

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

Tese de Doutorado

**Profilaxia por vacina de células dendríticas: avaliação de aspectos da resposta imunológica em camundongos Balb/c com carcinoma de mama induzido por 4T1**

Jéssica Ferreira Vieira

**Uberaba**

**2021**

Jéssica Ferreira Vieira

**Profilaxia por vacina de células dendríticas: avaliação de aspectos da resposta imunológica em camundongos Balb/c com carcinoma de mama induzido por 4T1**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor (a) em Ciências da Saúde área de concentração Imunologia Básica e Aplicada.

Orientação: Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin  
Coorientação: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

**Uberaba**

**2021**

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

V715p Vieira, Jéssica Ferreira  
    Profilaxia por vacina de células dendríticas: avaliação de aspectos da  
resposta imunológica em camundongos Balb/c com carcinoma de mama  
induzido por 4T1 / Jéssica Ferreira Vieira. -- 2021.  
    99 f. : il., fig., graf., tab.

    Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2021  
    Orientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin  
    Coorientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

    1. Neoplasias da mama. 2. Células dendríticas. 3. Imunoterapia. 4. Va-  
cinas anticâncer. I. Michelin, Márcia Antoniazi. II. Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 618.19-006

Jéssica Ferreira Vieira

**Profilaxia por vacina de células dendríticas: avaliação de aspectos da resposta imunológica em camundongos Balb/c com carcinoma de mama induzido por 4T1**

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

Uberaba-MG, 15 de junho de 2021.

**BANCA DE DEFESA**

Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin – UFTM

Profa. Dra. Millena Prata Jammal – UFTM

Prof. Dr. Guilherme Vannucchi Portari – UFTM

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

Prof. Dr. Francisco José Candido dos Reis – FMRP/USP

**Uberaba**

**2021**

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

## **Agradecimentos**

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que cruzaram e/ou compartilharam da minha jornada até aqui. Eu creio que nada nessa vida aconteça por acaso. Todas as nossas vivências auxiliam na construção da nossa essência e daquilo que desejamos e almejamos ser. Assim, agradeço:

A Deus, o Universo, como queiram chamar, essa energia vital, que de forma invisível nos auxiliam na melhora, nos fazendo crer na sabedoria e fé na vida;

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro, professores do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde;

À minha orientadora, Dra. Márcia Antoniazi Michelin, pelo voto de confiança, apoio, sugestões, compreensão em toda essa jornada que compartilhamos até aqui;

Ao meu Coorientador, Dr. Eddie Fernando Cândido Murta, pelos esclarecimentos, orientações, auxílios, sempre com cordialidade e rapidez;

Ao André e Tuânia, da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde;

Aos companheiros dessa jornada: Thamires Manfrim, Cláudio José da Silva, Polyana Barbosa Silva, Saulo Fernando Moreira, Millena Jammal, Taissa Nayara Lemos, Kézia Aguiar, Lenilson Silva, Eduardo Arthur Rodovalho, Douglas Abdalla, Eleni Solange, Angela Moed Lopes, Ana Paula Peixoto, Elias Xavier;

Aos meus pais, César Vieira e Val Ferreira, pelo apoio incondicional sempre. Meu irmão, César Júnior. Não sou nada sem vocês!;

Ao meu parceiro, Rafael A. Santos, gratidão pelo nosso encontro;

Aos meus tios Vando Antônio, Divina Ferreira, Dalva Ferreira, Ângela Oliveira e Maria Oliveira; meus avós Lázara Francisca, José Miguel, Maria Oliveira e Sinval Marques.

Aos meus primos Thiago Miguel, Vanessa Ferreira e Ranier Miguel;

Ao meu afilhado, Samuel Pereira;

Gratidão!

*“Tenha paciência. Tudo aquilo que você deseja, se for verdadeiro, e o mais importante: se for para ser seu, acontecerá.”*

*William Shakespeare*

## Resumo

As células dendríticas (DCs) têm sido abordadas como uma ferramenta promissora no campo da imunoterapia contra o câncer, por aproveitar a potência e a especificidade na indução de respostas imunes mediadas por células T específicas ao tumor. Neste trabalho investigamos a influência da imunoterapia profilática com vacina de DCs na ativação da resposta imunológica antitumoral, inibição do surgimento de metástases e desenvolvimento do câncer, em um modelo experimental de carcinoma mamário induzido por células 4T1. Foram utilizados 25 camundongos fêmeas adultas da linhagem Balb/c, separados em três grupos experimentais: controle, tumor e vacinado, sendo que os animais deste último grupo, receberam uma dose única de vacina com DCs antes da indução com células da linhagem tumoral 4T1. Ao longo do período experimental os animais tiveram seus volumes tumorais mensurados periodicamente. Observamos que a vacina influenciou na taxa de crescimento, promovendo uma redução nos volumes tumorais. Ao término do período experimental, os animais foram eutanasiados e os fígados, pulmões, baços e tumores dos grupos experimentais foram avaliados. Observamos uma redução estatisticamente significativa nas áreas de metástases hepáticas e pulmonares nos animais vacinados em relação aos não vacinados, por meio da técnica de H&E. Averiguamos no fígado, por citometria de fluxo, que a profilaxia levou a um aumento de linfócitos T totais, T CTL, Treg, assim como de IL-10 e IL-17 em Th; e redução de Th1, Th2, Th17 e de IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em Th. Realizamos avaliação sistêmica, através de amostras do baço, por meio de citometria de fluxo, em que a profilaxia também promoveu aumento de linfócitos T totais, Th e T CTL. A avaliação de citocinas nesse tecido foi realizada por ELISA após cultura de esplenócitos e foi observado que apenas as citocinas IL-10 e IL-12 estavam significativamente aumentadas no grupo vacinado. Ainda foi realizado ensaio *in vitro* com as células esplênicas sob estimulação de LPS por 12h, 24h e 36h, em que pode ser observado que as citocinas apresentam picos de secreção distintos. No microambiente tumoral, a avaliação de células imunes por citometria de fluxo demonstrou que a profilaxia com DCs promoveu aumento de células Th, Th1, Th2, Th17, Treg e T CTL, assim como de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em células Th1 e T CTL. Entretanto, direcionamentos investigativos são necessários para compreender a interação e peculiaridades desses processos. Desta forma, a imunoterapia profilática com DCs atuou de maneira distinta nos diferentes nichos avaliados e demonstrou alterar as respostas nesses meios, favorecendo a resposta imune antitumoral.

**Palavras-chave:** Imunoterapia. Imunologia celular. Célula dendrítica. Vacinas anticâncer.  
Neoplasias da mama.

## Abstract

Dendritic cells (DCs) have been approached as a promising tool in the field of cancer immunotherapy, as they take advantage of the potency and specificity in inducing immune responses mediated by tumor-specific T cells. In this work, we investigated the influence of prophylactic immunotherapy with DC vaccine on the activation of the antitumor immune response, inhibition of metastasis, and cancer development, in an experimental model of breast cancer induced by 4T1. Twenty-five adult female Balb/c mice were used, separated into three experimental groups: control, tumor, and vaccinated, and the animals of the latter group received a single dose of DC vaccine before induction with 4T1 tumor cell cells. Throughout the experimental period, the animals had their tumor volumes measured periodically. We observed that the vaccine influenced the growth rate, by promote a reduction in tumor volumes. At the end of the experimental period, the animals were euthanized and the livers, lungs, spleens, and tumors of the experimental groups were evaluated. We observed a statistically significant reduction in the areas of liver and lung metastases in vaccinated animals compared to non-vaccinated animals, using the H&E technique. We found in the liver, by flow cytometry, that prophylaxis led to an increase in total T lymphocytes, T CTL, Treg, as well as IL-10 and IL-17 in Th; and reduction of Th1, Th2, Th17 and IL-12, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  in Th. We performed a systemic evaluation, using spleen samples, by means of flow cytometry, in which prophylaxis also promoted an increase in lymphocytes. Total T, Th, and T CTL. Prophylaxis also promoted an increase in total T, Th, and T CTL lymphocytes. ELISA performed the evaluation of cytokines in this tissue after splenocyte culture and it was observed that only the cytokines IL-10 and IL-12 were significantly increased in the vaccinated group. An in vitro assay was also carried out with splenic cells under LPS stimulation for 12h, 24h, and 36h, that the cytokines present different secretion peaks. In the tumor microenvironment, we evaluated immune response cells, and prophylaxis with DCs increased Th, Th1, Th2, Th17, Treg, and T CTL cells, as well as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in Th1 and T CTL cells. Investigative directions are necessary to understand the interaction and peculiarities of these processes. The prophylactic immunotherapy with dendritic cells acted differently in the different niches evaluated and demonstrated to alter the responses in these media, favoring the anti-tumor immune response.

