

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE PATOLOGIA  
BÁSICA E EXPERIMENTAL

POLYANA BARBOSA SILVA

**ALTERAÇÕES EM LINFÓCITOS T<sub>Dcs</sub> E NA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS  
COESTIMULATÓRIAS, DE APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS E NA SÍNTESE DE  
FATOR DE NECROSE TUMORAL – ALPHA E INTERLEUCINA – 12 INDUZIDAS  
POR CÂNCER DE MAMA**

UBERABA-MG  
2016

POLYANA BARBOSA SILVA

**ALTERAÇÕES EM LINFÓCITOS T<sub>DCs</sub> E NA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS  
COESTIMULATÓRIAS, DE APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS E NA SÍNTESE DE  
FATOR DE NECROSE TUMORAL – ALPHA E INTERLEUCINA – 12 INDUZIDAS  
POR CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, área de concentração Patologia Básica e Experimental, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Antoniazi Michelin

UBERABA-MG  
2016

POLYANA BARBOSA SILVA

**ALTERAÇÕES EM LINFÓCITOS T<sub>DCs</sub> E NA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS  
COESTIMULATÓRIAS, DE APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS E NA SÍNTESE DE  
FATOR DE NECROSE TUMORAL – ALPHA E INTERLEUCINA – 12 INDUZIDAS  
POR CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, área de concentração Patologia Básica e Experimental como requisito para obtenção do Título de Mestre sob orientação do Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta. Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Antoniazi Michelin.

Dissertação aprovada em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Professor Orientador: Dr. Eddie Fernando Candido Murta  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Profa. Dra. Renata Margarida Etchebehere  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Prof. Dr . Hélio Humberto Angotti Carrara  
Universidade Federal de Uberlândia

## **DEDICATÓRIA**

...À Deus, por ter me concedido saúde e a oportunidade de concretizar mais uma etapa importante para minha evolução intelectual e moral. .

...Aos meus pais Denilson Fernandes Silva e Maria Abadia Barbosa, que não mediram esforços para que eu realizasse mais esse sonho, sempre ao meu lado, me apoiando, aconselhando e principalmente tendo muita paciência...Amor incondicional por vocês...

...A minha irmã Kênya Barbosa Silva, agradeço pelas permanentes orientações, amizade, companheirismo... e ao meu irmão de criação Davi Soares Morro Silva...

...Aos meus orientadores professores Dr. Eddie Fernando Cândido Murta e Dra. Márcia Antoniazi Michelin, por ter me dado a oportunidade de crescimento intelectual, pelos ensinamentos, orientações e confiança em mim depositada.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, por cada instrução, palavras de incentivo, críticas construtivas que com certeza contribuíram para o meu desenvolvimento tanto profissional, intelectual e pessoal.

Aos colegas do Curso de Pós-graduação e amigos do Laboratório do IPON, pela amizade, companheirismo, em especial: Cláudio José Silva, Jéssica Ferreira Vieira, Angela Maria Moed Lopes, Renata Moreira, Carolina Guissoni, Millena Prata, Letícia Montes Stark, Tauana Christina Dias, Saulo Fernando Moreira da Silva, Larissa Marinelli, Luan Andrade, Alessandra Cunha, Fabiano Mundim, Eduardo Rodovalho, Thiago Mantello, André Adriano Aleixo Rocha, Chambertan Souza Desidério, Andjara Cury.

Aos colegas de Iniciação Científica e Trabalho de Conclusão de Curso, pela amizade, em especial: Ananda, Lázaro, Raphael, Laís, Isadora e Rodrigo.

Aos secretários do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Tuania e André.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), agradeço os recursos financeiros destinados ao desenvolvimento desta pesquisa.

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta aos limites do seu tamanho original...ela cresce.”*

(Albert Einstein)

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>RESUMO</b> .....                                   | 09 |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                 | 10 |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....                         | 11 |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....                         | 12 |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....         | 13 |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                            | 16 |
| <b>1.1 Câncer</b> .....                               | 16 |
| <b>1.2 Câncer de Mama</b> .....                       | 16 |
| <b>1.3 Modelos Experimentais Câncer de Mama</b> ..... | 18 |
| <b>1.4 Resposta Imune a Tumores</b> .....             | 18 |
| 1.4.1 Células dendríticas e Resposta Antitumoral..... | 19 |
| 1.4.2 Células T e Resposta Antitumoral.....           | 20 |
| <b>1.5 Células T<sub>DC</sub></b> .....               | 21 |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....                         | 24 |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....                             | 26 |
| 3.1 Objetivo Geral.....                               | 26 |
| 3.2 Objetivos Específicos.....                        | 26 |
| <b>4. HIPÓTESE</b> .....                              | 28 |
| <b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                   | 30 |
| 5.1 Animais.....                                      | 30 |
| 5.2 Grupos Experimentais.....                         | 30 |
| 5.3 Indução de Tumor com Células 4T1.....             |    |
| 5.4 Coleta de Células Esplênicas .....                | 31 |
| 5.5 Citometria de fluxo.....                          | 32 |
| 5.6 Análise Estatística.....                          | 33 |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| <b>6.</b> | <b>RESULTADOS</b> .....   | 35 |
| 6.1       | Células T <sub>DC</sub> em camundongos saudáveis e com câncer de mama ..... | 35 |
| 6.2       | Redução de células T <sub>DC</sub> em camundongos com tumor.....            | 37 |
| <b>7.</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | 43 |
| <b>8.</b> | <b>CONCLUSÃO</b> .....  | 49 |
|           | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 51 |
|           | <b>ANEXO</b> .....  | 57 |



## RESUMO

Os componentes do sistema imunológico têm a capacidade de interagir entre eles, para promover o desenvolvimento de uma resposta imune adequada. Algumas das suas células parecem sobrepor-se, em termos de funções e marcadores, como a população de células T<sub>DC</sub>, combinando as características de células T e células dendríticas. **Objetivos:** caracterizar as T<sub>DCs</sub> esplênicas obtidas de camundongos saudáveis e com tumores mamários induzidos por 4T1 avaliando a expressão de moléculas apresentadora de antígeno, moléculas coestimulatórias e citocinas. **Materiais e métodos:** As células do baço de camundongos Balb/c saudáveis e com tumores foram avaliadas para a expressão de CD3, CD4, CD25, CD11c, CD11b, CD80, CD86, CHPII e também para a presença de citocinas IL-12 e TNF- $\alpha$ . Todos os experimentos realizados em triplicata biológica. **Resultados e Discussão:** A presença de células T<sub>DC</sub> em camundongos com tumores mamários induzidos por 4T1 (grupo experimental) diminuiu significativamente em moléculas de apresentação de antígeno ( $p=0,0002$ ), células positivas para IL-12 ( $p = 0,0260$ ) e também para o marcador de células proliferação ( $p=0,0001$ ) em comparação com os camundongos saudáveis. **Conclusão:** observou-se que os marcadores pesquisados e as quantidades de T<sub>DCs</sub> em camundongos foram reduzidos na presença de tumores. Mais estudos são necessários para a compreensão dos efeitos destas células principalmente no microambiente do tumor, o que pode sugerir novas alternativas de terapias antitumorais.

**Palavras-chave:** Câncer de mama, células T<sub>DC</sub>, linfócitos T, células dendríticas.

## ABSTRACT

The components of the immune system have the ability to interact between them, to promote the development of an appropriate immune response. Some of its cells seem to overlap in terms of functions and markers, as the population of T<sub>DC</sub> cells, combining characteristics of T cells and dendritic cells. Objectives: the characterization of splenic T<sub>DCs</sub> obtained from healthy or breast tumor-induced 4T1 mice, evaluating the expression of antigen presenting and/or costimulatory molecules, and cytokines. Materials and Methods: The spleen cells from healthy and with tumors Balb/c mice were evaluated for expression of CD3, CD4, CD25, CD11c, CD11b, CD80, CD86, MHCII and also for the presence of cytokines IL-12 and TNF-alpha. All the experiments were made in biological triplicate. Results and discussion: the presence of T<sub>DC</sub> cells in mice with the tumor-induced 4T1 (experimental group) decreased significantly in antigen presentation molecules ( $p = 0.0002$ ), cells positive for IL-12 ( $p = 0.0260$ ) and for marker of cell proliferation ( $p = 0.0001$ ) in comparison with the healthy mice. Conclusion: we observed that markers and quantities of T<sub>DCs</sub> in mice were reduced in the presence of tumors. More studies are needed for the understand the effects of these cells mainly on the tumor microenvironment, which may suggest new alternatives of antitumor therapies.

**Keywords:** Breast cancer, TDC cells, T cells, dendritic cells.

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1-** Representação do desenho do estudo, que mostra a indução de tumores com linhagem celular 4T1 e período de observação.....31
- Figura 2-** Retirada de baço de camundongo.....32
- Figura 3-** Porcentagem de células e Média de Intensidade de Fluorescência de células CD3<sup>+</sup> positivas para marcadores de células dendríticas e moléculas coestimulatórias.....35
- Figura 4-** Expressão em células linfocitárias que expressam moléculas de CD3<sup>+</sup>/TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/IL-12<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>/CD25 do marcador CD11c<sup>+</sup>.....37
- Figura 5-** Expressão em células linfocitárias que expressam moléculas de CD3<sup>+</sup>/TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/IL-12<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>/CD25 do marcador CD11b<sup>+</sup>.....39

**LISTA DE TABELAS**

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Divisão dos grupos experimentais de acordo com a administração de 4T1..... | 30 |
| Tabela 2 – Valor de p da porcentagem de células (% GATE) .....                        | 41 |
| Tabela 3 – Valor de p da Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) .....            | 41 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|                     |   |
|---------------------|---|
| %                   | Porcentagem   |
| °C                  | Grau <i>Celsius</i>   |
| 4T1                 | <i>Cell line selected from the 410.4 tumor</i>                |
| µL                  | Microlitro  |
| APCs                | Células Apresentadoras de Antígenos                           |
| BCRA1               | <i>Breast Cancer Type 1</i>                                   |
| BCRA2               | <i>Breast Cancer Type 2</i>                                   |
| CD                  | Células Dendríticas   |
| CD 4                | Cluster of Differentiation 4                                  |
| CD 8                | Cluster of Differentiation 8                                  |
| CD40                | Cluster of Differentiation 40                                 |
| CD40L               | Cluster of Differentiation 40 Ligante                         |
| CD80                | Cluster of Differentiation 80                                 |
| CD86                | Cluster of Differentiation 80                                 |
| CEUA                | Comitê de Ética em Uso de Animais                             |
| CHP                 | Complexo de Histocompatibilidade Principal                    |
| CNPq                | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| CTL                 | Citotóxico  |
| FAPEMIG             | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais       |
| FITC                | <i>Fluorescein Conjugate</i>                                  |
| Flt3L               | Tirosina Quinase 3 Semelhante a FMS ligante                   |
| IFN                 | Interferon  |
| IFN- $\alpha/\beta$ | Interferon tipo 1 – alfa/beta                                 |
| IFN- $\gamma$       | Interferon gama   |
| IL                  | Interleucina  |
| IL-2                | Interleucina 2  |
| IL-6                | Interleucina 6  |
| IL-12               | Interleucina 12   |

|                     |  |
|---------------------|--|
| IL-18               | Interleucina 18                              |
| INCA                | Instituto Nacional do Câncer                 |
| LCMV                | <i>Lymphocytic choriomeningitis virus</i>    |
| mCD                 | Células Dentríticas mielódes                 |
| MDSC                | <i>myeloid-derived suppressor cells</i>      |
| mg                  | Miligramas                                   |
| mL                  | Mililitros                                   |
| NK                  | <i>Natural Killer</i> (Assassinas Naturais)  |
| OMS                 | Organização Mundial de Saúde                 |
| PBS                 | Solução Salina Tamponada com Fosfato         |
| pCD                 | Células Dentríticas plasmocitóides           |
| PD-1                | Receptor de Morte Programada 1               |
| PD-L1/2             | Ligante do Receptor de Morte Programada 1    |
| PE                  | <i>Phycoerythrin</i>                         |
| PerCP               | <i>Peridinin chlorophyll protein complex</i> |
| Tbet                | <i>T-box expressed in T cells</i>            |
| TCR                 | <i>T cell receptor</i>                       |
| TGF- $\alpha/\beta$ | <i>Transforming Growth fator alfa/beta</i>   |
| Th1                 | Células T <i>helper</i> tipo 1               |
| Th2                 | Células T <i>helper</i> tipo 2               |
| Th9                 | Células T <i>helper</i> tipo 9               |
| Th17                | Células T <i>helper</i> tipo 17              |
| Treg                | Células T Regulatórias                       |
| TNF- $\alpha$       | Fator de Necrose Tumoral - alfa              |
| WHO                 | <i>World Heath Organization</i>              |

# *Introdução*

---

# 1 1 INTRODUÇÃO

## 3 1.1 Câncer

5 O Câncer é o termo abrangente utilizado para designar o crescimento celular  
6 descontrolado. Desenvolve-se, basicamente, quando há falha nos processos que induzem a  
7 divisão celular, defeitos no controle do ciclo de divisão celular e/ou desequilíbrio do controle  
8 de morte celular programada ou apoptose (ARRUDA *et al.*, 2008).

