

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

JULIA HAILER VIEIRA

NOVO PROTOCOLO DE MATURAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS: LINFÓCITOS
T E FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM METÁSTASES PULMONARES DE MODELO
EXPERIMENTAL DE CARCINOMA MAMÁRIO

UBERABA

2025

JULIA HAILER VIEIRA

NOVO PROTOCOLO DE MATURAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS: LINFÓCITOS
T E FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM METÁSTASES PULMONARES DE MODELO
EXPERIMENTAL DE CARCINOMA MAMÁRIO

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.
Orientação: Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin

UBERABA

2025

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

V715n Vieira, Julia Hailer
Novo protocolo de maturação de células dendríticas: linfócitos T e
fatores de transcrição em metástases pulmonares de modelo experimental de
carcinoma mamário / Julia Hailer Vieira. – 2025.
50 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal
do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2025
Orientador: Prof. Dr. Márcia Antoniazi Michelin

1. Neoplasias da mama. 2. Imunoterapia. 3. Células dendríticas. 4. Lin-
fócitos T. 5. Quimiocina CCL5. 6. Interleucina-12. I. Michelin, Márcia
Antoniazi. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 618.19-006

JULIA HAILER VIEIRA

NOVO PROTOCOLO DE MATURAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS: LINFÓCITOS
T E FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM METÁSTASES PULMONARES DE MODELO
EXPERIMENTAL DE CARCINOMA MAMÁRIO

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.

18 de Fevereiro de 2025

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Márcia Antoniazzi Michelin - Orientadora
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Profa. Dra. Helenice Gobbi
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Profa. Dr. José Maurício Sforcin
Universidade Estadual Paulista

Dedico este trabalho a todos que já se perguntaram,
ao menos uma vez,
“O que faz o meu olho brilhar?”
E a todos que me “acompanham”.

AGRADECIMENTOS

Chegar até aqui não seria possível sem o apoio e a inspiração de muitas pessoas especiais.

Primeiramente, agradeço ao meu pai, Julião, pessoa que me deu a vida, o nome e é a minha referência enquanto pessoa. O senhor é meu alicerce e meu porto seguro. Sem seu amor e apoio incondicional, nada disso seria possível.

Aos meus irmãos, Camila, Mateus e Gabriel, e familiares próximos, Tia Bel, Tio Walter, Madrinha e Padrinho, obrigada por estarem sempre ao meu lado, me mantendo sempre em suas orações, compreendendo minhas ausências e celebrando minhas conquistas. Todos os dias agradeço pela vida de vocês.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Dra. Márcia Antoniazi Michelin, a quem carinhosamente chamamos de Tia, pela oportunidade de realizar o presente trabalho. Suas palavras de incentivo e seu conhecimento foram essenciais. Embora o percurso tenha sido desafiador, acredito que cada experiência contribuiu para meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço à Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e à Tuânia pelo apoio e serviços prestados ao longo da minha formação.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, especialmente Eleni, Murilo, Lucas, Lenilson, Samara, Maria Eduarda, Joyce, Carlos e Saulo, e aos de fora do laboratório Maria, Lucas Ortolan e Bárbara, que tornaram essa jornada mais leve. À Maria Rita, funcionária terceirizada da limpeza. Seus puxões de orelha, cafés e marmitinhas me salvaram infinitas vezes. À minha psicóloga, Carol. Nossas sessões foram fundamentais para que eu pudesse manter o equilíbrio emocional e a motivação durante todo o processo. Seu apoio e compreensão foram essenciais para que eu superasse os momentos de dúvida e ansiedade, me permitindo seguir em frente com confiança.

Agradeço também à FAPEMIG, pelo suporte financeiro que tornou possível a concretização deste trabalho.

Finalmente, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste sonho. Cada palavra de incentivo, cada gesto de apoio, cada sorriso compartilhado fez a diferença. A todos, meu sincero e profundo obrigada.

“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que melhor se adapta às mudanças.”

Leon C. Megginson, sobre “A Origem das Espécies” de Charles Darwin

RESUMO

A metástase pulmonar é um fator primordial que contribui para a mortalidade em pacientes com câncer de mama, sendo responsável por mais de 90% das mortes relacionadas à doença. As células dendríticas (DCs) desempenham um papel central na ativação dos linfócitos T contra tumores, com sua plasticidade modulada pelos estímulos recebidos durante a maturação e pelo microambiente tumoral. Isso torna a imunoterapia baseada em DCs uma abordagem promissora no tratamento do câncer de mama e de suas complicações, como as metástases pulmonares. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de um protocolo alternativo de maturação de DCs para imunoterapia, que utiliza estímulos com IL-12 e RANTES, sobre o volume tumoral, a redução das metástases pulmonares, o infiltrado linfocitário e a prevalência dos perfis de ativação associados aos linfócitos auxiliares. Os efeitos biológicos do tratamento de camundongos BALB/c induzidos ao carcinoma mamário com 4T1 foram evidenciados sobretudo na redução das áreas metastáticas pulmonares, quantificadas pela técnica de hematoxilina e eosina. A análise das áreas metastáticas pulmonares mostrou uma redução significativa no grupo tratado com o protocolo alternativo (GP2), com uma média de 1203,33 μm^2 , em comparação ao grupo tumor (81052,5 μm^2), com valor de $p < 0,0001$ entre a comparação. Por citometria de fluxo, a análise da infiltração de linfócitos T no tumor revelou que o protocolo alternativo aumentou substancialmente a quantidade de linfócitos auxiliares, com uma média de 32,37 (MFI), em comparação aos grupos GT (21,50) e GP1 (21,78), com valores de $p < 0,0001$. A quantificação dos fatores de transcrição T-bet, GATA3, FOXP3 e ROR γ t no microambiente tumoral revelou que esse protocolo promove uma modulação mais profunda nas vias Th1 e Th17. A avaliação dos linfócitos T citotóxicos e auxiliares no pulmão indicou que ambos os tratamentos foram eficazes em reduzir a infiltração de células T associada à inflamação. No entanto, os animais tratados pelo protocolo alternativo apresentaram uma leve vantagem na redução dos fatores de transcrição relacionados à inflamação e regulação imune, como T-bet, GATA3, FOXP3 e ROR γ t. Assim, o estudo reforça a importância das DCs na indução de respostas imunes antitumorais e sugere que o protocolo alternativo pode ser uma estratégia eficaz para modular a resposta imune, contribuindo para a contenção da progressão metastática pulmonar no câncer de mama.

Palavras-chave: imunoterapia; células dendríticas; neoplasias da mama; RANTES; IL-12

ABSTRACT

Lung metastasis is a major contributor to mortality in breast cancer patients, accounting for more than 90% of disease-related deaths. Dendritic cells (DCs) play a central role in the activation of T lymphocytes against tumours, and their plasticity is modulated by stimuli received during maturation and by the tumour microenvironment. This makes DC-based immunotherapy a promising approach in the treatment of breast cancer and its complications, such as lung metastases. The aim of this study was to evaluate the effects of an alternative DC maturation protocol for immunotherapy using IL-12 and RANTES stimuli on tumour volume, reduction of lung metastases, lymphocyte infiltration and the prevalence of helper lymphocyte activation profiles. The biological effects of treatment with 4T1 in BALB/c mice with mammary carcinoma were demonstrated primarily by the reduction of lung metastases, quantified by the haematoxylin and eosin technique. Analysis of lung metastatic areas showed a significant reduction in the group treated with the alternative protocol (GP2) with an average of 1203.33 μm^2 compared to the tumour group (81052.5 μm^2), with a p-value <0.0001 between the comparisons. Flow cytometric analysis of T lymphocyte infiltration in the tumour showed that the alternative protocol significantly increased the amount of helper lymphocytes, with a mean of 32.37 (MFI) compared to the GT (21.50) and GP1 (21.78) groups, with p-values <0.0001. Quantification of the transcription factors T-bet, GATA3, FOXP3 and ROR γ t in the tumour microenvironment showed that this protocol promotes a more profound modulation of the Th1 and Th17 pathways. Evaluation of cytotoxic and helper T lymphocytes in the lung showed that both treatments were effective in reducing inflammation-associated T cell infiltration. However, the animals treated with the alternative protocol showed a slight advantage in the reduction of transcription factors related to inflammation and immune regulation, such as T-bet, GATA3, FOXP3 and ROR γ t. Thus, the study highlights the importance of DCs in the induction of anti-tumour immune responses and suggests that the alternative protocol may be an effective strategy for modulating the immune response, thereby contributing to limiting the progression of lung metastases in breast cancer.

Keywords: immunotherapy; dendritic cells; breast neoplasms; RANTES; IL-12

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Delineamento experimental simplificado	28
Figura 2 – Delineamento experimental completo.....	29
Figura 3 – Volume tumoral	32
Figura 4 – Cortes histológicos corados com HE	33
Figura 5 – Área de metástase pulmonar nos diferentes grupos experimentais.....	34
Figura 6 – Quantificação linfócitos auxiliares e citotóxicos tumorais	35
Figura 7 – Quantificação linfócitos auxiliares e citotóxicos pulmonares.....	36
Figura 8 – Expressão de fatores de transcrição no tumor.....	37
Figura 9 – Expressão de fatores de transcrição no pulmão	38
Figura 10 – Matriz de correlação GT	39
Figura 11 – Matriz de correlação GP1.....	40
Figura 12 – Matriz de correlação GP2.....	40
Quadro 1 – Distribuição dos animais por grupo.....	26
Quadro 2 – Protocolo de parafinização	29
Quadro 3 – Anticorpos Citometria	30
Quadro 3 – Anticorpos Citometria	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AOS TUMORES.....	15
1.2 IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS	16
1.3 PROTOCOLO DE MATURAÇÃO	19
1.4 MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA MAMÁRIO 4T1.....	20
1.5 METÁSTASES PULMONARES.....	21
2 JUSTIFICATIVA.....	23
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 METODOLOGIA	26
4.1 MODELO EXPERIMENTAL 4T1 E INDUÇÃO TUMORAL.....	27
4.2 CONFECÇÃO DAS IMUNOTERAPIAS.....	27
4.3 APLICAÇÃO DAS IMUNOTERAPIAS	28
4.4 AVALIAÇÃO DAS METÁSTASES PULMONARES.....	29
4.5 AVALIAÇÃO DOS LINFÓCITOS	30
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
5 RESULTADOS.....	32
6 DISCUSSÃO.....	41
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

O termo "câncer" refere-se a um conjunto de doenças malignas resultantes do crescimento anormal e desordenado de células. Essas células apresentam um ritmo de proliferação distinto e acelerado em comparação com os tecidos normais, devido a alterações genéticas e/ou epigenéticas que favorecem a rápida multiplicação, diferenciação e maior sobrevivência celular (Brown *et al.*, 2023).

Essas transformações podem levar à formação de tumores, que, além de crescerem localmente, possuem a capacidade de invadir tecidos adjacentes e disseminar-se para órgãos distantes, formando metástases. As células tumorais apresentam falhas nos mecanismos de regulação da proliferação celular e de resistência à apoptose, bem como aumento de seu potencial invasivo, características que influenciam as funções anatomofisiológicas dos órgãos afetados (Inca, 2024; Abbas; Lichtman; Pillai, 2019).

Conforme evidenciado pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer figura atualmente como uma das principais causas globais de mortalidade. Situação fomentada por aspectos como condições genéticas e hereditárias, aumento da expectativa de vida da população mundial, envelhecimento, crescimento populacional, exposição a fatores de risco e condições socioeconômicas desfavoráveis, além de hábitos como tabagismo, sedentarismo e obesidade. Entre os tipos de câncer mais prevalentes, destaca-se o câncer de mama em mulheres, com uma estimativa de 73.610 novos casos por ano no triênio 2023-2025. Este tipo de câncer possui uma alta propensão a metastatizar regionalmente para linfonodos e à distância para órgãos específicos, como ossos, fígados e pulmões, influenciado tanto pelo microambiente tumoral quanto pelas interações imunes (Xu; Tang, 2023; Inca, 2024).

Os tratamentos convencionais, que incluem radioterapia e/ou quimioterapia, podem causar efeitos adversos significativos na saúde e na qualidade de vida das pacientes, assim como danos específicos a órgãos. Essas terapias, embora algumas vezes sejam eficazes no tratamento do câncer de mama, podem levar a várias complicações, como danos cardiovasculares, efeitos hematológicos e toxicidade (Martins; Renni; Issa, 2021; Aristei; Lancellotta; Lupattelli, 2018; Iqbal *et al.*, 2018).

Dessa maneira, torna-se fundamental a busca por terapias que possam substituir ou complementar os tratamentos oferecidos às pacientes de forma a promover uma resposta antitumoral eficiente e que mitigue os efeitos adversos causados por essas intervenções.

1.1 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AOS TUMORES

O sistema imunológico, por meio da imunovigilância, atua no reconhecimento e eliminação de células mutadas antes da formação de tumores, além de elaborar respostas eficazes contra tumores já estabelecidos. Esse processo envolve uma complexa interação entre as respostas imunes inatas e adaptativas. Células imunes, como linfócitos T auxiliares (Th) e citotóxicos, células apresentadoras de antígenos e células assassinas naturais (NK), desempenham um papel essencial na detecção e destruição de células cancerígenas, por basear-se em antígenos alterados presentes nas células tumorais. Além de suas ações diretas, as citocinas liberadas por essas células são fundamentais para fortalecer a resposta antitumoral e garantir a integração eficiente entre as respostas inatas e adaptativas (Nnodim, 2021).

Contudo, em pacientes com neoplasias malignas, é comum observar-se um sistema imunológico adaptado ao tumor, que demonstra tolerância imunológica e exaustão das células envolvidas na eliminação tumoral, condições que favorecem o crescimento descontrolado das neoplasias. Os tumores podem explorar mecanismos imunológicos para evitar a detecção e promover seu próprio crescimento, como por exemplo, através da liberação de citocinas imunossupressoras e recrutamento de células supressoras, que criam um microambiente de proteção contra a destruição e que favorece a evasão imunológica (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019).

