

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**

**ANDRÉ ADRIANO ROCHA ALEIXO**

**CARACTERIZAÇÃO DO INFILTRADO CELULAR, AVALIAÇÃO DOS  
MARCADORES DE DENSIDADE MICROVASCULAR (CD31, CD105) E  
MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (Ki-67) NO CÂNCER DE MAMA  
4T1 EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM VACINA DE CÉLULAS  
DENDRÍTICAS, TERAPIA COM INTERFERON-ALPHA E TERAPIA COMBINADA**

UBERABA – MG  
2018

**ANDRÉ ADRIANO ROCHA ALEIXO**

**CARACTERIZAÇÃO DO INFILTRADO CELULAR, AVALIAÇÃO DOS  
MARCADORES DE DENSIDADE MICROVASCULAR (CD31, CD105) E  
MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (Ki-67) NO CÂNCER DE MAMA  
4T1 EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM VACINA DE CÉLULAS  
DENDRÍTICAS, TERAPIA COM INTERFERON-ALPHA E TERAPIA COMBINADA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dra. Márcia Antoniazi Michelin.

Co-orientador: Prof. Dr. John Paul Borgers

Co-orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta

UBERABA – MG  
2018

**ANDRÉ ADRIANO ROCHA ALEIXO**

**CARACTERIZAÇÃO DO INFILTRADO CELULAR, AVALIAÇÃO DOS  
MARCADORES DE DENSIDADE MICROVASCULAR (CD31, CD105) E  
MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (Ki-67 NO CÂNCER DE MAMA 4T1  
EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM VACINA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS,  
TERAPIA COM INTERFERON-ALPHA E TERAPIA COMBINADA**

Tese apresentada ao Curso de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde, sob a orientação da Prof. Dr. Márcia Antoniazzi Michelin. e co-orientação: Prof. Dr John Paul Bogers e Co-orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta

Área de concentração:

Tese aprovada em: 13/06/2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Professora Orientadora: Prof. Dra. Márcia Antoniazzi Michelin  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Professor. Dr. Emilio Belletti  
Universidade Federal de Uberlândia

---

Professor. Dra. Helenice Gobbi  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

---

Professor. Dra. Humberto Antogi Carrara  
Universidade Federal de São Paulo-USP-RP

---

Professor. Dr. André Luiz Pedrosa  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

## DEDICATÓRIA

Aos meus queridos e amados pais, Maria e Vantuir, por me ensinarem o caminho do bem, por me ensinarem, desde muito pequeno, que com a educação poderia me tornar um homem melhor, crescer, por sempre me apoiarem em minhas escolhas e me abençoarem, pelo amor incondicional, pela atenção e educação dedicada até hoje.

À minha querida e amada irmã, meu exemplo de responsabilidade, coerência e discernimento em tudo, obrigado pela amizade, amor, ajuda incondicional, companheirismo.

Aos meus avôs maternos e paternos que hoje não se encontram neste plano espiritual mais, mas eu sei que sempre estiveram e estarão comigo. Amo vocês.

À minha querida e também amada Tia Marina, minha segunda mãe, meu exemplo de luta, dedicação, profissionalismo e experiência. Meu sincero agradecimento por todo esse amor. Aos meus queridos primos e irmãos, Willian Junior e Mariana Rocha, sempre presentes em minha jornada, também expresso minha profunda gratidão.

Aos meus professores, grandes mestres e educadores, que durante minha jornada, em algum momento, muito me ensinaram e contribuíram, de forma direta ou indireta na minha formação acadêmica e pessoal. Agradeço, com carinho, a vocês: Márcia Antoniazi Michelin, Fabrizio Antonio Gomide Cardoso, Luciana Ferreira dos Santos Vaz, Patrícia Borges Peixoto, Alessandra da Cunha, Lidiana Simões, Leonardo César Carvalho, Andreza Aparecida Aleixo dentre outros.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e à Espiritualidade maior, por amparo e por sempre me iluminar e me dar o suporte necessário para os meus passos. Por sempre me proporcionar calma e discernimento para realizar as escolhas mais coerentes em cada momento de minha jornada. Por colocar, diante de mim, os desafios, barreiras e quedas, pois com estes aqui estou, crescendo e evoluindo, gratidão.

Aos meus orientadores, pessoas pelas quais tenho enorme admiração e respeito. À Prof. Dra. Márcia Antoniazzi Michelin e ao Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta por me acolherem de forma única durante todos estes anos de parceria, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional, pela confiança depositada, pelo convívio diário e pela amizade. Enfim, por tudo que a mim dedicaram, serei sempre muito grato.

Ao Instituto de Pesquisa em Oncologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro por todos esses anos de total apoio.

Aos amigos e companheiros Ângela, Eduardo, Letícia, Jéssica, Polyana, Mara, Fabiano, Chambertam e Saulo. Aos que não estão mais presentes mais que fizeram parte desta jornada, Alessandra, Tauana, Douglas, Rodrigo, Bruno, Isadora e Lazaro, minha gratidão para com todos.

Ao Laboratório de Biologia celular e Histologia da Universidade de Antuérpia na Bélgica, em particular ao meu também orientador John Paul Borgers, por ter me aceito como aluno pesquisador e por toda orientação durante o período que lá estive.

A Sophie em especial, durante os estudos na Universidade de Antuérpia pelo total suporte, auxílio, uma amiga, uma pessoa especial de um coração enorme. O meu muito obrigado ao Roland, Cindy, Isabel e Dominique pela paciência, ajuda e bom convívio.

A todos os professores do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelos ensinamentos passados, pelas críticas construtivas, pelas experiências transmitidas.

Aos técnicos Claudio e Andjara, que sempre nos auxiliam e ajudam no Instituto de Pesquisa em oncologia, deixo aqui o meu muito obrigado

A algumas pessoas queridas que sempre estarão no meu coração; Ana Carolina, Roberta Lua, Fernanda, Janaina, Katja, Aline, Ana Paula, Valdênia, Jolly, Vicky, Daniel, Jerlem, Patrick, Nayana, João, Gabriela, Milton e vários outros bons e queridos amigos que vibraram energias positivas que aqui não estão citados, gratidão a cada um de vocês.

A Joseane que no último momento desta jornada se mostrou mais que importante, me apoiando, incentivando. Gratidão por todos os momentos e palavras.

A todos que deram um sorriso, ou um bom dia ou boa tarde, a todos que eu pude conviver e dividir bons e às vezes não tão bons momentos nessa jornada, o meu muito obrigado e gratidão eterna.

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar a influência do tratamento com a vacina de células dendríticas, Interferon- $\alpha$  e terapia combinada (células dendríticas e Interferon- $\alpha$ ) na resposta imune no modelo experimental de câncer de mama induzido através da linhagem tumoral 4T1. Nessa perspectiva, este estudo analisou células imunes encontradas no baço CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e macrófagos CD14<sup>+</sup> alterações na síntese das citocinas IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e CD25<sup>+</sup>, bem como o infiltrado de linfócitos CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> microdensidade vascular (CD31), (CD105) e proliferação celular (Ki-67) no tumor em camundongos Balb / c, inoculados com (4T1). Os animais foram divididos em seis grupos, cada qual com 10 animais: grupo (1) controle (C), grupo sem tratamento e sem tumor, grupo (2) controle dendríticas (DCs), animais tratados com vacina de células dendríticas sem inoculação da linhagem tumoral 4T1, grupo (3) grupo tumor (T), animais inoculados com linhagem tumoral 4T1 e posteriormente tratados com solução salina a 0,9%, grupo (4), grupo tumor dendríticas tratado (T + DCs), animais inoculados com linhagem tumoral 4T1 e subsequentemente tratados com células dendríticas, grupo (5), grupo tratado com IFN- $\alpha$  (T + IFN- $\alpha$ ), animais com inoculação de linhagem tumoral 4T1 e subsequentemente tratados IFN- $\alpha$ , e grupo (6), grupo tumor tratado com IFN- $\alpha$  e vacina de células dendríticas (T + IFN- $\alpha$  + DCs), animais inoculados com linhagem tumoral 4T1 e posteriormente tratados com IFN- $\alpha$  e DCs vacina. Observamos que a indução de tumor, nos grupos de imunoterapia combinados com Interferon- $\alpha$  + células dendríticas e imunoterapia isolada somente com Interferon- $\alpha$ , reduziu as quantidades de linfócitos, de linfócitos produtores de citocinas Th1, macrófagos peritoneais e aumentou a presença de citocinas Th2 e células Treg. Os resultados também evidenciaram que as células dendríticas, mesmo na presença do tumor, grupo tumoral (T + DCs), foram capazes de promover uma diminuição na expressão das proteínas envolvidas na microdensidade vascular (CD31), (CD105) e na proliferação celular (Ki-67). Houve também um aumento na expressão de linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> intratumorais no grupo tratado com vacina de células dendríticas na presença do tumor. Portanto, podemos concluir que o microambiente tumoral parece ter uma forte influência negativa sobre a ação efetora do Interferon- $\alpha$ . Apenas a presença das células dendríticas no tumor promoveu a polarização do sistema Imune para um perfil de padrão de resposta anti-tumoral Th1. No entanto, mais estudos são necessários para buscar o melhor entendimento da biologia e ação adjuvante do IFN- $\alpha$  juntamente com as células dendríticas.

**Palavras-Chave;** Câncer de Mama, Proliferação celular, Angiogênese Patológica, Imunoterapia, Células Dendríticas.



## ABSTRACT

This study aims investigate the influence the treatment with dendritic cell vaccine, Interferon- $\alpha$  and combination therapy (dendritic cells and Interferon- $\alpha$ ) on the immune response in the proposed experimental model of breast cancer. In this perspective, this study analyzed through assessments of immune cells found in the spleen CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> and macrophages CD14<sup>+</sup> and changes in the synthesis of cytokines IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and CD25<sup>+</sup> as well as the infiltrate of the lymphocyte CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and vascular microdensity (CD31), (CD105) , cell proliferation (Ki-67), in Balb/c mice, inoculated with (4T1). For this study, we used animals were divided into six groups; the group I, control (C) no treat and no tumor (n=10) animals, group II, control treated with DCs vaccine (DC) (n = 10) animals without inoculation of the 4T1 tumoral lineage and later treated with DCs, group III, tumor (T) (n = 10) animals inoculated with 4T1 tumoral lineage and subsequently treated with 0.9% saline solution, group IV, tumor treated with DCs (T + DCs) (n = 10) animals inoculated with 4T1 tumoral lineage and subsequently treated with dendritic cells, group V, tumor treated with IFN- $\alpha$  (T + IFN- $\alpha$ ) (n = 10) animals with inoculation of 4T1 tumoral lineage and subsequently treated IFN- $\alpha$ , and group VI, tumor treated with IFN- $\alpha$  and DCs vaccine (T + IFN- $\alpha$  + DCs) (n = 10) animals inoculated with 4T1 tumoral lineage and subsequently treated with IFN- $\alpha$  and DCs vaccine. We can observe that the induction of tumor, on the immunotherapy groups combined with Interferon- $\alpha$  and DC's, and also on immunotherapy isolated only with Interferon- $\alpha$ , reduces the quantities of lymphocytes and also lymphocytes producers of Th1 cytokines, peritoneal macrophages and increases the presence of Th2 cytokines and Treg cells. The results also demonstrated that the DCs, even in the presence of the tumor, group (T + DCs) was able to promote a decrease in the expression of the proteins involved in vascular microdensity (CD31), (CD105) and in cell proliferation (Ki-67). It was also possible to observe an increase in the expression of intratumoral CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes in the group treated with DCs vaccine in the presence of the tumor. Therefore we can conclude that tumor microenvironment seems to have a negative strong influence on the effector action of Interferon- $\alpha$ . On the contrary, only presence of the DC's on the tumor promoted immune system polarization toward an anti-tumor Th1 response pattern profile. Nevertheless, more studies are needed to seek the best understanding of the biology and adjuvant action of IFN- $\alpha$  together with dendritic cells.

**Key words:** Immunotherapy, Breast Cancer, Dendritic Cells, Tumor, Cell Proliferation, Angiogenesis

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estimativa de casos de câncer de mama para 2025 no Brasil.....	15
<b>Figura 2.</b> Papel da endogлина (CD105) no endotélio vascular.....	21
<b>Figura 3.</b> Representação do desenho do estudo, incluindo a indução tumoral com a linhagem 4T1 e a eutanásia.....	31
<b>Figura 4.</b> O tecido tumoral criopreservado em molde para realização do corte em 10 $\mu\text{m}$ .....	37
<b>Figura 5.</b> Desenho esquemático ilustrando a adaptação do método de Munique.....	38
<b>Figura 6.</b> Fluxograma adaptado de <i>Science Lab</i> ilustra todo o procedimento realizado para os anticorpos extracelulares e quando permeabilizado para o intracelular.....	39
<b>Figura 7.</b> Frequência de linfócitos T totais CD3 <sup>+</sup> (A), linfócitos T <i>helper</i> CD4 <sup>+</sup> (C) e intensidade de fluorescência CD3 <sup>+</sup> (B), CD4 <sup>+</sup> (D) em células esplênicas.....	42
<b>Figura 8.</b> Frequência de linfócitos T regulatórios CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> (A), IL-10 expressadas por CD4 <sup>+</sup> (B) e intensidade de fluorescência para CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> (C) e IL-10 expressadas por CD4 <sup>+</sup> (D) em células esplênicas.....	43
<b>Figura 9.</b> Frequência de linfócitos T <i>helper</i> expressando IFN- $\alpha$ (A), TNF- $\alpha$ (B) e IL-12 (C) expressadas por CD4 <sup>+</sup> .....	45
<b>Figura 10.</b> Frequência de macrófagos (A), pela percentagem de <i>gate</i> , e intensidade de fluorescência IL-12 (B) e TNF- $\alpha$ (C) expressadas por (MFI).....	47
<b>Figura 11.</b> Análise por Imunofluorescência de linfócitos infiltrantes no tumor .....	49
<b>Figura 12.</b> Análise por Imunofluorescência da microdensidade vascular e proliferação celular no tumor.....	51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Descrição dos grupos experimentais de acordo com a administração de 4T1 e do tratamento realizad.....	29
<b>Tabela 2.</b> Marcações intra e extracelulares para as células do baço.....	31
<b>Tabela 3.</b> Marcações intra e extracelulares para as Macrófagos Peritoneais.....	31
<b>Tabela 4.</b> Descrição dos grupos experimentais para análise do tecido tumoral por Imunofluorescência.....	32
<b>Tabela 5.</b> Descrição dos anticorpos utilizados na técnica de imunofluorescência direta.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>Table 1.</b> Description of the experimental groups according to the administration of 4T1 and the treatment performed.....	33
<b>Table 2.</b> Intra and extracellular labeling for spleen cells.....	36
<b>Table 3.</b> Intra and extracellular labeling for peritoneal macrophages.....	36
<b>Table 4.</b> Description of the experimental groups for analysis of tumor tissue by immunofluorescence.....	37
<b>Table 5.</b> Description of the antibodies used in the direct immunofluorescence technique.....	37

## LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

$\alpha$	Alpha
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\mu$	Micro
%	Porcentagem.
°C	Graus Celsius.
APC	Célula Apresentadora de Antígeno.
APC*	Alofocianina
BRCA1	Breast Cancer 1 protein
BRCA2	Breast Cancer 2 protein
BSA	Albumina sérica bovina
CEUA	Comite de Ética no Uso de Animais
CD	Grupamento de diferenciação
CD105	Endogлина
CO <sup>2</sup>	Dióxido de carbono
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte antigen 4
CHP/MHC	Complexo de Histocompatibilidade
DC's	Células dendriticas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FoxP3	Forkhead box P3 (Fator de Transcrição FoxP3).
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
HE	Hematoxilina e Eosina
HIF-1	Fator inductor de Hipoxia- 1

HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano
ErbB2	Receptor tirosina quinase Erb-B2
IFN- $\alpha$	Interferon alpha
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
iDCs	Células dendríticas Imaturas
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IL12	Interleucina -12
IL10	Interleucina -10
IL-8	Interleucina -8
IL-2	Interleucina -2
IL-1 $\beta$	Interleucina -1 $\beta$
IU	Unidade Internacional
Lcor	Receptor nuclear dependente de ligante
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
INCA	Instituto Nacional de Câncer do Brasil.
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
MFI	Media de Intensidade de fluorescência
MVD	Microdensidade Vascular
NK	Natural Killer
O <sup>2</sup>	Oxygen
PD-1	Protéina ligante de Morte-1
PECAM-1	Platelet and endothelial cell adhesion molecular 1
PerCP	Proteína de clorofila de peridinina
PFA	Paraformaldeído
PE	Ficoeritrina

PBS	Tampão fosfato-salino
RE	Receptor de Estrógeno
RN	Receptor Nuclear
STAT1	Transdutor de sinal e ativador da transcrição-1
TCR	Receptor de célula T
TCD8 <sup>+</sup>	linfócito citotóxico CD8 <sup>+</sup>
TCD4 <sup>+</sup>	linfócito citotóxico CD4 <sup>+</sup>
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- alpha
TSP-1	Thrombospondina-1
Treg	linfócito T regulator
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
$\mu$ L	Microlitros
WHO	Organização Mundial da Saúde