9 O câncer, ou neoplasia maligna é caracterizado pela transformação de células normais  
10 em malignas, podendo se estabelecer de forma espontânea ou induzida por agentes químicos,  
11 físicos ou biológicos. Quando há quebra da integridade celular, as transformações são  
12 evidenciadas, levando posteriormente a alterações moleculares e fenotípicas celulares (LOEB;  
13 HARRIS, 2007; DAROLT; FREITAS; FREITAS2, 2011).

14 Estudos demonstram que uma única mutação não é suficiente para a formação do tumor  
15 e que é preciso ter duas ou mais modificações associadas que irão interferir nos mecanismos de  
16 proliferação e morte celular (ONUICHIC; CHAMMAS, 2010).

17 Segundo a *World Health Organization* (WHO), até o ano de 2030 são estimados 27  
18 milhões de novos casos incidentes de câncer no mundo, sendo 17 milhões de mortes por essa  
19 doença e milhares de pessoas vivas convivendo com essa doença (WHO, 2016).

20 No Brasil é um problema que ganha relevância pelo perfil epidemiológico que essa  
21 doença vem apresentando com altos números de casos. É o que se tem mostrado, a estimativa  
22 realizada pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) para o ano de 2016, válida também para o  
23 ano de 2017, a ocorrência de cerca de 596 mil casos de câncer, sendo 295.000 casos entre os  
24 homens e 300.800 entre as mulheres (INCA, 2016). Ainda de acordo com o Instituto, o número  
25 de casos de câncer de mama para este ano de 2016 é de 57.960 (INCA, 2016).

26 As células tumorais aglomeradas formam uma massa neoplásica que pode desenvolver  
27 a capacidade de realizar metástase, podendo assim comprometer a função de outros órgãos por  
28 apresentarem capacidade de invasão local e promoverem um microambiente favorável ao seu  
29 desenvolvimento (ONUICHI; CHAMMAS, 2010).

## 32 1.2 Câncer de Mama

34 O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum entre o sexo feminino e a segunda  
35 principal causa de morte por câncer de mulheres em todo o mundo. O aumento do número de



36 casos deste tipo de câncer tem permitido elucidar o entendimento quanto aos mecanismos  
37 moleculares relacionados a esta doença e conseqüentemente ao desenvolvimento de novos  
38 agentes terapêuticos e estratégias que podem proporcionar importante diminuição na  
39 mortalidade (PEROU *et al.*, 2000; SOTIRIOU; PUSZTAI, 2009).

40 É uma das neoplasias mais temidas pelas mulheres, uma vez que a sua ocorrência causa  
41 grande impacto psicológico, funcional e social, atuando negativamente nas questões  
42 relacionadas à autoimagem e à percepção da sexualidade (ROUZIER *et al.*, 2005). Seu  
43 desenvolvimento está relacionado à exposição prolongada aos hormônios femininos, à idade  
44 avançada para gestação, a não amamentação, ao excesso de peso, história familiar ou mutação  
45 genética, incluindo mutações nos genes BRCA1 e BRCA2. No entanto, há casos que a que a  
46 doença se desenvolve sem apresentar fatores de risco identificáveis (AMENDOLA; VIEIRA,  
47 2005).

48 Em relação à mortalidade, essa neoplasia representou cerca de 13,7% do total de mortes  
49 por câncer no mundo no ano de 2008, com a exceção dos tumores de pele não melanomas. Na  
50 população norte-americana, houve redução de 12,3% nas taxas de mortalidade por câncer de  
51 mama entre os anos de 1991 a 2006, o que foi atribuído principalmente à ampliação do  
52 rastreamento mamográfico (CINTRA *et al.*, 2012).

53 No Brasil, estima-se aproximadamente 57.960 novos casos de câncer de mama em 2016  
54 válidos para 2017. Com base em dados dos registros de câncer de base populacional nacional,  
55 as incidências da doença são similares às aquelas observadas em países desenvolvidos. Trata-se  
56 da principal causa de óbito por câncer feminino no país, principalmente nas regiões sudeste,  
57 sul, nordeste e centro-oeste e a segunda causa de neoplasia mais incidente na região norte. A  
58 faixa etária de maior risco para este câncer, segundo dados da Secretária de Vigilância em  
59 Saúde, encontra-se entre 50 e 69, sendo relativamente rara antes dos 35 anos, acima dessa idade  
60 há um progressivo crescimento em sua incidência especialmente após os 50 anos (INCA, 2016).

61 A classificação morfológica mais comum do câncer de mama é a preconizada pela  
62 Organização Mundial de Saúde (OMS) sendo 85% de carcinomas ductais e 15% de carcinomas  
63 lobulares (ANGULO *et al.*, 2013).

64 Somente a análise morfológica utilizada (anatomopatológica) é insuficiente para  
65 caracterizar os carcinomas de mama, uma vez que os tumores com o mesmo grau, estadio e tipo  
66 histológico podem apresentar diferentes prognósticos e respostas à terapia, sendo necessária a  
67 avaliação e classificação imunohistoquímica (ELSTON; ELLIS, 1991; REIS-FILHO;  
68 WESTBURY; PIERGA, 2006).

69 A detecção precoce da neoplasia é a única forma de diminuir suas taxas de morbidade e  
70 de mortalidade. Programas de prevenção e diagnóstico precoce, tais como exames de palpação

71 das mamas, mamografia, ecografia, ressonância nuclear magnética, biópsia e estadiamento,  
72 justifica-se pela promoção da qualidade de vida (MOLINA; DALBEN; LUCA, 2003;  
73 ANGULO *et al.*, 2013). Embora o prognóstico seja otimista para a maioria das mulheres  
74 diagnosticadas no estágio inicial da doença, o diagnóstico do câncer de mama ainda tem um  
75 profundo impacto psicossocial nos pacientes e seus familiares (BERGAMASCO; ANGELO,  
76 2001).

77

### 78 **1.3 Modelos Experimentais Câncer de Mama**

79

80 Para avaliar e compreender a biologia dos tumores de mama tem-se utilizado um modelo  
81 experimental conhecido como carcinoma mamário murino 4T1. Em 1983, Fred Miller isolou  
82 essa linhagem celular tumoral de camundongos da linhagem BALB/c (ASLAKSON; MILLER,  
83 1992; LELEKAKIS *et al.*, 1999; YONEDA *et al.*, 2000).

84 Essa linhagem celular é altamente tumorigênica e invasiva, morfológicamente o tumor  
85 apresenta proliferação epitelial maligna e com elevado índice mitótico, apoptótico e vários  
86 vasos sanguíneos ligados diretamente a progressão tumoral. Há, ocorrência de metástases  
87 espontâneas a partir do tumor primário de uma glândula mamária para vários locais distantes,  
88 incluindo os nódulos linfáticos, sangue, fígado, pulmão, cérebro e ossos (PULASKI;  
89 OSTRAND-ROSENBERG, 2001).

90 O tumor formado apresenta diversas características que permitem utilizar este modelo  
91 experimental para estudo do câncer de mama humano. Uma dessas características é de que essas  
92 células são facilmente transplantadas na glândula mamária, de modo que o tumor se desenvolva  
93 na própria glândula. Outra característica é que, semelhante ao que se observa no câncer de  
94 mama humano, a doença metastática de tumores 4T1 se desenvolve de forma espontânea a  
95 partir do tumor primário (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001).

96 Sendo assim esse modelo se torna de grande valia para o estudo do câncer de mama por  
97 essas células tumorais apresentarem um comportamento similar ao desenvolvido por tumores  
98 mamários humanos (DUPRÉ *et al.*, 2007).

99

### 100 **1.4 Resposta Imune a Tumores**

101

102 O sistema imunológico tem por finalidade manter a homeostase do organismo e  
103 combater as agressões de uma maneira geral. Ele é dividido em imunidade inata e imunidade  
104 adquirida que atuam em conjunto para a defesa do organismo (CRUVINEL *et al.*, 2010). Na  
105 imunidade inata tem-se uma resposta rápida a vários estímulos. É representada pelas barreiras

106 físicas, químicas e biológicas, fagócitos (neutrófilos e macrófagos, células dendríticas (CDs)),  
107 células *Natural Killer* (NK), proteínas do sangue incluindo o sistema complemento e as  
108 citocinas (CRUVINEL *et al.*, 2010).

109 A imunidade adquirida utiliza mecanismos de reconhecimento específicos de antígenos  
110 mediados por receptores presentes nas membranas dos linfócitos T e B e é mais eficiente pela  
111 formação de células de memória (MIZOBE-ONO; ARAUJO; SANTOS, 2006; MENDONÇA  
112 *et al.*, 2008).

113 As células tumorais são capazes de estimular respostas imunológicas específicas, uma  
114 vez que são circundados por linfócitos T, células NK e macrófagos que provocam uma resposta  
115 imune contra essas células. O sistema imune pode ser ativado por estímulos externos,  
116 destruindo assim células tumorais, desde que estas células expressem antígenos que sejam  
117 reconhecidos como estranhos pelas células de defesa do organismo (SILVA; SERAKIDES;  
118 CASSALI, 2004).

119 O sistema imune tem papel muito importante diante das células tumorais para que não  
120 haja crescimento do tumor, pois as células tumorais criam um ambiente imunossupressor como  
121 a liberação de citocinas, como o Fator de Crescimento Tumoral (TGF- $\beta$ ) afetando a resposta  
122 imune local, sendo que em pacientes com estágios de cânceres avançados a resposta imune está  
123 em mau funcionamento, com diminuição das respostas de linfócitos T auxiliares (T CD4<sup>+</sup>) e  
124 linfócitos T citotóxicos (T CD8<sup>+</sup>) e a deficiente expressão de moléculas do Complexo  
125 Histocompatibilidade Principal (CHP) nas células tumorais (PAZ *et al.*, 2014).

126

#### 127 1.4.1 Células dendríticas e Resposta Antitumoral

128

129 As CDs fazem a interligação entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa. Estas  
130 células são derivadas da medula óssea e residem em tecidos periféricos, pele, fígado e intestino  
131 onde capturam antígeno para processá-los e apresenta-los às células T virgens (CRUVINEL *et*  
132 *al.*, 2010).

133 Há dois subtipos de CD: as CD mielóides convencionais (mCD), caracterizadas pela  
134 expressão do marcador mielóide BDCA3<sup>+</sup> ou BDCA1<sup>+</sup> as CD plasmocitóides (pCD),  
135 caracterizadas pela expressão do marcador celular CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>CD303<sup>+</sup>. As CDs mielóides  
136 são encontradas nos tecidos periféricos e no sangue e são precursoras das células de  
137 Langherans, CD da pele, e estão envolvidas na produção da citocinas pró-inflamatórias, como  
138 o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina (IL-6) (OLIVEIRA; BORGES; CRUZ, 2013).  
139 As CDs plasmocitóides predominam no sangue periférico e secretam grandes quantidades de  
140 interferon tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ ) em resposta a infecções virais (CRUVINEL *et al.*, 2010).

141 As CD, por se posicionarem em locais estratégicos reconhecem antígenos, a partir de  
142 seus receptores de reconhecimento, realizam sua internalização a partir da fagocitose,  
143 processam este antígeno, expressam moléculas de adesão e de CHP e coestimuladores B7-1  
144 (CD80) e B7-2 (CD86) para ativar linfócitos T virgens, realizando assim a sua função de forte  
145 apresentadora de antígeno (STEIMANN; BANCHEREAU, 2007).

146 As CDs apresentam antígenos para as células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> pelo CHP-II e CHP-I,  
147 respectivamente, expresso na superfície dessas células. Esta apresentação resulta na  
148 diferenciação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> virgens em células efetoras Th1, Th2, TH17 ou Treg,  
149 enquanto que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> se diferenciam em citotóxicos (CTL). Devido aos sinais  
150 fornecidos pelas CDs, o reconhecimento de antígeno via CHP, a interação entre as moléculas  
151 coestimuladoras expressas na superfície das CDs e dos linfócitos T, ocorre uma resposta  
152 imunogênica ou tolerância imunológica, e a secreção de citocinas. As CDs podem induzir  
153 indiretamente a ativação de linfócitos B através da indução da expressão de moléculas de  
154 CD40/CD40L e de IL-12 nos linfócitos T, além de interagir com células da imunidade inata  
155 (BOUDREAU *et al.*, 2011).

156 Além disso, as CDs também são capazes de ativar células da resposta imune inata  
157 através da secreção de IL-12, que ativa as células NK, e da ativação de linfócitos do perfil Th1  
158 secretores de IFN- $\gamma$ , que é capaz de ativar tanto as células NK quanto os macrófagos (DE  
159 VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006). As células NK são as mais eficientes para o combate  
160 às células tumorais. A ativação dessas células depende do equilíbrio entre os seus receptores de  
161 ativação e inibição. Quando ativadas, as células NK induzem a morte da célula alvo através da  
162 liberação de grânulos tóxicos de perforina e granzima (TORREZINI; ATHANÁZIO, 2008). Os  
163 macrófagos são capazes de realizar a destruição das células tumorais, quando ativados na sua  
164 forma clássica, liberando enzimas tóxicas, como as enzimas lisossomais, espécies reativas de  
165 oxigênio e óxido nítrico, e pela produção do estimulador da toxicidade tumoral, o TNF- $\alpha$ , e das  
166 citocinas que estimulam a resposta do sistema imune (IL-2, IL-12 e IL-18). (COUSSENS;  
167 WERB, 2002).