**Keywords:** Immunotherapy. Cell immunology. Dendritic cell. Cancer vaccines. Breast neoplasm.

## Lista de figuras

<b>Figura 1. Visão geral de uma cascata metastática .....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 2. Os diferentes subconjuntos de linfócitos T auxiliares (CD4+) .....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 3. Papel limiar do sistema imunológico na resposta antitumoral .....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 4. Células dendríticas e a resposta imunológica antitumoral .....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 5. Delineamento experimental .....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 6. Distribuição resultados obtidos .....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 7. Representação da síntese de citocinas no sobrenadante (perfil de citocinas) de cultura de células leucocitárias do baço .....</b>	<b>76</b>
<b>Figura 8. Concentração de citocinas no sobrenadante de leucócitos totais esplênicos, dentro de 12h, 24h e 36h a partir da estimulação com LPS .....</b>	<b>76</b>

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1: estimativas câncer (ano 2020) .....</b>	<b>18</b>
<b>Tabela 2: distribuição dos animais nos grupos de estudo .....</b>	<b>34</b>

## Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

%	Porcentagem
°C	Grau <i>Celsius</i>
µL	Microlitro
4T1	Linhagem celular tumoral murina de células 4T1
ANGPTL4	Angiopietina 4
APC	Célula apresentadora de antígeno
Balb/c	Linhagem de camundongo albina e isogênica
CCL2	<i>Monocyte chemoattractant protein-2</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carboto
COX2	Ciclo-oxigenase 2
DC	Célula Dendrítica (Inglês: <i>Dendritic Cell</i> )
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
FSC	<i>Foward Scatter</i>
g/L	Gramas por litro
GATA-3	Proteína de Ligação GATA-3 (Inglês: GATA Binding Protein 3)
GLOBOCAN	<i>Global Cancer Observatory</i>
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (Inglês: <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating fator</i> )
HE	Hematoxilina-Eosina
Her2	<i>Human epidermal growth factor Receptor-type 2</i>
HIF 1	Fator induzível a hipóxia tipo 1
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (Inglês: <i>International Agency for Research on Cancer</i> )
IFN-α	Interferon tipo <i>alpha</i>
IFN-γ	Interferon tipo <i>gamma</i>
IL	Interleucina

IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IPON	Instituto de Pesquisa em Oncologia
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligramas
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (Inglês: <i>major histocompatibility complex</i> )
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MoDCs	Células dendríticas derivadas de monócitos
NK	Célula Natural Assassina (Inglês: <i>Natural Killer</i> )
NKT	Célula T <i>Natural Killer</i>
PBS	Solução Salina Tamponada (Inglês: <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
pg/mL	Pictogramas por mililitro
ROR $\gamma$ t	Receptor órfão gama t relacionado ao ácido retinóico (Inglês: <i>Retinoic acid-related orphan receptor gamma t</i> )
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
SPARC	Osteonectina
SSC	<i>Side Scatter</i>
STAT-3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3
STAT-4	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 4 (Inglês: <i>Signal transducers and activators of transcription</i> )
STAT-6	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 6
T CTL	Linfócito T citotóxico
T-bet	<i>T-box transcription factor</i>
TCR	Receptor de linfócito T
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador do tipo <i>beta</i>
Th	Linfócito T <i>helper</i> (auxiliar)
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1
Th17	Linfócito T <i>helper</i> 17
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
Th22	Linfócito T <i>helper</i> 22

Th9	Linfócito T <i>helper</i> 9
TNBC	Câncer de mama triplo-negativo (Inglês: <i>Triple-negative breast cancer</i> )
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral tipo <i>alpha</i>
Treg	Linfócito T regulatório
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
WHO/OMS	<i>World Health Organization</i> / Organização Mundial de Saúde
xg	Força Centrífuga Relativa

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1 Tumores, Neoplasias e Câncer de Mama</b> .....	<b>16</b>
<b>1.2 Metástases</b> .....	<b>19</b>
<b>1.3 Modelos experimentais de tumores de mama com células 4T1</b> .....	<b>22</b>
<b>1.4 Resposta imunológica aos tumores</b> .....	<b>23</b>
<b>1.5 Fígado e resposta imune</b> .....	<b>27</b>
<b>1.6 Células dendríticas e imunoterapia</b> .....	<b>28</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>31</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1 Objetivos específicos</b> .....	<b>33</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1 Animais e grupos experimentais</b> .....	<b>34</b>
<b>4.2 Indução tumoral de modelo de câncer de mama com células 4T1</b> .....	<b>35</b>
<b>4.3 Vacina de Células Dendríticas e protocolo de vacinação</b> .....	<b>35</b>
<b>4.4 Retirada dos fígados, tumores, baços e pulmões</b> .....	<b>36</b>
<b>4.5 Citometria de Fluxo</b> .....	<b>36</b>
<b>4.5.1 Estratégia de gate</b> .....	<b>37</b>
<b>4.6 Avaliação de metástases pulmonares e hepáticas (HE)</b> .....	<b>37</b>
<b>4.7 Níveis de citocinas e cinética da produção de citocinas por ELISA</b> .....	<b>38</b>
<b>4.8 Análise Estatística</b> .....	<b>38</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<b>5.1 Artigo 1</b> .....	<b>39</b>
<b>5.2 Artigo 2</b> .....	<b>52</b>
<b>5.3. Artigo 3</b> .....	<b>64</b>
<b>5.4 Síntese de citocinas por células leucocitárias do baço (ELISA)</b> .....	<b>75</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>78</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>81</b>

<b>ANEXO 1 – CEUA (parecer técnico) .....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXO 2 – CEUA (certificado protocolo 379) .....</b>	<b>99</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Tumores, Neoplasias e Câncer de Mama

Habitualmente, os termos tumor, câncer e neoplasia são utilizados como sinônimos. Porém, no entendimento biológico eles compreendem fenômenos bem distintos. Enquanto neoplasia trata-se da ocorrência de transformação celular com subsequente proliferação anormal (novo crescimento), câncer se trata do nome genérico de um conjunto de mais de 100 tipos de doenças que possuem em comum o crescimento anormal e desordenado, associado ao potencial invasivo. E tumor caracteriza o aumento tecidual (volume) devido ao crescimento do número de células e processos associados a inflamação (KUMAR; ASTER; ABBAS, 2016).

Desta forma, levando em consideração as ciências biológicas, o câncer é caracterizado como uma doença genética, com comportamento irregular devido às alterações genéticas e epigenéticas complexas, advindas de alterações que podem induzir a formação de neoplasias. Ele pode surgir em qualquer estrutura corporal, sendo constituído por células, que por algum motivo, perderam a capacidade de controlar o seu crescimento (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018).

Diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, que podem envolver estilo e hábitos de vida, estão associados ao desenvolvimento neoplásico. Mutações genéticas e erros aleatórios da replicação do DNA, danos genéticos induzidos, marcas epigenéticas (como metilações do DNA), perdas cromossômicas ou rearranjos estruturais, em resumo, levam a formação do câncer (ALTSHULER et al., 2010). Entretanto, as alterações genéticas e epigenéticas não são os únicos fenômenos que moldam o genoma do câncer; a transformação de uma célula normal em uma célula cancerosa não configura como um evento central para a gênese do câncer.

Ao menos outros dois fatores, intimamente relacionados entre si, podem desempenhar papel crítico: o sistema imune e a seleção evolutiva. A incapacidade do sistema imune de identificar e destruir as células neoplásicas também é primordial e essencial para o desenvolvimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A seleção evolutiva também desempenha esse papel crítico por considerar determinados traços fenotípicos, que podem indicar possível vantagem no microambiente. Por exemplo, uma célula com baixa demanda metabólica pode crescer mais rápido do que uma célula com alta demanda (GRAHAM; SOTTORIVA, 2017).

Logo, a seleção desempenha um papel central na formação e distribuição da frequência de alterações genéticas e epigenéticas dentro do tumor, e conseqüentemente da interação das

células imunes com as células neoplásicas. Além do mais, deve-se considerar que a formação do câncer requer a aquisição de uma série de alterações, mutações e alterações epigenéticas, e que todo esse desenvolvimento culmina em alterações na resposta imune.

Portanto, sendo o câncer uma doença com cerne genético, os genes envolvidos nas transformações das proteínas envolvidas na atividade do ciclo celular auxiliam muito na compreensão da fisiopatologia do câncer. Eles são caracterizados em proto-oncogenes e genes supressores. Os primeiros, em atividade habitual, controlam o processo de diferenciação e divisão mitótica celular, e quando alterados são denominados de oncogenes, podendo levar ao crescimento celular anormal. Os segundos são genes que habitualmente previnem expansão celular descontrolada e quando alterados alteram as proteínas do ciclo celular (ALTSHULER et al., 2010; WINDISCH et al., 2019).

Na última década, o câncer passou a ser considerado um problema de saúde pública, devido à alta incidência e magnitude que alcança a cada ano e à ausência de tratamentos eficazes que possam levar à sua completa remissão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). De acordo com dados da GLOBOCAN, as 10 principais prevalências de tipos de câncer no mundo são em ordem de maior estimativa de casos para a de menor: mama, próstata, cólon e reto, pulmão, colo uterino, estômago, bexiga, corpo uterino, tireoide e rim. Calcula-se que em 2030 a carga global de novos casos será de 21,4 milhões e de 13,2 milhões de mortes, devido em parte ao maior número de idosos na população (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), 2018).

Quando se observa as estimativas brasileiras, espera-se para o triênio 2020-2022 a ocorrência de 625 mil casos/ano (cálculo global corrigido: 685 mil casos/ano), sendo o câncer de próstata o mais comum em pessoas do sexo masculino e o câncer de mama mais comum entre pessoas do sexo feminino, desconsiderando os casos de câncer de pele não melanoma. O aumento dos casos é devido à mudança no perfil demográfico populacional ocasionada pelos novos estilos de vida da população, associados aos recentes processos de urbanização, crescimento industrial e avanços científico-tecnológicos, o que influenciou diretamente no perfil de morbimortalidade (INCA, 2019). As estimativas podem ser verificados na tabela 1.

Frente a esses indícios epidemiológicos há uma maior necessidade de intervenções e incentivos que agreguem ações de pesquisa para o controle do câncer, seja nos estágios iniciais, preventivos e de tratamento. Além de pesquisas que contemplem os mecanismos de desenvolvimento do câncer (teoria da carcinogênese), mecanismos de atuação do sistema imunológico, entre outros, para que se possa estabelecer possíveis intervenções.

**Tabela 1: estimativas câncer (ano 2020)**

<i>Mundo</i>				<i>Brasil</i>			
18 milhões novos casos				625 mil novos casos			
<i>Localização</i>		<i>Casos</i>		<i>Localização</i>		<i>Casos</i>	
Pulmão		2,1 milhões		Pele não melanoma		177 mil	
Mama		2,1 milhões		Mama		66 mil	
Colón/Reto		1,8 milhão		Próstata		66 mil	
Próstata		1,3 milhão		Colón/Reto		41 mil	
Pulmão		30 mil					
<b>Homens</b>		<b>Mulheres</b>		<b>Homens</b>		<b>Mulheres</b>	
<i>Localização</i>	<i>%</i>	<i>Localização</i>	<i>%</i>	<i>Localização</i>	<i>%</i>	<i>Localização</i>	<i>%</i>
Pulmão	14,5	Mama	24,2	Próstata	29,2	Mama	29,7
Próstata	13,5	Colón/Reto	9,5	Colón/Reto	9,1	Colón/Reto	9,2
Colón/Reto	10,9	Pulmão	8,4	Pulmão	7,9	Colo útero	7,4
Estômago	7,2	Colo útero	6,6	Estômago	5,9	Pulmão	6,6
Fígado	6,3			Cav. Oral	5	Tireoide	5,4

O câncer de mama é o mais frequente entre as mulheres do mundo e do Brasil, sendo a maior causa de mortalidade entre as mulheres, perdendo apenas para o câncer de pele não melanoma. 1/3 das mulheres com câncer de mama desenvolvem a doença metastática (síncrona ou metacrônica), o que incide drasticamente na sobrevida global e qualidade de vida (PENTHEROUDAKIS et al., 2006).

Dentre os vários subtipos do câncer de mama, o câncer de mama triplo-negativo (TNBC) representa uma categoria de tumores pouco imunogênicos e são associados a baixíssimas taxas de sobrevivência, além de serem altamente resistentes às imunoterapias atuais. Ele é caracterizado pela ausência de receptores de estrogênio, progesterona e Her2. As intervenções típicas nas pacientes são a quimioterapia neoadjuvante, seguida por remoção cirúrgica e quimioterapia de longo prazo, associada ou não a radioterapia (TELLI, 2016). Porém, tanto as taxas de recorrência quanto as taxas de metástases são altas, e as pacientes podem sofrer graves

efeitos colaterais a longo prazo (HUDIS; GIANNI, 2011; SANTANA-DAVILA; PEREZ, 2010). Logo, uma terapia de controle de crescimento e/ou prevenção, recorrência e/ou metástase, com efeitos colaterais mínimos seria interessante.

