UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

IGOR VISCONTE GONÇALVES

AVALIAÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B EM MODELO DE CÂNCER DE MAMA MURINO

Orientadora: Dr[a]. Liza Figueiredo Felicori Vilela
Co-orientadora: Dr[a]. Ana Maria Caetano de Faria

Belo Horizonte
Maio de 2019

IGOR VISCONTE GONÇALVES

AVALIAÇÃO ESPAÇO-TEMPORAL DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS B EM MODELO DE CÂNCER DE MAMA MURINO

Orientadora: Prof[a]. Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela
Co-orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Ana Maria Caetano de Faria

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Belo Horizonte
Maio de 2019

EXECUÇÃO DA PESQUISA

Laboratório de Biologia Sintética e Biomiméticos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG.

Laboratório de Imunobiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG.

COLABORADORES:

Universidade Federal de Minas Gerais
Dr[a]. Ana Maria Caetano de Faria
Dr. Luis Fernando Viana Furtado
Dr[a]. Miriam Teresa Paz Lopes
Dr. Dalton Dittz Júnior
Luciana Maria da Silva Siqueira
Me. Mariana Camila Gonçalves Miranda
Me. Natália Pinheiro Rosa
Me. Lícia Torres
Me. Fernanda de Fátima Souza de Oliveira

Centro de Pesquisas René Rachou – Fiocruz MG
Dr[a]. Dayane Andriotti Otta
Ana Beatriz Ribeiro de Queiroz

ÓRGÃOS FINANCIADORES:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)
Fundação Christiano Ottoni (UFMG)
Rede Biologia Sistêmica do Câncer

AGRADECIMENTOS

A realização desta dissertação de mestrado não teria sido possível sem suporte e contínuos incentivos. A todos aqueles que se envolveram - direta ou indiretamente - na execução deste projeto de pesquisa sou-lhes eternamente grato.

À minha orientadora, Prof[a]. Dr[a]. Liza Felicori, a quem possuo grande admiração, pela recepção gentil e amparo desde o primeiro momento em que nos encontramos. Por me deixar fazer parte da excelente e competente equipe que compõem o laboratório de biologia sintética, além de sempre ser presente e solicita.

À minha co-orientadora, Prof[a]. Dr[a]. Ana Caetano, pela simplicidade, simpatia e genuinidade em ajudar, por disponibilizar o laboratório de imunobiologia para execução dos experimentos, assim como conselhos e recomendações, pelos quais foram essenciais na condução e na realização da presente dissertação.

Aos professores Dr. Jader Cruz e Dr[a]. Andreia Laura por pelos auxílios, conselhos e críticas necessárias nos primeiros passos dados ainda durante o período de iniciação científica na graduação até os momentos iniciais na pesquisa acadêmica. Agradeço profundamente por todas as oportunidades, pelos erros e acertos ao longo dos anos de convívio.

À Prof[a]. Dr[a]. Miriam Lopes, Dr. Dalton Dittz e demais membros do laboratório de substâncias antitumorais do Departamento de Fisiologia e Farmacologia por colaborarem no delineamento da pesquisa e sempre a postos para contribuir com o projeto.

Em especial à pessoa de Luis Fernando, que não poderia ter aparecido em momento mais apropriado! Muitíssimo obrigado pelos ensinamentos, pelo tempo proveitoso na execução dos experimentos, pela gentileza e sempre presente durante os passos iniciais da pesquisa realizada. Reforço o que Prof[a]. Dr[a]. Elida Rabelo havia dito quando tive oportunidade de conhece-la, você é um excelente professor!

Aos meus pais, irmão e avós pelo carinho e suporte incondicionais, sempre dispostos a ajudar nos momentos necessários. A minha amável e dedicada parceira Letícia, pelo companheirismo e suporte em momentos ruins, pelos momentos descontraídos e agradáveis.

A todos os membros, ex-membros e amigos do laboratório de Biológica Sintética e Biomiméticos e Biologia Computacional, Naiá, Marcella, Elany, Taciana, Milene, Newton, Stephanie, Camila, Viviane, Luan pela alegre e contagiosa recepção desde as primeiras semanas de convívio e por sempre estarem dispostos a ajudar de todos os modos possíveis.

Aos amigos e colegas do laboratório de Imunobiologia. Em especial a Mariana, por ter aceitado fazer parte integral do projeto sem cogitar, pela paciência, pelos ensinamentos e críticas construtivas feitos ao longo de toda essa caminhada. A Natália e Lícia assim como os demais membros do laboratório por ter contribuído de maneira imprescindível em cada detalhe dos experimentos. Sem vocês, não há dúvida que o percurso teria sido muito mais difícil, sou eternamente grato por toda a ajuda prestada.

A Hilda, Luciana e Hermes pelos auxílios técnicos prestados com muita competência. A experiência de vocês foi muito proveitosa e essencial para esse trabalho.

A Fernanda, Dayane e Ana Beatriz pela atenção dada nos momentos mais cruciais dos experimentos executados. A expertise de vocês foi indispensável.

Ao Prof. Dr. Helton Costa e Prof.ª Drª. Fabíola Ribeiro, pela contribuição em pequenos detalhes experimentais, mas que ao final se mostraram primordiais para os resultados apresentados nessa dissertação. A Laila Sampaio e Mariana Souza pela gentileza e presteza nos momentos de dúvida e correria no laboratório.

A Sabrynna do departamento de Microbiologia e amigo pessoal Gustavo Pereira do departamento de Parasitologia pela gentileza em auxiliar em detalhes necessários para condução dos experimentos.

Em último momento agradeço as agências financiadoras, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e a todos brasileiros e brasileiras. Esta dissertação pertence a cada um de vocês.

RESUMO

O câncer de mama atinge número expressivo de mulheres em todo o mundo segundo dados da Organização Mundial da Saúde, sendo esperado elevação no número de casos nas próximas décadas. Fatores de risco como idade avançada, consumo de álcool, sobrepeso, histórico familiar, idade de menarca e menopausa, uso de contraceptivo, entre outros fatores, estão associados ao surgimento de neoplasia maligna de mama. Dentre os subtipos, o câncer de mama triplo-negativo é considerado a forma mais grave e com o pior prognóstico. Número crescente de estudos tem demonstrado a presença de distintos perfis celulares no infiltrado tumoral. Ainda que trabalhos tenham evidenciado a importância de infiltrados tumorais de linfócitos T, informações divergentes são encontradas a respeito dos infiltrados de linfócitos B no câncer de mama. Além disso, escassos são os estudos que tenham avaliado a dinâmica de linfócitos B em face ao crescimento de tumores de mama. No presente trabalho ficou demonstrado que o compartimento de células B presentes no baço, linfonodo inguinal e tumor respondem de maneira distinta em função da progressão do tumor 4T1 em animais BALB/c, demonstrando que diferentes mecanismos possivelmente atuam nos locais avaliados. Ao passo que pequena alteração nos linfócitos B (CD19+ B220+) tenha sido verificada no baço e no tumor, aumento significativo deste fenótipo foi observado no linfonodo inguinal logo após 7 dias do transplante de células 4T1. Embora tenham sido constatados diferentes subpopulações de linfócitos B no infiltrado tumoral - tais como linfócitos B naïve, plasmablastos e linfócitos B regulatórios – ficou destacado a contínua elevação de plasmócitos (CD19- B220- CD138+) intratumorais. Levando em consideração que o estabelecimento de resposta imune eficaz depende do contínuo transporte e interação de linfócitos B com outros componentes celulares, a melhor compreensão da dinâmica destas células em face ao crescimento de células tumorais é o passo inicial na elucidação de potenciais mecanismos atuantes, assim como no delineamento de novas abordagens terapêuticas que visem o tratamento da doença.

Palavras chave: câncer de mama triplo-negativo, linfócitos B, infiltrado tumoral.

ABSTRACT

Breast cancer affects an expressive number of women worldwide according to data from the World Health Organization, being expected an increase in the number of cases in the coming decades. Risk factors such as advanced age, alcohol consumption, overweight, family history, age of menarche and menopause, contraceptive use and other factores are intimately associated with emergence of breast cancer. Among the subtypes, triple-negative breast cancer is considered the most severe form and associated with worst prognosis. Increased number of studies have identified the presence of distinct cell types in the tumor infiltrate. Although studies have evidenced the importance of T lymphocytes in tumor infiltrates, divergent data in found regarding B lymphocyte infiltrates in breast cancer. In addition, there are few studies that have evaluated the kinetics of B lymphocytes in function of breast tumor development. In the current study, we showed that the B cell compartment present in the spleen, inguinal lymph node and tumor respond differently in function of 4T1 tumor growth in BALB/c mice, demonstrating that distinct mechanisms possible act on the evaluated tissues. While a small change in B lymphocytes (CD19+ B220+) was noted in the spleen and tumor, a significant increase os this phenotype was observed in the inguinal lymph node soon after 7 days of transplantation of 4T1 cells. Though different subpopulations of B lymphocytes have been noted in the tumor infiltrate - such as naïve B cells, plasmablasts and regulatory B lymphocytes - the continuous elevation of intratumoral plasma cells (CD19- B220- CD138+) deserves to be highlighted. Taking into account that the establishment of an effective immune response depends on the continuous transportation and interaction of B lymphocytes with other cellular components, a better understanding of the kinetics of these cells is the initial step in elucidating potential acting mechanisms underlying breast tumor growth. Moreover, the better understanding of B cell dynamics may be crucial for the design of new therapeutic approaches for the treatment of the disease.

Keywords: Triple-negative breast cancer, B lymphocytes, tumor infiltrate.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRCA1	*Breast cancer type 1 susceptibility protein*
BRCA2	*Breast cancer type 2 susceptibility protein*
PTEN	*Phosphatase and tensin homolog*
TP53	*Tumor protein p53*
STK11	*Serine/Threonine kinase 11*
AMPK	*AMP-activated protein kinase*
IHQ	Imunohistoquímica
FISH	*Fluorescence in situ hybridization*
TNBC	*Triple-negative breast cancer*
CNA	*Copy number alteration*
MIC	*Major histocompatibility complex (MHC) class I related molecule*
MICB	*MHC class I polypeptide-related sequence B*
LLT1	*Lectin like Transcript-1*
VEGF	*Vascular endothelial growth factor*
FGF	*Fibroblast growth factor*
G-CSF	*Granulocyte colony-stimulating factor*
PMA	*Phorbol 12-myristate 13-acetate*
TDLN	*Tumor-draining lymph node*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Loci e Genes associados a maior susceptibilidade ao surgimento do câncer de mama, distribuídos de acordo com o nível de risco.....19

Figura 2: Eventos patológicos associados ao Carcinoma Ductal *in situ*.....22

Figura 3: Reconhecimento de células tumorais pelo sistema imune inato. Células NK, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos são componentes celulares deste sistema.....35

Figura 4: Imunofenotipagem de Linfócitos B Naïve.....55

Figura 5: Imunofenotipagem de Plasmablastos.....57

Figura 6: Imunofenotipagem de Plasmócitos.....59

Figura 7: Imunofenotipagem de Linfócitos B de Memória.....61

Figura 8: Imunofenotipagem de Linfócitos B Regulatórios.....63

Figura 9: Peso e volume tumoral em função do tempo de desenvolvimento.....68

Figura 10: Evolução do número de leucócitos, viabilidade celular e número de linfócitos B intratumorais ao longo do desenvolvimento tumoral.....70

Figura 11: Frequência e número de linfócitos B naïve intratumorais ao longo do desenvolvimento tumoral.....71

Figura 12: Frequência e número de plasmablastos e plasmócitos intratumorais ao longo do desenvolvimento tumoral.....72

Figura 13: Frequência e número de linfócitos B de memória intratumorais ao longo do desenvolvimento tumoral.....74

Figura 14: Frequência e número de linfócitos B regulatórios intratumorais ao longo do desenvolvimento tumoral.....74

Figura 15: Frequência de diferentes subpopulações de linfócitos B no microambiente intratumoral em função do crescimento de células 4T1 para os períodos de 7,14 e 28 dias 75

Figura 16: Área do baço em função do tempo de desenvolvimento tumoral.....77

Figura 17: Evolução do número de leucócitos, viabilidade celular e número de linfócitos B no baço ao longo do desenvolvimento tumoral 79

Figura 18: Frequência e número de linfócitos B naïve no baço ao longo do desenvolvimento tumoral.....81

Figura 19: Frequência e número de plasmablastos no baço durante o desenvolvimento tumoral.....82

Figura 20: Frequência e número de plasmócitos no baço durante o desenvolvimento tumoral.....83

Figura 21: Frequência e número de linfócitos B de memória no baço em função do desenvolvimento tumoral.....84

Figura 22: Frequência e número de linfócitos B regulatórios no baço ao longo do desenvolvimento tumoral.....85

Figura 23: Frequência de diferentes subpopulações de linfócitos B no baço para os grupos controle e tumor em função dos diferentes períodos de crescimento do tumor 4T1 86

Figura 24: Área do linfonodo em função do tempo de desenvolvimento tumoral 88

Figura 25: Evolução do número de leucócitos, viabilidade celular e número de linfócitos B no linfonodo ao longo do desenvolvimento tumoral.....90

Figura 26: Frequência e número de linfócitos B naïve no linfonodo durante o desenvolvimento tumoral.....92

Figura 27: Frequência e número de plasmablastos no linfonodo durante o desenvolvimento tumoral.....94

Figura 28: Frequência e número de plasmócitos no linfonodo durante o desenvolvimento tumoral 95

Figura 29: Frequência e número de linfócitos B de memória no linfonodo durante o desenvolvimento tumoral.....96

Figura 30: Frequência e número de Linfócitos B regulatórios no linfonodo em função ao desenvolvimento tumoral.....98

Figura 31: Frequência de diferentes subpopulações de linfócitos B no linfonodo inguinal para os grupos controle e tumor em função dos diferentes períodos de crescimento do tumor 4T1 99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Taxa de mortalidade.....20

Tabela 2: Classificação por estádio do câncer de mama.....21

Tabela 3: Vantangens e desvatangens dos principais tipos de modelos murinos *in vivo* para o câncer de mama.....27

Tabela 4: Breve descrição dos resultados encontrados por diferentes autores em relação a modelos *in vivo* utilizando célula da linhagem 4T1.....31

Tabela 5: Descrição dos marcadores e fluorescências, assim como diluição e população de interesse de acordo com o painel utilizado.....53

Tabela 6: Frequência de Leucócitos, linfócitos totais, linfócitos CD4+ e CD19+ para as duas concentrações de células 4T1 utilizadas na padronização do modelo tumoral.....67

Tabela 7: Depleção de linfócitos B em diferentes modelos murinos de câncer de mama.....110

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 18
1.1. Etiologia do Câncer de Mama 18
1.2. Epidemiologia do Câncer de Mama 19
1.3. Aspectos Anatomopatológicos 21
1.4. Câncer de Mama Triplo-negativo (TNBC) 23
1.5. Modelos de Estudo 25
1.5.1. Modelos para estudo TNBC 26
1.5.2. Modelo Tumoral 4T1 29
1.6. Aspectos da Imunidade Tumoral 32
1.7. Infiltrados Linfocitários Tumorais (TILs) 39
2. OBJETIVOS 45
2.1. Objetivo Geral 45
2.2. Objetivos Específicos 45
3. MATERIAIS E MÉTODOS 47
3.1. Aspectos Éticos 47
3.2. Animais 47
3.3. Cultura e manutenção de células 4T1 48
3.4. Inoculação das células 4T1 48
3.5. Padronização do Modelo Tumoral 49
3.6. Eutanásia 49
3.7. Medidas dos Materiais Biológicos 49
3.7.1. Volume e Peso tumoral 49
3.7.2. Área do Baço e Linfonodo Inguinal 50
3.8. Obtenção da suspensão celular 50
3.8.1. Baço e Linfonodo Inguinal 50
3.8.2. Tumor 51
3.9. Citometria de Fluxo 51
3.9.1. Imunofenotipagem 51
3.9.2. Estratégia para determinação das populações em interesse 54
3.10. Análise Estatística 64
4. RESULTADOS 66

4.1. Avaliação de distintas subpopulações de linfócitos B intratumorais em função ao desenvolvimento tumoral.....66
4.1.1. Padronização da concentração de células para o desenvolvimento tumoral e extração de células intratumorais.....66
4.1.2. Aumento expressivo da massa tumoral no 28º dia.....67
4.1.3. Aumento no número de células e diminuição de linfócitos CD19+ B220+ ao longo do desenvolvimento tumoral.....69
4.1.4. Diminuição de Linfócitos B naïve ao longo do desenvolvimento tumoral.....71
4.1.5. Aumento expressivo de plasmócitos ao longo do tempo de desenvolvimento tumoral.....71
4.1.6. Linfócitos B de Memória e Linfócitos B Regulatórios intratumorais permanecem inalterados.....73
4.1.7. Predomínio de Plasmócitos no microambiente tumoral em comparação a outras populações no estágio mais avançado da doença 75
4.2. Avaliação de distintas subpopulações de linfócitos B no baço em função ao desenvolvimento tumoral.....76
4.2.1. Tumor induzido por células 4T1 triplica o tamanho do baço em 28 dias.....76
4.2.2. Aumento no número de leucócitos, mas decréscimo no número de linfócitos B no baço ao longo da evolução tumoral.....78
4.2.3. Diminuição na frequência e número de linfócitos B naïve, plasmablastos, plasmócitos, linfócitos B de memória e células B regulatórias ao longo da evolução tumoral.....80
4.2.4. Crescimento do tumor 4T1 *in vivo* não acarreta em aumento de diferentes subpopulações de linfócitos B no baço 86
4.3. Avaliação de distintas subpopulações de linfócitos B no linfonodo em função ao desenvolvimento tumoral.....87
4.3.1. Aumento do linfonodo inguinal após curto período de inoculação de células de adenocarcinoma 4T1.....87
4.3.2. Aumento no número de leucócitos e elevação no número e frequência de linfócitos B.....89

4.3.3. Elevação da frequência de linfócitos B naïve diante crescimento tumoral.....91
4.3.4. Aumento no número de Plasmablastos e Linfócitos B de Memória em momento inicial e tardio do desenvolvimento tumoral.....92
4.3.5. Número de Linfócitos B Regulatórios aumentam após 7 e 14 dias de desenvolvimento tumoral.....97
4.3.6. Crescimento do tumor 4T1 *in vivo* acarreta em aumento no compartimento de linfócitos B 99
5. DISCUSSÃO 101
6. CONCLUSÃO 114
7. SUMÁRIO 116
8. PERSPECTIVAS 118
9. REFERÊNCIAS 120

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Etiologia do Câncer de Mama

Assim como demais tipos de neoplasias malignas, o desenvolvimento do câncer de mama é o resultado da influência de múltiplos fatores, podendo estes serem internos ou externos ao organismo. Cerca de 80 a 90% dos casos de câncer de mama estão associados a fatores ambientais - tais como consumo de bebidas alcoólicas, exposição frequente a radiações ionizantes, tabagismo e infecções virais (Coyle, Y.M., 2004), e fatores relacionados à história reprodutiva e hormonal da mulher, como menarca antes dos 12 anos, nuliparidade, primeira gravidez após os 30 anos, menopausa após os 55 anos, uso contínuo de contraceptivos hormonais (INCA, 2018). Ainda que existam diversos fatores ligados ao surgimento do câncer de mama, a idade é considerada uma das variáveis mais notáveis. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer dos EUA (NCI), o risco de desenvolvimento aumenta gradativamente ao longo dos anos, de maneira que mulheres acima de 70 anos de idade tem uma chance de cerca de nove vezes maior em ser diagnosticada com câncer de mama quando comparada a mulheres com 30 anos de idade (Howlader, N. *et al.,* 2012).

Fatores genéticos também podem contribuir para o aparecimento da doença. Alterações em genes essenciais para a homeostasia celular podem levar ao descontrole proliferativo das células de mama. King, M. *et al*., 2003 relatou que as chances de aparecimento do câncer de mama em mulheres portadoras de mutações nos genes BRCA1/BRCA2 é de mais de 80%. Chances elevadas também são descritas por Antoniou, A. *et al.,* 2003*;* Petrucelli, N., Daly, M.B., Pal, T., 2016; Mehgou, A., Akouchekian, M., 2016.

Aumento significativo para o desenvolvimento do câncer de mama também é observado a partir da mutação de outros genes, tais como PTEN, TP53 e STK11, genes estes responsáveis pelo controle do ciclo celular através da via AKT, reparação de danos ao DNA e proliferação celular através de via de AMPK, respectivamente. Por serem considerados de alta penetrância, a mutação dos mesmos aumenta substancialmente a chance de desenvolvimento da neoplasia maligna de mama, conforme evidenciado na figura 1 em trabalho realizado por Foulkes, W.D., 2008 (NIH, 2018).

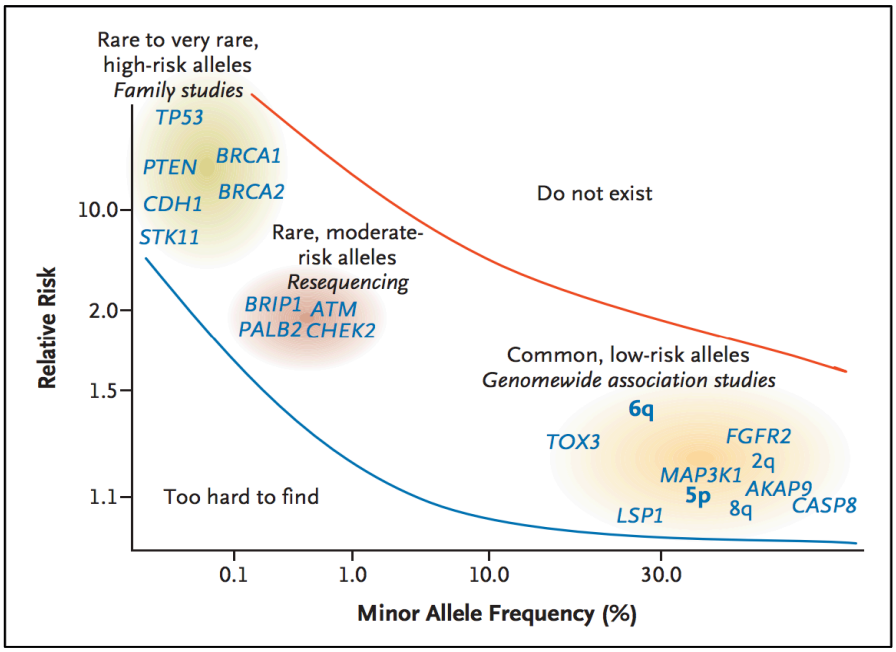

Figura 1. Loci e Genes associados a maior susceptibilidade ao surgimento do câncer de mama, distribuídos de acordo com o nível de risco. (Foulkes, 2008).

1.2. Epidemiologia do Câncer de Mama

Sendo uma doença de alta complexidade, o câncer de mama é o tipo de neoplasia mais comum entre mulheres, possuindo elevada taxa de mortalidade e considerado um problema de saúde pública a nível nacional e internacional. A doença atinge principalmente mulheres com idade entre 45 e 55 anos, de modo que a retirada parcial ou completa da mama, quimioterapia, radioterapia e hormônio terapia sejam necessários para o tratamento da doença (Ataollahi, M.R. *et al.,* 2015; WHO, 2015). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), somente em 2015, cerca de 570 mil mulheres morreram decorrentes de câncer de mama, número que corresponde a aproximadamente 15% de todos os casos de câncer dentre o sexo feminino. Ainda de acordo com a organização, a doença possui a maior taxa mortalidade e incidência entre mulheres (Stewart, B.W., Wild, C.P., 2014; INCA, 2018).

Estimativas brasileiras também demonstram o aumento progressivo no número de mulheres atingidas pela doença. De acordo com o INCA, em 2016 foram estimados 57.960 novos casos de câncer de mama para o país, enquanto em 2018 foram previstos aproximadamente 59.700 novos casos, sendo a região Sudeste a mais afetada do país, seguido pelas regiões Nordeste e Sul, respectivamente (INCA, 2016;

INCA, 2018). A crescente taxa de mortalidade desde 2006 (Tabela 1), reafirma a necessidade de ações e programas que preconizem o diagnóstico precoce e tratamento adequado da doença.

Ano	Mama	Brônquios e Pulmões	Colo do Útero	Colon	Localização Primária Desconhecida
2006	11,45	7,08	4,86	3,70	4,60
2007	11,29	7,32	4,80	3,81	4,55
2008	11,69	7,51	4,81	3,82	4,32
2009	11,43	7,48	4,84	3,88	3,98
2010	11,51	7,40	4,54	3,74	4,11
2011	11,90	7,85	4,66	3,91	4,07
2012	12,83	8,00	4,62	4,01	4,16
2013	12,00	8,12	4,62	4,10	4,05
2014	11,98	8,34	4,51	4,20	3,88
2015	12,19	8,57	4,61	4,08	3,86
2016	12,73	8,81	4,70	4,20	3,96

Tabela 1. Taxa de mortalidade das 5 localizações primárias mais frequentes em 2015, ajustadas por idade, pela população mundial, por 100 mil mulheres, Brasil, entre 2006 e 2016 (INCA, 2016).

Tão importante quanto o acesso ao tratamento adequado, o diagnóstico correto e precoce do câncer de mama é fundamental na sobrevida das pacientes. Dados do Serviço Nacional de Saúde Inglês (NHS), que avaliou mulheres com faixa etária de 15 a 99 anos no Reino Unido entre os anos 2002 a 2006, verificou que a taxa de sobrevida relativa em 5 anos é de mais de 90% e 80% nos casos de câncer de mama em estágios I e II, mas somente de 55% e 15% nos estágios III e IV, respectivamente (CRUK, 2016), estágios estes considerados mais agressivos devido o comprometimento maior da mama e tecidos adjacentes (Tabela 2). Apesar disso, no Brasil, segundo Lee, B.L. *et al.,* 2012, 20,2% das pacientes foram diagnosticadas com câncer de mama em estágio I, 46,8% e 24,6% nos estágios II e III, respectivamente, enquanto 4,4% já se encontravam em estágio IV. De acordo com estudo prospectivo realizado pelo Grupo Brasileiro de Estudos do Câncer de Mama (GBECAM), utilizando dados epidemiológicos de mulheres diagnósticas com a doença em todas as regiões do país, demonstrou que cerca de 40% das mulheres são diagnosticadas nos estágios mais graves da neoplasia de mama, sugerindo baixo índice de rastreamento da doença (Cecilio, A.P. *et al.,* 2015).

Estadiamento	Características
0	Considerado como Carcinoma *in situ*, as células cancerígenas estão presentes ao longo da estrutura do lóbulo ou ducto, sem invadir tecido circundante.
I	Tumor invasivo pequeno (< 2 cm) mas que não se espalhou pelos linfonodos.
II A	Tumor invasivo pequeno (< 2 cm) que infiltrou linfonodos axilares; Tumores entre 2 e 5 centímetros, mas não atingiu linfonodos axilares; Não há evidência de tumor na mama, mas existe câncer nos linfonodos axilares.
II B	Tumor possui 2 a 5 centímetros e atingiu linfonodos axilares; Tumor maior que 5 centímetros, mas não atingiu linfonodos axilares.
III A	Tumor é menor que 5 centímetros e se espalhou pelos linfonodos axilares que estão aderidos uns aos outros ou a outras estruturas vizinhas; Tumor é maior que 5 centímetros, atingiu linfonodos axilares os quais podem ou não estar aderidos uns aos outros ou a outras estruturas vizinhas.
III B	O tumor infiltra a parede torácica ou causa edema ou ulceração da mama ou é diagnosticado como câncer de mama inflamatório. Pode ou não ter se espalhado para os linfonodos axilares, mas não atinge outros órgãos.
III C	Tumor de qualquer tamanho que não se espalhou para partes distantes, mas que atingiu linfonodos acima e abaixo da clavícula ou para linfonodos dentro da mama ou abaixo do braço.
IV	Tumor de mama metastático. O tumor de qualquer tamanho espalhou-se para outros locais do corpo, como ossos, pulmões, fígado ou cérebro.

Tabela 2. Classificação por estádio do câncer de mama (Amin, M.B. *et al*., 2018).

Atualmente, o INCA recomenda que a mamografia seja oferecida a mulheres com idade entre 50 e 69 anos, a cada dois anos, uma vez que esta é a faixa etária com maior taxa de incidência da doença (INCA, 2018; ACS, 2018), além de apresentar melhor equilíbrio entre os riscos e benefícios pela realização da mamografia de rotina. Além deste exame, o histórico familiar, anamnese da paciente e outros métodos de diagnóstico – tais como ultrassonografia, imagem de ressonância magnética e biópsia - são utilizados na detecção precoce de possíveis alterações patológicas da mama (CDC – EUA, 2018).

1.3. Aspectos Anatomopatológicos

O câncer de mama abrange diferentes tipos de tumores, com diferentes características clínicas, curso de doença, prognóstico, níveis de agressividade, além

de apresentar diferentes respostas em função às distintas modalidades terapêuticas empregadas. Entretanto, todos atingem o tecido mamário e podem originar-se na mesma estrutura anatômica. Aspectos celulares e teciduais, incluindo classificações histopatológicas e moleculares são utilizados para classificar os tumores de mama em diferentes grupos (Bertos, N.R., Park, M., 2011).

