientização sobre a importância da mamografia e aos avanços nas técnicas cirúrgicas. Mesmo com todos esses avanços no tratamento do câncer de mama, atualmente não há tratamentos totalmente eficazes para a doença porque ela metastatiza para órgãos distantes, como: ossos, pulmões, cérebro e fígado. Isso é atribuído principalmente à complexidade do processo de metástase (KIM, 2021).

A metástase do câncer não é mais vista como uma cascata linear de eventos, mas sim como uma série de processos simultâneos e parcialmente sobrepostos, à medida que as células metastáticas com sucesso assumem novos fenótipos enquanto abandonam os antigos comportamentos. O progresso no desenvolvimento de terapias para doenças metastáticas tem sido limitado pela falta de compreensão sistemática desse fenômeno complexo (SUHAIL *et al.*, 2019).

Uma intervenção eficaz no processo que leva essas células à morte depende de uma melhor compreensão do mecanismo da metástase. Tanto as propriedades intrínsecas das células do câncer de mama quanto o microambiente do órgão hospedeiro são importantes para determinar a eficiência da metástase específica do órgão (LU; KANG, 2007).

## 1.2 MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA MAMÁRIO

Vários modelos murinos de câncer de mama foram desenvolvidos para estudar os mecanismos moleculares subjacentes à progressão tumoral e metástase para serem usados no desenvolvimento de agentes terapêuticos.

No entanto, a maioria desses modelos de camundongos são de tumores genéticos que, embora sejam excelentes modelos para estudos dos mecanismos, não são adequados para testar agentes terapêuticos, pois a metástase leva meses para se desenvolver nesses modelos (PASCHALL; LIU, 2016).

O rápido desenvolvimento tumorigênico encontrado para o modelo 4T1, o qual possui características semelhantes ao carcinoma mamário triplo negativo em humanos, oferece um meio rápido e direto para avaliar os resultados do tratamento em um modelo de Camundongos BALB/c imunocompetentes endogâmicos fêmeas (ARROYO-CRESPO *et al.*, 2019).

Quase todos os camundongos com tumor proveniente de células 4T1 desenvolvem metástases dentro de 30 dias após a indução do tumor na glândula mamária. No entanto, os tumores 4T1 crescem rapidamente no local primário e o tamanho da neoplasia frequentemente excedia os limites permitidos na maioria dos protocolos animais. As metástases nesta fase são geralmente micrometástases (PASCHALL; LIU., 2016).

Para recriar experimentalmente o carcinoma mamário humano, a linhagem de células 4T1 é o modelo mais utilizado, pois tem característica invasiva e tumorigênico.

Com isso sua linhagem de células tumorais são transplantáveis e a partir da submissão do tumor primário na glândula mamária, o tumor pode evoluir para metástase, e atingir diferentes locais. Estudos utilizam o modelo de células 4T1 para avaliar métodos de imunoterapia celular, visando a ativação de linfócitos T auxiliares (CD4 +) e linfócitos T citotóxicos (CD8 +) específicos para tumores (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2000).

### 1.3 METÁSTASE HEPÁTICA

Por definição metástase é o termo utilizado para descrever o processo em que as células tumorais desprendam-se do seu foco primário, migram, infiltram em outros órgãos ou tecidos e origina tumores secundários (HU *et al.*, 2020).

A persistência e evolução do câncer estão predominantemente ligadas à habilidade metastática e disseminadora das células neoplásicas para outros locais. A maioria dos pacientes não vão ao óbito devido aos tumores primários, mas sim devido às metástases. A diminuição do tamanho do tumor é um aspecto clínico crucial, assim como a redução das metástases, ambos capazes de influenciar significativamente a sobrevida do paciente (GEIGER; PEEPER, 2009).

O processo de metástase decorre de uma série de eventos simultâneos ou sobrepostos, porém, podem ser explicados de 2 formas. O primeiro de progressão linear sugere variações genéticas em clones celulares do tumor inicial, resultando assim em sobrevivência e crescimento destas células em locais diferentes (LIANG *et al.*, 2020). O segundo o modelo de progressão paralela propõe que as células neoplásicas desenvolvem precocemente sua capacidade metastática, e possibilita a disseminação de diferentes clones de células neoplásicas para diferentes ambientes (KOSCIELNY; TUBIANA, 2010).

Independente da forma em que se deu origem a metástase, após a ruptura das células neoplásicas do local primário, estas entram em contato com a corrente sanguínea, onde estão expostas a diversos fatores para o combate dessas células metastáticas, como o estresse oxidativo, forças de cisalhamento e resposta imune de células presentes na corrente sanguínea (GARCÍA-JIMÉNEZ; GODING, 2019). Entretanto, por mais que estas células estejam sendo eliminadas pelo sistema imune, as sobreviventes podem entrar em estado de dormência ou de proliferação e desenvolvimento de tumores secundários (BIRKBAK; MCGRANAHAN, 2020).

O fígado por conta de sua localização anatômica é um órgão bastante irrigado, o que faz ser um alvo metastático no câncer de mama. O tumor secundário em células hepáticas está associado a um mau prognóstico, e influencia diretamente na sobrevida global dos pacientes (HE *et al.*, 2017; YING *et al.*, 2021). Portanto há uma necessidade de que os tratamentos baseados em imunoterapias, sejam importantes para reduzir o tumor, mas também seus alvos secundários.

#### 1.4 RESPOSTA IMUNE A TUMORES

Tumores não são apenas agregados de células cancerígenas, mas também ecossistemas complexos e bem organizados. Os componentes imunológicos que se encontram dentro dos tumores, que chamamos de microambiente imune tumoral, há muito tempo demonstram estar relacionados ao desenvolvimento, recorrência e metástase do tumor. No entanto, os estudos convencionais que subestimam o potencial da arquitetura espacial desse microambiente são incapazes de elucidar completamente a sua complexidade (FU *et al.*, 2021).

Para obter controle e prevenção do crescimento tumoral a resposta imune submete-se da utilização de fatores celulares e moleculares de mecanismos do sistema imune inato e adaptativo como as células T auxiliares, células T citotóxicas, células B, células natural killer (NK) e células apresentadoras de antígenos (APCs), sendo umas das mais fundamentais as células dendríticas (DCs) (REEVES; JAMES, 2017).

#### 1.5 CÉLULAS DENDRÍTICAS

As células dendríticas (DCs) são um alvo imunoterapêutico promissor, dada a sua capacidade de captar e apresentar antígenos associados ao tumor por meio de vários mecanismos que iniciam respostas efetoras potentes contra o tumor. Além da apresentação direta do antígeno, as propriedades intrínsecas adicionais das DCs são relevantes para a imunoterapia, inclui a capacidade de migrar entre os tecidos linfóides e não linfóides e modular os gradientes de citocinas e quimiocinas para controlar a inflamação e o *homing* (migração) dos linfócitos, todos provavelmente importantes para o tratamento sistêmico e prolongado (PEREZ; DE PALMA, 2019).

As DCs são classificadas em diferentes subconjuntos considera-se seu fenótipo de superfície, expressão de moléculas, ontogenia e funções. Elas podem ser amplamente classificadas como DCs convencionais consisti em dois subconjuntos (DC1 e DC2), DCs plasmocitóides, DCs inflamatórias e células de Langerhans. As DCs possuem uma série de receptores de reconhecimento de padrões extracelulares e intracelulares para detectar diferentes sinais de anormalidade. Ao detectar esses sinais, as DCs são ativadas, regulam positivamente as moléculas co-estimuladoras, produzem várias citocinas e quimiocinas, captam o antígeno e o processam e migram para os gânglios linfáticos, onde apresentam antígenos para as células T citotóxicos (CD8+) e auxiliares (CD4+) (BALAN; SAXENA; BHARDWAJ, 2019).

As DCs são reconhecidas como APCs especializadas, as quais originam-se a partir de células-tronco hematopoiéticas (CD34+) presentes na medula óssea. As DCs são importantes na imunoterapia, podem capturar, processar e apresentar antígenos de células T como demonstrado na figura 1, e geralmente são identificadas por sua grande expressão de moléculas complexas de histocompatibilidade principal do tipo II e co-estimulatórias (CANCEL *et al.*, 2019).

As DCS são excelentes APCs do sistema imunológico, responsáveis por preencher a lacuna entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa, inclui a ativação de células T antitumorais. Após a maturação e ativação, as DCs regulam negativamente a fagocitose, aumentam a expressão do MHC e da molécula coestimuladora, aumentam a produção de citocinas e exibem migração aprimorada para os linfonodos. Como resultado dessas mudanças fenotípicas que ocorrem durante a ativação, DCs já maduras são capazes de preparar células T virgens e dar início a resposta imune adaptativa (GARDNER; DE MINGO PULIDO; RUFFELL, 2020).

Antes da descoberta e caracterização das DCs, as vacinas contra o câncer eram baseadas na engenharia genética de células tumorais, células autólogas e alogênicas e linhagens celulares. Acredita-se que os mecanismos de imunogenicidade requerem a captação e apresentação de antígenos por meio da DC endógena. A apresentação adequada de antígenos por parte das DCs é fundamental para que os linfócitos T sejam ativados para exercerem sua função (SANTOS; BUTTERFIELD, 2018; TROMBETTA; MELLMAN, 2005).

## 1.6 ATIVAÇÃO DE LINFOCITOS T E GERAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO

A identidade celular é determinada por programas de transcrição que por sua vez, são conduzidos por fatores de transcrição que induzem a expressão ou silenciamento de genes específicos, e formam circuitos capazes de se autorregular para estabelecer e manter o fenótipo celular. Estudos sugerem que as vias de desenvolvimento e os genes são reativados nas células cancerígenas, o que resulta em um estado semelhante às células-tronco que é responsável pela iniciação, progressão, metástase e resistência à terapia do tumor (ERVIN *et al.*, 2022).

Os linfócitos T podem se diferenciar em Linfócitos T auxiliar (CD4<sup>+</sup>) e Linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) de acordo com o processo de seleção positiva e negativa. A molécula de histocompatibilidade principal do tipo II é importante para a diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e de citocinas sintetizadas, bem como seus fatores de transcrição (Figura 1), são importantes para esse controle da atividade antitumoral, ou mesmo, a supressão desta resposta, bem como a resposta imunológica a diferentes outros patógenos (IVANOVA; OREKHOV, 2015).

Os fatores de transcrição são proteínas que regulam a expressão gênica, se ligam a sequências específicas de DNA, chamadas de elementos regulatórios ou sítios de ligação, geralmente encontrados em regiões promotoras ou intensificadoras dos genes. A ligação do fator de transcrição a esses elementos pode ativar ou reprimir a transcrição do gene-alvo, influenciando assim a produção de RNA mensageiro (mRNA) e, conseqüentemente, um esquema de proteínas desempenha um papel crítico na regulação dos processos biológicos, como desenvolvimento embrionário, resposta a sinais extracelulares, adaptação a mudanças ambientais e diferenciação celular, assim, sendo de extrema importância para o equilíbrio homeostático, como também modular a resposta imune frente a microrganismos (HOSOKAWA; ROTHENBERG, 2021).