## 1.2 Metástases

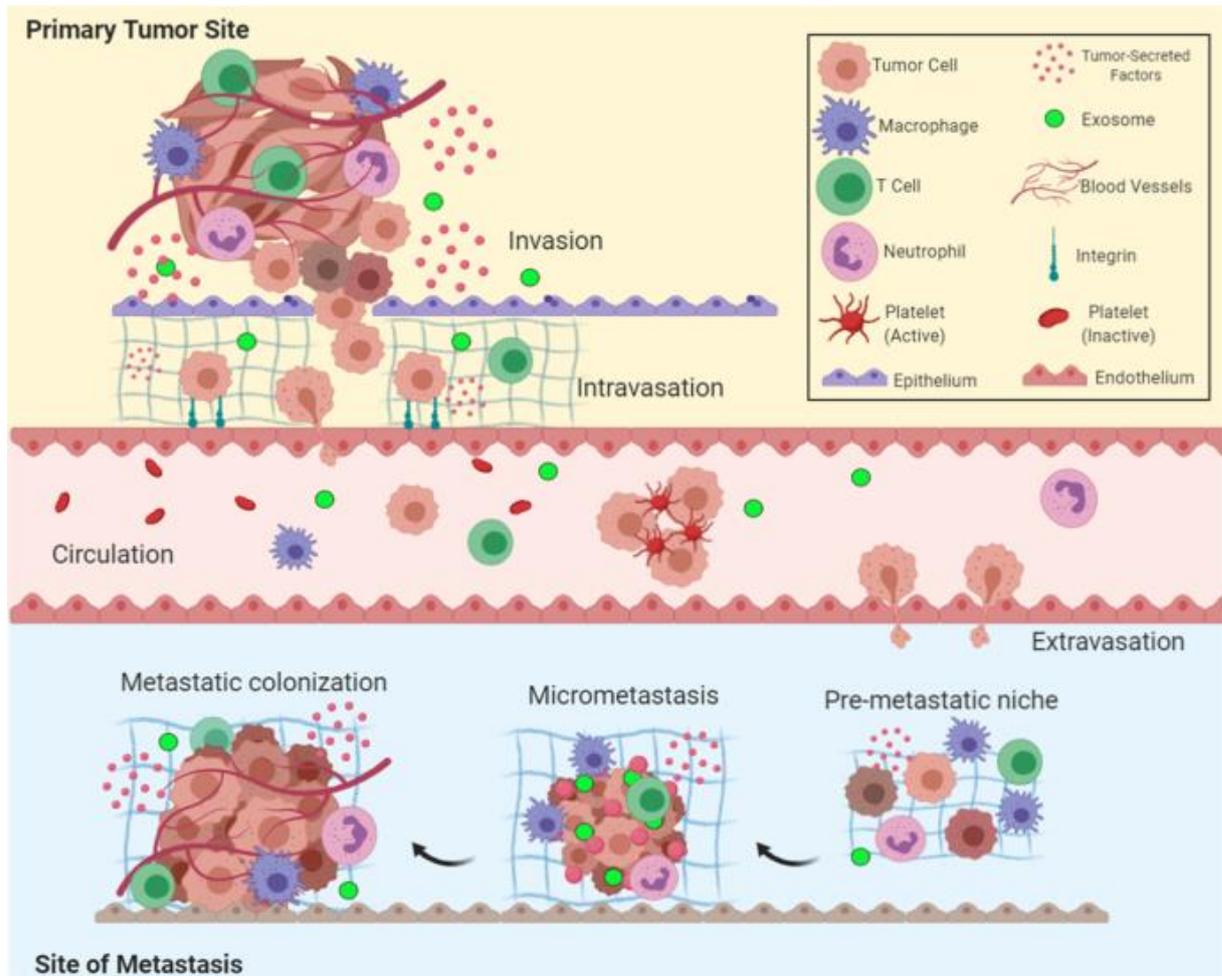
Metástase é um termo utilizado para descrever um processo que promove a disseminação de células transformadas de seu tecido original para outros locais do corpo, e subsequente crescimento de uma massa secundária. Surge de células neoplásicas com alto poder invasivo e capacidade de evasão do tumor primário, invadindo tecidos vizinhos e órgãos distantes (GEIGER; PEEPER, 2009).

Assim, a sobrevivência e manutenção do câncer depende, em sua maior parte, da capacidade metastática e disseminativa das células neoplásicas para outros sítios. A maioria dos pacientes vão a óbito não pelos tumores primários, mas devido às metástases. A redução tumoral representa um fator clínico importante, assim como a diminuição das metástases, o que pode modificar a sobrevida do paciente. Porém, mecanismos e ferramentas que bloqueiam ou reduzem o processo metastático pode ser um adicional para alterar/reduzir as taxas de morte por câncer. O tamanho, a quantidade e a localização das lesões metastáticas influenciam nesse processo (GEIGER; PEEPER, 2009; GROSS et al., 2016).

A metástase se trata de um processo com diversas etapas sequenciais (Figura 1), que atualmente é explicado por dois modelos clássicos: o modelo de progressão linear e o modelo de progressão paralela. O primeiro postula que os clones celulares heterogêneos dentro do tumor primário sofrem mutações e seleção, passando a acumular mudanças mutacionais que permitem a sobrevivência e crescimento em outros nichos. O segundo postula que as células neoplásicas adquirem potencial metastático precoce, mesmo quando a lesão primária é pequena ou indetectável, o que permitiria que diferentes clones celulares de células neoplásicas pudessem ser semeados paralelamente em diferentes nichos secundários (LIANG et al., 2020; PENTHEROUDAKIS et al., 2006). Ou seja, os dois modelos defendem que alterações genéticas ou não, associadas a fatores de seleção no nicho primário sustentam e originam populações celulares heterogêneas com potencial metastático.

Além do mais, à medida que ocorre o crescimento do tumor primário, o processo de angiogênese se desenvolve simultaneamente, como um mecanismo de apoio às necessidades fisiometabólicas do tumor. A nova vascularização possibilita uma rota de saída das células neoplásicas para o sistema circulatório, podendo atingir órgãos como cérebro, pulmão, fígado

e medula óssea, entre outros. A migração/saída das células tumorais se assemelha muito com o processo de migração leucocitária, que é regulado por diferentes fatores de crescimento, receptores, quimiocinas e citocinas. Essas substâncias funcionam como importantes sinalizadores (HUNTER; CRAWFORD; ALSARRAJ, 2008; KIM et al., 2011; LIZOTTE et al., 2016).



**Figura 1. Visão geral de uma cascata metastática.** Ilustração demonstrando as etapas principais do processo metastático, que incluem a invasão, o intravasamento no leito vascular, a circulação, o extravasamento e a colonização no nicho secundário. Fonte: “Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited” (FARES et al., 2020).

Especificamente no câncer de mama metastático, essas moléculas desempenham uma atividade interessante na movimentação/motilidade das células tumorais, atuando em mecanismos de adesão, manutenção, migração e até mesmo proliferação celular. No caso de câncer de mama metastático, o estágio IV é designado como aquele que se espalhou para outras partes do corpo (TSUJI; PLOCK, 2017).

Assim, um tumor metastático em uma parte diferente do corpo é composto de células do câncer de mama do tumor primário. Acredita-se que exista um padrão órgão-específico e as células de câncer de mama possuem preferência por fígado, cérebro, ossos e pulmões. Esses locais expressam fatores de crescimento, citocinas, que possuem vias de sinalização e componentes solúveis que propiciam e subsidiam o comportamento metastático e a implantação do tumor secundário. Ou seja, depende do sítio secundário para a existência de características necessárias para a colonização, assim como a forma do padrão de aptidão das células tumorais circulantes para extravasar barreiras e sobreviver em outros tecidos. Porém, em alguns casos, ocorre de o nicho inicial do câncer de mama nem ser detectado e ocorrer mecanismos que o espalhem a outras partes do corpo (CLARK et al., 2016; KORKAYA; LIU; WICHA, 2011; WU et al., 2017).