# SUMÁRIO

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRATIC

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
<b>2.1 CÂNCER</b> .....	18
2.1.1 Câncer de Mama.....	18
2.1.2 Resposta Antitumoral frente ao tumor .....	20
2.1.3 Angiogene e Câncer.....	21
<b>2.2 Ki-67 e Índice de proliferação Celular</b> .....	24
<b>2.3 Imunoterapia com Células Dendríticas</b> .....	24
<b>2.4. Terapia com IFN-<math>\alpha</math></b> .....	25
<b>2.5 Linhagem Tumoral 4T1</b> .....	26
<b>3 Contextualização e Hipótese</b> .....	28
<b>4. Objetivo</b> .....	29
4.1 Objetivo Geral. ....	29
4.2 Objetivos Específicos .....	29
<b>5 Material e Método</b> .....	30
5.1 Animais.....	30
5.2 Grupos Experimentais .....	30
5.3 Indução de Tumores com linhagem 4T1. ....	31
5.4 Obtenção de Células Dendríticas de Médula óssea do Fêmur e Tíbia .....	32
5.5 Imunoterapia com Células Dendríticas.....	32
5.6 Imunoterapia com IFN- $\alpha$ .....	32
5.7. Eutanasia do Animais .....	33
5.8. Citometria de Fluxo de Células Esplênicas e Macrófagos peritoneais.....	33



5.9. Preparação dos grupos Experimentais para Imunofluorescência; coleta e processamento .....	35
5.10 Inunofluorescência Direta .....	35
5.10.1 Marcação com Ki-67 .....	38
6 Análise e interpretação por Imunofluorescência .....	39
6 Análise Estatística .....	38
<b>7.Resultados</b> .....	<b>40</b>
7.1 Expressão por Citometria de fluxo em células Esplênicas .....	41
7.2 Expressão por Citometria de fluxo de Macrófagos peritoneais .....	46
7.3 Análise de Linfócitos Infiltrantes por Imunofluorescência no tumor .....	47
7.4 Análise da proliferação celular e microdensidade vascular .....	49
<b>8 Discussão</b> .....	<b>55</b>
<b>9 Conclusão.</b> .....	<b>57</b>
10 Referências .....	58

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) e da Organização Mundial da Saúde (2017) o câncer é um problema de saúde pública, o que se reafirma a cada ano em virtude de sua crescente incidência e taxas de mortalidade cada vez mais elevadas. Em alguns países o risco de desenvolvimento de algum tipo de câncer pode chegar a cerca de 35% (AHMEDIN JEMAL et al., 2014). Ao longo de 2012, aproximadamente 14,1 milhões de novos casos foram relatados pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC), assim como 8,2 milhões de mortes em decorrência do câncer. É necessário destacar 65% (5,3 milhões) de aludidas mortes ocorreram nas regiões menos desenvolvidas do mundo (STEWART; WILD, 2014; TORRE et al., 2015).

Um fato preocupante e que tem sido motivo de grande alerta, principalmente nos países em desenvolvimento, são os mais de 19,3 milhões de novos casos estimados para o ano de 2025, bem como os 11,4 milhões de mortes decorrentes do câncer. Importante destacar, ainda, que as proporções nas regiões menos desenvolvidas tendem a aumentar (GLOBOCAN/IARC, 2017). Desta forma, as taxas de incidência continuam a crescer em todos os países, apresentando-se, todavia, menores em locais onde a renda é mais elevada. É possível observar o mesmo perfil com relação à mortalidade, cujas taxas estão diminuindo consideravelmente nos países de alta renda, todavia aumentando em países de média e baixa rendas ou considerados em processo de desenvolvimento (AHMEDIN JEMAL et al., 2014).

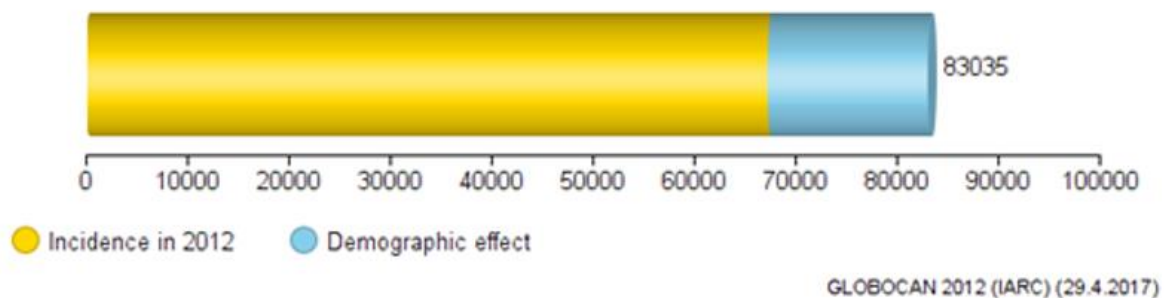
É evidente a existência de um perfil para determinados tipos de câncer em países em desenvolvimento que se assemelham ao perfil de países desenvolvidos. Isso ocorre com relação a alguns tipos de câncer com altos índices de acometimento, tais como próstata, mama e intestino. Já o câncer de colo do útero se relacionam com as condições socioeconômicas menos favoráveis de alguns países e regiões (INCA, 2016).

No Brasil o Instituto Nacional do Câncer (INCA) aponta o câncer de próstata como o de maior incidência entre os homens, bem como o de mama entre as mulheres. Tal indicação corrobora com dados estimados pela Globocan (2012) na América Latina e no Caribe, onde os números apontam para cerca de 1,1 milhão de casos novos de câncer, excluindo-se os de pele não melanoma, sendo os tipos de câncer mais incidentes o de próstata em homens, e de mama em mulheres, ambos no patamar de 152 mil casos (INCA, 2016).

No cenário mundial o câncer de mama também assumiu, em 2012, o *status* de tumor com maior incidência entre as mulheres, havendo sido constatada uma incidência de 1,7

milhões de casos, bem como uma taxa de mortalidade de 521.000 pacientes (World Health Organization 2012). Dos 184 países que fazem parte da base de dados GLOBOCAN, o câncer de mama é o diagnóstico mais frequente e comum em mulheres de 140 países (o que equivale a 76%), bem como a causa mais frequente de mortalidade por câncer em 101 países (55%). No Brasil, nos últimos anos, estes dados se reafirmaram e o câncer de mama é conhecido como a maior causa de morte por câncer entre as mulheres.

Entre 2016 e 2017 o Instituto Nacional do Câncer apontou 57.930 novos casos. A *Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide* (2017), por sua vez, estimou uma projeção de ampliação do número de novos casos para o ano de 2025, o qual poderá alcançar o patamar de 83.035 casos, dos quais mais de 54.000 acometerão mulheres com idade inferior a 65 anos, e mais de 28.500 novos casos entre mulheres com idade igual ou superior a 65 anos (Figura 1).



**Figura 1.** Estimativa de casos de câncer de mama para 2025 no Brasil.

Diante de tais evidências, a realização de investimentos vinculados ao desenvolvimento de ações abrangentes mostra-se cada vez mais necessária, incluindo-se nestes as pesquisas para a prevenção e controle do câncer e de seus fatores correlatos de risco, junto à promoção e ao efetivo tratamento. O monitoramento engloba todos os níveis e faz-se necessário para o controle futuro da doença.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1.1 CÂNCER

As células cancerígenas surgem a partir de células normais, em um processo que ocorre em várias etapas após mutações e uma elevada taxa de divisão celular, levando à ativação de proto-oncogenes e à inativação de genes supressores de tumores. O eventual destino de uma célula cancerígena dependerá do microambiente ou do estroma do tumor, onde existe uma estreita relação entre as células tumorais e células residentes do tecido, tais como fibroblastos e as células infiltrantes no tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

No que concerne ao controle proliferativo, para que uma célula tumoral sofra modificações de diferenciação celular e morte celular é indispensável que ocorram duas ou mais alterações genéticas. Referidas alterações ocorrerão de maneira intrínseca, por mutações herdadas ou erros aleatórios na replicação do DNA, ou ainda de maneira extrínseca, na qual fatores ambientais são responsáveis pela diferenciação da célula normal em célula tumoral, como, por exemplo, no caso de alterações genéticas induzidas por determinados tipos de infecções virais ou pelo contato com algumas substâncias químicas carcinogêneas conhecidas (CHIBA; MARUSAWA; USHIJIMA, 2012).

Uma vez ocorridas aludidas alterações, estas são evidenciadas após a quebra da integridade funcional do ciclo celular, o que desencadeia outras alterações, em nível molecular e de fenótipo (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006 ;TRAN et al., 2010). Após a quebra de integridade celular, ocorre uma interferência progressiva nos mecanismos celulares de proliferação com potencial replicativo e angiogênico ilimitados. Há diferenciação através de sinais de crescimento e potencial de invasão celular por parte das células tumorais e, por fim, evasão da morte celular, ou seja, a habilidade que a célula tumoral tem de evitar a apoptose por algum mecanismo, fazendo com que as células passem a apresentar características fenotípicas cada vez mais agressivas e indiferenciadas (WATNICK et al., 2013).

### 2.1.2 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o tipo de câncer de maior incidência e mortalidade na população feminina no mundo. Havendo desta forma um consenso entre os órgãos mundiais de prevenção e também de pesquisa contra o câncer sobre a necessidade de uma ampla abordagem contra essa doença. O câncer de mama não é uma doença única, pelo contrário é uma doença

heterogênea, apresentando-se com inúmeras formas histopatológicas, logo diferentes respostas terapêuticas e distintas evoluções. O câncer de mama é causado por alterações genéticas que por sua vez podem ser estimulados por inúmeros fatores ambientais como; tabagismos, uso de hormônios, terapia de reposição hormonal (TRH) na menopausa, início da menstruação em idade muito jovem, gravidez em idade avançada, nuliparidade, excesso de bebidas alcoólicas, excesso de peso e sedentarismo e predisposição genética familiar (INCA, 2016).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) são conhecidos mais de 20 subtipos distintos da doença; dentre estes, aproximadamente 80% são classificados, sob o aspecto morfológico, como carcinoma ductal invasivo; entre os demais, menos frequentes, inserem-se o lobular, o tubular, o mucinoso, o medular, o micropapilar e o papilar (GOBBI, 2012). Todavia, oito em cada dez casos de câncer de mama do tipo ductal são carcinomas invasivos com potencial de invadir tecidos vizinhos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

A literatura ainda menciona a classificação molecular e histológica de alguns dos principais carcinomas de mama. Como regra geral, tumor tipo luminal A apresenta receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) positivos, receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) negativo e Ki 67 baixo (<14%); luminal B apresenta (RE) e (RP) positivos, podendo ter positividade também para (HER2) e tem maior atividade proliferativa Ki 67 (>14%). Já o superexpressor de (HER2) apresenta (RE) e (RP) negativos e (HER2) positivo; o tipo basaloide geralmente é (RE), (RP) e (HER2) sendo um triplo negativo. O câncer de mama triplo-negativo possui um quadro clínico mais agressivo quando comparado aos demais (SHOKOUH; EZATOLLAH; BARAND, 2015).

Mulheres jovens com faixa etária inferior a 50 anos, que apresentam altas taxas de mutação gênica de BRCA1 e BRCA2, podem desenvolver características clínicas mais agressivas além da superexpressão do gene do fator de crescimento epidérmico humano receptor 2 (HER2) (NANCIE et al., 2017).

Outro elemento importante no que concerne às neoplasias é o estado inflamatório do microambiente tumoral, que é também caracterizado pelo infiltrado de populações de leucócitos. Ademais, tumores sólidos apresentam infiltrados com inúmeros componentes do sistema imune, dentre os quais neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas (CDs), macrófagos, fibroblastos, bem como, células *natural killer* (NK) dentre outras. Diante desse cenário, é conhecida a correlação existente entre a inflamação e o prognóstico do paciente com câncer de mama (QUAIL; JOYCE, 2013).

O conceito segundo o qual a inflamação crônica promove tumorigênese não é novo, respaldando-se em observações e alterações importantes nos níveis de determinadas citocinas,

tais como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , como consequente fatores que medeiam a inflamação, resultando, desta maneira, na formação ou não de um ambiente favorável ao câncer de mama (MANTOVANI et al., 2008; PANTSCHENKO et al., 2003).

### 2.1.3 RESPOSTA ANTITUMORAL FRENTE AO TUMOR

A resposta imunológica frente às células tumorais inicia-se pela imunidade inata com a produção de citocinas e quimiocinas que são indispensáveis como interferons (IFN), fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (ILs) e de células tais como macrófagos, células NK e células dendríticas (CDs). Macrófagos estimulados por patógeno ou por citocinas pró-inflamatórias passam a produzir TNF- $\alpha$ . Segundo estudos, o TNF- $\alpha$  possui atividade citotóxica sobre as células tumorais, podendo desencadear posteriormente o processo de apoptose, seguido por fagocitose, o que dará ensejo ao surgimento de um ambiente antiinflamatório. O TNF- $\alpha$  também desempenha uma ação quimiotática em relação aos linfócitos (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

Os linfócitos TCD8<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup>, quando ativados via complexo de histocompatibilidade principal (CHP) classes I e II, são indispensáveis para o principal mecanismo de defesa contra as células tumorais. Contudo, para que a resposta ocorra de forma satisfatória, as células apresentadoras de antígenos (APCs) são imprescindíveis por processarem, exporem e apresentarem o antígeno ao complexo de CHP, após o que as células TCD8<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup> são estimuladas ao desempenho de suas funções antitumorais (BERGER, 2005; LOOSE; VAN DE WIELE, 2009). Alguns aspectos do papel da inflamação na promoção ou supressão do crescimento tumoral são discutidos. Sabe-se, por exemplo, que os linfócitos citotóxicos T CD8<sup>+</sup> são potencialmente eficientes em destruir as células tumorais. Todavia, há evidências experimentais e clínicas que sugerem que eles também podem contribuir para a progressão do tumor, a depender do perfil de citocinas que são secretadas e da atuação dos demais componentes do sistema imune junto aos linfócitos (VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006). Da mesma forma, os linfócitos T *helper* CD4<sup>+</sup> desempenham um papel fundamental em face das células tumorais, pois podem sofrer polarização, em TH1, TH2, TH17 ou Treg, após sua ativação, o que determinará o perfil de resposta imune e, conseqüentemente, regulará a progressão e/ou regressão tumoral. Essa diferenciação inclui a produção de diferentes citocinas e quimiocinas, assim como fatores de transcrição que são essenciais para determinar o perfil de linfócitos que serão polarizados (IGNEY; KRAMMER, 2002).

O sistema imunológico é determinante para a vigilância contra as neoplasias, contando com vários mecanismos e componentes celulares na resposta antitumoral. Elementos da imunidade inata e adquirida atuam de forma sinérgica e conjunta na resposta imune aos tumores (VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006).

Neste cenário, as células dendríticas (CDs) são elementos essenciais e são tidas como apresentadoras profissionais de antígenos (APCs) para células T *naive* (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). Estudos já demonstraram que CDs derivadas do baço apresentam um potencial cem vezes maior que macrófagos em apresentar antígenos aos linfócitos T. As CDs são reconhecidas por sua grande importância e são foco de inúmeros estudos (JIANG et al., 2017).

### 2.2.1 ANGIOGÊNESE E CÂNCER

Angiogênese e vasculogênese são termos que definem a formação de novos vasos sanguíneos, sendo a primeira um processo que ocorre durante a fase embrionária, período no qual ocorre a formação de novos vasos sanguíneos a partir das células mesenquimais conhecidas como angioblastos (MARÇOLA; RODRIGUES, 2015; SALCEDO et al., 2005). A angiogênese é um componente importante de muitos processos fisiológicos, tais como os processos de crescimento, diferenciação e de reparação dos tecidos (FOLKMAN J, 1995; CARMELIET, P & JAIN, 2000).

No entanto, a angiogênese, quando decorrente de uma forma patológica, é conhecida como neoangiogênese, a qual é mais comum na presença de doenças inflamatórias, isquêmicas e neoplásicas (LEE et al., 2000; WATNICK et al., 2013). Segundo Folkman (1995), a maioria dos tumores e também metástases tem origem em pequenas estruturas celulares avasculares que induzem a neoformação vascular. Evidências experimentais e clínicas demonstram que a microvasculatura tumoral assume grande relevo e importância na disseminação, progressão, latência e apoptose das células tumorais (CARMELIET, P & JAIN, 2000).