A eficácia do sistema imunológico também pode ser comprometida pelos tratamentos convencionais, como quimioterapia, que afetam as células cancerígenas mas também as células imunes. Esta situação destaca a relevância de estudos em imunologia do câncer com o objetivo de criar tratamentos mais direcionados e eficientes (Nnodim, 2021).

1.2 IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS

Células dendríticas (DCs) são leucócitos tradicionalmente categorizados como pertencentes ao sistema imunológico inato, que são chave para a eficiência do sistema imunológico adaptativo. São frequentemente descritas como “pontes” entre as respostas imunológicas, uma vez que suas atuações desencadeiam efeitos de ativação e defesa capazes de combater os mais variados patógenos. Essa versatilidade deve-se à capacidade de reconhecer, fagocitar, degradar, e apresentar a outras células, esses diferentes patógenos. Características que as tornam as principais e mais potentes células apresentadoras de antígenos (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019).

A imunoterapia com células dendríticas é uma abordagem promissora no tratamento do câncer que explora o papel único das DCs como células apresentadoras de antígenos para

iniciar respostas imunes robustas contra tumores. Essa estratégia envolve a coleta de células dendríticas do próprio paciente, que são cultivadas e estimuladas *in vitro* para, em seguida, serem reintroduzidas no organismo, com o objetivo de direcionar uma resposta imune eficaz contra o câncer (Song *et al.*, 2024).

O gradiente de citocinas estabelecido pelas DCs influencia a expressão de fatores de transcrição em diferentes subconjuntos de linfócitos T auxiliares, o que, por sua vez, modula a diferenciação e a função dos linfócitos ativados (Hilligan *et al.*, 2020; Yin; Chen; Eisenbarth, 2021). A capacidade das DCs de adaptar sua produção de citocinas conforme o contexto patogênico e celular, enfatiza seu papel no direcionamento das respostas imunes adaptativas. Essa especificidade é fundamental para uma imunidade e tolerância efetivas. Outros fatores, como a presença de células imunes adicionais e o microambiente geral, também desempenham papéis significativos na diferenciação das células T (Yin; Chen; Eisenbarth, 2021).

As citocinas IFN- γ (Interferon- γ) e IL-12 (Interleucina-12), secretadas pelas DCs ativadas, induzem a polarização dos linfócitos T auxiliares para o perfil Th1. Esse processo ocorre por meio da ativação do fator de transcrição T-bet, que regula a expressão gênica característica desse subtipo celular. Como resultado, os linfócitos Th1 passam a produzir elevadas concentrações de IFN- γ e TNF- α (sigla em inglês para Fator de Necrose Tumoral) (Ghimirey *et al.*, 2021; Noël *et al.*, 2021).

A presença de linfócitos Th1 se associa a melhores resultados clínicos, por aumentar as respostas imunológicas contra tumores (Ghimirey *et al.*, 2021; Noël *et al.*, 2021). As citocinas produzidas por esse perfil celular promovem apoptose e senescência em células cancerosas, aumentam a expressão de MHC (sigla em inglês para Complexo Principal de Histocompatibilidade) de classe I, e promovem a ativação de macrófagos e células T citotóxicas (Nocera *et al.*, 2016).

Para o perfil Th2, a diferenciação dos linfócitos Th ocorre em resposta à secreção das citocinas IL-2 e IL-4 pelas DCs. Esse processo é mediado pelo fator de transcrição GATA3, que controla a expressão de genes associados à resposta imune humoral. Linfócitos Th2 são caracterizados pela produção de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, que promovem respostas para o combate a infecções parasitárias, e para a reparação e remodelação tecidual, com estimulação de fibroblastos e angiogênese (Chen *et al.*, 2022; Le *et al.*, 2021).

As células Th2, entretanto, estão associadas a um microambiente tumoral imunossupressor, que fomenta o crescimento tumoral e inibe respostas imunes antitumoral eficazes (Chen *et al.*, 2022). Altos níveis de infiltração de células Th2 associam-se com

estágios avançados de câncer e características mais agressivas da doença (Le et al., 2021).

Além disso, as células Th2 podem induzir anergia em linfócitos T, o que dificulta ainda mais a eficácia dos tratamentos (Zhang et al., 2015). O equilíbrio entre as células Th1 e Th2 exerce grande impacto no prognóstico, visto que a baixa relação Th1/Th2 está frequentemente relacionada a piores desfechos em subtipos específicos de câncer de mama (Noël et al., 2021; Xiao et al., 2023).

Esses achados indicam que uma resposta imune dominada por Th1 pode atuar de maneira protetora contra o câncer, enquanto a polarização para o perfil Th2 pode facilitar a progressão tumoral (Xiao et al., 2023).

A indução do perfil Th17 ocorre pela ação combinada de IL-6, IL-23 e TGF- β no microambiente, que ativam o fator de transcrição ROR γ t, responsável por regular a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-17 e IL-22. Os linfócitos Th17 desempenham papel importante na defesa contra patógenos extracelulares e na promoção de inflamações teciduais, além de estarem associados a condições autoimunes (Karpisheh et al., 2022).

Embora as células Th17 frequentemente estejam associadas à promoção do crescimento do tumor e contribuam para a resistência à imunoterapia, sua atividade no microambiente tumoral pode variar. A depender do contexto, essas células podem exercer efeitos antitumorais, uma vez que uma inflamação inicial pode ser benéfica ao recrutamento de células imunes citotóxicas para o microambiente tumoral, mas uma inflamação crônica pode favorecer o escape imunológico, o que sugere um papel duplo na modulação do câncer (Karpisheh et al., 2022; Shibabaw; Teferi; Ayelign, 2023).

A diferenciação para o perfil T regulador (Treg) ocorre em um microambiente dominado por IL-10 e TGF- β (sigla em inglês para Fator de Crescimento Transformador- β), que ativam o fator de transcrição FOXP3, regulador de genes envolvidos na supressão imunológica. Essas células são caracterizadas pela produção de IL-10 e TGF- β , que contribuem para a manutenção da tolerância imunológica, o controle de respostas inflamatórias exacerbadas e a prevenção de danos aos tecidos (Zhang et al., 2024).

No contexto tumoral, Tregs criam um microambiente imunossupressor, que favorece o crescimento do tumor e a evasão do sistema imune por meio da supressão das respostas das células T efectoras (Zhang et al., 2024). Além disso, interagem com macrófagos associados ao tumor, promovem a remodelação da matriz extracelular e facilitam a disseminação das células malignas, de maneira a favorecer o processo metastático, o qual associa-se à redução da sobrevida em pacientes com câncer de mama (Adam; Longworth; Lawson, 2024; Zhang et al., 2024).

Embora Tregs estejam envolvidos na progressão tumoral, estratégias terapêuticas que visam esgotar ou inibir essas células devem equilibrar a necessidade de manter a tolerância imunológica, o que ressalta a complexidade do tratamento imunomodulador no câncer de mama (Adam; Longworth; Lawson, 2024).

A primeira vacina de DC aprovada pela Food and Drug Administration (FDA), Provenge, exemplifica a aplicação bem-sucedida dessa tecnologia em ambientes clínicos (Lee et al., 2023). As vacinas de DC demonstraram eficácia no tratamento de diversos tipos de câncer, como leucemia mieloide aguda, melanoma e carcinoma hepatocelular, destacando sua versatilidade (Jeng et al., 2022; Zhang, 2024). Além disso, novas gerações dessas imunoterapias estão sendo desenvolvidas, incluindo vacinas pulsadas por micro RNA e baseadas em biomateriais, com o objetivo de aumentar sua eficácia e superar as limitações das versões anteriores (Lee et al., 2023).

Apesar dos avanços, a otimização dessa terapia ainda é objeto de intensa pesquisa, já que fatores como o protocolo de maturação dessas células, a entrega de antígenos e as condições do microambiente tumoral podem influenciar diretamente o sucesso terapêutico (Cho et al., 2023; Kurilin; Alshevskaya; Sennikov, 2024). À medida que novas metodologias são desenvolvidas e testadas, espera-se que a imunoterapia com DCs possa se consolidar como uma alternativa eficaz para o tratamento de diversos tipos de câncer, inclusive aqueles refratários às terapias convencionais.

1.3 PROTOCOLO DE MATURAÇÃO

O presente trabalho visa validar um protocolo alternativo para a maturação das DCs para imunoterapia. O protocolo de maturação das DCs envolve tradicionalmente, citocinas específicas para a diferenciação celular e maturação. O Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF), juntamente com a Interleucina 4 (IL-4), formam uma clássica junção de moléculas empregada na maioria dos protocolos de diferenciação de DCs, desde, aproximadamente, 1994 (Sallusto; Lanzavecchia, 1994), as quais foram mantidas nos protocolos envolvidos neste projeto.

Ambos os protocolos fazem uso do Fatores de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e de antígenos de uma linhagem celular de câncer de mama derivada do tecido da glândula mamária de camundongos BALB/c (4T1). O TNF- α , como uma citocina potente indutora da maturação de DCs, promove a transformação das células dendríticas imaturas, que são excelentes em captar e processar antígenos, em células maduras, especializadas na

apresentação de antígenos. Os antígenos de 4T1 servem para induzir uma resposta imune específica ao carcinoma mamário (Vieira *et al.*, 2021a; Vieira *et al.*, 2021b).

Interleucina 12 (IL-12) e Ligantes 5 de Quimiocina CC (RANTES, sigla em inglês para “Regulado após a Ativação, Expressão e Secreção de Células T Normais) foram usadas como um protocolo alternativo de maturação de DCs *in vitro*, pelo Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON), pertencente à UFTM. Foram obtidos excelentes resultados (em processo de publicação) quanto a geração de um perfil de células dendríticas maduras e eficazes para ativação de subtipos balanceados de linfócitos T e células NK, importantes na resposta imune antitumoral.

A IL-12 é uma interleucina crucial na indução do perfil Th1 de linfócitos T auxiliares, perfil conhecido por ser altamente eficaz no combate a neoplasias, além de estimular a produção de IFN- γ por leucócitos, uma interleucina comumente relacionada à vulnerabilidade tumoral quando suprimida (Ikeda; Old; Schreiber, 2002) Quanto a RANTES, trata-se de uma quimiocina 5 do subgrupo CC, importante no processo de migração leucocitária (Abbas; Lichtman; Pillai, 2019). Tais fatores podem explicar parte do sucesso observado com a utilização dessas moléculas *in vitro*. Cabe agora validar esses resultados *in vivo*.

1.4 MODELO EXPERIMENTAL DE CARCINOMA MAMÁRIO 4T1

O modelo murino de câncer de mama 4T1 é amplamente utilizado por reproduzir as características agressivas do câncer de mama triplo-negativo humano, especialmente em estudos sobre metástases e intervenções terapêuticas. As células 4T1 apresentam um fenótipo híbrido epitelial-mesenquimal, co-expressando marcadores como E-caderina (epitelial) e N-caderina e vimentina (mesenquimais), o que propicia uma alta capacidade invasiva e metastática. Esse modelo mimetiza de forma eficaz a progressão tumoral e a disseminação metastática do câncer de mama humano em camundongos BALB/c, que são isogênicos, o que garante consistência nos estudos experimentais. Embora diferenças epigenéticas e outros fatores intrínsecos possam influenciar a resposta imune individual dos animais, o uso de camundongos BALB/c proporciona uma base sólida para a realização de experimentos controlados, com resultados mais consistentes e reprodutíveis (Herndon *et al.*, 2024).

Os tumores induzidos pelas células 4T1 disseminam-se espontaneamente para órgãos como pulmões, cérebro, fígado, ossos e linfonodos, o que torna esse modelo valioso para a investigação de metástases. Além disso, as interações imunológicas do modelo têm sido

fundamentais para a avaliação da eficácia de inibidores de pontos de controle imunológicos, como anti-PD1 e anti-CTLA4, por meio das alterações que podem ser observadas na infiltração e ativação de células imunes no microambiente tumoral (Nikolaou *et al.*, 2023). A semelhança clínica com o câncer de mama avançado em humanos justifica seu uso frequente em pesquisas pré-clínicas voltadas à compreensão da biologia tumoral e ao desenvolvimento de terapias inovadoras (Pulaski *et al.*, 2000; Vieira *et al.*, 2021a).

1.5 METÁSTASES PULMONARES

Metástase é o processo pelo qual células cancerígenas se disseminam a partir do tumor primário para outras partes do corpo, através do deslocamento pela corrente sanguínea ou linfática e restabelecimento em órgãos ou tecidos distantes, onde podem formar novos tumores (Rycaj *et al.*, 2017). É um dos principais fatores que torna o câncer mais agressivo e difícil de tratar, pois indica que o tumor se espalhou além do local de origem, o qual afeta a função de outros órgãos e complica o controle da doença. O processo de metástase envolve diversas etapas, que incluem a invasão local, entrada nos vasos sanguíneos ou linfáticos, sobrevivência na circulação, extravasamento para tecidos distantes e proliferação no novo local (Brum *et al.*, 2017).

O processo metastático não ocorre de forma aleatória, mas em locais específicos, influenciado por uma combinação de fatores microambientais, celulares e moleculares. Depende das propriedades intrínsecas do câncer, da arquitetura dos sistemas circulatórios, da ação de quimioatraentes e da capacidade das células cancerígenas de interagir com o microambiente dos diferentes tecidos e órgãos (Rycaj *et al.*, 2017).

No câncer de mama, a metástase pulmonar é frequente devido à complexa interação entre as células tumorais e o microambiente pulmonar, que pode, durante a progressão da doença, evoluir para um ambiente favorável à disseminação metastática (Wu; Liang; Zhang, 2022). As células metastáticas do câncer de mama tendem a adquirir um perfil mais agressivo devido à seleção de células resistentes à quimioterapia e radioterapia ou ao impacto do próprio microambiente tumoral (Park; Ashayeripناه; Chopin, 2023).