Após a ativação de células T auxiliares naïve, a presença de IL-12 liberada pelas APCs e do IFN- $\gamma$  liberado pela própria ativação do linfócito, ativam os fatores de transcrição STAT1 e STAT4 respectivamente, que juntos irão induzir a expressão do fator de transcrição T-bet indutor da resposta do perfil Th1 (IVANOVA; OREKHOV, 2015). Este perfil é voltado para resposta imunológica de antígenos intracelulares como: vírus ou antígenos tumorais; e isto se dá muito pela presença do IFN- $\gamma$  que tem

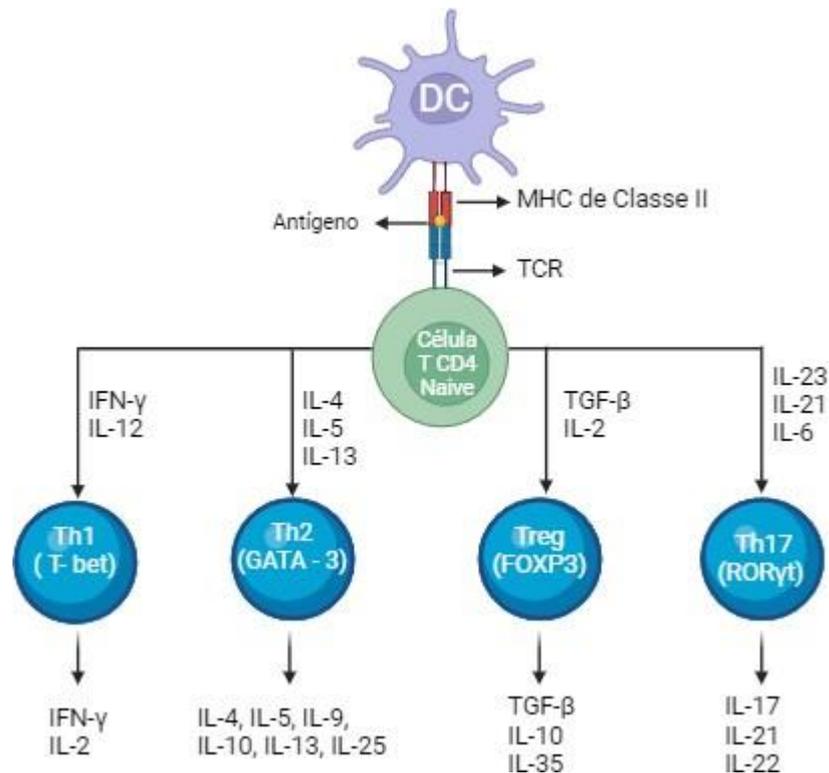
a capacidade de recrutar linfócitos T citotóxicos para o local (ANNUNZIATO; ROMAGNANI; ROMAGNANI, 2015).

Já o perfil de células T Th2 sintetiza principalmente IL-4 e IL-2 que são citocinas importantes para o processo de diferenciação, vão ser indutoras dos fatores de transcrição STAT5 e STAT6 que por sua vez vão induzir o fator de transcrição mestre GATA3 (OESTREICH; WEINMANN, 2012). O perfil Th2 é importante para o combate de infecções parasitárias e alérgenos, quando ativado a resposta do tipo 2 libera IL-4, IL-5 e IL-13 que vão promover a mudança da classe de anticorpos de células B para a imunoglobulina E, recrutam eosinófilos para o local de inflamação e por fim podem promover a produção de muco, respectivamente (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010).

O FOXP3 é o fator de transcrição responsável pela geração e função das células T regulatórias, as quais se diferenciam quando estimuladas por TGF- $\beta$  e IL-2, sendo um perfil cuja a função está correlacionada a manutenção da homeostase do sistema imunológico e autotolerância (JOSEFOWICZ; RUDENSKY, 2009). Para manter o equilíbrio homeostático o perfil Treg conta com a secreção de IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35 citocinas reguladoras que inibem a resposta exacerbada de outros perfis. Entretanto há evidências crescentes que essas células possuem impacto importante na resposta imune antitumoral, pois fatores derivados de tumores promovem o recrutamento e expansão de Treg, impossibilitando uma imunidade efetiva contra o câncer que estão associadas a progressão tumoral (KIM; CANTOR, 2014).

Já o fator de transcrição ROR $\gamma$ t é induzido pela ativação do fator de transcrição STAT3 mediante as citocinas IL-6, IL-21 e IL-23 o que induz o linfócito T ao perfil Th17. Sua função está associada a proteção contra infecções bacterianas e fúngicas nas superfícies mucosas, porém possui um papel dividido na imunologia dos tumores, pois podem promover o crescimento tumoral, ou podem atuar numa resposta antitumoral ao recrutar células imunes para os tumores, ativando linfócitos T citotóxicos efetores ou mesmo convertendo-se no fenótipo Th1, produzindo IFN- $\gamma$  (GUÉRY; HUGUES, 2015).

Figura 1: Célula Dendrítica apresentando antígeno e ativando linfócitos.



Fonte: Imagem adaptada de (ZHU; ZHU, 2020).

Nota: Imagem ilustrativa para mostrar didaticamente a apresentação de antígeno através da complexo principal de histocompatibilidade do tipo II, ativação de linfócitos e seus subtipos, e seus principais fatores de transcrição.

## 1.7 IMUNOTERAPIA COM LINFÓCITOS T INFILTRANTES DE TUMOR

Os linfócitos T infiltrantes de tumor (TILs) são linfócitos específicos do tumor diretamente isolados das ressecções tumorais, que foram obtidos e descritos inicialmente em cânceres epiteliais (FELDMAN *et al.*, 2015; ROSENBERG; SPIESS; LAFRENIERE, 1986).

A imunoterapia age no tratamento de muitas malignidades sólidas e hematológicas, e pode ser realizada por vários mecanismos, como bloqueio imunológico de moléculas checkpoint, citocinas ou até mesmo, terapia celular adotiva (ACT) utilizando TILs do microambiente tumoral (CONSTANTINO *et al.*, 2017).

Isso reflete um reconhecimento específico das células tumorais e leva a um fenótipo tumoral que seria mais sensível à imunoterapia (BODOR; BOUMBER; BORGHAEI, 2020).

O sucesso recente do bloqueio do checkpoint imunológico na imunoterapia do câncer modificou os algoritmos para o tratamento de uma variedade de doenças neoplásicas. Contudo, a seleção ideal de candidatos apropriados para esses tratamentos ainda é um desafio. A presença, localização e composição de um infiltrado imune tumoral pré-existente parece influenciar o benefício desses tratamentos. A associação entre a presença de TILs basais e os resultados dos pacientes tem sido investigada no câncer de mama. A extensão do TIL varia e tem diferentes associações com resultados nos vários subtipos de câncer de mama (SOLINAS *et al.*, 2017).

Os cânceres de mama triplo-negativo têm maior probabilidade de apresentarem linfócitos intratumorais <50% dando a característica de um tumor linfocitário, estima-se que a cada aumento de 10% deste infiltrado linfocitário maior é a chance de sobrevida (STANTON; DISIS, 2016).

## 2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Grande progresso foi feito no entendimento da biologia das DCs e das células T eficazes e regulatórias, abrindo caminho para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas nas neoplasias. Contudo, inúmeras questões ainda se encontram em aberto, como quais são os subconjuntos de DCs ideais para o uso clínico, melhores antígenos, estratégias de carregamento, doses, rotas de administração ou ensaios de potência. Somado a isto, o uso de terapias combinadas tem-se demonstrado como uma estratégia promissora no tratamento e eliminação de tumores e suas metástases.

Pesquisas adicionais são importantes para desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes que melhorem os resultados dos pacientes permite compreender melhor o papel do microambiente imunológico tumoral como um todo, devido à natureza complexa das interações entre o tumor e o sistema imunológico. Uma melhor compreensão sobre o uso de vacinas com DCs conjuntamente com TILs, pode ser usada na concepção de novos ensaios clínicos, onde o aumento do infiltrado imunológico com altos níveis de TILs prevê não apenas resposta à quimioterapia, mas também melhor taxa de sobrevida.

Mais de 200 ensaios clínicos de vacinas de DCs demonstraram que esta terapia é segura, altamente imunogênica e pode ativar regularmente respostas imunes antitumorais, além de causar regressão tumoral prolongada e rápida e resposta clínica em pacientes com câncer avançado que receberam tratamento anteriormente (SANTOS; BUTTERFIELD, 2018). Entretanto nossa hipótese é que a combinação da imunoterapia de DCs com outras terapias pode potencializar o efeito geral.

Para se avaliar o potencial imunoterapêutico das DCs e TILs é importante a avaliação do perfil de resposta imune sistêmico e local, realizado pela ativação de células presentes no baço e no tumor. Também é de extrema importância a realização da mensuração de metástases, devido ao impacto de prognóstico em que tumores secundários são associados. A avaliação dos fatores de transcrição é uma ferramenta importante para caracterizar o tipo de resposta imunológica frente ao tumor, o que pode indicar se de fato a estratégia terapêutica leva a uma imunidade antitumoral.

Além do impacto social, nossa abordagem poderá apontar conceitos científicos importantes para tratamento de doenças oncológicas, que podem gerar patentes, contribuindo para a emancipação científica e tecnológica de nosso país.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o perfil de resposta imunológica e a presença de metástases hepáticas em camundongos com carcinoma mamário, submetidos a imunoterapia com células dendríticas associado com linfócitos T infiltrantes de tumor.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o volume tumoral na mama de camundongos dos diferentes grupos de estudo.
- Quantificar a área metastática em fígado dos grupos tratados e não tratados;
- Avaliar por citometria de fluxo as células tumorais e esplênicas o perfil de resposta imunológica por meio da quantificação da média de intensidade de fluorescência dos fatores de transcrição T-bet, GATA-3, RORγt e FOXP3, dos grupos controle, tumor e tumor tratado.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRA

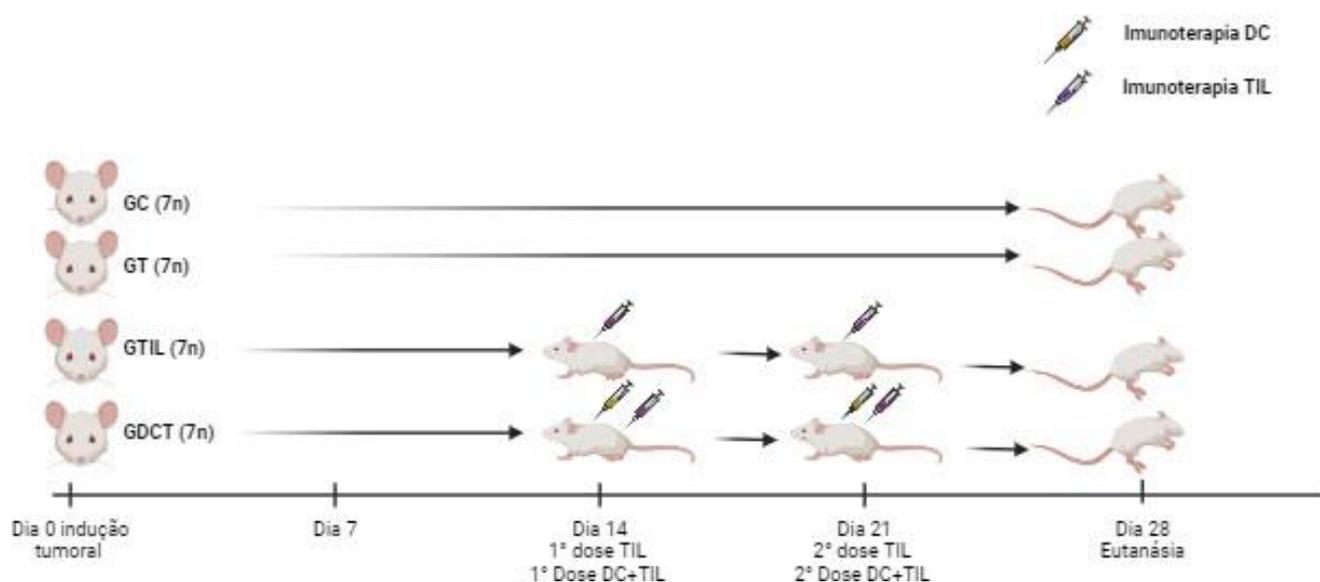
Trata-se de um estudo experimental com uma abordagem mista, onde foi utilizado camundongos para experimentos em in-vitro e in-vivo. A pesquisa aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro sob o parecer Nº 1/2021/CEUA/PROPPG, PROCESSO Nº 23085.008739/2020-24. Foram utilizadas 70 camundongos fêmeas da linhagem BALB/C com idade de 6 semanas, provenientes do Biotério Central da UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Os animais passaram por habituação no Biotério Setorial do Instituto de Pesquisa em Oncologia – IPON. Ficaram acomodados em gaiolas com dimensões de 305x198x133mm em gaiolas plásticas com acesso livre a água e comida, separados em diferentes grupos experimentais, sendo submetidos a ambientes ciclo claro-escuro, temperatura controlada 22°C +/-2°C.