A observação de que a neoangiogênese ocorre em torno de um tumor foi realizada há dois séculos, e a hipótese de que o tumor produz substâncias solúveis angiogênicas foi apresentada em 1968. Posteriormente, Folkman sugeriu que o crescimento do tumor e das metástases dependiam da angiogênese e que, desta forma, o bloqueio da neoangiogênese poderia constituir-se em uma estratégia para inibir o crescimento tumoral (EHRMANN; KNOTH, 1968; FOLKMAN, 1995). As mutações dentro dos proto-oncogenes levam à produção descontrolada de fatores de crescimento, incluindo fatores angiogênicos. Exemplo

disso são as mutações do gene p53, que aumentam a expressão de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (CARMELIET, P & JAIN, 2000)

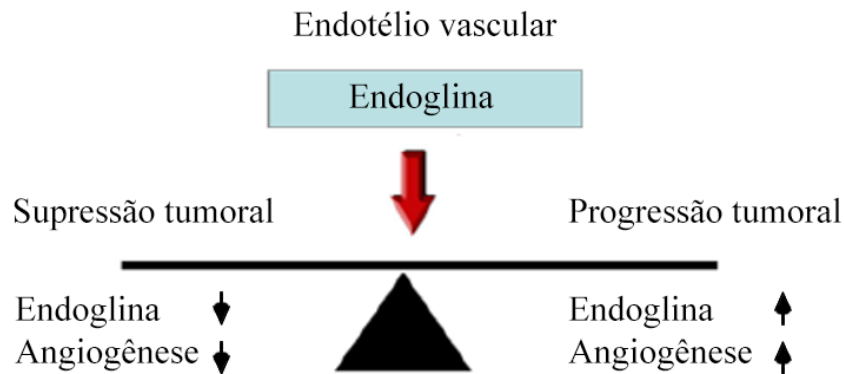
Segundo estudos experimentais e clínicos o tumor é “angiogene-dependente”, podendo as células tumorais superexpressar fatores angiogênicos tais como fator de crescimento endotelial vascular (VEFG), Interleucina 8 (IL-8), angiogenina, fator de crescimento transformador Beta (TGF- $\beta$ ) (NAOYO NISHIDA, HIROHISA YANO, TAKASHI NISHIDA, TOSHIHARU KAMURA, 2006). O principal fator e estímulo externo para a expressão destes fatores é a hipóxia, a qual pode induzir uma cascata de via de sinalização através do fator induzível de hipóxia (HIF-1) que leva a um aumento da transcrição de vários fatores neoangiogênicos (KOUKOURAKIS et al., 2002).

A neoangiogênese é essencial para progressão do tumor. Neste sentido, inúmeros estudos têm sido desenvolvidos nas últimas décadas com a finalidade de correlacionar os fatores angiogênicos e a densidade vascular com aspectos clínico-patológicos do câncer de mama. Tais estudos buscam identificar as funções e caracterizar a participação de algumas proteínas presentes na microvasculatura e também envolvidas com a proliferação de alguns tumores, dentre os quais o mamário (SCHIMMING; MARMÉ, 2002; TADBIR et al., 2012a).

Uma glicoproteína largamente citada na literatura, essencial para a proliferação do endotélio e de fases da neoangiogênese, é a endogлина, também conhecida como CD105 (CHEIFEZ et al., 1992). A maioria das funções do CD105 parecem estar associadas à sinalização de TGF- $\beta$ , uma citocina diretamente envolvida na proliferação celular, diferenciação e migração (CHEIFEZ et al., 1992; LEVI et al., 2011). Diversos estudos relatam que o CD105 é largamente expresso em tumores sólidos como mama, próstata e endométrio (EL-GOHARY et al., 2007; MINEO, 2004; NIKITEAS et al., 2007).

O CD105 aparece, pois, como um bom marcador endotelial no monitoramento terapêutico da neoangiogênese tumoral em neoplasias malignas, principalmente por participar de fases ativas de precursores endoteliais neoangiogênicos. Estudos recentes demonstram que a endogлина pode ser um marcador preditivo de metástase regional e sobrevida de pacientes oncológicos, onde há relação do aumento da microdensidade vascular (MVD) com diminuição da sobrevida em câncer urotelial do trato urinário superior (MIYATA; SAGARA; WATANABE, 2013). (Figura 2).





**Fonte:** Lopéz-Novoa e Bernabeu, 2010.

**Figura 2.** Papel da endoglina (CD105) no endotélio vascular.

Outro marcador endotelial largamente utilizado na literatura para o estudo da microdensidade vascular (MVD) é o CD31, ou molécula de adesão plaquetária do tipo 1 (PECAM-1) (MÜLLER ET AL., 2002; PRIVRATSKY; NEWMAN, 2014).

O CD31 é uma glicoproteína transmembrânica que possui um domínio extracelular que contém seis unidades de homologia similares a imunoglobulinas (Ig), as quais são da subclasse C2, típicas de moléculas de adesão intercelular. O CD31 também possui um domínio citoplasmático com locais potenciais para a fosforilação após a ativação celular, todas as características sugerem que ele esteja envolvido em eventos interativos durante angiogênese (RAKOCEVIC et al., 2017). Constitutivamente expresso pelas células endoteliais e envolvido na integridade das mesmas, o CD31 é uma molécula de adesão celular que tem participação na formação de novos vasos e ligação com a biologia das células endoteliais progenitoras (PRIVRATSKY et al., 2011; PRIVRATSKY; NEWMAN, 2014).

## 2.2 Ki-67 E ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Ki-67 é uma proteína nuclear codificada pelo gene *MIK167* (BULLWINKEL et al., 2006) e está associada à proliferação celular, a alta expressão de Ki-67 está associada a uma diminuição da sobrevida e prognóstico negativo para o câncer de mama. O Ki67 está presente em todas as fases de divisão celular, exceto na fase G0, e tendo maior expressão nas fases G2 e M (CATTORETTI et al., 1992). Estudos evidenciam que níveis acima de 40% já são considerados muito altos e têm sido associados a desfechos desfavoráveis em estudos de câncer de mama. Em inúmeros estudos a Ki-67 aparece como um indicador clínico do comportamento biológico e também de sobrevida, pois sinaliza a síntese de DNA intratumoral com um aumento da marcação da taxa proliferativa. As neoplasias sempre apresentam distúrbios em seus ciclos celulares com consequente perda de diferenciação e a formação de massas tumorais (TADBIR et al., 2012). Poucos estudos reportam sobre as taxas de Ki-67 em ductos mamários normais, porém há estudos que relatam níveis muito baixos, inferiores a 3% (URRUTICOECHEA; SMITH; DOWSETT, 2005).

COTRAN, R. S .; KUMAR, V .; COLLINS, (2000) definem o índice de proliferação celular como uma porcentagem de células de uma neoplasia que está em proliferação. Assim, a proteína Ki-67 tem sido utilizada como marcador de proliferação para determinar o prognóstico em tumores de mama. Uma metanálise envolvendo 12.155 pacientes demonstrou que a positividade do Ki-67 confere maior risco de recidiva e pior sobrevida em pacientes com câncer de mama inicial (INWALD et al., 2013).

Diante desta definição é possível afirmar que o índice de proliferação de uma neoplasia pode ser conhecido por intermédio da determinação do índice celular de proteínas que sejam específicas do seu ciclo, tal como o Ki-67, a qual tem sido utilizada por suas características como um fator prognóstico no carcinoma mamário da mulher (GASPARINI et al., 1994; SAHIN et al., 1991). Diversos estudos corroboram a utilização do Ki-67 como marcador de proliferação celular (ABADIE; AMARDEILH; DELVERDIER, 1999; BARBOSA et al., 2003; NAHED; SHAIMAA, 2016).

## 2.3 IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS

Células dendríticas (DCs) são heterogêneas e são produzidas pela medula óssea; (PALUCKA; BANCHEREAU, 2012). Sua identificação ocorreu por volta dos anos 70, quando foram observadas células em tecidos linfóides de camundongos diferenciados por apresentarem

prolongamentos citoplasmáticas, que variavam em tamanho, forma e quantidade de dendritos (STEINMAN; COHN, 1973). Divididos em subpopulações, algumas DCs estão presentes e restritas apenas aos tecidos linfóides, outras presentes nos tecidos periféricos conhecidas como DCs sentinelas com enorme potencial para fagocitose, migração e ação contra patógenos (ALEIXO; MICHELIN; MURTA, 2013; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998b; LIPSCOMB; MASTEN, 2002).

Células dendríticas apresentam em suas estruturas extensões citoplasmáticas capazes de processar um antígeno protéico e apresentá-lo em conjunto com moléculas MHC classe I e II na superfície celular, onde ele pode interagir com os receptores de células T específicas (ARDAVÍN, 2003; BANCHEREAU; PALUCKA, 2005).

Quando agentes pró-inflamatórios, infecção intracelular por vírus, ou bactérias ativam as DCs, as mesmas sofrem alteração funcionais (BANCHEREAU; PALUCKA, 2005; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). Posteriormente, migram para tecidos linfóides e passam por mudanças fenotípicas, passando a expressar altos níveis de MHC e moléculas acessórias, adquirindo a função de ativação através da apresentação cruzada de antígenos para os linfócitos T antígeno-específico (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

Alguns estudos evidenciam ainda que na presença de DCs maduras ocorre uma inibição na angiogênese (FAINARU et al., 2010), e que as células endoteliais teriam participação no recrutamento de tais DCs para a regulação das mesmas dos mecanismos de inibição da angiogênese. Zhou e pesquisadores (2013) observaram que após a depleção de células Tregs e da vacina CCL21 + anticorpo monoclonal anti-CD25 resultou em um maior recrutamento de DCs maduras com redução da formação de novos vasos e aumento da infiltração por células CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>. Desta forma, mais estudos experimentais têm evidenciado a importância do papel das DCs na resposta antitumoral.

## **2.4 TERAPIA COM IFN- $\alpha$**

O Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ), também conhecido como interferon tipo I, é produzido a partir de células leucocitárias e fibroblastos através da expressão de um grupo de genes. São citados aproximadamente 13 genes que, quando expressos corretamente, caracterizam a proteína IFN- $\alpha$ . Pertencentes ao grupo Tipo I, elas exercem diversos efeitos parácrinos (MOGENSEN et al., 1999; TOMER; BLACKARD; AKENO, 2007).

O IFN- $\alpha$  tem como principal ação a inibição da replicação viral (AGY et al., 1995). Todavia, estudos evidenciam sua utilização e eficácia no tratamento contra o câncer.

Anteriormente, havia uma ideia errada de que o IFN- $\alpha$  não poderia atuar na inibição do crescimento e também na função das células tumorais, no entanto, estudos mostraram *in vitro* e *in vivo* que o IFN- $\alpha$  pode não apenas desacelerar o crescimento de células tumorais, mas também gerar ações regulatórias e suprimir a oncogênese e aumentar a expressão da molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I (GOLOMB et al., 1986; GUTTERMAN, 1994; LASFAR et al., 2016; ROMERIO; RIVA; ZELLA, 2000). Importante salientar a existência de outros questionamentos acerca da biologia e da participação do IFN- $\alpha$  no microambiente. Todas as ações evidenciam uma atividade antiproliferativa visando o aumento do reconhecimento tumoral por IFN- $\alpha$  (DUNN et al., 2005; GUTTERMAN, 1994; LASFAR et al., 2016).

O IFN- $\alpha$  parece possuir um efeito sobre as células dendríticas (RIZZA et al., 2015). Há evidências de que pode acelerar a diferenciação de DCs, atuando como um sinal de diferenciação, contribuindo indiretamente para a resposta antitumoral e podendo assim potencializar a diferenciação de DC, aumentando no final a resposta contra células tumorais. O IFN- $\alpha$  é atualmente reconhecido como um poderoso indutor da diferenciação / ativação de células dendríticas (DCs) (RIZZA et al., 2011; SANTINI et al., 2009; SPADARO et al., 2012).

Com relação aos linfócitos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, o IFN- $\alpha$  tem contribuí também no processo de diferenciação das células T (LAPENTA et al., 2006; LE BON et al., 2003; LONGHI et al., 2009). Há estudos clínicos que evidenciam o papel antitumoral e imunomodulador do IFN- $\alpha$  em pacientes com melanoma após tratamento (TARHINI et al., 2012).

## 2.5 LINHAGEM TUMORAL 4T1

O carcinoma mamário 4T1 é uma linhagem celular de tumor transplantável com capacidade de gerar metástases de forma espontânea a partir do tumor primário na glândula mamária semelhante como ocorre em humanos. As metástases podem atingir, também, diversos locais e órgãos, tais como linfonodos, fígado, pulmões, cérebro e ossos; a disseminação é progressiva para os linfáticos drenantes e muito semelhante ao câncer de mama humano (PULASKI & OSTRAND-ROSENBERG, 2001).

A linhagem 4T1 são células de origem murina que têm características semelhantes à de um câncer de mama humano que se encontra no estágio IV de desenvolvimento. São provenientes de tecido mamário e utilizadas em modelo animal de camundongos Balb/c (ATCC ® CRL-2539™). Desta forma, trata-se de um modelo bem estabelecido dentro da literatura e

bastante utilizado em estudos na área da oncologia ((BARADARAN et al., 2017; PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001).

### 3 CONTEXTUALIZAÇÃO E HIPÓTESES

Estudos desenvolvidos e em andamento no Instituto de Pesquisa de Oncologia (IPON-UFTM) evidenciam que a imunoterapia com DCs é capaz de reduzir o tamanho tumoral, aumentar a síntese de citocinas Th1 em animais com tumor de mama e levar a uma redução da síntese de citocinas do perfil Th2 e perfil Treg. Desta forma, estando correlacionada aos padrões de imunossupressão e progressão tumoral, a neoangiogênese, também é foco de investigação após a imunoterapia com DCs, podendo as DCs maduras, segundo Dong; Aplin; Nicosia (2009), alterar a síntese de fatores neoangiogênicos, levando a uma menor formação e progressão vascular, aumentando a inibição do crescimento tumoral. Em paralelo, no mesmo instituto, estudos evidenciam aumento da resposta Th1 em mulheres não fumantes com neoplasias intraepiteliais cervicais graus II e III predominantemente causadas pelo vírus do papiloma humano (HPV) que foram tratadas com vacina intralesional de IFN- $\alpha$ .

Deste contexto levantou-se a hipótese de que a terapia combinada de células dendríticas com Interferon- $\alpha$  poderá potencializar a ação das CDs no modelo experimental proposto de câncer de mama. Referida terapia combinada poderia, também, interferir diminuindo a expressão de proteínas relacionadas à proliferação celular e microdensidade vascular no modelo de tumor de mama e aumentar a expressão de linfócitos e citocinas no baço e macrófagos peritoneais.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo tem como objetivo analisar o perfil imunológico, a densidade microvascular e a proliferação celular em camundongos fêmeas Balb/c tratados com terapia combinada (células dendríticas e Interferon- $\alpha$ ) frente ao modelo experimental de câncer de mama com linhagem 41T.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar a influência das terapias aplicadas; Interferon- $\alpha$ , terapia combinada (células dendríticas + Interferon- $\alpha$ ) e terapia de células dendríticas em linfócitos provenientes da cultura de células esplênicas (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>), e macrófagos (CD14<sup>+</sup>) através da citometria de fluxo no modelo experimental de câncer de mama com linhagem 41T.
2. Analisar a influência das terapias aplicadas; Interferon- $\alpha$ , terapia combinada (células dendríticas + Interferon- $\alpha$ ) e terapia de células dendríticas através das alterações de expressão da síntese de citocinas de células esplênicas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12 e CD25<sup>+</sup>) através da citometria de fluxo no modelo experimental de câncer de mama com linhagem 41T.
3. Avaliar por imunofluorescência o infiltrado de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, a densidade microvascular (CD31 e CD105) e a proliferação celular (Ki-67) no tumor de mama dos grupos experimentais após aplicação das terapias; Interferon- $\alpha$ , terapia combinada (células dendríticas + Interferon- $\alpha$ ) e terapia de células dendríticas.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS

Foram utilizados um total de 70 camundongos fêmeas da linhagem isogênica Balb/c, dos quais foram separados 60 para os grupos experimentais e 10 foram destinados à extração de medula óssea necessária para a produção da vacina de células dendríticas.

Os camundongos foram adquiridos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Minas Gerais (UFMG) e mantidos no biotério do Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (cujas dimensões são de 30,5 x 19 x 13 cm), separados em grupos, em ambiente claro/escuro, com temperatura controlada ( $22 \pm 5$  °C), alimentação e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e previamente aprovados no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, sob número de registro 290.

### 5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais destinados aos experimentos foram randomizados em 6 grupos, respeitando a seguinte ordem (Tabela 1), ver o desenho do estudo na (figura 3).

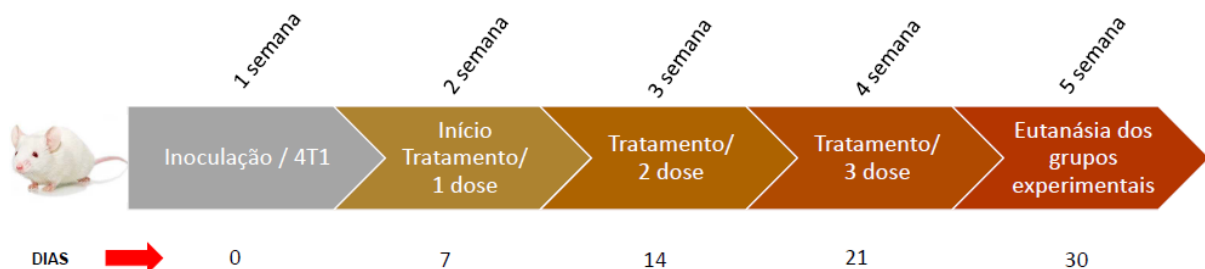
- **Grupo – Controle** (n = 10): animais sem inoculação da linhagem tumoral 4T1.
- **Grupo C + DC – Controle tratado com vacina de células dendríticas** (n = 10): animais sem inoculação da linhagem tumoral 4T1 e posteriormente tratados com células dendríticas.
- **Grupo T – Tumor tratado com solução salina 0,9%** (n = 10): animais com inoculação de linhagem tumoral 4T1 e posteriormente tratados com solução salina 0,9%.
- **Grupo T+DC – Tumor tratado com vacina de células dendríticas** (n = 10): animais com inoculação de linhagem tumoral 4T1 e posteriormente tratados com células dendríticas.
- **Grupo T+ IFN- $\alpha$  – Tumor tratado com IFN- $\alpha$**  (n = 10): animais com inoculação de linhagem tumoral 4T1 e posteriormente tratados IFN- $\alpha$ .