168

#### 169 1.4.2 Células T e Resposta Antitumoral

170

171 Durante a resposta imune adquirida contra tumores as principais células participantes  
172 desta resposta são os linfócitos T. A maioria das células T humanas expressam, como receptor  
173 de reconhecimento de antígeno, o TCR  $\alpha/\beta$  e moléculas de CD4 ou CD8. Essas moléculas  
174 interagem com moléculas de CHP realizando uma sinalização intracelular para que ocorra a  
175 ativação das células T (BROOKS *et al.*, 1993). Quando ativadas durante o processo de

176 apresentação de antígenos anteriormente descrito, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> podem se diferenciar  
177 em subpopulações Th1, Th2, Th17 ou Treg, ao passo que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> se diferenciam  
178 em CTL (BOUDREAU *et al.*, 2011).

179 O principal mecanismo utilizado pelo sistema adaptativo celular para a morte das células  
180 tumorais é dependente dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTL), que reconhecem antígenos  
181 tumorais específicos apresentados por moléculas de CHPI. Por esta razão um dos mecanismos  
182 potentes de evasão tumoral envolve a expressão imperfeita ou não das moléculas de CHPI  
183 (TORREZINI, ATHANAZIO, 2008), ao passo que as células T CD4<sup>+</sup> com a liberação de  
184 citocinas no início das respostas imunológicas, como a IL-12, promove a diferenciação na  
185 subpopulação de Th1 (MURPHY; STOCKINGER, 2010).

186

187

### 188 **1.5 Células T<sub>D</sub>Cs**

189

190 Para que se tenha uma resposta imune eficaz faz se necessário a interação entre o sistema  
191 imune inato e o adaptativo (MOSER; LEO, 2010). E para que se inicie essa resposta é  
192 fundamental que se tenha a comunicação entre as CD e as células T (BANCHEREAU;  
193 STEINMAN, 1998).

194 Tanto as CD quanto as células T se originam a partir de progenitores comuns da medula  
195 óssea e se diferenciam durante seu desenvolvimento, no entanto, estudos estão sendo realizados  
196 quanto às suas funções, que podem ser que não sejam tão distintas (LIU; NUSSENZWEINE,  
197 2010).

198 As CD convencionais, ou mielóides, se diferenciam a partir de um progenitor comum  
199 da medula óssea e migram para os órgãos linfoides periféricos. Utiliza, para o seu  
200 desenvolvimento, os fatores de transcrição PU. 1, Ikaros, IRF8 e o Batf 3 e, como marcadores  
201 de diferenciação, o Flt3 e o seu ligante Flt3L. Estudos recentes mostram que o fator de  
202 transcrição Zbtb46, também é expresso no decorrer da diferenciação das CD convencionais  
203 (MEREDITH *et al.*, 2012; SATPATHY *et al.*, 2012).

204 As células T, ou linfócitos T, também se originam na medula óssea e completam sua  
205 maturação no timo. Estas células podem se diferenciar, após sua ativação, em populações  
206 distintas de resposta, como linfócitos Th1, Th2, Th9, Th17, Treg e o T CD8<sup>+</sup> (MOSMANN *et*  
207 *al.*, 1986; PODGAEC *et al.*, 2007; BETTELLI *et al.*, 2008; LI; ROSTAMI, 2010).

208 O sistema imune inato e adaptativo atuam através de diferentes células, sendo que  
209 algumas células parecem sobrepor-se, como é o caso de uma população celular recentemente

210 descoberta, denominada células T<sub>DC</sub>, que combinam características moleculares e funcionais  
211 dessas de ambas as respostas imunológicas (KUKA; MUNITIC; ASHWELL, 2012).

212 As células T<sub>DC</sub> apresentam características tanto de células T quanto de CDs, sendo,  
213 portanto, intermediárias entre as respostas imunes inata e adaptativa. Estas células também  
214 necessitam do timo para o seu desenvolvimento, sendo semelhantes às células T em sua origem  
215 e desenvolvimento, apresentando, ainda, propriedades funcionais características dos linfócitos  
216 T (KUKA; MUNITIC; ASHWELL, 2012).

217 As células T<sub>DC</sub> são caracterizadas pela expressão de altos níveis do marcador de CDs  
218 mielóides CD11c, de moléculas de MHC-II e do receptor de células T, TCR  $\alpha\beta$ . Também  
219 expressam CD11b, F4/80 e FcR $\gamma$ . Estas células possuem tamanho e morfologia semelhantes às  
220 células T, sugerindo que as células TDC possam ser um novo subconjunto de linfócitos T  
221 (KUKA; MUNITIC; ASHWELL, 2012).

222 Células T (por exemplo, Lck, subunidades de CD3 e IL-7R $\alpha$ ) e DCs (CD83, MHC II,  
223 Flt3 e Zbtb46) (RECHAVI; GOLDSTEIN; KLOOG, 2009) apresentam características da  
224 resposta imune inata comuns com a expressão de genes codificadores de proteínas normalmente  
225 encontradas nas células T<sub>DC</sub>.

226 Estas células podem ainda, hipoteticamente, serem capazes de fornecer funções  
227 necessárias para autorregulação, indicando que elas não precisam da ajuda de uma célula  
228 apresentadora de antígenos (APC) convencional por serem autossuficientes para apresentação  
229 de antígenos. É regulada positivamente por moléculas coestimulatórias assim como as CD  
230 convencionais (KUKA; MUNITIC; ASHWELL, 2012).

231 Além disso, estudos mostram que, quando as células T<sub>DC</sub> são estimuladas com agonistas  
232 de Receptores Semelhantes a Toll (TLR), elas são capazes de sintetizar IL-12, uma citocina  
233 produzida por CDs e importante para polarização de linfócitos do perfil Th1. A produção de  
234 IL-12 por TDC pode ser ainda mais evidente quando estimuladas com o IFN- $\gamma$  recombinante  
235 (rIFN- $\gamma$ ) (KUKA; MUNITIC; ASHWELL, 2012).

236 No entanto, ainda não está bem esclarecido qual o papel das células T<sub>DC</sub> na resposta  
237 imunológica antitumoral. Dessa forma, faz-se necessário avaliar o comportamento dessas  
238 células em uma resposta imune normal ou frente a estímulos como o desenvolvimento do tumor,  
239 sugerindo alternativas de terapias antitumorais.

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

*Justificativa*

---

266 **2 JUSTIFICATIVA**

267

268 Não é de hoje que a saúde pública enfrenta uma das doenças mais desafiadoras para os  
269 imunologistas e outros especialistas: o câncer. O câncer e seu tratamento estão associados com  
270 numerosos efeitos adversos, sintomas físicos e psicológicos.

271 O sistema imune é extremamente complexo, sendo que suas células têm a capacidade  
272 de interagir entre si, sendo esta interação entre o sistema imune inato e o adaptativo de grande  
273 importância para o desenvolvimento de uma resposta imune adequada. Algumas destas células  
274 parecem sobrepor-se em termos de marcadores e funções, como é o caso de uma população  
275 celular recentemente descoberta, denominada células T<sub>DC</sub>.

276 Sendo essas células recém-descobertas, não se sabe ainda informações suficientes sobre  
277 seu fenótipo e função, principalmente em um ambiente em que há presença de células tumorais.  
278 Desta forma, nosso estudo justifica-se por caracterizar as células T<sub>DC</sub> localizadas no baço de  
279 camundongos saudáveis e em camundongos com câncer de mama induzidos por 4T1 para  
280 avaliar se este último promove uma alteração deste perfil, visto que ainda não está bem  
281 esclarecido qual o papel das células T<sub>DC</sub> na resposta imunológica e muito menos na resposta  
282 imune antitumoral e a partir disso poder sugerir novas alternativas de terapias antitumorais.

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

299

300



301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

315

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

*Objetivos*

---

328

329

### 330 3 OBJETIVOS

#### 331 3.1 Objetivo Geral

332 Este estudo objetiva melhor caracterizar as T<sub>DC</sub> esplênicas, em termos morfológicos e  
333 funcionais, de camundongos na ausência e presença de tumores de mama induzidos por 4T1  
334 em camundongos.

335

#### 336 3.2 Objetivos Específicos

337 3.2.1 Avaliar por citometria de fluxo a expressão de marcadores de superfície de células T<sub>DC</sub> –  
338 CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>+</sup> e CD25<sup>+</sup> (receptor de IL-2) – em células obtidas do baço de  
339 camundongos saudáveis e com câncer de mama induzidos por 4T1.

340 3.2.2 Avaliar por citometria de fluxo a expressão de moléculas coestimulatórias em células T<sub>DC</sub>  
341 – CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> – em células obtidas do baço de camundongos saudáveis e com câncer de  
342 mama induzidos por 4T1.

343 3.2.3 Avaliar por citometria de fluxo a expressão de moléculas de apresentação de antígenos  
344 em células T<sub>DC</sub> – CHP-II (Ia) – em células obtidas do baço de camundongos saudáveis e com  
345 câncer de mama induzidos por 4T1.

346 3.2.4 Avaliar por citometria de fluxo a expressão de citocinas em células T<sub>DC</sub> – TNF- $\alpha$  e IL-  
347 12 – em células obtidas do baço de camundongos saudáveis e com câncer de mama induzidos  
348 por 4T1.

349 3.2.5 Comparar se ocorrem alterações das características fenotípicas das T<sub>DCs</sub> na presença de  
350 tumores de mama induzidos por 4T1.

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

382

383

384

385

386

387

*Hipótese*

---

388

389 **4 HIPÓTESE**

390

391 Células T<sub>DC</sub> (linfócitos T com características de células dendríticas) expressam maior  
392 quantidade de moléculas coestimuladoras, de apresentação de antígeno e sintetiza citocinas  
393 TNF-  $\alpha$  e IL-12 na presença de câncer de mama induzido por 4T1.

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449

*Materiais e Métodos*

---

## 450 5 MATERIAIS E MÉTODOS

451

### 452 5.1 Animais

453

454 Neste estudo, foram utilizados um total de 20 camundongos da linhagem Balb/c fêmeas,  
 455 com 8 semanas de idade, provenientes do Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON), Uberaba,  
 456 Minas Gerais. Os animais foram separados em grupos, mantidos em 4 gaiolas de plástico, sendo  
 457 5 camundongos em cada gaiola, com acomodação adequada, em ambiente claro/escuro de 12h,  
 458 em temperatura controlada ( $21 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ), com alimentação e água disponíveis *ad libitum*. Depois  
 459 do período experimental, os animais foram eutanasiados com uma overdose de Ketamina (75  
 460 mg/kg) e Xilazina (15 mg/kg). Seus restos mortais foram descartados, juntamente com o lixo  
 461 biológico, para incineração.

462 Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da  
 463 Universidade Federal do Triângulo Mineiro, sob o número de registro 317 (ANEXO A). Todos  
 464 os experimentos foram realizados em triplicata biológica.

465

### 466 5.2 Grupos Experimentais

467

468

469 Os animais foram divididos em dois grupos experimentais (Tabela 1) da seguinte forma:  
 470 Grupo controle, constituído por animais que não sofreram a indução do tumor e Grupo  
 471 experimental constituído por animais que foram inoculados com células tumorais da linhagem  
 4T1. Esses animais foram observados no decorrer dos 30 dias de experimento.

472

473 Tabela 1 - Divisão dos grupos experimentais de acordo com a administração de 4T1.

474

| Grupos             | Administração de<br>4T1 ( $2 \times 10^5$ ) | Nº animais |
|--------------------|---|------------|
| Grupo Controle     | Não   | 10         |
| Grupo Experimental | Sim   | 10         |
| Total              | -   | 20         |

475

Fonte: Autores (2015).

476

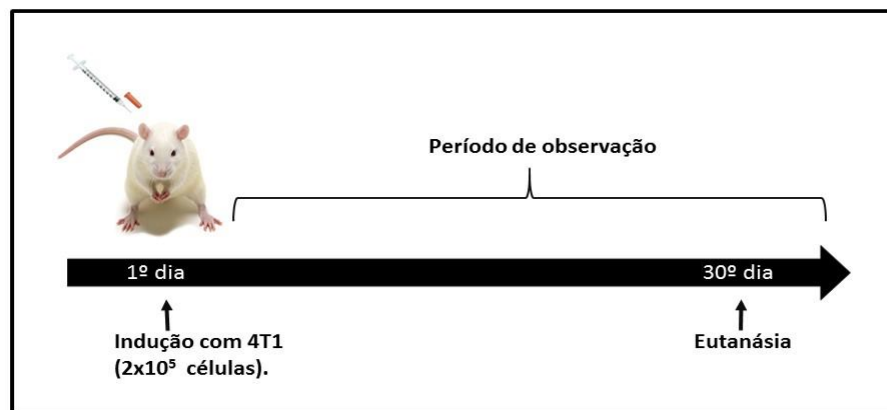
477

478

### 5.3 Indução de Tumor com Células 4T1

As células da linhagem tumoral 4T1 foram mantidas em cultura em meio RPMI completo, em estufa humidificada (Water Jacket Incubator 3110, Thermo-Fisher Scientific, Marietta, OH) à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para a indução do tumor, as células foram lavadas com solução fisiológica 0,9% a 290xg, 4°C por 10 minutos e, posteriormente, foram injetadas  $2 \times 10^5$  células 4T1 na glândula mamária dos animais dos grupos tumor (figura 1) e o crescimento tumoral monitorado por 30 dias.