Destes 70 animais, 28 foram induzidos com linhagens tumorais de mama para obtenção dos linfócitos tumores infiltrantes. Dos animais restantes, 14 animais foram utilizados para a confecção das vacinas de DCs e 28 animais integraram os grupos experimentais (Figura 2), os quais foram divididos em 4 grupos:

- **Grupo Controle (GC)** - constituído de 7 animais que não foram induzidos tumor e serviram como grupo de comparação dos parâmetros avaliados nos demais grupos;
- **Grupo Tumor de Mama (GT)**: constituído por 7 animais que foram induzidos ao desenvolvimento de tumor pela linhagem celular 4T1;
- **Grupo Tumor de Mama Tratado com Vacina de Linfócitos Tumor Infiltrantes Ativado (GTIL)**: constituído por 7 animais que foram induzidos ao desenvolvimento de tumor pela linhagem celular 4T1 e posteriormente tratados com a imunoterapia de linfócitos;
- **Grupo Tumor de Mama Tratado com a Vacina combinada (DCs + TILs), ou seja, Vacina de Células Dendríticas e Linfócitos Tumor Infiltrantes Ativado (GDC+TIL)**: constituído por 7 animais que foram induzidos ao desenvolvimento de tumor pela linhagem celular de 4T1 e posteriormente tratados com a imunoterapia combinada.

Após 28 dias de indução tumoral, os animais foram eutanasiados por anestesia intraperitoneal com xilazina (30 mg/kg) e ketamina (300 mg/kg). Em seguida, foram retirados baço e tumor, os quais foram utilizados parte na citometria de fluxo e parte armazenados em TRIzol®.

Figura 2: Fluxograma da fase experimental



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

Nota: Imagem ilustrativa descrevendo os processos durante a fase experimental do trabalho, descrevendo os grupos e ilustrando os processos e os dias em que foram realizados. Siglas: Células Dendríticas (DC), Linfócitos T Infiltrantes de Tumor (TIL).

## 4.2 INDUÇÃO TUMORAL

As células de linhagem 4T1 foram cultivadas em meio RPMI 1680 (Sigma-Aldrich), suplementado com bicarbonato de Sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), soro bovino fetal (SBF), HEPES ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ ), Estreptomicina, L-Glutamina ( $200\text{nM}$ ), Mercaptoethanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ ), Pivurato de Sódio ( $\text{C}_3\text{H}_3\text{NaO}_3$ ) em estufa a 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , posteriormente, nos dias de indução as mesmas foram lavadas e suspendidas em solução fisiológica 0,9%, foram inoculadas na glândula mamária abdominal direita, em uma concentração de  $2 \times 10^5$  células.

Para manter um padrão de qualidade e ver a viabilidade destas células, foi feito um acompanhamento diário, observando-as pelo microscópio, até os dias de indução.

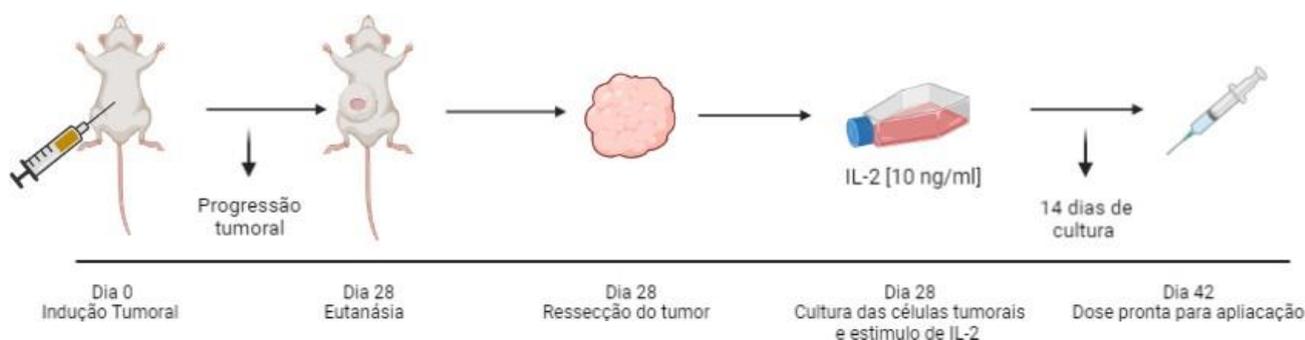
### 4.3 IMUNOTERAPIA DE LINFÓCITO T INFILTRANTES DE TUMOR

O desenvolvimento do projeto de pesquisa pode ser dividido em 2 etapas: a produção de imunoterapias, e a aplicação das imunoterapias nos grupos experimentais.

Em um primeiro momento, foi necessário desenvolver a imunoterapia de TIL's (Figura 3). Foram utilizados 28 animais, onde os animais BALB/c foram induzidos ao câncer de mama com a linhagem de células 4T1 para adquirir as doses para a imunoterapia, seguindo o padrão de 1 dose por animal. Após 28 dias estes animais foram eutanasiados por meio de superdosagem anestésica (Cetamina 300 mg/kg e Xilazina 30 mg/kg intraperitoneal), foi coletado o tumor, feito uma divulsão mecânica e as células já separadas do tecido, foram ambientadas em garrafas de 25cm<sup>2</sup> (volume 7,5 ml) com meio RPMI 1680 (Sigma-Aldrich), suplementado com bicarbonato de Sódio (NaHCO<sub>3</sub>), soro bovino fetal (SBF), HEPES (C H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S), Estreptomicina, L-Glutamina (200<sub>n</sub>M), Mercaptoethanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS), Pivurato de Sódio (C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub>) em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, em uma concentração de 15x10<sup>6</sup> células, receberam estímulo de IL-2 [10 ng/ml]. Após 14 dias foi feita a retirada das células do sobrenadante de cultura, lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4, e ressuspendidas em solução fisiológica 0,9%. Após este processo a imunoterapia já estava finalizada.

Foram administradas 5,0x10<sup>6</sup> células, em um volume de 50µL de solução fisiológica, em dose dupla, após 14 e 21 dias da indução tumoral do grupo experimental.

Figura 3: Fluxograma da produção da imunoterapia de TILs



Nota: Imagem ilustrativa descrevendo os processos durante a produção da imunoterapia.

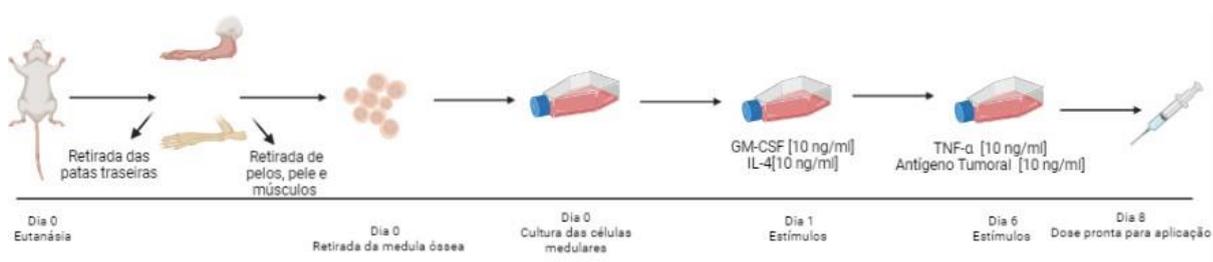
#### 4.4 IMUNOTERAPIA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

A vacina de células dendríticas é obtida através da medula óssea de camundongos BALB/c (Figura 4). No dia 0 é feita a eutanásia dos animais por meio de super dosagem anestésica (Cetamina 300 mg/kg e Xilazina 30 mg/kg intraperitoneal), dissecação das patas traseiras, retirada de pelos, pele e músculo. Com o auxílio de uma seringa de 13,4 x 5mm e solução fisiológica as células da medula óssea foram retiradas. As células medulares foram então colocadas em garrafas de 25cm<sup>2</sup> (volume 7,5 ml) condicionadas com meio IMDM (Sigma-Aldrich) suplementado com -Glutamina (200<sub>n</sub>M), Pivurato de Sódio (C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>3</sub>), 100µg/mL de Gentamicina, 0,1 mM de vitaminas e 5% de SBF, incubadas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, em uma concentração de 15x10<sup>6</sup> células. Os seguintes estímulos foram realizados:

- Dia 1: estímulo de GM-CSF [10 ng/ml] e IL-4 [10 ng/ml];
- Dia 6: estímulo de TNF- $\alpha$  [10 ng/ml] e antígeno tumoral provenientes de células 4T1 [10 ng/ml].

Após 48 horas do segundo estímulo as células em cultura já estão diferenciadas em células dendríticas e estão prontas para a produção da vacina, assim foram retiradas, lavadas com PBS pH 7,4 e ressuspendidas em solução fisiológica 0,9%. Foram administradas 5,0 x 10<sup>6</sup> células, em 50µL de solução fisiológica, em dose dupla, após 14 e 21 dias da indução tumoral do grupo experimental.

Figura 4: Fluxograma da produção da imunoterapia de DCs



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Nota: Imagem ilustrativa descrevendo os processos durante a produção da imunoterapia.

#### 4.5 MEDIDA TUMORAL

A medição tumoral começou após 7 dias da indução do tumor. Até a chegada do 7º dia, os animais ficaram em observação para avaliação do comportamento ou estresse do animal.

Após o prazo, foi realizada a medição a cada 2 dias, onde, com o auxílio de um paquímetro, foi mensurado o volume tumoral no sentido craniocaudal e látero-lateral.

Para determinar o valor final, foi usado a seguinte fórmula:  $[\text{maior diâmetro} \times (\text{menor diâmetro}^2)/2]$ .

#### 4.6 EUTANÁSIA E COLETA DE ORGÃOS

Após 28 dias, os grupos experimentais foram eutanasiados através de super dosagem anestésica (Cetamina 300 mg/kg e Xilazina 30 mg/kg intraperitoneal).

Retirou-se dos animais o tumor e baço, para realização da citometria de fluxo.. Também foi coletado o fígado destes animais com inclusão em parafina, seguido de cortes histológicos.

#### 4.7 PARAFINIZAÇÃO, CORTES HISTOLÓGICOS E COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA

Para a avaliação da presença de metástases foram confeccionadas lâminas de fígado dos animais dos grupos Tumor, Tumor TIL e Tumor DC+TIL. A realização da parafinização foi seguido o protocolo abaixo:

Tabela 1 - Etapas para realização da parafinização

<b>Etapas</b>	<b>Duração</b>
<b>Fixação do Tecido</b>	
Formalina 10%	24 horas
<b>Desidratação</b>	
Solução de Etanol 70%	30 minutos
Solução de Etanol 80%	30 minutos

Solução de Etanol 90%	30 minutos
Solução de Etanol 100%	30 minutos

---

**Clareamento**

Xilol I	30 minutos
Xilol II	30 minutos
Xilol III	30 minutos

---

**Infiltração**

Parafina derretida	2 horas
--------------------	---------

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

Após a infiltração é feita a inclusão dos órgãos em moldes de parafina e posteriormente espera-se a solidificação.