- **Grupo T+DC+IFN- $\alpha$  – Tumor tratado com IFN- $\alpha$  e vacina de células dendríticas** (n = 10): animais com inoculação de linhagem tumoral 4T1 e posteriormente tratados IFN- $\alpha$  e vacina de células dendríticas.

**Tabela 1 – Descrição dos grupos experimentais de acordo com a administração de 4T1 e do tratamento realizado**

Grupos	Inoculação de 4T1 $2,0 \times 10^5$	Tratamento realizado	N = (número de animais)
Grupo controle	-	Não foi realizado	10
Grupo controle / DC	-	Vacina com DC	10
Grupo Tumor	+	Vacina com SF 0,9%	10
Grupo Tumor	+	Vacina com DC	10
Grupo Tumor	+	Vacina com IFN- $\alpha$	10
Grupo Tumor	+	Vacina com DC + INF- $\alpha$	10



**Figura 3.** Representação do desenho do estudo, incluindo a indução tumoral com a linhagem 4T1 e a eutanásia.

### 5.3 INDUÇÃO DE TUMORES COM A LINHAGEM 4T1

A linhagem tumoral 4T1 é conhecida na literatura como potente indutor na formação de tumores de mama em roedores. As células 4T1 foram mantidas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) completo em estufa de CO<sup>2</sup> com 5% a 37 °C. A inoculação foi administrada em dose única na região do último par de mamas do animal. Desta forma camundongos Balb/c fêmeas entre 8-12 semanas de vida foram submetidos à indução de células

da linhagem tumoral 4T1 com volume de 50  $\mu$ l com concentração de  $2,0 \times 10^5$  células por animal entre o último par de mamas de cada animal dos grupos GIII, GIV, GV e GVI.

#### 5.4 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DA MEDULA ÓSSEA DO FÊMUR E TÍBIA DE CAMUNDONGOS

Os animais foram eutanasiados com superdosagem de anestésicos, Cloridrato de Ketamina (90 mg/kg) e Xilazina (15 mg/kg). CDs foram obtidas segundo protocolo de Lutz et al. (1999) adaptado, onde células da medula óssea foram extraídas do fêmur e também da tíbia de camundongos Balb/c com a ajuda de uma seringa 13 x 4,5 com solução tampão PBS, e diferenciadas em cultura. Em seguida foi adicionado meio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) completo, com 0,1 mM de vitaminas, 2 mM de L-glutamina, 100  $\mu$ g/ml de Gentamicina (Sigma). Posteriormente, estas células de medula óssea foram adicionadas em numa quantidade de 7,5 mL para cada garrafa de cultura, com concentração de  $32 \times 10^6$  células por garrafa. Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) foram adicionados com concentração 20  $\mu$ l (10 ng/ $\mu$ L) e interleucina 4 (IL-4). As culturas foram mantidas em câmaras de CO<sup>2</sup> a 5% a 37 °C por mais 5 dias. No sétimo dia as células receberam 40  $\mu$ l (10 ng/ $\mu$ L) de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), seguido de 40  $\mu$ l de lisado antígeno tumoral de 4T1.

#### 5.5 IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS

Camundongo dos grupos GII, GIV e GVI receberam 3 doses de imunoterapia de células dendríticas, sendo uma dose por semana, no volume de 50  $\mu$ L em uma concentração de  $5 \times 10^6$  células dendríticas. A imunoterapia teve início na primeira semana subsequente à semana da aplicação da linhagem tumoral 4T1. O grupo GIII grupo tumor tratado com solução salina, foram administradas desta forma 3 doses de 50  $\mu$ L de solução salina 0,9% nas semanas subsequente à aplicação de 4T1 seguindo o mesmo procedimento para que foi aplicado os demais grupos GII, GIV e GVI.

#### 5.6 IMUNOTERAPIA COM IFN- $\alpha$

Camundongos dos grupos GV e GVI, receberam a terapia com IFN- $\alpha$ . Assim, foram administradas 3 doses, sendo uma dose por semana, contendo  $2,1 \times 10^5$  UI de IFN- $\alpha$  em um

volume de 70  $\mu\text{L}$ . A aplicação foi realizada na semana subsequente à inoculação das células 4T1. Nos camundongos do grupo GVI, foi realizada a terapia combinada, com IFN- $\alpha$  e  $5 \times 10^6$  células dendríticas. A aplicação foi feita sob via subcutânea no dorso do animal. O IFN- $\alpha$ , utilizado foi o comercial “Blauferon-B Alfainterferona 2-B” da empresa Blausegel, o qual vem liofilizado e acompanhado do diluente de 1 mL. O frasco possui o total de 3 milhões de UI. O fármaco está inscrito sob o lote 0806040/3.

## 5.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Ao final da terceira dose da vacina aguardou-se uma semana e, ao fim da quarta semana, procedeu-se a eutanásia dos camundongos. Os animais foram eutanasiados com superdosagem de anestésicos, Cloridrato de Ketamina (90 mg/kg) e Xilazina (15 mg/kg). Todo o material biológico para análise foi retirado e devidamente armazenado. Os restos mortais dos animais foram devidamente entregues para descarte junto ao técnico responsável do setor de coleta da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

## 5.8 CITOMETRIA DE FLUXO DE CÉLULAS ESPLÊNICAS E MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Após a obtenção de células do baço e macrófagos peritoneais as mesmas foram colocadas em solução de lise (BD Bioscience – FACST<sup>TM</sup> *lysing solution*) na proporção de 1:20. Após incubação à temperatura ambiente por 20 minutos as células foram centrifugadas, 10 minutos à 4 °C em rotação de 290 g. Após centrifugar o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e centrifugou-se por 3 vezes com PBS (solução salina tamponada com fosfato). Em seguida foi adicionado proteína transportadora inibitória (BD Golgisto<sup>TM</sup>) na proporção de 2  $\mu\text{L}$  para cada 3 ml de solução de células do baço, incubou-se por 20 minutos e centrifugou-se com PBS; em seguida a contagem de células na Câmara de Neubauer foi realizada adicionando-se 180  $\mu\text{L}$  de solução de Turk e 20  $\mu\text{L}$  da amostra de células. Para cada tubo de citometria foram adicionados  $1,0 \times 10^6$  células. Após a preparação das amostras foi feita a primeira marcação com 0,5  $\mu\text{L}$  de anticorpo de marcação de superfície  $2,0 \times 10^6$  células/tubo. Os anticorpos extracelulares utilizados foram: anti-CD3 FITC, anti-CD4 PeCy 5.0, anti-CD14

PE (Tabela 3). Após 30 minutos de incubação com anticorpo a 4 °C ao abrigo da luz centrifugou-se as células com PBS 1x, sendo 1 mL por tubo, por 10 minutos, 4 °C e 290 g.

Para marcação intracelular foi adicionado aos tubos 100 µL de solução de permeabilização e fixação (BD Citofix/Cytoperm™), em cada tubo, incubadas a 4 °C por 20 minutos. As células foram então marcadas com os anticorpos intracelulares por 30 minutos a 4 °C. os anticorpos utilizados foram: anti-TNF- $\alpha$  PE, anti-IL-12 PE, anti-IFN- $\gamma$  FITC, anti-IL-10 FITC (Tabela 2). Após a incubação as células foram centrifugadas por mais duas vezes com o tampão de lavagem BD Perm/wash 1x centrifugando por 10 minutos, 4 °C e 290 g. Foi realizada marcação intracelular por 30 minutos a 4 °C no escuro e centrifugou-se 2 vezes com tampão de lavagem BD Perm/wash. A solução foi ressuspendida para 500 µL em PBS para leitura no citômetro BD FACSCalibur™.

**Tabela 2 – Marcações intra e extracelulares para as células do baço**

Descrição dos tubos	Marcações extracelulares	Marcações intracelulares
1	Controle permeabilizado	-
2	$\alpha$ -CD3 FITC + $\alpha$ -CD4 PeCy 5.0	$\alpha$ -TNF- $\alpha$ PE
3	$\alpha$ -CD3 FITC + $\alpha$ -CD4 PeCy 5.0	$\alpha$ -IL-12 PE
4	$\alpha$ -CD4 PeCy 5.0 + $\alpha$ -CD25 PE	$\alpha$ -INF- $\gamma$ FITV
5	$\alpha$ -CD4 PeCy 5.0 + $\alpha$ -CD25 PE	$\alpha$ -TNF- $\alpha$ PE
6	$\alpha$ -IgG1 FITC + IgG2A PeCy 5.0 + $\alpha$ -IgG 2B PE	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

**Tabela 3 – Marcações intra e extracelulares para macrófagos peritoneais**

Descrição dos tubos	Marcações extracelulares	Marcações intracelulares
1	Isotipo – $\alpha$ -IgG1-FITC	$\alpha$ -IgG PE
2	$\alpha$ -CD14 FITC	$\alpha$ -TNF- $\alpha$ PE
3	$\alpha$ -CD14 FITC	$\alpha$ -IL-12 PE

## 5.9 PREPARAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA: COLETA E PROCESSAMENTO

Para a análise do infiltrado tumoral após a cuidadosa remoção cirúrgica dos tumores de mama de cada animal, o tecido tumoral foi imediatamente identificado e colocado em um meio de glicóis e resinas hidrossolúveis – *tissue tek* O.C.T<sup>®</sup> e, posteriormente, armazenado no *freezer* a uma temperatura de -80 °C para preservação do tecido. Para a análise da imunofluorescência apenas o grupo controle/controlado não foi incluído, visto que a literatura não evidência altas taxas ou diferenças dos marcadores aqui propostos e relação clínica ou experimental no tecido de mama normal. Foram randomizados 6 blocos de *tissue tek*<sup>®</sup> sendo um n = 6 (Tabela 4) peças tumorais de cada grupo, totalizando 90 peças e 450 cortes marcados para estudo e análise.

**Tabela 4 – Descrição dos grupos experimentais para análise do tecido tumoral por Imunofluorescência**

Grupos	Inoculação de 4T1 2,0 x 10 <sup>5</sup>	Tratamento realizado	N = (número de animais)
Grupo controle / CDs	-	Vacina com DC	6
Grupo Tumor	+	Vacina com SF 0,9%	6
Grupo Tumor	+	Vacina com DC	6
Grupo Tumor	+	Vacina com IFN- $\alpha$	6
Grupo Tumor	+	Vacina com DC + INF- $\alpha$	6

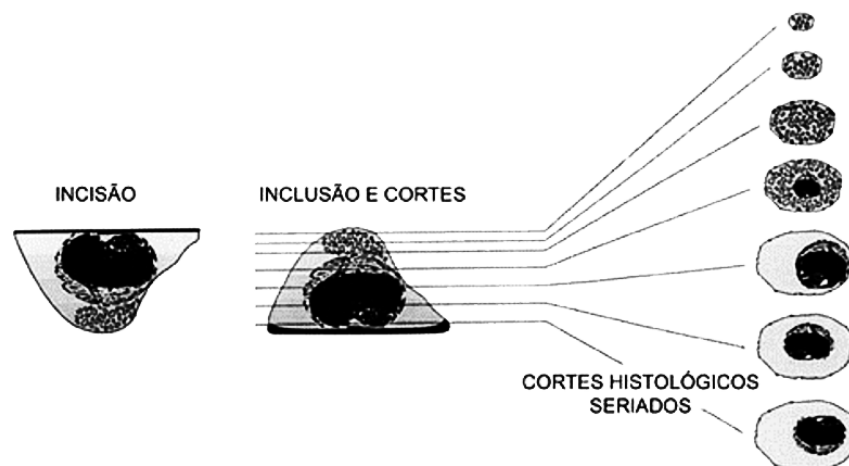
## 5.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

Para análise dos tumores de mama através da expressão de CD3, CD4, CD8, CD31, CD105 e Ki-67 foram utilizados os seguintes anticorpos (Tabela 5).

Tabela 5 – Descrição dos anticorpos utilizados na técnica de imunofluorescência direta

Anticorpos	Herdeiro/Espécie	Especificações Marca	Diluição	Número de catálogo
CD3 FITC	Rat IgG <sub>2b</sub> , κ	BD Pharmingen™	1/500	561798
CD4 PE-Cy™ 5	Rat IgG <sub>2a</sub> , κ	BD Pharmingen™	1/50	553050
CD8a APC	Rat IgG <sub>2a</sub> , κ	BD Pharmingen™	1/100	553035
CD31 FITC	Mouse/IgG <sub>2a</sub> , κ	BD Pharmingen™	1/500	553372
CD105 PE	Rat IgG <sub>2a</sub> , κ	BD Pharmingen™	1/250	562759
Ki-67 PE	Mouse/IgG1, κ	BD Pharmingen™	1/250	556027

O tecido tumoral criopreservado e previamente randomizado foi retirado do *freezer* -80 °C e embocado no molde do cabeçote do criostato Leica CM1950 ® aonde foram realizados cortes de 10µm e fixados em lâminas pré-silanizadas para microscopia, tamanho 25,4 x 76,2 mm e espessura de 1,0 a 1,2 mm RD system ® (Figura 3). Todas as peças tumorais randomizadas para o estudo foram criocortadas e mantidas em ordem crescente em um porta-

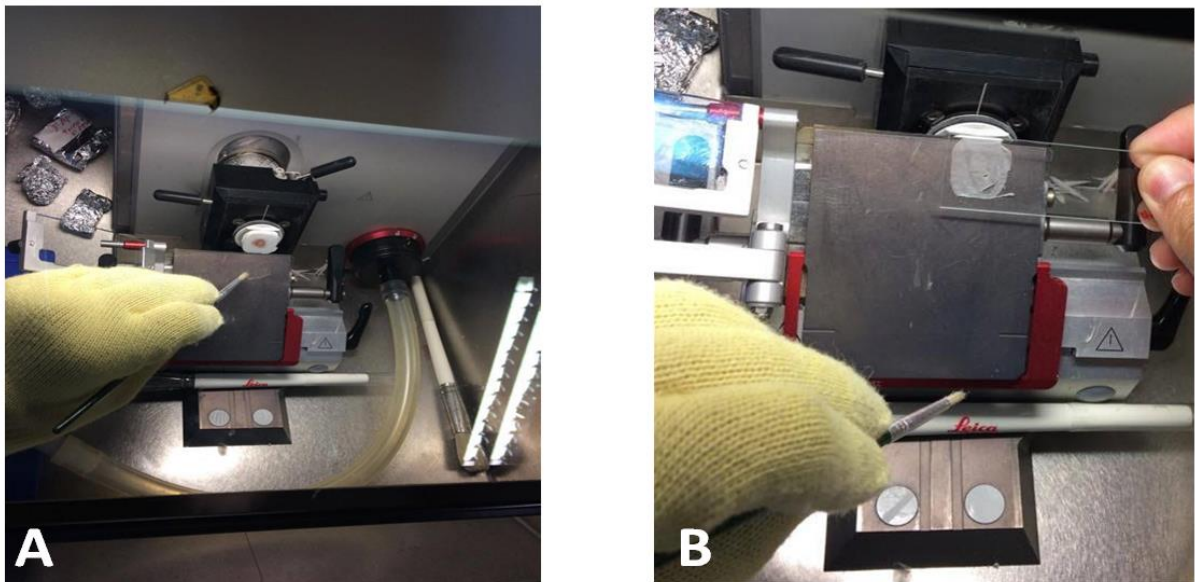


Fonte: Terzian, 2011.

**Figura 4.** Desenho esquemático ilustrando a adaptação do método de Munique. Os cortes seriados dão uma visão tridimensional do tumor e de suas relações com as margens cirúrgicas. Neste esquema podemos ver importância e diferenças da lesão tumoral com relação ao núcleo e periferia e importância da randomização dos cortes para análise.

lâminas a fim de controlar o seguimento e o nível do tumor estudado, uma adaptação do Método de Munique (FIGUEIREDO KOPKE, 2003) (Figura 4).

Há respostas distintas quando são avaliados diversos componentes do infiltrado tumoral bem como das regiões peri e intratumoral de um tecido lesionado. Porém este não foi o foco do estudo. O procedimento adotado teve como meta a obtenção da homogeneidade do estudo e da análise do tecido tumoral, sendo 5 lâminas de cada bloco criocortadas com tecido fixado: a primeira, décima, vigésima, trigésima e a quadragésima lâmina foram imunomarcadas com os respectivos anticorpos em estudo.