A metástase pulmonar é um fator primordial para a mortalidade em pacientes com câncer de mama, sendo responsável por mais de 90% das mortes relacionadas a essa doença (Patel; Susman; Allan, 2023). O desenvolvimento de metástases pulmonares é influenciado por mecanismos biológicos, como a sinalização sistêmica dos tumores primários, a formação de um nicho pré-metastático e o potencial de metástase a longo

prazo, mesmo após anos do tratamento inicial. Fatores como respostas inflamatórias, angiogênese e remodelação da matriz extracelular também são fundamentais no processo de colonização e crescimento tumoral no pulmão (Cohen et al., 2023).

Estudos sobre imunoterapia baseadas em DCs indicam que a aplicação dessas vacinas pode reduzir significativamente a incidência de metástases (Cunha; Michelin; Murta, 2016; Michelin; Murta; Silva, 2021; Silva; Cunha; Murta; Michelin, 2022, 2024; Silva *et al.*, 2020; Vieira *et al.*, 2021b).

Visto que o protocolo alternativo de maturação de DCs para imunoterapia demonstrou maior eficiência *in vitro*, especialmente na expressão de moléculas de adesão, coestimulatórias e citocinas antitumorais, espera-se que essa maior efetividade também se reflita na redução das metástases *in vivo*.

2 JUSTIFICATIVA

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo demonstram que o protocolo convencional de maturação de DCs para imunoterapia se mostrou eficiente na redução do volume tumoral e na polarização de células imunes para um perfil anti-tumoral (Lopes; Michelin; Murta, 2017; Matias *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2011; Vieira *et al.*, 2020). Além disso, a eficácia dessa abordagem foi corroborada pela redução significativa dos índices metastáticos em modelos murinos BALB/c. No entanto, esse protocolo não foi suficiente para a completa erradicação do tumor, mesmo com variações no número de aplicações da imunoterapia (Cunha; Michelin; Murta, 2016; Michelin; Murta; Silva, 2021; Silva; Cunha; Murta; Michelin, 2022, 2024; Silva *et al.*, 2020; Vieira *et al.*, 2021b).

Esses resultados destacam o potencial dessas terapias como ferramentas fundamentais no tratamento do câncer e abrem perspectivas para avanços que levem à eliminação tumoral completa e que apontam para um futuro em que as imunoterapias possam se consolidar como estratégias de primeira linha, não apenas por melhorar os índices de sobrevivência, mas também por elevar significativamente a qualidade de vida dos pacientes.

Estudos conduzidos pelo nosso grupo ampliaram esse horizonte ao implementar, *in vitro*, um protocolo de maturação de células dendríticas enriquecido com IL-12 e RANTES. Esse protocolo superou os resultados obtidos com o protocolo convencional ao demonstrar maior eficiência na diferenciação celular, aumento na migração das DCs, maior expressão de moléculas de superfície e coestimulatórias, além da produção aumentada de citocinas e interleucinas relevantes para a resposta antitumoral. Observou-se também aumento na quantidade de células T citotóxicas e T auxiliares, com predominância dos subtipos linfocitários adequados à resposta imune antitumoral. Adicionalmente, houve redução de células de perfil imunossupressor e polarização das células NK para um perfil pró-inflamatório (em processo de publicação). Propomos que essa abordagem inovadora, ao ser testada *in vivo*, possa promover não apenas redução mais eficaz do volume tumoral, mas também impacto significativo na contenção das metástases pulmonares, afim de construir novas direções para imunoterapias com DCS mais robustas e eficazes para a medicina de precisão e personalizada.

A possibilidade de alcançar tratamentos mais eficientes e com menos efeitos colaterais pode revolucionar a forma como o câncer é tratado, de forma a reduzir a dependência de terapias altamente invasivas e nocivas, como quimioterapia e radioterapia, e minimizar os custos sociais e econômicos associados ao cuidado oncológico. Além disso, a validação de

novos protocolos com maior eficácia pode favorecer sua incorporação em sistemas públicos de saúde e ampliar o acesso a terapias inovadoras, especialmente em países em desenvolvimento, onde o câncer ainda representa um desafio crescente para a saúde pública.

3 OBJETIVOS

Compreender os mecanismos imunológicos envolvidos na atuação das células dendríticas nos diferentes protocolos de maturação propostos é essencial para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes contra o câncer. Dessa maneira, este estudo propõe-se a investigar esses mecanismos por meio dos seguintes objetivos:

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a incidência de metástases pulmonares e o perfil dos linfócitos T entre camundongos induzidos ao carcinoma mamário tratados com dois diferentes protocolos de imunoterapia baseada em células dendríticas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) comparar a taxa de crescimento tumoral dos diferentes grupos experimentais;
- b) avaliar a incidência e o tamanho de metástases pulmonares entre os grupos experimentais;
- c) quantificar os linfócitos T auxiliares (CD4+) e T citotóxicos (CD8+) nos tumores primários e pulmões;
- d) analisar a expressão dos fatores de transição T-BET, GATA-3, FOXP3, ROR γ t nos tumores primários e pulmões.

4 METODOLOGIA

Seguindo as diretrizes do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o protocolo n° 23085.005932/2022-75, foram utilizados 58 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com idade entre 6 e 8 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

Os animais passaram por um período de habituação de 10 a 14 dias no Laboratório Multiusuário de Modelos Biológicos (LAMMOBI) da UFTM, no qual ficaram acomodados em grupos de 3 a 5 animais, em gaiolas plásticas com dimensões de 305x198x133mm, com livre acesso a água e alimento. As condições ambientais foram controladas, com temperatura de 22°C +/-2°C e ciclo claro-escuro de 12 horas.

Dos 58 camundongos, 46 foram dispostos em quatro grupos experimentais, conforme a Quadro 1 e descrito a seguir:

- a) Grupo Controle (GC): composto por 10 camundongos que não sofreram intervenção;
- b) Grupo Tumor (GT): 12 animais tumor induzidos, mas não tratados;
- c) Grupo Protocolo Convencional (GP1): 12 animais tumor induzidos e tratados com DCs provenientes do protocolo convencional de maturação para imunoterapia;
- d) Grupo Protocolo Alternativo (GP2): 12 camundongos tumor induzidos e tratados com DCs provenientes do protocolo alternativo de maturação para imunoterapia.

Quadro 1 – Distribuição dos animais por grupo

Grupos	Indução tumoral 4T1	Tratamento	Número de animais
Controle	Não	Não	10
Tumor	Sim	Não	12
Protocolo Convencional	Sim	Sim	12
Protocolo Alternativo	Sim	Sim	12

Fonte: da própria autora, 2024.

Os 12 animais restantes (GV) foram alocados no grupo destinado à confecção das imunoterapias e foram doadores de medula óssea para a obtenção de células precursoras. Desse grupo, 6 camundongos foram utilizados para a preparação da primeira dose das

imunoterapias, enquanto os outros 6 foram destinados à segunda dose. Cada camundongo proporcionou a obtenção de material suficiente para 4 aplicações.

4.1 MODELO EXPERIMENTAL 4T1 E INDUÇÃO TUMORAL

As células da linhagem 4T1, adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro (código:0022), foram cultivadas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) completo e mantidas em estufa de CO₂ a 5% de umidade a 37°C. No denominado “Dia 0”, realizou-se a indução tumoral nos grupos GT, GP1 e GP2. As células foram lavadas duas vezes com solução salina 0,9%, centrifugadas a 290xg a 4°C por 10 minutos em cada lavagem, para garantir a completa remoção do meio de cultura. Em seguida, foram ressuspensas em solução salina estéril 0,9% e inoculadas em dose única de 50µl, contendo $2,0 \times 10^5$ células, por via subcutânea na glândula mamária abdominal esquerda, com uma seringa de 1ml com agulha de 13x4,5mm.

A avaliação macroscópica, in vivo, dos tumores foi realizada a cada dois ou três dias com auxílio de um paquímetro, registrando-se o maior e menor diâmetro para o cálculo do volume tumoral, de acordo com a fórmula: $[\text{Maior diâmetro} \times (\text{menor diâmetro}^2)/2]$.

4.2 CONFECÇÃO DAS IMUNOTERAPIAS

Independentemente do protocolo de maturação utilizado, as células precursoras pluripotentes foram obtidas a partir da coleta de células da medula óssea dos fêmures e tíbias dos animais do grupo destinado à confecção das imunoterapias.

Nos períodos estabelecidos, conforme detalhado na Figura 1 e Figura 2, após a eutanásia dos camundongos do GV, as pernas traseiras foram removidas assepticamente, e fêmures e tíbias foram isolados. As extremidades proximais e distais desses ossos foram seccionadas com uma lâmina estéril para expor as cavidades medulares. Em seguida, uma seringa estéril de 1mL preenchida com solução salina tamponada estéril foi utilizada para realizar a lavagem do canal medular. A pressão gerada pela injeção do tampão promoveu a extração do conteúdo medular, que foi coletado em tubos cônicos estéreis. As células extraídas foram homogeneizadas, cultivadas em frascos de cultura de 25cm² e separadas conforme o protocolo de maturação. As culturas foram mantidas em meio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) suplementado com 0,1mM de vitaminas, 2mM de l-glutamina, 100µg/mL de gentamicina, 1mM de Piruvato de Sódio (C₃H₃NaO₃) e 5% Soro Bovino Fetal e incubadas em estufa de CO₂ a 5% de umidade e a 37°C.

Após 24 horas, as células foram estimuladas com 10ng/ μ L de GM-CSF e 10ng/ μ L de IL-4, para promover a diferenciação, em ambos os protocolos. No quinto dia após o primeiro estímulo, as células foram novamente estimuladas, dessa vez, a fim de promover a maturação.

Às células do protocolo convencional foram adicionados 10 ng/ μ L de TNF- α e antígeno tumoral 4T1, enquanto às células do protocolo alternativo além de 10 ng/ μ L de TNF- α e 4T1, foram adicionados 10 ng/ μ L de IL-12 e RANTES.

4.3 APLICAÇÃO DAS IMUNOTERAPIAS

As doses foram administradas nos dias 7 e 14 após indução tumoral (Figura 1 e Figura 2), por via subcutânea na região dorsal, utilizando 50 μ L de células suspensas em solução salina 0,9% estéril. A dosagem foi calculada com base na seguinte fórmula:

$$\text{n}^\circ \text{ de células contadas} \times 50 \times 10^3 = 1 \text{ mL} \quad (1)$$

$$5 \times 10^6 = X \quad (2)$$

Esta fórmula é derivada do fator de correção da câmara de Neubauer (50×10^3) e do protocolo padrão de administração de 5×10^6 células dendríticas do Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON).

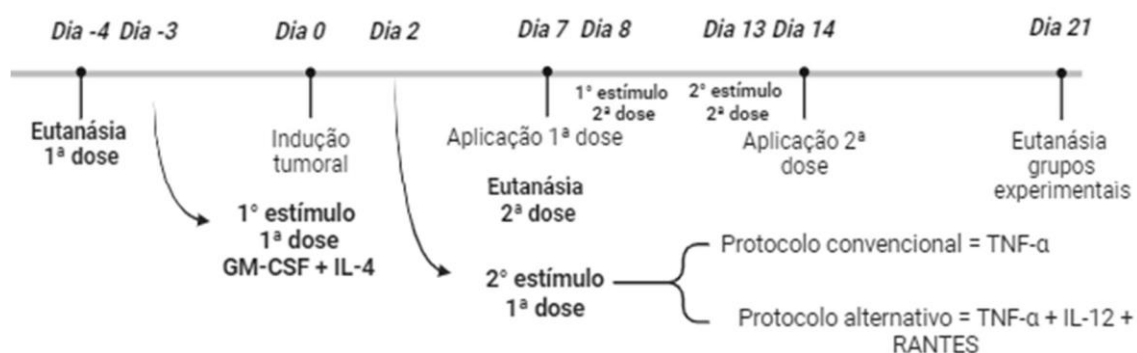
Nos casos em que o volume resultante ultrapassou 100 μ L, as amostras foram reajustadas para atingir a concentração celular ideal. Para isso, as células foram centrifugadas novamente a 4°C, 2100 rpm, por 10 minutos e parte do sobrenadante foi removido, para nova contagem celular e ajuste do volume final.

Figura 1 – Delineamento experimental simplificado



Fonte: da própria autora, 2024.

Figura 2 – Delineamento experimental completo



Fonte: da própria autora, 2024.

4.4 AVALIAÇÃO DAS METÁSTASES PULMONARES

Para avaliar a presença e extensão das metástases pulmonares, foram confeccionadas lâminas histológicas dos pulmões de todos os grupos experimentais. Após a eutanásia, os órgãos foram excisados e fixados em formalina a 10% por 24 horas, para posterior desidratação em concentrações crescentes de álcool, clarificação em xilol e inclusão em parafina, conforme descrito na Quadro 2. Cortes de 3-5 μ m de espessura foram realizados em micrótomo rotativo automatizado (Leica RM2255). As lâminas histológicas foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e a quantificação das metástases foi feita por meio da avaliação de 10 campos aleatórios, em microscópio óptico de alta resolução Nikon Eclipse. As imagens foram analisadas com o software NIS-Elements.

Quadro 2 – Protocolo utilizado para a parafinização das amostras

Fixação	
Formalina a 10%	24 horas
Desidratação	
Álcool 70%	1 hora*
Álcool 80%	1 hora*
Álcool 90%	1 hora*
Álcool Absoluto I	1 hora*
Álcool Absoluto II	1 hora*
Clarificação	
Xilol I	30 minutos*

Xilol II	30 minutos*
Impregnação	
Parafina I	30 minutos*
Parafina II	15 minutos*
Inclusão em parafina	

Fonte: da própria autora, 2024.
Nota: a) Protocolo padronizado pelo Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) – UFTM.
b) *Tempos variáveis de acordo com as características apresentadas por cada peça.