Foram feitos corte de na espessura de 10µm em micrótomo (Leica RM2255) e posteriormente corados com Hematoxilina e Eosina. A realização da coloração foi seguida pelo protocolo abaixo:

Tabela 2 - Etapas para realização da coloração

<b>Etapas</b>	<b>Duração</b>
<b>Desparafinação</b>	
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
<b>Hidratação</b>	
Etanol 100%	3 minutos
Etanol 90%	3 minutos
Etanol 80%	3 minutos
Etanol 70%	3 minutos
Água destilada	5 minutos
<b>Corante Hematoxilina</b>	
Água Destilada	5 minutos
<b>Corante Eosina</b>	
Água Destilada	5 minutos
<b>Desidratação</b>	
Etanol 70%	3 minutos

Etanol 80%	3 minutos
Etanol 90%	3 minutos
Etanol 100%	3 minutos

---

**Clareamento Final**

---

Xilol I	3 minutos
---------	-----------

---

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

As lâminas foram observadas no microscópio *Nikon Eclipse T12*, onde foi capturado 12 imagens por lâmina divididas em um quadrante, as imagens foram analisadas e quantificadas pelo *software QuPath-0.4.4*. As áreas de metástases foram identificadas pela diferença de morfologia celular, geralmente próximas a vasos sanguíneos.

#### 4.8 CITOMETRIA DE FLUXO

Após a eutanásia como descrito anteriormente, o tumor e baço foram obtidos de seus respectivos grupos, para serem analisados pela técnica de citometria de fluxo.

A técnica foi realizada de acordo com o protocolo sugerido pelo próprio fabricante. Em um primeiro momento o tumor e o baço foram macerados em placas de Petri para conseguir extrair as células tumorais e esplênicas, respectivamente, posteriormente estas células foram colocadas em um tubo falcon de 50ml.

Para ter acesso aos leucócitos das amostras coletadas, as mesmas foram submetidas à lise de hemácias, onde se adicionou solução de lise (BD Biosciences - FACST<sup>TM</sup> Lysing Solution) em uma concentração de 1:10 mL, com incubação de 20 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação a 2100rpm por 10 minutos a 4°C foi retirado o sobrenadante, assim sobrando, somente, um precipitado celular. Foram lavadas 2 vezes com PBS, e realizado uma centrifugação de 2100rpm por 10 minutos a 4°C, no precipitado celular foi adicionado proteína transportadora inibitória (BD Golgi Stop<sup>TM</sup>) onde foi adicionado 500µL para cada 1mL de solução, as células foram incubadas por 20 minutos a 4°C em geladeira, ao abrigo da luz, seguido por centrifugação 2100rpm por 10 minutos a 4°C para a retirada do sobrenadante e excesso de proteína, seguido de mais 2 lavagens com PBS seguindo os padrões anteriores.

Foi feita a contagem de células em câmara de Neubauer e os leucócitos foram separados em tubos de ensaio com uma concentração de  $10^6$  células e realizado a marcação extra celular (CD4 APC) e seu respectivo isotipo, depois o tubo foi incubado por 30 minutos ao abrigo da luz. As células foram lavadas para retirada do excesso de anticorpos e se adicionou BD Cytotfix/Citoperm™ solução de fixação e permeabilização, processo realizado para preparar as células para as marcações intracelulares.

Feitas as marcações intracelulares (T-bet, GATA3, FOXP3, RORγT) e seus respectivos isotipos, os tubos são novamente incubados por 30 minutos ao abrigo da luz, posteriormente são lavadas por 3 vezes com solução tampão (BD Perm/Wash™ Buffer), finalizando assim o processo, com os leucócitos marcados e prontos para leitura no citômetro FACS Calibur™, onde foi analisado a média de intensidade de fluorescência das células marcadas.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

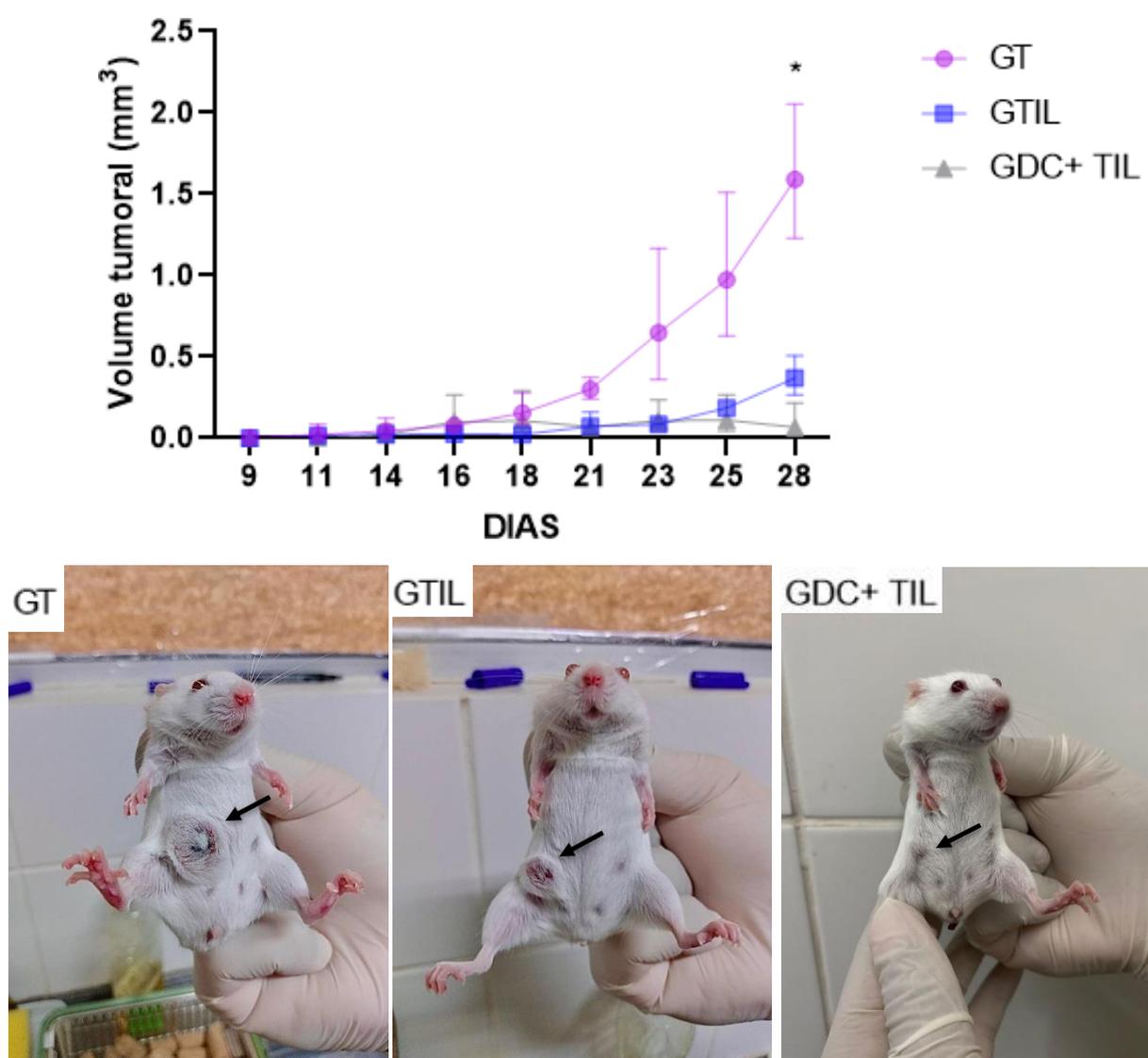
Os dados foram analisados por meio do teste de normalidade Shapiro Wilk. A distribuição dos dados foi considerada normal, e o teste paramétrico ANOVA para comparação entre 3 ou mais grupos foi utilizado. Os resultados com valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Para a análise dos dados, o software GraphPad Prism 9 foi utilizado.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 VOLUME TUMORAL

No decorrer do experimento foi feito o acompanhamento para a medida tumoral, após a eutanásia e com a tabulação dos dados conseguimos uma diferença significativa no tamanho do volume tumoral quando comparamos os grupos tratados com o grupo sem tratamento ( $p < 0,05$ ). Porém não há diferença significativa quando comparamos o grupo tratado com imunoterapia de TILs, com o grupo que recebeu as 2 imunoterapias.

Figura 5: Avaliação do volume tumoral por  $\text{mm}^3$  de camundongos não vacinados e  
Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

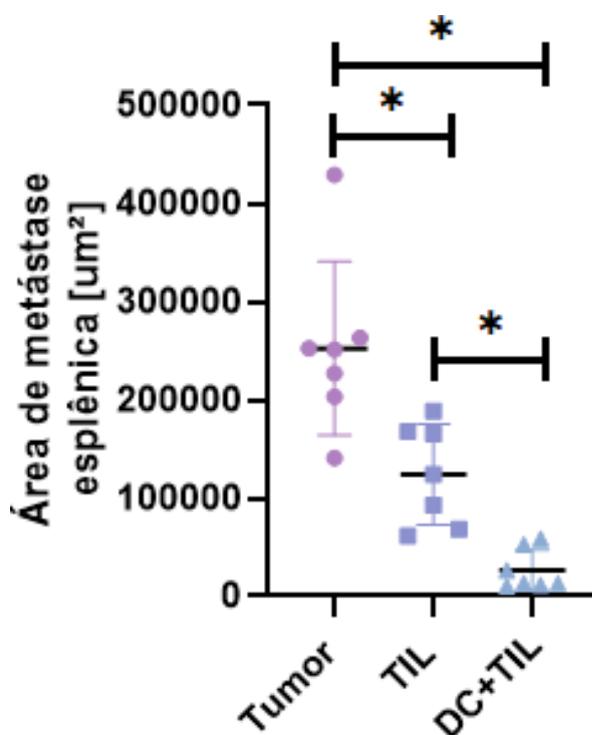


Nota: Análise do volume tumoral através da medição do paquímetro e convertido os valores na fórmula [maior diâmetro x (menor diâmetro<sup>2</sup>)/2], comparando Grupo Tumor (GT), Grupo TIL (GTIL) e Grupo DC+TIL (GDC+TIL). Os resultados foram analisados usando o teste 2way ANOVA para comparar os 3 grupos (\*p<0,05).

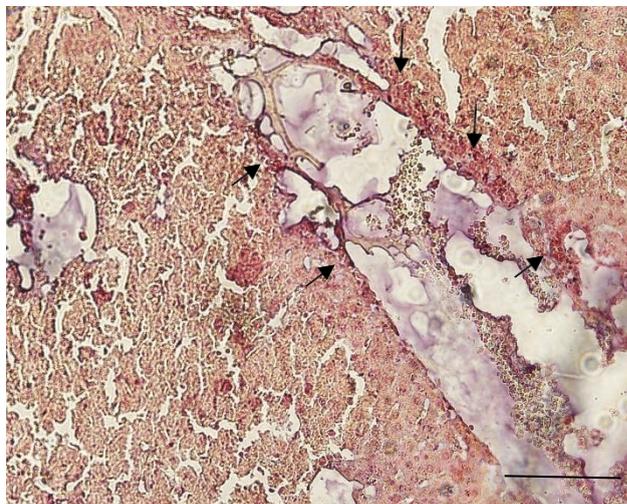
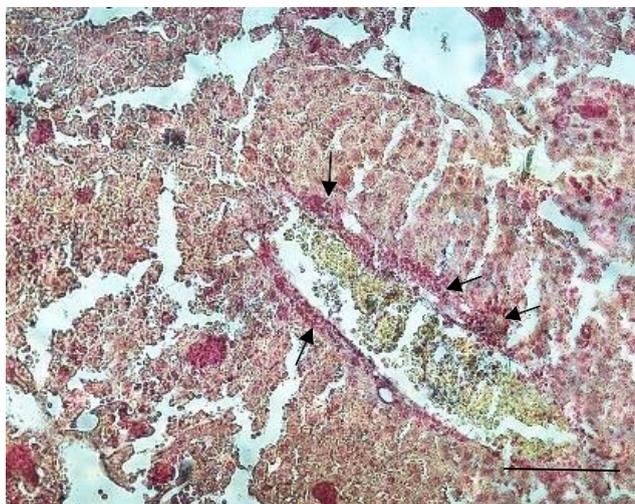
## 5.2 METÁSTASES HEPÁTICAS

Em relação as áreas metastáticas presentes nos cortes histológicos de fígado corados com hematoxilina e eosina, pode se visualizar que ambas imunoterapias promoveram uma diminuição de áreas com metástases quando comparamos o Grupo Tumor com o Grupo TIL (\*p<0,05) e com o grupo DC+TIL (\*p<0,05).