Resultado de um processo cumulativo de alterações celulares, a neoplasia maligna de mama se desenvolve a partir de lesões classificadas como pré-tumorais, e, portanto, consideradas benignas - tais como a hiperplasia atípica ductal (ADH), atipia epitelial plana (FEA) e hiperplasia atípica lobular (ALH). Nestes tipos de lesões, as células parenquimatosas da glândula mamária apresentam proliferação alterada, associada a alterações citológicas e anormalidade na arquitetura celular. Ainda que estas lesões sejam classificadas como benignas, a evolução da lesão pode acarretar no desenvolvimento do câncer de mama. De acordo com Said, S.M. *et al.,* 2015, a presença de hiperplasia atípica (AH) aumenta em 4 vezes o risco do aparecimento da doença no decorrer dos anos. Burstein, H.J. *et al.,* 2004 demonstra (Figura 2) a progressão das alterações histológicas durante o desenvolvimento do câncer de mama, em diferentes estágios da doença (Bombonati, A., Sgroi, D.C., 2001).

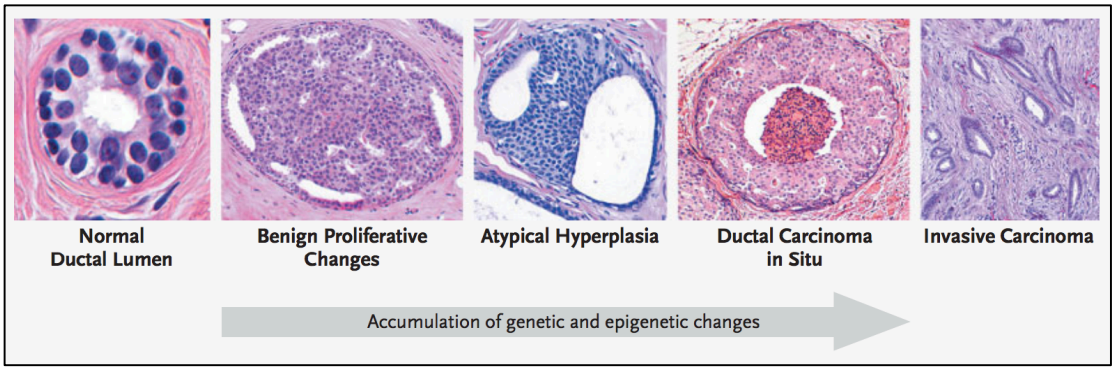

Figura 2. Eventos patológicos associados ao Carcinoma Ductal *in situ.* (Burstein *et al.,* 2004).

Os tumores de mama são classificados pela histopatologia de acordo com suas características morfológicas, de maneira que a maior parcela se encaixa no grupo dos adenocarcinomas, que constitui mais de 95% das variações do câncer de mama. Os dois principais tipos de adenocarcinomas são o carcinoma *in situ* e o carcinoma invasivo. O carcinoma ductal *in situ* (DCIS) é considerado a forma mais comum quando comparada ao carcinoma lobular *in situ* (LCIS), enquanto o carcinoma ductal invasivo (IDC) é o considerado mais frequente para os adenocarcinomas invasivos de

mama. Ambos carcinomas *in situ* e invasivo são classificados em diferentes subtipos, tais como o medular, cribiforme, metaplásico, apócrino, mucino, papilar, micropapilar, neuroendócrino (Malhotra, G.K. *et al.,* 2010; Sinn, H., Kreipe, H., 2013; Makki, J., 2015).

Receptores celulares e outras moléculas são utilizados não somente para classificar os variados tipos de câncer de mama, mas também para direcionar a melhor abordagem terapêutica. A partir da avaliação dos receptores de estrógeno (ER), progesterona (PR), fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2/neu), fator de crescimento epidermal humano 1 (EGFR), citoceratinas de padrão basal 5/6 (CK5/6), antígeno nuclear Ki-67, receptor androgênico (AR) e P53, os tumores podem ser classificados em: ER+ (ER+/HER2+), HER2+ (ER-/HER2+), triplo negativo (ER-/PR-/HER2-) e triplo positivo (ER+/PR+/HER2+). Ao longo dos anos, novas classificações surgiram, complementando as análises patológicas e imunohistoquimicas (Tang, P., Tse, G.M., 2015). Os trabalhos pioneiros de Perou, C.M. *et al.*, 2000 e Sorlie, T. *et al.* 2001 permitiram classificar os carcinomas de acordo com o perfil de expressão molecular. Através da caracterização das variações na expressão genética, foram identificados os sub-tipos: Luminal A, Luminal B, Normal-símile, HER2-enriquecido e Basal-símile.

1.4. Cancer de Mama Triplo-negativo (TNBC)

O câncer de mama triplo-negativo (TNBC) se refere a um conjunto de tumores caracterizados pela ausência de expressão do receptor de Progesterona (PR), Estrógeno (ER) e HER2/neu. Devido a falta destes marcadores celulares, pacientes que desenvolvem este tipo de neoplasia maligna não se beneficiam de terapia endócrina ou terapias cujo alvo molecular seja o HER2/neu, restringindo dessa forma as opções terapêuticas.

O diagnóstico do TNBC depende majoritariamente da avaliação dos perfis de expressão de PR e ER por imunohistoquímica (IHQ), além da verificação do perfil de expressão de HER2/neu por IHQ e/ou pela técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). A Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) e o Colégio Americano de Patologia (CAP) preconizam que somente sejam considerados TNBC amostras que apresentem níveis de coloração por IHQ < 1% para receptores de Estrogênio (ER), < 1% receptores de Progesterona (PR), e HER2/neu negativo por

IHQ ou FISH (Hudis, C.A., Gianni, L., 2011; Foulkes, W.D., Smith, I.E., Reis-Filho, J.S., 2010).

Além do diagnóstico realizado por técnicas como IHQ e FISH, esforços têm sido feito afim de compreender as bases moleculares do TNBC, de maneira a atribuir características que possam servir para o direcionamento mais eficaz do tratamento. Numerosas tentativas têm sido feitas a fim de se estabelecer a classificação molecular dos tumores TNBC, baseados em resultados transcriptomicos e genômicos (Bianchini, G. *et al.,* 2016). Ainda que inicialmente o subtipo intrínseco *Basal*-símile tenha sido utilizado como sinônimo para descrever o câncer de mama triplo-negativo, estudos demonstraram que este tipo de neoplasia maligna é marcado pela heterogeneidade e, portanto, a definição não se aplica (Bastien, R.R. *et al.,* 2012). Posteriormente, novos subtipos para o fenótipo triplo-negativo, tais como Claudina-baixo*,* Molecular-apócrino e Luminal-símile foram descritos (Prat, A. *et al.*, 2010).

Lehmann, B.D. *et al*., 2011, demonstraram – através da análise de transcriptomas – a existência de seis subtipos no câncer de mama triplo-negativo: Basa-símile 1 (BL1), Basal-símile 2 (BL2), Imunomodulatório (IM)*,* Mesenquimal (M)*,* Mesenquimal células tronco (MSL) e Luminal androgênico (LAR). Outras classificações foram propostas por Curtis, C. *et al.,* 2012 e Burstein, M.D. *et al.,* 2015, levando em consideração a integração dos CNAs, perfis de expressão genética e prognóstico. Entretanto, há que ressaltar que, apesar dos subtipos estarem incluídos no fenótipo triplo-negativo, a resposta ao tratamento é diferenciada devido às diferenças nos perfis moleculares e celulares (Lehmann, B.D. *et al.,* 2016; Masuda, H. *et al.,* 2013)

Caracterizado pela maior agressividade, pior prognóstico e elevada taxa de mortalidade, o TNBC atinge mulheres mais jovens quando comparado aos demais variações dos tumores de mama. Além disso, dados epidemiológicos sugerem que este subtipo tende a ser mais prevalente na população afrodescendente quando comparado a mulheres de outras etnias (DeSantis, C.E. *et al.,* 2016; Gretchen, G.L., Burke, A., Anderson, W.F., 2010). A idade na primeira gravidez, período de amamentação, nuliparidade, elevação da razão cintura/quadril também são considerados fatores de risco associados ao desenvolvimento de tumores triplo-negativo (Anders, C.K., Carey, L.A., 2009).

1.5. Modelos de Estudo

Desde os experimentos de Losee e Ebeling em 1914 até isolamento e cultura *in vitro* com sucesso das células de adenocarcinoma de cérvix de Henrietta Lacks por George Otto Gey em 1951, novas tecnologias e modelos para o estudo do câncer tem surgido (Lucey, B.P., Nelson-Ress, W.A., Hutchins, G.M., 2009; Honegger, P., 2011). Culturas *in vitro* tem demonstrado ser um método de grande valor para o estudo de funções e mecanismos de diversos tipos celulares.

Dentre a extensa modalidade de culturas *in vitro*, a técnica de cultivo em monocamada é a mais comumente empregada nos laboratórios de pesquisa, visto sua relativa facilidade de manutenção, controle das condições físico-químicas (pH, temperatura, concentração de O_2 e CO_2, osmolaridade), regulação das condições nutricionais, homogeneidade celular, além de serem facilmente caracterizadas em estudos citológicos e histológicos. Ainda assim, o modelo também possui suas desvantagens, como a limitação das interações célula-célula e célula-componentes da matriz extracelular, além de possíveis alterações genéticas pelo cultivo contínuo (Park, K.M., Lewis, D., Gerecht, S., 2017).

Afim de superar limitações impostas pelo modelo de monocamada, novas modalidades de cultura *in vitro* tem sido desenvolvidas e apresentas nas últimas décadas, agregando maior complexidade e mimetizando de forma mais fidedigna o microambiente tumoral. No trabalho desenvolvido por Park, K.M., Lewis, D., Gerecht, S., 2017; Pradhan, S. *et al.,* 2017, são apresentados técnicas avançadas como o cultivo de células em diferentes tipos de matrizes e microesferas, afim de explorar as mudanças na morfologia, sinalização, adesão, migração e proliferação de células cancerígenas. Sistemas de cultura em três dimensões (3D), co-cultura e microfluidos são novos modelos mencionados que têm sido integrados na rotina dos laboratórios de pesquisa do câncer (Parlato, S. *et al.,* 2017; Donglai, L. *et al.,* 2017).

Apesar da evolução dos modelos *in vitro* empregados nas últimas décadas, o uso de modelos *in vivo* ainda é uma ferramenta indispensável para o estudo das neoplasias. O uso de camundongos permite o estudo da iniciação do tumor, manutenção, progressão e resposta ao tratamento. Há um grande número de modelos tumorais transplantáveis disponíveis, de forma a refletir diferentes tipos e estágios da doença. Estes modelos recapitulam mutações genéticas, mecanismos de resistência tumoral e características únicas de diferentes tumores, que podem - até certo ponto -

simular diferentes tipos de câncer em humanos. Da mesma forma que modelos *in vitro*, o uso de camundongos para o estudo de neoplasias malignas também apresenta limitações. A utilização de camundongos imunocomprometidos e imunodeficientes pode não representar o processo natural de desenvolvimento tumoral, dado a incapacidade de geração de resposta imune adequada nestes animais, resposta esta intimamente associado a progressão tumoral (Lei, Z. *et al.,* 2016). Além disso, terapias experimentais testadas em camundongos não necessariamente terão resposta similar em humanos. Ademais, diferenças entre o microambiente tumoral de camundongos e humanos também devem ser aspectos a serem considerados pelos pesquisadores (Holen, I. *et al.,* 2017).

1.5.1. Modelos para estudo do TNBC

Apesar do surgimento de novas tecnologias, o uso de células *in vitro* ainda é recorrente no estudo de células do fenótipo triplo-negativo. Em revisão de literatura realizada por Chavez, K.J., Garimella, S.V., Lipkowitz, S., 2010, foram descritas 27 linhagens celulares de câncer humano classificados como TNBC. Apesar da existência de outras linhagens humanas, as 27 foram as mais comumente empregadas. Além disso, é verificada que parcela expressiva das linhagens utilizadas como modelo de estudo do TNBC recebe classificação molecular basal-símile (Lehmann, B.D.*,* Pietenpol, J.A.*,* 2014).

Ainda que espécies diferentes, células obtidas a partir de tumores mamários de camundongos têm sido vastamente utilizadas no estudo do câncer de mama, dado aspectos semelhantes entre tumores de mama de humanos e camundongos. Conforme observado por Hollern, D.P., Andrechek, E.R., 2014, foi verificado similaridade entre modelos celulares murinos e humanos tanto ao nível de expressão gênica quanto na atividade de vias celulares. Rennhack, J. *et al.,* 2017 por sua vez atestou que número significativo de CNAs amplamente conservadas e compartilhadas entre tumores de mama humano e murino.

Além de modelos experimentais *in vitro,* modelos *in vivo* também são empregados na pesquisa de neoplasias de mama. Conforme pode ser verificado na Tabela 3, diferentes modelos murinos têm sido utilizados, de maneira que a escolha deverá ser realizada em função do objetivo de pesquisa, pautado pelas vantagens e

desvantagens do modelo escolhido. Dentre os mais comumente utilizados, se encontram os modelos de transplantes/enxertos celulares. Nestes, células cancerígenas derivadas de camundongos ou humanos são cultivadas *in vitro* e sequencialmente transplantadas no hospedeiro que, a depender do local de inóculo, é subclassificado em ectópico (ex.: inóculo subcutâneo), ortotópico (ex.: inóculo na glândula mamária/almofada de gordura), metástico (ex.: injeção intra-cardíaca ou veia caudal). Quando o transplante de células tumorais é realizado em hospedeiro de linhagem correspondente, é denominado transplante singênico (ex.: células tumorais linhagem BALB/c 4T1). Modelos que se baseiam na modificação genética surgiram ainda na década de 80 e desde então têm sido implementados ao longo dos últimos anos (Kersten, K. *et al.,* 2017). Ao contrário dos modelos anteriores, estes são baseados na clonagem de genes oncogênicos e introdução dos mesmos em camundongos (ex.: Modelo FVB-Tg C3-1-TAg) ou pela inativação de genes supressores de genes ou ativação de de oncogenes através do uso agentes exógenos ou vírus, de maneira que ambos ocasionam no surgimento do tumor de mama no animal (Holen, I. *et al.,* 2017; Usary, J. *et al.,* 2018).

Modelos	Vantagens	Desvantagens
Transplante celular ectópico	Rápido, Baixo custo, simplicidade técnica. Envolve células tumorais humanas. Mensuração do tamanho tumoral fácil. Possibilidade de remoção do tumor.	Hospedeiro imunocomprometido; Alguns subtipos não são capazes de crescer; Crescimento tumoral em local periférico; Modela somente estágio avançado da doença
Transplante celular ortotópico	Microambiente apropriado; Mensuração do tamanho tumoral. Possibilidade de remoção do tumor.	Tecnicamente mais complexos que modelos ectópicos; Hospedeiro imunocomprometido; Alguns subtipos não são capazes de cresce; Modela somente estágio avançado da doença
Transplante celular metastático	Crescimento tumoral em locais específicos (Ex.: Ossos, Pulmão)	Não há tumor primário, de forma que os estágios iniciais não são mimetizados.
Transplante celular humano	Implantação de células tumorais ou fragmentos tumorais. Tumores mantêm características histopatológicas e genéticas do tumor original. Possibilidade de remoção do tumor	Subtipos agressivos são favorecidos; Requer acesso ao material fresco do paciente; Custo elevado; Hospedeiro imunocomprometido; Estroma murino substitui estroma humano ao longo das passagens celulares.

Singênico	Tumores com alta taxa de crescimento; Tumor e microambiente tumoral derivam da mesma espécie; Hospedeiro imunocompetente; Possibilidade de remoção do tumor; Podem ser metastáticos.	Microambiente tumoral murino; Local de metástase, frequência e latência altamente variados;
Geneticamente modificado convencional	Microambiente natural; Sistema Imune intacto; Modela estágios iniciais e tardios da doença; Pode ser metastático	Microambiente tumoral murino; Não há representação genética humana fidedigna; Pode haver alteração nos níveis de expressão genética devido a integração do transgene; Não pode ser utilizado para testar determinadas terapias.
Geneticamente modificado condicional	Microambiente natural; Sistema Imune intacto; Modela estágios iniciais e tardios da doença; Recapitulo a heterogeneidade genética; Histopatologia representativa	Microambiente tumoral murino; Baixa frequência de metástases e raros modelos clínicos de metástase

Tabela 3. Vantangens e desvatangens dos principais tipos de modelos murinos *in vivo* para o câncer de mama (Holen, I. *et al.,* 2017).

Distintas formas de classificação podem ser utilizadas para segmentação dos modelos para o estudo das neoplasias malignas de mama triplo-negativas. Yang, Y. *et al.,* 2017, classificou os modelos existentes de acordo com sua eficiência de metástase, status do sistema imune do hospedeiro e proximidade com tumores de mama humanos. Dentre os modelos descritos pelo trabalho se encontram linhagens de células TNBCs obtidas a partir do surgimento tumoral espontâneo, tais como 4T1, D2A1, E0771, EMT-6, F311, assim como linhagens tumorais provinientes de camundongos transgênicos, como F311, HRM-1, M6, Met-1, MVT1, R3T. Novos modelos tumorais murinos também foram avaliados nos trabalhos desenvolvidos por Kaur, P. *et al.,* 2012 e Huang, C. *et al.,* 2014.

Descobertas relevantes têm sido feitas nos últimos anos utilizando os modelos destacados anteriormente. Cecil, D.L. *et al.,* 2018, pesquisando a eficiência de uma vacina direcionada a proteínas associadas a transição epitélio-mesenquimal de células triplo-negativas de mama, observou que o crescimento tumoral em camundongos FVB-Tg C3-1-TAg foi inibido em mais de 80% comparado ao grupo controle. Em trabalho realizado por Crosby, E.J. *et al.,* 2018, utilizando células E0771 e 4T1 foi verificado que o tratamento conjunto utilizando anti-CTLA4 e anti-PD1

produziu resultado mais eficaz quando comparado ao uso individual dos medicamentos.

1.5.2. Modelo Tumoral 4T1

Células de adenocarcinoma triplo-negativo de mama 4T1 foram originalmente isoladas a partir de camundongos BALB/c por Fred Miller e colaboradores ainda na década de 80 (Dexter et al., 1978; Miller, F.R., Miller B.E., Heppner, G.H., 1983; Miller, F.R., 1983) e desde então têm sido amplamente utilizadas nos estudos do câncer de mama. O tumor cresce em camundongos de linhagem BALB/c e em cultura *in vitro*, sendo uma das quatro sublinhagens derivadas do tumor 410.4. Células da linhagem 4T1 são altamente tumorigênicas e invasivas, causando metástases a partir do tumor primário em diversos tecidos, incluindo linfonodos, sangue, fígado, pulmões, cérebro e ossos (Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2000).

O tumor desenvolvido por estas células possui várias características que o tornam um modelo experimental animal adequado como modelo do câncer de mama. Estas células podem ser facilmente transplantadas na glândula mamária, de modo a mimetizar o crescimento tumoral em humanos. Além disso, assim como no câncer de mama em humanos, a metástase progride de forma espontânea a partir do tumor primário, sem que haja necessidade de remoção cirúrgica do tumor primário para o desenvolvimento de metástase. As células 4T1 ainda se espalham de maneira progressiva nos linfonodos e demais órgãos, aspecto semelhante ao que ocorre nas neoplasias humanas (Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2000).

Ao contrário das linhagens geneticamente modificadas, células 4T1 se originam de um processo espontâneo de tumorigenese, descartando possíveis interferências potencialmente causadas pela modificação do DNA. Além disso, estas células possuem menor custo comparado aos demais modelos expostos (Gómez-Cuadrado, L, *et al.,* 2017). A modificação genética pode ainda ocasionar em baixa penetrância e longo período de latência na fase metastática da doença. O modelo relembra características histopatológicas e moleculares visto na doença humana, de maneira que seu uso tem sido cada vez mais incorporado nas pesquisas pré-clínicas (Day, C., Merlino, G., Dyke, T.V., 2015).

Em oposição a células humanas, o desenvolvimento de metástase a partir de células murinas tende a ser mais eficaz, além de exibir características mais semelhantes aquelas observadas em pacientes com a neoplasia maligna (Vernon, A.E., Bakewell, S.J., Chodosh, L.A., 2007). Além disso, o modelo em questão possui a vantagem de permitir análises em animais com sistema imune em pleno funcionamento. Dado que o sistema imune desempenha papel fundamental no desenvolvimento e progressão do câncer, modelos que utilizem animais imunocompetentes são essenciais para a análise do avanço do câncer, além de permitir a avaliação de distintas terapias (Tao, K. *et al.*, 2008).

Apesar da boa reprodutibilidade e uso de animais imunocompetentes, o modelo 4T1 limita as observações feitas à fisiopatologia do camundongo, de forma que as evidências científicas extraídas não necessariamente corroborem com achados observados nas neoplasias de mama em humanos. Ainda assim, achados relevantes foram observados recentemente utilizando o modelo em questão. Nasti, T.H., Bullard, D.C., Yusuf, N., 2015 observou que o crescimento tumoral foi menor em animais *knockout* para o receptor de adesão P-selectina em relação a animais *wild-type*. Além disso, os animais *knockout* obtiveram maior taxa de sobrevivência e metástases reduzidas. De acordo com o estudo, a perda de P-selectina influenciou na capacidade de infiltração de Tregs, assim como reduziu citocinas pró-inflamatórias no local. Corroborando com tais achados, Goudin, N. *et al.,* 2016, verificou que a presença de Tregs se demonstra essencial na promoção tumoral. No trabalho desenvolvido, foi averiguado que a depleção de células Treg acarretou na regressão significativa da massa tumoral. Além disso, também foi observado um aumento substancial de células dendríticas nos linfonodos drenantes, população esta capaz de orquestrar a ativação, amplificação e migração de células T efetoras ao microambiente tumoral.

Demais células do sistema imune aparentam possuir papel pertinente no curso de desenvolvimento da neoplasia de mama. Steenbrugge, J. *et al.,* 2018 verificou que a co-cultura de macrófagos e células 4T1 ocasionou na polarização de macrófagos do estado pró-inflamatório (M1) ao estado anti-inflamatório (M2), caracterizado pela diminuição nos níveis de expressão intracelular de Interleucina 12 (IL-12) e aumento nos níveis de fator de transformação do crescimento beta (TGF-ß). Kakoschky, B. *et al.,* 2018, estudando macrófagos associados ao tumor (TAMs), constatou que o peptídeo denominado M2pep foi capaz de se ligar seletivamente e ser internalizado

em macrófagos M2 presentes no tumor 4T1 e regiões associados, de modo que o peptídeo M2pep trás uma abordagem promissora para o desenvolvimento seletivo de fármacos, que possam eventualmente ser utilizados no combate da doença. Gebremeskel, S. *et al.,* 2017, verificou que a combinação de quimioterápicos junto a terapia de ativação de células NKT aumentou de forma significativa a sobrevivência dos camundongos desafiados por células 4T1. Além disso, foi observado que os camundongos tiverem o crescimento tumoral atenuado quando desafiados novamente, demonstrando que a terapia de ativação de células NKT possui potencial de ser usada em combinação com quimioterápicos já em uso afim de aumentar a proteção contra reincidência do tumor (Tabela 4).

Objetivo	Conclusão	Autores
Investigar o papel da P-selectina na regulação de diferentes subtipos de linfócitos T no microambiente tumoral.	Camundongos sem P-selectina tiveram menor crescimento tumoral, maior taxa de sobrevivência e metástase reduzida compara a animais *wild-type*. A perda de P-selectina inibiu a infiltração por células Treg.	Nasti, T.H., Bullard, D.C., Yusuf, N., 2015.
Observar as consequências no microambiente tumoral da depleção de linfócitos T regulatórios.	A depleção parcial de linfócitos T regulatórios levou a regressão do tumor 4T1 em camundongos BALB/c, assim como ocasionou na geração de uma população particular de linfócitos TCD8, expressando CD11c e baixos níveis de PD-1.	Goudin, N. *et al.,* 2016
Averiguar as respostas imunológicas responsáveis por guiar a progressão tumoral intraductal, focando no papel de macrófagos.	Foi observado que células 4T1 são capazes de modificar o status inflamatório de macrófagos quando em co-cultura, assim como em modelo animal.	Steenbrugge, J.E. *et al.,* 2018
Verificar se o peptídeo M2pep teria capacidade de se ligar e ser internalizado por macrófagos associados ao tumor (TAMs) em modelo 4T1.	Foi verificado que o peptídeo M2pep possuí a capacidade de se ligar especificamente em alvos de macrófagos associados ao tumor tipo M2, tornando o subtipo anti-inflamatório alvo para desenvolvimento de novos fármacos.	Kakoschky, B. *et al.,* 2018

Investigar se a ativação de células NKT podem ser combinadas com agentes quimioterápicos afim de proporcionar melhor resposta terapêutica.	A combinação de quimioterápicos com o uso de células NKT ativadas aumentou significativamente a sobrevida dos camundongos. Além disso, foi o crescimento tumoral foi atenuado. O tratamento aumentou a ativação de células imune e resposta citotóxica.	Gebremeskel, S. *et al.,* 2017

Tabela 4. Breve descrição dos resultados encontrados por diferentes autores em relação a modelos *in vivo* utilizando células da linhagem 4T1.

1.6. Aspectos da Imunidade Tumoral

Nos primeiros estágios da carcinogênese, as células tumorais são rejeitadas por mecanismos que envolvem células da imunidade inata, tais como células NK, macrófagos, subpopulações de células dendríticas, além de eosinófilos, neutrófilos e mastócitos (Figura 3). A interação entre receptores presentes em células NK, como NKG2D à moléculas presentes na superfície de células tumorais, tais como MIC, MICB, UL16, RAE, estimulam a produção e secreção de IFN-y, perforinas e granzimas, que, por sua vez, são capazes de eliminar células neoplásicas diretamente. Embora a existência de tais moléculas tumorais possa acarretar na ativação de células NK, outras, tal como LLT1, atuam no sentido de inibir a ação de células *Natural Killer.* O *knockout* de tais moléculas é capaz de recuperar a eliminação de células tumorais (Marrufo, A.M. *et al.,* 2018). Além do combate direto às células neoplásicas, células NK também participam da ativação de linfócitos TCD8+ e promovem a diferenciação de células TCD4+ no subtipo TH1, estado este caracterizado por estímulo a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-2, INF-y e TNF-ß, além de estimular resposta inflamatório por fagócitos (Liu Y, Zeng, G., 2012; Woo, S.R., 2015).

Amplamente distribuídos em diferentes tecidos e considerados um dos principais fagócitos do sistema imune, macrófagos são de suma importância no curso de evolução do câncer de mama. Ainda que estas células sejam capazes de reconhecer antígenos de superfície, como moléculas de fosfatidilserina (PS) e moléculas de adesão intercelular ICAM-3, promovendo a fagocitose de células cancerígenas tumorais em estado apoptótico, a capacidade de atuação destas células contra células neoplásicas é muitas vezes insuficiente (Zhao, X. *et al.,* 2017; Gwak, J.M. *et al.,* 2015). Células tumorais através da síntese e secreção de citocinas como fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), fator de crescimento vascular

endotelial (VEGF) e CCL2 promovem o recrutamento de monócitos e macrófagos ao microambiente tumoral. No local a presença de tais citocinas e fatores induzem – ainda que os mecanismos celulares e moleculares não estejam completamente elucidados – a transformação em macrófagos associados ao tumor (TAMs), cujas funções no microambiente são múltiplas. Fatores sintetizados (VEGF, FGF) por tais células, promovem a formação de novos vasos, acarretando no maior aporte de oxigênio e nutrientes ao local. Além disso, é verificado que estas populações são capazes de modificar a arquitetura tecidual em prol da invasão e metástase tecidual pelas células neoplásicas. Metaloproteinases (MMPs) e outras proteinases - como a família das catepsinas são ativamente liberadas ao microambiente tumoral, hidrolisando componentes importantes do estroma celular, como moléculas de colágeno, laminina, fibronectina e fibrina, o que possibilita a evasão de células tumorais do sítio primário de crescimento. (Woo, S.R. *et al.,* 2015; Liu, Y., Cao, X., 2015; Tan, G. *et al*., 2013; Caley, M.P., Martins, V.L.C., O'Toole, E.A., 2015). Abordagens terapêuticas visando o bloqueio de metaloproteinases, catepsinas e componentes moleculares associadas têm sido investigado nos últimos anos. De acordo com pesquisas realizadas nos últimos anos, o bloqueio de metaproteinases resultam na menor migração e invasão de células neoplásicas (Huang, T.H. *et al.,* 2015; Kim, G.E. *et al.,* 2014; Magee, P.J. *et al.,* 2014; Roomi, M.W. *et al.,* 2012; Al-Mahmood, S. *et al.,* 2018).

Compartilhando características com macrófagos, células dendríticas também estão envolvidas na progressão tumoral. Receptores expressos por células dendríticas, tais como receptores do tipo *scavenger*, TIM e PS, capacitam esta população celular a reconhecer antígenos presentes em células tumorais, de forma que estas células sejam fagocitadas, antígenos processados e apresentados posteriormente. Apesar disso, dados demonstraram que células de câncer podem prevenir a apresentação e o estabelecimento de resposta imune específica a antígenos tumorais (Palucka, K., Coussens, L.M., O'Shaughnessy, J., 2013). Além disso, é observado que fatores secretados por células tumorais, tais como TSLP, tem capacidade de alterar a maturação de células dendríticas, de forma a estimular a expressão de OX40L (CD-134), molécula esta pertencente a família de TNF e crucial em diferentes tipos de reações imunes mediadas por linfócitos T (Croft, M. *et al.,* 2013). Através do OX40L, células dendríticas estimulam a produção e secreção de citocinas de natureza imunossupressora – tais como IL-4 e IL-13, que, em última instância,

passam a promover o desenvolvimento tumoral (Yang, W. *et al.,* 2017; Papageorgis, P. *et al.,* 2015; Terabe, M., Park, J.M., Berzofsky, J.A., 2004). O bloqueio de OX40L e TSLP em modelo de câncer de mama foi capaz de inibir o desenvolvimento tumoral. Novas modalidades terapêuticas que visam o bloqueio de células dendríticas de perfil pró-tumoral tem demonstrado resultado promissores, reafirmando que tais células possuem papel relevante no contexto do crescimento dos tumores de mama (Pedroza-Gonzales, A. *et al*., 2011, De Mingo Pulido, A. *et al.,* 2018).