**Fonte:** Elaborado pelo Autor

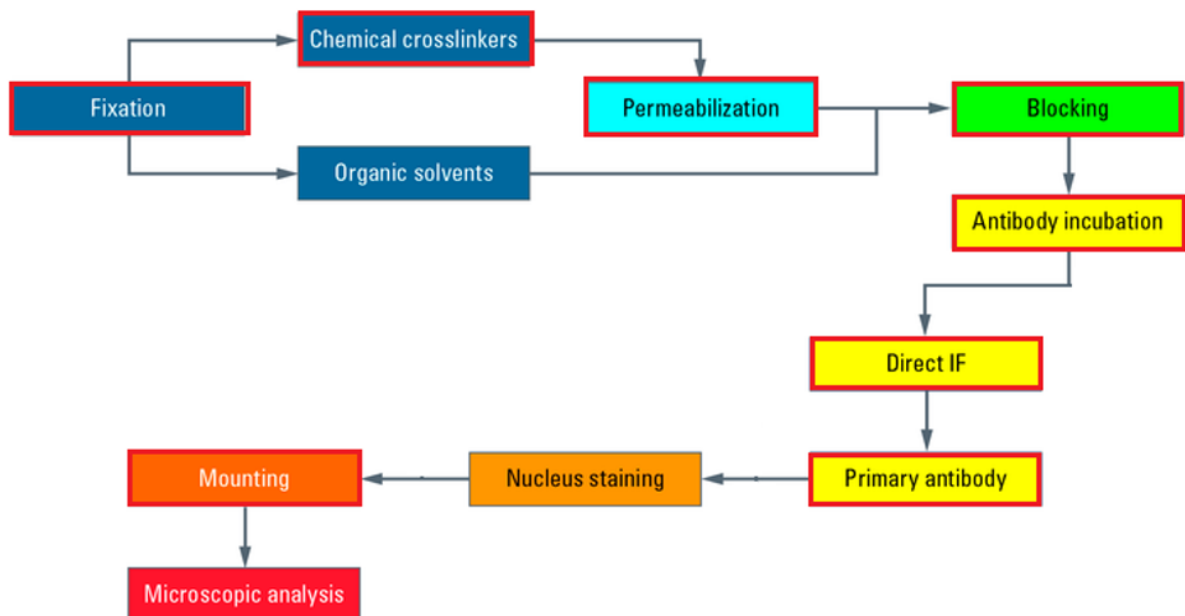
**Figura 5.** (A) O tecido tumoral criopreservado em molde para realização do corte em 10  $\mu\text{m}$ . (B) Corte do tecido tumoral e fixação na lâmina a  $-20^\circ$  no criostato Leica CM1950®

O tecido tumoral foi fixado com Paraformaldeído (PFA) 4%, por 10 minutos em temperatura ambiente. O fixador foi escolhido após padronização com relação ao tempo e demais tipos de fixadores descritos na literatura. Para tal, realizou-se análise morfológica por coloração de Hematoxilina e Eosina (HE). Após fixação com (PFA) 4%, a solução de PBS 1X (*Phosphate-Buffered Saline*) foi utilizada para a lavagem do tecido fixado. Posteriormente, os cortes passaram por uma etapa de bloqueio com solução de BSA (*Bovine Serum Albumin*) a

3% + PBS 1X, em temperatura ambiente, por 2 h. Após o bloqueio, os anticorpos foram diluídos seguindo a padronização descrita previamente (Tabela 4) e incubados em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 2 h (CD3, CD31, CD105) e por 3 h (CD4, CD8). Ao final da incubação, realizou-se a lavagem das lâminas com PBS e a montagem das lâminas com solução glicerol 2% + PBS. Em cada reação realizada e padronizada foi colocado um controle positivo e negativo, para determinar a viabilidade da marcação positiva e do anticorpo em estudo.

### 5.10.1 MARCAÇÃO COM Ki-67

Para a marcação do anticorpo intracelular Ki-67 a técnica foi realizada como descrita para aos demais anticorpos. Porém foi realizada a permeabilização com solução *Tween20* ® 0,05% + PBS1X e posterior bloqueio com solução de BSA (*Bovine Serum Albumin*) a 3%. O anticorpo foi previamente diluído 1/250 em *Tween20* ® 0,05% + PBS e incubado a 4 °C, por 20 h, *overnight*. No dia seguinte, ao final da incubação, realizou-se a lavagem das lâminas com PBS. Ao final, foi realizada a montagem das lâminas com solução glicerol 2% + PBS (Figura 5).



Fonte: *Science Lab*, 2017.

**Figura 6.** Fluxograma adaptado de *Science Lab* ilustra todo o procedimento realizado para os anticorpos extracelulares e quando permeabilizado para o intracelular

## 6 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA



As imagens foram capturadas através do sistema Microscópio Invertido Eclipse TI-E Nikon ®. Posteriormente, as imagens foram quantificadas e analisadas através do *software NIS-Elements Advance Research* ® desenvolvido pela Nikon.

Para aquisição das imagens por meio da microscopia, foram selecionados quatro campos por corte, sendo cada um previamente visualizado e focado na objetiva de 10x e 40x. Realizou-se a captura de 25 imagens por campo, primeiramente do quadrante superior esquerdo, logo após direito e, posteriormente, do quadrante inferior esquerdo e direito utilizando o mesmo padrão para todas as lâminas, obtendo células marcadas e não marcadas. A imunorreatividade foi quantificada pela média de intensidade de fluorescência da área de expressão, morfologia e distribuição das células no tecido.

## 6.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos ao programa o GraphPad Prism Versão 5.01 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA) e todos os dados foram verificados quanto à distribuição normal, por meio dos testes de normalidade. Desta maneira, quando as amostras assumiram normalidade, o teste de análise de variância (ANOVA) com Post-Hoc Turkey foi utilizado para três ou mais comparações entre grupos. Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  DP, com  $p < 0,05$ . Para comparações de dados que não foram homogêneos quanto ao teste de normalidade, foi empregado o teste de Kruskal-Wallis com Post-Hoc Dunn's. Os resultados foram expressos em mediana  $\pm$  e valores máximo e mínimo. Considerou-se sempre  $p < 0,05$ , para valores estatisticamente significativos.

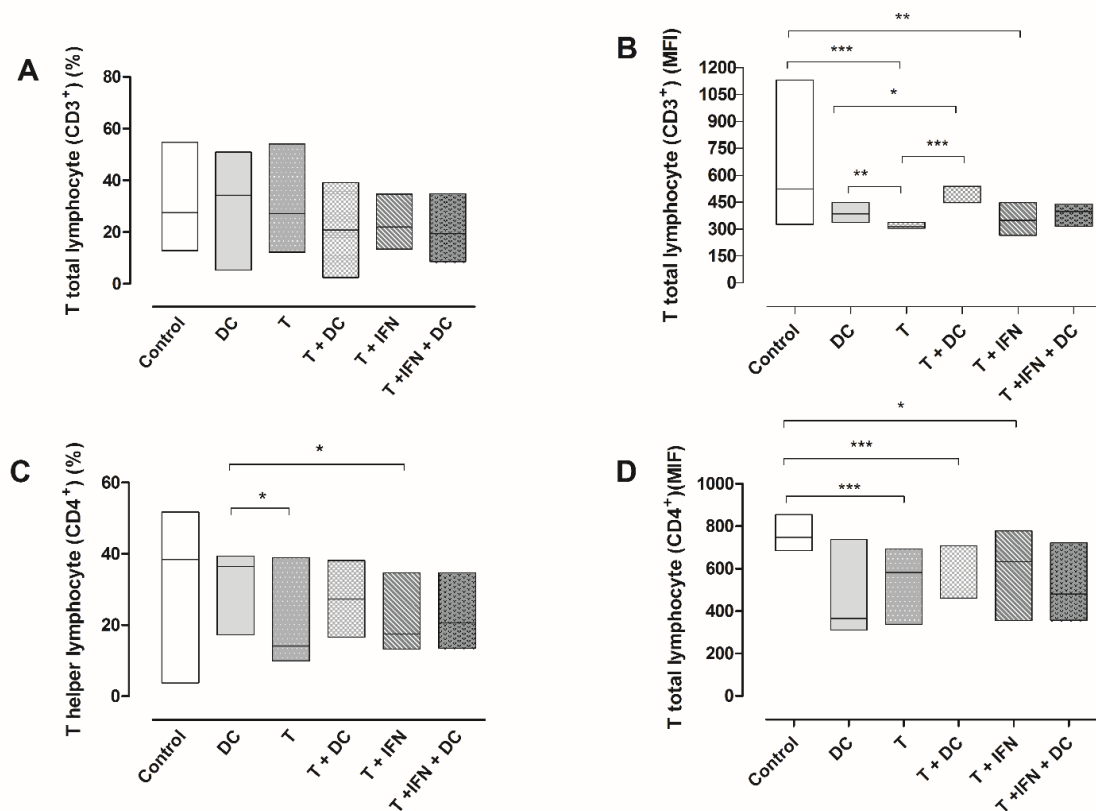
## 7 RESULTADOS

### 7.1 EXPRESSÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO EM CÉLULAS ESPLÊNICAS

A presença de linfócitos T totais e de linfócitos T auxiliares foi avaliada através das moléculas de superfície CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, respectivamente, e expressa através da mediana (máximo e mínimo) da % *gate* (número de células duplo positivas para cada marcador) e intensidade de fluorescência (FI) (quantidade de células duplo positivas independentes da quantidade de células positivas) nas células esplênicas.

Na identificação e expressão de linfócitos T totais e linfócitos T *helper* no baço é possível observar que não houve diminuição significativa da expressão de CD3<sup>+</sup> na presença da imunoterapia isolada, da vacina com Interferon- $\alpha$  ou da imunoterapia combinada quando comparadas aos controles e ao grupo tumor (Figura 7A). No entanto, ao analisar a intensidade de fluorescência, foi verificado, um aumento de linfócitos totais CD3<sup>+</sup> no grupo tratado com células dendríticas (T + DC) com  $p < 0,05$  em relação ao grupo (DC) e  $p < 0,01$  em relação ao grupo tumor. Diferença estatística foi observada, também, entre os grupos tratados com células dendríticas (T + DC) vs. (T), com  $p < 0,001$ . Observou-se, também, diferença estatística para os grupos (C) vs. (T), com  $p < 0,001$  nos quais houve uma diminuição de proteínas duplo positivas intensidade de fluorescência (FI) na presença do tumor em relação ao controle (Figura 7B).

Linfócitos CD4<sup>+</sup> apresentaram maiores diferenças significativas apenas para os grupos (DC) vs (T) e (DC) vs (T + CD + IFN- $\alpha$ ) com  $p < 0,05$ , para ambos grupos. A baixa expressão do grupo (T) e (T + IFN- $\alpha$ ) possibilitou a diferença estatística aqui evidenciada (Figura 7C). Com relação a (FI) para CD4<sup>+</sup>, ficou evidenciada uma alta expressão no grupo (C). Desta maneira, diferenças significativas foram observadas para (C) vs (DC), (T), (T + DC) e (T + IFN- $\alpha$ ) com  $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ , respectivamente (Figura 7D).



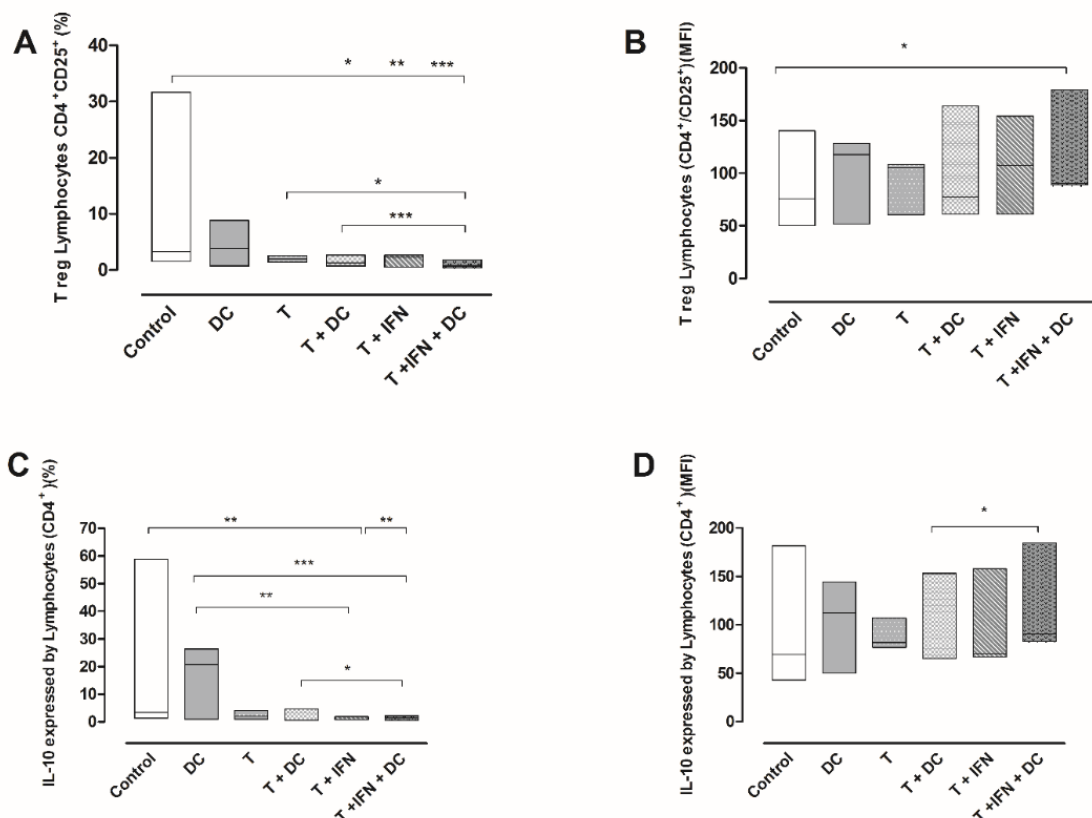
**Figura 7.** Frequência de linfócitos T totais CD3<sup>+</sup> (A), linfócitos T *helper* CD4<sup>+</sup> (C) e intensidade de fluorescência CD3<sup>+</sup> (B), CD4<sup>+</sup> (D) em células esplênicas após a imunoterapia com vacina de DCs terapia combina e vacina de IFN- $\alpha$ . Os resultados foram expressos em mediana % de *gate* para CD3<sup>+</sup> (A) e CD4<sup>+</sup> (C) e intensidade de fluorescência (MFI) CD3<sup>+</sup> (B), CD4<sup>+</sup> (D). As diferenças observadas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (5%), onde \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

Com relação à frequência de marcação para linfócitos T regulatórios CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, foi possível observar na (Figura 8A) que os grupos (T + DC) e (T + IFN $\alpha$  + DC), ou seja, que receberam a imunoterapia com DCs de forma isolada e também combinada com IFN $\alpha$ , apresentaram as menores porcentagens de *gate* quando comparados aos demais grupos, sendo estatisticamente significativo em relação ao grupo tumor (T) vs (T + IFN $\alpha$  + DC) com  $p < 0,05$  e (T + DC) vs (T + IFN- $\alpha$  + DC) com  $p < 0,001$ , respectivamente.

Diferenças significativas também foram encontradas quando o controle foi comparado aos demais grupos (C) vs (T + DC), (T + IFN $\alpha$ ) e (T + IFN $\alpha$  + DC) sendo  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente. Em contrapartida, com relação à intensidade de fluorescência (IF) para CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>, foi observado um aumento significado no grupo terapia combinada quando comparado com o grupo controle (C) vs (T + IFN $\alpha$  + DC)  $p < 0,05$ . Assim, nos grupos (T + DC) e (T + IFN $\alpha$  + DC), respectivamente, foram observados 77,3 e 90,46 de porcentagem de mediana de fluorescência, o que se mostrou menor, quando comparado ao grupo tumor sem tratamento (T) 105,3%, porém os dados não foram significantes (Figura 8B).

Com comportamento semelhante ao  $CD4^+/CD25^+$  na dupla marcação de células  $CD4^+$  para IL-10, foi verificada uma diminuição na intensidade de fluorescência (Figura 8C) nos grupos com terapia de  $IFN\alpha$  (T +  $IFN\alpha$ ) e terapia combinada (T +  $IFN\alpha$  + DC), quando comparamos o grupo tumor (T + DC) vs. (T +  $IFN\alpha$  + DC), com  $p < 0,05$ .

Quanto ao grupo (CD) quando comparado aos grupos (T +  $IFN\alpha$ ) e (T +  $IFN\alpha$  + DC), respectivamente, os mesmos demonstraram diminuição com diferença estatística (DC) vs. (T +  $IFN\alpha$  + DC)  $p < 0,001$  e (DC) vs. (T +  $IFN\alpha$ )  $p < 0,01$ . Em consonância com a intensidade de fluorescência (IF) de  $CD4^+/CD25$ , o grupo que recebeu a terapia isolada com CDs apresentou menor porcentagem 65,11 de IF para dupla marcação de células  $CD4^+$  para IL-10, quando comparado ao grupo tumor T 81,82 de MFI. A terapia isolada também mostrou capacidade de diminuir a intensidade da dupla marcação comparada ao tumor 70,19 de MFI, porém sem diferença estatística. Comparadas as medianas de porcentagem observados diferença entre a imunoterapia isolada (T + DC) vs. (T +  $IFN\alpha$  + DC), com  $p < 0,05$ .