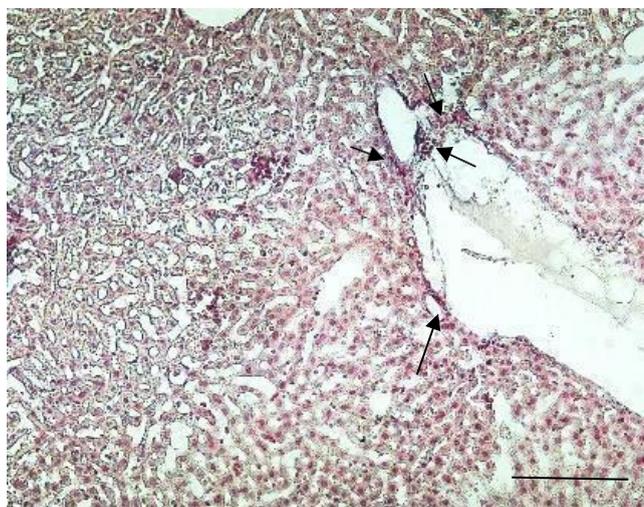
Figura 6: Avaliação de metástases hepáticas



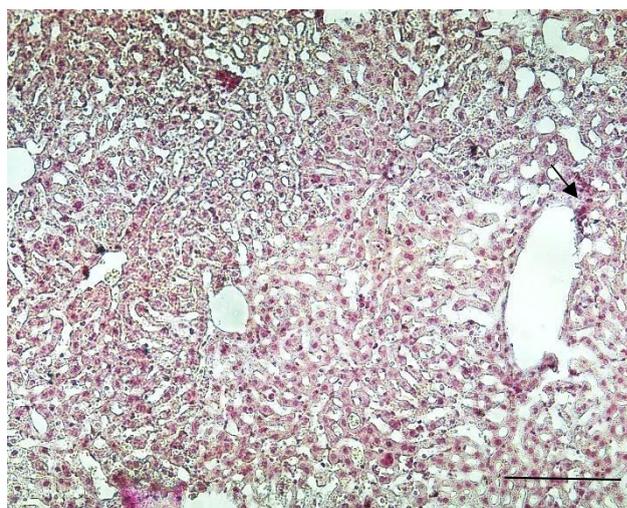
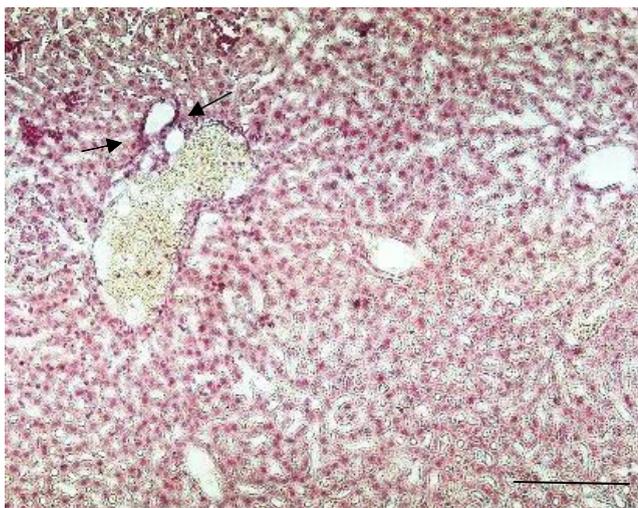
## TUMOR



## TIL



## DC+TIL



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

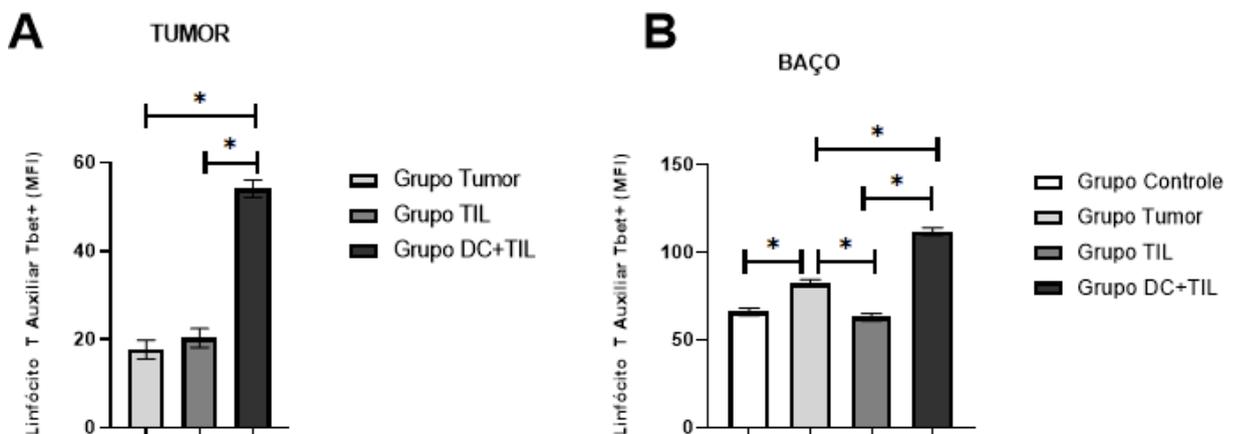
Nota: Análise feita de áreas metastáticas em  $\mu\text{m}^2$  de cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina. Análise de área metastática ( $\mu\text{m}^2$ ) do grupo tumor com o grupo TIL ( $*p<0,05$ ). Análise de área metastática ( $\mu\text{m}^2$ ) do grupo tumor com o grupo DC+TIL ( $*p<0,05$ ). Análise de área metastática ( $\mu\text{m}^2$ ) do grupo TIL com o grupo DC+TIL ( $*p<0,05$ ). Na análise dos resultados foi utilizado o teste “one-way ANOVA” para a comparação com 3 grupos ou mais. Escala de barra: 200 $\mu\text{m}$  (40x)

### 5.3 ANÁLISE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO T-BET EM LINFÓCITOS T AUXILIARES EM TUMOR E BAÇO

Ao analisarmos o gráfico da figura 6A, observamos que a intensidade de fluorescência do fator de transcrição T-bet em linfócitos T auxiliares foi superior quando comparamos os grupos tratados GDC+TIL e GTIL em relação ao GT ( $*p<0,05$ ), entretanto nota-se a eficiência da imunoterapia combinada quando comparamos também, os dois grupos tratados.

Já no gráfico da figura 6B, nos deparamos com linfócitos T auxiliares esplênicos e pode-se observar que no GDC+TIL o fator de transcrição T-bet também está aumentado, porém quando comparamos o GTIL ao grupo controle, o mesmo mantém níveis semelhantes, porém não significativos, já quando comparado ao Grupo Tumor a uma diminuição significativa ( $*p<0,05$ ).

Figura 7: Avaliação do fator de transcrição T-bet em linfócitos T auxiliares intratumorais e esplênicos.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Nota: (A) Análise da média de intensidade de fluorescência por citometria de fluxo de linfócitos T auxiliares intratumorais do grupo tumor e grupo TIL ( $*p<0,05$ ); grupo tumor e grupo DC+TIL ( $*p<0,05$ );

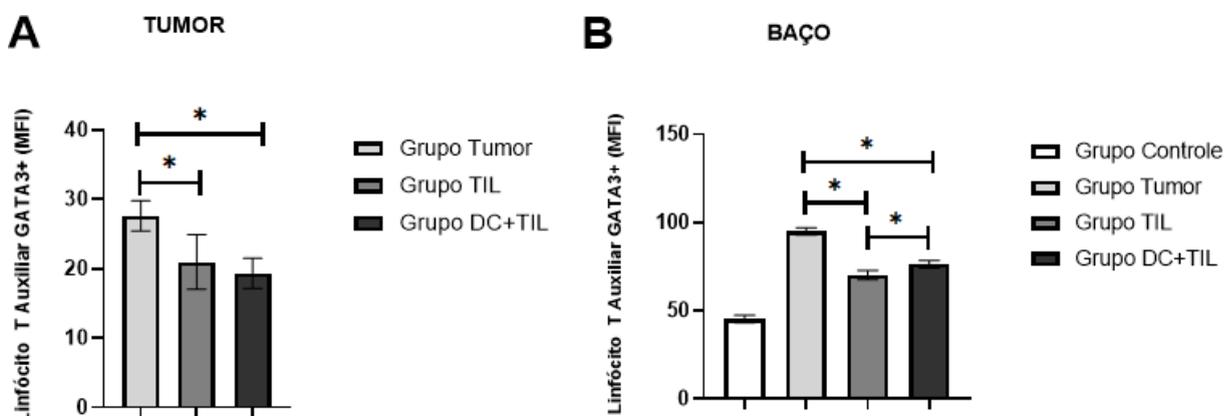
grupo DC+TIL e grupo TIL (\*p<0,05). (B) Análise da média de intensidade de fluorescência por citometria de fluxo de linfócitos T auxiliares esplênicos do grupo controle e grupo tumor (\*p<0,05); grupo controle e grupo TIL (\*p<0,05); grupo controle e grupo DC+TIL (\*p<0,05); grupo tumor e grupo TIL (\*p<0,05); grupo tumor e grupo DC+TIL (\*p<0,05); grupo TIL e grupo DC+TIL (\*p<0,05). Na análise dos resultados foi utilizado o teste “one-way ANOVA” para a comparação com 3 grupos ou mais.

#### 5.4 ANÁLISE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO GATA3 EM LINFÓCITOS T AUXILIARES EM TUMOR E BAÇO

No gráfico da figura 7A, o fator de transcrição GATA3 presente em linfócitos Tauxiliares intratumorais é maior no grupo tumor quando comparado com o grupo TIL (\*p<0,05) e com grupo DC+TIL (\*p<0,05), no entanto os valores não foram significativos quando se compara os dois grupos tratados.

Na resposta sistêmica na figura 7B os linfócitos t auxiliares esplênicos com presença de GATA3 também apresenta um maior aumento no grupo tumor em relação aos grupos TIL (\*p<0,05) e DC+TIL (\*p<0,05).