Ainda que pesquisados em menor extensão, o papel desempenhado pelo grupo dos granulócitos, tais como mastócitos, neutrófilos e eosinófilos – têm sido estudados no decorrer dos últimos anos. De acordo com os achados de Ribatti, D., 2013, mastócitos executam papel crucial na angiogênese e progressão tumoral. Estas células são atraídas em direção ao microambiente tumoral e passam a produzir diversos fatores angiogênicos, como VEGF e bFGF assim como metaloproteinases, promovendo em última instância vascularização tumoral e invasão, respectivamente. Papa, A. *et al.,* 2015 e Lian, C. *et al.,* 2016 constataram que uma das moléculas secretadas por mastócitos ativos, o fator de crescimento semelhante ao fator de crescimento epidérmico de ligação à heparina (HB-EGF) está correlacionado ao progresso tumoral, metástase, resistência a drogas e angiogênese em tumores de mama triplo-negativo.

Considerado como um dos principais agentes e primeira linha de defesa do sistema imunológico inato, o papel exercido por neutrófilos na carcinogênese ainda está sob investigação. Ainda que neutrófilos possuam uma ampla gama de mecanismos anti-tumorais, nem sempre estes mecanismos são suficientes para prevenir a multiplicação de células tumorais (Uribe-Querol, E., Rosales, C., 2015). Espécies reativa de oxigênio (ROS), produzidas para eliminação de células tumorais, podem contribuir no processo de carcinogênese. De acordo com De Larco, J.E., Wuertz, B.R.K., Furcht, L.T., 2004, Shabani, F., McNeil, J., Tippett, L., 1998, ácido hipocloroso (HOCl) produzido a partir da conversão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ativar diversas metaloproteinases, degradando a matriz extracelular e contribuindo para proliferação de células neoplásicas. Além disso, é verificado que ROS derivado de neutrófilos tem capacidade de causar mutações pontuais e quebra na fita de DNA, potencialmente agravando o processo de mutação celular em células tumorais (Gungor, N. *et al.,* 2010).

Similar aos neutrófilos, a literatura acerca do papel de eosinófilos no progresso da doença de mama é escassa. Os poucos estudos disponibilizados apontam que um número elevado de eosinófilos está associado a um melhor prognóstico. Estudo conduzido por Ownby, H.E. *et al.,* 1983, verificou que pacientes com baixa contagem de eosinófilos no sangue tinham risco elevado de recorrência do câncer de mama em relação a pacientes com número normal ou elevado de eosinófilos, levantando a hipótese que estas células contribuem no combate tumoral. Achados similares também foram verificados em estudo conduzido por Onesti, C.E. *et al.,* 2018, em que melhor prognóstico esteve associado a pacientes com contagens elevadas de eosinófilos.

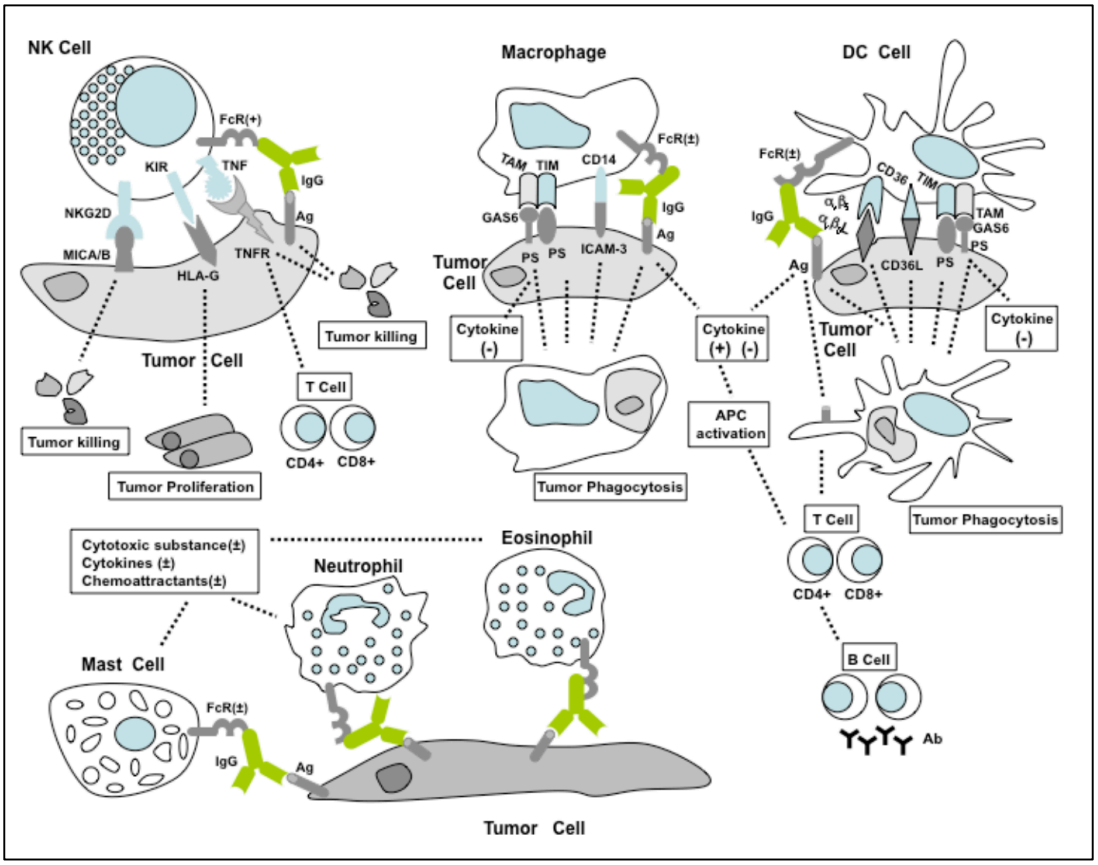

Figura 3. Reconhecimento de células tumorais pelo sistema imune inato. Células NK, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos são componentes celulares deste sistema (Liu & Zeng, 2012).

Células da imunidade adaptativa também exercem papel crucial no câncer de mama. Originados a partir da continua diferenciação e especialização de células

progenitoras linfoides, linfócitos T e B desempenham funções imprescindíveis no decorrer da neoplasia maligna de mama. Após os eventos moleculares associados a expressão e maturação adequada do receptor, linfócitos deixam a medula óssea e passam o ocupar - em última instância - órgãos linfoides periféricos, tais como baço e linfonodos. Através da continua filtração de elementos do sangue e linfa, assim como células estranhas e patógenos, linfócitos e demais populações do sistema imune residentes nestes órgãos estão continuamente monitorando a presença de antígenos (Camara, N.O.S., Lepique, A.P., Basso, A.S., 2012).

Ao contrário de células normais, adventos mutacionais que ocorrem no material genético de células tumorais favorecem o surgimento de novos antígenos, proporcionando o reconhecimento por linfócitos T e B, assim como demais células de sistema imune (Houghton, A.N., Guevara-Patiño, J.A., 2004). Entretanto, há que ressaltar que determinadas células dentro da massa tumoral são capazes de perder seus antígenos, inviabilizando o reconhecimento por parte do sistema imune e contribuindo para evolução da neoplasia (Beatty, G.L., Gladney, W.L., 2015).

Papéis contrastantes de linfócitos T foram descritos na neoplasia maligna de mama no decorrer dos últimos anos. Ao passo que células Th1 promovem imunidade anti-tumoral, primariamente através da secreção de citocinas como IFN-gama, TNF-alfa e IL-2, estimulando a polarização de macrófagos a estados pró-inflamatórios (M1), colaborando com as funções citotóxicas de linfócitos TCD8 e estimulando a síntese e expressão de moléculas de MHC de classe I e II em células apresentadoras de antígenos, linfócitos do subtipo Th2 secretam citocinas como IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, que, por sua vez, induzem estado de anergia em linfócitos T e perda de citotoxicidade mediada por células T (DeNardo, D.G., Coussens, L.M., 2007). Em estudo realizado Ehi, K. *et al.,* 2008 analisando suptipos de linfócitos T em linfonodos sentinelas coletado de pacientes portadores de câncer de mama, foi verificado que - a depender do estadiamento da doença - há um aumento significativo de linfócitos Th2 em relação a linfócitos Th1, demonstrando dessa maneira que o predomínio de condições imunossupressoras é essencial para o progresso da doença. Tashnizi, A.H. *et al.,* 2014, avaliando os níveis de expressão de citocinas a partir de amostras de sangue coletado de pacientes diagnosticados com câncer de mama, observou níveis significativamente elevados de citocinas associadas a resposta Th1. Simultaneamente, foi averiguado elevados níveis de expressão de IL-10, citocina característica de resposta tipo Th2.

Linfócitos T regulatórios (Treg) também foram retratados em neoplasias malignas de mama (Varn, F.S. *et al.,* 2016; Gu-Trantien, C. *et al.,* 2013). Descritos nos meados da década de 90 por Sakaguchi, S., *et al.,* 1995, diferentes fenótipos se encontram dentro desta população, sendo verificado distintos perfis de secreção de citocinas, assim como diferentes mecanismos de imunossupressão (Jonuleit, H., Schmitt, E., 2003; Cretney, E., Kallies, A., Nutt, S.L, 2013). Evidências demonstram a produção de citocinas como IL-10, TGF-beta e IL-35 é capaz de suprimir resposta pró-inflamatória de linfócitos T e B, células NK, células dendríticas e macrófagos. A elevada expressão de CD25 (IL-2R) permite que populações de Tregs sequestrem IL-2 do estroma, de forma a restringir a ação efetora de linfócitos TCD8 e NK. (Chao, J.L., Savage, P.A., 2018; Caridade, M., Graca, L., Ribeiro, R.M., 2013; Shevach, E.M., 2009; Plitas, G., Rudensky, A.Y., 2016; Watanabe, M.A.E. *et al.,* 2010).

Ainda que os efeitos desencadeados a partir da ação de Tregs possam estar associados a progressão da doença em pacientes com câncer de mama, estudo de meta-análise feito por Shang, B. *et al.,* 2015, sugere que o papel prognóstico de Tregs é altamente influenciado pela localização do tumor e, igualmente, correlacionado ao subtipo molecular e estágio tumoral. Dados extraídos de pesquisas clínicas ratificam tal conclusão, Liu, S. *et al.,* 2014, observou que a presença de FOXP3+ Tregs indicam pior prognóstico em pacientes portadores do subtipo ER+ de câncer de mama, ao passo que foi verificado prognóstico favorável em subtipos HER2+/ER+. No subtipo triplo-negativo, numerosos estudos apontam que a presença de linfócitos T regulatórios estão associados um bom prognóstico, levantando a hipótese que os mecanismos empregados e efeitos correlacionados à presença desta população de linfócitos varia conforme o subtipo de câncer de mama presente no paciente (Tsiatas, M. *et al.,* 2018; Lee, S. *et al.,* 2013; Yeong, J. *et al.,* 2017; Zhou, Y. *et al.,* 2017).

A detecção e eliminação de células tumorais também é feita através de imunoglobulinas. Linfócitos B, responsáveis pela síntese e secreção de anticorpos, passam – de forma similar aos linfócitos T – por processo de maturação celular e molecular, de maneira que nos últimos estágios de diferenciação, estas células são capazes de sintetizar grande número de anticorpos específicos a determinado antígeno. Além do seu papel essencial na imunidade humoral, células B também participam ativamente mediando diversas outras funções fundamentais para a homeostase imunológica. Processamento e apresentação de antígenos peptídicos através da expressão de MHC II, co-estimulação de linfócitos T, regulação na

atividade de células dendríticas e polarização de células TCD4+ nos subtipos Th1 e Th2 estão entre as funções não relacionadas a produção de anticorpos (LeBien, T.W., Tedder, T.F., 2008).

Anticorpos circulantes capazes de reconhecer antígenos expressos por células de câncer tem sido detectado em pacientes portadores de câncer de mama. Alguns destes anticorpos são direcionados a antígenos associados ao tumor, tais como p53 mutado, enquanto outros são reativos a proteínas não mutadas presentes no hospedeiro. Além disso, é verificado que células tumorais em estado apoptótico ou em necrose podem contribuir para manutenção da inflamação no local de desenvolvimento tumoral pelo lançamento de antígenos próprios. Anticorpos produzidos por plasmócitos atuam através de diferentes mecanismos afim de contribuir para a resposta anti-tumoral: morte mediada através do sistema complemento, fagocitose mediada pela porção Fc por macrófagos e citotoxicidade mediada por células NK. Ademais, o revestimento de células neoplásicas permite com estas sejam capturadas, processadas por células dendríticas e seus antígenos apresentados a linfócitos TCD4 e TCD8, acarretando nas funções efetoras anti-tumorais destas células. Ainda que seja verificado a presença de anticorpos contra alvos citosólicos e proteínas nucleares derivadas de células de câncer de mama, a ação desencadeada contra tais antígenos é insuficiente para eliminação das células tumorais (Chen, C. *et al.,* 2015; Liu, T. *et al.,* 2014; Lenner, P. *et al.,* 1999).

Similarmente aos linfócitos T, o microambiente tumoral contém populações de linfócitos B de diferentes subtipos, que podem contribuir de maneira positiva ou negativa para a expansão da massa tumoral, a depender do subtipo da doença. Zhu, S. *et al*., 2017, analisando amostra de tumores de mama humano, verificou a presença de fenótipo específico de linfócitos B $CD27^+$ IgG^+ capazes de expressar elevados níveis de IFN-gama, citocina importante na promoção de ações anti-tumorais tais como aumento nas funções efetoras e proliferação de linfócitos TCD8+ e elevação na apresentação de antígenos por células dendríticas (Medrano, R.F.V. *et al.,* 2017). Segundo os autores, a presença de tal subtipo de linfócitos B poderia potencialmente promover a diferenciação de linfócitos $TCD4^+$ em Th1 além de suprimir as respostas desencadeadas por Tregs. Apesar disso, evidências também apontam para a presença de linfócitos B regulatórios em pacientes de câncer de mama, perfil celular cujas ações podem contribuir para a expansão tumoral (Tsuda, B. *et al.,* 2018; Shen, M. *et al.,* 2018; Guan, H. *et al.,* 2016).

A melhor compreensão da atuação dos diferentes tipos e subtipos de células do sistema imune ao longo do desenvolvimento do câncer de mama, permite com que novas modalidades terapêuticas sejam continuamente pesquisadas e empregadas (Pento, J.T., 2017; Scott, A.M, Allison, J.P, Wolchok, J.D., 2012; Schneble, E., Jinga, D., Peoples, G., 2015).

1.7. Infiltrados Linfocitários Tumorais (TILs)

Do ponto de vista imunológico, infiltrações por células mononucleadas em tumores sólidos indicam um local com processo inflamatório vigoroso, algo que foi observado ainda na década de 70 através dos trabalhos realizados por Underwood, J.C, 1974 e Ioachim H.L. 1976. Por meio da histologia, os autores propuseram que infiltrações por células mononucleadas em tumores humanos poderiam estar diretamente relacionadas ao prognóstico dos pacientes, além de representar estado de imunovigilância pelas células do hospedeiro. Apesar de nos anos subsequentes evidências de outros estudos terem sustentado tal hipótese, o papel de diferentes infiltrados linfocitários nos distintos subtipos da neoplasia de mama permanece a ser melhor elucidado (Zhang, Z. *et al.,* 2017).

Ao longo dos últimos anos, diferentes populações têm sido identificadas nos infiltrados linfocitários no câncer de mama. Ainda assim é verificado que as ações conferidas por distintas populações de linfócitos sofrem influência quanto ao subtipo da doença (Denkert, C. *et al*., 2018). No câncer de mama triplo-negativo têm sido destacados a elevada infiltração por linfócitos TCD8+, conforme verificado em estudo clínico realizado por Sikandar, B. *et al.,* 2017. A partir de amostras provenientes pacientes submetidos a mastectomia, foi certificado que aqueles com o subtipo triplo-negativo apresentaram elevação significativa para linfócitos T em comparação a pacientes portadores de demais subtipos moleculares da neoplasia de mama. Em trabalho similar, Matsumoto, H. *et al.,* 2016 e Wang, K. *et al.,* 2017 atestaram que a maior infiltração por linfócitos TCD4+ e TCD8+ promoveu maior taxa de sobrevivência entre os pacientes avaliados. Populações de linfócitos T regulatórios também têm sido detectadas em amostras de pacientes portadores de câncer de mama, sendo observado em alguns estudos prognóstico favorável em pacientes TNBC (Lee, S. *et*

al., 2013; West, N.R. *et al.,* 2013; Yeong, J. *et al.*, 2017). Ainda que a presença de células TCD4, TCD8 e mesmo Tregs possam estar associados a um melhor prognóstico em tumores triplo-negativos, os mecanismos moleculares empregados por estas células no combate deste subtipo de câncer de mama permanece por ser elucidado.

Atualmente, a infiltração por linfócitos B tem sido reconhecido como novo marco para a melhor compreensão dos eventos celulares associados ao desenvolvimento do câncer de mama. De forma similar aos achados de linfócitos T, dados recentes sugerem papel controverso de diferentes subtipos de linfócitos B no microambiente tumoral, sendo observado efeitos positivos, negativos ou sem significância para a predição e prognóstico da doença (Shen, M., Wang, J., Ren, X., 2018; Wouters, M.C.A., Nelson, B.H., 2018). Após a exposição ao antígeno, células B percorrem um caminho de diferenciação e estruturação celular e molecular até se tornarem células altamente especializadas na secreção de anticorpos. Desde a expansão a partir de um clone linfócito B até os processos que envolvem a contínua diferenciação de plasmablastos a plasmócitos ou linfócitos B de memória, numerosos genes e expressão de receptores são modificados (Tarte, K. *et al.,* 2003). Estudos prévios sugerem que linfócitos B presentes no infiltrado tumoral passam por proliferação, hipermutação somática e maturação da afinidade de anticorpos *in situ,* ainda assim poucos são os anticorpos produzidos por linfócitos B do infiltrado devidamente caracterizados (Pavoni, E. *et al.,* 2007; Hansen, M.H., Nielsen, H., Ditzel, H.J., 2001; Nzula, S., Going, J.J., Stott, D.I., 2003; Simsa, P. *et al.,* 2005).

Dados importantes foram lançados em primeira mão em pesquisa recente feita por Garaud, S. *et al.,* 2018. O estudo caracterizou o repertório de autoanticorpos IgG e IgA presentes em amostras de câncer de mama e tecido de mama normal utilizando ensaio de microarranjo, sendo posteriormente analisado a relação entre a presença de autoanticorpos e as características clinicais, histológicas e imunológicas de tumores de mama. Além de detectar a presença de plasmócitos nas amostras de tumor de mama, a partir da análise dos resultados obtidos de microarranjo, foi verificado que 86,4% de anticorpos IgG e 84,8% de anticorpos IgA das amostras de pacientes com câncer possuem capacidade de interação contra um ou mais dos 91 antígenos utilizados.

A detecção de populações de plasmócitos em infiltrados tumorais no câncer de mama foi destaca ainda na década de 80 em artigo publicado por Ito, T. *et al.,* 1986.

Yeong, J. *et al.*, 2018, analisando amostras de pacientes TNBC e utilizando imunohistoquímica afim de quantificar células B e plasmócitos no infiltrado tumoral, associado a mensuração da expressão de imunoglobulinas, verificou que pacientes com densidade acima da média para plasmócitos obtiveram melhor período longe de recidiva da doença e taxa de sobrevivência dos pacientes. Além disso, foi observado elevados níveis de expressão de imunoglobulinas que, por sua vez, estiveram associados a melhor prognóstico para os casos analisados. Achados similares foram observados nos estudos conduzidos por McIntire, P. *et al.,* 2018 e Bense, R.D. *et al.,* 2017, em que também foi verificada maior taxa de sobrevivência entre pacientes TNBC com frações mais elevadas de plasmócitos. Apesar de estudos apontarem a presença de plasmócitos assim como a presença de anticorpos como bom prognóstico, o papel desempenhado por esta população celular no infiltrado tumoral no subtipo triplo-negativo permanece por ser melhor esclarecido.

A partir da interação entre seu receptor e o antígeno, linfócitos B naïve proliferam-se e se diferenciam em células B memória ou células efetoras secretoras de anticorpos (LeBien, T.W., Tedder, T.F., 2008). Ainda que as populações de linfócitos B naïve estejam presentes em outros compartimentos - em destaque órgãos linfocitários secundários, o papel desempenhado por tais populações nos infiltrados linfocitários permanece por ser elucidado (McDaniel, J.R. *et al.,* 2018; Fittall, M.W. *et al.,* 2016). Purrington, K.S. *et al.,* 2018, através da análise histopatológica e perfil de expressão genética de mulheres afrodescendentes diagnosticadas com TNBC, observou que o aumento de linfócitos B naïve esteve associado pior sobrevida. Garaud, S. *et al.,* 2018, verificou a presença de linfócitos B naïve e diferentes estágios de maturação de linfócitos B de memória no infiltrado linfocitário tumoral de pacientes de mama. Ainda assim, novos estudos são necessários afim de verificar quais os mecanismos moleculares relacionados a migração de linfócitos B naïve para o local de desenvolvimento tumoral, assim como as implicações relacionados ao prognóstico da doença. O mesmo pode ser dito em relação as populações de linfócitos B de memória, uma vez que carecem dados a respeito da mesma na literatura atual.

População do infiltrado linfocitário que tem ganhado destaque nos anos recentes são os denominados linfócitos B Regulatórios. Apesar das funções supressoras de linfócitos B regulatórios terem sido inicialmente descritas ainda na década de 70 (Katz, S.I., Parker, D., Turk, J.L., 1974), somente a partir dos anos 2000 os mecanismos bioquímicos e moleculares foram experimentalmente observados

(Mizoguchi, A. *et al.,* 2002; Mauri, C. *et al.,* 2003; Filatreu, S. *et al.*, 2002). Possuindo diferentes mecanismos de ação, essa população de células B é capaz de agir alterando a atividade exercida por diferentes linhagens do sistema imune. Através da produção de IL-10, TGF-beta e IL-35, Bregs são capazes de suprimir a diferenciação de linfócitos pró-inflamatórios, tais como monócitos produtores de TNF-alfa, células dendríticas produtoras de IL-12, linfócitos Th1 e linfócitos citotóxicos TCD8. Ademais, Bregs são aptos a induzir a diferenciação de Tregs (Rosser, E.C., Mauri, C., 2015). Ao contrário das demais linhagens de linfócitos cuja diferenciação é muita das vezes baseada na expressão de um fator celular específico, evidências acumuladas ao longo dos últimos anos sugerem que a diferenciação de linfócitos B em células B regulatórias se dá pelas condições presentes no meio (Matsumoto, M. *et al.,* 2014; Blair, P.A. *et al.,* 2010). Dados reforçam tal hipótese, uma vez que são verificados diferentes tipos celulares – tais como plasmablastos, plasmócitos, linfócitos B imaturos, linfócitos B de transição e linfócitos B memória - com atividades regulatórias. Em virtude de diferentes linhagens de linfócitos B terem plena capacidade de exercerem funções regulatórias, numerosos fenótipos têm sido caracterizados em humanos e camundongo (Sarvaria, A., Madrigal, J.A., Saudemont, A., 2017; Wortel, C.M., Heidt, S., 2017; He, Y. *et al.,* 2014).

Evidências coletadas a partir de estudos conduzidos em modelos animais demonstram que a presença, assim como as atividades exercidas por Bregs nos tumores de mama triplo-negativo possuem aspecto relevante para o processo de tumorigênese. Olkhanud, P.B. *et al.,* 2011, utilizando modelo de células 4T1, demonstrou que o crescimento tumoral e metástase para os pulmões são dependentes da presença de células B regulatórias. O estudo observou que o crescimento tumoral aparenta ser mediado pela conversão de linfócitos TCD4+ em Tregs, especificadamente pela ação de TGF-beta secretado por células B regulatórias. Corroborando com estes achados, Tadmor, T. *et al.,* 2011, utilizando células EMT-6 em camundongos, também observou que a elevação de Tregs no infiltrado tumoral teve decréscimo significativo em animais depletados de linfócitos B. Em outro estudo, Wejksza, K. *et al*., 2013 utilizando modelo de câncer murino 4T1 sugeriu que metabolitos de 5-lipoxigenase são responsáveis por promover o desenvolvimento de células B regulatórias através do receptor de peroxisoma (PPARalfa).

Desde o início do processo de carcinogênese, a partir do aparecimento de células com alterações morfonucleares, até eventos que culminam na geração de

células neoplásicas capazes de deixarem o sítio primário de crescimento e desenvolver metástase, a avaliação do espaço temporal nos permite compreender melhor os eventos associados a expansão do tumor, de maneira que novos mecanismos celulares possam ser propostos e estudados. Embora literatura crescente aponte papel importante de diferentes subpopulações de linfócitos B nas neoplasias malignas de mama, os achados são limitados a períodos específicos, de forma que carecem de pesquisas que avaliem a variação temporal de células B em função do desenvolvimento tumoral.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar a dinâmica de subpopulações de linfócitos B durante o desenvolvimento do tumor de mama triplo-negativo murino 4T1 em modelo animal.

2.2. Específicos

- Quantificar as populações de Linfócitos B Naïve, Linfócitos B Regulatórios, Linfócitos B Memória e Plasmablastos e Plasmócitos no baço, linfonodo inguinal ipsilateral e tumor primário ao longo do tempo durante desenvolvimento tumoral.

- Comparar a alteração nas populações de Linfócitos B Naïve, Linfócitos B Regulatórios, Linfócitos B Memória, Plasmablastos e Plasmócitos no baço, linfonodo inguinal ipsilateral entre animais sem tumor e com tumor induzido por células 4T1.

- Comparar a alteração nas populações de Linfócitos B Naïve, Linfócitos B Regulatórios, Linfócitos B Memória, Plasmablastos e Plasmócitos intratumorais ao longo do tempo de crescimento tumoral.

- Comparar a área do baço e linfonodos inguinais entre os animais com tumor e sem tumor.

- Quantificar o peso e volume tumoral nos animais com Tumor.

- Comparar os achados experimentais sobre as alterações das subpopulações de linfócitos B com dados disponíveis na literatura.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos

Todos os ensaios realizados neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais sob o n° 215/18.

3.2. Animais

Foram utilizados camundongos fêmea isogênicos da linhagem BALB/c (*Mus musculus)* com 8 semanas de idade, pesando entre 18 e 20 gramas, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Imunobiologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia em condições sanitárias livre de patógenos específicos (*Specific pathogen-free – SPF)*, em mini-isoladores com racks ventiladas (Alesco® Série Ventilife) com acesso a água e ração autoclavadas *ad libitum*, temperatura entre 20 e 25 °C e ciclo de luz controlada (Ciclo de 12 horas).

Para este estudo, os animais foram distribuídos em dois grupos, cada um com seis animais, avaliados após 7, 14 e 28 dias do desafio:

- PBS: Animais inoculados (subcutâneo) na almofada de gordura mamária com 50 µL de solução Tampão Fosfato-salino (PBS 1X) filtrado (0.22 µM).

- Experimental: Animas inoculados (subcutâneo) na almofada de gordura mamária com $5x10^5$ células de adenocarcinoma mamário 4T1 ressuspendidas em 50 µL de solução Tampão Fosfato-salino (PBS 1X) filtrado (0.22 µM).

3.3. Cultura e manutenção de células 4T1

As células de adenocarcinoma mamário 4T1 - gentilmente fornecidas pela Prof[a]. Dra. Miriam Tereza Paz Lopes e Dr. Dalton Dittz Júnior (Departamento de Farmacologia, UFMG, ATCC® CRL-2539™) foram cultivadas em meio RPMI (1X) GlutaMAX™ (Gibco®, Waltham, USA), suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal – FBS (Gibco®, Waltham, USA) e 1% de solução antibiótica Penicilina (10.000 Unids/mL) + Estreptomicina (10.000 µg/mL) (Gibco®, Waltham, USA), mantidas em estufa a 37 ºC e atmosfera de 5% de CO_2.

Para manutenção das células, foi realizado repique afim de não atingir a confluência. Neste procedimento, o meio de cultura foi removido do frasco com o auxílio de uma pipeta Pasteur e, sequencialmente, foram adicionados 2-3 mL de solução 0.25% Tripsina-EDTA (1X) estéril (Gibco®, Waltham, USA) afim de desprender as células do frasco. Após 5 minutos em incubação na estufa (37 ºC, 5% CO_2), a ação da solução de Tripsina-EDTA foi neutralizada pela adição de meio de cultura completo (RPMI GlutaMAX™ + 10% FBS + 1% Solução Antibiótica Penicilina-Estreptomicina). As células em suspensão foram recolhidas em tubo cônico de 15 mL (Falcon®, Corning, USA) e centrifugadas. O sobrenadante foi removido, meio de cultura completo foi adicionado e as células foram ressuspendidas e adicionados a um novo frasco que, por sua vez, foi mantido nas condições descritas anteriormente, até atingir quantidade celular suficiente para os experimentos *in vivo.* Para estabelecer o número de células viáveis desejado para os experimentos, foi realizada contagem em câmara de Neubauer utilizando o ensaio de exclusão por azul de tripano (Corning®, Corning, USA).