No caso das metástases pulmonares e hepáticas, as suas presenças representam um mau prognóstico, incidindo na sobrevida geral dos pacientes de uma forma bastante agressiva, por prejudicarem as funções desses órgãos. Devido à localização anatômica, ambos possuem um grande leito capilar, sendo os locais mais frequentes de metástases de câncer de mama, além de serem nichos propícios por possuírem diversos componentes que sustentam as metástases (HE et al., 2017; KAPLAN; PSAILA; LYDEN, 2006; WU et al., 2017). E a taxa de ocorrência das metástases hepáticas é secundária às pulmonares. Entretanto, a taxa de sobrevida das primeiras é mais pobre (PENTHEROUDAKIS et al., 2006)

As células do câncer de mama se originam de células epiteliais para formar o tumor primário e podem adquirir motilidade celular e formar um tumor secundário invasivo. Assim, são vários os fatores que participam do processo de metástase para esses órgãos e uma sequência de eventos, sejam moleculares ou celulares, são articulados para que ocorra o estabelecimento tumoral com sucesso. Esse processo tem início com a secreção de alguns fatores solúveis pelas células tumorais. As células circulantes ao câncer de mama secretam outras moléculas que permitem o aumento da permeabilidade vascular (SPARC, metaloproteinases, COX2, ANGPTL4, CCL2). Essas substâncias facilitam a transição epitélio-mesênquimal, processo fundamental para as etapas iniciais da metástase, e atuam na morfologia celular e aumento do potencial invasivo e migratório (ADAM et al., 2006; WU et al., 2017).

A hipóxia também pode ser um fator que facilita o crescimento e disseminação de células tumorais com ativação do fator induzível por hipóxia 1 (HIF 1). As metaloproteinases podem melhorar o recrutamento de células derivadas da medula óssea que secretam mais metaloproteinases e Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF). As células imunes

supressoras ainda podem auxiliar, gerando um ambiente imunossuprimido e uma matriz extracelular adequada para a colonização. Ainda pode ocorrer indução de fibroblastos que participam da ativação de diversas vias de sinalização. No caso da colonização do pulmão e fígado, estas são facilitadas por interações do microambiente tumoral, estroma e células imunes (ADAM et al., 2006; KRETSCHMANN; WELM, 2012; SLEEMAN; STEEG, 2010; WU et al., 2017).

Desta forma, a metástase pode ocorrer por meio da ação cooperativa de aglomerados heterogêneos de células tumorais, epiteliais, mesenquimais e imunes. E quaisquer diferenças fenotípicas e genotípicas antes e depois da metástase são criticamente importantes para determinar o mecanismo da metástase, bem como identificar alvos diagnósticos e terapêuticos (CHEUNG; EWALD, 2016; KAPLAN; PSAILA; LYDEN, 2006; TSUJI; IBARAGI; HU, 2009).

### **1.3 Modelos experimentais de tumores de mama com células 4T1**

As pesquisas iniciais que envolviam a fisiopatogênese do câncer de mama eram realizadas em modelos experimentais de camundongos. Neles a indução tumoral era realizada a partir de células de câncer de mama de linhagem humana. Entretanto, esses modelos não mimetizavam o que ocorria em uma mulher com câncer de mama. A metástase e o próprio crescimento tumoral eram pobres e não reprodutíveis, quando comparados aos casos humanos (TAO et al., 2008).

Desta forma, em 1983, *Fred Miller* publicou um trabalho que descrevia uma linhagem de células de câncer de mama, isoladas de camundongos Balb/c, que foram denominadas de 4T1 (carcinoma mamário murino de células 4T1). Nas últimas décadas essa linhagem celular tem sido bastante utilizada, por possuir alto poder tumorigênico e invasivo, apresentando proliferação epitelial maligna, com alto índice mitótico, apoptótico e vários vasos sanguíneos ligados à progressão tumoral (ASLAKSON; MILLER, 1992; LELEKAKIS et al., 1999; YONEDA et al., 2000). Possuem ainda poder metastático para pulmão, fígado, cérebro, ossos, demonstrando atingir os últimos estágios do estadiamento tumoral (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2000; TAO et al., 2008).

O tumor formado pela linhagem 4T1 apresenta diversas características que permitem utilizar este modelo experimental para estudo do câncer de mama humano. Se trata de um modelo singênico (intraespecífico; células tumorais utilizadas são da mesma espécie do animal

de um modelo de metástase espontânea) e a doença metastática de tumores 4T1 se desenvolve de forma espontânea a partir do tumor primário (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2000).

Então, esse modelo se torna de grande valia para o estudo do câncer de mama, por apresentar comportamento similar ao desenvolvido por tumores mamários humanos (se assemelhando ao quadro clínico de tumores de mama triplo negativo) e também no que se relaciona à interação tumor e sistema imune. Além do mais, a utilização de modelos animais e linhagens específicas é essencial para a análise da progressão e avaliação tumoral, graças a importância do microambiente tumoral nas interações deste com o hospedeiro, principalmente no comportamento tumoral e o papel que o sistema imune desempenha (DUPRÉ; REDELMAN; HUNTER, 2007).

#### **1.4 Resposta imunológica aos tumores**

Buscando identificar, neutralizar, e na tentativa de eliminar os diferentes patógenos que possam gerar dano ao organismo, o sistema imunológico tem ajustado e adaptado seus mecanismos frente a diferentes agressões. Ele desempenha um papel relevante, assim como os demais sistemas que compõe o organismo, na prevenção e desenvolvimento dos diversos processos patológicos. No desenvolvimento tumoral, as interações estabelecidas entre células tumorais e componentes do sistema imunológico são complexas, e reagem de maneiras distintas em cada indivíduo. Nesse contexto, o sistema imune ou pode subsidiar o crescimento tumoral, provendo a progressão tumoral e até mesmo a angiogênese, ou pode subsidiar sua inibição, levando à atenuação espontânea (DOUGAN; DRANOFF, 2009).

A transformação neoplásica ocorre em várias etapas e apesar de as células tumorais serem células transformadas oriundas de células do próprio hospedeiro, o sistema imunológico identifica-as como “não próprias” através de mecanismos de detecção de alterações, sejam eles epigenéticos ou genéticos (GARCÍA PAZ et al., 2014; REIS et al., 2018). Essa premissa é denominada de *immunosurveillance* (teoria da vigilância imunológica). Ela teoriza sobre a capacidade do sistema imune em identificar e destruir células transformadas através dos seus determinantes antigênicos; prediz que o sistema imune é responsável pelo monitoramento e controle das células tumorais, processo crucial de proteção do hospedeiro na inibição da carcinogênese (BURNET, 1970; REIS et al., 2018).

Os componentes do sistema imune trabalham em conjunto: sistema imune inato e sistema imune adaptativo. Logo, os mecanismos imunes de eliminação tumoral envolvem as duas imunidades, garantindo a ocorrência de um sistema integrado de defesa no hospedeiro,

agindo de forma recíproca. Desta forma, a imunidade inata atua como linha de defesa inicial frente as células tumorais, atuando através das células epiteliais, monócitos, macrófagos, células dendríticas, leucócitos polimorfonucleares, células *Natural Killer* (NK) e outras subpopulações de linfócitos, que unem a resposta inata à adaptativa, como os linfócitos T  $\gamma\delta$ . Na imunidade adaptativa atuam principalmente os linfócitos T auxiliares e citotóxicos (T CD4+ e T CD8+, respectivamente) e linfócitos B, tipos celulares que apresentam maior especificidade contra as células tumorais. Porém, algumas populações de células, como os macrófagos, células dendríticas, células NK e neutrófilos, mesmo sendo consideradas células da imunidade inata, desempenham papel importante na imunidade adaptativa também (LOOSE; VAN DE WIELE, 2009; MIRZA et al., 2019; SENGUPTA et al., 2010; VAHIDIAN et al., 2019).

De forma resumida, o processo se inicia com mecanismos da imunidade inata. As células imunes reconhecem a presença das células tumorais, que graças ao processo de formação do tumor, geram danos teciduais locais, induzindo uma resposta inflamatória essencial para o recrutamento celular. As células NK são estimuladas a produzir interferon do tipo *gamma* (IFN- $\gamma$ ), citocina capaz de induzir a morte das células tumorais, associado com a liberação de seus grânulos de perforinas e granzimas. As NKs dependem do equilíbrio de seus receptores de ativação e inibição para que possam ser ativadas em associação com a interleucina 12 (IL-12) e o IFN- $\gamma$  (TORREZINI; ATHANAZIO, 2008; VAHIDIAN et al., 2019).