Figura 8: Avaliação do fator de transcrição GATA3 em linfócitos T auxiliares intratumorais e esplênicos.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

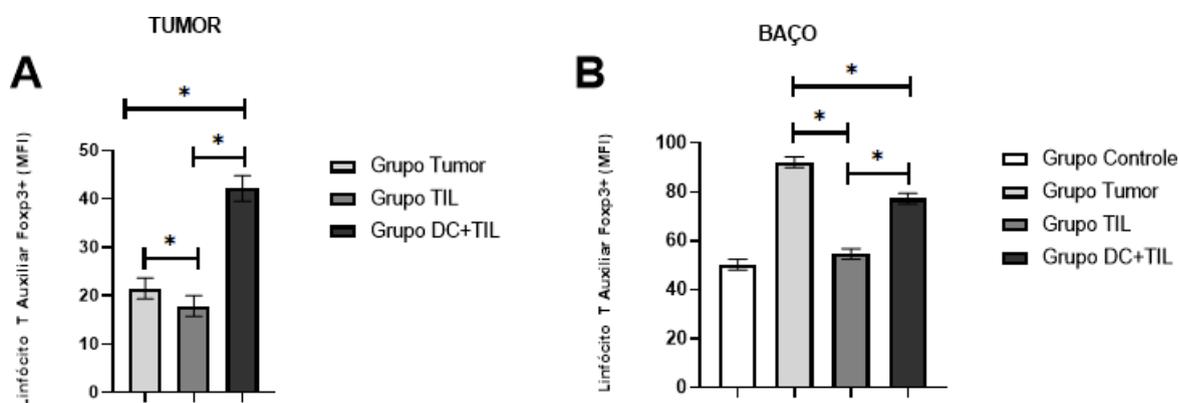
Nota: (A) Análise da média de intensidade de fluorescência por citometria de fluxo de linfócitos T auxiliares intratumorais do grupo tumor e grupo TIL (p<0,05); grupo tumor e grupo DC+TIL (p<0,05); grupo DC+TIL e grupo TIL não apresentou diferença significativas (p<0,05). (B) Análise da média de intensidade de fluorescência por citometria de fluxo de linfócitos T auxiliares esplênicos do grupo controle e grupo tumor (p<0,05); grupo controle e grupo TIL (p<0,05); grupo controle e grupo DC+TIL (p<0,05); grupo tumor e grupo TIL (p<0,05); grupo tumor e grupo DC+TIL (p<0,05); grupo TIL e grupo DC+TIL (p<0,05). Na análise dos resultados foi utilizado o teste “one-way ANOVA” para a comparação com 3 grupos ou mais.

## 5.5 ANÁLISE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO FOXP3 EM LINFÓCITOS T AUXILIARES EM TUMOR E BAÇO

No gráfico da figura 8A, os linfócitos T auxiliares intratumorais com o fator de transcrição FOXP3 presente, tiveram um aumento significativo quando comparado o grupo DC+TIL com o grupo Tumor ( $p < 0,05$ ), e com o grupo TIL ( $p < 0,05$ ), entretanto há uma diminuição na expressão do fator de transcrição FOXP3 entre o grupo tumor e grupo TIL ( $p < 0,05$ ).

Ao analisarmos o gráfico da figura 8B, observa-se que o grupo Tumor tem um maior nível na expressão do fator de transcrição FOXP3, quando o comparamos com os demais grupos ( $p < 0,05$ ).

Figura 9: Avaliação do fator de transcrição FOXP3 em linfócitos T auxiliares intratumorais e esplênicos.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

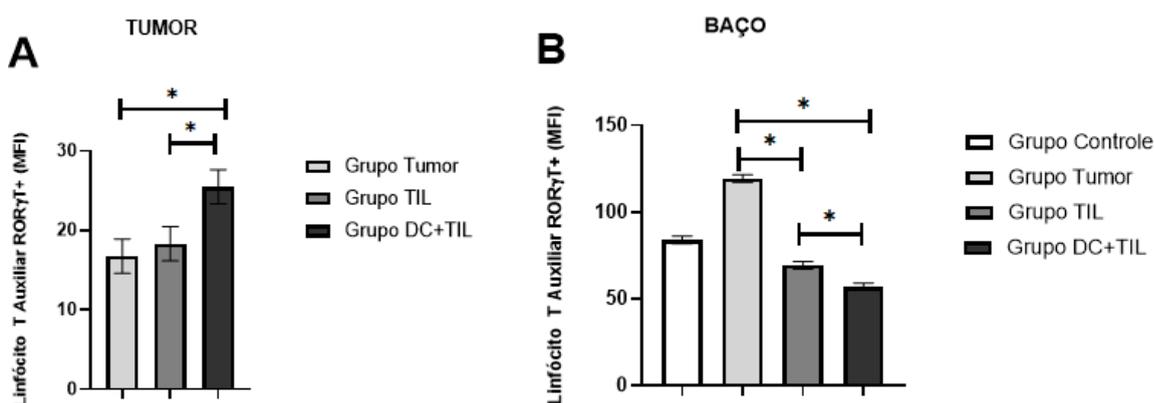
Nota: (A) Análise da média de intensidade de fluorescência por citometria de fluxo de linfócitos T auxiliares intratumorais do grupo tumor e grupo TIL ( $p < 0,05$ ); grupo tumor e grupo DC+TIL ( $p < 0,05$ ); grupo DC+TIL e grupo TIL ( $p < 0,05$ ). (B) Análise da média de intensidade de fluorescência por citometria de fluxo de linfócitos T auxiliares esplênicos do grupo controle e grupo tumor ( $p < 0,05$ ); grupo controle e grupo TIL ( $p < 0,05$ ); grupo controle e grupo DC+TIL ( $p < 0,05$ ); grupo tumor e grupo TIL ( $p < 0,05$ ); grupo tumor e grupo DC+TIL ( $p < 0,05$ ); grupo TIL e grupo DC+TIL ( $p < 0,05$ ). Na análise dos resultados foi utilizado o teste “one-way ANOVA” para a comparação com 3 grupos ou mais.

## 5.6 ANÁLISE DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO ROR $\gamma$ T EM LINFÓCITOS T AUXILIARES EM TUMOR E BAÇO

No gráfico da figura 9A, foi analisado linfócitos T auxiliares com a presença do fator de transcrição ROR $\gamma$ T, onde o grupo DC+TIL apresenta níveis superiores quando comparado ao grupo TIL ( $p < 0,05$ ) e grupo tumor ( $p < 0,05$ ), porém os valores do fator de transcrição dos grupos TIL e tumor não são significativos quando comparados ( $p < 0,05$ ).

No gráfico da figura 9B, os valores de ROR $\gamma$ T no grupo tumor é superior quando comparado ao grupo TIL ( $p < 0,05$ ) e grupo DC+TIL ( $p < 0,05$ ).

Figura 10: Avaliação do fator de transcrição ROR $\gamma$ T em linfócitos T auxiliares intratumorais e esplênicos.



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Nota: (A) Análise da média de intensidade de fluorescência por citometria de fluxo de linfócitos T auxiliares intratumorais do grupo tumor e grupo TIL não foram significantes ( $p < 0,05$ ); grupo tumor e grupo DC+TIL ( $p < 0,05$ ); grupo DC+TIL e grupo TIL ( $p < 0,05$ ). (B) Análise da média de intensidade de fluorescência por citometria de fluxo de linfócitos T auxiliares esplênicos do grupo controle e grupo tumor ( $p < 0,05$ ); grupo controle e grupo TIL ( $p < 0,05$ ); grupo controle e grupo DC+TIL ( $p < 0,05$ ); grupo tumor e grupo TIL ( $p < 0,05$ ); grupo tumor e grupo DC+TIL ( $p < 0,05$ ); grupo TIL e grupo DC+TIL ( $p < 0,05$ ). Na análise dos resultados foi utilizado o teste “one-way ANOVA” para a comparação com 3 grupos ou mais.

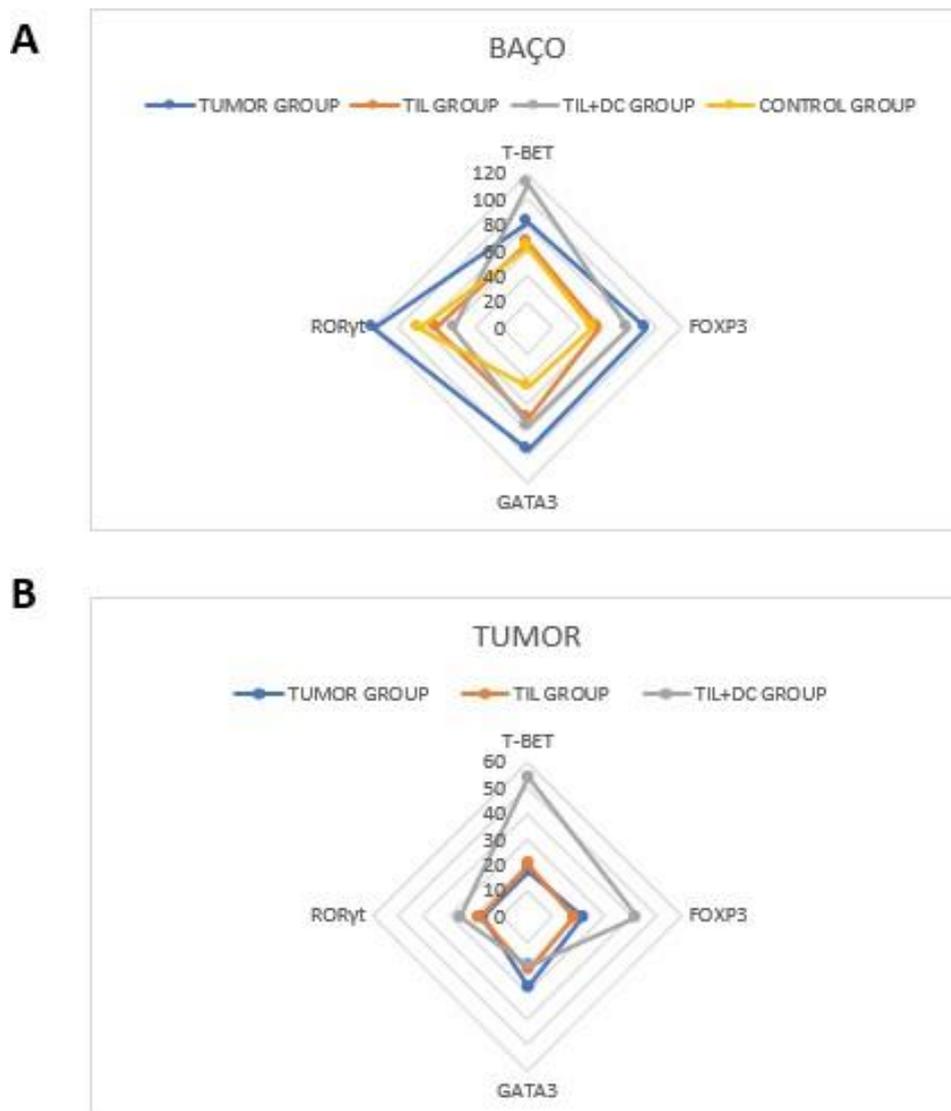
## 5.7 EXPRESSÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO NO BAÇO E TUMOR

No gráfico da figura 10A, é possível visualizar o comportamento dos fatores de transcrição T-bet, GATA3, Foxp3 e ROR $\gamma$ T em conjunto no baço, e nota-se um aumento de desses fatores nos grupos Tumor, TIL e DC+TIL quando comparados ao grupo tumor.

Na figura 10B, se visualiza o comportamento dos fatores de transcrição T-bet, GATA3, Foxp3 e ROR $\gamma$ T em conjunto no tumor, onde o grupo que recebeu as 2

imunoterapias combinadas (DC+TIL) apresenta maiores valores de T-bet, Foxp3 e ROR $\gamma$ T quando comparados aos outros grupos (TIL), (Tumor). É evidente que no grupo DC+TIL apresenta maiores concentrações de T-bet em relação ao Foxp3.

Figura 10: Expressão dos fatores de transcrição no baço e tumor



Fonte: Elaborada pelo autor, 2024.

Nota: Gráficos de satélite mostrando a distribuição da média de intensidade de fluorescência (MFI) no baço (A) e tumor (B) analisando a intensidade dos fatores de transcrição de células T T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ T e FOXP3. O baço e o tumor dos animais do grupo controle, grupo tumor, grupo TIL e grupo TIL+DC foram analisados pela técnica de citometria de fluxo.