**Figura 1** – Representação do desenho do estudo, que mostra a indução de tumores com linhagem celular 4T1 e período de observação.



Fonte: Adaptado de Abdalla e colaboradores, 2014.

### 5.4 Coleta de células esplênicas

Os animais foram eutanasiados (como descrito acima), e os baços foram removidos (figura 2) e submetidos a um processo de ruptura mecânica com o auxílio de pinças. As células obtidas foram homogeneizadas imediatamente em solução fisiológica 0,9%, e lavadas três vezes por centrifugação a 290 xg durante 10 min a 4°C em solução fisiológica 0,9%. Após centrifugação, as células foram ressuspensas e distribuídas a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/tubo para utilização em protocolo de citometria de fluxo.

Figura 2 – Retira de baço de camundongo



Fonte: do Autores (2015).

## 5.5 Citometria de fluxo

As células esplênicas foram colocadas em solução de lise (BD *Biosciences* - FACS™ *Lysing Solution*) a uma proporção de 1 ml de amostra em 20 ml de solução de lise. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, a solução de lise celular foi removida por centrifugação durante 10 min a uma temperatura de 4°C e 290 xg, por três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS). A cada amostra, foi adicionado 1 ml de PBS suplementado com 2 ul da proteína transportadora inibitória (BD *Golgistop*™) por 3 ml de solução de células e, em seguida, incubadas durante 20 min a 4°C. As células foram então lavadas com PBS por centrifugação, tal como descrito acima, para remover o excesso de proteínas.

Após centrifugação, as células foram ressuspensas, contadas e submetidas à imunomarcção extracelular com anticorpos BD *Pharmigen*™®. As células foram incubadas com cada um dos anticorpos a 4°C durante 30 min no escuro e depois lavadas com PBS para remover o excesso de anticorpos. A permeabilização e a fixação foram realizados (BD *Cytofix/Cytoperm*™ solution) a 4°C durante 20 min no escuro. As células foram igualmente submetidas à imunomarcção intracelular, alguns tubos foram reservados para isotipos de controle. Após marcação intracelular, as células foram mais uma vez incubadas a 4°C durante 30 min no escuro e lavadas em solução tampão (BD *Perm/Wash*™ Buffer) para remover o excesso anticorpos. Finalmente, as células foram ressuspensas em 500µl de PBS para análise por citometria de fluxo num citômetro BD *FACS Calibur*™.



561 As células foram ressuspensas, contadas e submetidas à imunomarcação extracelular  
562 com anticorpos anti-CD11b PerCP-Cy5.5 (molécula de adesão), anti-CD11c APC (quando  
563 positivo esse marcador celular indica células dendríticas mielóides), anti-80 FITC, anti-CD86  
564 APC (moléculas coestimul rias), anti-Ia PE (CHP-II – molécula apresentadora de antígeno),  
565 anti-CD3 FITC (linfócitos T totais linfócitos), anti-CD25 PE (receptor de IL-2) (BD  
566 PharmigenTM®) por 30 min a 4 C e lavadas com PBS. A permeabiliza o e a fixa o foram  
567 realizadas (BD Cytotfix/CytopermTM solution) a 4 C durante 20 min. As células foram  
568 igualmente submetidas   imunomarca o intracelular de citocinas anti-IL-12 PE e anti-TNF-   
569 PE (BD PharmigenTM®).

570 Após marca o intracelular, as células foram mais uma vez incubadas a 4 C durante 30  
571 min no escuro e lavadas em soluço tampão (BD Perm/WashTM Buffer) para remover o excesso  
572 anticorpos. Finalmente, as células foram ressuspensas em 500 l de PBS para análise por  
573 citometria de fluxo num cit metro BD FACS CaliburTM.

574

#### 575 **4.6 Análise Estatística**

576

577 Os dados obtidos neste trabalho foram analisados através do aplicativo GraphPad  
578 Prism® 5.00. As variáveis cuja distribui o não foi normal foram analisadas utilizando-se testes  
579 não paramétricos, *Mann-Whitney* para compara es entre dois grupos. Foram consideradas  
580 estatisticamente significantes as diferenças em que p foi menor que 5% ( $p < 0.05$ ).

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

*Resultados*

---

619

620 **6 RESULTADOS**

621

622 **6.1 Células T<sub>DC</sub> em camundongos saudáveis e com câncer de mama**

623

624 Para avaliar a presença de células T<sub>DC</sub> em camundongos saudáveis e com câncer de

625 mama, foi realizada citometria de fluxo, para análise da expressão de marcadores de superfície

626 CD3, CD11c, CD11b, CD80, CD86 e CHP de classe II, característicos destas células. Na figura

627 3, observamos a porcentagem de células (% GATE) e a média de intensidade de fluorescência

628 (MFI) para os marcadores de células dendríticas e moléculas coestimulatórias em células CD3<sup>+</sup>

629 expressos em mediana. Nota-se, nesta figura, uma diminuição significativa da porcentagem de

630 células CD3<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> no grupo de células esplênicas do grupo experimental (0%) em relação

631 ao grupo controle (1,61%) ( $p=0,0175$ ) e também na média de intensidade de fluorescência no

632 grupo de células esplênicas do grupo experimental (0) em relação ao grupo controle (865,96)

633 ( $p=0,0175$ ). Quanto à porcentagem de células CD3<sup>+</sup>/CHPII<sup>+</sup> houve uma diminuição

634 significativa no grupo experimental (47,40%) em relação ao grupo controle (81,71%)

635 ( $p=0,0002$ ) assim como a média de intensidade de fluorescência no grupo de células esplênicas

636 do grupo experimental (657,78) em relação ao grupo controle (1518,6) ( $p=0,0002$ ). Em relação

637 as demais marcações, CD11c, CD80 e CD86, não foram observadas alterações significativas

638 ( $p>0,05$ ). Estes resultados sugerem que há uma redução de células T<sub>DC</sub> em camundongos com

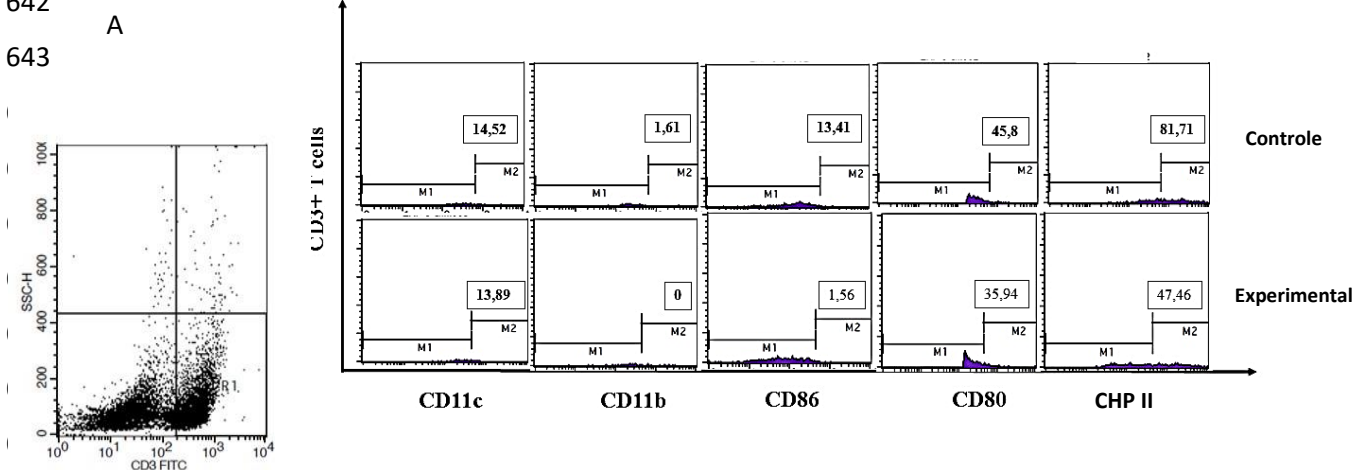
639 câncer de mama comparado a camundongos saudáveis.

640

641

642

643

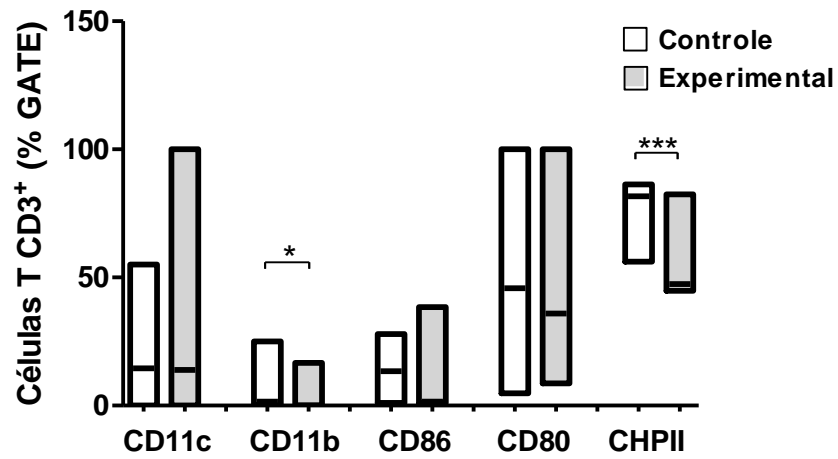


651

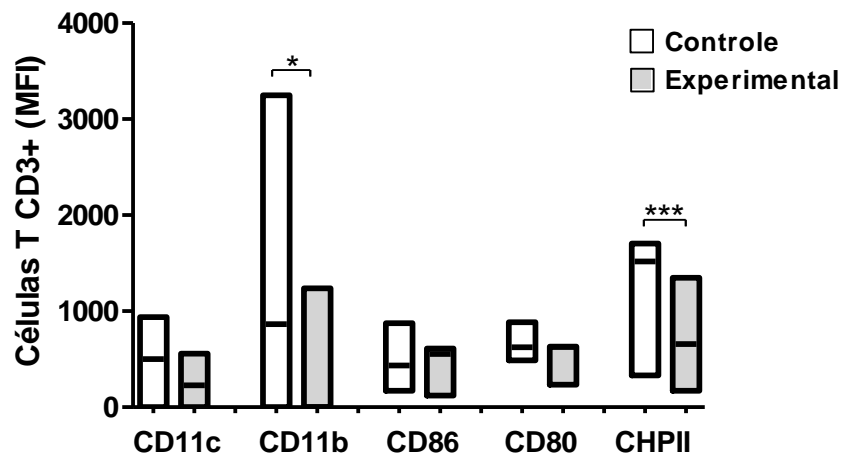
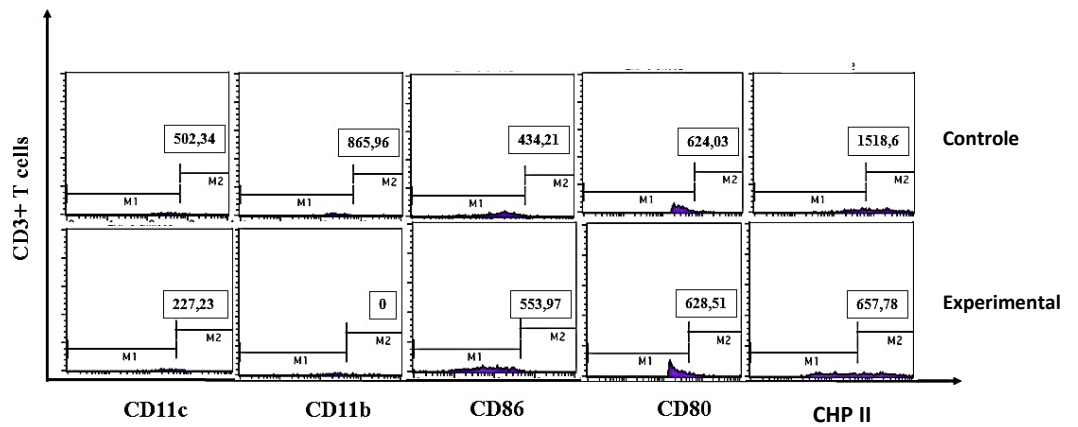
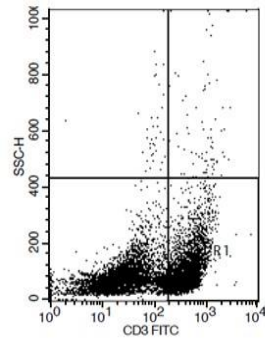
652

653

654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682



B



**Figura 3:** Porcentagem de células (A) e Média de Intensidade de Fluorescência (B) de células CD3<sup>+</sup> positivas para marcadores de células dendríticas e moléculas coestimulatórias. Resultados expressos em mediana (Teste Mann Whitney). \*p<0,05; \*\*\*p<0,0001. Grupo Controle e Grupo Experimental. %GATE: Porcentagem de células. MFI: Média de Intensidade de Fluorescência.