3.4. Inoculação das células 4T1

Os animais com 8 semanas de vida do grupo experimental foram inoculados de forma subcutânea (s.c.) na almofada de gordura mamária do lado esquerdo – próximo ao quarto mamilo – com $5x10^5$ células de adenocarcinoma mamário 4T1 ressuspendidas em 50 µL de solução tampão fosfato-salino (PBS 1X) estéril. Os

animais do grupo controle foram inoculados no mesmo local com 50 µL de solução tampão fosfato-salino (PBS 1X) estéril.

3.5. Padronização do Modelo Tumoral

Os animais - BALB/c (*Mus musculus)* com 8 semanas de idade, pesando entre 18 e 20 gramas – foram inoculados com duas concentrações ($5x10^5$ células/50 µL PBS 1X e $1x10^6$ células/50 µL PBS 1X) de células 4T1 ressuspendidas em solução (PBS 1X) filtrado (0.22 µM). Após 14 dias de desenvolvimento das células tumorais, os animais foram eutanasiados, a massa tumoral extraída, processada de acordo com os protocolos vigentes e verificado o número de células através da técnica de citômetria de fluxo.

3.6. Eutanásia

Após o período correspondente a 7, 14 ou 28 dias, os camundongos foram eutanasiados pela aplicação intraperitoneal (i.p.) de solução anestésica 100 mg/kg Cetamina (Syntec®, Santana de Parnaíba, Brasil) e 5mg/kg Xilazina (Syntec®, Santana de Parnaíba, Brasil) e deslocamento cervical.

3.7. Medidas dos Materiais Biológicos

3.7.1. Volume e Peso tumoral

Após a retirada, o tumor foi pesado em balança analítica e volume mensurado com o auxílio de um paquímetro (Zaas-1.0004®) após os dias 7, 14 e 28 dias de indução, sendo o utilizado a seguinte fórmula descrita por Kim, E.J. *et al.* 2011:

$$\text{Volume} = (\text{comprimento} \times \text{largura}^2 \times 0{,}52)\ \text{mm}^3$$

3.7.2. Área do Baço e Linfonodo Inguinal

Após a remoção cirúrgica do baço e linfonodo inguinal ipsilateral, os mesmos foram fotografados ao lado de uma régua, sendo a área mensurada através do *software* ImageJ (NIH, USA).

3.8. Obtenção da suspensão celulares

3.8.1. Baço e Linfonodo Inguinal

Após a realização da eutanásia, os camundongos tiveram sua cavidade abdominal exposta para retirada dos órgãos desejados. Com auxílio de instrumentos cirúrgicos, o baço e linfonodo inguinal ipsilateral foram coletados, fotografados, medidos e colocado em tubo cônico contendo meio de cultura RPMI (1X) GlutaMAX™ (Gibco®, Waltham, USA) suplementado com 10% FBS (Gibco®, Waltham, USA) e 1% de solução antibiótica Penicilina (10.000 Unids/mL) + Estreptomicina (10.000 µg/mL) (Gibco®, Waltham, USA), mantidos em gelo. Sequencialmente o baço e o linfonodo inguinal de cada camundongo foi fragmentado – individualmente - em moedor de tecido de vidro (Pirex®) até obtenção de solução homogênea. O homogenato obtido foi então passado através de um filtro de células de 70 µM (Falcon®, Corning, USA) para um novo tubo cônico de centrifugação e centrifugado à 500 xg por 10 minutos à 4 ºC. Para lisar as hemácias presentes nas amostras de baço, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuspendido em 1 mL de solução tampão fosfato-salino PBS 10X por 10 segundos, sendo adicionado 9 mL de água destilada após o término do período. O tubo foi novamente centrifugado à 500 xg por 10 minutos à 4 ºC, sendo o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em solução tampão FACS (PBS 1X Estéril Filtrada 0.22µM + 5% Soro Bovino Fetal). O homogenato obtido a partir do linfonodo inguinal, foi centrifugado sob as mesmas condições descritas e as células também foram ressuspendidas em solução tampão FACS.

3.8.2. Tumor

Após a remoção cirúrgica do tumor, o mesmo foi colocado em tubo cônico de centrifugação de 15 mL (Falcon®, Corning, USA) contendo meio de cultura RPMI (1X) GlutaMAX™ (Gibco®, Waltham, USA) armazenado em gelo. Com o auxílio de um bisturi, o tumor foi fragmentado mecanicamente em partes menores e sequencialmente transferido para um novo tubo cônico de poliesterino 12x75 mm (Falcon®, Corning, USA). Ao tubo contendo os fragmentos do tumor foi adicionado solução 2 mg/mL de Colagenase tipo IV (Sigma®, St. Louis, USA) + 0.1 mg/mL (200U) de DNase I (Sigma®, St. Louis, USA). Após incubação à 37 ºC por 1 hora sob leve agitação (80 RPM), foi adicionado meio de cultura RPMI (1X) GlutaMAX™ (Gibco®, Waltham, USA) suplementado com 10% de FBS (Gibco®, Waltham, USA) afim de inibir a ação enzimática. O homogenato tumoral foi então passado através de um filtro de células (Falcon®, Corning, USA) de 70 µM para um novo tubo cônico de centrifugação de 15 mL (Falcon®, Corning, USA) e centrifugado à 300 xg por 5 minutos à 4 ºC. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em solução tampão FACS.

3.9. Citometria de Fluxo

3.9.1. Imunofenotipagem

Afim de determinar as subpopulações de linfócitos B (Naïve, Regulatórios, Memória, Plasmócitos e Plasmablastos) do baço, linfonodo inguinal ipsilateral e tumor, as células isoladas foram contadas, utilizando o ensaio de exclusão por azul de Tripano (Corning®, Corning, USA). Após a contagem em câmara de Neubauer, as células foram diluídas em meio de cultura completo de modo a ser obtido $1x10^6$ células/100µL. As células foram distribuídas para marcação em três distintos painéis, sendo as células pertencentes aos painéis I e II destinadas a marcação de superfície, enquanto as células do painel III foram utilizadas para marcação de superfície e intracelular. $1x10^6$ células pertencentes aos painéis I e II foram distribuídas em placa de 96 poços de fundo redondo (Falcon®, Corning, USA) e centrifugadas a 500xg por

10 minutos à 4°C, sendo o sobrenadante posteriormente descartado. As células foram então incubadas por 20 minutos à 4°C na presença de 50 µL de FC Block (1:100) (BD®, Franklin Lakes, USA) e anticorpo monoclonal *Live/Dead* Yellow (1:1000) (BD®, Franklin Lakes, USA). Após o período de incubação, as células foram centrifugadas a 500xg por 10 minutos à 4°C, sendo o sobrenadante posteriormente descartado. Sequencialmente, as células foram incubadas por 1 hora no escuro à 4 °C na presença dos anticorpos dos painéis I e II (Tabela 5). Após o período de incubação, solução tampão FACS (2% FBS) foi adicionado a cada um dos poços e as células foram centrifugadas por 10 minutos à 4°C, sendo este passo repetido mais uma vez. Após a lavagem, as células foram incubadas por 20 minutos no escuro à 4°C com 50 µL de solução paraformaldeído 4% v/v para fixação. Adicionado 100 µL de solução tampão FACS, as células foram centrifugadas a 500xg por 10 minutos à 4°C, sendo o sobrenadante descartado posteriormente e o pellet celular ressuspendido em 100 µL de solução tampão FACS.

As células pertencentes ao painel III foram inicialmente transferidas para placa de 6 poços de fundo chato (Corning®, Corning, USA) e estimuladas pela presença de PMA (50 ng/mL) e Ionomicina (500 ng/mL) (Sigma®, St. Louis, USA) *overnight* em incubadora (37 ºC, 5% CO_2). Passado o período foi adicionado Brefeldina A (10 µg/mL) (Sigma®, St. Louis, USA) e incubado por mais 4 horas sob as mesmas condições anteriormente descritas. Sequencialmente, as células foram transferidas para um tubo cônico de centrifugação de 15 mL (Falcon®, Corning, USA), centrifugadas a 500 xg por 5 minutos à 4°C. Após remoção do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em tampão FACS (2% FBS) sob a concentração de $1x10^6$ células/100µL, transferidas para placa de 96 poços de fundo redondo (Falcon®, Corning, USA) e incubadas com FC Block (1:100) (BD®, Franklin Lakes, USA) e anticorpo monoclonal *Live/Dead* V450 (1:1000) (BD®, Franklin Lakes, USA) por 20 minutos à 4°C. Sequencialmente, as células foram incubadas por 1 hora no escuro à 4 ºC com os anticorpos de superfície do painel III (Tabela 5). Após o período de incubação e centrifugação a 500 xg por 10 minutos à 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas por 30 minutos no escuro à 4°C na presença de solução de Fixação/Permeabilização (eBioescience® Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set – ThermoFisher, Waltham, USA). Em seguida foi adicionado solução de tampão de permeabilização e as células centrifugadas a 500 xg por 10

minutos à 4°C. Após a repetição do passo anterior, as células foram incubadas na presença do anticorpo monoclonal IL10-PE (1:100) por 1 hora no escuro à 4°C. Após nova lavagem com tampão de permeabilização e centrifugação a 500xg por 10 minutos à 4°C, as células foram ressuspendidas em tampão FACS.

	Antígeno	Fluorocromo	Diluição	Populações
PAINEL I	CD19	PercP-Cy5	1:300	Linfócitos B Naïve Plasmablastos Plasmócitos
	B220	Alexa Fluor 700	1:200	
	IgM	PE-Dazzle 594	1:100	
	IgD	PE	1:100	
	CD138	PE-Cy7	1:150	
PAINEL II	CD19	PercP-Cy5	1:300	Linfócitos B Memória
	B220	Alexa Fluor 700	1:200	
	IgM	PE-Dazzle 594	1:100	
	CD80	PE	1:100	
	CD62L	APC-Cy7	1:200	
PAINEL III	CD19	PercP-Cy5	1:300	Linfócitos B Regulatórios
	B220	Alexa Fluor 700	1:200	
	CD5	FITC	1:100	
	CD1d	Pacific-Blue	1:200	
	IL-10	PE	1:100	

Tabela 5. Descrição dos marcadores e fluorescências, assim como diluição e população de interesse de acordo com o painel utilizado.

A aquisição das amostras foi realizada em um citômetro (FACS LSRFortessa, Becton Dickinson®, San Jose, USA) utilizando o *software* FACS Diva. A partir do gráfico bidimensional que permite verificar diferentes populações celulares em função de sua granulosidade e tamanho, uma janela (*Gate*) para população de linfócitos foi estabelecida e, partir deste, foram gravados 100 mil eventos. Todas as análises foram feitas usando o *software FlowJo* (Ashland, Oregon, USA) o qual permite analisar todas as células adquiridas ou apenas determinadas populações individualizadas por janelas (*Gates*) estabelecidas com base em parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) ou fluorescência (FL).

3.9.2. Estratégia para determinação das populações em interesse

As células extraídas do baço, linfonodo inguinal e tumor foram avaliadas através de citometria de fluxo. A partir da seleção de células classificadas como vivas, os linfócitos foram identificados a partir da seleção de células com tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), sendo delineado um *gate* para população. A análise das populações de Linfócitos B Naïve, Plasmablastos, Linfócitos B Regulatórios e Linfócitos B de Memória foi realizada através do estabelecimento de *gate* de células CD19+ e B220+, ao passo que a análise de Plasmócitos foi realizada a partir do estabelecimento de *gate* de células CD19- e B220-. Os *dot plots* a seguir representam a estratégia de análise para as diferentes subpopulações estudadas no presente trabalho.

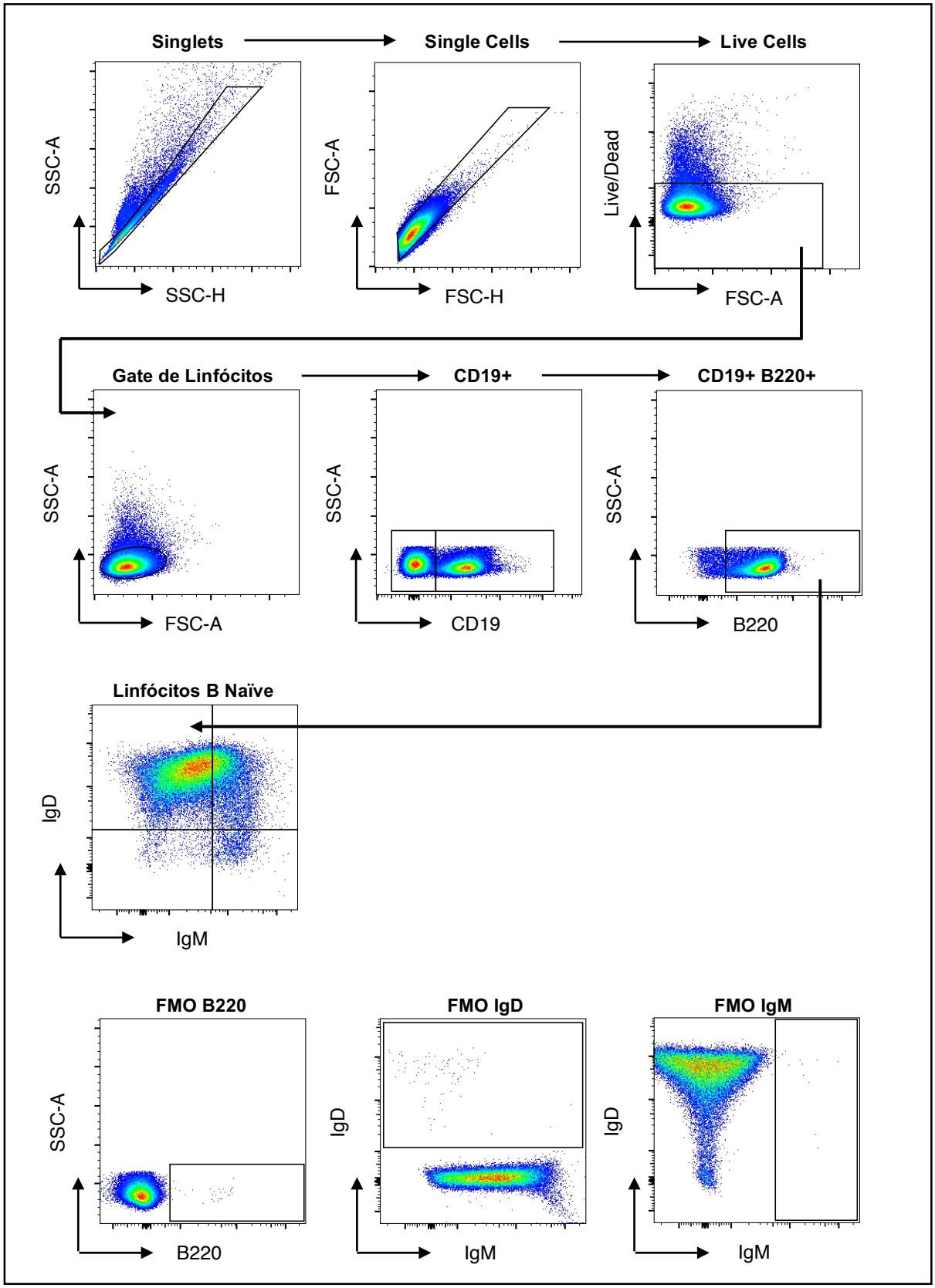
Singlets
Single Cells
Live Cells
SSC-A
SSC-H
FSC-A
FSC-H
Live/Dead
FSC-A
Gate de Linfócitos
CD19+
CD19+ B220+
SSC-A
FSC-A
SSC-A
CD19
SSC-A
B220
Linfócitos B Naïve
IgD
IgM
FMO B220
FMO IgD
FMO IgM
SSC-A
B220
IgD
IgM
IgD
IgM

Figura 4. Imunofenotipagem de Linfócitos B Naïve.

Os linfócitos B Naïve foram identificados através da seleção de células com tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) em *gate* de linfócitos, em seguida, pela expressão positiva de CD19/B220 e, posteriormente, avaliados quanto a expressão de IgM e IgD, sendo considerado as células B Naïve aquelas com expressão elevada de IgD e baixa expressão de IgM.

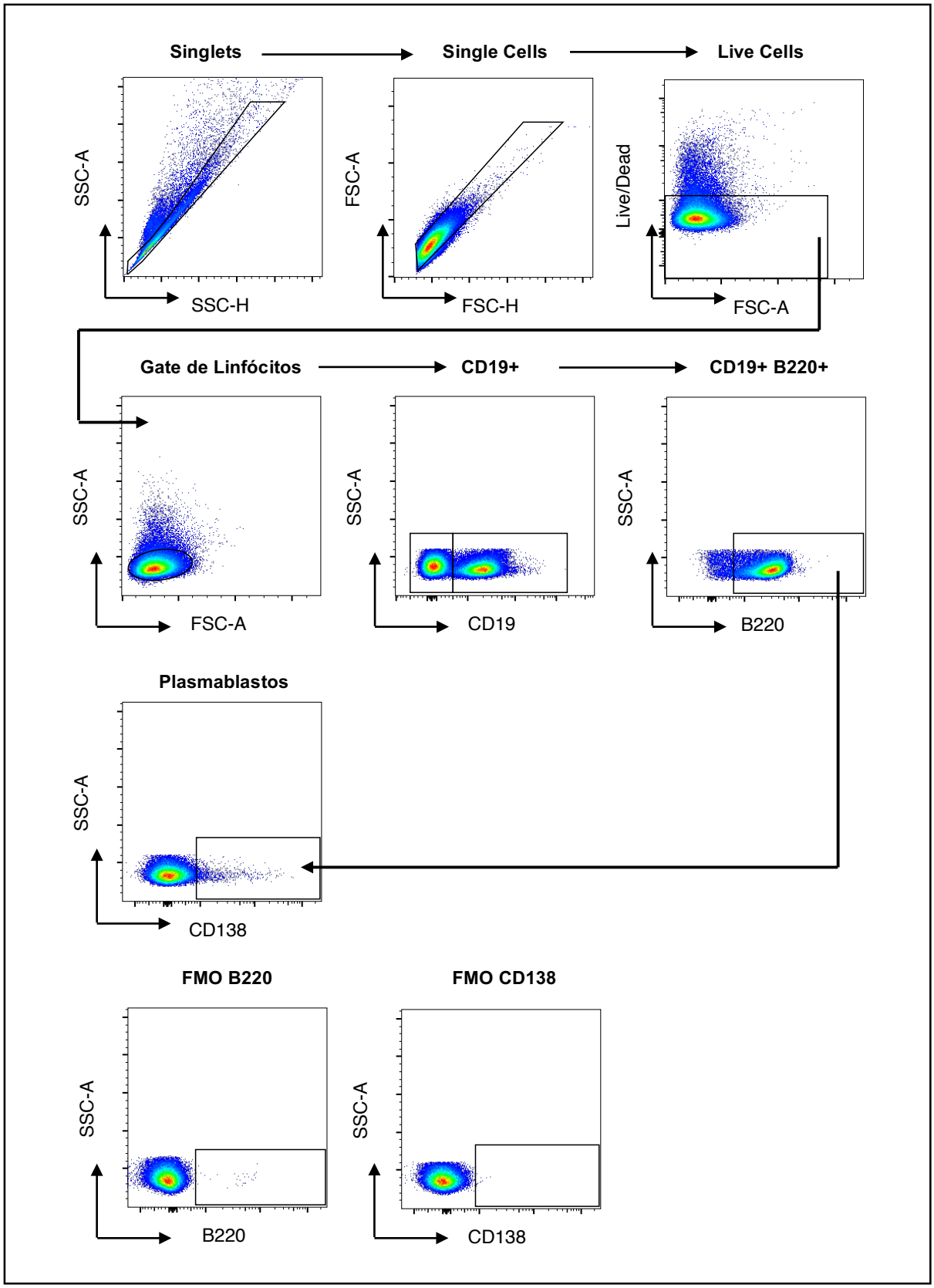
Singlets
Single Cells
Live Cells
SSC-A
SSC-H
FSC-A
FSC-H
Live/Dead
FSC-A
Gate de Linfócitos
CD19+
CD19+ B220+
SSC-A
FSC-A
SSC-A
CD19
SSC-A
B220
Plasmablastos
SSC-A
CD138
FMO B220
FMO CD138
SSC-A
B220
SSC-A
CD138

Figura 5. Imunofenotipagem de Plasmablastos.

Os Plasmócitos foram identificados através da seleção de células com tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) em *gate* de linfócitos, em seguida, pela expressão positiva de CD19/B220 e, posteriormente, avaliados quanto a expressão de CD138, sendo considerado Plasmablastos aqueles com expressão positiva de CD138.

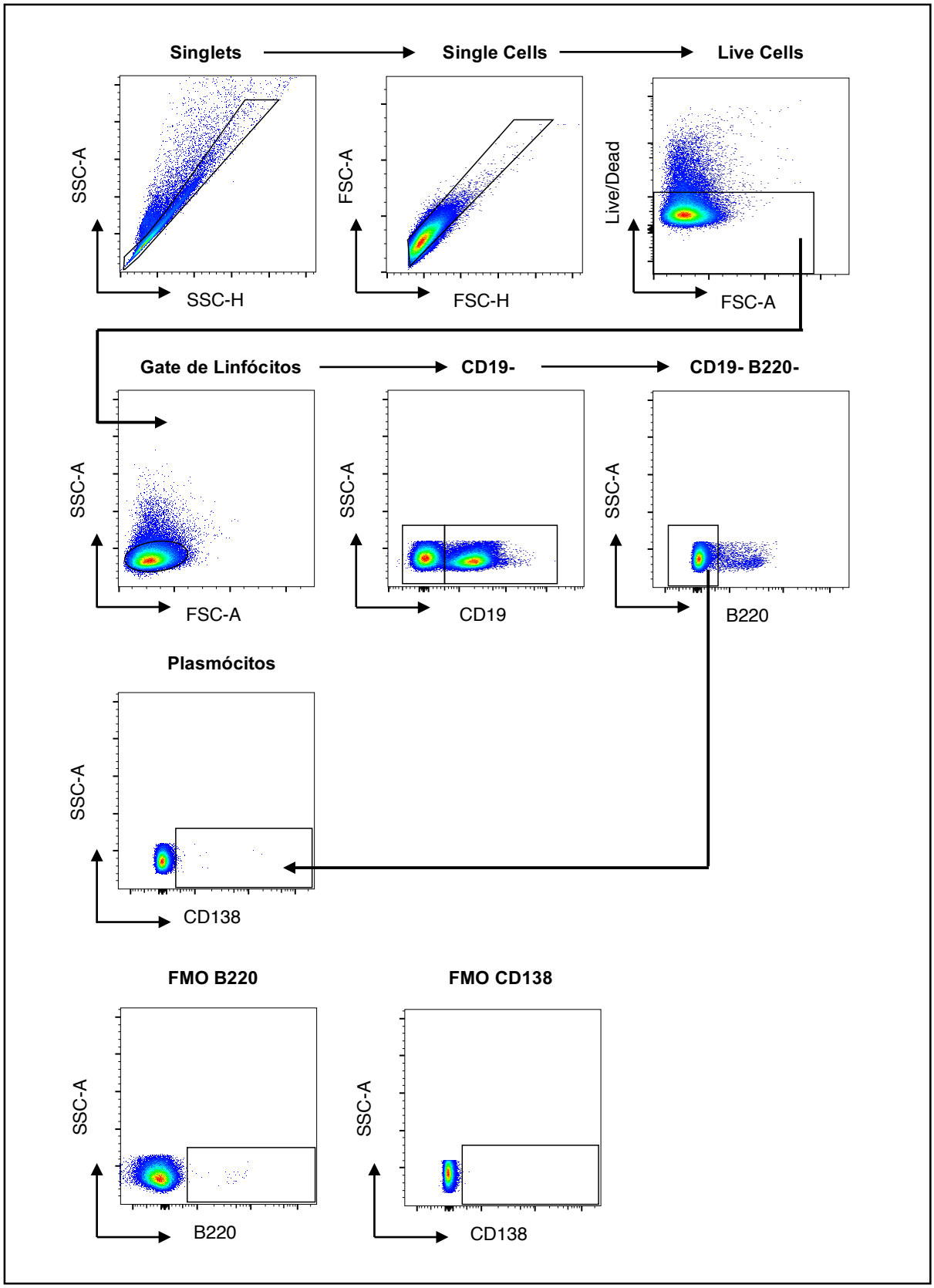
Singlets
Single Cells
Live Cells
SSC-A
SSC-H
FSC-A
FSC-H
Live/Dead
FSC-A
Gate de Linfócitos
CD19-
CD19- B220-
SSC-A
FSC-A
SSC-A
CD19
SSC-A
B220
Plasmócitos
SSC-A
CD138
FMO B220
FMO CD138
SSC-A
B220
SSC-A
CD138

Figura 6. Imunofenotipagem de Plasmócitos.

Os Plasmablastos foram identificados através da seleção de células com tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) em *gate* de linfócitos, em seguida, pela expressão negativa de CC19/B220 e, posteriormente, avaliados quanto a expressão de CD138, sendo considerado Plasmócitos aqueles com expressão positiva de CD138.

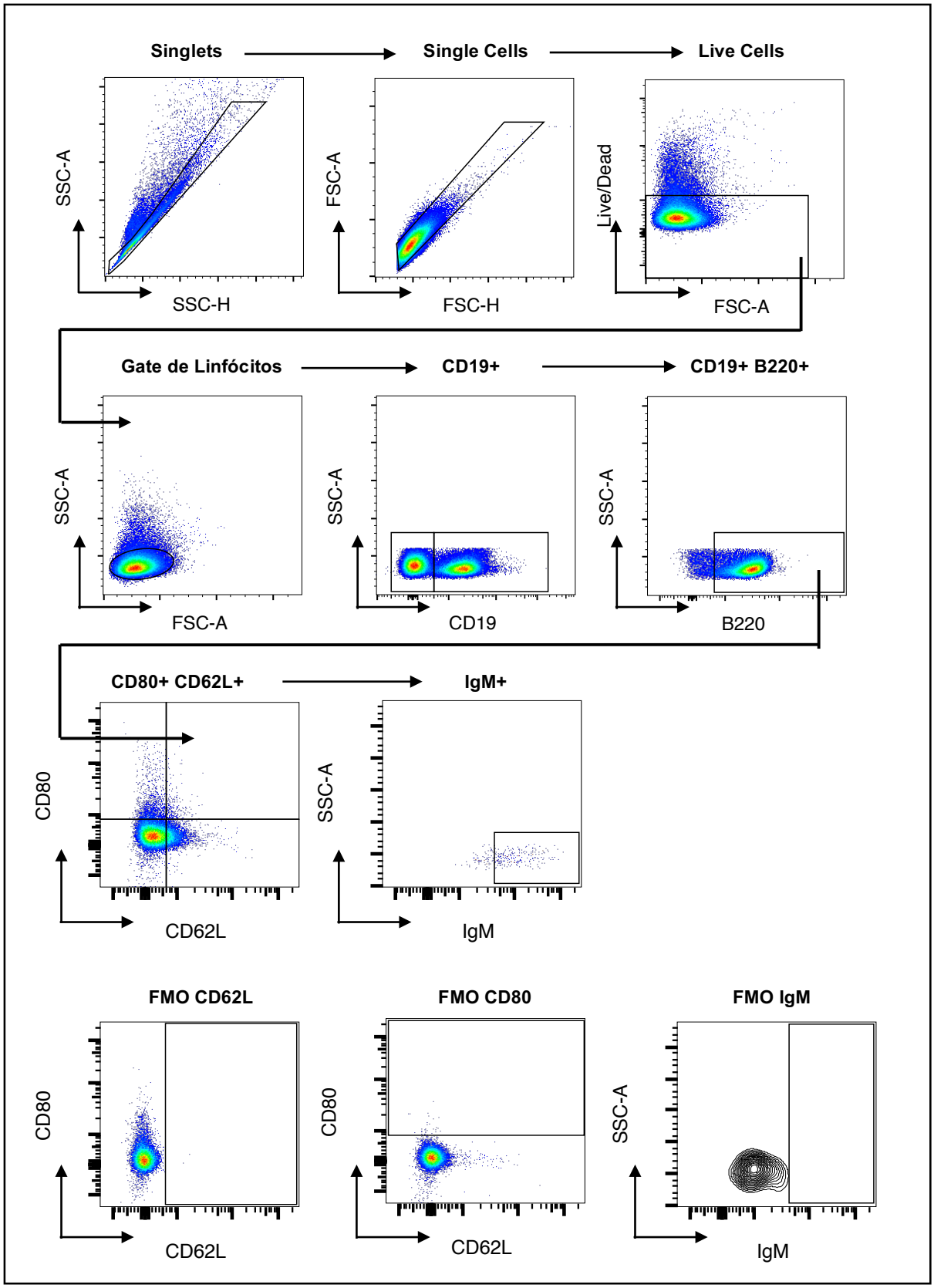
Singlets
Single Cells
Live Cells
SSC-A
SSC-H
FSC-A
FSC-H
Live/Dead
FSC-A
Gate de Linfócitos
CD19+
CD19+ B220+
SSC-A
FSC-A
SSC-A
CD19
SSC-A
B220
CD80+ CD62L+
IgM+
CD80
CD62L
SSC-A
IgM
FMO CD62L
FMO CD80
FMO IgM
CD80
CD62L
CD80
CD62L
SSC-A
IgM

Figura 7. Imunofenotipagem de Linfócitos B de Memória.

Os linfócitos B de Memória foram identificados através da seleção de células com tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) em *gate* de linfócitos, em seguida, pela expressão positiva de CC19/B220 e, posteriormente, avaliados quanto a expressão de CD80/CD62L. As populações com positividade para CD80 e CD62L foram avaliadas quanto a expressão de IgM, sendo consideradas populações B de memória aquelas que apresentaram marcação positiva para IgM.