4.5 AVALIAÇÃO DOS LINFÓCITOS

A técnica de citometria de fluxo foi empregada para avaliar e quantificar os linfócitos T citotóxicos (CD8+) e auxiliares (CD4+), assim como seus fatores de transcrição T-bet, GATA-3, Foxp3, RORγt nos tumores primários e pulmões. As porções utilizadas dos pulmões compreendiam regiões normais e acometidas por tumores secundários. Após a eutanásia, os órgãos e tumores foram submetidos à dissociação mecânica separadamente, seguida pela adição de solução de lise para a ruptura de hemácias. As amostras foram incubadas, lavadas com PBS 1x (Phosphate- Buffered Saline) e tratadas com solução de Golgi Stop, sendo novamente, incubadas e lavadas. A marcação extracelular foi realizada com anticorpos anti-CD4 (marcador de linfócito T auxiliar) e anti-CD8 (marcador de linfócitos T citotóxicos), seguida de permeabilização e marcação intracelular com anticorpos anti-T-bet, anti-GATA-3, anti-Foxp3 e anti-RORγt (fatores de transcrição linfocitários). Após uma nova lavagem, as amostras foram analisadas no citômetro BD FACSCalibur™. Todos os anticorpos utilizados foram listados a seguir (Quadro 3).

Quadro 3 – Caracterização dos anticorpos utilizados para a citometria de fluxo (continua)

Anticorpo	Marcação	Tecido	Fornecedor	Nº catálogo
APC anti-mouse anti-CD4	Linfócito T auxiliar	Pulmão e Tumor	BD	553051
APC anti-mouse anti-CD8	Linfócito T citotóxico	Pulmão e Tumor	BD	553035
ALEXA 488 anti-mouse anti-T-bet	Fator de transcrição T-bet	Pulmão e Tumor	BD	561266

Quadro 3 – Caracterização dos anticorpos utilizados para a citometria de fluxo

(conclusão)

Anticorpo	Marcação	Tecido	Fornecedor	Nº catálogo
PE anti-mouse anti-GATA3	Fator de transcrição GATA3	Pulmão e Tumor	BD	560074
ALEXA 488 anti-mouse anti-FOXP3	Fator de transcrição FOXP3	Pulmão e Tumor	BD	560407
PE anti-mouse anti-ROR γ t	Fator de transcrição ROR γ t	Pulmão e Tumor	BD	562607
APC Rat IgG2a κ	Isotipo controle	Pulmão e Tumor	BD	554690
Alexa Fluor® 488 Rat IgG2b, κ	Isotipo controle	Pulmão e Tumor	BD	557726
PE Mouse Anti-Rat IgG2a	Isotipo controle	Pulmão e Tumor	BD	558067

Fonte: da própria autora, 2024

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando os testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov e Shapiro Wilk. Para distribuições normais, aplicou-se o teste paramétrico ANOVA para as comparações entre os grupos. Quando as distribuições não seguiram a normalidade, foram utilizados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis. A análise estatística foi conduzida com o software GraphPad Prism 9.0, e a significância foi estabelecida em $P < 0,05$, garantindo a confiabilidade e relevância dos resultados.

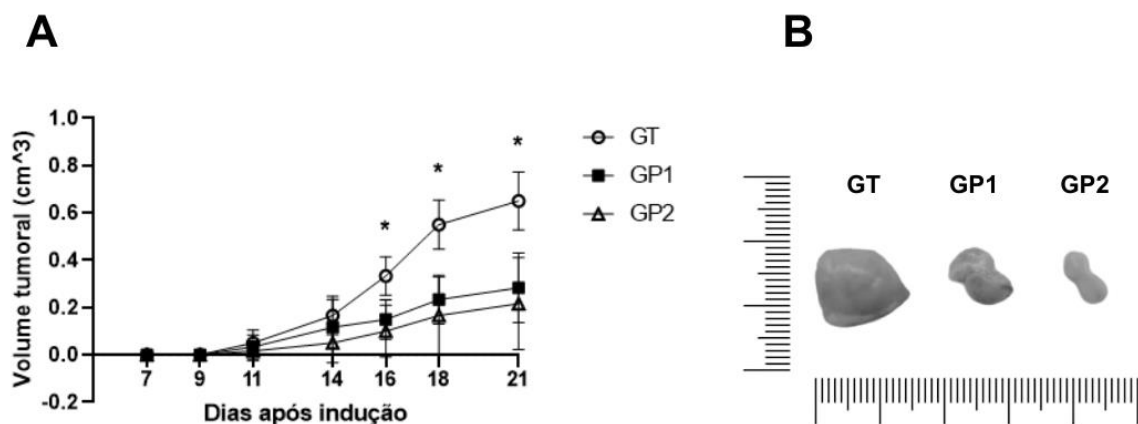
5 RESULTADOS

Os resultados deste estudo trazem aspectos relevantes sobre a modulação da resposta imune pelas células dendríticas em modelos experimentais de câncer. A seguir, são apresentados os principais achados:

a) Comparar a taxa de crescimento tumoral dos diferentes grupos experimentais

A análise macroscópica do volume do tumor primário demonstrou diferenças estatisticamente significativas ao comparar os grupos tratados com o grupo não tratado. No dia 16, os valores de p foram de 0,0083 para GP1 e de 0,0057 para GP2, quando comparados ao GT. No dia 18, os valores observados foram 0,0010 para GP1 e 0,0028 para GP2. Já no dia 21, os valores de p foram de 0,0024 para GP1 e 0,0038 para GP2. No entanto, ao avaliar os grupos submetidos aos diferentes tratamentos entre si, não foi possível identificar diferenças estatisticamente relevantes. Apesar do acompanhamento dos volumes tumorais ao longo do tempo ter mostrado variações nos tamanhos dos tumores, essas diferenças não se traduziram em significância estatística quando os tratamentos foram comparados diretamente.

Figura 3 – Análise da variação do volume tumoral ao longo do tempo nos diferentes grupos experimentais



Fonte: da própria autora, 2024.

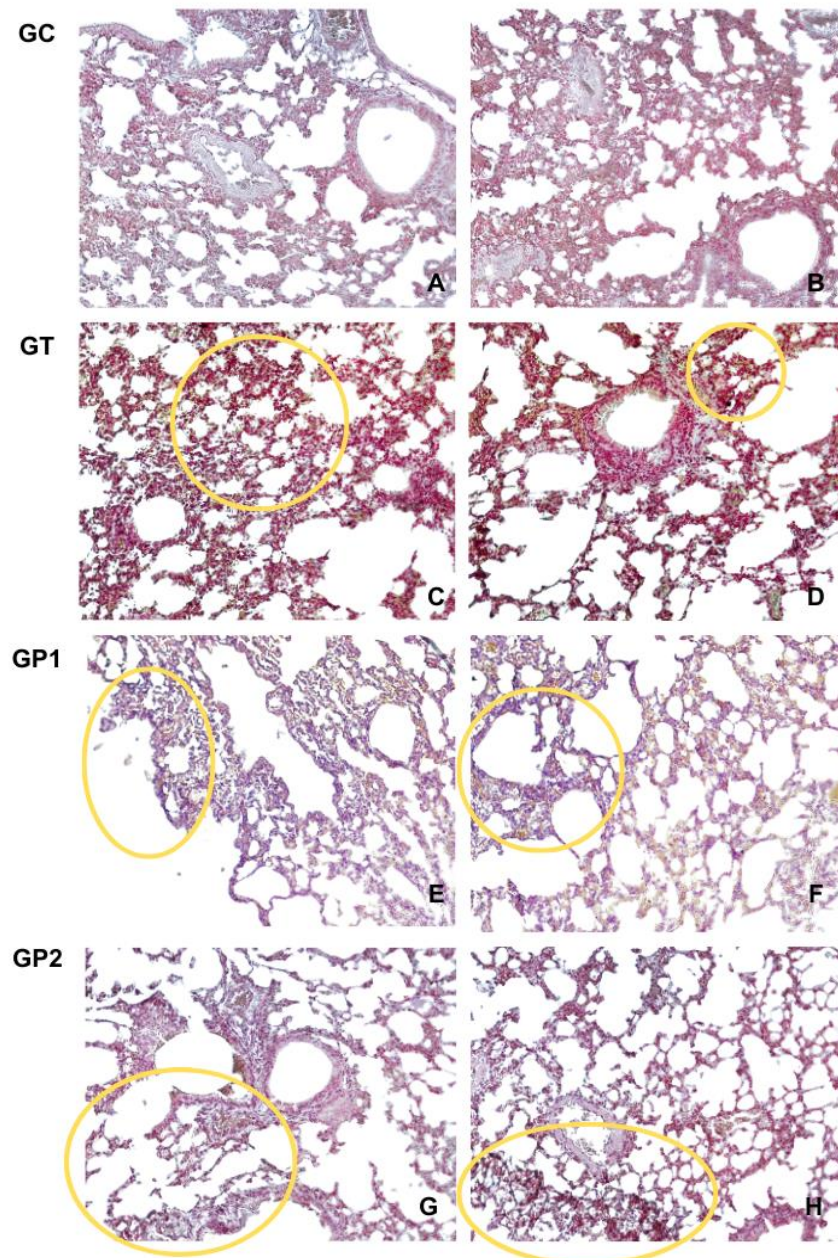
Nota: Representação do volume tumoral médio dos grupos experimentais de tumor de mama induzido por células 4T1 tratados ou não com diferentes protocolos de imunoterapia com células dendríticas, mensurados através da fórmula $[\text{Maior diâmetro} \times (\text{menor diâmetro}^2)/2]$. (A) Comparação entre os volumes tumorais (cm³) ao longo do tempo. Dados foram considerados paramétricos com base nos testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov e Shapiro Wilk. Para as comparações entre os grupos, foi aplicado o teste ANOVA de medidas repetidas e pós-teste Tukey's de comparações múltiplas. Os valores representam as médias dos volumes medidos nos dias 7, 9, 11, 14, 16, 18 e 21 após a indução tumoral para os grupos

GT, GP1 e GP2. (B) Imagem dos tumores removidos pós eutanásia.

b) Avaliar a incidência e o tamanho de metástases pulmonares entre os grupos experimentais por cortes histológicos corados com HE

A quantificação das áreas metastáticas pulmonares, avaliadas pela coloração de hematoxilina e eosina, revelou diferenças significativas entre os grupos. As áreas sugestivas de metástase pulmonar estão destacadas nas fotomicrografias apresentadas abaixo (Figura 4).

Figura 4 – Avaliação histopatológica das áreas metastáticas pulmonares por coloração com hematoxilina e eosina (HE)



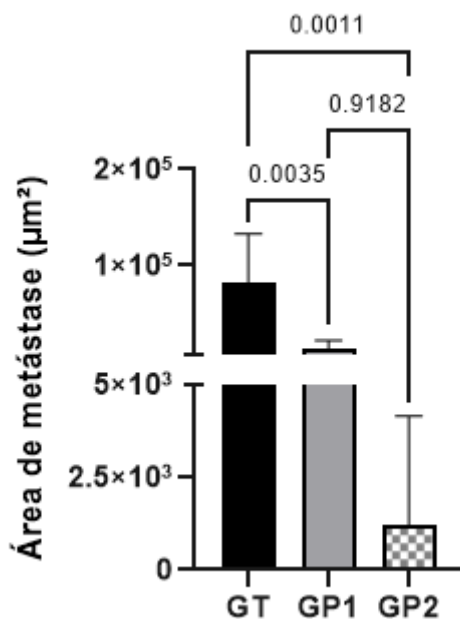
Fonte: da própria autora, 2024.

Nota: Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmões de camundongos pertencentes aos grupos GC (A e B), GT (C e D), GP1 (E e F) e GP2 (G e H), corados por hematoxilina e eosina, com aumento de 10x. As áreas marcadas em amarelo destacam regiões suspeitas de metástase pulmonar, caracterizadas pela desorganização da arquitetura alveolar, infiltração celular densa e presença de massas celulares compatíveis com lesões metastáticas. Comparações entre os grupos mostram diferenças na extensão e no padrão das lesões, evidenciando os efeitos dos tratamentos aplicados.

O GT apresentou área metastática média de $81.052,5 \mu\text{m}^2$, significativamente superior às áreas observadas nos grupos tratados. O GP1 apresentou uma redução marcante para $11.425,7 \mu\text{m}^2$, com diferença estatisticamente significativa em relação ao GT ($p = 0,0035$). No GP2, a redução foi ainda mais acentuada, com área metastática de $1.203,33 \mu\text{m}^2$, também significativamente menor que o GT ($p = 0,0011$) (Figura 5).

Entretanto, ao comparar os grupos tratados entre si (GP1 vs GP2), não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,9182$) (Figura 5).

Figura 5 – Quantificação da área de metástase pulmonar nos diferentes grupos experimentais



Fonte: da própria autora, 2024.

Nota: Área metastática pulmonar (em μm^2) nos diferentes grupos experimentais, quantificada por análise histológica da coloração por Hematoxilina e Eosina. GP1 e GP2 mostraram uma redução significativa nas áreas metastáticas em comparação ao GT, com diferenças estatisticamente significativas GT-GP1 ($p = 0,0035$), GT- GP2 ($p = 0,0011$), enquanto GP1 e GP2 não diferiram significativamente entre si ($p = 0,9182$).