## 6. DISCUSSÃO

Nos últimos anos o câncer vem sendo um grande desafio para a saúde pública mundial, por conta de suas altas taxas de incidência e mortalidade, diante disso se dá a necessidade pela busca de novos tratamentos, que fujam das terapias convencionais: quimioterapia, radioterapia e cirurgia. Assim surge a imunoterapia com uma abordagem promissora, que visa a melhora na qualidade de vida, e em alguns casos, a remissão completa do tumor.

No presente estudo, foram utilizadas 2 tipos de imunoterapias aplicadas em combinação como forma de tratamento em um modelo *in vivo* de carcinoma mamário murino. A terapia celular adotiva com linfócitos infiltrantes de tumor, obtidas da retirada desses linfócitos do microambiente tumoral colocados em cultura na presença de IL-2, na função de expansão clonal (KONGKAEW *et al.*, 2022). E a vacina de DCs que visa a ativação do sistema imune, principalmente de células T, como já bem descrito na literatura (PALUCKA; BANCHEREAU, 2013). Nossos resultados indicam que a combinação das 2 imunoterapias demonstram eficácia, o que valida nossa hipótese.

É evidente que a terapia celular adotiva, notadamente com linfócitos infiltrantes de tumor, revelou-se eficaz na redução do volume tumoral e da área de metástase hepática. No entanto, ao se contrastar esses resultados com o grupo submetido à combinação das duas imunoterapias, observam-se promissoras vantagens. A administração de células dendríticas, responsáveis por iniciar a resposta imune, juntamente com linfócitos T previamente ativadas, evidencia-se como um aprimoramento notável, sugerindo uma sinergia que intensifica a eficácia do tratamento.

Quando comparamos nossos resultados com o que já foi descrito na literatura, outros estudos usando imunoterapias de forma separada conseguiram resultados parecidos ou até melhores. Por exemplo, em um ensaio clínico, o uso de TIL autólogos com IL-2 para tratar metástases cerebrais causou uma regressão completa da metástase em 41% dos pacientes tratado (HONG *et al.*, 2010). Além disso, em um estudo semelhante usando células dendríticas em camundongos BALB/c, a imunoterapia também mostrou ser eficaz ao reduzir metástases pulmonares (FIELDS; SHIMIZU; MULÉ, 1998). Estudos no nosso grupo de pesquisa também demonstram eficácia das células dendríticas em reduzir metástases, porém em um contexto de em

que estas células são utilizadas como vacina profilática e não como imunoterapia (VIEIRA *et al.*, 2021). Essas descobertas destacam a importância de pesquisas mais aprofundadas para entender melhor as respostas terapêuticas e aprimorar estratégias imunoterápicas combinadas, como as propostas neste estudo.

Quando se fala em combate tumoral, quer seja por meio de tratamentos convencionais ou no âmbito das imunoterapias, a eficácia da resposta imunológica frequentemente está associada ao aumento dos linfócitos T, estas células apresentam subtipos que desempenham papéis tanto na regressão quanto na progressão da atividade tumoral (SELEDTSOV; GONCHAROV; SELEDTSOVA, 2015). Para alcançar uma resposta imunológica eficaz contra o tumor, é crucial que haja uma presença significativa de linfócitos auxiliares do tipo 1, especificamente caracterizados pelo fator de transcrição T-bet (LAZAREVIC; GLIMCHER; LORD, 2013; TIAN *et al.*, 2021).

Observamos em nossos resultados de infiltrado tumoral, que os níveis do fator de transcrição T-bet são notavelmente mais elevados no grupo TIL em comparação ao grupo Tumor isolado. Além disso, constatamos que esses níveis alcançam um patamar ainda mais superior quando comparamos o grupo DC+TIL, o que vai de encontro com o trabalho MORI *et al.* (2019) onde foi observado que pacientes que tiveram um infiltrado com níveis maiores T-bet tiveram uma maior taxa de sobrevida global, constatando que quanto maiores os níveis de T-bet melhor o prognóstico dos pacientes, sendo similar aos nossos resultados onde o grupo DC+TIL obteve menor volume tumoral e menor área de metástase, sendo assim, um indicativo de melhor prognóstico.

A alta expressão de T-bet reprime a expressão de IL-4, interleucina a qual é de extrema importância para a diferenciação do linfócito T naïve em perfil Th2, e acaba por influenciar diretamente na expressão de GATA3 (FANG; ZHU, 2017). O que pode explicar nossos resultados em que os níveis de linfócitos T auxiliares do tipo 2, mediados pelo fator de transcrição GATA3, foram observados em patamares inferiores nos grupos tratados em comparação com o grupo Tumor. Esta observação pode ser explicada pelos dados já documentados na literatura, nos quais se destaca que o perfil Th2 é eficaz na resposta imune contra parasitas extracelulares, como helmintos, bem como em condições alérgicas e não são efetivos na resposta imune antitumoral (LUCKHEERAM *et al.*, 2012). Outro ponto que já foi citado anteriormente, é o antagonismo dos perfis Th1/Th2 (LUCKHEERAM *et al.*, 2012; MAHLANGU *et al.*,

2020) que também é evidenciado em nossos resultados quando fazemos uma análise de equilíbrio entre esses dois perfis.

É de conhecimento que as células T auxiliares do tipo regulatório, mediadas pelo fator de transcrição FOXP3, desempenham a função de imunossuprimir a resposta imunológica. Esse papel é crucial para manter a homeostase durante uma infecção, contribuindo para a preservação dos níveis de tolerância imunológica. (LI; RUDENSKY, 2016). Essa capacidade é viabilizada pela secreção de citocinas inibitórias, tais como IL-10, IL-35 e TGF- $\beta$ , as quais têm a capacidade de inibir células T citotóxicas, auxiliares e células dendríticas quando ativadas (TOOMER; MALEK, 2018). Considerando e analisando os resultados obtidos, inicialmente, a elevação do fator de transcrição FOXP3 no grupo que recebeu duas imunoterapias não sinaliza otimismo, quando se analisa o resultado isoladamente, entretanto, uma perspectiva mais abrangente emerge ao examinar o gráfico da figura 10B que demonstra todos os fatores de transcrição no tumor, revelando claramente a predominância do perfil Th1 sobre o perfil Treg no grupo DC+TIL. Outro ponto importante que deve ser ressaltado, é que no microambiente tumoral sempre haverá a expressão de FOXP3 (SALEH; ELKORD, 2020). Então níveis mais altos deste fator de transcrição são esperados, porém não em grupos que foram tratados com imunoterapia. O que pode ser explicado em nossos resultados em relação a esse aumento é o fato da realização da terapia celular adotiva com TILs, onde estimulamos esses linfócitos *in vitro* com IL-2, citocina utilizada para expansão clonal (ABBAS *et al.*, 2018). Porém não foi feita a separação de linfócitos, e os mesmos foram infundidos nos camundongos com a presença de todos os subtipos.

Nosso estudo possui algumas limitações que devem ser mencionadas, como a falta de investigação do papel de linfócitos citotóxicos tanto no microambiente tumoral como no baço, pois SABERIAN *et al.* (2021) em seu estudo com humanos utilizando as duas imunoterapias buscou uma abordagem selecionando somente linfócitos T citotóxicos para a produção de TILs e em seus resultados sugerem que a combinação pode resultar em resposta clínica e uma maior sobrevida, outro estudo de LOU *et al.* (2004) em camundongos resultou em um aumento da resposta antitumoral. Então por mais que a expressão de FOXP3 esteja alta, existem outros mecanismos da resposta imune envolvidos para compensar está alta expressão.

Embora já descrito anteriormente que os linfócitos do perfil Th17 possuem funcionalidades divididas em relação ao seu papel no combate tumoral (GUÉRY;

HUGUES, 2015), em nossos resultados os linfócitos T auxiliares do perfil Th17 mediado pelo fator de transcrição ROR $\gamma$ T apresenta níveis maiores no grupo que recebeu as 2 imunoterapias, em seu trabalho BLOCK et al. (2020) utilizou de células dendríticas para induzir o perfil Th17, concluindo que, apesar do número limitado de pacientes e do risco potencial de viés, a indução do perfil Th17 pode estar relacionada a uma melhora na resposta imunogênica, resultando em benefícios clínicos.

Os resultados obtidos a partir da análise das células T esplênicas apresentam distinções quando comparados aos linfócitos tumorais. Essa diferença decorre da natureza do baço, um órgão linfóide secundário, que representa a resposta imune sistêmica, correspondente ao organismo como um todo. A resposta imune sistêmica envolve a mobilização de células imunológicas circulantes, em contraste com a resposta imune local, que se concentra de maneira específica em um local designado, como é o caso do tumor em questão (NIKOLICH-ŽUGICH; DAVIES, 2017).

De maneira geral, nosso trabalho demonstrou que a imunoterapia com TILs é eficiente, porém quando juntamos a terapia celular adotiva com a imunoterapia de células dendríticas, os resultados podem ser ainda mais otimistas. Porém outras análises devem ser feitas como a avaliação de moléculas de adesão, células T citotóxicas afim de enriquecer o conhecimento da resposta imunológica com imunoterapias contra os tumores.

## **7. CONCLUSÃO**

A eficiência da imunoterapia com TILs de forma isolada em camundongos BALB/c induzidos com carcinoma mamário pela linhagem de células 4T1, como também evidenciou uma potencialização quando combinada a imunoterapia de células dendríticas, regredindo o volume tumoral, como também pontos metastáticos no fígado, sendo necessárias pesquisas que busquem compreender ainda mais os mecanismos envolvidos na redução de metastases.

O perfil de resposta imune foi analisado por meio dos fatores de transcrição correspondentes aos subtipos de linfócitos constatando que o perfil Th1 teve aumento nos grupos que receberam a intervenção com as imunoterapias suprimindo os perfis Treg e Th2.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; TROTTA, E.; R SIMEONOV, D.; MARSON, A.; BLUESTONE, J. A. Revisiting IL-2: Biology and Therapeutic Prospects. **Science Immunology**, v. 3, n. 25, p. eaat1482, 6 jul. 2018.
- ANNUNZIATO, F.; ROMAGNANI, C.; ROMAGNANI, S. The 3 Major Types of Innate and Adaptive Cell-Mediated Effector Immunity. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 3, p. 626–635, mar. 2015.
- ARROYO-CRESPO, J. J.; ARMIÑÁN, A.; CHARBONNIER, D.; DELADRIERE, C.; PALOMINO-SCHÄTZLEIN, M.; LAMAS-DOMINGO, R.; FORTEZA, J.; PINEDA-LUCENA, A.; VICENT, M. J. Characterization of Triple-Negative Breast Cancer Preclinical Models Provides Functional Evidence of Metastatic Progression. **International Journal of Cancer**, v. 145, n. 8, p. 2267–2281, 15 out. 2019.
- BALAN, S.; SAXENA, M.; BHARDWAJ, N. Chapter One - Dendritic cell subsets and locations. *Em*: LHUILLIER, C.; GALLUZZI, L. **International Review of Cell and Molecular Biology**. Immunobiology of Dendritic Cells Part A. [s.l.] Academic Press, 2019. p. 1–68.
- BIRKBAK, N. J.; MCGRANAHAN, N. Cancer Genome Evolutionary Trajectories in Metastasis. **Cancer Cell**, v. 37, n. 1, p. 8–19, 13 jan. 2020.
- BODOR, J. N.; BOUMBER, Y.; BORGHAEI, H. Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibition in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). **Cancer**, v. 126, n. 2, p. 260–270, 15 jan. 2020.
- 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.
- CANCEL, J.-C.; CROZAT, K.; DALOD, M.; MATTIUZ, R. Are Conventional Type 1 Dendritic Cells Critical for Protective Antitumor Immunity and How? **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 9, 2019.
- CONSTANTINO, J.; GOMES, C.; FALCÃO, A.; NEVES, B. M.; CRUZ, M. T. Dendritic Cell-Based Immunotherapy: A Basic Review and Recent Advances. **Immunologic Research**, v. 65, n. 4, p. 798–810, 1 ago. 2017.
- DELMONICO, L.; ALVES, G.; AMARAL, L. F. P. do. A biologia do câncer de mama e testes moleculares de prognóstico. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 14, 31 ago. 2015.