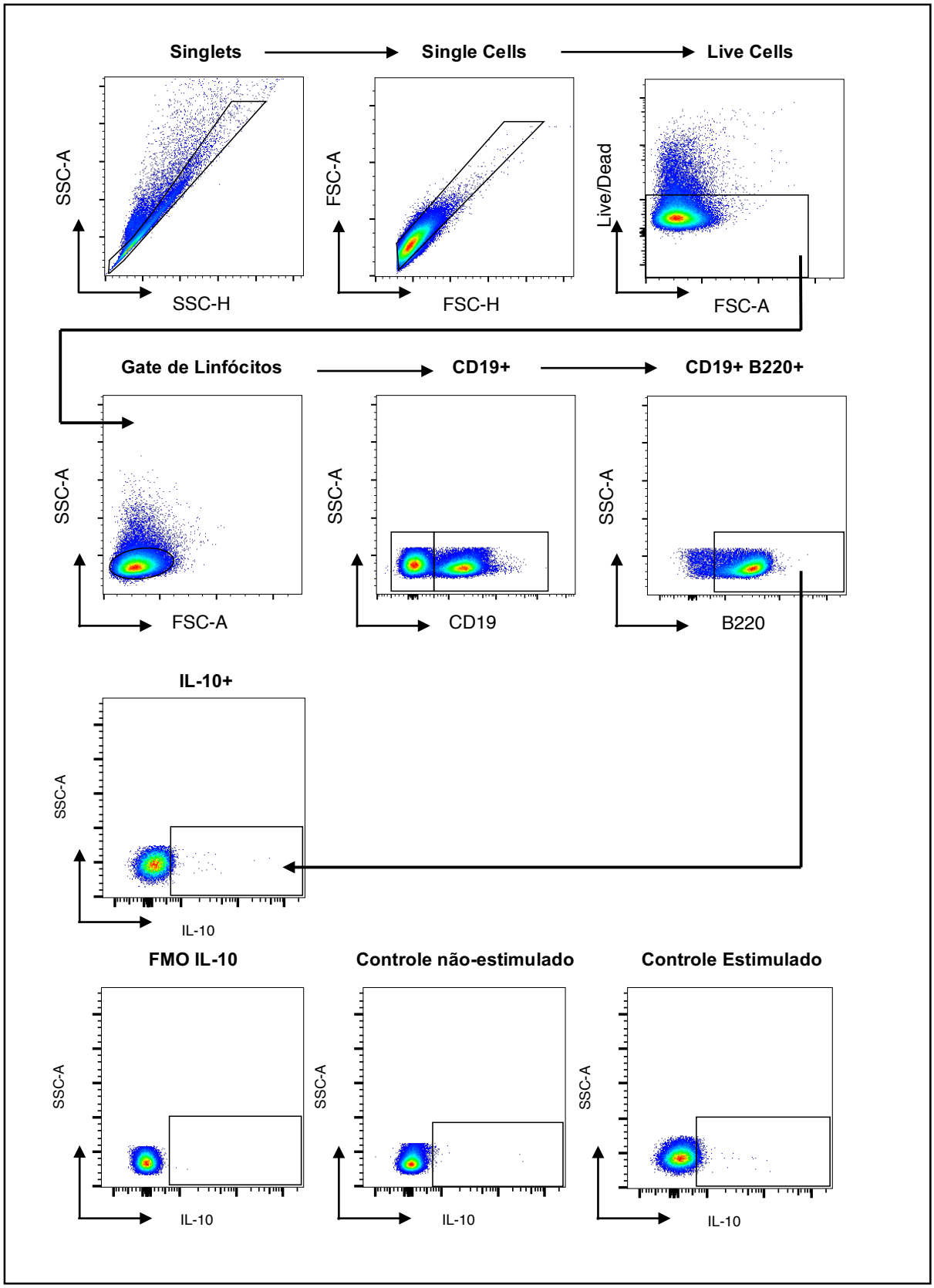
Singlets
Single Cells
Live Cells
SSC-A
SSC-H
FSC-A
FSC-H
Live/Dead
FSC-A
Gate de Linfócitos
CD19+
CD19+ B220+
SSC-A
FSC-A
SSC-A
CD19
SSC-A
B220
IL-10+
SSC-A
IL-10
FMO IL-10
Controle não-estimulado
Controle Estimulado
SSC-A
IL-10
SSC-A
IL-10
SSC-A
IL-10

Figura 8. Imunofenotipagem de Linfócitos B Regulatórios.

Os Linfócitos B Regulatórios (Bregs) foram identificados através da seleção de células com tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A) em *gate* de linfócitos, em seguida, pela expressão positiva de CD19 B220 e, posteriormente, avaliados quanto a expressão de IL-10, sendo considerado Linfócitos B Regulatórios aqueles com expressão positiva de IL-10.

3.10. Análise Estatística

Os resultados estão representados como média ± desvio padrão (DP). Para avaliação da normalidade das amostras, as mesmas foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk. Os resultados que apresentaram distribuição normal foram avaliados pelo teste t de *Student* ou Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey, já para amostras cuja distribuições consideradas não normais o teste de Mann-Whitney ou Análise de Variância Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn foram utilizados. As análises foram feitas através do programa GraphPad-Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) e foram consideradas estatisticamente significativas os valores de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação de distintas subpopulações de linfócitos B intratumorais em função ao desenvolvimento tumoral

4.1.1. Padronização da concentração de células para o desenvolvimento tumoral e extração de células intratumorais

Com objetivo de confirmar se a inoculação de células 4T1 na almofada de gordura mamária dos animais acarretaria em crescimento do tumor conforme descrito na literatura, assim como verificar se diferentes concentrações de células afetariam no número de linfócitos obtidos após processamento tumoral, inoculamos (s.c) animais fêmea da linhagem BALB/c (*Mus musculus)* com 8 semanas de idade com duas concentrações distintas de células 4T1, $5x10^5$ e $1x10^6$, respectivamente e acompanhamos o crescimento durante o período de 14 dias. Após este período, os animais foram eutanasiados, os tumores extraídos e processados, e suas células fenotipadas de acordo com os protocolos estabelecidos.

O acompanhamento dos animais após inoculação permitiu verificar o estabelecimento e contínuo crescimento de massa tumoral, demonstrando que o local e as concentrações utilizadas no inóculo foram adequadas. Além disso, a partir da análise por citometria de fluxo foi verificado a presença de leucócitos e linfócitos em ambos os tumores utilizando diferentes concentrações, conforme pode ser observado na figura 18. Há que salientar que, apesar do camundongo inoculado com concentração mais elevada de células 4T1 ($1x10^6$) ter gerado maior frequência de linfócitos totais, a diferença foi pequena, de modo que a concentração de $5x10^5$ foi escolhida para execução dos experimentos subsequentes (Tabela 6). Elevadas concentrações de células 4T1 estão associadas a mortalidade precoce dos animais, aspecto que poderia comprometer as análises realizadas para o período de 28 dias.

Concentração / População Celular	$5x10^5$	$1x10^6$
Leucócitos	75.9 %	80.4 %
Linfócitos Totais	15 %	18 %
Linfócitos CD4+	14 %	32.8 %
Linfócitos CD19+	33.3 %	25.9 %

Tabela 6. Frequência de Leucócitos, linfócitos totais, linfócitos CD4+ e CD19+ para as duas concentrações de células 4T1 utilizadas na padronização do modelo tumoral

4.1.2. Aumento expressivo da massa tumoral no 28º dia

Afim de avaliar o crescimento das células de adenocarcinoma 4T1, os animais pertencentes ao grupo tumor para os diferentes períodos de análise (7, 14 e 28 Dias) foram inoculados (s.c.) na almofada de gordura mamária com a concentração de $5x10^5$/50µL células 4T1. Ao atingir o período estipulado, os animais foram eutanasiados e os tumores extraídos, sendo o peso mensurado em balança analítica e volume tumoral calculado a partir do comprimento e largura do tumor.

Conforme verificado pela figura 9A, foi observado que não houveram diferenças visuais acentuadas entre o tumor de 7 dias e 14 dias. Apesar disso, diferença notável é verificada para o tumor de 28 dias. Ainda que a análise visual não tenha demonstrado grandes diferenças, foi verificado alteração estatisticamente significativa entre o peso dos tumores de 7 dias (0.08 ± 0.01 g) e 14 dias (0.28 ± 0.06 g). Além disso foi observado aumento expressivo no peso tumoral para o período de 28 dias (1.44 ± 0.19 g). Apesar de terem sido detectadas diferenças no peso (Figura 9B) entre todos os períodos avaliados, os resultados de volume demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre no volume dos tumores de 7 dias (69.94 ± 18.11 mm^3) e 14 dias (136.3 ± 26.57 mm^3), ao passo que foi verificado que o volume do tumor de 28 dias (1799 ± 156.1 mm^3) apresentou elevação relevante (Figura 9C).

Os resultados em conjunto demonstram que crescimento acentuado é observado em curto espaço de tempo.

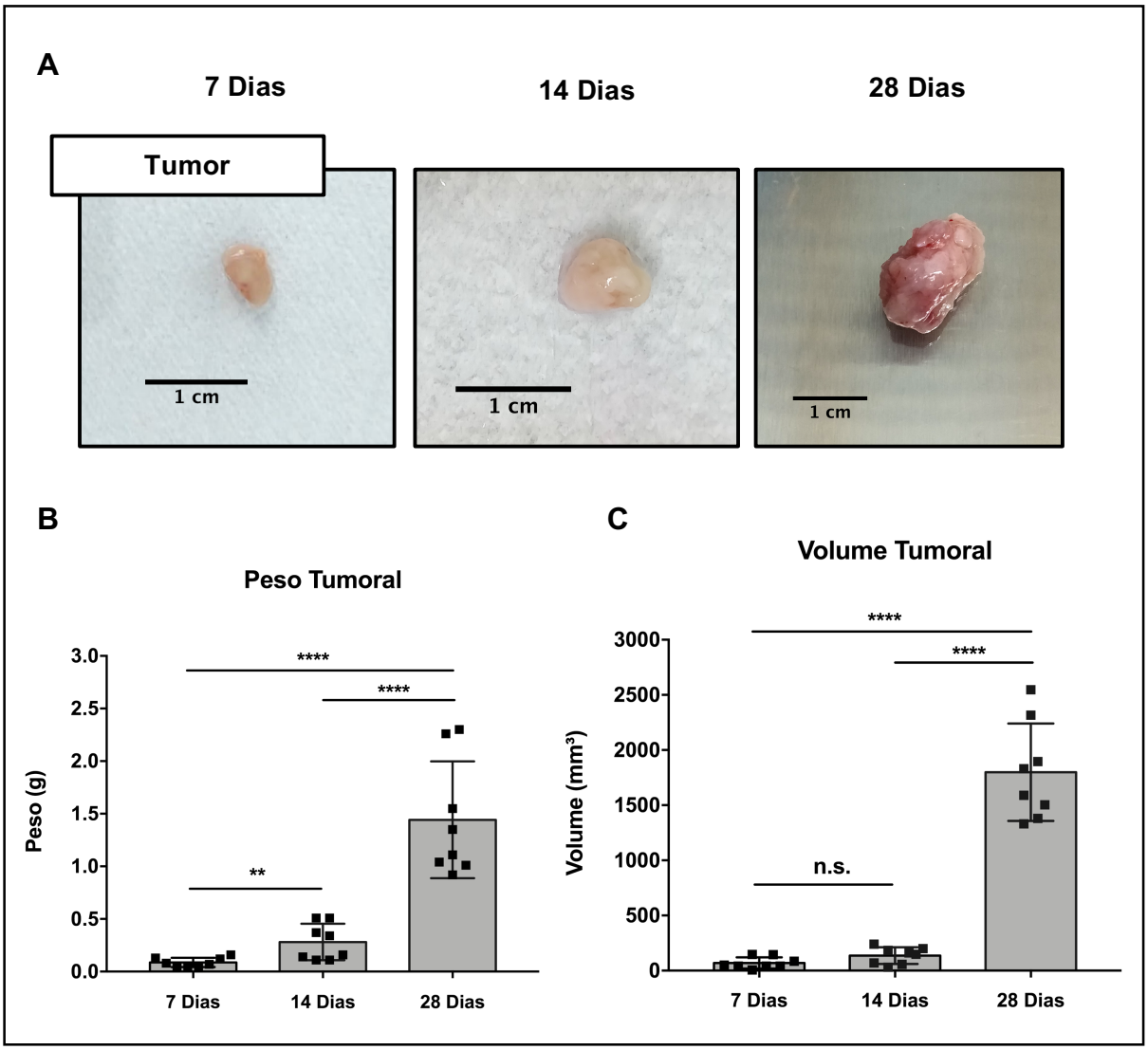

Figura 9. Peso e volume tumoral em função do tempo de desenvolvimento

(A) Fotos representativas do tumor formado pelo crescimento de células de adenocarcinoma 4T1 em camundongos da linhagem BALB/c pertencentes aos grupos controle e tumor após 7, 14 e 28 dias do inoculo com solução PBS 1X e células de adenocarcinoma 4T1, respectivamente. (B) Gráficos em barra representando o peso dos tumores de camundongos BALB/c com 8 semanas de idade pertencentes aos grupos tumor (n=8) para os períodos de 7, 14 e 28 dias, respectivamente. (C) Gráficos em barra representando o volume dos tumores de camundongos BALB/c com 8 semanas de idade pertencentes aos grupos tumor (n=8) para os períodos de 7, 14 e 28 dias, respectivamente. As barras representam a média ± desvio padrão. n.s. = não significativo; ** $p<0,01$; **** $p< 0.0001$.

4.1.3. Aumento no número de células e diminuição de linfócitos CD19+ B220+ ao longo do desenvolvimento tumoral

Com objetivo de verificar possíveis alterações no compartimento de linfócitos B infiltrantes em função ao tempo de desenvolvimento tumoral, leucócitos foram extraídos a partir do tumor desenvolvido nos animais inoculados nos períodos de 7, 14 e 28 dias e posteriormente avaliadas quanto a alterações na frequência (%), número absoluto de linfócitos B. Além disso, foram verificadas o percentual médio de células vivas em cada um dos diferentes períodos analisados.

Foi observado que tumores com 28 dias de crescimento apresentaram contagem de células expressivamente maior que os tumores com 7 e 14 dias de desenvolvimento, conforme pode ser verificado na figura 10A, demonstrando que há infiltração considerável de células nos estágios mais avançados da neoplasia de mama. Além disso, é perceptível que a contagem de leucócitos no tumor se assemelha às contagens obtidas no linfonodo inguinal (Figura 23). De forma semelhante, a partir de corante de viabilidade, foi observado que tumores de 28 dias apresentaram maior percentual médio de células vivas em relação aos tumores com 7 e 14 dias de crescimento (Figura 10B).

Apesar da elevação da contagem de leucócitos ao longo do desenvolvimento tumoral, mesma tendência não foi verificada quando avaliada a frequência (%) e número absoluto de linfócitos B. Foi visto que a frequência (%) desta população tende a aumentar para os períodos de 7 e 14 dias, seguido de uma diminuição para o período de 28 dias, ainda que não tenha sido verificado diferença estatisticamente significativa (Figura 10C). Além disso, ao analisar isoladamente o número absoluto, não foi constato diferença estaticamente significativa entre os três períodos de crescimento tumoral avaliados (Figura 10D).

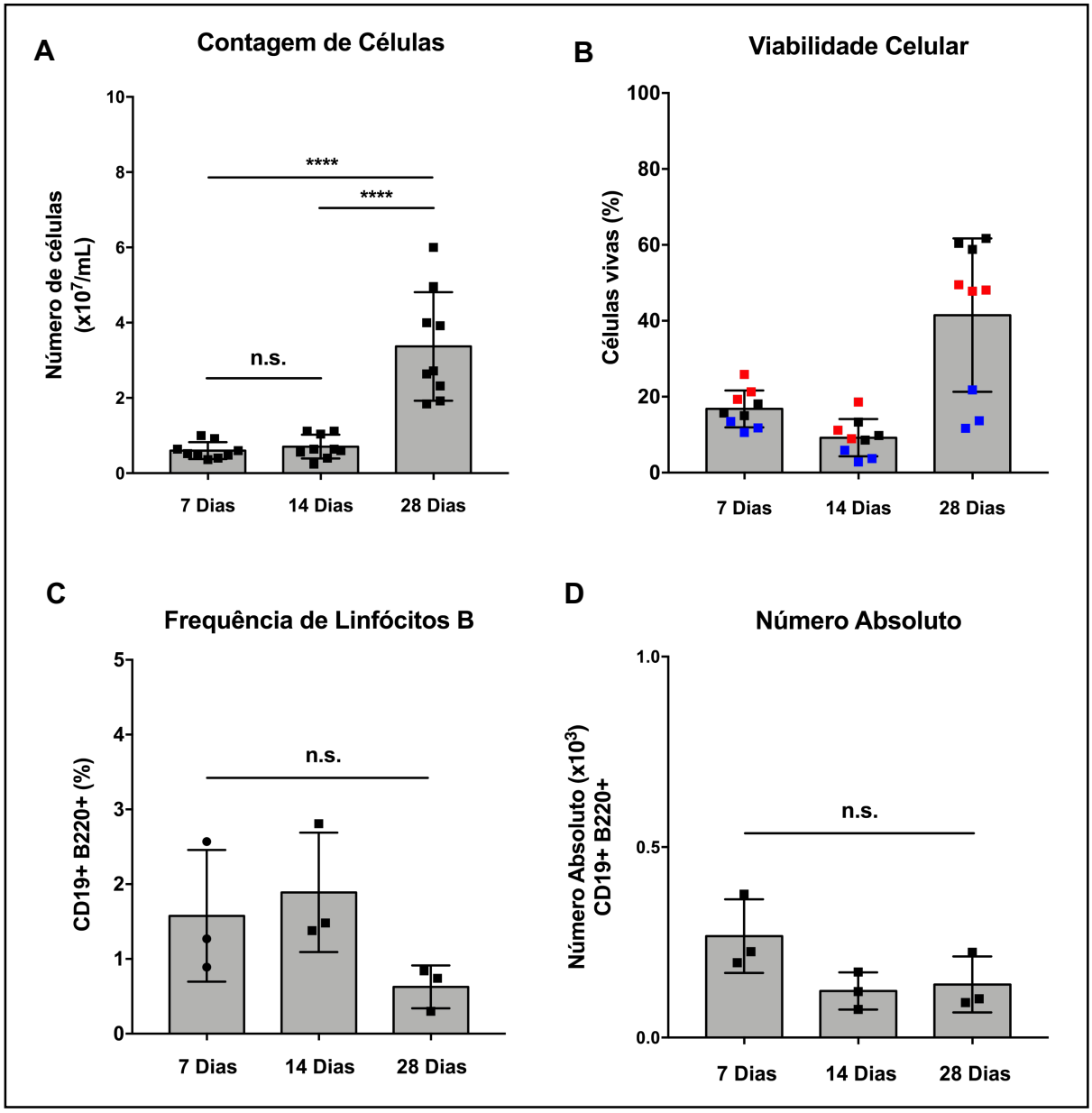

Figura 10. Evolução do número de leucócitos, viabilidade celular e número de linfócitos B intratumorais ao longo do desenvolvimento tumoral.

(A) Gráficos em barra representando o **número total de leucócitos** contados em câmara de Neubauer por ensaio de exclusão com solução de azul de tripano a partir do processamento dos tumores dos camundongos pertencentes grupo tumor (n=9) para os dias 7, 14 e 28 dias, respectivamente **(B)** Representação em gráfico em barra da **frequência (%) de células vivas** a partir dos tumores dos camundongos do grupo tumor (n=9), sendo cada uma das cores representativas de um painel (Painel 1= preto / Painel 2= vermelho / Painel 3= azul), de forma cada amostra representa um *pool* de n=3. **(C)** Gráficos em barra representando a **frequência relativa (%)** de linfócitos B (CD19+ B220+) avaliados através da citometria de fluxo dos tumores dos camundongos dos grupos tumor (n=3), sendo cada amostra representando de um *pool* de 3 animais. **(D)** Representação do **número absoluto** de linfócitos B (CD19+ B220+) avaliados através da citometria de fluxo dos tumores dos camundongos do grupo tumor (n=3), sendo cada amostra representando de um *pool* de 3 animais. As barras representam a média ± desvio padrão. n.s. = não significativo; **** p< 0.0001.

4.1.4. Diminuição de Linfócitos B naïve ao longo do desenvolvimento tumoral

Analisando-se a frequência da população definida com linfócitos B naïve, foi observado que, apesar do decréscimo ao longo do período de crescimento tumoral, não foi visto diferença estatisticamente significativa entre os três períodos analisados. O mesmo foi observado em relação ao número absoluto (Figura 11A e B).

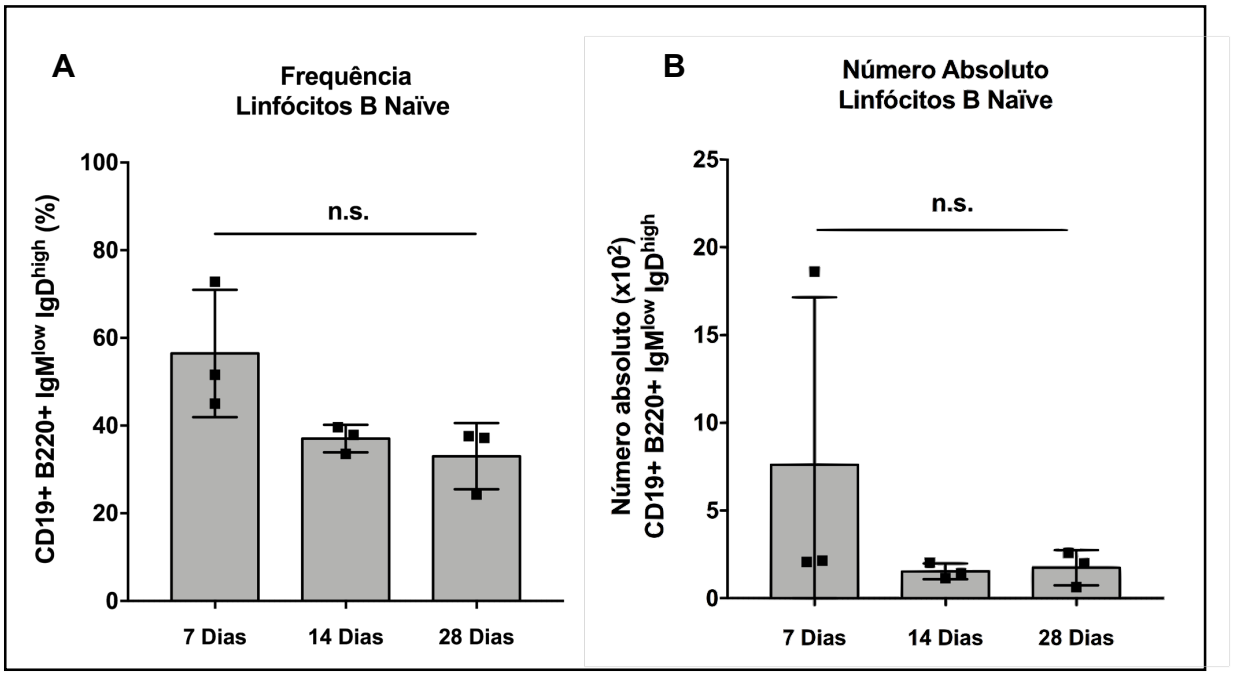

Figura 11. Frequência e número de linfócitos B naïve intratumorais ao longo do desenvolvimento tumoral.

(A) Gráficos em barra representando a frequência (%) de linfócitos B naïve (CD19+ B220+ IgM^{low} IgD^{high}) a partir do processamento dos tumores dos camundongos pertencentes ao grupo tumor (n=3) para os dias 7, 14 e 28 dias, respectivamente (B). Gráficos em barra representando o número absoluto de linfócitos B naïve (CD19+ B220+ IgM^{low} IgD^{high}) avaliados através da citometria de fluxo a partir do processamento dos tumores dos camundongos do grupo tumor (n=3). Cada uma das amostras representa o *pool* de três animais. n.s. = não significativo.

4.1.5. Aumento expressivo de plasmócitos ao longo do tempo de desenvolvimento tumoral

A partir da análise dos dados, observamos que apesar dos números absolutos de plasmablastos não terem alterado de forma considerável entre os diferentes

períodos analisados, alterações estatisticamente significativas foram vistas quanto a frequência (%) para esta população. De acordo com figura 12 é perceptível aumento expressivo na frequência entre o período de 7 e 14 dias, assim como entre 7 e 28 dias. Apesar do decréscimo observado entre o dia 14 e 28, não houve diferença estatisticamente significativa entre os mesmos. Ao contrário da população de plasmablastos em que aumento na frequência (%) e número absoluto somente foi observado entre o 7º e 14º dia, é possível observar aumento contínuo em ambos número absoluto e frequência de plasmócitos em função ao tempo de desenvolvimento tumoral (Figura 12C e D).

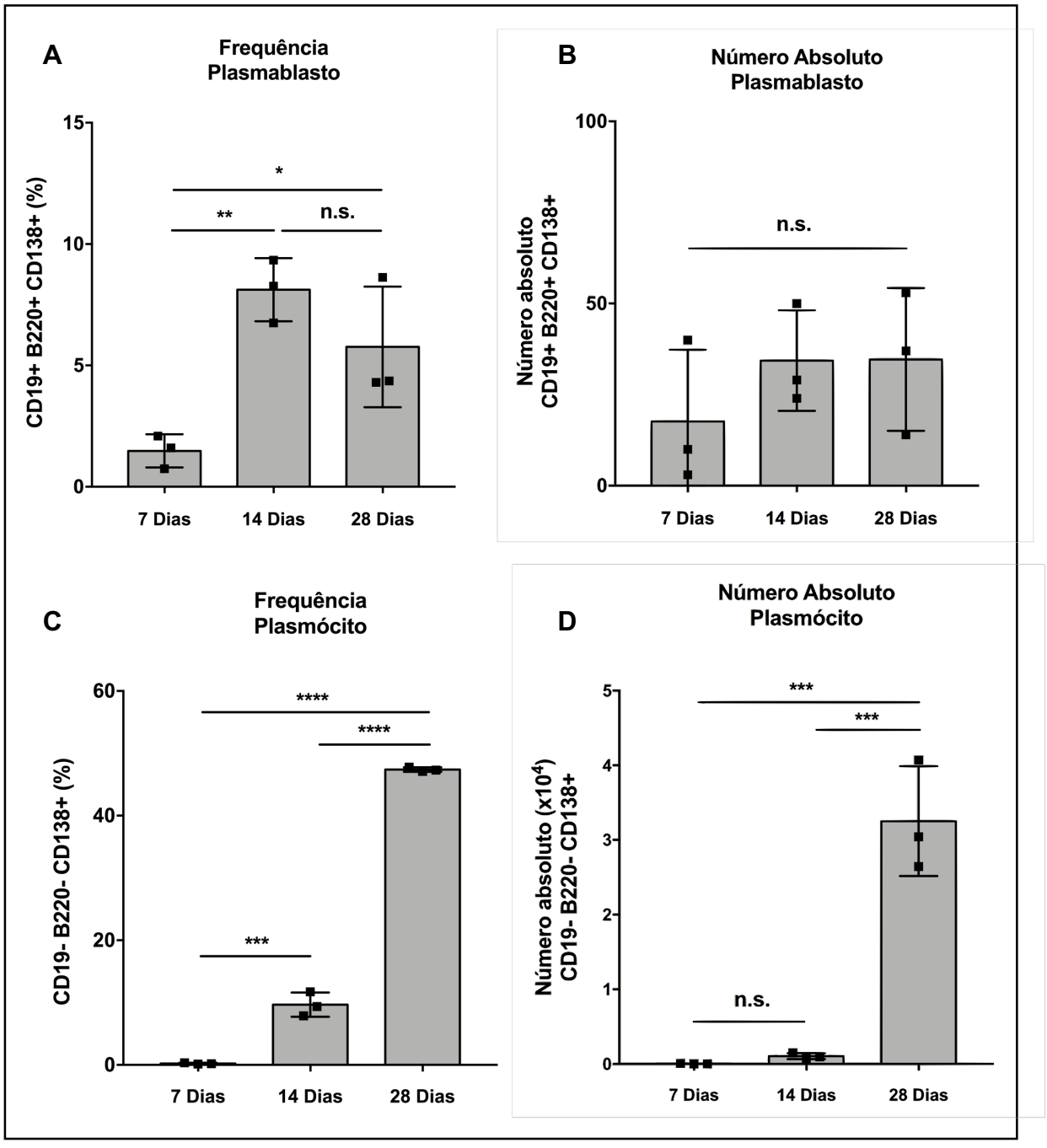

Figura 12. Frequência e número de plasmablastos e plasmócitos intratumorais ao longo do desenvolvimento tumoral.

(A) Gráficos em barra representando a frequência (%) de plasmablastos (CD19+ B220+ CD138+) dos tumores dos camundongos pertencentes ao grupo tumor (n=3) para os dias 7, 14 e 28 dias, respectivamente (B). Gráficos em barra representando o número absoluto de plasmablastos (CD19+ B220+ CD138+) avaliados através da citometria de fluxo a partir dos tumores dos camundongos dos grupos tumor (n=3). (C) Gráficos em barra representando a frequência (%) de plasmócitos (CD19- B220- CD138+) dos tumores dos camundongos pertencentes ao grupo tumor (n=3) para os dias 7, 14 e 28 dias, respectivamente. (D) Gráficos em barra representando o número absoluto de plasmócitos (CD19- B220- CD138+) avaliados através da citometria de fluxo a partir dos tumores dos camundongos dos grupos tumor (n=3). Cada uma das amostras representa o *pool* de três animais. n.s. = não significativo; *** p= 0.001; **** p< 0.0001.