**Figura 8.** Frequência de linfócitos T regulatórios  $CD4^+ CD25^+$  (A), IL-10 expressos por  $CD4^+$  (B) e intensidade de fluorescência para  $CD4^+ CD25^+$  (C) e IL-10 expressadas por  $CD4^+$  (D) em células esplênicas após a imunoterapia com vacina de CDs terapia combina e vacina de  $IFN-\alpha$ . Os resultados foram expressos em mediana, % de gate para  $CD4^+ CD25^+$  (A) e IL-10 expressadas por  $CD4^+$  (C) e intensidade de fluorescência (MFI)  $CD4^+ CD25^+$  (B), e IL-10 expressadas por  $CD4^+$  (D). As diferenças observadas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (5%), onde \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

Com relação à dupla marcação das células CD4<sup>+</sup> para IFN- $\alpha$  e a frequência, foi possível verificar na Figura 9A que houve diferença estatística entre os grupos (T + DC) vs. (T + IFN- $\alpha$  + DC)  $p < 0,05$ , assim como (T + IFN- $\alpha$  + DC), comparado aos grupos controle e controle (C) dendríticas (DC), sendo  $p < 0,001$  para ambos. Foi evidenciado, assim, uma diminuição da expressão de IFN- $\alpha$  na presença do tumor, porém, quando na presença da imunoterapia com células dendríticas isoladamente, observou-se um aumento da expressão de IFN- $\alpha$  por CD4<sup>+</sup>. De forma contrária, foi observado um aumento de IFN- $\alpha$  expresso por CD4<sup>+</sup> através de MIF nos grupos (T + DC), (T + IFN- $\alpha$ ) e (T + IFN- $\alpha$  + DC), porém sem significância (Figura 9B).

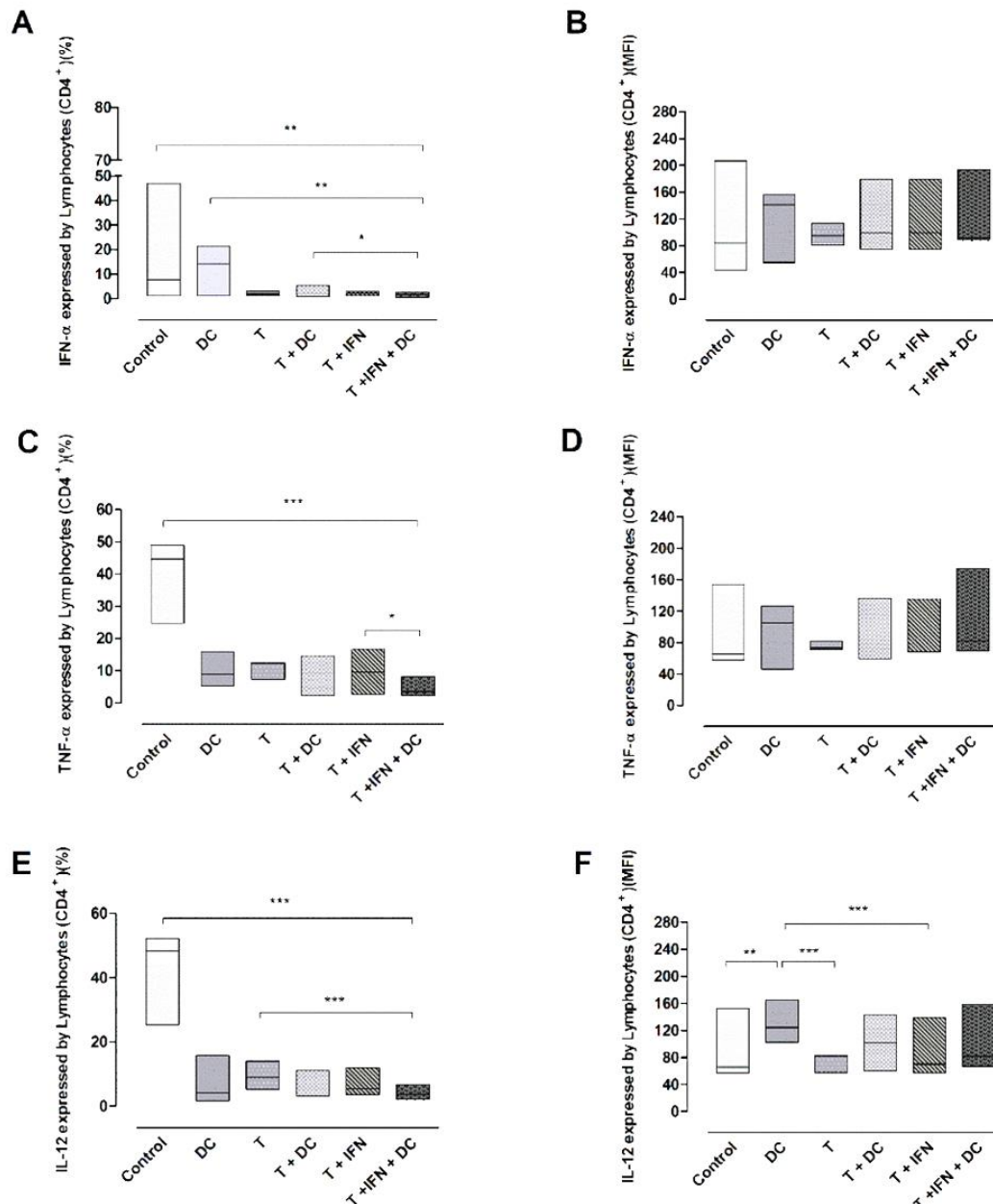
Na Figura 9C foi analisada a participação de CD4<sup>+</sup>/TNF- $\alpha$ . Verificou-se uma diminuição da expressão de células duplo positivas tanto na presença de interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) isoladamente, quanto na presença da terapia combinada, sendo que houve diferença estatística quando comparado os grupos (T + IFN- $\alpha$ ) vs. (T + IFN- $\alpha$  + DC) com  $p < 0,05$  e diferença estatística com relação ao grupo controle sem tratamento (C) vs. (T + IFN- $\alpha$  + DC), com  $p < 0,001$ . Observou-se, também, um aumento da percentagem de mediana de forma geral no grupo tumor que recebeu tratamento com DCs de forma isolada (T) vs (T + DC), no entanto, sem diferença estatística.

Na análise de IF para CD4<sup>+</sup>/TNF- $\alpha$ , verificou-se que na presença da imunoterapia, seja ela de forma isolada no (T + DC), ou combinada (T + IFN- $\alpha$  + DC), a resposta foi positiva com relação ao grupo tumor sem tratamento (T), aonde a percentagem de IF aumentou, no entanto, sem diferença estatística (Figura 9D).

Para IL-12 foi analisada a dupla marcação CD4<sup>+</sup>/IL-12. Foi observado que na presença da imunoterapia com DCs ocorreu um aumento da produção de células expressas, quando comparadas ao grupo tumor sem tratamento (T). Verificou-se que no grupo tratado com DCs (T + DC), comparando-se as percentagens de medianas, houve um aumento da expressão da dupla marcação, (T) 8,950 vs. (T + DC) 11,19, porém sem significância estatística. No entanto, na presença do Interferon- $\alpha$  e da terapia combinada, houve diminuição da expressão destas células com relação ao grupo tumor (T) 8,950 vs (T + IFN- $\alpha$ ) 5,450 e (T + IFN- $\alpha$  + DC) 3,690, respectivamente.

Diferenças estatísticas foram observadas quando comparados os grupos (C) vs. (T + IFN- $\alpha$  + DC) e (T) vs. (T + IFN- $\alpha$  + DC), com  $p < 0,001$  (Figura 8E). Na análise da FI novamente foi constatada uma diminuição da intensidade de fluorescência no grupo tumor sem tratamento (T) com diferença estatística para o grupo que recebeu apenas imunoterapia com DCs sem tumor, grupo (DC)  $p < 0,001$  e grupo (T + IFN- $\alpha$ )  $p < 0,001$ . O grupo (DC) apresentou diferença estatística para (FI) em relação ao grupo controle (C) com  $p < 0,001$ .

Observou-se um aumento das medianas sem diferença estatística do grupo tumor comparado ao grupo tumor imunoterapia isolada de DCs (T) 81,12 vs. (T + CD) 101,2 (T + IFN- $\alpha$  + DC). A terapia combinada não foi capaz de aumentar os níveis de (FI) com relação ao tumor (T) 81,12 vs. (T + IFN- $\alpha$  + DC) 81,49, assim como a vacina com interferon também não foi capaz de aumentar os níveis de (MFI) em relação ao grupo tumor sem tratamento (T) 81,12 vs. (T + IFN- $\alpha$ ) 69,89 (Figura 9F).



**Figura 9.** Frequência de linfócitos T *helper* expressando IFN- $\alpha$  (A), TNF- $\alpha$  (B) e IL-12 (C) expressas por CD4<sup>+</sup>. A intensidade de fluorescência para CD4<sup>+</sup>/IL-10 (B) foi analisada em células esplênicas após a imunoterapia com vacina de CDs terapia combina e vacina de IFN- $\alpha$ . Os resultados foram expressos em mediana, % de *gate* (A) e citocinas expressadas por CD4<sup>+</sup> (B), D e F. A e intensidade de fluorescência (MFI) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (B), e IL-10 expressadas por CD4<sup>+</sup> (D). As diferenças observadas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (5%), onde \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

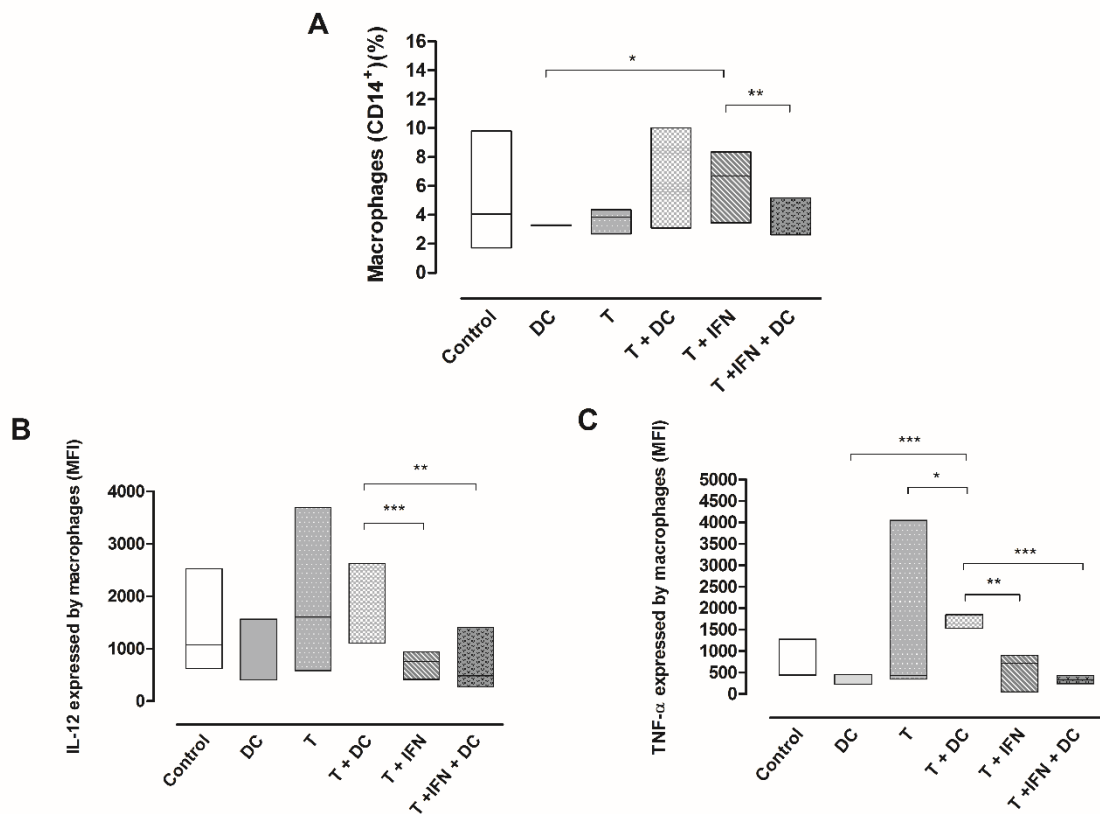
## 7.2 EXPRESSÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Analisaram-se, também, as duplas marcações para macrófagos, sendo elas CD14<sup>+</sup>/TNF- $\alpha$  e CD14<sup>+</sup>/IL-12. Foi possível observar que as imunoterapias com DC de forma isolada, grupo (T + DC), e a vacina com Interferon- $\alpha$  (T + IFN- $\alpha$ ) foram capazes de aumentar a expressão de CD14<sup>+</sup> comparado ao grupo tumor. Porém o grupo terapia combinada (T + IFN- $\alpha$  + DC), quando comparada aos demais apresentou diminuição de sua expressão. Foram verificadas diferenças estatísticas entre os grupos (T + IFN- $\alpha$ ) vs. (T + IFN- $\alpha$  + DC)  $p < 0,01$  e também entre o grupo (DC) vs. (T + IFN- $\alpha$ )  $p < 0,05$ .

Com relação à intensidade de fluorescência (FI) da dupla marcação CD14<sup>+</sup>/IL-12, foi novamente verificada uma diminuição da (FI) no grupo que recebeu a terapia combinada (T + IFN- $\alpha$  + DC), sendo significativamente diferente comparada ao grupo (T + DC)  $p < 0,01$ , da mesma forma foi verificada uma diminuição da expressão da dupla marcação para o grupo que recebeu a vacina de Interferon IFN- $\alpha$ , sendo também significativamente diferente comparado ao grupo (T + DC)  $p < 0,001$ . Observou-se também que a expressão de (FI) através da mediana mostrou que a vacina com DCs no grupo tumor (FI) em relação ao grupo tumor sem tratamento (T) 1606 vs. (T + DC) 2629, porém sem significância.

De comportamento semelhante a CD14<sup>+</sup>/IL-12, foi analisada a dupla marcação para CD14<sup>+</sup>/TNF- $\alpha$ . Verificou-se que a imunoterapia combinada (T + IFN- $\alpha$  + DC) na presença do tumor apresentou novamente uma baixa (FI) se comparada aos demais grupos como vacina com interferon (T + IFN- $\alpha$ ), (T + DC), (T) e também ao grupo (DC). Da mesma forma o grupo (T + IFN- $\alpha$ ) apresentou (FI) baixa em relação ao grupo (T + DC) e (T). Foram verificadas diferenças estatísticas entre (T + DC) vs (T + IFN- $\alpha$ ),  $p < 0,01$  e (T + DC) vs. (T + IFN- $\alpha$  + DC)  $p < 0,001$ . A terapia isolada com CD, grupo (T + DC) apresentou (FI) através da mediana maior quando comprada ao tumor (T) 427,3 vs (T + DC) 1855.





**Figura10.** Frequência de macrófagos (A), pela percentagem de *gate*, e intensidade de fluorescência IL-12 (B) e TNF- $\alpha$  (C) expressadas por (MFI). A intensidade de fluorescência para CD14<sup>+</sup>/IL-12 e (B), foi analisada em células esplênicas após a imunoterapia com vacina de CDs terapia combina e vacina de IFN- $\alpha$ . Os resultados foram expressos em mediana, % de *gate* (A) e citocinas expressadas por CD4<sup>+</sup> (B), D e F. A e intensidade de fluorescência (MFI) CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (B), e IL-10 expressadas por CD4<sup>+</sup> (D). As diferenças observadas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (5%), onde \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 7.3 ANÁLISE DE LINFÓCITOS INFILTRANTES POR IMUNOFLUORESCÊNCIA NO TUMOR

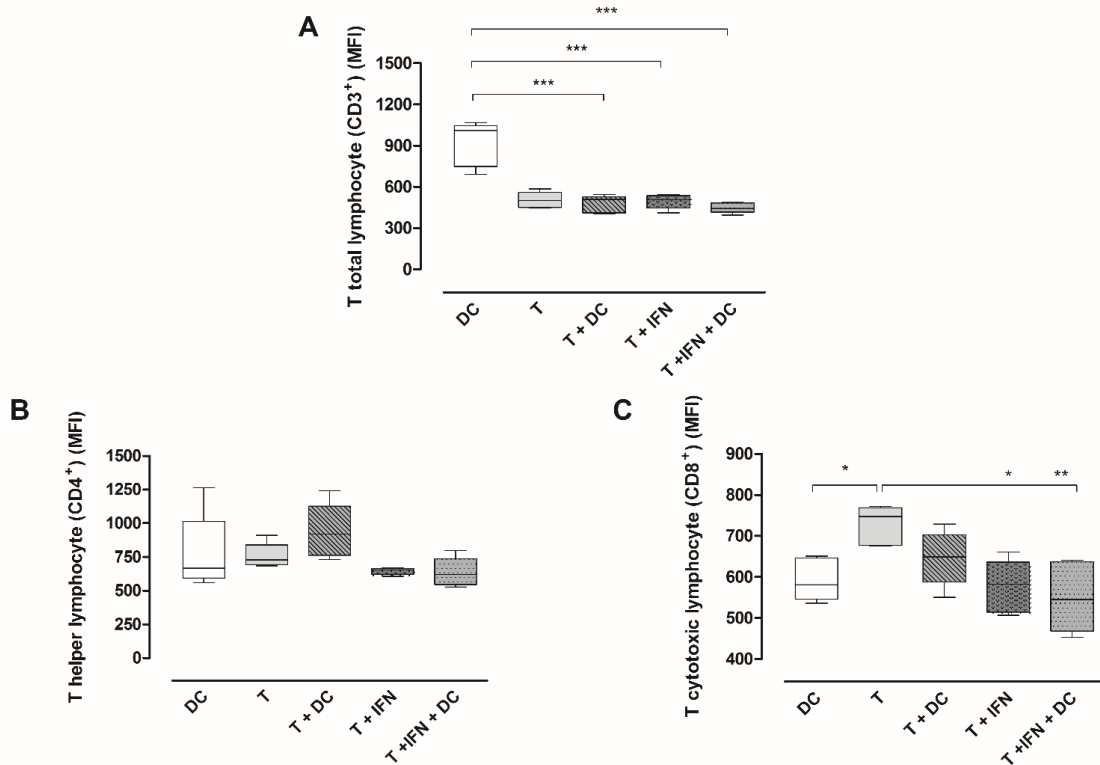
Foram analisadas um total de 90 amostras dentre os 5 grupos e foram realizadas 5 lâminas, sempre em duplicata, para cada corte realizado para posterior análise quanto à imunorreatividade para as moléculas de superfície CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Os dados são representados em média de intensidade de fluorescência (MFI).