Os macrófagos, células fagocíticas com capacidade de apresentação antigênica, possuem papel dicotômico na resposta antitumoral a depender do seu perfil de diferenciação. Os macrófagos tipo 1 liberam enzimas lisossomais tóxicas, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, substâncias que promovem a destruição das células tumorais. Ainda são produtores de fator de necrose tumoral tipo *alpha* (TNF- $\alpha$ ) e outras citocinas estimuladoras do sistema imune, como IL-2, IL-12 e IL-18. Os macrófagos tipo 2 podem atuar a favor do crescimento tumoral, através da secreção de VEGF e fator de transformação do crescimento do tipo *beta* (TGF- $\beta$ ), capazes de promover a angiogênese tumoral (DHABEKAR; DANDEKAR; KINGAONKAR, 2011; LEWIS; POLLARD, 2006; NIELSEN; SCHMID, 2017; OSTUNI et al., 2015).

Juntas, as células NK e os macrófagos são capazes de ativar um ao outro através de uma via de reciprocidade que conta com a participação de IFN- $\gamma$  e IL-12. Então, a morte das células tumorais ocorre via apoptose através da produção de oxigênio reativo e intermediários de nitrogênio. Quimiocinas também são produzidas, exercendo papel de prevenção da angiogênese, e outras moléculas solúveis, como TNF- $\alpha$  e demais citocinas, desempenham papel

de auxílio à atividade destas células e de outros mecanismos (CRUVINEL et al., 2012; DHABEKAR; DANDEKAR; KINGAONKAR, 2011).

As células dendríticas, células apresentadoras de antígenos (APC) profissionais, possuem uma morfologia que lhes dão capacidade de iniciar e estimular as respostas imunes adaptativas. Elas são capazes de estabelecer uma ponte entre os mecanismos da imunidade inata e a adaptativa (PALUCKA et al., 2011).

Na imunidade adaptativa ocorre uma maior especificidade da resposta antitumoral, pois durante a resposta inata o ambiente é organizado para a atuação e elaboração dessa resposta mais específica. As interações entre as APCs e as citocinas produzidas são um dos fatores que garantem essa especificidade. Assim, as células T são ativadas para as suas diferentes atuações pelo reconhecimento do antígeno de uma célula tumoral pelo receptor de célula T (TCR) e demais mecanismos (MIRZA et al., 2019).

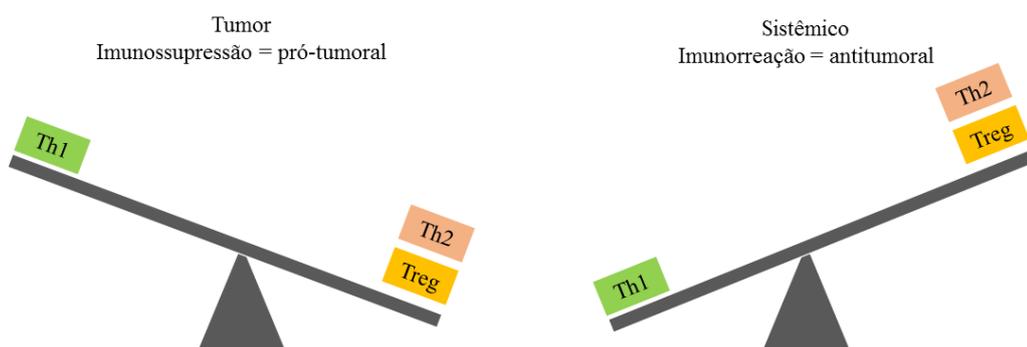
Portanto, os antígenos tumorais e/ou células tumorais a serem reconhecidos pelo TCR são apresentados via complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*), expresso na superfície das células dendríticas, aos linfócitos T CD4+ e T CD8+. O MHC de classe I apresenta aos linfócitos T CD8+, e o MHC de classe II aos linfócitos T CD4+. Essas proteínas desempenham um papel importante no reconhecimento antigênico, já que o linfócito T apenas reconhece o antígeno se eles forem apresentados pelo MHC ao TCR. A apresentação culmina na diferenciação dos linfócitos T CD8+ naïve em linfócitos T citotóxicos (CTL) e dos linfócitos T CD4+ naïve (Th) em subpopulações efetoras, as Th1, Th2, Th17, Th9, Th22 e T regulatória (Treg) (MIRZA et al., 2019; TORREZINI; ATHANAZIO, 2008).

Os linfócitos T auxiliares possuem capacidade de diferenciação, formando fenótipos específicos que são determinados pela natureza do antígeno, microambiente, citocinas, moléculas coestimulatórias, entre outros aspectos (KIDD, 2003). Na figura 2 é possível visualizar as citocinas que estão envolvidas nos mecanismo de diferenciação (citocinas essas que são secretadas por células dendríticas, macrófagos e demais células), moléculas e fatores de transcrição que são ativadas frente a estímulos antigênicos (IVANOVA; OREKHOV, 2015; RAPHAEL et al., 2015).

Portanto, não apenas o sinal gerado pela apresentação é o responsável pela ativação e diferenciação: o reconhecimento antigênico via MHC é o primeiro sinal. O segundo sinal é gerado pela interação entre as moléculas coestimulatórias, expressas na superfície das células dendríticas, com receptores na superfície dos linfócitos. Ainda há um terceiro sinal, que ocorre pelo estímulo de citocinas (BOUDREAU et al., 2011).



tentativa de esquivar da resposta imunológica, podendo reverter mecanismos de ataque a seu favor. A natureza certa destes tipos de interações ainda não está elucidada em sua plenitude. Assim, alguns estudos buscaram e buscam identificar os mecanismos de escape associados ao crescimento tumoral, tanto os que envolvem as células tumorais quanto os que envolvem os antígenos associados ao tumor, e ainda o próprio sistema imunológico do hospedeiro (ALMAND et al., 2000; FONSECA; DRANOFF, 2008; GARCÍA PAZ et al., 2014).



**Figura 3. Papel limiar do sistema imunológico na resposta antitumoral.** Os subtipos celulares imunes, a depender do perfil de ativação local e sistêmico, podem favorecer ou inibir o crescimento tumoral. Fonte: do autor.

### 1.5 Fígado e resposta imune

Mesmo não sendo um órgão linfóide secundário clássico, como linfonodo e baço, o fígado representa um local único para o desenvolvimento de resposta imune adaptativa. Ele medeia atividades de diversificado repertório de células da resposta imune e de outras células não hematopoiéticas. Além dos hepatócitos, há considerável riqueza de APCs, NK, célula T *Natural Killer* (NKTs), linfócitos T, B, neutrófilos, eosinófilos e componentes do sistema complemento (KUBES; JENNE, 2018). Entretanto, o repertório das células imunes hepáticas e a atividade que desempenham não é clara nos processos fisiopatológicos.

Alguns trabalhos mencionam que a resposta imune adaptativa hepática pode não ser gerada de forma eficiente e direta, como em linfonodos e baço (HINES; SON; KREMER, 2010). Porém, o fígado é rico em linfócitos ( $10^{10}$  células) e a grande maioria são linfócitos T (em maior parte linfócitos T auxiliares), NK, NKT e apenas 5% de linfócitos B. Mesmo que sejam populações semelhantes às que são encontradas na circulação periférica, esses linfócitos diferem nas proporções e padrões de atuação, e seus papéis permanecem incertos. A composição e localização dessas populações podem mudar as condições inflamatórias, e isso associado a posição anatômica e a vasculatura bem distinta, fazem com que o fígado tenha

capacidade única de trocar informações imunológicas continuamente (BOGDANOS; GAO; GERSHWIN, 2013; CHAUDHRY; EMOND; GRIESEMER, 2019).