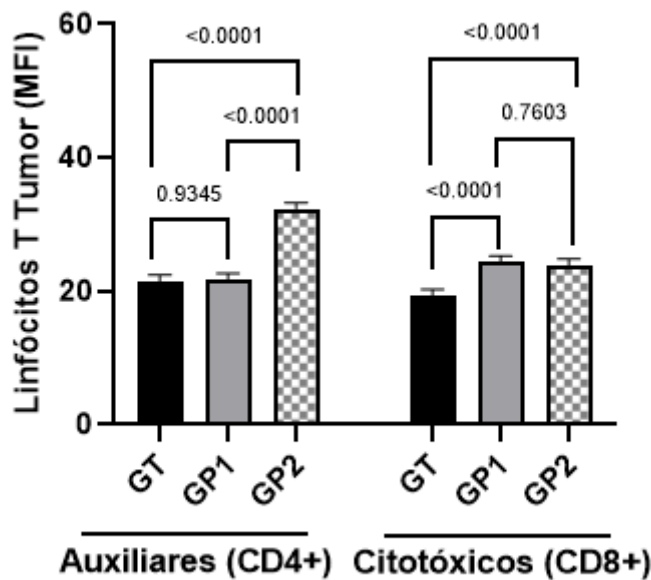
c) Quantificar os linfócitos T auxiliares (CD4+) e T citotóxicos (CD8+) nos tumores e pulmões pela técnica de citometria de fluxo

A análise dos linfócitos auxiliares no tumor mostrou que não houve diferença

significativa entre o grupo tumor e o grupo tratado GP1 ($p = 0,9345$). No entanto, o grupo tratado GP2 apresentou aumento significativo na quantidade de linfócitos auxiliares em comparação tanto ao grupo tumor quanto ao GP1, com diferenças altamente significativas ($p < 0,0001$) (Figura 6).

Para os linfócitos citotóxicos, observou-se aumento significativo no grupo tratado GP1 em relação ao GT, e o mesmo ocorreu no grupo GP2, quando comparado ao GT ($p < 0,0001$). No entanto, ao comparar os grupos tratados, não houve diferença significativa entre eles ($p = 0,7603$) (Figura 6).

Figura 6 – Quantificação linfócitos auxiliares e citotóxicos tumorais



Fonte: da própria autora, 2024.

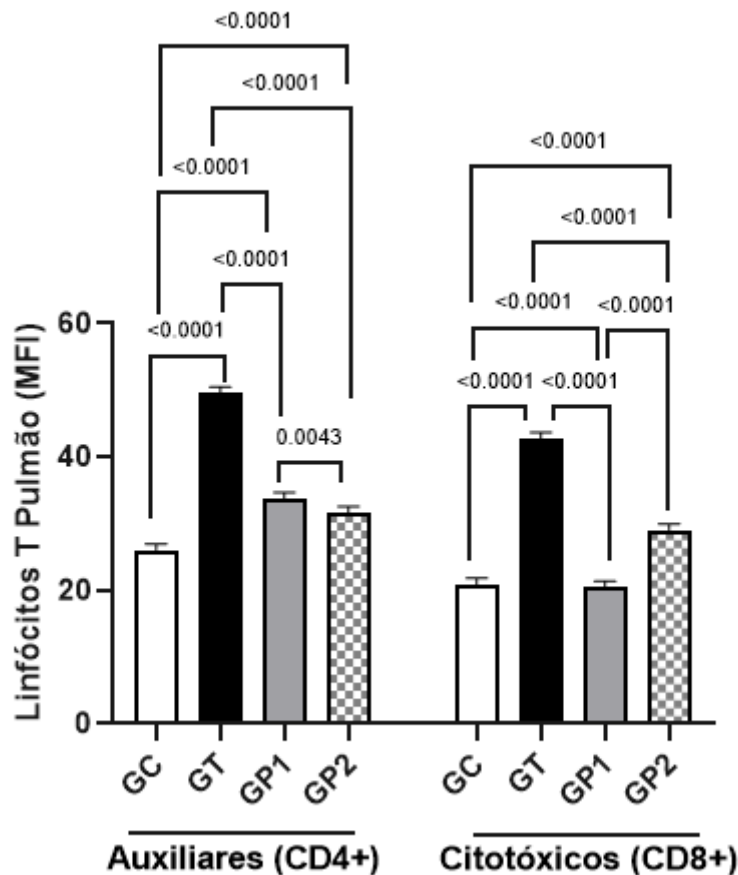
Nota: Quantificação da mediana de fluorescência (MFI) de linfócitos T auxiliares (LT. auxiliar CD4+) e linfócitos T citotóxicos (LT. citotóxico CD8+) infiltrados no tumor dos grupos experimentais (GT, GP1 e GP2). Para todas as marcações foram aplicados os testes de normalidade seguido do pós teste ANOVA. O grupo GP2 apresentou um aumento significativo de CD4+ em relação aos outros grupos ($p < 0,0001$), enquanto GP1 e GT não diferiram entre si. Para CD8+, tanto GP1 quanto GP2 exibiram níveis significativamente maiores que o GT ($p < 0,0001$), sem diferenças significativas entre GP1 e GP2 ($p = 0,7603$).

A análise da presença de linfócitos T auxiliares e citotóxicos no pulmão revelou variações importantes entre os diferentes grupos experimentais.

Observou-se aumento significativo na quantidade de linfócitos auxiliares no GT em relação ao GC. Nos grupos tratados com imunoterapia, houve diminuição significativa em relação ao grupo tumor, embora ambos ainda apresentassem níveis superiores ao grupo controle. Ao comparar os grupos tratados entre si, foi detectada pequena diminuição, com diferença estatisticamente significativa entre GP1 e GP2 (Figura 7).

Em relação aos linfócitos citotóxicos, também foi observado aumento acentuado no GT quando comparado ao GC. No grupo tratado GP1, os níveis de T citotóxicos retornaram a valores semelhantes aos do grupo controle, enquanto no grupo GP2 ocorreu aumento moderado em relação ao GP1, embora menor do que no grupo tumor (Figura 7).

Figura 7 – Quantificação linfócitos auxiliares e citotóxicos pulmonares



Fonte: da própria autora, 2024.

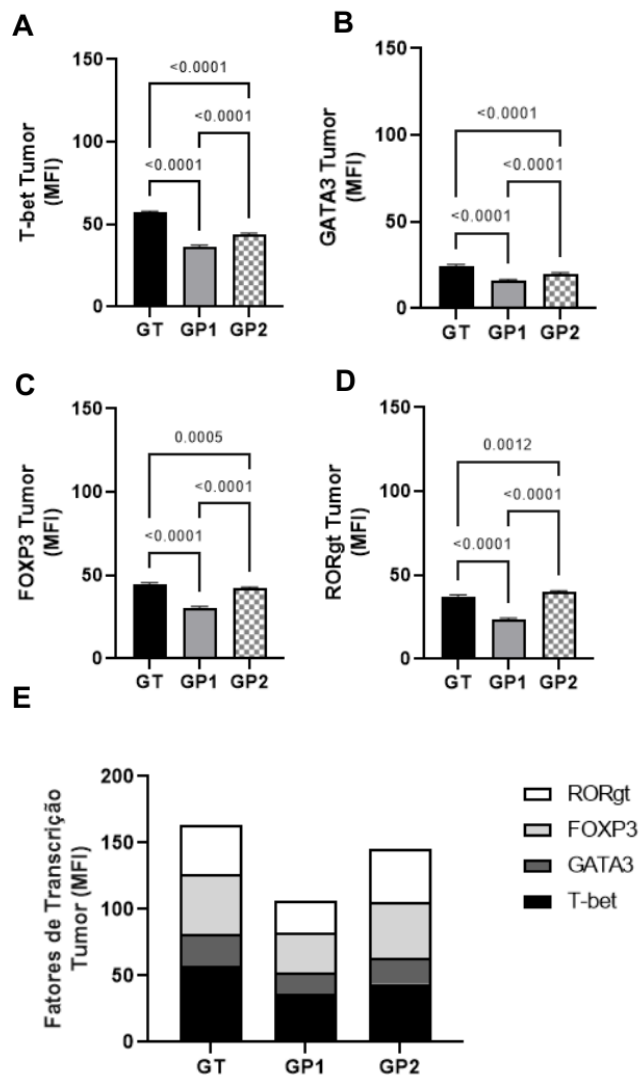
Nota: Quantificação de MFI de linfócitos T auxiliares (LT. auxiliar CD4+) e linfócitos T citotóxicos (LT. citotóxico CD8+) no tecido pulmonar entre os grupos GC, GT, GP1 e GP2. Para todas as marcações foram aplicados os testes de normalidade seguido do pós teste ANOVA. Observou-se aumento significativo de CD4+ e CD8+ no GT em comparação ao GC ($p < 0,001$). Nos grupos tratados, houve uma redução dos níveis em relação ao GT, com GP2 apresentando leve diminuição de CD4+ em relação ao GP1 ($p = 0,0043$).

d) Analisar a expressão dos fatores de transição T-BET, GATA-3, FOXP3, ROR γ t nos tumores e pulmões pela técnica de citometria de fluxo

A análise dos fatores de transcrição no microambiente tumoral revelou que o GT apresentou níveis consistentemente mais elevados de T-bet, GATA3, FOXP3 e ROR γ t em comparação com os grupos tratados (GP1 e GP2). Especificamente, a expressão de T-bet foi ligeiramente maior no GP2 em relação ao GP1, embora ambos tenham apresentado valores

significativamente menores em comparação ao GT. No entanto, essa diferença entre GP1 e GP2 não é expressiva. Em relação à GATA3, ambos os grupos tratados exibiram níveis similares, sem diferenças substanciais. O GP2 demonstrou leve tendência a maior expressão de FOXP3 em relação ao GP1, mas ambos os tratamentos reduziram drasticamente essa expressão quando comparados ao GT. Para ROR γ t, o GP2 mostrou expressão ligeiramente superior ao GP1, porém, novamente, ambos apresentaram níveis consideravelmente reduzidos em relação ao GT (Figura 8).

Figura 8 – Avaliação da expressão de fatores de transcrição associados à resposta imune no tumor

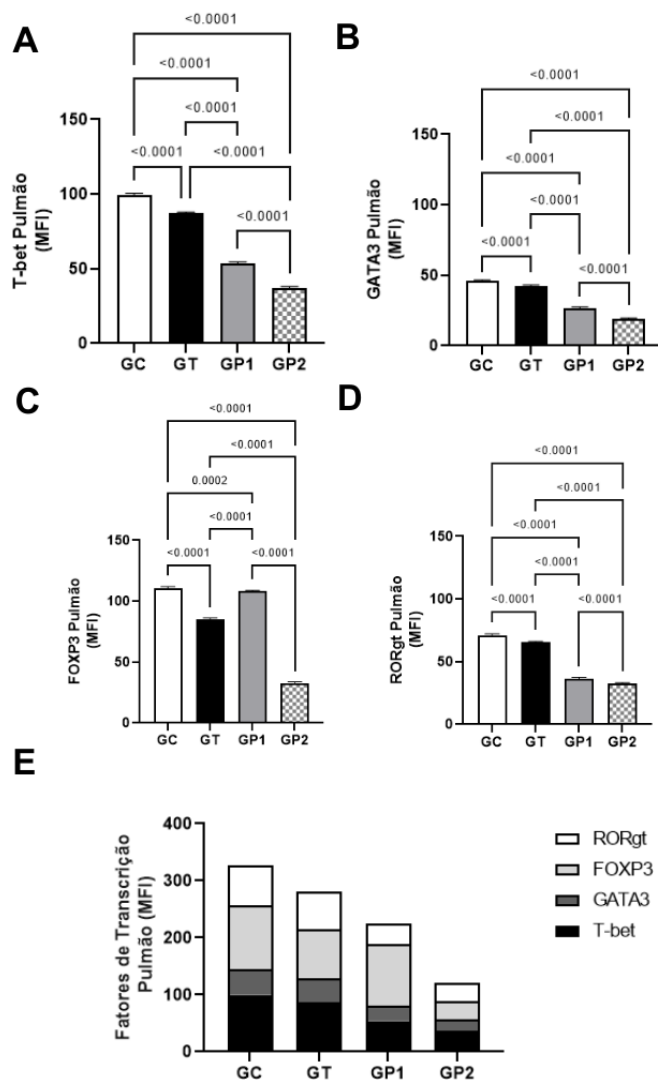


Fonte: da própria autora, 2024.

Nota: Expressão relativa de fatores de transcrição (A: T-bet, B: GATA3, C: FOXP3, D: ROR γ t, E: sumarização e proporções dos fatores de transcrição) no tecido tumoral dos diferentes grupos experimentais (GT, GP1 e GP2). Para todas as marcações foram aplicados os testes de normalidade seguido do pós teste ANOVA. O grupo GT exibiu níveis mais elevados de todos os fatores em comparação aos grupos tratados. GP1 e GP2 apresentaram reduções significativas na expressão dos fatores, com o GP2 mostrando uma ligeira redução em FOXP3 e ROR γ t em comparação ao GP1.

Nos pulmões, os resultados seguem tendência similar à observada no tumor. O GT apresentou os níveis mais altos de todos os fatores de transcrição (T-bet, GATA3, FOXP3, ROR γ t), enquanto os grupos tratados exibiram uma redução significativa na expressão desses fatores. Na comparação direta entre os protocolos, o GP2 mostrou expressão de T-bet ligeiramente inferior ao GP1. Da mesma forma, GP2 exibiu a menor expressão de GATA3, FOXP3 e ROR γ t (Figura 9).