Analisando CD3<sup>+</sup> FITC foi possível observar que, de acordo com os grupos (DC), (T), (T + DC), (T + IFN- $\alpha$ ) e (T + IFN- $\alpha$  + DC) e suas médias respectivamente 919,9, 505,1, 477,1, 494,4, 448,8, houve diferença significativa apenas entre os grupos (DC) vs (T + DC), (T + IFN- $\alpha$ ) e (T + IFN- $\alpha$  + DC)  $p < 0,001$ , respectivamente (Figura 11A). Na análise de (MFI) de CD4<sup>+</sup> PE-Cy foi possível notar, através das médias, um aumento quando comparado o grupo que recebeu a imunoterapia com DCs de forma isolada com o grupo tumor sem tratamento (T)

759,0, vs (T + DC) 939,9. Observou-se também que não houve aumento da (MFI) na presença da vacina com Interferon- $\alpha$  e também na presença da terapia combinada quando comparado ao grupo tumor sem tratamento (T) e ao controle (DC) grupo tumor tratamento com DCs sem tumor (Figura 11B).

Na análise de CD8<sup>+</sup> APC foi verificado um padrão diferente de CD4<sup>+</sup> PE-Cy quando observado o grupo tumor sem tratamento (T), no qual a (MFI) foi maior e significativamente diferente quando comparado com o grupo controle sem tumor e tratamento com DCs (DC)  $p < 0,05$ , grupo tumor tratado com vacina de Interferon- $\alpha$  (T + IFN- $\alpha$ )  $p < 0,05$  e também quando comparado ao grupo que recebeu a terapia combina Interferon- $\alpha$  e CDs (T + IFN- $\alpha$  + DC)  $p < 0,01$ .

Os grupos (DC), (T + IFN- $\alpha$ ) e (T + IFN- $\alpha$  + DC) apresentaram menor (MFI) quando comparados a grupo (T). Foi verificado também que no grupo tumor que recebeu apenas a imunoterapia com CDs (T + DC) houve um aumento de (MFI) para CD8<sup>+</sup>. Todavia, não foi significativo se comparado às médias dos grupos (T + DC) 646,1 vs. (T + IFN- $\alpha$ ) 576,5 (T + IFN- $\alpha$  + DC) 551,0. Porém a imunoterapia com CDs mostrou-se mais efetiva em relação aos demais grupos em estimular células TCD8<sup>+</sup> (Figura 11C).



**Figura 11.** Análise por Imunofluorescência de linfócitos infiltrantes. **A** CD3<sup>+</sup> (MFI) média de intensidade de fluorescência de linfócitos T totais infiltrantes em tumor de mama. **B** CD4<sup>+</sup> (MFI) média de intensidade de fluorescência de linfócitos T *helper* infiltrantes em tumor de mama nos grupos (CD) grupo controle + células dendrítica, (T) grupo tumor (T + CD), Tumor + célula dendrítica (T + IFN- $\alpha$ ) tumor + Interferon- $\alpha$ . (T + IFN- $\alpha$  + CD) tumor + Interferon- $\alpha$  + células dendríticas. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (5%), onde \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 7.4 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR E MICRODENSIDADE VASCULAR

No que concerne à Ki-67, identificada como uma proteína nuclear envolvida diretamente na proliferação celular, foi possível verificar através da média de intensidade de fluorescência que quando na presença da imunoterapia nos grupos tumor tratados com células dendríticas (T + DC) e tumor tratado com terapia combinada (T + IFN- $\alpha$  + DC) houve uma diminuição da síntese proteica de Ki-67, da mesma forma na presença do interferon, houve também uma menor presença da proteína no grupo tumor tratado com interferon (T + IFN- $\alpha$ ).

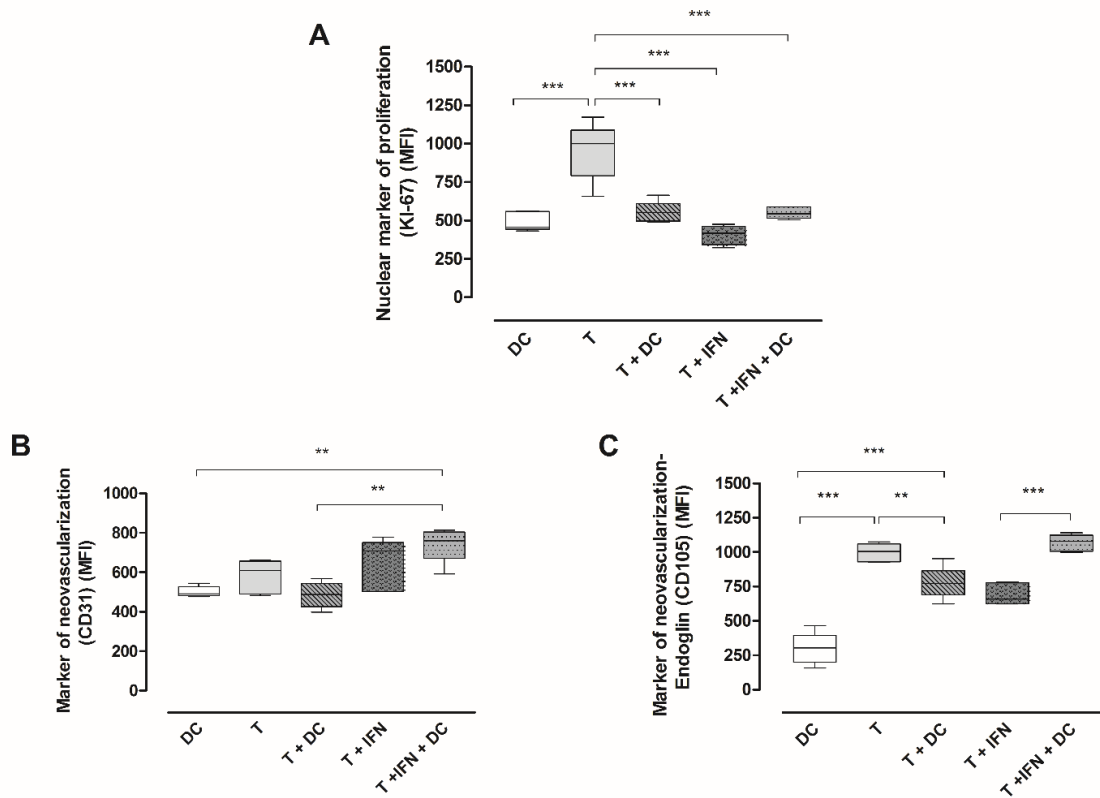
A análise tendo-se por parâmetro as médias permite visualizar a participação da imunoterapia e da vacina com relação ao Ki-67. A média do grupo tumor sem tratamento apresentou-se superior sempre que comparada aos demais grupos (T) 952,0 vs (T + DC) 551,7 (T) 952,0 vs (T + IFN- $\alpha$ ) 405,1 e (T) 952,0 vs (T + IFN- $\alpha$  + DC) 550,1, porém sem diferença

estatística. Diferenças significativas foram observadas entre o grupo (T + DC) vs. (T + IFN- $\alpha$ ),  $p < 0,001$ , e entre os grupos (DC) vs (T)  $p < 0,001$ , (T) vs (T + IFN- $\alpha$ ),  $p < 0,01$  e (T) vs. (T + IFN- $\alpha$  + DC) também com  $p < 0,001$  (Figura 12A).

CD31 apresentou-se de forma inesperada, com alta expressão nos grupos que receberam a terapia combina com IFN- $\alpha$  e DCs (T + IFN- $\alpha$  + DC) e, também, no grupo tumor que recebeu apenas a vacina com interferon (T + IFN- $\alpha$ ), sendo estatisticamente diferente quando comparado ao grupo controle (T + IFN- $\alpha$  + DC) vs. (DC)  $p < 0,01$  e também significativamente diferente em relação ao grupo tumor tratado com DCs de forma isolada (T + IFN- $\alpha$  + DC) vs. (T + DC)  $p < 0,01$ . De forma contrária e sendo favorável ao tratamento e contra as células tumorais, o grupo (T + DC), grupo no qual foi tratado apenas com a células dendríticas, quando comparado ao grupo tumor sem tratamento, apresentou-se com menor expressão de (MFI) (T), 580,7 vs. (T + DC), 485,4 (Figura 12B).

No que concerne à endogлина (CD105), o comportamento de sua expressão foi semelhante ao da proteína Ki-67. A expressão de (MFI) CD105 demonstrou-se alta no grupo tumor sem tratamento, como esperado, e quando comparado ao grupo controle (DC) ( $p < 0,01$ ) apresentou-se estatisticamente diferente. Quando o grupo tumor tratado com células dendríticas foi comparado ao grupo tumor, observou-se que a presença das células dendríticas foi capaz de alterar a síntese de CD105, diminuindo sua expressão, (T) vs (T + DC) ( $p < 0,01$ ). Também de forma positiva a presença do interferon, no grupo (T + IFN- $\alpha$ ), foi capaz de diminuir a expressão de CD105 sendo estatisticamente diferente quando comparado ao grupo (T + IFN- $\alpha$  + DC)  $p < 0,0011$ , que de forma contrária não foi capaz de alterar a síntese de CD105 e apresentou-se com alta síntese, semelhante ao grupo (T) (Figura 12C).

Diante do exposto, o grupo tumor tratado com células dendríticas (T + DC) demonstrou menor expressão para as proteínas CD105, Ki-67 e CD31 através da (MIF) quando comparados ao grupo tumor (T), evidenciando também que na presença da terapia combinada houve maior expressão para CD31 e CD105 quando comparado ao grupo (T), da mesma forma observou-se uma maior expressão de CD31 na presença de interferon com relação ao (T).



**Figura 11.** Análise por Imunofluorescência da microdensidade vascular e proliferação celular no tumor. Marcador de neovascularização CD31 (A) CD105 (B) e proliferação celular Ki-67(C) nos grupos (DC) grupo controle + células dendrítica, (T) grupo tumor (T + DC), Tumor + célula dendrítica (T + IFN- $\alpha$ ) (tumor + Interferon- $\alpha$ ) (T + IFN- $\alpha$  + DC) (tumor + Interferon- $\alpha$  + células dendríticas). Os resultados foram expressos em média de intensidade de fluorescência (MFI). As diferenças observadas foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (5%), onde \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*  $p < 0,0001$

## 8 DISCUSSÃO

As vacinas terapêuticas vêm sendo cada vez mais aplicada na tentativa de buscar a ativação da resposta imune contra o câncer. Inúmeros estudos prévios demonstram a capacidade de células dendríticas (DCs) em promover a ativação de vários tipos de resposta diante de diferentes tipos de patógenos, bem como a existência de uma correlação entre a ativação de DCs e o tipo de resposta celular produzida (KIKUCHI, 2006).

Alguns trabalhos em humanos e experimentais vêm evidenciando que a imunoterapia com DCs induz a uma ativação do perfil Th1 sistemicamente, e é uma importante terapia na resposta antitumoral (BRYSON et al., 2017; JIANG et al., 2017; MATIAS et al., 2013; QIN et al., 2017; RODRIGUES et al., 2011b).

Como terapia adjuvante o IFN- $\alpha$  vem largamente sendo utilizado e tem como principal ação a inibição da replicação viral (RIZZA et al., 2011). Todavia, há estudos que demonstram sua utilização e eficácia no tratamento contra o câncer, *in vitro* e *in vivo*. A atividade antitumoral relevante do IFN- $\alpha$  vem sendo também amplamente testada para vários tipos de tumores (TARHINI; COGAS. KIRKWOOD, 2012).

Em um estudo clínico o IFN- $\alpha$  mostrou-se eficaz no tratamento de tumores hematológicos, como por exemplo a leucemia mieloide crônica, apresentando uma melhora da sobrevida em 15% dos pacientes tratados com quimioterapia e a citocina, versus aqueles submetidos somente a quimioterapia convencional. O Interferon- $\alpha$  parece ainda possuir um efeito sobre as células dendríticas. Há evidências de que o IFN- $\alpha$  pode acelerar a diferenciação das DCs, atuando como sinal para a diferenciação e podendo, assim, potencializar a diferenciação de DCs, contribuindo de maneira indireta para a resposta antitumoral (KREUTZ et al., 2015; ROZERA et al., 2015; SANTINI et al., 2009b; SPADARO et al., 2012).

Lapenta et al., (2006), demonstrou *in vitro* que DCs geradas a partir de monócitos após exposição ao IFN- $\alpha$  e ao GM-CSF são altamente eficazes na indução de *cross priming*. Demais estudos *in vitro* demonstram maior eficiência de DCs geradas na presença de IFN- $\alpha$ , observando maior número de linfócitos CD4<sup>+</sup> secretores de IFN- $\gamma$  (GIGANTE et al., 2008). Todavia de forma contrária, em nosso modelo experimental o IFN- $\alpha$  não se mostrou adjuvante as DCs e não potencializou seu papel como era esperado na presença do tumor. Demonstramos isso através de nossos achados tanto com relação a baixa frequência de linfócitos totais e da intensidade de fluorescência de T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e também através da baixa expressão de citocinas (IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-12) para os grupos com terapia com IFN- $\alpha$  e terapia combinada

com DCs. Nos observamos ainda um aumento da frequência de CD4+/CD25 e da expressão de IL10 nos grupos com terapia com IFN- $\alpha$ .

Segundo Giermasz et al., (2009) o sucesso da terapia com DCs e IFN- $\alpha$  é dependente da eficiência em se gerar DCs maduras e capazes de produzirem IL-12. Desta maneira, DCs imaturas podem produzir e liberar vários fatores angiogênicos e, por sua vez, fatores angiogênicos podem afetar a biologia das DCs. De acordo com estudos, a baixa resposta imune local na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) está ligada a uma diminuição no número de células dendríticas maduras da mucosa brônquica, levando a um baixo desempenho de DCs e aumento da vascularização brônquica e aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento transformador (TGF) - $\beta$ . *In vivo*, em pacientes com câncer de pulmão, há aumento da expressão de VEGF e pior prognóstico (HASHIMOTO; TANAKA; ABE, 2005; INOSHIMA et al., 2002; ZANINI et al., 2014).

Inúmeros são os mecanismos de escape tumoral que inibem a ação do sistema imunológico e seus componentes. As células tumorais lançam de mecanismos de inibição de linfócitos T, ativação de ciclos proliferativos e também induzem a sustentação do tumor através da neoangiogênese e de fatores que promovem a autossuficiência da mesma, influenciando desta forma na imunoterapia e em seu objetivo final. Segundo estudos experimentais e clínicos o tumor é “angiogene-dependente”, podendo as células tumorais superexpressar fatores angiogênicos e de proliferação tais como; fator de crescimento endotelial vascular (VEFG), Interleucina 8 (IL-8), angiogenina, fator de crescimento transformador Beta (TGF- $\beta$ ) (KUREBAYASHI et al., 1999; NAOYO NISHIDA, HIROHISA YANO, TAKASHI NISHIDA, TOSHIHARU KAMURA, 2006).

Ki-67 sinaliza a síntese de DNA intratumoral com um aumento da marcação da taxa proliferativa. Diante da análise da presença de Ki-67 nos grupos propostos restou evidenciado que no grupo tumor tratado com células dendríticas houve uma diminuição da expressão de Ki-67. Da mesma forma, o grupo tumor Interferon- $\alpha$  e o grupo tumor terapia combinada apresentaram diminuição da expressão da proteína quando comparados ao grupo tumor sem tratamento, corroborando, desta maneira, os estudos que relatam a capacidade de expressão de Ki-67 em tumores de mama (ELNEMR et al., 2016).