4.1.6. Linfócitos B de Memória e Linfócitos B Regulatórios intratumorais permanecem inalterados

Ainda que não tenham sido detectadas alterações quanto a frequência (%) de linfócitos B de memória no decorrer do desenvolvimento tumoral, verificou-se queda no número absoluto entre o 14º dia e 28º dia (Figura 13A e B). Apesar disso, é necessário ressaltar que o baixo número obtido para o fenótipo celular em questão impossibilita especulações sobre os possíveis papeis desempenhados por este subtipo de linfócito B em função o desenvolvimento tumoral. Resultados semelhantes foram observados para linfócitos B regulatórios, em que não houveram diferenças estatísticas significativas quanto a frequência e número absoluto da população, ainda que aparente aumento tenha sido observado para o período de 28 dias (Figura 14A e B).

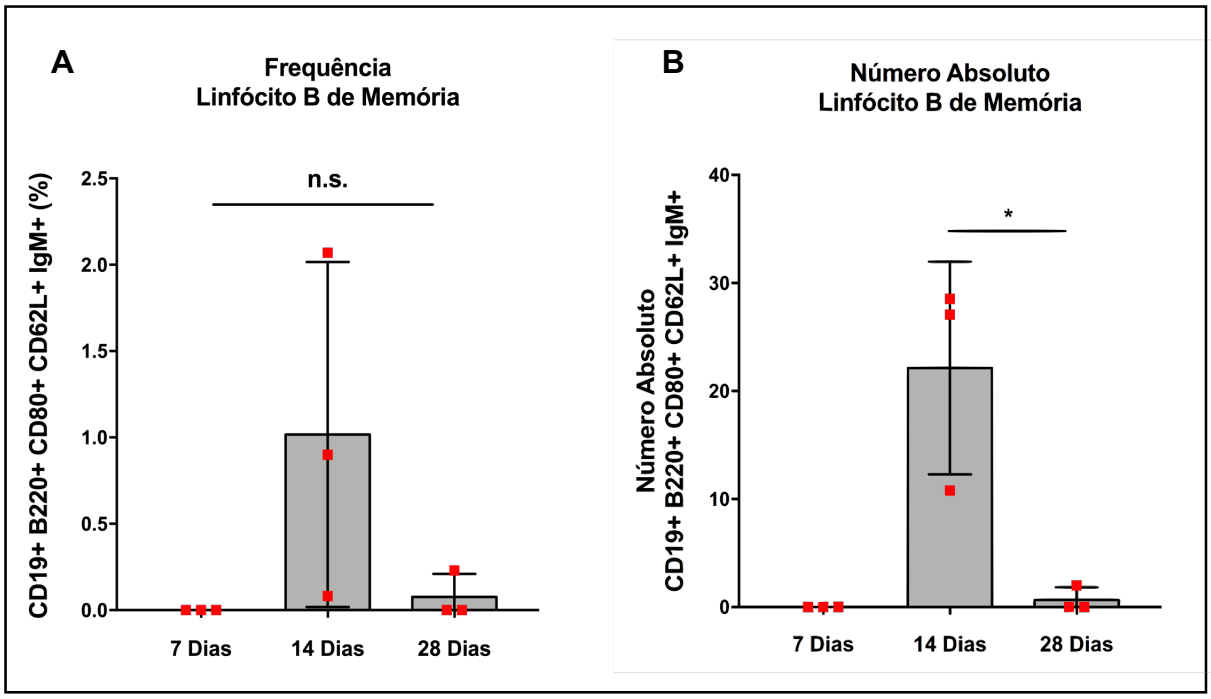

Figura 13. Frequência e número de linfócitos B de memória intratumorais ao longo do desenvolvimento tumoral

(A) Gráficos em barra representando a frequência (%) de linfócitos B de memória (CD19+ B220+ CD62L+ CD80+ IgM+) a partir do processamento dos tumores dos camundongos pertencentes ao grupo tumor (n=3) para os dias 7, 14 e 28 dias, respectivamente (B). Gráficos em barra representando o número absoluto de linfócitos B de memória (CD19+ B220+ CD62L+ CD80+ IgM+) avaliados através da citometria de fluxo a partir do processamento dos tumores dos camundongos do grupo tumor (n=3). Cada uma das amostras representa o *pool* de três animais. n.s. = não significativo; * p< 0.05;

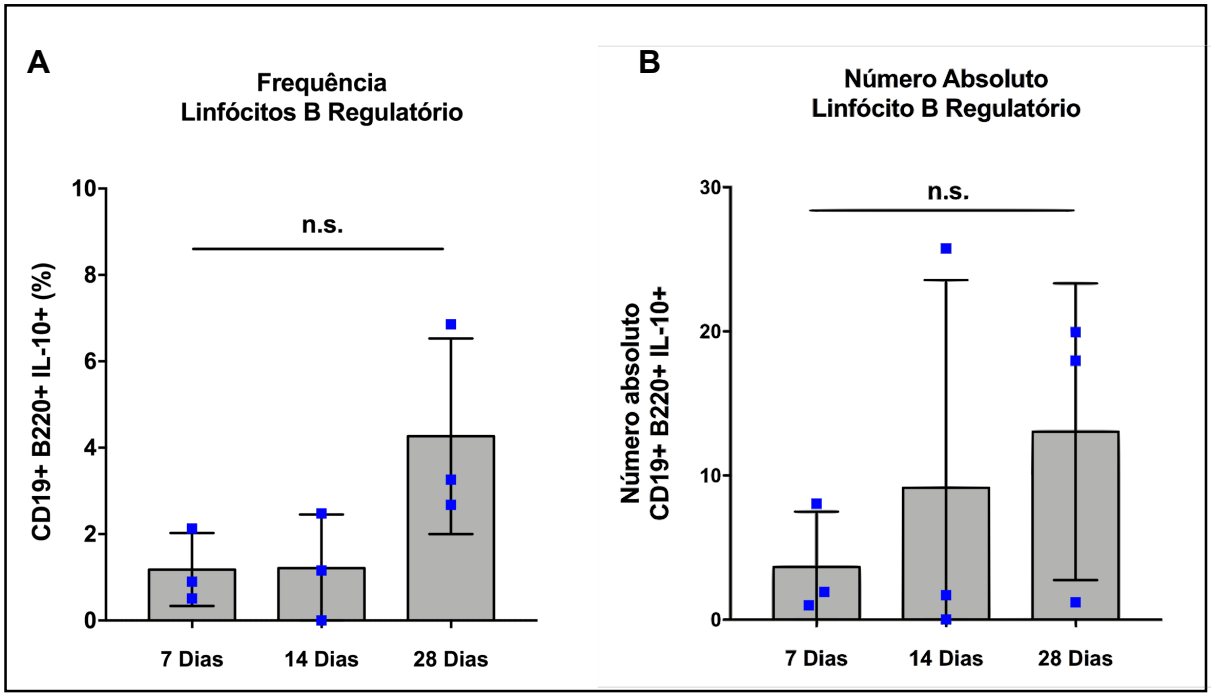

Figura 14. Frequência e número de linfócitos B Regulatórios intratumorais ao longo do desenvolvimento tumoral

(A) Gráficos em barra representando a frequência (%) de linfócitos B regulatórios (CD19+ B220+ IL-10+) a partir do processamento dos tumores dos camundongos pertencentes ao grupo tumor (n=3) para os dias 7, 14 e 28 dias, respectivamente (B). Gráficos em barra representando o número absoluto de plasmablastos (CD19+ B220+ IL-10+) avaliados através da citometria de fluxo a partir do processamento dos tumores do grupo tumor (n=3). Cada uma das amostras representam o *pool* de três animais. n.s. = não significativo.

4.1.7. Predomínio de Plasmócitos no microambiente tumoral em comparação a outras populações no estágio mais avançado da doença

Embora a partir da mensuração por citometria de fluxo tenha sido verificado alteração quanto a frequência nas diferentes subpopulações de linfócitos B analisadas, ficou evidenciado um contínuo aumento na população de plasmócitos no microambiente intratumoral em função do crescimento tumoral por células de adenocarcinoma murino 4T1 (Figura 15).

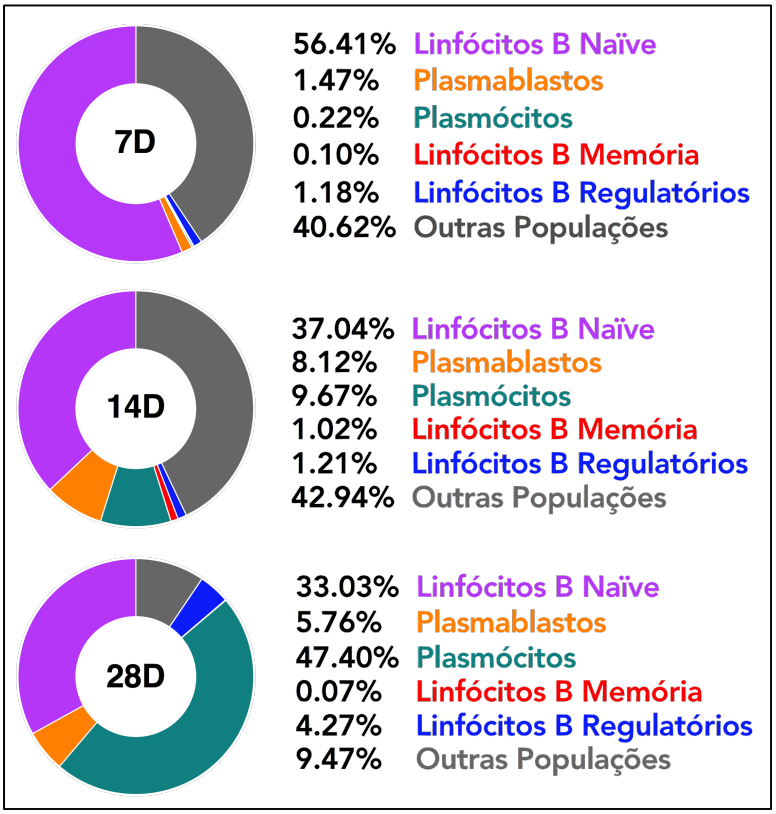

Figura 15. Frequência de diferentes subpopulações de linfócitos B no microambiente intratumoral em função do crescimento de células 4T1 para os períodos de 7, 14 e 28 dias.

4.2. Avaliação de distintas subpopulações de linfócitos B no baço em função ao desenvolvimento tumoral

4.2.1. Tumor induzido por células 4T1 triplica o tamanho do baço em 28 dias

Afim de verificar se o tamanho do baço é afetado pelo desenvolvimento tumoral, camundongos BALB/c foram eutanasiados após 7, 14 e 28 dias do transplante de células 4T1. O baço foi extraído, a presença de alterações visuais foi verificada e a área do órgão medida através do *software* de análise ImageJ.

Conforme verificado na literatura, o baço dos camundongos desafiados com células tumorais 4T1 tornou-se progressivamente maior em função do período de crescimento do tumor de mama (Figura 16A). Corroborando com os achados visuais, por meio da mensuração da área do órgão através do *software* de análise ImageJ (Materiais e Métodos, seção 3.7.2) tornou-se evidente que o aumento da área do baço está intimamente associado ao tempo de expansão da massa tumoral. De acordo com os dados expostos nos gráficos de barra da figura 16B, é possível observar que, apesar do sutil aumento da área do baço para os camundongos do grupo tumor (0.84 ± 0.03 cm^2) em relação ao grupo controle (0.76 ± 0.01 cm^2) após 7 dias do desafio tumoral, este aumento não foi estatisticamente significativo. Entretanto, foi constatado diferença estatística entre o grupo controle (0.68 ± 0.02 cm^2) e grupo tumor (1.32 ± 0.10 cm^2) para o período de 14 dias, assim como entre o grupo controle (0.68 ± 0.01 cm^2) e grupo tumor (2.72 ± 0.09 cm^2) para o período de 28 dias.

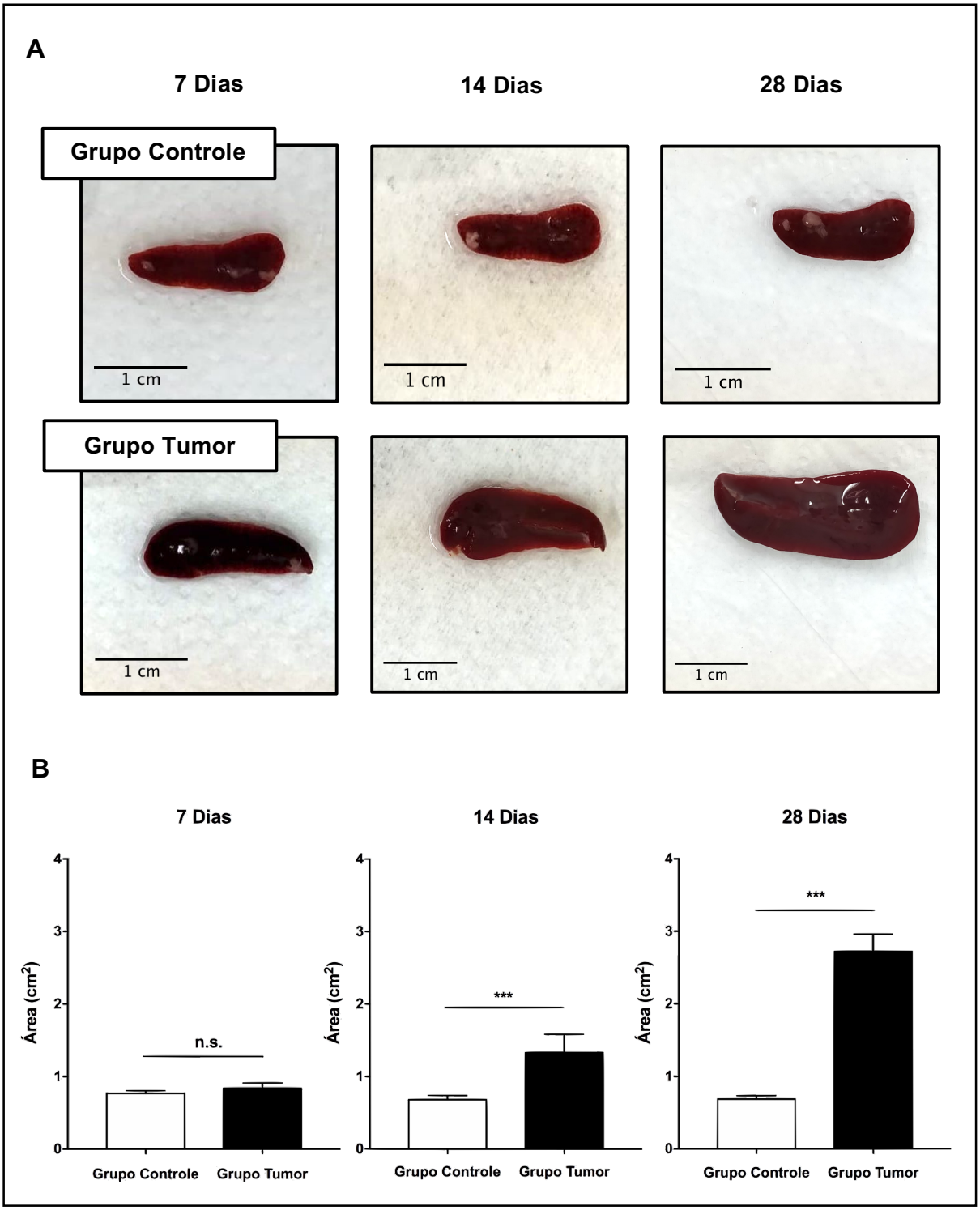

Figura 16. Área do baço em função do tempo de desenvolvimento tumoral.

(A) Fotos representativas do baço de camundongos da linhagem BALB/c pertencentes aos grupos controle e tumor após 7, 14 e 28 dias do inoculo com solução PBS 1X e células de adenocarcinoma 4T1, respectivamente. (B) Gráficos em barra representando a área (cm^2) do baço de camundongos BALB/c com 8 semanas de idade pertencentes aos grupos controle (n=6) e tumor (n=6) para os períodos de 7, 14 e 28 dias, respectivamente. As barras representam a média ± desvio padrão. n.s.= não significativo; *** p= 0.0001.

4.2.2. Aumento no número de leucócitos, mas decréscimo no número de linfócitos B no baço ao longo da evolução tumoral

Visto que a maior proporção de células presente no baço de camundongos são linfócitos B, o atual trabalho teve como objetivo verificar o impacto no número e subpopulações de linfócitos B neste órgão ao longo do desenvolvimento tumoral. Para tal, os baços dos animais inoculados com células 4T1 e solução fosfato-salino (PBS) 1X estéril/filtrado foram processados e contados em câmara de Neubauer (Materiais e Métodos, seção 3.9.1), sequencialmente sendo avaliados através da citometria de fluxo.

A partir dos resultados foi possível constatar que não houve diferença estatisticamente significativa na contagem do número de leucócitos para o período de 7 dias entre o grupo controle ($0.5x10^8$ ± 0.1 células/mL) e grupo tumor ($0.7x10^8$ ± 0.1 células/mL). Contudo, o número de leucócitos no grupo tumor ($3.23x10^8$ ± 0.7 células/mL) foi 5.3 vezes maior do que no grupo controle ($0.6x10^8$ ± 0.3 células/mL) no período de 14 dias e 9.3 vezes maior 28 dias após inoculação das células tumorais, onde foi observado no grupo controle ($0.55x10^8$ ± 0.06 células/mL) e no grupo tumor ($5.12x10^8$ ± 0.7 células/mL) (Figura 17A).

Através do uso de corante capaz de discriminar células vivas e mortas em análise por citometria de fluxo, células extraídas do baço dos camundongos de ambos os grupos controle e tumor foram avaliadas quanto à sua viabilidade celular. De acordo com os gráficos expostos na figura 17B, é possível averiguar que ≥ 80% células foram classificadas como vivas para os períodos de 7 e 28 dias em ambos os grupos controle e tumor, ao passo que percentual médio menor (≤ 80%) foi visto para células pertencentes ao período de 14 dias.

Apesar do aumento da contagem de leucócitos, a inoculação das células tumorais 4T1 nos animais de grupo correspondente não condicionou elevação contínua do número e frequência (%) de linfócitos B (CD19+ B220+), opostamente foi observado um decréscimo na população 28 dias após o transplante de células tumorais (Figuras 17C e D).

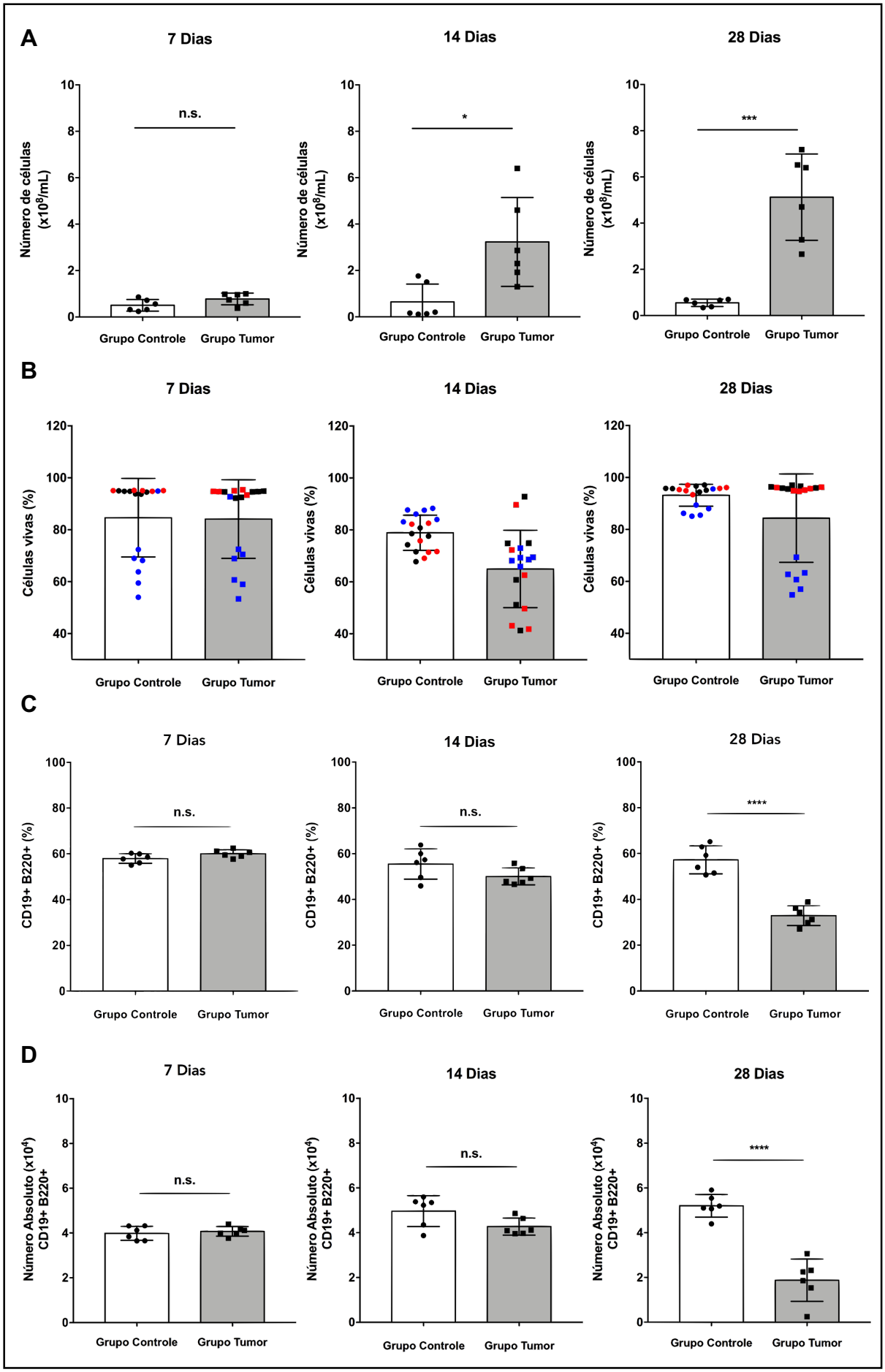
A
7 Dias
14 Dias
28 Dias
Número de células (x10⁶/mL)
n.s.
*
***
Grupo Controle
Grupo Tumor
B
Células vivas (%)
C
CD19+ B220+ (%)
****
D
Número Absoluto (x10⁴) CD19+ B220+

Figura 17. Evolução do número de leucócitos, viabilidade celular e número de linfócitos B no baço ao longo do desenvolvimento tumoral.

(A) Gráficos em barra representando o **número total de leucócitos** contados em câmara de Neubauer por ensaio de exclusão com solução de azul de tripano a partir do processamento dos baços dos camundongos pertencentes aos grupos controle (n=6) e grupo tumor (n=6) para os dias 7, 14 e 28 dias, respectivamente **(B)** Representação em gráfico em barra da **frequência (%) de células vivas** a partir do processamento dos baços dos camundongos dos grupos controle (n=18) e tumor (n=18), sendo cada uma das cores representativas de um painel (Painel 1= preto / Painel 2= vermelho / Painel 3= azul), de forma cada painel possuir n=6. **(C)** Gráficos em barra representando a **frequência relativa (%)** de linfócitos B (CD19+ B220+) avaliados através da citometria de fluxo a partir do processamento dos baços dos camundongos dos grupos controle (n=6) e tumor (n=6). **(D)** Representação do **número absoluto** de linfócitos B (CD19+ B220+) avaliados através da citometria de fluxo a partir dos baços dos camundongos dos grupos controle (n=6) e tumor (n=6). As barras representam a média ± desvio padrão. n.s. = não significativo; * p< 0.05; *** p= 0.0001; **** p< 0.0001.

4.2.3. Diminuição na frequência e número de linfócitos B naïve, plasmablastos, plasmócitos, linfócitos B de memória e células B regulatórias ao longo da evolução tumoral

Afim de verificar se o crescimento das células de adenocarcinoma 4T1 poderiam causar alteração no compartimento de linfócitos B naïve no baço, o número absoluto e frequência foi avaliado por citometria de fluxo.

Conforme é possível observar nos gráficos (A e B) apresentados na figura 18, não houve alteração estatisticamente significativa na frequência e número absoluto de linfócitos B naïve no baço entre os grupos controle e grupo tumor nos períodos de 7 e 14 dias. Apesar disso, no dia 28, é possível verificar queda expressiva na frequência – grupo controle (49.25 ± 4.59 %) vs. grupo tumor (31.03 ± 4.16 %) – e número absoluto, grupo controle ($2.82x10^4$ ± 0.28) vs. grupo tumor ($1.7x10^4$ ± 0.1). A diminuição verificada no dia 28 levanta a hipótese de maior taxa de diferenciação de linfócitos B naïve em outras subpopulações do compartimento de células B.

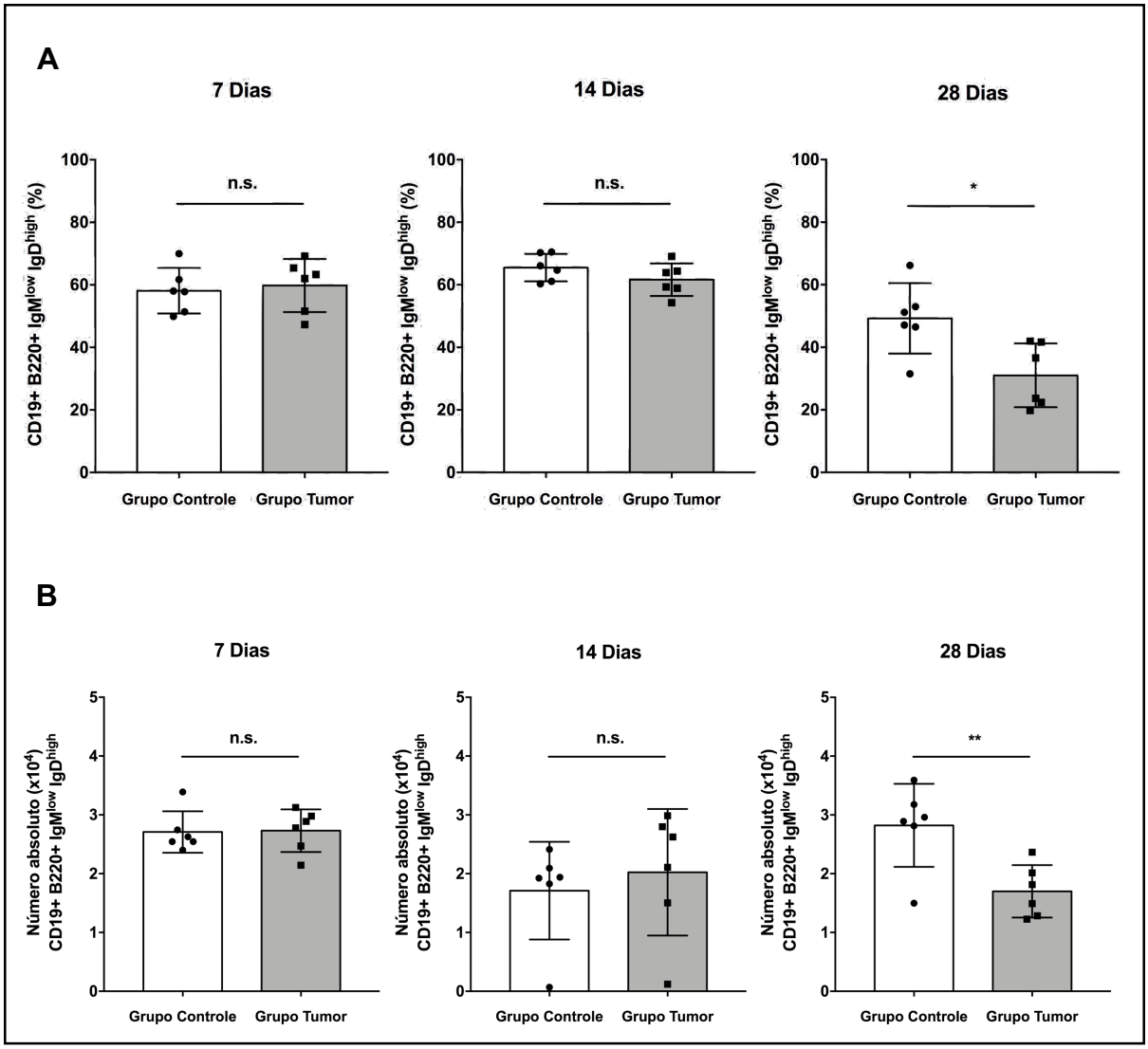

Figura 18. Frequência e número de linfócitos B naïve no baço ao longo do desenvolvimento tumoral.

(A) Gráficos em barra representando a frequência (%) de linfócitos B naïve (CD19+ B220+ IgM^{low} IgD^{high}) a partir do processamento dos baços dos camundongos pertencentes aos grupos controle (n=6) e grupo tumor (n=6) para os dias 7, 14 e 28 dias, respectivamente (B). Gráficos em barra representando o número absoluto de linfócitos B naïve (CD19+ B220+ IgM^{low} IgD^{high}) avaliados através da citometria de fluxo a partir do processamento dos baços dos camundongos dos grupos controle e tumor. n.s. = não significativo; * $p< 0.05$; ** $p< 0.001$.