683  
684

## 685 6.2 Redução de células T<sub>DC</sub> em camundongos com tumor

686

687 Para avaliar a influência do tumor sobre as células T<sub>DC</sub>, foi avaliado a porcentagem de  
 688 células e a média de intensidade de fluorescência de TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, IL-12<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> em células  
 689 CD3<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> ou CD3<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup>.

690 Na figura 4, observamos a expressão de marcadores CD3<sup>+</sup>/TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/IL-12<sup>+</sup> e  
 691 CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> positivas para CD11c<sup>+</sup> expressos em mediana. Em relação à porcentagem de  
 692 células CD3<sup>+</sup>/TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> não foram observadas alterações significativas quando  
 693 comparados o grupo de células esplênicas do grupo experimental (75%) ao grupo controle  
 694 (30,39%) ( $p > 0,05$ ) ao passo que a intensidade média de fluorescência dessa marcação reduziu  
 695 significativamente no grupo de células esplênicas do grupo experimental (692,27) em relação  
 696 ao grupo controle (1308,61) ( $p < 0,0002$ ).

697 Em relação à porcentagem de células CD3<sup>+</sup>/IL-12<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> observou-se uma diminuição  
 698 significativa tanto da porcentagem dessas células no grupo de células esplênicas do grupo  
 699 experimental (75,00%) em relação ao grupo controle (81,82%) ( $p = 0,0260$ ) assim como na  
 700 média de intensidade de fluorescência dessas células no grupo de células esplênicas do grupo  
 701 experimental (600,23) em relação ao grupo controle (1302,7) ( $p < 0,0001$ ).

702 Em se tratando da porcentagem de células CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> não foram observadas  
 703 alterações significativas quando comparados o grupo de células esplênicas do grupo  
 704 experimental (66,67%) ao grupo controle (72,73%) ( $p > 0,05$ ) ao passo que se observou uma  
 705 diminuição significativa da média de intensidade de fluorescência dessa população celular no  
 706 grupo de células esplênicas do grupo experimental (624,09) ( $p < 0,0001$ ) em relação ao grupo  
 707 controle (1304,6).

708

709

710

711

712

713

714

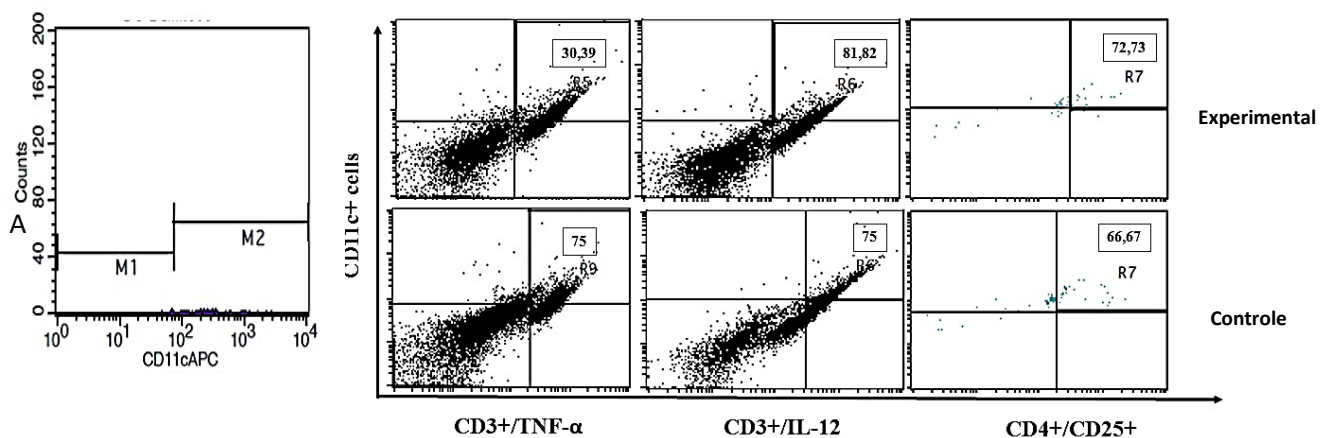
715

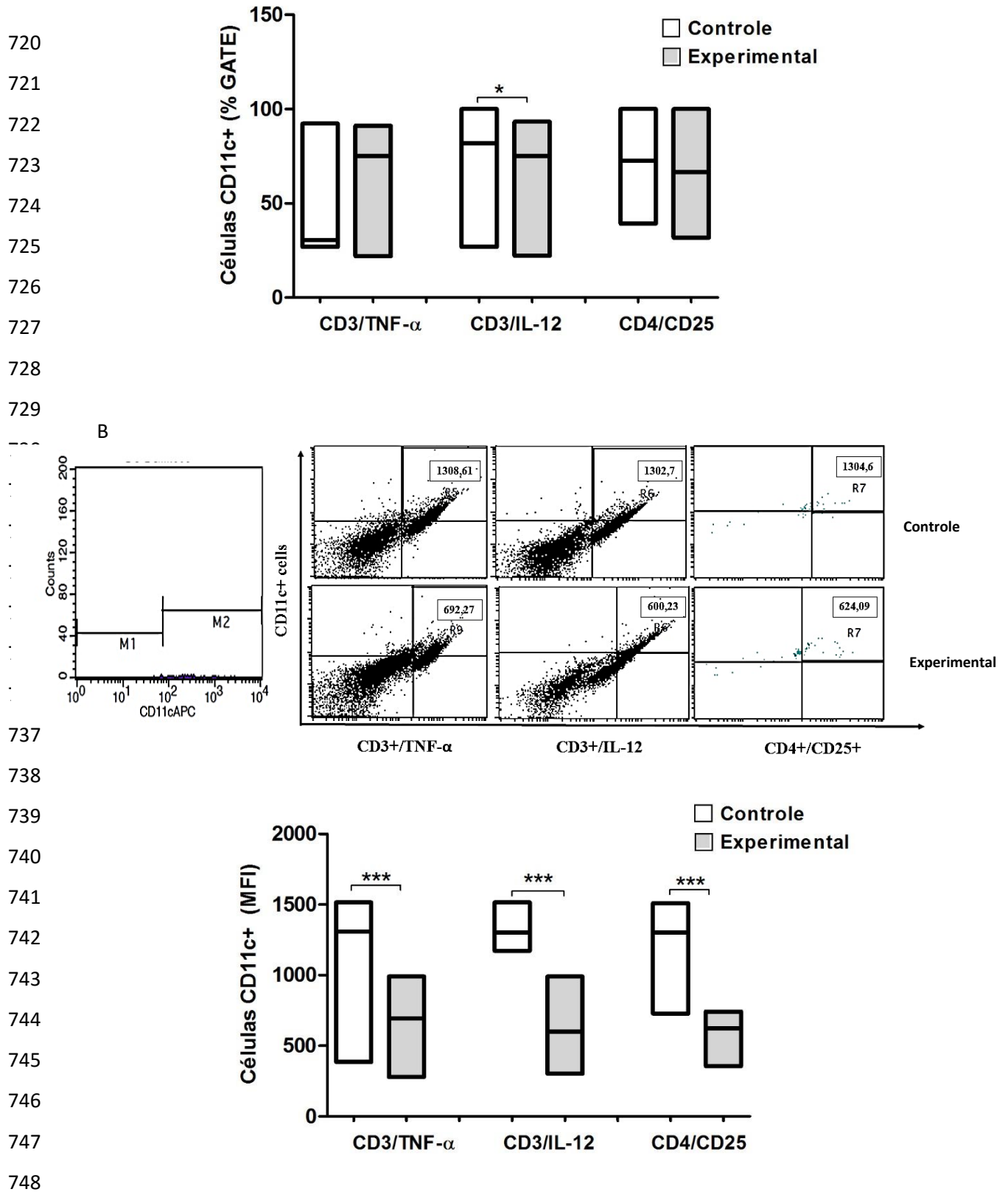
716

717

718

719





**Figura 4:** Expressão em células linfocitárias que expressam moléculas de CD3<sup>+</sup>/TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/IL-12<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>/CD25 do marcador CD11c<sup>+</sup>. Porcentagem de células (A) e Média de Intensidade de Fluorescência (B). Foram obtidas células esplênicas de camundongos saudáveis e camundongos induzidos com  $2 \times 10^5$  células da linhagem de células tumorais 4T1 e analisadas através da técnica de citometria de fluxo. Os resultados obtidos foram expressos em mediana (Teste Mann Whitney). \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ . Grupo Controle e Grupo Experimental. %GATE: Porcentagem de células. MFI: Média de Intensidade de Fluorescência.

749 Em relação à expressão de células  $CD3^+/TNF-\alpha^+$ ,  $CD3^+/IL-12^+$  e  $CD4^+/CD25^+$  positivas  
 750 para  $CD11b^+$ , expressos em mediana, (figura 4) observamos os seguintes resultados: notamos  
 751 um aumento significativo da porcentagem de células  $CD3^+/TNF-\alpha^+/CD11b^+$  no grupo de  
 752 células esplênicas do grupo experimental (75%) em relação ao grupo controle (26,97%)  
 753 ( $p=0,0260$ ) enquanto que a sua média de intensidade de fluorescência diminuiu de forma  
 754 significativa no grupo de células esplênicas do grupo experimental (1049,14) em relação ao  
 755 grupo controle (4114,43) ( $p<0,0002$ ).

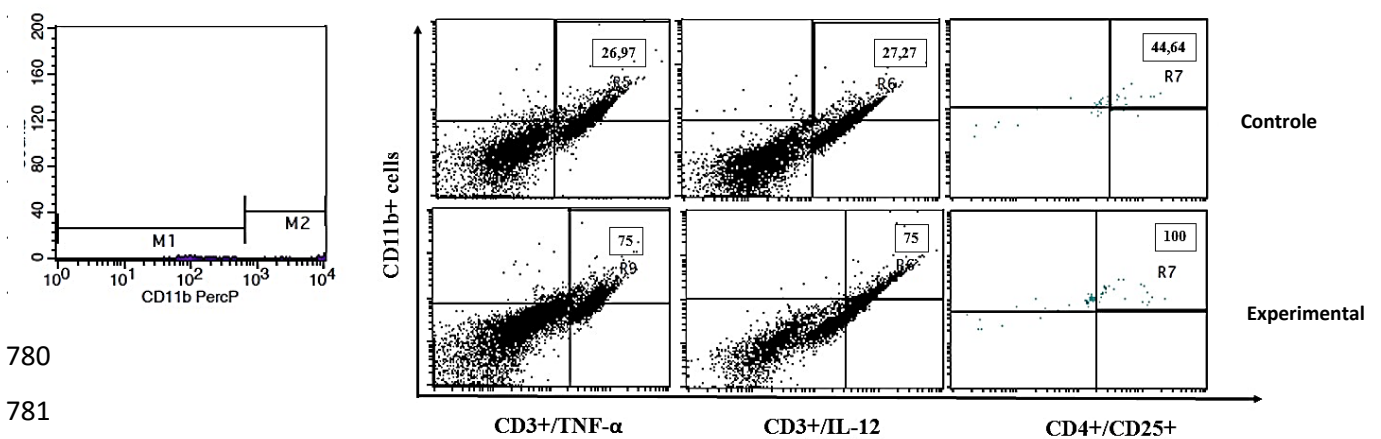
756 Nas células  $CD3^+$  positivas para a citocina  $IL-12^+$  notamos que não foram observadas  
 757 alterações significativas em relação à porcentagem de células  $CD3^+/IL-12^+/CD11b^+$  quando  
 758 comparados ao grupo de células esplênicas do grupo experimental (75,00%) ao grupo controle  
 759 (27,27%) ( $p>0,05$ ). Em relação à média de intensidade de fluorescência das células da mesma  
 760 população celular se observou uma diminuição significativa no grupo de células esplênicas do  
 761 grupo experimental (1049,14) em relação ao grupo controle (2510,38) ( $p<0,0001$ ).