Figura 9 – Avaliação da expressão de fatores de transcrição associados à resposta imune no pulmão

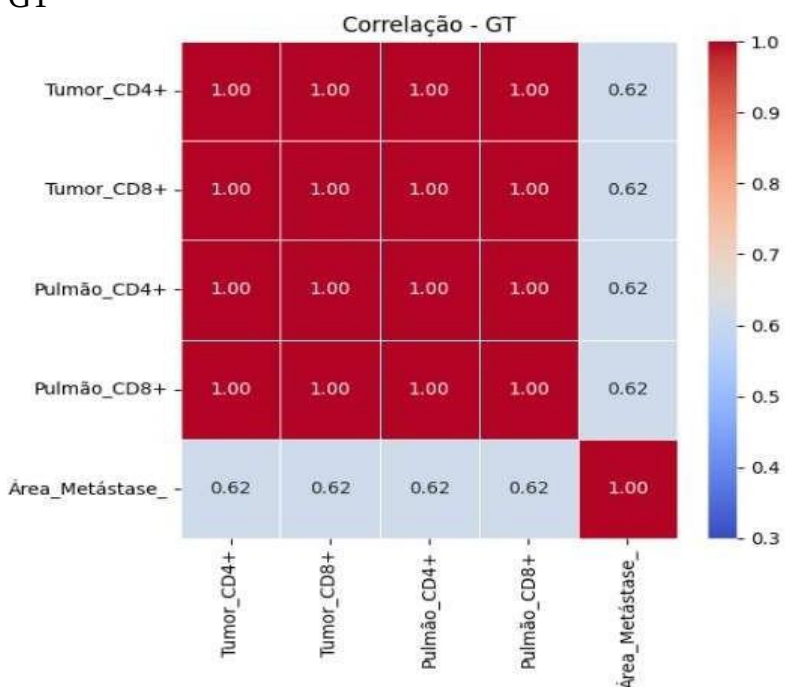


Fonte: da própria autora, 2024.

Nota: Expressão relativa de fatores de transcrição (A: T-bet, B: GATA3, C: FOXP3, D: ROR γ t, E: sumarização e proporções dos fatores de transcrição) no tecido pulmonar entre os grupos experimentais. Para todas as marcações foram aplicados os testes de normalidade seguido do pós teste ANOVA. GT apresentou os maiores níveis de todos os fatores analisados. GP1 e GP2 reduziram a expressão dos fatores, sendo o GP2 o grupo com a menor expressão, especialmente para T-bet e FOXP3, sugerindo uma maior modulação do microambiente pulmonar no protocolo alternativo.

No que se refere à correlação entre as células T auxiliares e citotóxicas e as áreas metastáticas, os dados indicam que, no GT, as correlações entre essas populações celulares nos tumores e pulmões foram máximas. No tratamento com o protocolo convencional, a correlação entre a infiltração de linfócitos T e a área metastática foi reduzida. No GP2, essa correlação foi ainda mais reduzida (Figura 10, 11 e 12).

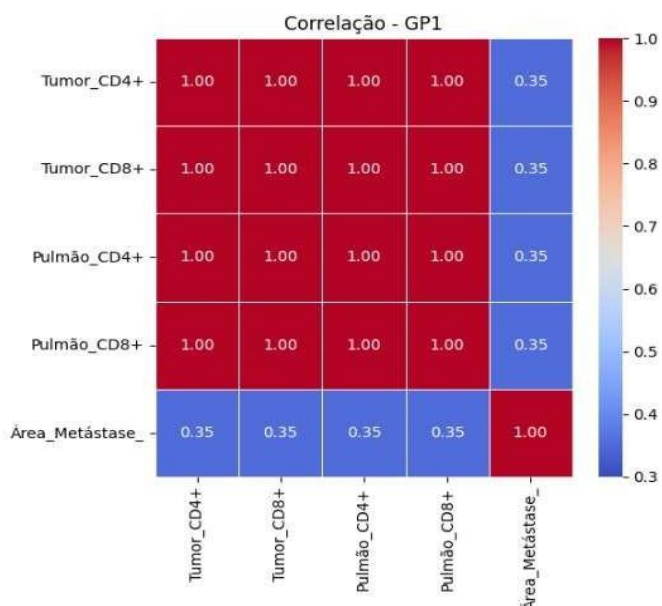
Figura 10 – Análise de correlação entre variáveis imunológicas e tumorais no grupo GT



Fonte: da própria autora, 2024.

Nota: Correlação entre as células T auxiliares (CD4+) e citotóxicas (CD8+), presentes nos tumores e pulmões, e a área metastática no grupo tumor.

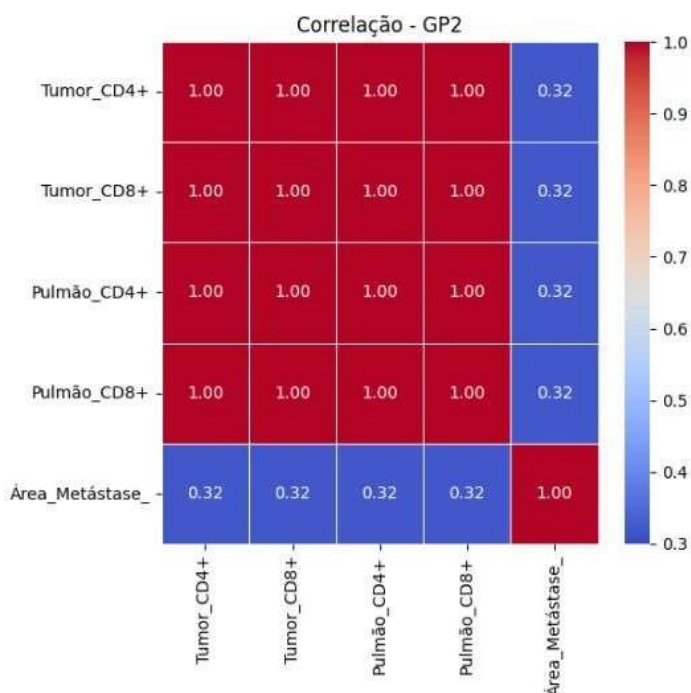
Figura 11 – Análise de correlação entre variáveis imunológicas e tumorais no grupo GP1



Fonte: da própria autora, 2024.

Nota: Correlação entre as células T auxiliares (CD4+) e citotóxicas (CD8+), presentes nos tumores e pulmões, e a área metastática no grupo protocolo 1.

Figura 12 – Análise de correlação entre variáveis imunológicas e tumorais no grupo GP2



Fonte: da própria autora, 2024.

Nota: Correlação entre as células T auxiliares (CD4+) e citotóxicas (CD8+), presentes nos tumores e pulmões, e a área metastática no grupo protocolo 2.

6 DISCUSSÃO

A versatilidade das células dendríticas as torna ferramentas promissoras para o desenvolvimento de imunoterapias personalizadas contra o câncer, sobretudo devido à sua capacidade de orquestrar respostas imunológicas antitumorais específicas. As DCs desempenham um papel central na intensificação da atividade das células T contra tumores, moldando a resposta imune de forma eficaz. A plasticidade dessas células é modulada pelos estímulos que recebem durante o processo de maturação, bem como pelo microambiente em que estão inseridas. Esses fatores tornam a imunoterapia baseada em DCs uma abordagem promissora no tratamento do câncer de mama e de suas complicações secundárias, como as metástases pulmonares (Constantino *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2024).

Neste estudo, as variações observadas entre os volumes tumorais dos grupos dos grupos tratados não atingiram significância estatística, o que sugere que o impacto do tratamento na redução tumoral foi insuficiente para causar uma alteração mensurável ou que tais diferenças não foram detectadas nas condições experimentais aplicadas. Esse resultado reflete a complexidade das interações tumor-hospedeiro e pode indicar a necessidade de ajustes nos parâmetros do protocolo terapêutico para alcançar uma resposta antitumoral mais robusta. Todavia, os efeitos biológicos dos tratamentos podem ser observados de forma mais evidente em outros parâmetros.

Os resultados referentes às áreas metastáticas pulmonares indicaram uma clara eficácia dos tratamentos testados. Tanto GP1 quanto GP2 mostraram reduções significativas nas áreas metastáticas quando comparados ao GT. A ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados sugere que ambos os protocolos exercem efeito semelhante na redução da metástase pulmonar, reforçando a eficácia geral das estratégias imunoterápicas na contenção da progressão metastática, independentemente das variações no protocolo, como já demonstrado por estudos anteriores (Cunha; Michelin; Murta, 2016; Michelin; Murta; Silva, 2021; Silva; Cunha; Murta; Michelin, 2022, 2024; Silva *et al.*, 2020; Vieira *et al.*, 2021b).

O fator quimiotático RANTES tem um papel relevante na maturação e migração das DCs, influenciando o recrutamento de outras células imunes para o local do tumor (Sallusto *et al.*, 1999). Essas mudanças são essenciais para a transição das DCs de células de captura de antígeno para células apresentadoras, que iniciam a imunidade adaptativa por meio dos linfócitos T, tanto auxiliares, como citotóxicos (Flores-Romo, 2001). Tais fatores podem explicar ou justificar a tendência de uma redução da média do volume tumoral no GP2 em

relação aos demais grupos.

A análise da infiltração de linfócitos T auxiliares no tumor revelou um dado interessante: enquanto não houve diferença significativa entre GT e GP1, o grupo tratado com o protocolo alternativo (GP2) apresentou um aumento substancial na quantidade de linfócitos auxiliares em comparação tanto ao GT quanto ao GP1. Este aumento sugere uma potencial vantagem do protocolo GP2 em promover o recrutamento de células T auxiliares ao microambiente tumoral, o que pode refletir uma resposta imune mais robusta associada a esse protocolo. No estudo conduzido por Garriss *et al* (2018), observa-se a importância do diálogo entre células dendríticas e linfócitos T para uma resposta antitumoral eficaz, com a sinalização mediada por IFN- γ e IL-12 sendo crítica para essa ativação. As células T auxiliares desempenham papel crucial, tanto na ativação de outras células imunes quanto na resposta citotóxica direta contra células tumorais que expressam MHC classe II. O aumento de células Th1, induzidas por IL-12, favorece a produção de IFN- γ , que está envolvido na senescência tumoral e na normalização dos vasos tumorais (Algarra; Garrido; Garcia-Lora, 2021; Bonaccorsi *et al.*, 2015; Garriss *et al.*, 2018).

Esse achado pode ser reforçado pela quantificação dos fatores de transcrição T-bet, GATA3, FOXP3 e ROR γ t no microambiente tumoral, que revelou que o GT apresentou os níveis mais altos de todos os fatores, sugerindo ativação generalizada de diferentes vias de resposta imunológica, incluindo tanto respostas pró-inflamatórias quanto regulatórias. A redução significativa desses fatores nos grupos tratados sugere que os protocolos de imunoterapia testados foram capazes de modular a resposta imunológica no microambiente tumoral. Particularmente, o GP2 mostrou tendência a ser mais eficaz na redução de T-bet e ROR γ t, indicativo de uma modulação mais profunda nas vias Th1 e Th17, respectivamente. Esses achados são compatíveis com a hipótese de que o protocolo alternativo pode promover uma resposta imunológica mais equilibrada, limitando tanto a inflamação excessiva quanto a imunossupressão regulatória.

É importante considerar as funções dos fatores de transcrição para além de sua expressão isolada, de forma a compreender como esses marcadores interagem em diferentes tipos celulares e contextos no câncer. Sob esta óptica, a expressão dos fatores de transcrição T-bet, GATA3, FOXP3 e ROR γ t não está restrita apenas aos linfócitos T, mas também é observada em diversas células imunes e tumorais no contexto do câncer. Estudos revelaram que o FOXP3, tradicionalmente associado às células T reguladoras, também pode ser expresso em células tumorais, particularmente no melanoma. Essa expressão pode ser induzida em células B transformadas, sugerindo que a malignidade pode desencadear a

expressão de FOXP3 em linhagens celulares que não pertencem aos linfócitos T (Ebert *et al.*, 2008). Além disso, o fator de transcrição ROR γ t, comumente relacionado aos linfócitos Th17, pode ser coexpresso com FOXP3 em uma população estável de Tregs infiltrantes de tumores. Esses Tregs ROR γ t⁺ desempenham um papel essencial no crescimento tumoral, modulando o ambiente inflamatório, especialmente por meio da regulação da IL-6 em células dendríticas (Rizzo *et al.*, 2018).

Em relação ao GATA3, fator característico das células Th2, estudos o identificam como um proto-oncogene em neoplasias de células T, que influencia o crescimento e a proliferação dessas células. No entanto, seu papel vai além das células T, o que indica participação mais abrangente em várias malignidades (Geng *et al.*, 2022). Por outro lado, as células NK são grandes produtoras de T-bet, um fator crucial para o seu desenvolvimento e função. A expressão de T-bet nas células NK é induzida por citocinas, como IFN- γ e IL-12, o que aumenta suas capacidades citotóxicas (Huang; Bi, 2021; Wong *et al.*, 2023). Além disso, pesquisas mostram que T-bet é fundamental para manter as respostas antitumorais das células NK, sendo que a ausência desse fator resulta em células NK disfuncionais (Kiekenes *et al.*, 2021; Wong *et al.*, 2023).

Para os linfócitos T citotóxicos, observou-se uma dinâmica semelhante à infiltração de T auxiliares. Tanto GP1 quanto GP2 induziram aumentos significativos na infiltração de T citotóxicos em relação ao grupo tumor. No entanto, a comparação direta entre os dois protocolos de tratamento (GP1 vs GP2) não revelou diferenças significativas, o que indica que ambos os tratamentos têm capacidade equivalente de promover a infiltração de células T citotóxicas no tumor. Isso sugere que, embora o protocolo alternativo tenha mostrado maior eficácia no recrutamento de T auxiliares, os níveis de T citotóxicos permanecem semelhantes entre os protocolos e aponta para uma modulação imunológica similar.

A análise dos linfócitos auxiliares no pulmão revelou um padrão distinto, especialmente em relação ao impacto da imunoterapia no controle da infiltração associada à progressão metastática. O GT apresentou níveis significativamente aumentados de T auxiliares em relação ao GC, o que aponta para uma infiltração exacerbada associada à progressão metastática. Esse resultado é consistente com dados da literatura, que mostram que a infiltração de células T, particularmente CD4⁺, reflete a tentativa do sistema imunológico de conter a metástase em expansão, embora muitas vezes de forma ineficaz ou insuficiente em contextos metastáticos avançados (Cohen *et al.*, 2023; Rodriguez-Tirado *et al.*, 2022). Essas células podem modular a atividade dos macrófagos, através da sinalização por IL-4, uma citocina predominante no perfil Th2, que está associada ao aumento do extravasamento de

células tumorais e à promoção de seu crescimento, mediados por macrófagos imunossupressores (Rodriguez-Tirado *et al.*, 2022). Além disso, a interação entre os linfócitos T auxiliares e fibroblastos associados ao câncer pode intensificar a formação de um nicho fibrótico pré-metastático, promovendo a metástase pulmonar (Cohen *et al.*, 2023).