A partir das análises realizadas foi observado que o crescimento das células de adenocarcima 4T1 não influenciou de forma expressiva o número e frequência de plasmasblastos (Figura 19A e B) e plasmócitos (Figuras 20A e B) para os períodos de 7 e 14 dias. Similarmente aos achados anteriores, alterações relevantes somente foram observadas para o período de 28 dias. Além disso, é notável o baixo número de plasmócitos em todos os períodos analisados.

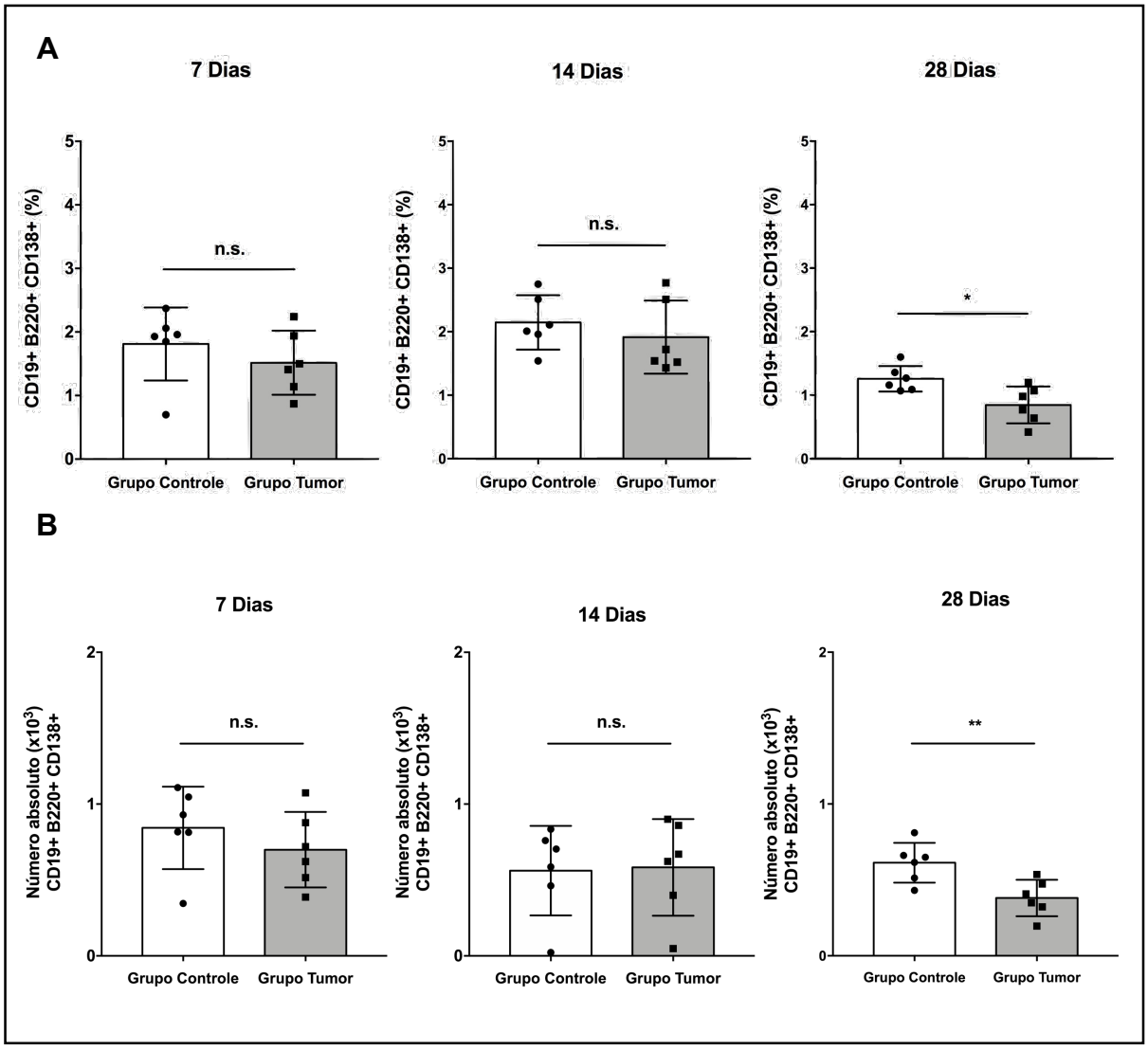

Figura 19. Frequência e número de plasmablastos no baço durante o desenvolvimento tumoral.

(A) Gráficos em barra representando a frequência (%) de plasmablastos (CD19+ B220+ CD138+) a partir do processamento dos baços dos camundongos pertencentes aos grupos controle (n=6) e grupo tumor (n=6) para os dias 7, 14 e 28 dias, respectivamente (B). Gráficos em barra representando o número absoluto de plasmablastos (CD19+ B220+ CD138+) avaliados através da citometria de fluxo a partir do processamento dos baços dos camundongos dos grupos controle (n=6) e tumor (n=6). n.s. = não significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

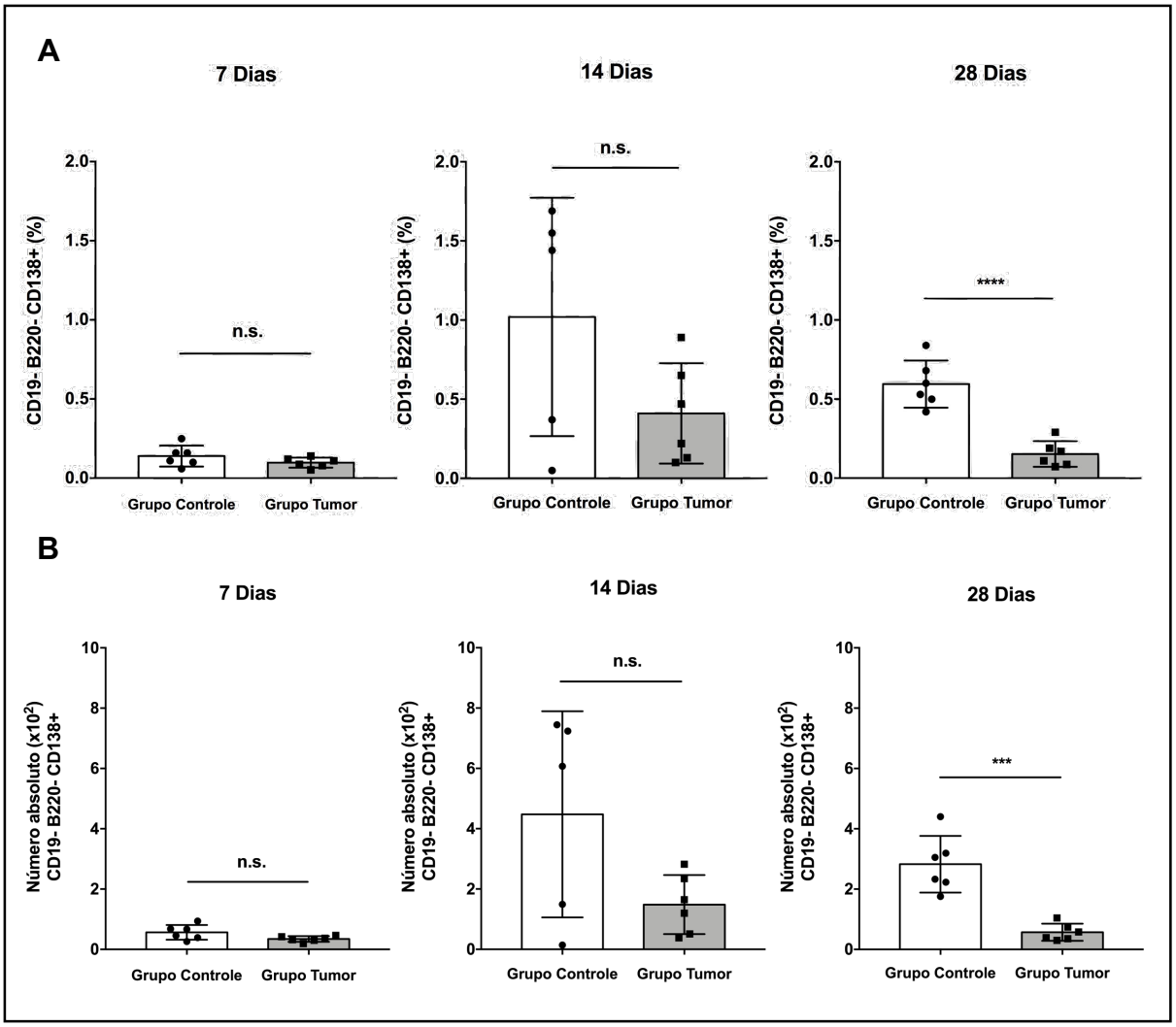

Figura 20. Frequência e número de plasmócitos no baço durante o desenvolvimento tumoral.

(A) Gráficos em barra representando a frequência (%) de plasmócitos (CD19- B220- CD138+) a partir do processamento dos baços dos camundongos pertencentes aos grupos controle (n=6) e grupo tumor (n=6) para os dias 7, 14 e 28 dias, respectivamente (B). Gráficos em barra representando o número absoluto de plasmablastos (CD19- B220- CD138+) avaliados através da citometria de fluxo a partir do processamento dos baços dos camundongos dos grupos controle (n=6) e tumor (n=6). n.s. = não significativo; *** p= 0.0001; **** p<0.0001.

A partir da análise por citometria, foi observado comportamento similar de células classificadas como B de memória em relação às populações de linfócitos B naïve, plasmablastos e plasmócitos, ainda que para estas populações somente foi verificado alteração estatisticamente significativa em estado tardio – 28 dias - do desenvolvimento de células 4T1 nos animais de grupo correspondente. Conforme observado nos gráficos A e B da figura 21, é possível perceber contínua diminuição na frequência (%) e número absoluto da população B de memória entre o grupo

controle e grupo tumor para o período de 7, 14 e 28 dias após a inoculação de células tumorais. Assim como as populações de plasmablastos e plasmócitos o baixo número e frequência de linfócitos B de memória no baço tornam a identificação de tais fenótipos laborioso. Conforme pode ser verificado nos gráficos (Figura 21A e B), em todos os períodos analisados, ≤ 0.5% de linfócitos B de memória foram observados.

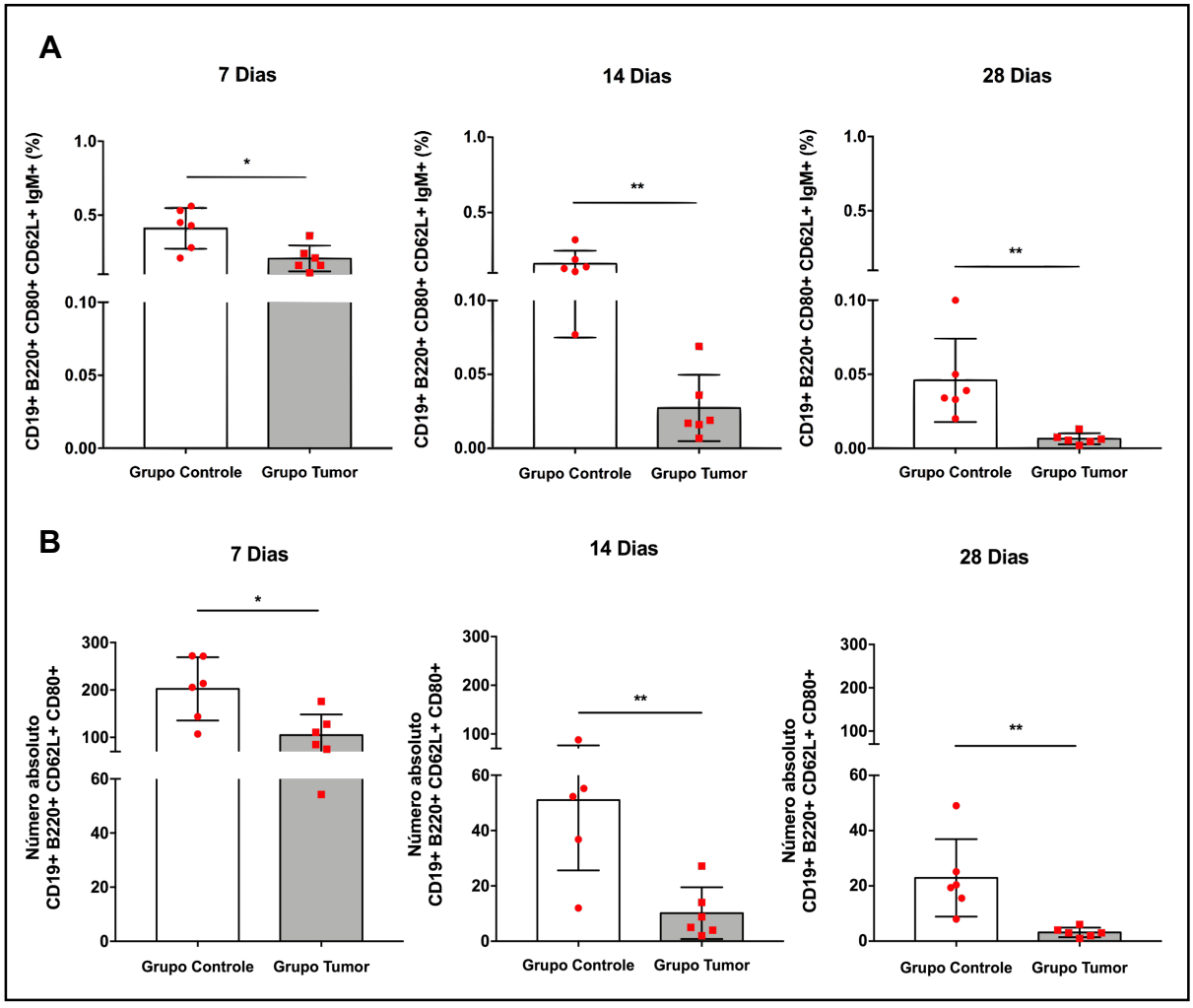

Figura 21. Frequência e número de linfócitos B de memória no baço em função do desenvolvimento tumoral.

(A) Gráficos em barra representando a frequência (%) de linfócitos B de memória (CD19+ B220+ CD62L+ CD80+ IgM+) a partir do processamento dos baços dos camundongos pertencentes aos grupos controle (n=6) e grupo tumor (n=6) para os dias 7, 14 e 28 dias, respectivamente (B). Gráficos em barra representando o número absoluto de linfócitos B de memória (CD19+ B220+ CD62L+ CD80+ IgM+) avaliados através da citometria de fluxo a partir do processamento dos baços dos camundongos dos grupos controle (n=6) e tumor (n=6). n.s. = não significativo; * p< 0.05; ** p< 0.001.

A partir da análise por citometria de fluxo, foi observado que a população de células B regulatórias apresenta baixa frequência e número absoluto - conforme pode ser constatado nas figuras 22A e B, respectivamente, achado este semelhante às frequências encontradas na literatura, ainda que em condições patológicas diferentes (Iwata, Y. *et al.*, 2011; Horikawa, M. *et al.,* 2013; Matsushita, T. *et al.,* 2010).

Igualmente as demais populações anteriormente avaliadas e descritas, somente foi observado alteração estatiscamente significativa para o período de 28 dias, em que foi constatado decréscimo em ambos frequência (%) e número absoluto entre o grupo controle e grupo tumor (Figura 22A e B).

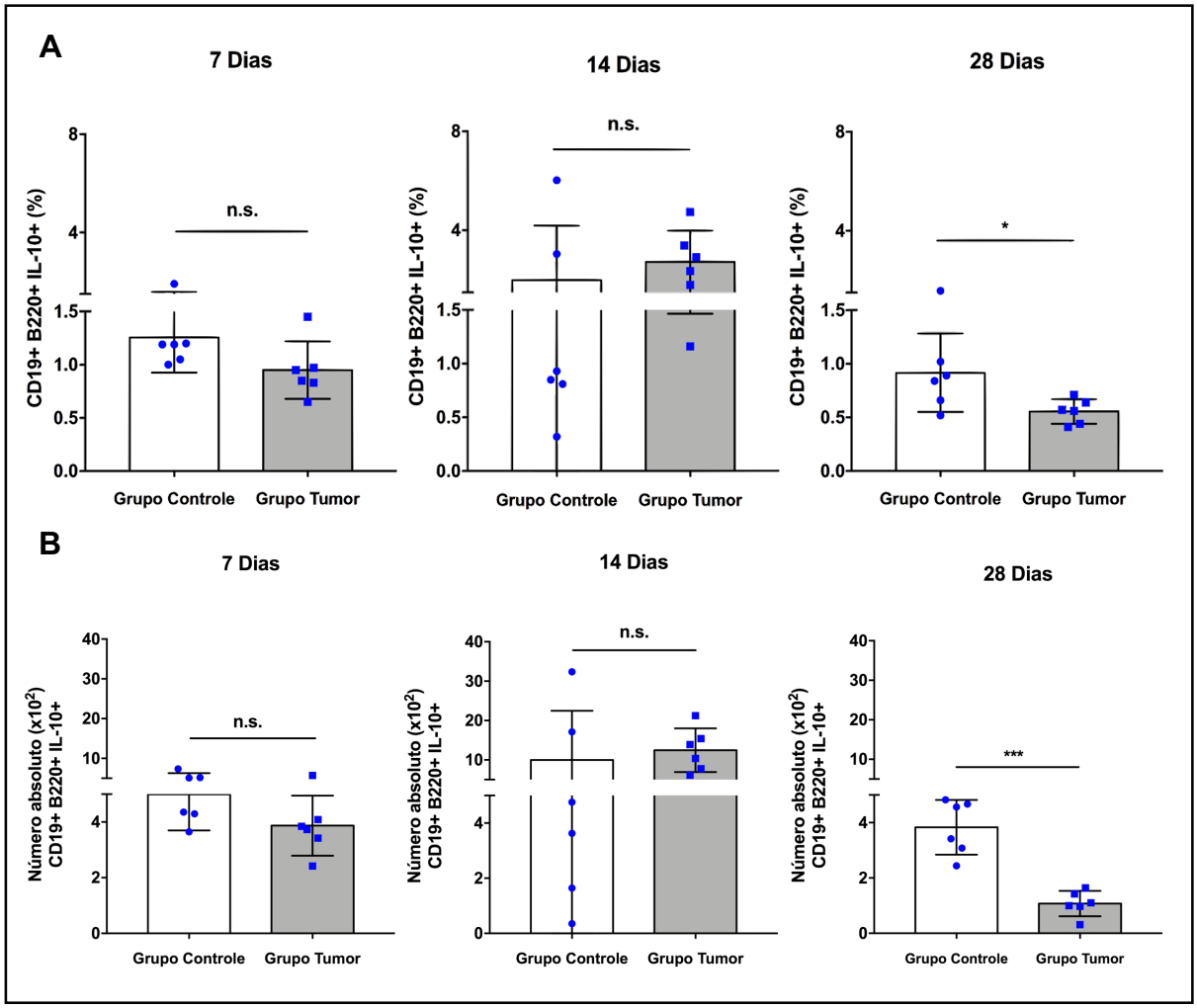

Figura 22. Frequência e número de linfócitos B regulatórios no baço ao longo do desenvolvimento tumoral.

(A) Gráficos em barra representando a frequência (%) de linfócitos B regulatórios (CD19+ B220+ IL-10+) a partir do processamento dos baços dos camundongos pertencentes aos grupos controle (n=6) e grupo tumor (n=6) para os dias 7, 14 e 28 dias, respectivamente (B). Gráficos em barra representando o número absoluto de plasmablastos (CD19+ B220+ IL-10+) avaliados através da citometria de fluxo a

partir do processamento dos baços dos camundongos dos grupos controle (n=6) e tumor (n=6). n.s. = não significativo; * p< 0.05; *** p= 0.0001.

A partir da análise dos resultados, ficou evidente queda no compartimento de linfócitos B no período de 28 dias, queda esta que é confirmada ao serem analisadas as subpopulações individualmente. Conforme demonstrado anteriormente foram observados decréscimo nas populações de linfócitos B naïve, plasmablastos, plasmócitos, linfócitos B de memória e células B regulatórias.

4.2.4. Crescimento do tumor 4T1 *in vivo* não acarreta em aumento de diferentes subpopulações de linfócitos B no baço

Conforme observado nos resultados anteriores, ficou evidenciado que, embora o crescimento das células 4T1 em camundongos da linhagem BALB/c tenha acarretado em aumento do baço, aumento contínuo não foi observado analisando as diferentes subpopulações de linfócitos B. De forma oposta, foi verificado um decréscimo nestas subpopulações para o período de 28 dias (Figura 23).

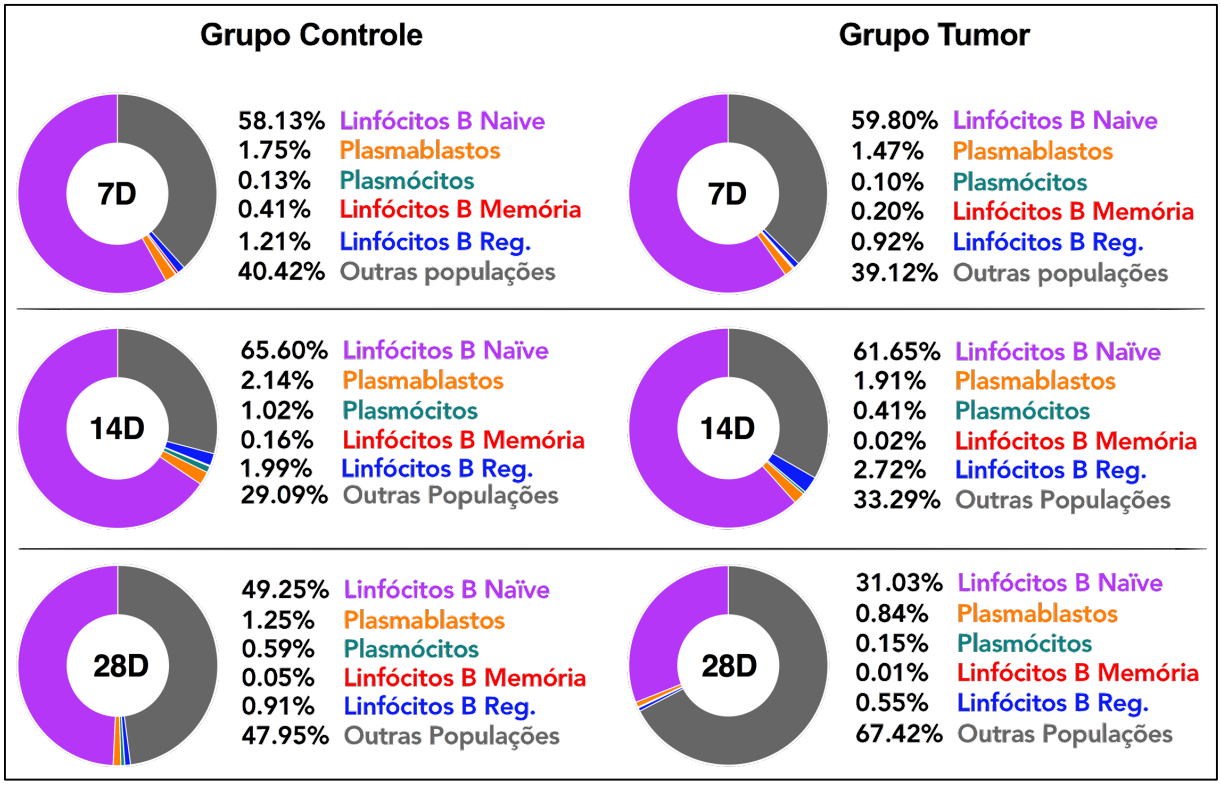

Figura 23. Frequência de diferentes subpopulações de linfócitos B no baço para os grupos controle e tumor em função dos diferentes períodos de crescimento do tumor 4T1.

4.3. Avaliação de distintas subpopulações de linfócitos B no linfonodo em função ao desenvolvimento tumoral

4.3.1. Aumento do linfonodo inguinal após curto período de inoculação de células de adenocarcinoma 4T1

O sistema linfático, composto por linfonodos e vasos linfáticos, possui papel essencial na iniciação e modulação da resposta imune anti-tumoral. Antígenos provenientes de células cancerígenas e células apresentadora de antígenos (APCs) são transportados por vasos linfáticos aferentes até os linfonodos drenantes. Sob condições patológicas, estes linfonodos passam por mudanças significativas quanto o trânsito de células do sistema imune e o fluxo de linfa, assim como alterações estruturais e funcionais, que podem incluir hiperplasia e linfangiogênese, de forma a promover a dispersão de células tumorais (Ji, R., 2017). Com objetivo de verificar se o crescimento de células de adenocarcinoma 4T1 nos animais de grupo correspondente poderia causar tais alterações, avaliamos alterações visuais e mensuramos a área do linfonodo inguinal ipsilateral dos animais através do *software* de análise ImageJ.

Apesar de menor tamanho, foi possível verificar que, logo após 7 dias diante do desafio tumoral por células cancerígenas 4T1, houve mudança visual entre o linfonodo inguinal do grupo controle comparado ao linfonodo inguinal do grupo tumor. Os linfonodos inguinais dos grupos tumor referentes aos dias 14 e 28 também demonstraram tais alterações, conforme pode ser verificado em figura 24A. Além de alterações qualitativas, também observamos que há alteração expressiva quanto a área do linfonodo inguinal nos grupos tumor mediante o crescimento das células cancerígenas 4T1 (Figura 24B). Em todos os períodos avaliados foi constatado que a média da área do linfonodo inguinal dos animais inoculados com as células neoplásicas – 0.083 ± 0.005 cm^2 (7 Dias), 0.089 ± 0.007 cm^2 (14 Dias), 0.10 ± 0.007 cm^2 (28 Dias) - foi pelo menos duas vezes maior que os animais do grupo controle inoculados com solução salina-fosfato (PBS 1X) – 0.031 ± 0.004 cm^2 (7 Dias), 0.029 ± 0.001 cm^2 (14 Dias), 0.037 ± 0.002 cm^2 (28 Dias).

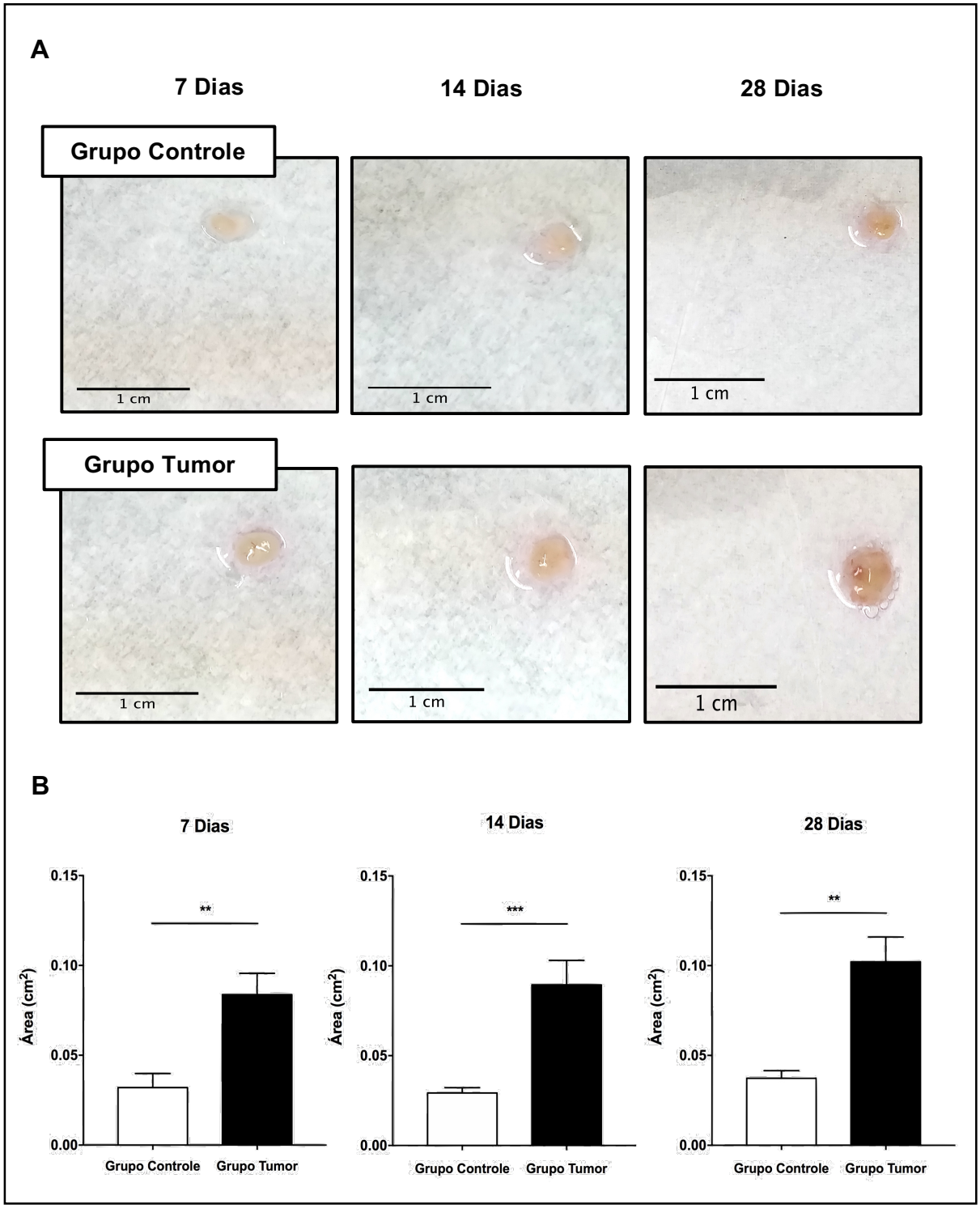

Figura 24. Área do linfonodo em função do tempo de desenvolvimento tumoral.