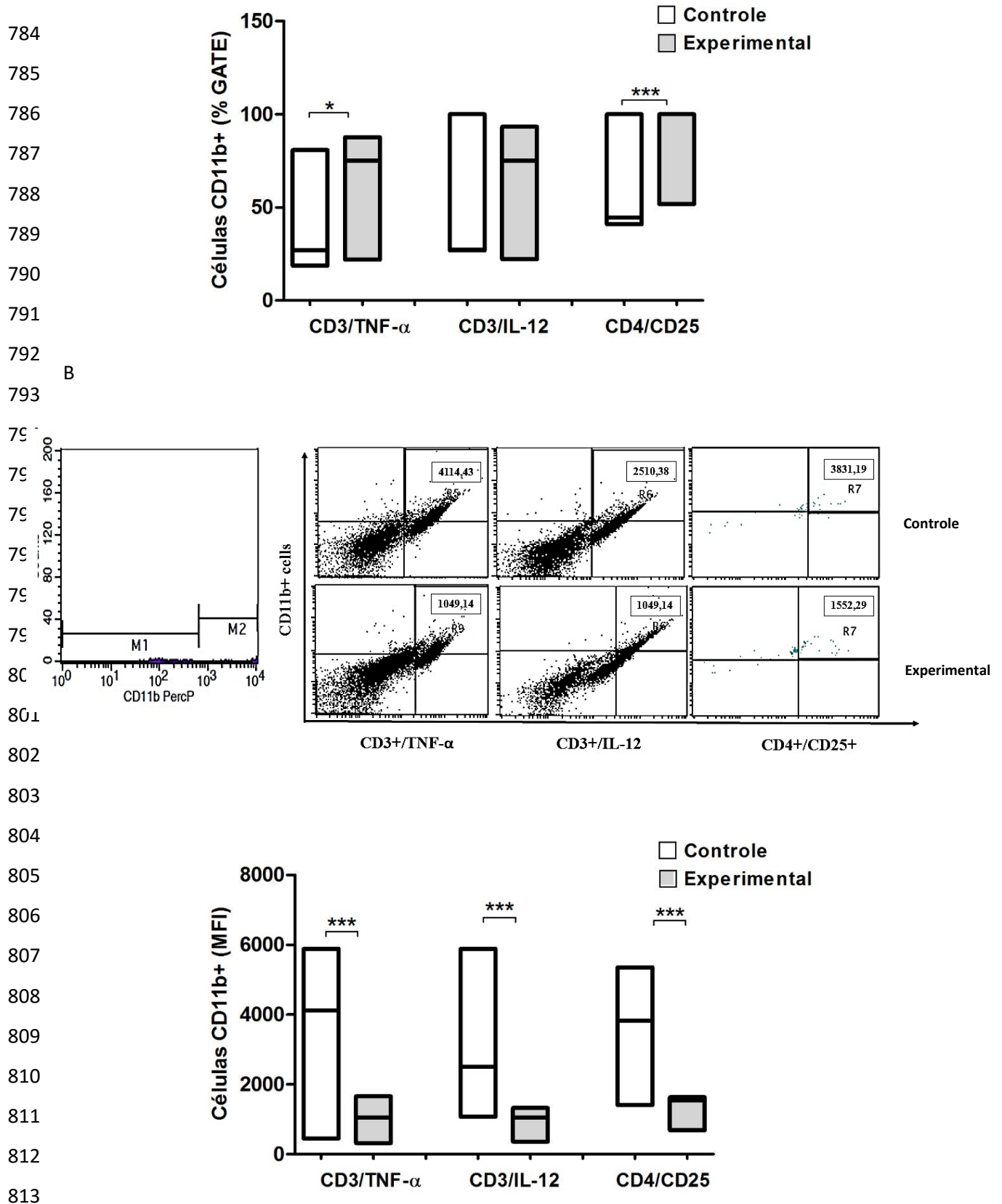
762 Na expressão de marcadores de  $CD11b$  em células linfocitárias  $CD4^+$  positivas para a  
 763 citocina  $CD25^+$  notamos um aumento significativo da porcentagem de células  
 764  $CD4^+/CD25^+/CD11b^+$  no grupo de células esplênicas do grupo experimental (100%) em relação  
 765 ao grupo controle (44,64%) ( $p<0,0001$ ). Quanto à média de intensidade de fluorescência se  
 766 observa uma diminuição significativa dessas mesmas células no grupo de células esplênicas do  
 767 grupo experimental (1552,29) em relação ao grupo controle (3831,19) ( $p<0,0001$ ). Estes  
 768 resultados sugerem que há uma redução de células  $T_{DC}$  produtoras de  $IL-12$ ,  $TNF-\alpha$  e que  
 769 possuem o marcador de proliferação para  $IL-2$  ( $CD25$ ) em camundongos com câncer de mama  
 770 comparado a camundongos saudáveis.

771

772

773





**Figura 5:** Expressão em células linfocitárias que expressam moléculas de CD3<sup>+</sup>/TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/IL-12<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>/CD25 do marcador CD11b<sup>+</sup>. Porcentagem de células (A) e Média de Intensidade de Fluorescência (B). Foram obtidas células esplênicas de camundongos saudáveis e camundongos induzidos com  $2 \times 10^5$  células da linhagem de células tumorais 4T1 e analisadas através da técnica de citometria de fluxo. Os resultados obtidos foram expressos em mediana (Teste Mann Whitney). \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ . Grupo Controle e Grupo Experimental. %GATE: Porcentagem de células. MFI: Média de Intensidade de Fluorescência.



814

Tabela 2 – Valor de p da porcentagem de células (% GATE).

815

| Marcação                    | Controle | Experimental | Valor de p |
|-----------------------------|----------|--------------|------------|
| CD3+/CD11c+                 | 14,52    | 13,89        | >0,05 NS   |
| CD3+/CD11b+                 | 1,61     | 0            | 0,0175*    |
| CD3+/CD86+                  | 13,41    | 1,56         | >0,05 NS   |
| CD3+/CD80+                  | 45,8     | 35,94        | >0,05 NS   |
| CD3+/CHP11+                 | 81,71    | 47,4         | 0,0002***  |
| CD11c+/CD3+/TNF- $\alpha$ + | 30,39    | 75           | >0,05 NS   |
| CD11c+/CD3+/IL-12+          | 81,82    | 75           | 0,026      |
| CD11c+/CD4+/CD25+           | 72,73    | 66,67        | >0,05 NS   |
| CD11b+/CD3+/TNF- $\alpha$ + | 26,97    | 75           | 0,0260*    |
| CD11b+/CD3+/IL-12+          | 27,27    | 75           | >0,05 NS   |
| CD11b+/CD4+/CD25+           | 44,64    | 100          | <0,0001*** |

816

Fonte: Autores (2015).

817

NS: Não Significativa; \*p&lt;0,05; \*\*\*p&lt;0,001

818

819

820

Tabela 3 – Valor de p da Média de Intensidade de Fluorescência (MFI).

821

| Marcação                    | Controle | Experimental | Valor de p |
|-----------------------------|----------|--------------|------------|
| CD3+/CD11c+                 | 14,52    | 13,89        | >0,05 NS   |
| CD3+/CD11b+                 | 1,61     | 0            | 0,0175*    |
| CD3+/CD86+                  | 13,41    | 1,56         | >0,05 NS   |
| CD3+/CD80+                  | 45,8     | 35,94        | >0,05 NS   |
| CD3+/CHP11+                 | 81,71    | 47,4         | 0,0002***  |
| CD11c+/CD3+/TNF- $\alpha$ + | 30,39    | 75           | >0,05 NS   |
| CD11c+/CD3+/IL-12+          | 81,82    | 75           | 0,026      |
| CD11c+/CD4+/CD25+           | 72,73    | 66,67        | >0,05 NS   |
| CD11b+/CD3+/TNF- $\alpha$ + | 26,97    | 75           | 0,0260*    |
| CD11b+/CD3+/IL-12+          | 27,27    | 75           | >0,05 NS   |
| CD11b+/CD4+/CD25+           | 44,64    | 100          | <0,0001*** |

822

Fonte: Autores (2015).

823

NS: Não Significativa; \*p&lt;0,05; \*\*\*p&lt;0,001.

824

825

826

827

828

829

830

831

832

833

834

835

836

837

838

839

840

841

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

*Discussão*

---

852

## 853 7 DISCUSSÃO

854

855           Recentemente descritas, as células T<sub>DC</sub> são um subtipo de células com propriedades  
856 comuns a células T policlonais e a células dendríticas (REIZIS et al., 2011). Essas células, raras,  
857 possuem similaridade morfológica a das células dendríticas com expressão de níveis  
858 intermediários de CD11c e de moléculas de apresentação antigênica CHP de classe II. Além  
859 disso, essas células também são caracterizadas pela expressão de moléculas coestimulatórias  
860 (CD80, CD86) e marcadores de superfície linfocitários (CD3, CD4 e TCR  $\alpha/\beta$ ) (KUKA;  
861 MUNITIC; ASWELL, 2012).

862           Em nosso estudo observamos a redução do número e funcionalidade dos linfócitos T  
863 totais (CD3<sup>+</sup>) positivos para CD11b e para a molécula de apresentação antigênica CHP de II  
864 presentes nas células T<sub>DCs</sub>, sugerindo que essa diminuição aconteça devido a mecanismos que  
865 os tumores utilizam para escapar do sistema imune.

866           Os linfócitos T totais (CD3<sup>+</sup>) são representados pela população de linfócitos T auxiliares  
867 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>), T citotóxicos (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) e linfócitos duplos-positivos  
868 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>). São sem dúvidas as principais células de um mecanismo de defesa para o  
869 organismo. A atuação dessas células ativa componentes do sistema imune para que haja uma  
870 resposta eficaz (OSTRAND-ROSENBERG, 2008).

871           A falha ou a falta de uma resposta satisfatória dos linfócitos T a antígenos associados a  
872 tumores pode ser explicado pelo mecanismo de tolerância imunológica associado ao escape  
873 tumoral. Como a ativação dessas células requer dois sinais de ativação, complexo CHP-  
874 peptídeo e receptor de células T (TCR) para a ligação de moléculas coestimulatórias (B7-1 –  
875 CD80 e B7-2 - CD86) para seus ligantes (CD28) na superfície da célula T, as células tumorais  
876 utilizam meios de não expressar tais moléculas para que não tenha o reconhecimento e ativação  
877 desses linfócitos (OSTRAND-ROSENBERG, 2008).

878           Com o mecanismo de escape tumoral esses linfócitos totais podem estar diminuídos  
879 devido as células tumorais não expressarem moléculas coestimulatórias e assim produzir  
880 anergia em linfócitos antitumorais evadindo-se da resposta imune. Estudos em modelos  
881 experimentais demonstrou que a perda de função imunitária, pode afetar a produção de vários  
882 mediadores desses linfócitos entre ele a produção de citocinas e de mecanismos efetores das  
883 células NK contribuindo de forma favorável ao desenvolvimento tumoral (JOYCE; POLLARD,  
884 2009).

885 Estudos realizados por Gabrilovich e colaboradores demonstram que a diminuição da  
886 função das células T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> podem estar ligadas também as células supressoras  
887 derivadas mielóides (MDSC) por suprimirem a resposta imune adaptativa através do bloqueio  
888 das funções dessas células (GABRILOVICH *et al.*, 2007). Os seus níveis elevados na medula  
889 óssea, sangue e baço de camundongos com câncer está associado a um crescimento tumoral de  
890 progressão maligna (OSTRAND-ROSENBERG, 2008).

891 Uma resposta imune eficiente requer coordenação entre imunidade inata e adaptativa.  
892 Em particular, a interferência entre as células dendríticas (CD) e células T é a chave para a  
893 iniciação da imunidade adaptativa (BANCHEREAU; STEIMANN, 1998).

894 As CDs são potentes na captura e processamento antigênico, encontradas tanto na  
895 circulação quanto em tecidos, com grande eficácia no processo de apresentação cruzada e  
896 também na apresentação de antígenos via CHP classe II (GUERMONPREZ *et al.*, 2002). O  
897 sistema de subtipos de células dendríticas é basicamente constituído por quatro: CD derivadas  
898 de monócitos (CD4<sup>low</sup>CD11c<sup>+</sup>) (SEGURA; AMIGORENA 2013); células de Langerhans  
899 (CD1a<sup>+</sup>langerina<sup>+</sup>) (TOEBAK *et al.*, 2009); CDs Plasmocitoides (CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>CD303<sup>+</sup>)  
900 (REIZIS *et al.*, 2011) e CD mielóide convencional (BDCA3<sup>+</sup> ou BDCA1<sup>+</sup>) (SATPATHY *et al.*,  
901 2012).

902 As moléculas CD11c e CD11b são expressas em uma variedade de células, como os  
903 macrófagos, monócitos, células dendríticas e células *Natural Killer* (NK) (FAN;  
904 EDGINGTON, 1991; EVANS *et al.*, 2009). Em nosso estudo procuramos caracterizar as  
905 células T<sub>DC</sub> localizadas no baço de camundongos saudáveis e avaliar se o câncer de mama  
906 poderia induzir uma alteração deste perfil. De forma geral, observamos que ocorre uma redução  
907 significativa das células T<sub>DC</sub> nos camundongos com tumores, principalmente em relação aos  
908 marcadores celulares CD11b e molécula de apresentação de antígeno CHP de classe II,  
909 sugerindo que a presença de neoplasias pode influenciar na diferenciação desse perfil celular.

910 Em uma resposta antitumoral essas moléculas são importantes, por estarem presentes na  
911 superfície de células apresentadoras de antígeno como as células dendríticas. Essas células por  
912 sua vez são responsáveis pela apresentação antigênica para ativação de linfócitos T e  
913 consequente destruição tumoral (LIU; CAO, 2015).

914 Em contrapartida a esses dados, o microambiente tumoral contém uma rede de fatores  
915 imunossupressores, com a capacidade de reprogramar esse ambiente e limitar a capacidade de  
916 alguns tipos celulares, incluindo a inibição da função e capacidade das células T na erradicação  
917 do tumor (WU *et al.*, 2015). Os componentes celulares do tumor, a matriz extracelular e o fluido  
918 intersticial constituem esse microambiente juntamente com as células do sistema imunológico.

919 Por sua vez as células tumorais e não tumorais expressam em sua superfície diversas moléculas  
920 e fatores que podem afetar a eficácia de uma resposta imune influenciando principalmente na  
921 apresentação antigênica e na resposta das células T (PARDOLL, 2012).