Nos grupos tratados, houve redução significativa dos níveis de T auxiliares em relação ao GT, embora ambos os grupos ainda mantivessem níveis superiores ao GC, o que indica que os protocolos de imunoterapia modulam a infiltração imune no pulmão. A comparação entre GP1 e GP2 revelou pequena, mas significativa, diferença entre os dois, o que sugere que o protocolo alternativo pode ser ligeiramente mais eficaz na redução da infiltração de T auxiliares no pulmão. Este achado, que embora não esperado a primeiro momento nas hipóteses preliminares, pode indicar que o GP2 induz resposta mais regulada ou controlada no microambiente metastático pulmonar. Este dado pode ser melhor fundamentado pela caracterização dos fatores de transcrição prescritores do perfil de ativação dos linfócitos T auxiliares infiltrantes.

Os fatores de transcrição pulmonares, exibiram tendências similares às do tumor, com o GP2 novamente mostrando leve vantagem na redução dos fatores inflamatórios e regulatórios. A menor expressão de T-bet, GATA3, FOXP3 e ROR γ t no GP2, em comparação com o GP1, reforça a hipótese de que o protocolo alternativo pode ser mais eficaz na modulação da resposta imune associada à metástase pulmonar, uma vez que a diminuição desses fatores pode indicar que o GP2 promove uma resposta imune menos polarizada, o que evita a exacerbação de respostas pró-inflamatórias (Th1, Th17) ou imunossupressoras (Tregs), e que o microambiente pulmonar metastático se torna menos propício à progressão tumoral.

Esse padrão não é completamente inesperado, pois a literatura sugere que uma resposta inflamatória exacerbada (como observada no GT) pode, paradoxalmente, contribuir para a progressão tumoral ao criar um ambiente imunossupressor ou ao facilitar o recrutamento de células pró-tumorais (Cohen *et al.*, 2023; Rodriguez-Tirado *et al.*, 2022). O controle mais sutil da infiltração imune, como o visto no GP2, pode refletir um equilíbrio mais favorável entre a eliminação de células tumorais e a prevenção de um ambiente imunossupressor.

Em relação aos linfócitos T citotóxicos no pulmão, os resultados também indicaram diminuição significativa nos grupos tratados em relação ao GT, com o GP1 retornando a níveis semelhantes aos do controle, enquanto o GP2 apresentou modesta elevação de CD8⁺ em comparação a GP1, embora ainda inferior ao GT. Esses resultados indicam que, apesar da resposta imunológica antitumoral, ambos os tratamentos são eficazes em reduzir a infiltração

de células T associada à inflamação.

Além disso, de acordo com a literatura, as células T citotóxicas desempenham papel central na redução de metástases pulmonares, pois são fundamentais para a eliminação de células cancerosas dormentes, o que influencia significativamente o desenvolvimento de metástases no câncer de mama. No entanto, uma alta densidade de células T citotóxicas em estado inflamatório crônico pode, paradoxalmente, favorecer a formação de metástases, ao contribuir para a criação de um microambiente que facilita a invasão tumoral por meio da alteração da arquitetura tecidual. Outra possível explicação para o fato de que a elevada infiltração de T citotóxicos no pulmão do GT não resulta necessariamente na redução das áreas metastáticas pode estar associada à presença de macrófagos alveolares. Esses macrófagos suprimem a atividade das células inflamatórias para proteger os tecidos pulmonares de danos causados pela inflamação crônica, preservando os processos respiratórios.

Por fim, as correlações observadas entre as células T auxiliares e citotóxicas e as áreas metastáticas fornecem mais evidências do impacto imunomodulador dos tratamentos. A correlação observada entre a infiltração de células T auxiliares e citotóxicas e as áreas metastáticas sugere possível ligação entre a resposta imune e a progressão da metástase.

No GT, as associações máximas indicam que a infiltração de células T está diretamente associada ao avanço da metástase. A redução dessa correlação nos grupos tratados, particularmente no GP2, sugere que o tratamento pode estar modulando positivamente essa infiltração, dissociando-a da progressão metastática e promovendo uma resposta antitumoral mais eficaz.

De maneira geral, enquanto o GT apresentou correlação positiva moderada entre a infiltração de células T e a área metastática, o que aponta para uma infiltração associada à progressão metastática, os tratamentos reduziram essa correlação. O GP2 foi particularmente eficaz em diminuir essa associação, sugerindo controle mais eficiente da metástase. Em conjunto, os resultados indicam que ambos os protocolos de imunoterapia são eficazes na modulação do microambiente tumoral e na contenção da metástase pulmonar, com o protocolo alternativo demonstrando tendência a ser mais eficiente na redução da infiltração de células T e na modulação de fatores de transcrição inflamatórios e regulatórios, o que pode refletir maior eficácia no controle da resposta imune associada ao tumor e à metástase.

A infiltração de linfócitos T auxiliares e citotóxicos no pulmão e no tumor primário é um marcador prognóstico importante. No caso das células T auxiliares, o predomínio de células Th1, caracterizadas pela expressão de T-bet e produção de IFN- γ , está associado a

uma resposta antitumoral mais eficaz. Por outro lado, células Treg, marcadas pela expressão de FOXP3, podem suprimir essa resposta e favorecer a progressão tumoral. A presença de células Th17, caracterizadas por ROR γ t, também desempenha um papel importante na resposta imune, mas sua função exata na metástase ainda é objeto de debate, visto que este perfil exhibe características pró-tumorais e antitumorais (Karpisheh *et al.*, 2022; Shibabaw; Teferi; Ayelign, 2023; Yang *et al.*, 2012).

Estudos demonstram que as células Th17 estão implicadas na progressão do câncer de mama, por acentuar as condições inflamatórias por meio de citocinas como IL-17, IL-22 e TNF- α , que podem facilitar o crescimento e a metástase tumoral (Karpisheh *et al.*, 2022; Shibabaw; Teferi; Ayelign, 2023). Por outro lado, outro estudo sugere que as células Th17 também podem contribuir para a imunidade antitumoral, já que sua presença foi associada a melhores resultados clínicos em certos contextos (Yang *et al.*, 2012).

A adição de RANTES ao protocolo de maturação pode ter facilitado a migração de células T auxiliares e citotóxicas para o pulmão e tumor, de maneira a contribuir para a maior infiltração observada nesses tecidos. Por outro lado, a IL-12, citocina essencial para a ativação de células T CD8⁺ citotóxicas e a polarização de linfócitos T CD4⁺ auxiliares para o perfil Th1, pode ter promovido a produção de IFN- γ e aumentado a atividade antitumoral das células imunes. Assim sendo, a combinação de RANTES e IL-12 pode potencializar a resposta imune antitumoral, o que promove um ambiente imune mais pró-inflamatório e favorável à eliminação de células tumorais. Assim, a inclusão dessas moléculas no protocolo de maturação de DCs pode ter contribuído para o aumento da infiltração de células T e a redução das áreas metastáticas, observadas especialmente no grupo GP2.

Com base nos resultados obtidos, o protocolo de maturação de DCs que utiliza RANTES e IL-12 mostrou-se particularmente eficaz na redução de metástases pulmonares, o que destaca seu potencial terapêutico. Dado esse desempenho superior, especialmente na modulação da resposta imune e na contenção da progressão metastática no pulmão, o protocolo alternativo se dá como estratégia promissora para ser explorada em outros contextos oncológicos. Estudos futuros poderão investigar sua eficácia no tratamento de cânceres primários do pulmão e em outros tipos de câncer que apresentam organotropismo para metástases pulmonares, de maneira a ampliar sua aplicação no desenvolvimento de terapias mais personalizadas e eficazes.

Para mais, apesar dos resultados promissores do protocolo alternativo, o presente estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas. Uma das principais limitações é a análise dos dados de metástases pulmonares, que se concentrou em aspectos

quantitativos sem avaliação mais detalhada dos mecanismos moleculares envolvidos na inibição da metástase. Além disso, o estudo focou em um único modelo tumoral, o que limita a generalização dos resultados para outros tipos de câncer. A ausência de uma avaliação temporal mais abrangente sobre o comportamento das metástases também pode restringir a compreensão completa da dinâmica da resposta imunológica induzida pelo protocolo. Por fim, os resultados obtidos abrem novas questões. Por exemplo, a relação entre a modulação dos fatores de transcrição e o controle metastático ainda precisa ser melhor entendida. Futuros estudos poderiam se beneficiar de uma abordagem mais ampla, que inclua a identificação dos mecanismos exatos pelos quais o GP2 regula vias de controle metastático. Além disso, seria relevante investigar se a modulação imune aqui observada está diretamente relacionada à interação entre as células dendríticas provenientes da imunoterapia e células T, analisar biomarcadores de resposta imune e validar esses achados em modelos adicionais de câncer.

7 CONCLUSÃO

Os achados sugerem que o protocolo alternativo pode promover uma resposta imune mais equilibrada, favorecendo a infiltração de células T auxiliares e uma modulação das vias Th1 e Th17, que são cruciais para a eficácia antitumoral. A redução significativa dos fatores de transcrição T-bet, GATA3, FOXP3 e ROR γ t nos grupos tratados indica uma influência positiva dos tratamentos na regulação da resposta imune tumoral e metastática. Em particular, o grupo tratado com o protocolo alternativo demonstrou maior eficácia na infiltração de células T auxiliares no tumor e uma modulação mais eficiente da inflamação no pulmão, sugerindo seu potencial superior no controle da progressão metastática.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. LICHTMAN, A. H. PILLAI, S. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imune**. 9. ed. Rio de Janeiro: GEN, 2019.

ADAM, I.; LONGWORTH, A.; LAWSON, D. Regulatory T cells as key modulators of breast cancer brain metastasis. **The Journal of Immunology**, v. 212, n. 1_Supplement, p. 0450_5224-0450_5224, 1 maio 2024. Suppl. Disponível em: https://jitc.bmj.com/content/11/Suppl_1/A1115. Acesso em: 17 out. 2024.

ALGARRA, I.; GARRIDO, F.; GARCIA-LORA, A. M. MHC heterogeneity and response of metastases to immunotherapy. **Cancer and Metastasis Reviews**, Dordrecht, v. 40, n. 2, p. 501-517, 15 jun. 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10555-021-09964-4.pdf>. Acesso em: 1 mai. 2024.

ARISTEI, C.; LANCELLOTTA, V.; LUPATTELLI, M. Which side effects should be described to patients before neoadjuvant radio-chemotherapy treatment? In: VALENTINI, V.; SCHMOLL, H. J.; VAN DE VELDE, C. (ed). **Multidisciplinary management of rectal cancer**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 247-251.

BONACCORSI, I.; CAMPANA, S.; MORANDI, B. Acquisition and presentation of tumor antigens by dendritic cells. **Critical Reviews in Immunology**, Boca Raton, FLA, v. 35, n. 5, p. 349-364, 2015. Disponível em: <https://www.dl.begellhouse.com/download/article/5f81b32e756edc33/CRI-15-014-Final-Article-1-29-16-2.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2024.

BROWN, J. S.; AMEND, S. R.; AUSTIN, H. R.; GATENBY, R. A.; HAMMARLUND, E. U.; PIENTA, K. J. Updating the definition of cancer. **Molecular Cancer Research**, Philadelphia, PA, v. 21, n. 11, p. 1142-1147, 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10618731/pdf/1142.pdf>. Acesso em: 15 out. 2024.

BRUM, I. V.; GUERRA, M. R.; CINTRA, J. R. D.; TEIXEIRA, M. T. B. Metastatic breast cancer: clinicopathological features and survival according to the site of metastasis. **Medicina** (Ribeirão Preto), Ribeirão Preto, SP, v. 50, n. 3, p. 158-168, 8 jun. 2017. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/139811/135086>. Acesso em: 17 jun. 2024.

CHEN, Y. et al. Pharmaceutical targeting Th2-mediated immunity enhances immunotherapy response in breast cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 20, n. 1, p. 1-14, 1 dez. 2022. Disponível em: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-022-03807-8>. Acesso em: 17 out. 2024.

CHO, S. Y. et al. WT1 Pulsed Human CD141+ Dendritic Cell Vaccine Has High Potential in Solid Tumor-Targeted Immunotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1501, 1 jan. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36675017/>. Acesso em: 10 nov. 2024.

COHEN, N. *et al.* Breast cancer-secreted factors promote lung metastasis by signaling systemically to induce a fibrotic premetastatic niche. **Cancer Research**, Baltimore, MD, v. 83, n. 20, p. 3354-3367, 13 out. 2023. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/83/20/3354/3371313/3354.pdf>. Acesso em: 17 jun. 2024.

CONSTANTINO, J.; GOMES, C.; FALCÃO, A.; NEVES, B. M.; CRUZ, M. T. Dendritic

cell-based immunotherapy: a basic review and recent advances. **Immunologic Research**, Totowa, NJ, v. 65, n. 4, p. 798-810, 28 ago. 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s12026-017-8931-1.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2024.

CUNHA, A. da; MICHELIN, M. A.; MURTA, E. F. C. Phenotypic profile of dendritic and T cells in the lymph node of Balb/C mice with breast cancer submitted to dendritic cells immunotherapy. **Immunology Letters**, Amsterdam, NL, v. 177, p. 25-37, 1 set. 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247816301249?via%3Dihub>. Acesso em: 20 mai. 2024.