ERVIN, E.-H.; FRENCH, R.; CHANG, C.-H.; PAUKLIN, S. Inside the Stemness Engine: Mechanistic Links between Deregulated Transcription Factors and Stemness in Cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 87, p. 48–83, dez. 2022.

FANG, D.; ZHU, J. Dynamic balance between master transcription factors determines the fates and functions of CD4 T cell and innate lymphoid cell subsets. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 7, p. 1861–1876, 3 jul. 2017.

FELDMAN, S. A.; ASSADIPOUR, Y.; KRILEY, I.; GOFF, S. L.; ROSENBERG, S. A. Adoptive Cell Therapy--Tumor-Infiltrating Lymphocytes, T-Cell Receptors, and Chimeric Antigen Receptors. **Seminars in Oncology**, v. 42, n. 4, p. 626–639, ago. 2015.

FIELDS, R. C.; SHIMIZU, K.; MULÉ, J. J. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 16, p. 9482–9487, 4 ago. 1998.

FU, T.; DAI, L.-J.; WU, S.-Y.; XIAO, Y.; MA, D.; JIANG, Y.-Z.; SHAO, Z.-M. Spatial Architecture of the Immune Microenvironment Orchestrates Tumor Immunity and Therapeutic Response. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 14, n. 1, p. 98, 25 jun. 2021.

GARCÍA-JIMÉNEZ, C.; GODING, C. R. Starvation and Pseudo-Starvation as Drivers of Cancer Metastasis through Translation Reprogramming. **Cell Metabolism**, v. 29, n. 2, p. 254–267, 5 fev. 2019.

GARDNER, A.; DE MINGO PULIDO, Á.; RUFFELL, B. Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.

GEIGER, T. R.; PEEPER, D. S. Metastasis mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1796, n. 2, p. 293–308, 1 dez. 2009.

GUÉRY, L.; HUGUES, S. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 314620, 2015.

HE, Z.-Y.; WU, S.-G.; PENG, F.; ZHANG, Q.; LUO, Y.; CHEN, M.; BAO, Y. Up-Regulation of RFC3 Promotes Triple Negative Breast Cancer Metastasis and Is Associated With Poor Prognosis Via EMT. **Translational Oncology**, v. 10, n. 1, p. 1–9, fev. 2017.

HONG, J. J.; ROSENBERG, S. A.; DUDLEY, M. E.; YANG, J. C.; WHITE, D. E.; BUTMAN, J. A.; SHERRY, R. M. Successful Treatment of Melanoma Brain Metastases with Adoptive Cell Therapy. **Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 16, n. 19, p. 4892–4898, 1 out. 2010.

HOSOKAWA, H.; ROTHENBERG, E. V. How transcription factors drive choice of T cell fate. **Nature reviews. Immunology**, v. 21, n. 3, p. 162–176, mar. 2021.

HU, Z.; LI, Z.; MA, Z.; CURTIS, C. Multi-Cancer Analysis of Clonality and the Timing of Systemic Spread in Paired Primary Tumors and Metastases. **Nature Genetics**, v. 52, n. 7, p. 701–708, jul. 2020.

IVANOVA, E. A.; OREKHOV, A. N. T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 327470, 2015.

JOSEFOWICZ, S. Z.; RUDENSKY, A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 616–625, maio 2009.

KIM, H.-J.; CANTOR, H. CD4 T-Cell Subsets and Tumor Immunity: The Helpful and the Not-so-Helpful. **Cancer Immunology Research**, v. 2, n. 2, p. 91–98, fev. 2014.

KIM, M. Y. Breast Cancer Metastasis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1187, p. 183–204, 2021.

KONGKAEW, T.; THAIWONG, R.; TUDSAMRAN, S.; SAE-JUNG, T.; SENGPRASERT, P.; VASURATNA, A.; SUPPIPAT, K.; REANTRAGOON, R. TIL Expansion with High Dose IL-2 or Low Dose IL-2 with Anti-CD3/Anti-CD28 Stimulation Provides Different Quality of TIL-Expanded T Cell Clones. **Journal of Immunological Methods**, v. 503, p. 113229, abr. 2022.

KOSCIELNY, S.; TUBIANA, M. Parallel Progression of Tumour and Metastases. **Nature Reviews. Cancer**, v. 10, n. 2, p. 156, fev. 2010.

LAZAREVIC, V.; GLIMCHER, L. H.; LORD, G. M. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 11, p. 777–789, nov. 2013.

LI, M. O.; RUDENSKY, A. Y. T Cell Receptor Signaling in the Control of Regulatory T Cell Differentiation and Function. **Nature reviews. Immunology**, v. 16, n. 4, p. 220–233, abr. 2016.

LIANG, Y.; ZHANG, H.; SONG, X.; YANG, Q. Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets. **Seminars in Cancer Biology**, Enigmatic tumor properties associated with metastatic spread. v. 60, p. 14–27, 1 fev. 2020.

LOU, Y.; WANG, G.; LIZÉE, G.; KIM, G. J.; FINKELSTEIN, S. E.; FENG, C.; RESTIFO, N. P.; HWU, P. Dendritic Cells Strongly Boost the Antitumor Activity of Adoptively Transferred T Cells In vivo. **Cancer research**, v. 64, n. 18, p. 6783–6790, 15 set. 2004.

LU, X.; KANG, Y. Organotropism of Breast Cancer Metastasis. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 12, n. 2–3, p. 153–162, 1 set. 2007.

LUCKHEERAM, R. V.; ZHOU, R.; VERMA, A. D.; XIA, B. CD4+T Cells: Differentiation and Functions. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 925135, 2012.

MORI, H. et al. T-bet+ lymphocytes infiltration as an independent better prognostic indicator for triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 176, n. 3, p. 569–577, ago. 2019.

MAHLANGU, T.; DLUDLA, P. V.; NYAMBUYA, T. M.; MXINWA, V.; MAZIBUKO-MBEJE, S. E.; CIRILLI, I.; MARCHEGGIANI, F.; TIANO, L.; LOUW, J.; NKAMBULE, B. B. A Systematic Review on the Functional Role of Th1/Th2 Cytokines in Type 2 Diabetes and Related Metabolic Complications. **Cytokine**, v. 126, p. 154892, fev. 2020.

NIKOLICH-ŽUGICH, J.; DAVIES, J. S. Homeostatic Migration and Distribution of Innate Immune Cells in Primary and Secondary Lymphoid Organs with Ageing. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 187, n. 3, p. 337–344, mar. 2017.

OESTREICH, K. J.; WEINMANN, A. S. Master Regulators or Lineage-Specifying? Changing Views on CD4+ T Cell Transcription Factors. **Nature Reviews. Immunology**, v. 12, n. 11, p. 799–804, nov. 2012.

PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Dendritic-Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines. **Immunity**, v. 39, n. 1, p. 38–48, 25 jul. 2013.

PASCHALL, A. V.; LIU, K. An Orthotopic Mouse Model of Spontaneous Breast Cancer Metastasis. **Journal of Visualized Experiments : JoVE**, n. 114, p. 54040, 14 ago. 2016.

PEREZ, C. R.; DE PALMA, M. Engineering Dendritic Cell Vaccines to Improve Cancer Immunotherapy. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 5408, 27 nov. 2019.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. **Current Protocols in Immunology**, v. 39, n. 1, p. 20.2.1-20.2.16, 2000.

REEVES, E.; JAMES, E. Antigen Processing and Immune Regulation in the Response to Tumours. **Immunology**, v. 150, n. 1, p. 16–24, jan. 2017.

ROSENBERG, S. A.; SPIESS, P.; LAFRENIERE, R. A New Approach to the Adoptive Immunotherapy of Cancer with Tumor-Infiltrating Lymphocytes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 233, n. 4770, p. 1318–1321, 19 set. 1986.

SABERIAN, C. et al. Randomized phase II trial of lymphodepletion plus adoptive cell transfer of tumor-infiltrating lymphocytes, with or without dendritic cell vaccination, in patients with metastatic melanoma. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v. 9, n. 5, p. e002449, maio 2021.

SALEH, R.; ELKORD, E. FoxP3+ T Regulatory Cells in Cancer: Prognostic Biomarkers and Therapeutic Targets. **Cancer Letters**, v. 490, p. 174–185, 10 out. 2020.

SANTOS, M. de O.; LIMA, F. C. da S. de; MARTINS, L. F. L.; OLIVEIRA, J. F. P.; ALMEIDA, L. M. de; CANCELA, M. de C. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, p. e-213700, 6 fev. 2023a.

SANTOS, P. M.; BUTTERFIELD, L. H. Dendritic Cell-Based Cancer Vaccines. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 200, n. 2, p. 443–449, 15 jan. 2018.

SELEDTSOV, V. I.; GONCHAROV, A. G.; SELEDTSOVA, G. V. Clinically Feasible Approaches to Potentiating Cancer Cell-Based Immunotherapies. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 11, n. 4, p. 851–869, 2015.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7–30, 2017.

SOLINAS, C.; CARBOGNIN, L.; DE SILVA, P.; CRISCITIELLO, C.; LAMBERTINI, M. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer According to Tumor Subtype: Current State of the Art. **Breast (Edinburgh, Scotland)**, v. 35, p. 142–150, out. 2017.

STANTON, S. E.; DISIS, M. L. Clinical Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer. **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v. 4, n. 1, p. 59, dez. 2016.

SUHAIL, Y.; CAIN, M. P.; VANAJA, K.; KURYWCHAK, P. A.; LEVCHENKO, A.; KALLURI, R.; KSHITIZ, null. Systems Biology of Cancer Metastasis. **Cell Systems**, v. 9, n. 2, p. 109–127, 28 ago. 2019.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TAN, J.; LE, A. The Heterogeneity of Breast Cancer Metabolism. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1311, p. 89–101, 2021.

TIAN, H.; XING, J.; TANG, X.; CHI, H.; SHENG, X.; ZHAN, W. Identification and Characterization of a Master Transcription Factor of Th1 Cells, T-Bet, Within Flounder (Paralichthys Olivaceus). **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 704324, 2021.

TOOMER, K. H.; MALEK, T. R. Cytokine Signaling in the Development and Homeostasis of Regulatory T cells. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 3, p. a028597, mar. 2018.

TROMBETTA, E. S.; MELLMAN, I. Cell Biology of Antigen Processing in Vitro and in Vivo. **Annual Review of Immunology**, v. 23, p. 975–1028, 2005.

VIEIRA, J. F.; PEIXOTO, A. P.; MURTA, E. F. C.; MICHELIN, M. A. Prophylactic Dendritic Cell Vaccination in Experimental Breast Cancer Controls Immunity and Hepatic Metastases. **Anticancer Research**, v. 41, n. 7, p. 3419–3427, jul. 2021.

YING, X.; MA, N.; ZHANG, X.; GUO, H.; LIU, Y.; CHEN, B.; ZHAO, S.; WU, S.; LI, W.; WANG, L.; JIA, K.; WANG, H.; CHEN, P.; JIANG, M.; TANG, X.; QI, H.; DAI, C.; HE, Y. Research Progress on the Molecular Mechanisms of Hepatic Metastasis in Lung Cancer: A Narrative Review. **Annals of Palliative Medicine**, v. 10, n. 4, p. 4806–4822, abr. 2021.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations (\*). **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 445–489, 2010.

ZHU, X.; ZHU, J. CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 8011, 28 out. 2020.