A ausência de Ki-67 em células quiescentes e a alta capacidade de expressão fez com que a proteína através de inúmeros estudos se torne um biomarcador extensamente estudado. KI-67 expressa desta maneira células tumorais positivas (URRUTICOECHEA; SMITH; DOWSETT, 2005) podendo ser, neste contexto, um fator predisponente à recorrência da doença e pode ser também um elemento de escape à imunoterapia. Em seu estudo Ghebeh e

colaboradores (2007) evidenciaram forte relação da molécula B7-H1 (PD-L1) com a expressão da proteína Ki-67 em tumor de mama de mulheres, com receptor para estrógeno e progesterona.

De maneira semelhante ao Ki-67, as proteínas relacionadas à microdensidade vascular (CD31 e CD105) e a neoangiogênese na presença da imunoterapia com DCs de forma isolada apresentaram-se em níveis baixos de expressão comparadas ao grupo tumor. Desta maneira, restou evidenciado também que as células dendríticas, diante do modelo experimental proposto, foram capazes de atuar em algum momento na diminuição da expressão de tais proteínas envolvidas no processo endotelial da microdensidade vascular tumoral. Curiel et al. (2004) demonstrou resultados semelhantes aos observados no presente estudo, evidenciando em seu estudo *in vivo* utilizando placas de matrigel, através da técnica de imunofluorescência, que células dendríticas mieloides (m DCs) maduras foram capazes de inibir a angiogênese em tumor de ovário.

Segundo Dong et al. (2009), células dendríticas podem inibir ou estimular fatores angiogênicos, por exemplo, através de citocinas; todavia o grau de maturação em que as células se encontram parece ser determinante para uma resposta antitumoral e contra fatores precursores proliferativos e da angiogênese.

Outro fator importante que se soma à ação da imunoterapia com CDs maduras na tentativa de regulação do processo proliferativo e da neoangiogênese é a participação da Trombospondina 1 (TSP-1), a qual é secretada pelas células dendríticas imaturas (iDCs) que passa a ser regulada positivamente após sua maturação com a produção de citocinas pró-inflamatórias, a exemplo do IL-12 (DOYEN et al., 2003).

A Trombospondina 1 (TSP-1) participa na migração celular, proliferação durante a embriogênese e reparo de lesão e parece ser uma proteína importante neste processo de inibição da neoangiogênese. Estudos sobre a Trombospondina 1 reportam ao seu potencial na regulação da angiogênese, bem como da proliferação e da metástase (KANG et al., 2007). Desta maneira o processo de maturação com produção de TSP-1 parece ter ação importante na ação das DCs junto à microdensidade vascular tumoral.

Em nosso trabalho, observou-se o aumento da expressão por CD31 e CD105 no grupo imunoterapia combinada quando comparado ao grupo tumor e células dendríticas. Neste contexto, DCs podem não ter assumido um perfil maturo, como citado em estudos, para que se possa ter atuação antitumoral, e o IFN- $\alpha$  pode ter sofrido bloqueio através dos mecanismos inibitórios ativados pelo microambiente tumoral.

Segundo Celià-Terrasa e colaboradores (2017), em recente e importante estudo, as células tronco tumorais do microambiente tumoral têm a capacidade de produzir microRNAs



(especificamente miR-199a), os quais são críticos na regulação, manutenção e desenvolvimento de câncer. Desta maneira, o miR-199a suprime diretamente a produção de um corressor de receptor nuclear dependente de ligante (LCOR) do qual o IFN  $\alpha$  depende para atuação na célula tumoral. Desta maneira, o eixo miR-199a-LCOR parece ser uma chave para a terapia adjuvante com IFN- $\alpha$ .

Aludido mecanismo pode explicar o insucesso na terapia combinada com IFN- $\alpha$  no presente estudo, uma vez que células tronco residentes no microambiente tumoral têm a capacidade de produzir miR-199a e bloquear indiretamente a ação de IFN- $\alpha$ . Todavia, Terrasa e colaboradores (2017) relatam em seus resultados que com o aumento de LCOR os níveis de miR-199a podem apresentar-se menores, de forma que o IFN- $\alpha$  passaria atuar de forma efetiva nas células tumorais associando-se ao LCOR e, posteriormente, executando sua função efetora.

Em relação ao infiltrado de linfócitos T *helper* e T citotóxico, em nosso estudo foi possível evidenciar a presença de uma resposta imunológica nos animais que receberam a imunoterapia de células dendríticas de forma isolada, possivelmente ativando a resposta para um perfil antitumoral levando, desta forma, a um aumento nas expressões MFI dos linfócitos infiltrantes T *helper* e T citotóxico, essenciais para a resposta antitumoral. Corroborando desta maneira com estudos prévios em camundongos que demonstraram que DCs de origem mieloides de camundongos carregados com antígenos são eficientes para ativar linfócitos infiltrantes T *helper* e T citotóxico (JIANG et al., 2017).

Ademais, também foi demonstrado no presente estudo que células derivadas da medula óssea, estimuladas e diferenciadas de acordo com o protocolo proposto por nosso grupo foram capazes de ativar células linfócitos T

De forma contrária, em nosso estudo quando na presença do Interferon- $\alpha$  de forma isolada e na imunoterapia combinada, verificou-se uma diminuição na presença de linfócitos infiltrantes tanto para linfócitos T *helper* (CD4<sup>+</sup>), quanto para linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>), sendo a diminuição de linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) significativa quando comparada aos demais grupos. Os resultados corroboram as análises da microdensidade vascular e proliferação, nos quais o Interferon- $\alpha$  parece ter sofrido ação do microambiente tumoral e, posteriormente, bloqueio de suas funções efectoras.

Estudos recentes demonstram que INFs do tipo I contribuem para a apresentação cruzada, por meio do aumento da retenção de antígenos e aumento da sobrevivência de CD8<sup>+</sup> (LORENZI et al., 2011), além de apresentarem positivos e múltiplos efeitos sobre as DCs (SANTINI et al., 2000, 2009b). Entretanto, em inúmeros casos e estudos a ação de IFN  $\alpha$  é bloqueada totalmente ou parcialmente, o que pode ser explicado também pela atuação da via miR-199a-LCOR/IFN,

recentemente descrita.

Todavia, a participação real de interferon neste contexto e sua biologia ainda permanecem obscuros. Atualmente sabe-se que ativação da via STAT 1 (*signal transducer and activator of transcription-1*), ou seja, sua regulação transcricional, parece ser essencial para a expressão e ativação dos IFNs. O STAT1 desempenha um papel crítico na tumorigênese, controlando um conjunto complexo de atividades e funções e favorecendo a carcinogênese e a sobrevivência do tumor, confirmando a complexidade desse sistema biológico (CHEON; BORDEN; STARK, 2014; HARICHARAN; LI, 2014; WEICHSELBAUM et al., 2008).

Segundo Meissl (2017) a ação de oncogenes, a perda de supressores tumorais, a interação com o estroma, ação de IFN e agentes genotóxicos culminam em alta expressão de STAT 1 a favor do microambiente tumor levando a alteração de processos celulares que culminam na resistência a resposta imune. Desta forma mais estudos se fazem necessários para buscar elucidar a biologia e ação do IFN isoladamente e também juntamente com as DCs.

## 9 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi possível ressaltar a influência do microambiente tumoral sobre a imunoterapia combinada com Interferon- $\alpha$  e de forma isolada apenas com Interferon- $\alpha$  onde o microambiente tumoral parece ter forte influência sobre a ação efetora do Interferon- $\alpha$ . Com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

1. Imunoterapia combinada com Interferon- $\alpha$  e DC, e também a imunoterapia isolada apenas com Interferon- $\alpha$  na presença de tumor demonstraram uma redução do número linfócitos produtores de citocinas do perfil Th1, macrófagos peritoneais e aumenta a presença de citocinas Th2 e células Treg
2. A vacina de DCs foi capaz também de ativar linfócitos intratumorais, levando a um aumento de expressão de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup> no grupo tratado apenas com a imunoterapia de células dendríticas, auxiliando, desta maneira, a resposta positiva antitumoral
3. A terapia com células dendríticas isolada no modelo experimental proposto foi capaz de alterar e diminuir a expressão de proteínas envolvidas na microdensidade vascular e também na proliferação celular atuando independentemente da ação do microambiente tumoral

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIE, J. J.; AMARDEILH, M. A.; DELVERDIER, M. E. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 215, n. 11, p. 1629–34, 1 dez. 1999.

AHMEDIN JEMAL et al. **O Atlas do Câncer**. Atlanta, Geórgia, EUA: [s.n.].

ARDAVÍN, C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 7, p. 582–591, 2003.

BANCHEREAU, J.; PALUCKA, A. K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 4, p. 296–306, 2005.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245–252, 19 mar. 1998.

BARBOSA, T. V. et al. Prognostic significance of Ki-67 in great cell undifferentiated carcinoma of the major salivary glands: study of 11 cases. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n. 5, p. 629–634, out. 2003.

CARMELIET, P & JAIN, R. Angiogenesis in cancer and other disease. **Nature**, v. 407, p. 249–257, 2000.

CATTORETTI, G. et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. **The Journal of Pathology**, v. 168, n. 4, p. 357–363, dez. 1992.

CHIBA, T.; MARUSAWA, H.; USHIJIMA, T. Inflammation-associated cancer development in digestive organs: Mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. **Gastroenterology**, v. 143, n. 3, p. 550–563, 2012.

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, 2006.

DUNN, G. P. et al. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. **Nature Immunology**, v. 6, n. 7, p. 722–729, 12 jul. 2005.

EL-GOHARY, Y. M. et al. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as

prognostic markers in prostatic adenocarcinoma. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 127, n. 4, p. 572–579, 2007.

FOLKMAN J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nature medicine**, v. 1, p. 27–31, 1995.

GASPARINI, G. et al. Cell kinetics in human breast cancer: Comparison between the prognostic value of the cytofluorimetric S-phase fraction and that of the antibodies to Ki-67 and PCNA antigens detected by immunocytochemistry. **International Journal of Cancer**, v. 57, n. 6, p. 822–829, 1994.

GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 6, p. 463–474, 2012.

GOLOMB, H. M. et al. Alpha-2 interferon therapy of hairy-cell leukemia: a multicenter study of 64 patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 4, n. 6, p. 900–905, jun. 1986.

GUTTERMAN, J. U. Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 4, p. 1198–205, 15 fev. 1994.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, jan. 2000.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. **J. Leukoc. Biol.**, v. 71, n. 6, p. 907–920, 2002.

JANEWAY, C. A; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual review of immunology**, v. 20, n. 2, p. 197–216, 2002.

JIANG, T. et al. Immunotherapy with Dendritic Cells Modified with Tumor-Associated Antigen Gene Demonstrates Enhanced Antitumor Effect Against Lung Cancer. **Translational Oncology**, v. 10, n. 2, p. 132–141, 2017.

KOUKOURAKIS, M. I. et al. Hypoxia-inducible factor (HIF1A and HIF2A), angiogenesis, and chemoradiotherapy outcome of squamous cell head-and-neck cancer. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 53, n. 5, p. 1192–1202, 2002.

LAPENTA, C. et al. IFN- $\alpha$ -conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-

- priming CD8<sup>+</sup> T cells against exogenous viral antigens. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 8, p. 2046–2060, ago. 2006.
- LASFAR, A. et al. IFN- $\lambda$  cancer immunotherapy: new kid on the block. **Immunotherapy**, v. 8, n. 8, p. 877–888, jul. 2016.
- LE BON, A. et al. Cross-priming of CD8<sup>+</sup> T cells stimulated by virus-induced type I interferon. **Nature Immunology**, v. 4, n. 10, p. 1009–1015, 21 out. 2003.
- LEE, S. H. et al. Early Expression of Angiogenesis Factors in Acute Myocardial Ischemia and Infarction. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 9, p. 626–633, 2 mar. 2000.
- LONGHI, M. P. et al. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4<sup>+</sup> Th1 immunity with poly IC as adjuvant. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 7, p. 1589–1602, 6 jul. 2009.
- LOOSE, D.; VAN DE WIELE, C. The Immune System and Cancer. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**, v. 24, n. 3, p. 369–376, jun. 2009.
- MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436–444, 24 jul. 2008.
- MARÇOLA, M.; RODRIGUES, C. E. Endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis: Another brick in the wall. **Stem Cells International**, v. 2015, p. 10, 2015.
- MINEO, T. C. Prognostic impact of VEGF, CD31, CD34, and CD105 expression and tumour vessel invasion after radical surgery for IB-IIA non-small cell lung cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 57, n. 6, p. 591–597, 2004.
- MIYATA, Y.; SAGARA, Y.; WATANABE, S. CD105 is a more appropriate marker for evaluating angiogenesis in urothelial cancer of the upper urinary tract than CD31 or CD34. **Virchows Archiv**, v. 463, p. 673–679, 2013.
- MÜLLER, A. M. et al. Expression of the endothelial markers PECAM-1, vWf, and CD34 in vivo and in vitro. **Experimental and molecular pathology**, v. 72, n. 3, p. 221–229, 2002.
- NAHED, A. S.; SHAIMAA, M. Y. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer molecular subtype. **Cancer Biology & Medicine**, v. 13, n. 4, p. 496, 2016.
- NANCIE PETRUCELLI, MARY B DALY, T. P. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. **GeneReviews**, v. 4, 2017.

NAOYO NISHIDA, HIROHISA YANO, TAKASHI NISHIDA, TOSHIHARU KAMURA, AND M. K. Angiogenesis in Cancer. **Vasc Health Risk Manag.**, v. 2, p. 213–219., 2006.

NIKITEAS, N. I. et al. Vascular endothelial growth factor and endoglin (CD-105) in gastric cancer. **Gastric Cancer**, v. 10, n. 1, p. 12–17, 2007.

PANTSCHENKO, A. G. et al. The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: implications for tumor progression. **Int J Oncol**, v. 23, n. 2, p. 269–284, 2003.

PANTSCHENKO AG, PUSHKAR I, ANDERSON KH, WANG Y, MILLER LJ, KURTZMAN SH, BARROWS G, K. D. The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: implications for tumor progression. **Int J Oncol.**, v. 23, p. 269–84., 2003.

PRIVRATSKY, J. R. et al. Relative contribution of PECAM-1 adhesion and signaling to the maintenance of vascular integrity. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 9, p. 1477–1485, 1 maio 2011.

PRIVRATSKY, J. R.; NEWMAN, P. J. PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. **Cell and Tissue Research**, v. 355, n. 3, p. 607–619, 17 mar. 2014.

QUAIL, D.; JOYCE, J. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423–1437, 2013.

RIZZA, P. et al. IFN-alpha as a vaccine adjuvant: recent insights into the mechanisms and perspectives for its clinical use. **Expert review of vaccines**, v. 10, n. 4, p. 487–498, 2011.

RIZZA, P. et al. Role of type I interferon in inducing a protective immune response: Perspectives for clinical applications. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 26, n. 2, p. 195–201, 2015.

ROMERIO, F.; RIVA, A.; ZELLA, D. Interferon- $\alpha$  2b reduces phosphorylation and activity of MEK and ERK through a Ras/Raf-independent mechanism. **British Journal of Cancer**, v. 83, n. 4, p. 532–538, ago. 2000.

SAHIN, A. A. et al. Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis. **Cancer**, v. 68, n. 3, p. 549–57, 1 ago. 1991.

SALCEDO, X. et al. Review article: Angiogenesis soluble factors as liver disease markers. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 22, n. 1, p. 23–30, 2005.

SANTINI, S. M. et al. IFN-alpha in the Generation of Dendritic Cells for Cancer Immunotherapy. In: **Dendritic Cells**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 295–317.

SCHIMMING, R.; MARMÉ, D. Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Head & neck**, v. 24, n. 2, p. 151–6, 2002.

SHOKOUH, T. Z.; EZATOLLAH, A.; BARAND, P. Interrelationships Between Ki67, HER2/neu, p53, ER, and PR Status and Their Associations With Tumor Grade and Lymph Node Involvement in Breast Carcinoma Subtypes. **Medicine**, v. 94, n. 32, p. e1359, 2015.

SPADARO, F. et al. IFN- enhances cross-presentation in human dendritic cells by modulating antigen survival, endocytic routing, and processing. **Blood**, v. 119, n. 6, p. 1407–1417, 9 fev. 2012.

STEWART, B.; WILD, C. **World cancer report 2014**. [s.l: s.n.].

TADBIR, A. A. et al. Expression of Ki67 and CD105 as Proliferation and Angiogenesis Markers in Salivary Gland Tumors. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 10, p. 5155–5159, 2012a.

TADBIR, A. A. et al. Expression of Ki67 and CD105 as proliferation and angiogenesis markers in salivary gland tumors. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 10, p. 5155–5159, 2012b.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, mar. 2015.

TRAN, U. et al. The RNA-binding protein bicaudal C regulates polycystin 2 in the kidney by antagonizing miR-17 activity. **Development**, v. 137, n. 7, p. 1107–1116, 1 abr. 2010.

URRUTICOECHEA, A.; SMITH, I. E.; DOWSETT, M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 28, p. 7212–7220, 2005.

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

WATNICK, R. S. et al. The Role of the Tumor Microenvironment in Regulating Angiogenesis The Role of the Tumor Microenvironment in Regulating Angiogenesis. 2013.