SILVA, S. F. M. da; CUNHA, A. da; 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**, New Delhi, IN, v. 60, p. 375-385, 2022. Disponível em: <https://nopr.niscpr.res.in/bitstream/123456789/59848/1/IJEB%2060%20%2806%29%20375-385.pdf>. Acesso em: 17 mai. 2024.

SILVA, S. F. M. da; CUNHA, A. da; MURTA, E. F. C.; MICHELIN, M. A. ICAM2 is related to good prognosis in dendritic cell immunotherapy for cancer. **Immunotherapy**, London, v. 16, n. 3, p. 173-185, 21 fev. 2024. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.2217/imt-2021-0097?needAccess=true>. Acesso em: 17 out. 2024.

MARTINS, W. de A.; RENNI, M. J. P.; ISSA, A. F. C. The clinical aspects of heart damage by chemotherapy and radiotherapy. In: Mesquita, C.T.; Rezende, M.F. (ed.). **Nuclear Cardiology**. Cham, CH: Springer International Publishing, 2021. p. 675-689.

EBERT, L. M. et al. The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells. **Cancer Research**, Baltimore, MD, v. 68, n. 8, p. 3001-3009, 15 abr. 2008. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article-lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-07-5664>. Acesso em: 16 ago. 2024.

FLORES-ROMO, L. In vivo maturation and migration of dendritic cells. **Immunology**, Oxford, UK, v. 102, n. 3, p. 255-262, 1 mar. 2001. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1783189/pdf/imm0102-0255.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2024.

GARRIS, C. S. *et al.* Successful anti-PD-1 cancer immunotherapy requires T cell-dendritic cell crosstalk involving the cytokines IFN- γ and IL-12. **Immunity**, Cambridge, MA, v. 49, n. 6, p. 1148-1161.e7, dez. 2018. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6301092/pdf/nihms-1508894.pdf>. Acesso em: 17 mai. 2024.

GENG, X. *et al.* GATA-3 is a proto-oncogene in T-cell lymphoproliferative neoplasms. **Blood Cancer Journal**, New York, v. 12, n. 11, p. 149, 4 nov. 2022. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9633835/pdf/41408_2022_Article_745.pdf. Acesso em: 16 ago. 2024.

GHIMIREY, N.; STEELE, C.; CZERNIECKI, B. J.; KOSKI, G. K.; SHOWALTER, L. E.

Sunitinib combined with Th1 cytokines potentiates apoptosis in human breast cancer cells and suppresses tumor growth in a murine model of HER-2pos breast cancer. **International Journal of Breast Cancer**, v. 2021, n. 1, p. 8818393, 1 jan. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33936816/>. Acesso em: 17 out. 2024.

HERNDON, M. E. *et al.* The 4T1 breast carcinoma model possesses hybrid epithelial/mesenchymal traits linked to a highly metastatic phenotype. **bioRxiv**, California, fev. 2024. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2024.02.02.578710v1>. Acesso em: 20 out. 2024.

GHIMIREY, N. *et al.* Sunitinib combined with Th1 cytokines potentiates apoptosis in human breast cancer cells and suppresses tumor growth in a murine model of HER-2pos breast cancer. **International Journal of Breast Cancer**, v. 2021, n. 1, p. 8818393, 1 jan. 2021. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-19463-9>. Acesso em: 17 out. 2024.

HUANG, C.; BI, J. Expression Regulation and Function of T-Bet in NK Cells. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, Switzerland, v. 12, p. 761920, out. 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8524037/>. Acesso em: 17 out. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2020**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 10 mai. 2024.

IKEDA, H.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, Inglaterra, v. 13, n. 2, p. 95–109, 2002.

IQBAL, M. *et al.* Hematological study of cancer patients with radio-chemotherapy. **Science Letters**, Nova York, v. 3, n. 2, p. 75–79, 2015.

KARPISHEH, V. *et al.* The role of Th17 cells in the pathogenesis and treatment of breast cancer. **Cancer Cell International 2022**, Berlim, v. 22, n. 1, p. 1–13, 5 mar. 2022.

KIEKENS, L. *et al.* T-BET and EOMES Accelerate and Enhance Functional Differentiation of Human Natural Killer Cells. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 12, p. 732511, 24 set. 2021.

KURILIN, V.; ALSHEVSKAYA, A.; SENNIKOV, S. Development of cell technologies based on dendritic cells for immunotherapy of oncological diseases. **Biomedicines**, v. 12, n. 3, p. 699, 21 mar. 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9059/12/3/699>. Acesso em: 20 nov. 2024.

LE, L. *et al.* Th2 cell infiltrations predict neoadjuvant chemotherapy response of estrogen receptor-positive breast cancer. **Gland Surgery**, v. 10, n. 1, p. 15465–15165, 1 jan. 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7882347/>. Acesso em: 17 out. 2024.

LEE, K.-W.; YAM, J. W. P.; MAO, X. Dendritic cell vaccines: A shift from conventional approach to new generations. **Cells**, v. 12, n. 17, p. 2147, 25 ago. 2023. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37681880/>. Acesso em: 10 abr. 2024.

LOPES, A. M. M.; MICHELIN, M. A.; MURTA, E. F. C. Monocyte-derived dendritic cells from patients with cervical intraepithelial lesions. **Oncology Letters**, Athens, v. 13, n. 3, p. 1456-1462, 2017. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.5595/download>. Acesso em: 7 jun. 2024.

MATIAS, B. F. *et al.* Influence of Immunotherapy with Autologous Dendritic Cells on Innate and Adaptive Immune Response in Cancer. *Clinical Medicine Insights. Oncology*, Basel, v. 7, n. 7, p. 165, 2013.

MICHELIN, M. A.; MURTA, E. F. C.; SILVA, S. F. M. da. 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**, [São José dos Pinhais, PR], v. 7, n. 7, p. 66648–66666, jul. 2021. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/32448/pdf>. Acesso em: 15 jun. 2024.

NIKOLAOU, C. *et al.* Abstract C079: Comprehensive immunophenotypic profiling sheds light on the dynamic interplay between immune cells in the 4T1 breast cancer model upon anti-PD1 and anti-CTLA4 immunotherapy. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 22, n. 12, p. C079–C079, dez. 2023. Suppl. Disponível em: https://aacrjournals.org/mct/article/22/12_Supplement/C079/730429/Abstract-C079-Comprehensive-immunophenotypic. Acesso em: 17 out. 2024.

NNODIM, J. The relevance of immunological system in cancer progression. **Medical Journal of Clinical Trials & Case Studies**, Novi, MI, v. 5, n. 3, 000287. 2021. Disponível em: <https://medwinpublishers.com/MJCCS/the-relevance-of-immunological-system-in-cancer-progression.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2024.

NOCERA, N. F.; LEE, M. C.; CRUZ, L. M. de la; ROSEMBLIT, C.; CZERNICKI, B. J. Restoring lost anti-HER-2 Th1 immunity in breast cancer: A crucial role for Th1 cytokines in therapy and prevention. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. OCT, p. 225587, 6 out. 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27766079/>. Acesso em: 17 out. 2024.

NOËL, G. *et al.* Functional Th1-oriented T follicular helper cells that infiltrate human breast cancer promote effective adaptive immunity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 19, 1 out. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34411002/>. Acesso em: 17 out. 2024.

PARK, H. Y.; ASHAYERIPANAH, M.; CHOPIN, M. Harnessing dendritic cell diversity in cancer immunotherapy. **Current Opinion in Immunology**, Amsterdã, v. 82, p. 102341, jun. 2023.

PATEL, U.; SUSMAN, D.; ALLAN, A. L. Influence of Extracellular Vesicles on Lung Stromal Cells during Breast Cancer Metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 24, n. 14, p. 11801, 22 jul. 2023.

PULASKI, B. A.; CLEMENTS, V. K.; PIPELING, M. R.; ROSENBERG, S. O. Immunotherapy with vaccines combining MHC class II/CD80+ tumor cells with interleukin-12 reduces established metastatic disease and stimulates immune effectors and monokine induced by interferon gamma. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, Hoboken, v. 49, n. 1, p. 34–45, 2000.

RIZZO, A. *et al.* RORGT-expressing tregs drive the growth of colitis-associated colorectal cancer by controlling IL6 in dendritic cells. **Cancer Immunology Research**, Pensilvânia, v. 6, n. 9, p. 1082–1092, Sept. 2018.

RODRIGUES, C. M.; MATIAS, B. F.; MURTA, E. F. C; MICHELIN, M. A. The role of T lymphocytes in cancer patients undergoing immunotherapy with autologous dendritic cells. **Clinical Medicine Insights. Oncology**, Londres, v. 5, n. 5, p. 107, 2011.

RODRIGUEZ-TIRADO, C.; ENTENBERG, D.; LI, J.; QIAN, B. Z.; CONDEELIS, J. S.; POLLARD, J.W. Interleukin 4 controls the pro-tumoral role of macrophages in mammary cancer pulmonary metastasis in mice. **Cancers**, Basel, v. 14, n. 17, p. 4336, Sept. 2022.

RYCAJ, K.; LI, H.; ZHOU, J.; CHEN, X.; TANG, D. G. Cellular determinants and microenvironmental regulation of prostate cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, Amsterdã, v. 44, p. 83–97, Jun. 2017.

SALLUSTO, F. *et al.* Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 29, n. 5, p. 1617–1625, maio 1999.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **The Journal of Experimental Medicine**, Nova York, v. 179, n. 4, p. 1109–1118, 1 abr. 1994.

SHIBABAW, T.; TEFERI, B.; AYELIGN, B. The role of Th-17 cells and IL-17 in the metastatic spread of breast cancer: As a means of prognosis and therapeutic target. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 14, p. 1094823, 13 mar. 2023.

SILVA, P. B.; JAMMAL, M. P.; MICHELIN, M. A.; MURTA, E. F. C. Phenotypic differences of tecidual TDCs obtained from breast cancer mice. **European Journal of Gynaecological Oncology**, Padua, v. 41, n. 5, p. 689, 2020.

SONG, M.-S.; NAM, J. H.; NOH, K. E.; LIM, D. S. Dendritic Cell-Based Immunotherapy: The Importance of Dendritic Cell Migration. **Journal of Immunology Research**, Londres, v. 2024, p. 1–11, Apr. 2024.

VIEIRA, J. F.; MURTA, E. F. C.; NOMELINI, R. S.; MICHELIN, M. A. Estimulação crônica do sistema imunológico em pacientes com câncer ginecológico e mama e linfócitos T auxiliares periféricos produtores de IL-12/ Chronic stimulation of the immune system in patients with gynecological cancer and IL-12-producing peripheral helper T lymphocytes. **Brazilian Journal of Development**, Heidelberg, v. 6, n. 11, p. 87994– 88005, Nov. 2020.

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**, Atenas, v. 41, n. 7, p. 3419–3427, Jul. 2021a.

VIEIRA, J. F.; PEIXOTO, A. P.; ABREU, T. N. L. de; MURTA, E. F. C.; MICHELIN, M. A. Imunoterapia profilática com células dendríticas reduz metástases pulmonares em modelo de câncer de mama experimental / Prophylactic immunotherapy with dendritic cells reduces lung metastases in an experimental breast cancer model. **Brazilian Journal of Development**, Heidelberg, v. 7, n. 5, p. 47401–47414, 7 jun. 2021b.

WONG, P. *et al.* T-BET and EOMES sustain mature human NK cell identity and antitumor function. **The Journal of Clinical Investigation**, Durham, v. 133, n. 13, 3 jul. 2023.

WU, M.; LIANG, Y.; ZHANG, X. Changes in Pulmonary Microenvironment Aids Lung Metastasis of Breast Cancer. **Frontiers in Oncology**, Lausanne, v. 12, p. 860932, 26 maio 2022.

XIAO, Y.; HUANG, Y.; JIANG, J.; CHEN, Y.; WEI, C. Identification of the prognostic value of Th1/Th2 ratio and a novel prognostic signature in basal-like breast cancer. *Hereditas*, v. 160, n. 1, p. 1–14, 1 dez. 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36694223/>. Acesso em: 17 out. 2024.

XU, D.; TANG, M. Advances in the study of biomarkers related to bone metastasis in breast cancer. **British Journal of Radiology**, Londres, v. 96, n. 1150, 1 out. 2023.

YANG, L. J.; QI, Y.; TANG, L.; ZHAO, S.; SHAN, B. Expression of Th17 Cells in Breast Cancer Tissue and Its Association with Clinical Parameters. **Cell Biochemistry and Biophysics**, Heidelberg, v. 62, n. 1, p. 153–159, 13 jan. 2012.

YIN, X.; CHEN, S.; EISENBARTH, S. C. Dendritic cell regulation of T helper cells. **Annual Review of Immunology**, v. 39, p. 759–790, 26 abr. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33710920/>. Acesso em: 17 out. 2024.

ZHANG, H.; FELTHAUS, O.; EIGENBERGER, A.; HLEIN, S.; PRANTI, L. Treg cell therapeutic strategies for breast cancer: Holistic to local aspects. **Cells**, v. 13, n. 18, p. 1526, 11 set. 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/13/18/1526>. Acesso em: 05 jul. 2024.

ZHANG, Q. *et al.* CCL5-mediated Th2 immune polarization promotes metastasis in luminal breast cancer. **Cancer Research**, v. 75, n. 20, p. 4312–4321, 15 out. 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26249173/>. Acesso em: 05 jul. 2024.


Universidade Federal do Triângulo Mineiro

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

Uberaba, 08 de julho de 2022

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

CERTIFICADO

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

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

ALDO ROGELIS AQUILES RODRIGUES
Coordenador da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **ALDO ROGELIS AQUILES RODRIGUES, Coordenador(a) da Comissão de Ética no Uso de Animais**, em 11/07/2022, às 09:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).

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 **0778984** e o código CRC **2DED45E8**.

Referência: Processo nº 23085.005932/2022-75

SEI nº 0778984