Mesmo sendo descrito como um local de ativação de célula T, no fígado, esse processo ocorre inclinado a um ambiente tolerante. Isso ocorre devido a exposição constitutiva de produtos microbianos ao qual o órgão é submetido, que modula de forma negativa as moléculas coestimulatórias (BERTOLINO; MCCAUGHAN; BOWEN, 2002; SANA et al., 2014). O fato é que mesmo sendo tolerogênico, o sistema imune do fígado deve ser capaz de gerar respostas rápidas e controladas, inclusive em relação às células tumorais (PROTZER; MAINI; KNOLLE, 2012).

No combate às neoplasias, o objetivo das imunoterapias é atingir a doença com um impacto mínimo nos tecidos normais, e espera-se que possam gerar resposta imune ativa específica contra o tumor (local e sistêmica), além de capacidade de memória celular, para proteção contra possíveis recorrências (ALY, 2012). Sendo o fígado um local comum para sítios secundários tumorais, é esperado que algumas imunoterapias possam atuar no crescimento, prevenção e disseminação acelerada. Um exemplo que pode ser associado é o carcinoma mamário triplo negativo, que apresenta um perfil agressivo, evolução rápida, alto risco de recorrência e padrão metastático visceral (cérebro, fígado e pulmão), alta taxa de óbito, resistência a terapia e resistente a imunoterapias por ser pouco imunogênico (BOYLE, 2012).

## **1.6 Células dendríticas e imunoterapia**

As células dendríticas são APCs relacionadas ao sistema imune inato, modulando a resposta imune contra microrganismos, autoimunidade e resposta imune antitumoral. Tem origem em precursores hematopoiéticos pluripotentes da medula óssea. São classificadas em convencionais e plasmocitóides (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

As convencionais migram para órgãos linfoides periféricos. Possuem como fatores de transcrição PU.1, Ikaros, IRF8, RelB, Batf 3 e expressão na sua superfície CD11c e MHC II, não sendo nenhum deles exclusivos para definição de linhagem. Porém são essenciais para a ativação da resposta imune antitumoral. Já as plasmocitóides são caracterizadas pela expressão de CD11c, MHC II, CD45R, Siglec-H e Bst2, e exercem função imune antiviral por meio de síntese de IFN- $\alpha$ . Sua disfunção no câncer tem sido associada ao aumento de supressão da resposta imune antitumoral (MITCHELL; CHINTALA; DEY, 2018; PALUCKA et al., 2011).

Alguns estudos ainda têm demonstrado que células dendríticas podem diferenciar de monócitos, as Células Dendríticas Derivadas de Monócitos (MoDCs). Os monócitos em

condições específicas podem se diferenciar em macrófagos, osteoclastos e células dendríticas. As MoDCs possuem fenótipo semelhante às células dendríticas convencionais: expressam CD11c, MHC II, CD11b e CD24. Podem ser diferenciadas *in vitro* sob estimulação de Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF, do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) e IL-4, sendo o mesmo processo possível de ser realizado em células de medula óssea murina (KUSHWAH; HU, 2011; LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2005; MILDNER; JUNG, 2014; PALUCKA et al., 2011). Assim, os métodos de diferenciação de células dendríticas *in vitro* são uma importante ferramenta, sendo empregada em imunoterapia tumoral e contra doenças infecciosas (LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2005).

A imunoterapia com células dendríticas é utilizada no tratamento do câncer visando regular a atividade de linfócitos T CTL tumor-específicos e células NK que podem eliminar células malignas. Mesmo em caso de doença metastática, as respostas antitumorais específicas podem ser observadas em mais de 70%, por exemplo, em pacientes com câncer de próstata e mais de 60% em pacientes com câncer de células renais (ANGUILLE et al., 2014).

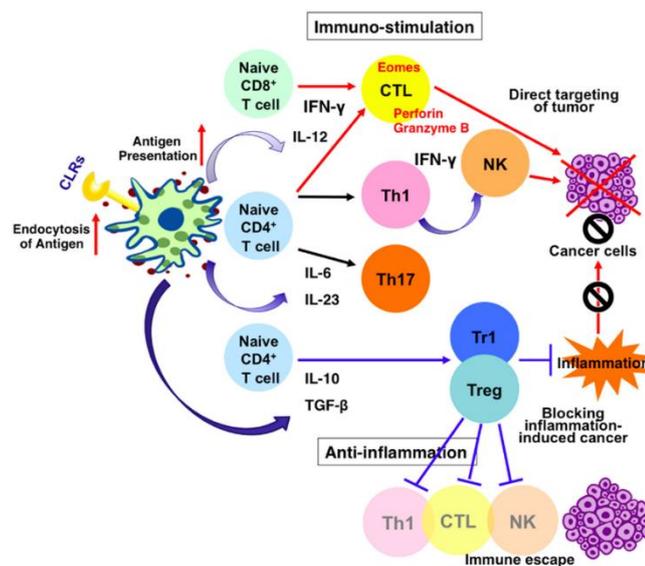
A resposta imunológica mediada por uma célula dendrítica inicia-se com a apresentação antigênica via molécula de MHC aos linfócitos T naïve, nos órgãos/tecidos linfóides secundários. Quando imaturas, as células dendríticas podem apresentar autoantígenos aos linfócitos T, levando a um estado de tolerância imune, com a diferenciação de linfócitos Treg ou até mesmo a deleção de células T. Por outro lado, as células dendríticas maduras podem ativar células T específicas que possuem diferentes funções. Desse processo que resulta os diferentes fenótipos de linfócitos T auxiliares (Th1, Th2, Th17, etc) e ativação de T CTL. As células dendríticas ainda podem interagir com componentes do sistema imune inato, como células NK, macrófagos e mastócitos, de forma indireta (PALUCKA et al., 2011; PALUCKA; BANCHEREAU, 2012, 2013).

A partir dessa interação são observados diversos parâmetros de atuação: os linfócitos Th1 são diferenciados por estimulação de IL-12, caracterizados pela expressão de STAT-4 e Tbet. Quando ativados, células Th1 secretam citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12, que têm a capacidade de potencializar as respostas de outras células importantes para resposta imune antitumoral (já mencionado anteriormente), como T CTL, NK e macrófagos (PARDOLL; TOPALIAN, 1998). Os Th2 são caracterizados pela expressão de STAT-6 e GATA-3 e atuam inibindo a atividade de T CTL (pela produção de IL-4). Esse panorama contribui para o desenvolvimento tumoral (LOOSE; VAN DE WIELE, 2009).

Os Th17 possuem um papel um pouco controverso, pois podem atuar tanto na progressão tumoral (via secreção de IL-17) ou atuar na resposta imune antitumoral com o recrutamento de T CTL e NK para o microambiente tumoral e se diferenciar em Th1. São células caracterizadas por expressão de STAT-3 e ROR $\gamma$ t, e secreção de IL-17, IL-22 e IL-21 (CHANG et al., 2016; LIN et al., 2015; ZENG et al., 2018). As Treg se caracterizam pela expressão de FoxP3, relacionam-se com manutenção da autotolerância, prevenção de doenças autoimunes (via secreção IL-10 e TGF- $\beta$ ). No tumor, TGF- $\beta$  promove a inibição de NK e T CTL, favorecendo a progressão tumoral (SAITO et al., 2016; SAKAGUCHI et al., 2010).