922 Apesar de termos avaliado as células esplênicas dos camundongos com tumores e não o  
923 tecido tumoral, acreditamos que o microambiente tumoral e seus mediadores poderiam estar  
924 regulando a produção e funcionalidade das células T<sub>DC</sub>, visto que em estudo realizado por Okita  
925 e colaboradores (2014) foi observado uma forte correlação entre o aumento das células no  
926 ambiente tumoral com marcadores CD11b<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup> representados pelas APCs e o mau  
927 prognóstico em pacientes com câncer gástrico, sugerindo que a presença dessas células  
928 caracterizam uma população de células DC imaturas, o que consequentemente correlacionaram  
929 positivamente as células que expressavam CD11b<sup>+</sup> com as células T regulatórias, indicando que  
930 essas células poderiam ter o potencial para induzir uma ambiente regulatório em pacientes com  
931 câncer gástrico (OKITA *et al.*, 2014).

932 Estudos relacionados com a atuação da molécula de apresentação de antígeno, CHP,  
933 demonstraram que a maioria dos tumores são capazes de apresentar antígenos, no entanto como  
934 mecanismo de escape a falta dessas moléculas em células tumorais promovem uma tolerância  
935 exercendo efeitos prejudiciais (MORTARA *et al.*, 2009). Estudos com tumores sólidos mostram  
936 que, os mesmos, não expressam moléculas de CHP de classe II e o seu envolvimento com as  
937 células T CD4<sup>+</sup> é dependente de células apresentadoras de antígenos (APCs) e citocinas  
938 envolvidas (SCHIETINGER *et al.*, 2010).

939 No estudo de Kuka e colaboradores (2012), foi demonstrado a capacidade das células  
940 T<sub>DC</sub> em não precisar de uma APC para apresentação de antígeno e consequentemente a sua  
941 ativação. As células esplênicas de camundongos Balb/c foram estimuladas com anti-CD3<sup>+</sup>,  
942 tanto as células T, T<sub>DC</sub> e a co-cultura de células T com CD e observaram que as células T<sub>DC</sub>  
943 expandiram em maior proporção que as outras, sugerindo que as células T<sub>DC</sub> são capazes de  
944 fornecer funções para elas mesma, principalmente por terem a presença de moléculas  
945 coestimulatórias e de apresentação antigênica presentes nas CD (CD80, CD86 e MHC de II)  
946 não sendo necessário assim, a ajuda de uma APC para sua ativação (KUKA; MUNITIC;  
947 ASWELL, 2012)..

948 Nossos dados demonstraram que ocorre uma diminuição das moléculas coestimulatórias  
949 avaliadas e também da molécula de apresentação de antígeno (CHP de classe II) na presença  
950 de um ambiente modificado pelo tumor. Estes dados corroboram para a ideia de que o tumor  
951 influencia negativamente o surgimento destas células como mecanismo de escape para não ser  
952 eliminado.

953 Diante da modulação negativa do tumor nas moléculas de membrana acima reportadas,  
954 investigamos a presença de citocinas intracelulares importantes na estimulação da resposta  
955 imune antitumoral produzidas pelas T<sub>DCs</sub>.

956 As T<sub>DCs</sub>, além de ter a habilidade de supra regular as moléculas coestimulatórias,  
957 podendo processar e apresentar antígenos por moléculas de CHP de classe II de forma  
958 independente, bem como se proliferar nas respostas imunes, sugerindo que sua dualidade  
959 genética é refletida em suas propriedades funcionais de linfócitos T e de células dendríticas  
960 (KUKA; ASHWELL, 2013), elas ainda são capazes produzirem citocinas como a IL-12, TNF-  
961  $\alpha$  e IL-2 quando estimulados por agonista de receptores semelhantes a *toll* (TLR). A IL-12 é  
962 uma citocina produzida por CD e macrófagos envolvida principalmente na diferenciação do  
963 fenótipo das células T CD4<sup>+</sup> para o perfil Th1, importante para a imunidade antitumoral  
964 (MURPHY; STOCKINGER, 2010; WANG *et al.*, 2013).

965 Em um estudo publicado por nosso grupo, Michelin e colaboradores (2015) observaram  
966 um perfil de células T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> no sangue periférico de pacientes com câncer, através da  
967 técnica de citometria de fluxo, que expressaram altos níveis de IL-12 importantes para uma  
968 resposta eficaz contra o tumor (MICHELIN *et al.*, 2015).

969 Estes linfócitos auxiliares que produzem IL-12 também já haviam sido descritos em  
970 camundongos com tumores em um trabalho anterior (MICHELIN *et al.*, 2013).

971 No estudo investigativo sobre as características inatas das células T<sub>DC</sub>, Kuka e  
972 colaboradores estimularam esplenócitos totais de camundongos com LPS e outro com agonista  
973 de TLR. E observaram que as T<sub>DC</sub> estimuladas com agonista de TLR foram capazes de produzir  
974 a IL-12 (KUKA; MUNITIC; ASWELL, 2012).

975 Em nosso estudo observamos que as células T<sub>DC</sub> produtoras de IL-12 quando em  
976 presença do tumor diminuíram tanto em sua quantidade quanto em funcionalidade.  
977 Acreditamos que com essa diminuição o perfil de células será desviado para um perfil  
978 imunossupressor caracterizado pela presença de células Th2, favorecendo assim a progressão  
979 tumoral.

980 Em nossos estudos, verificamos também, a ação dos linfócitos T que expressam TNF- $\alpha$   
981 obtidos de baço de animais com tumores e observamos que também apresentaram uma redução  
982 nessa população celular tanto em sua quantidade quanto em sua funcionalidade principalmente  
983 na presença das células tumorais.

984 Um estudo realizado por Katanov e colaboradores (2015) observou que a progressão do  
985 câncer de mama promovida por células do estroma associados a fibroblastos e células  
986 mesenquimais resultaram em um microambiente tumoral inflamatório incluindo altos níveis de

987 TNF- $\alpha$  e também IL-1, citocinas pró-tumorigênica, o que levou a um recrutamento leucocitário  
988 pró-tumor de mama (KATANOV *et al.* 2015).

989 Os dados do estudo acima contradizem com os nossos achados de que na presença das  
990 células tumorais há diminuição das células T<sub>DCs</sub> que expressam TNF- $\alpha$  tanto em sua quantidade  
991 quanto em sua funcionalidade, possivelmente por estas células serem muito peculiares, esta  
992 citocina possa exercer uma função diferente no baço destes animais, comparada com a citocina  
993 no microambiente tumoral.

994 Assim sendo, decidimos investigar se estas células possuíam também a molécula de  
995 CD4<sup>+</sup> e o receptor para a IL-2 (CD25), responsável pela proliferação dos linfócitos. Nossos  
996 resultados demonstraram que ocorre a expressão destas moléculas de membrana nas células  
997 esplênicas de camundongos saudáveis, contudo, as células TDC apresentam uma redução destes  
998 marcadores na presença do tumor. Avaliando a memória imunológica das células T<sub>DC</sub>, que  
999 possuem níveis intermediários da molécula CD25<sup>+</sup>, Kuka e colaboradores (2012) infectaram  
1000 camundongos com o Vírus da Coriomeningite Linfocítica (LCMV) e verificou a expansão  
1001 dessas células após 8 dias de pico de resposta. In vitro verificou a proliferação desse tipo células  
1002 com o mesmo vírus e observou após dois meses que possuía ainda seus aspectos moleculares e  
1003 funcionais, indicando assim uma persistência imunológica desse tipo celular (KUKA;  
1004 MUNITIC; ASWELL, 2012).

1005 Em nosso estudo observamos que houve um aumento células T<sub>DCs</sub> CD11b<sup>+</sup> para  
1006 CD3<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, sugerindo que seja um mecanismo que organismo utiliza na  
1007 tentativa do combate tumoral, sem muita efetividade enquanto que as T<sub>DCs</sub> CD11c<sup>+</sup> houve  
1008 diminuição no seu marcador de proliferação alterando o seu perfil proliferativo.

1009 Esses estudos vão ao encontro aos nossos achados no que diz respeito a memória e a  
1010 capacidade de proliferação das células T<sub>DC</sub>, onde observamos um aumento dessas células mais  
1011 a sua funcionalidade diminuída quando avaliadas o seu comportamento sobre a presença do  
1012 tumor.

1013 Diante dessa análise, podemos sugerir que as T<sub>DCs</sub> possam atuar em favor da resposta  
1014 imune antitumoral, sendo essas de suma importância, pela razão de estarem diminuídas em um  
1015 ambiente sobre a influência de células tumorais.

1016

1017

1018

1019

1020

1021

1022

1023

1024

1025

1026

1027

1028

1029

1030

1031

1032

1033

1034

1035

1036

1037

1038

1039

1040

1041

1042

1043

1044

1045

1046

1047

1048

1049

1050

1051

1052

1053

*Conclusão*

---



## 1054 **8 CONCLUSÃO**

1055

1056 Podemos concluir que:

- 1057 1. Estes novos subtipos de linfócitos T possuem em sua membrana moléculas  
1058 características de células dendríticas mielóides (CD11c) e moléculas de adesão (CD11b)  
1059 necessárias para a funcionalidade dessas células TDC;
- 1060 2. A presença das moléculas coestimulatórias presentes nas células TDC, encontravam  
1061 diminuídas na presença do tumor, tanto em sua quantidade e funcionalidade;
- 1062 3. A molécula de apresentação de antígenos CHPII representada nos camundongos pelo  
1063 Ia, se apresentou diminuída na presença de células tumorais;
- 1064 4. Além disto, esse subtipo de linfócitos T, possuem a capacidade de produzir TNF- $\alpha$  e IL-  
1065 12 citocinas importantes para uma resposta antitumoral, só que expressas em menores  
1066 quantidades;
- 1067 5. Possuem marcadores de linfócitos T auxiliares (CD4+) e receptor para IL-2 (CD25)  
1068 representante de um perfil proliferativo;
- 1069 6. Contudo, todos estes marcadores, tanto em sua quantidade e funcionalidade presentes  
1070 nas células T<sub>DC</sub> no baço de camundongos se encontraram reduzidas quando na presença de  
1071 células tumorais.

1072

1073

1074

1075

1076

*Referências*

---

## REFERÊNCIAS

- ABDALLA, D. R. et al. Innate immune response adaptation in mice subjected to administration of DMBA and physical activity. **Oncology Letter**, v.7, n.3, p.886-890, 2014.
- AMENDOLA, L. C. B.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.51,n.4, p.325-330, 2005.
- ÂNGULO, M. M. et al. Câncer de mama. **Medicine**, v. 27, n. 11, p. 1629-40, 2013.
- ARRUDA, J. T. et al. Proteína p53 e o câncer: Controvérsias e esperanças. **Estudos**, v. 35, p.123-141, 2008.
- ASLAKSON, C. J.; MILLER, F. R. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. **Cancer Research**, v. 52, n. 6, p. 1399-1405, 1992.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, p. 245–252, 1998.
- BESGAMASCO, R. B.; ÂNGELO, M. O Sofrimento de Descobrir-se com Câncer de Mama: Como o Diagnóstico é Experienciado pela Mulher. **Revista Brasileira de cancerologia**, 2001.
- BETTELLI, E. et al. Induction and effector functions of TH17 cells. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1051-1057, 2008.
- BOUDREAU, J. A. et al. Engineering dendritic cells to enhance cancer immunotherapy. **Molecular Therapy**, v. 19, n. 5, p. 841-853, mai. 2011.
- BROOKS, E. G. et al. Human T-cell receptor (TCR)  $\alpha/\beta$  + CD4-CD8- T cells express oligoclonal TCRs, share junctional motifs across TCR V beta-gene families, and phenotypically resemble memory T cells. **PNAS**, v. 90, n. 24, p. 11787–11791, 1993.
- CINTRA, J. R. D. et al. Perfil imuno-histoquímico e variáveis clinicopatológicas no câncer de mama. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 2, p.178-187, 2012.
- COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature Medicine**, v. 420, p.19-26, dez. 2002.
- CRUVINEL, W. M. et al. Sistema Imunitário – Parte I: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, Botucatu, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.
- DAROLT, J.; FREITAS, T. P.; FREITAS2, L.S. Diagnóstico cinesiológico-funcional de pacientes oncológicos internados no hospital São José de Criciúma/SC. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, Criciúma, v. 40, n. 2, p-18-24, 2011.

DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature reviews Cancer**, v. 6, n. 1, p. 24–37, jan. 2006.

DUPRÉ, S. A; REDELMAN, D.; HUNTER, K. W. The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. **International journal of experimental pathology**, v. 88, n. 5, p. 351–60, 2007.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer: I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, n. 5, p. 403-10, 1991.

EVANS, R. et al. Integrins in immunity. **Journal of Cell Science**, v.122, p.215–225, 2009

FAN, S.T.; EDGINGTON, T. S. Coupling of the adhesive receptor CD11b/CD18 to functional enhancement of effector macrophage tissue factor response. **Journal Clinical Investigator**, v.87, p.50–57, 1991.

GABRILOVICH, D.I. et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. **Cancer research**, v. 67, n. 1, p. 425-425, 2007.