Os T CTL são as principais células da resposta imune antitumoral. Produzem granzimas e perforinas (enzimas citolíticas) que induzem apoptose nas células tumorais (TOSOLINI et al., 2011). Além do mais, conforme comentado acima, as células dendríticas ainda podem participar da ativação de NK (célula da imunidade inata), através da secreção de IL-12 e IFN- $\gamma$ . É interessante que ambas citocinas podem ser secretadas tanto pelas células dendríticas, quanto por alguns subtipos de linfócitos. Quando em atividade, as células NK secretam grânulos com granzimas e perforinas que levam a indução da morte celular (VAHIDIAN et al., 2019).

Apesar dessa intrincada rede, em que as células dendríticas se demonstram como eixos centrais (Figura 4), associado ao fato de a imunoterapia com células dendríticas diferenciadas *in vitro* demonstrarem resultados clínicos satisfatórios, os resultados ainda são bastante restritos. Isso demonstra a necessidade de compreensão dessa ferramenta nas interações espaço-tempo dos mecanismos e aperfeiçoamento das estratégias terapêuticas, incluindo o seu papel na questão da profilaxia.



**Figura 4. Células dendríticas e a resposta imunológica antitumoral.** Mecanismos de ativação das células imunes por células dendríticas. Fonte: “Targeting C-Type Lectin Receptors for Cancer Immunity” (YAN et al., 2015).

## 2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Os casos de câncer vêm cada vez mais aumentando na população mundial. Apesar dos avanços observados nas fases de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento, como a radioterapia e quimioterapia, não é sempre que ocorre um efeito antitumoral que erradique a doença. Desta forma, é evidente a importância de novos tratamentos que apresentem menores efeitos adversos e melhore a qualidade de vida dos pacientes. E se possível, a existência de mecanismos eficientes na prevenção, combate e controle da doença.

O desenvolvimento de novas formas de tratamento e/ou prevenção é de extrema importância para o processo do combate às neoplasias. Por isso o interesse em analisar quais os efeitos imunológicos da vacina de células dendríticas como profilaxia utilizando modelos experimentais com linhagens de carcinoma mamário induzido por 4T1.

A vacina de células dendríticas tem sido utilizada em diversos modelos de estudo de tratamento ao câncer, graças ao seu elevado potencial em estimular os linfócitos T, e por ser ponte entre os mecanismos de respostas imunes inatas e adquiridas. A literatura demonstra presença insignificante de efeitos colaterais e resultados promissores na estimulação desse tipo celular. Os mecanismos de respostas antitumorais fornecidas pelos linfócitos T efetores gerados pela vacina garantem melhores ações no tecido neoplásico alvo, permitindo regressão tumoral e produzindo células de memória que geram a proteção em casos de recidivas (ANGUILLE et al., 2014; PALUCKA; BANCHEREAU, 2012).

Para aumentar o resultado clínico das vacinas devem ser observados: condições da cultura das células dendríticas, escolha das subpopulações de células dendríticas, estágio de maturação do preparado de células dendríticas, meios de cultura de antígenos, via de administração, dose e frequência da vacinação, e outras variáveis (PALUCKA; BANCHEREAU, 2013). Diversos protocolos têm sido desenvolvidos na tentativa de melhorar o processo de obtenção e amadurecimento das células dendríticas *in vitro*. Esses trabalhos buscam desenvolver métodos para a adequada obtenção de fenótipos e genótipos úteis de células dendríticas para o desenvolvimento de imunoterapias eficazes. No IPON trabalhos são realizados nesse sentido e conta com uma patente (PCT BR201 / 000416) sobre maturação e obtenção de células dendríticas (ALEIXO; MICHELIN; MURTA, 2014; LOPES; MICHELIN; MURTA, 2017).

No IPON ainda são realizadas análises da eficácia do tratamento com vacina de células dendríticas em camundongos, induzidos com linhagens tumorais de câncer de mama, e em humanos. Essas análises têm evidenciado que os alvos tratados com a vacina de células

dendríticas estimula respostas imunes, apresentando uma maior concentração de citocinas do perfil Th1 (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), quando comparada com as citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-10) e Treg (TGF- $\beta$ ) e aumento do percentual total de linfócitos T pós imunoterapia (MATIAS et al., 2013; RODRIGUES et al., 2011).

Considerando que as células dendríticas apresentam grande potencial de mediar a ativação de uma resposta imune específica ao tumor, especialmente através da ativação de linfócitos Th1, T CTL e NK (forma indireta), o intuito deste estudo é avaliar como um tratamento profilático, utilizando vacina de células dendríticas, pode contribuir para a compreensão dos mecanismos e efeitos do sistema imunológico frente à resposta antitumoral, não apenas no microambiente tumoral. Espera-se que a aplicação da vacina como medida preventiva seja também capaz de induzir uma resposta antitumoral sistêmica e local, com ativação do perfil Th1 capaz de promover a eliminação das células neoplásicas.

Na literatura são escassos estudos que demonstrem a vacina de células dendríticas como medida preventiva contra neoplasias (MARKOV et al., 2015; SHANGGUAN et al., 2020). Por isso a importância em elucidar a abrangência dos mecanismos e efeitos, considerando a contribuição para elucidação de quais mecanismos do sistema imune são recrutados para minimizar o desenvolvimento tumoral, e se possível, para introduzir e sustentar uma discussão.

Nesta perspectiva, o uso de camundongos é de suma importância para a elaboração e melhor avaliação desses parâmetros, pois estes são primordiais para o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e também terapêuticos. Em humanos, esses procedimentos são de difícil análise pelo fato de esse grupo ser bastante diferenciado e heterogêneo, enquanto que os camundongos que serão usados nesse trabalho possuem características isogênicas, o que possibilita uma reprodutibilidade fidedigna dos processos, que são importantes e essenciais nessas fases iniciais da pesquisa. Outro fato considerável é o grau de invasão dos procedimentos que envolvem essa pesquisa, o que torna a manipulação complexa e inviável em humanos.

Portanto, a hipótese desse trabalho foi de que a vacina de células dendríticas aplicada de forma profilática pode gerenciar resposta imunológicas antitumorais, mantendo a resposta após sua administração, e contribuindo para a compreensão dos mecanismos e efeitos do sistema imunológico frente à resposta antitumoral.

### 3. OBJETIVOS

Analisar a influência da profilaxia com vacina de célula dendríticas, obtidas e diferenciadas de camundongos, sobre alguns mecanismos imunológicos que são associados a resposta imunológica antitumoral.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Verificar a influência da profilaxia com vacina de células dendríticas na taxa de crescimento tumoral de camundongos Balb/c induzidos ao carcinoma mamário pela linhagem celular 4T1.
- Analisar o efeito da profilaxia com vacina de células dendríticas na presença de metástases hepáticas e pulmonares em camundongos Balb/c induzidos ao carcinoma mamário pela linhagem celular 4T1.
- Avaliar o efeito da profilaxia com vacina de células dendríticas nas as populações de linfócitos T auxiliares (CD3, CD4, T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t e FoxP3) e T citotóxicos (CD3 e CD8), assim como algumas citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12, IL-17 e TNF- $\alpha$ ) no fígado e tumores de camundongos Balb/c induzidos ao carcinoma mamário pela linhagem celular 4T1.
- Avaliar o efeito da profilaxia com vacina de células dendríticas nas populações de linfócitos T totais, T auxiliares (CD3 e CD4) e T citotóxicos (CD3 e CD8) no baço de camundongos Balb/c induzidos ao carcinoma mamário pela linhagem celular 4T1.
- Analisar/dosar a influência da profilaxia com vacina de células dendríticas na resposta do sistema imunológico antitumoral, pelo estudo da cinética de produção de citocinas (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ) induzidas por LPS, no sobrenadante de cultura de células esplênicas.