GUERMONPREZ, P. et al. Antigen presentation na T cell stimulation by dendritic cells. **Annual Review of immunology**, v.20, p.621-67, 2002.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2016: **Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/2017tabelaestados.asp?UF=BR>>. Acesso em 17/03/2016.

JOYCE, J.A.; POLLARD, J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 4, p. 239-252, 2009.

KATANOV, C. et al. Regulation of the inflammatory profiles stromal cells in human breast cancer: prominent roles for TNF- $\alpha$  and the NF- $\kappa$ B pathway. **Stem cell Research & Therapy**, v.6, n.87, 2015.

KUKA, M.; MUNITIC, I.; ASHWELL, J. D. Identification and characterization of polyclonal  $\alpha\beta$  T cells with dendritic cell properties. **Nature Communication**, v. 3, p. 1223, 2012.

KUKA, M.; ASHWELL, J. D. A method for high purity sorting of rare cell subsets applied to TDC. **Jornal of Immunological Methods**, p. 111-116, 2013.

LELEKAKIS, M. et al. A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 17, n. 2, p. 163-170, 1999.

LI, H.; ROSTAMI, A. IL-9: basic biology, signaling pathways in CD4<sup>+</sup> T cells and implications for autoimmunity. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 198-209, 2010.

LIU, K.; NUSSENZWEIG, M.C. Origin and development of dendritic cells. **Immunology Review**, v. 234, p. 45-54, 2010.

LIU, Y.; CAO, X. Intratumoral dendritic cells in the anti-tumor immune response. **Cellular & Molecular Immunology**, v.12,p.381-390, 2015.

LOEB, L.A.; HARRIS, C.C. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. **Cancer Research**, v.68, p.6863-6872, 2007.

MENDONÇA, V. A. et al. Imunologia da hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Belo Horizonte, v. 83, n. 4 p-343-350, 2008.

MEREDITH, M.M. et al. Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. **The Journal of Experimental Medicine**. 2012.

MICHELIN, M. A. et al. Peripheral helper lymphocytes produce interleukin 12 in cancer patients. **Clinical medicine insights: oncology**, v.7, 2013.

MICHELIN, M. A. et al. Interleukin-12 in patients with câncer is synthesized by peripheral helper T lymphocytes. **Oncology letters**, v.10, p.1523-1526, 2015.

MIZOBE-ONO, L.; ARAUJO, J. L. P.; SANTOS, M. C. Componentes das imunidades inata e adaptativa presentes na saliva humana **Revista de odontologia da Unesp**, v. 35, n. 4, p. 253-261, 2006.

MOLINA, L.; DALBEN, I.; LUCA, L.A. Análise das oportunidades de diagnóstico precoce para as neoplasias malignas de mama. **Journal of Clinical Pathology**, v. 49, n. 2, p. 185-90, 2003.

MORTARA, L. et al. Irradiated CIITA-positive mammary adenocarcinoma cells act as a potent anti-tumor-preventive vaccine by inducing tumor-specific CD4<sup>+</sup> T cell priming and CD8<sup>+</sup> T cell effector functions. **International Immunology**, v.21,p.21:655–65, 2009.

MOSER, M.; LEO, O. Key concepts in immunology. **Vaccine**, v.28, p. (Suppl 3):C2–13, 2010.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **The Journal of Immunology**, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986.

MURPHY, K.M.; STOCKINGER, B. Effector T cell plasticity: Flexibility in the face of changing circumstances. **Nature Immunology**. v. 11, p. 674–680, 2010.

OKITA, Y. et al. Role of tumor-infiltrating CD11b<sup>+</sup> antigen-presenting cells in the progression of gastric cancer. **Journal of surgical Research**, p192-200, 2014.

OLIVEIRA, T. G.; BORGES, O.; CRUZ, M. T. Imunoterapia anti-tumoral com células dendríticas. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, Coimbra, v.2, n.2, p.45-60, 2013.

ONUCHIC, A.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista Médica**. São Paulo, v. 89, n. 1, p.21-31, jan. /mar. 2010.

OSTRAND-ROSENBERG, S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. **Current opinion in genetics & development**, v. 18, n. 1, p. 11-18, 2008.

PARDOLL, D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Review Cancer**. v.12, p.252-64, 2012.

PAZ, F. G. et al. The relationship between the antitumor effector of the IL-12 gene therapy and the expression of Th1 cytokines in an HPV 16 positive murine tumor model. **Hindawi Publishing Corporation: Mediators of inflammation**, México, p.1-9, 2014.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, p. 747-752, 2000.

PODGAEC, S. et al. Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component. **Human Reproduction**, v. 22, n. 5, p. 1373-1379, 2007.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model. **Current Protocols Immunology**, 2001.

RECHAVI, O.; GOLDSTEIN, I.; KLOOG, Y. Intercellular exchange of proteins: the immune cell habit of sharing. **FEBS Letters**, v. 583, p. 1792-1799, 2009.

REIS-FILHO, J.S.; WESTBURG, C.; PIERGA, J.Y. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. **Journal Clinical Pathology**, v. 59, n. 3, p. 225-31, 2006.

REIZIS, B. et al. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. **Annual Review of Immunology**, v.29, p.163–183, 2011.

ROUZIER, R.. Nomograms to predict pathologic complete response and metastasis-free survival after preoperative chemotherapy for breast cancer. **Journal Clinical of Oncology**, v. 23, n. 33, p. 8331-9, 2005.

SATPATHY, A.T, et al. Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. **Journal of Experimental Medicine**, 2012.

SCHIETINGER et al. Bystander killing of cancer requires the cooperation of CD4(+) and CD8(+) T cells during the effector phase. **Journal of Experimental Medicine**, v.207, p.2469–77, 2010.

SEGURA, E.; AMIGORENA, S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. **Trends immunology**, v.34, n.9, p.440-5, 2013.

SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Revista Ciências Rural**, Santa Maria, v. 2, n. 34, p.625-633, mar. /abr. 2004.

SOTIRIOU, C.; PUSZTAI, L. Gene-expression signatures in breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 8, p. 790-800, 2009.

STEINMAN, R. M.; BANCHEREAU, J. Taking dendritic cells into medicine. **Nature**, v. 449, n. 7161, p. 419–26, 27 set. 2007.

TOEBAK, M. J. et al. Dendritic cells: Biology of the skin. **Contact Dermatitis**, v. 60, p.2-20, 2009.

TORREZINI, T.; ATHANÁZIO, D. A. Imunovigilância e imunoedição de neoplasias: implicações clínicas e potencial terapêutico, **Revista Brasileira de Cancerologia**, Salvador, v. 54, n. 1, p.63-77, 2008.

YONEDA, T. et al. Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma. **Cancer**, v. 88(12 Suppl):2979-2988, 2000.

WANG, J. et al. Association of interleukin-12 polymorphisms and serum IL-12 p40 levels with osteosarcoma risk. **DNA Cell Biology**. v.32, p.605-610, 2013.

WHO. World Cancer Report 2015. **Lyon: International Agency for Research on Cancer**, 2016.

WU, A. A. et al. Reprogramming the tumor microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells. **OncoImmunology**, v.4, n.7, 2015.

*Anexo*

---



## ANEXO



**Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

Parecer Consubstanciado

**PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS**

**IDENTIFICAÇÃO**

**TÍTULO DO PROJETO:** Influência da atividade física na resposta imunológica de tumores experimentais em camundongos induzidos por linhagem celular 4T1

**PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL:** Prof. Dr. Márcia Antoniazzi Michelin

**INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA:** UFTM

**DATA DE ENTRADA NO CEUA UFTM:** 07/07/2014.

**PROTOCOLO CEUA/UFTM:** 317

**SUMÁRIO DO PROJETO**

**1. OBJETIVOS (GERAL E ESPECÍFICOS)**

**Objetivos gerais:** investigar a influência da atividade física sobre a resposta imunológica decorrente do desenvolvimento do câncer.

**Objetivos específicos:** analisar a influência da atividade física na resposta do sistema imune contra tumores, através da avaliação de células imunes (CD 3+ CD4+, CD8+ e CD14+); analisar as alterações na síntese de citocinas (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e CD25+); verificar a influência da prática de atividade física no processo de angiogênese pela densidade microvascular (CD31+, CD105+ e Ki67); identificar o padrão de metilação dos genes: Tbox 21, IL-12, NOS2, NOS3, TGF- $\beta$ , miRNA29a, miRNA29b e miRNA155 dos camundongos da linhagem balb/c com tumores de mama e dos grupos controles; fazer o seqüenciamento das regiões metiladas dos genes envolvidos na resposta antitumoral; medir a expressão dos genes envolvidos com a resposta antitumoral dos camundongos da linhagem balb/c com tumores de mama e do grupo controle.

**2. JUSTIFICATIVA**

Tendo em vista que a experimentação animal seria o primeiro passo para descobertas de novas metodologias de diagnóstico e terapêutica. Utilizando animais poderemos investigar, nos mais variados aspectos da resposta imunológica, as interações entre o sistema imune e a resposta Tumoral e a efetividade das vacinas de células dendríticas. Tais interações, cuja investigação em seres humanos não se faz possível pelo comportamento invasivo e experimental dos procedimentos

**3. MATERIAL E MÉTODOS**

**3.1) Animais:**

Serão utilizados 60 camundongos da linhagem Balb/C, 50 fêmeas e 10 machos, peso 25g, procedentes do Biotério Central da UFMG. Os animais serão alojados no biotério do IPON - UFTM. Os animais serão mantidos em gaiolas plásticas (305 x 198 x 133 mm), 10 animais por caixa, cama de maravalha. A temperatura ambiente será controlada de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $55 \pm 15\%$  e com ciclo de luminosidade claro e escuro de 12 horas. Os animais receberão ração comercial (Nuvilab) e água à vontade.

**3.2) Procedimentos com animais e demais procedimentos:**

Os grupos experimentais serão divididos da seguinte forma: **G1 - Grupo controle:** 10 Animais sem qualquer intervenção; **GII - Grupo treinado:** 10 animais sem tumor submetidos ao protocolo de treinamento; **GIII - Grupo tumor:** 10 Animais com tumor induzido com a linhagem 4T1; **GIV - Grupo tumor treinado:** 10 Animais com tumor induzido com a linhagem 4T1 e submetidos ao protocolo de treinamento.

Os animais dos grupos III e IV serão inoculados com a linhagem tumoral 4T1, que é conhecida como potente indutor na formação de tumores de mama em roedores. Desta forma será, inoculado uma única dose



**Universidade Federal do Triângulo Mineiro**  
Pré-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

**Parecer Consubstanciado**  
**PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS**  
**IDENTIFICAÇÃO**

**TÍTULO DO PROJETO:** Influência da atividade física na resposta imunológica de tumores experimentais em camundongos induzidos por linhagem celular 4T1  
**PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL:** Prof. Dr<sup>a</sup> Márcia Antoniazzi Michelin  
**INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA:** UFTM  
**DATA DE ENTRADA NO CEUA UFTM:** 07/07/2014  
**PROTOCOLO CEUA/UFTM:** J17

da linhagem tumoral 4T1 com volume de 50 µl com concentração de  $2,0 \times 10^7$  células por animal na região do último par de mamas, posteriormente o tempo de 7 dias será respeitado para o desenvolvimento do tumor. A confirmação do desenvolvimento se dará por palpação e inspeção no local das mamas. Posteriormente os animais do **grupo II** serão submetidos ao protocolo de treinamento, que consiste em sessões de natação durante quatro semanas, cinco vezes por semana, os animais são colocados em baias separadas em água com temperatura controlada ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ), água esta trocada todos os dias, e não há adição de peso extra aos animais. Todo e qualquer sinal de incapacidade física, risco de afogamento, os animais são retirados do ambiente aquático. O **grupo III** tumor sem treinamento e **grupo IV** tumor treinados seguem o mesmo padrão. Posteriormente a todo o período experimental serão eutanasiados através de superdosagem anestésica e os tecidos alvos removidos e condicionados adequadamente para posteriores estudos.

**3. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PARA OS ANIMAIS E DESCRIÇÃO DAS RESPECTIVAS MEDIDAS PREVENTIVAS E CURATIVAS QUANDO NECESSÁRIO**

Os desconfortos dos animais nas manobras de administração da droga 4T1, bem como durante o tratamento serão amenizados retirando-os do experimento. Pois uma vez apresentado desconforto ou risco não submeteremos o animal aos mesmos procedimentos respeitando o mesmo. A retirada dos animais se caso necessária, esta prevista no cálculo amostral. Para evitar e ou minimizar tais sofrimentos durante o procedimento, toda a equipe será devidamente treinada para a realização do procedimento de indução de tumor e vacinação com células dendríticas.

**4. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PARA AS PESSOAS ENVOLVIDAS NA PESQUISA**

As pessoas envolvidas neste projeto serão treinadas para todos os procedimentos e utilizarão EPI's (luvas de procedimento, jalecos, máscaras).

**COMENTÁRIOS DO RELATOR QUANTO À ESTRUTURA DO PROTOCOLO**

Este protocolo obedece aos princípios éticos para a experimentação animal.

**PARECER DA CEUA:** Aprovado em 19/09/2014

*(O relatório anual ou final deverá ser encaminhado pelo Pesquisador um ano após o início do processo).*

Prof. Dra. Rosângela Soares Chriguer  
Coordenadora da CEUA/UFTM