(A) Fotos representativas do linfonodo inguinal ispilateral de camundongos da linhagem BALB/c pertencentes aos grupos controle e tumor após 7, 14 e 28 dias do inoculo com solução PBS 1X e células de adenocarcinoma 4T1, respectivamente. (B) Gráficos em barra representando a área (cm^2) do linfonodo inguinal ipsilateral de camundongos BALB/c com 8 semanas de idade pertencentes aos grupos controle (n=6) e tumor (n=6) para os períodos de 7, 14 e 28 dias, respectivamente. As barras representam a média ± desvio padrão. n.s.= não significativo; ** p< 0.001; *** p= 0.0001.

4.3.2. Aumento no número de leucócitos e elevação no número e frequência de linfócitos B

Ainda que os eventos inflamatórios decorrentes da presença e contínua expansão da massa tumoral no hospedeiro possam acarretar num aumento das populações do sistema imune, este aumento não necessariamente levará a uma elevação significativa nas populações de linfócitos B, conforme observado nos resultados avaliados para o baço. Visando verificar se o crescimento das células tumorais 4T1 poderiam causar alterações no compartimento de células B do linfonodo inguinal, avaliamos a contagem de leucócitos totais através do uso da câmara de Neubauer a partir do processamento dos linfonodos inguinais pertencentes aos grupos controle e tumor, após 7, 14 e 28 dias.

De acordo com os resultados obtidos, foi visto que - 7 dias após a inoculação de células adenocarcinomatosas 4T1 - houve aumento estatiscamente significativo na contagem de leucócitos no grupo tumor ($3.4x10^7 \pm 0.55$) em comparação ao grupo controle ($0.93x10^7 \pm 0.15$), aumento este que também foi observado para os períodos de 14 e 28 dias, ainda que diferença estatística somente tenha sido constatada para os períodos de 7 e 14 dias (Figura 25A).

Através do uso de corante capaz de discriminar células vivas e mortas, é possível verificar na figura 25B que – similarmente aos achados de viabilidade celular verificados na análise do baço – os períodos 7 e 28 dias foram os que obtiveram maior percentual médio de células vivas, sendo viabilidade ≥ 80% para ambos os períodos. Apesar disso, viabilidade menor foi observado para células avaliadas no período de 14 dias.

Além da elevação no número total de leucócitos, é possível averiguar nas figuras 25C e D, houve aumento estatisticamente significativo na frequência (%) e número absoluto de linfócitos B para todos os períodos analisados.

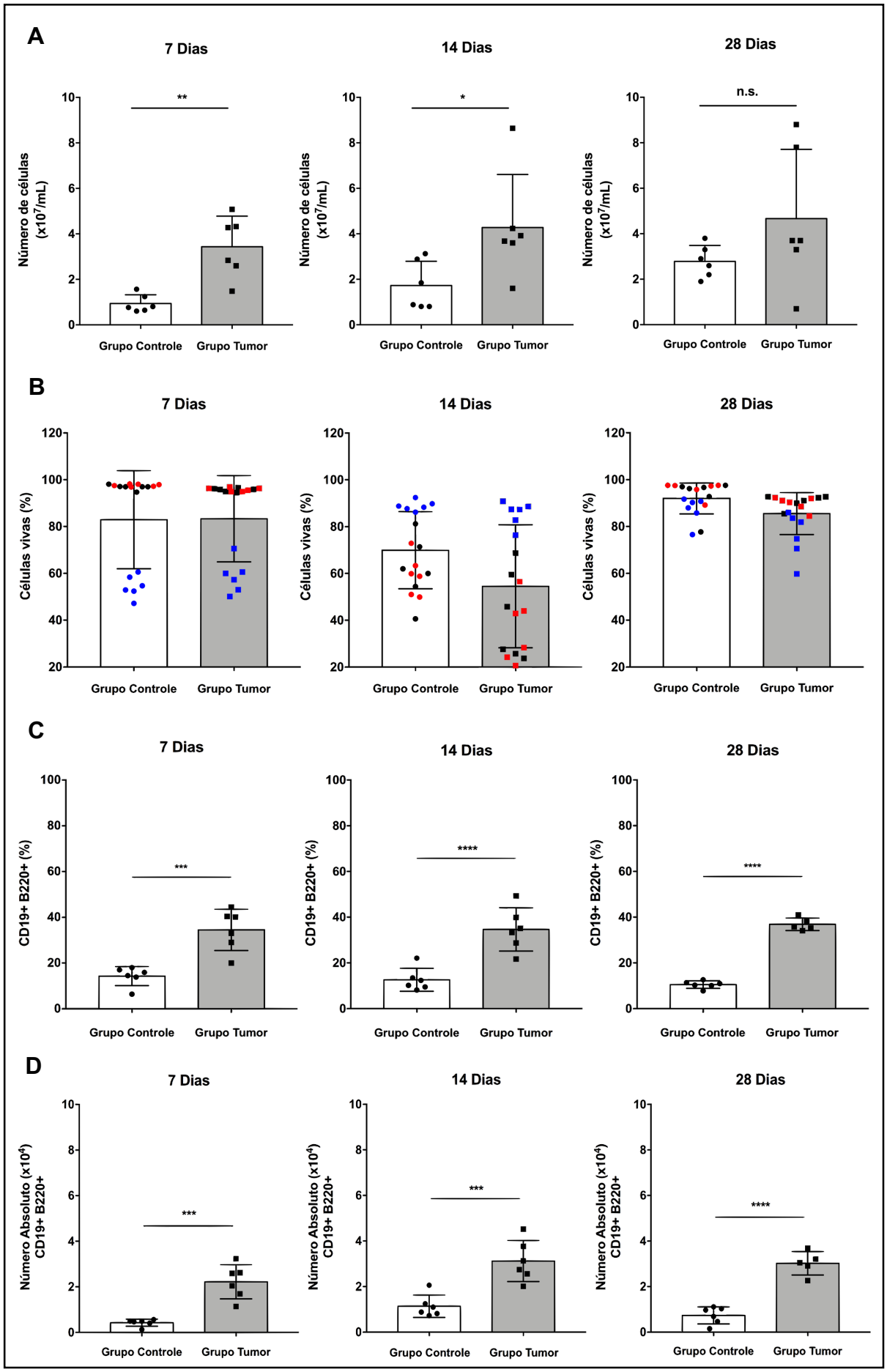
A
7 Dias
14 Dias
28 Dias
Número de células (x10^7/mL)
**
*
n.s.
Grupo Controle
Grupo Tumor
B
Células vivas (%)
C
CD19+ B220+ (%)
***
****
D
Número Absoluto (x10^4) CD19+ B220+

Figura 25. Evolução do número de leucócitos, viabilidade celular e número de linfócitos B no linfonodo ao longo do desenvolvimento tumoral.

(A) Gráficos em barra representando o **número total de leucócitos** contados em câmara de Neubauer por ensaio de exclusão com solução de azul de tripano a partir do processamento dos linfonodos dos camundongos pertencentes aos grupos controle (n=6) e grupo tumor (n=6) para os dias 7, 14 e 28 dias, respectivamente **(B)** Representação em gráfico em barra da **frequência (%) de células vivas** a partir do processamento dos linfonodos dos camundongos dos grupos controle (n=18) e tumor (n=18), sendo cada uma das cores representativas de um painel (Painel 1= preto / Painel 2= vermelho / Painel 3= azul), de forma cada painel possuir n=6. **(C)** Gráficos em barra representando a **frequência relativa (%)** de linfócitos B (CD19+ B220+) avaliados através da citometria de fluxo a partir do processamento dos linfonodos dos camundongos dos grupos controle (n=6) e tumor (n=6). **(D)** Representação do **número absoluto** de linfócitos B (CD19+ B220+) avaliados através da citometria de fluxo a partir dos linfonodos dos camundongos dos grupos controle (n=6) e tumor (n=6). As barras representam a média ± desvio padrão. n.s. = não significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p = 0.0001$; **** $p < 0.0001$.

4.3.3. Elevação da frequência de linfócitos B naïve diante crescimento tumoral

Em contrapartida aos resultados obtidos para o baço, foi observado que a frequência (%) de linfócitos B naïve teve elevação considerável no grupo tumor em relação aos animais pertencentes ao grupo controle em todos os períodos avaliados (7, 14 e 28 dias) (Figura 26A). Apesar disso, em relação ao número absoluto para esta população, somente foram vistos aumento estatisticamente significativos para os períodos de 7 e 28 dias conforme observado na figura 26B.

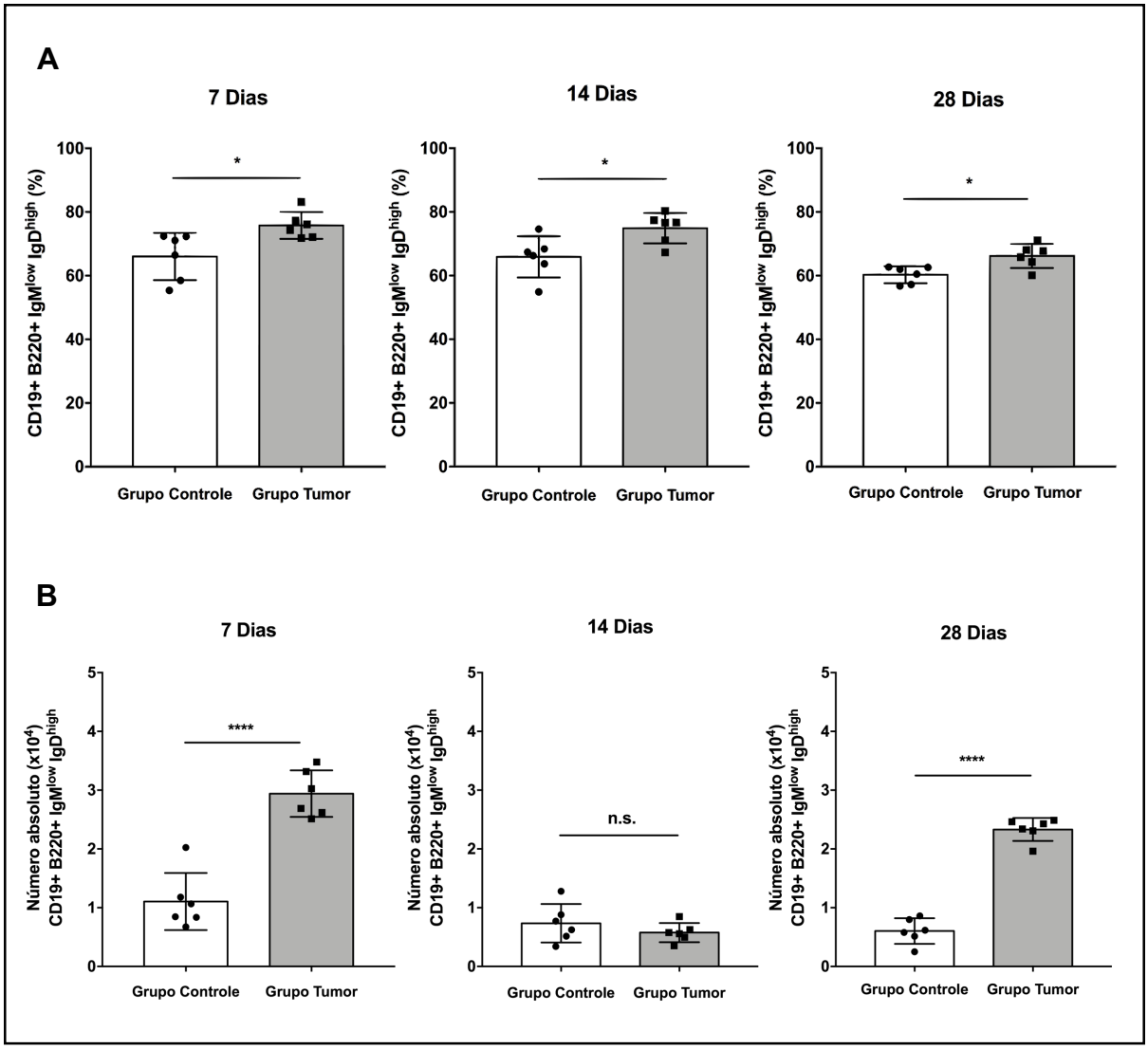

Figura 26. Frequência e número de linfócitos B naïve no linfonodo durante o desenvolvimento tumoral

(A) Gráficos em barra representando a frequência (%) de linfócitos B naïve (CD19+ B220+ IgM^{low} IgD^{high}) dos linfonodos inguinais dos camundongos pertencentes aos grupos controle (n=6) e grupo tumor (n=6) para os dias 7, 14 e 28 dias, respectivamente (B). Gráficos em barra representando o número absoluto de linfócitos B naïve (CD19+ B220+ IgM^{low} IgD^{high}) dos linfonodos inguinais dos camundongos dos grupos controle (n=6) e tumor (n=6). n.s. = não significativo; * $p< 0.05$; **** $p< 0.0001$.

4.3.4. Aumento no número de Plasmablastos e Linfócitos B de Memória em momento inicial e tardio do desenvolvimento tumoral.

Com objetivo de verificar possíveis alterações no compartimento de células B efetoras - especificamente plasmablastos e plasmócitos, e linfócitos B de memória

diante o contínuo crescimento de células tumorais de mama 4T1, células obtidas a partir do processamento do linfonodo inguinal dos grupos controle e tumor para os períodos de 7, 14 e 28 dias foram fenotipadas e analisadas por citometria de fluxo.

Ainda que decréscimo na frequência (%) de plasmablastos para todos os períodos analisados tenha sido detectado (Figura 27A), a diminuição não foi estatisticamente significativa. Apesar disso, a partir da análise dos números absolutos para esta população é verificável diferença estatística para todos os períodos (Figura 27B). Especificamente, foi observado que o número de plasmablastos eleva-se de forma significativa em fase inicial do desenvolvimento tumoral – período de 7 dias, seguido de queda para o período intermediário de 14 dia, com subsequente elevação no período de 28 dias.

Similar as populações de plasmablastos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na frequência (%) de plasmócitos entre o grupo controle e grupo tumor nos respectivos períodos de 7, 14 e 28 dias. Diferentemente dos plasmablastos, não foram vistas modificações no número absoluto para população de plasmócitos (Figura 28A e B).

Em oposição aos resultados observados no baço, há uma tendência de elevação na frequência de linfócitos B de memória nos linfonodos dos animais inoculados com células cancerígenas 4T1, haja vista que diferença estatisticamente significativa foi constatado para o período de 7 e 28 dias. Apesar disso, não houve mudança no período intermediário de 14 dias (Figura 29A). Numericamente, foi observado - juntamente a frequência (%), aumento do número absoluto de linfócitos B de memória nos períodos de 7 e 28 dias, ainda que, novamente, tenha sido observado queda no número absoluto para o período de análise de 14 dias.

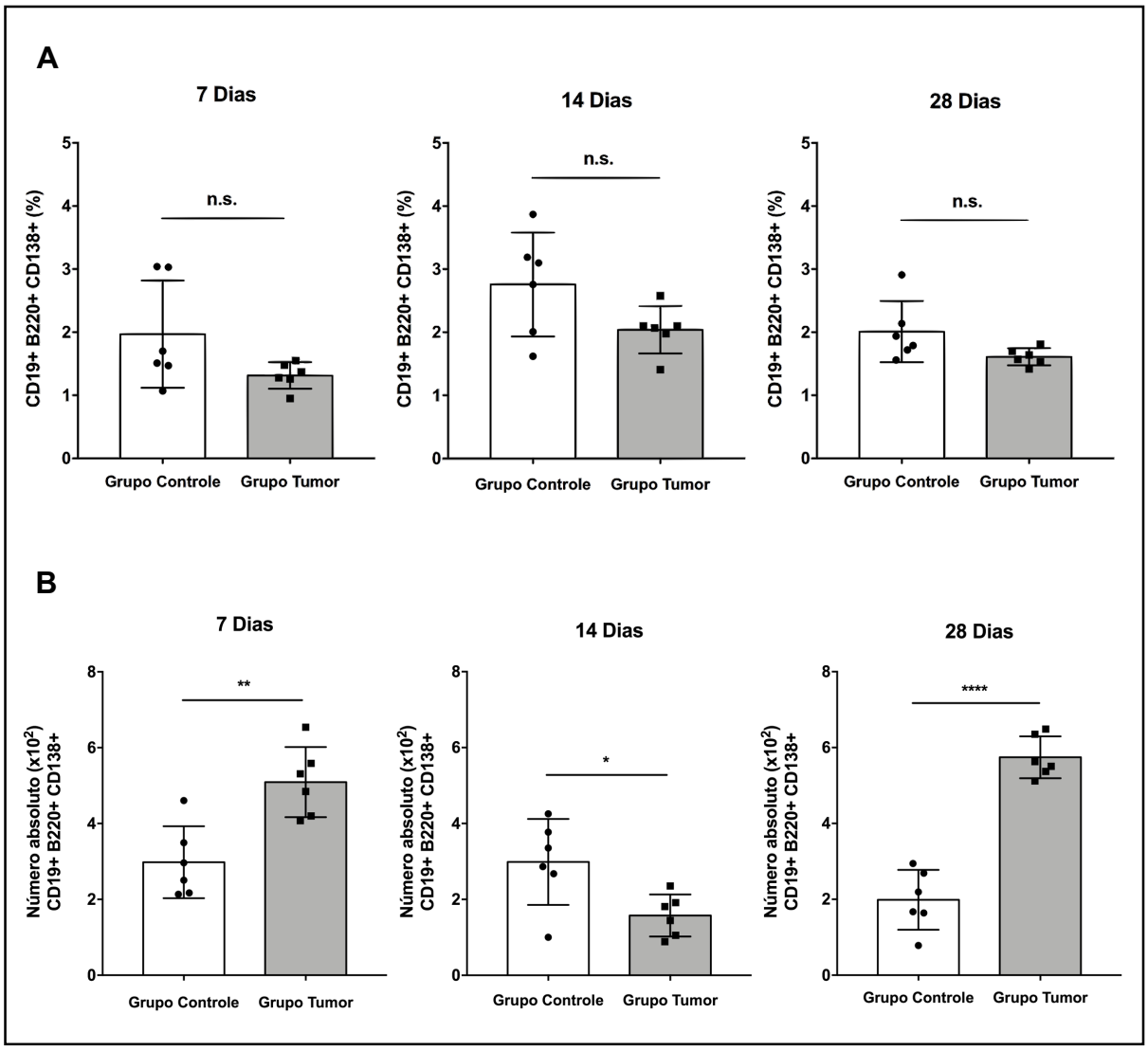

Figura 27. Frequência e número de plasmablastos no linfonodo durante o desenvolvimento tumoral

(A) Gráficos em barra representando a frequência (%) de plasmablastos (CD19+ B220+ CD138+) do linfonodo inguinal dos camundongos pertencentes aos grupos controle (n=6) e grupo tumor (n=6) para os dias 7, 14 e 28 dias, respectivamente (B). Gráficos em barra representando o número absoluto de plasmablastos (CD19+ B220+ CD138+) avaliados através da citometria de fluxo a partir do linfonodo inguinal dos camundongos dos grupos controle (n=6) e tumor (n=6). n.s. = não significativo; * $p < 0.05$ ** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

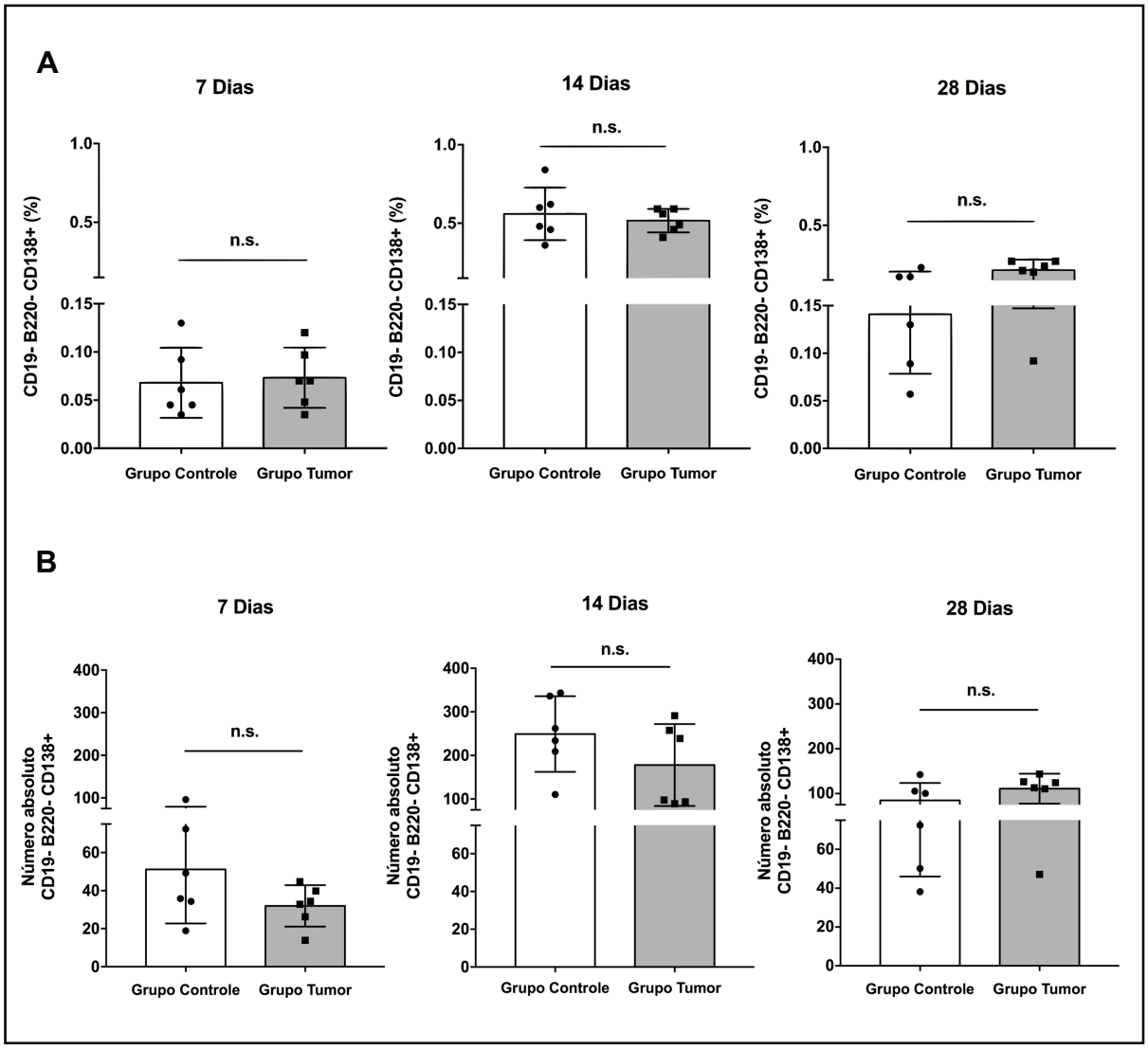

Figura 28. Frequência e número de plasmócitos no linfonodo durante o desenvolvimento tumoral

(A) Gráficos em barra representando a frequência (%) de plasmócitos (CD19- B220- CD138+) a partir do processamento do linfonodo inguinal dos camundongos pertencentes aos grupos controle (n=6) e grupo tumor (n=6) para os dias 7, 14 e 28 dias, respectivamente (B). Gráficos em barra representando o número absoluto de plasmócitos (CD19- B220- CD138+) avaliados através da citometria de fluxo a partir do processamento do linfonodo inguinal dos camundongos dos grupos controle (n=6) e tumor (n=6). n.s. = não significativo.

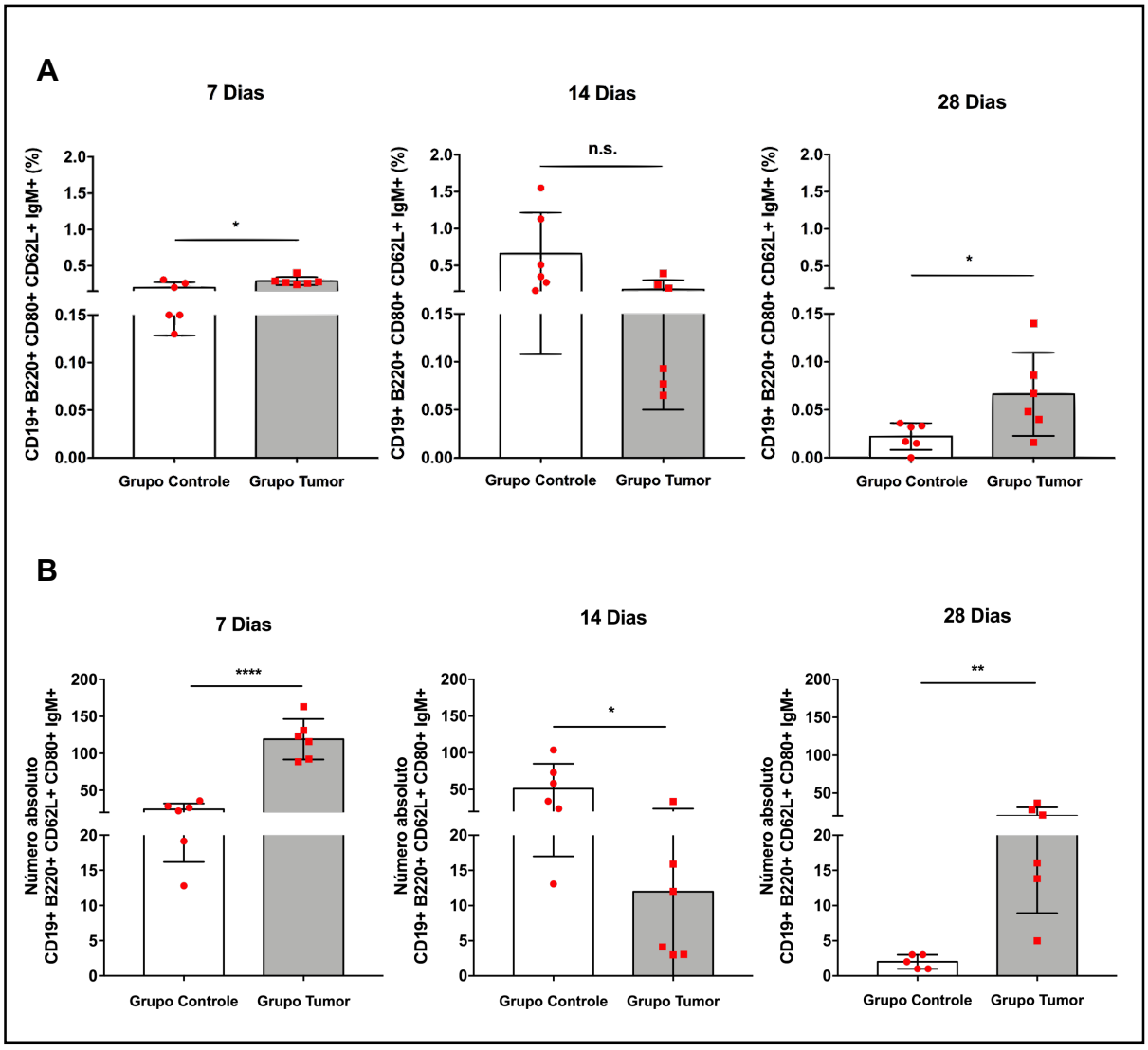

Figura 29. Frequência e número de linfócitos B de memória no linfonodo durante o desenvolvimento tumoral

(A) Gráficos em barra representando a frequência (%) de linfócitos B de memória (CD19+ B220+ CD62L+ CD80+ IgM+) a partir do processamento do linfonodo inguinal dos camundongos pertencentes aos grupos controle (n=6) e grupo tumor (n=6) para os dias 7, 14 e 28 dias, respectivamente (B). Gráficos em barra representando o número absoluto de linfócitos B de memória (CD19+ B220+ CD62L+ CD80+ IgM+) avaliados através da citometria de fluxo a partir do processamento do linfonodo inguinal dos camundongos dos grupos controle (n=6) e tumor (n=6). n.s. = não significativo; * p< 0.05; ** p< 0.001, **** p< 0.0001.

4.3.5. Número de Linfócitos B Regulatórios aumentam após 7 e 14 dias de desenvolvimento tumoral

A presença de linfócitos B regulatórios nos linfonodos tem sido descrita em diferentes modelos tumorais ao longo dos últimos anos. A partir de evidências coletadas nas últimas décadas, acredita-se que a presença de linfócitos B regulatórios esteja associado a pior prognóstico da doença, uma vez que os mecanismos empregados por estas populações linfocitárias são correlacionados a supressão da resposta imune (Maglioco, A. *et al.,* 2014; Ganti, S.N. *et al.,* 2015). Ainda assim, pouco se sabe sobre a dinâmica destas células no decorrer do desenvolvimento do tumor de mama. Com objetivo de analisar as potenciais variações temporais de linfócitos B regulatórios, células foram extraídas do linfonodo inguinal dos animais pertencentes aos grupos controle e tumor após 7, 14 e 28 dias do desafio tumoral.

De acordo com os resultados obtidos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas quanto a frequência de células B regulatórias entre o grupo controle e grupo tumor em todos os períodos avaliados (Figura 30A). Entretanto, é possível verificar que quando elevação no número absoluto de células B regulatórias em todos os tempos analisados, ainda que aumento estatisticamente significativo só tenha sido constato para o período de 7 e 14 dias (Figura 30B).

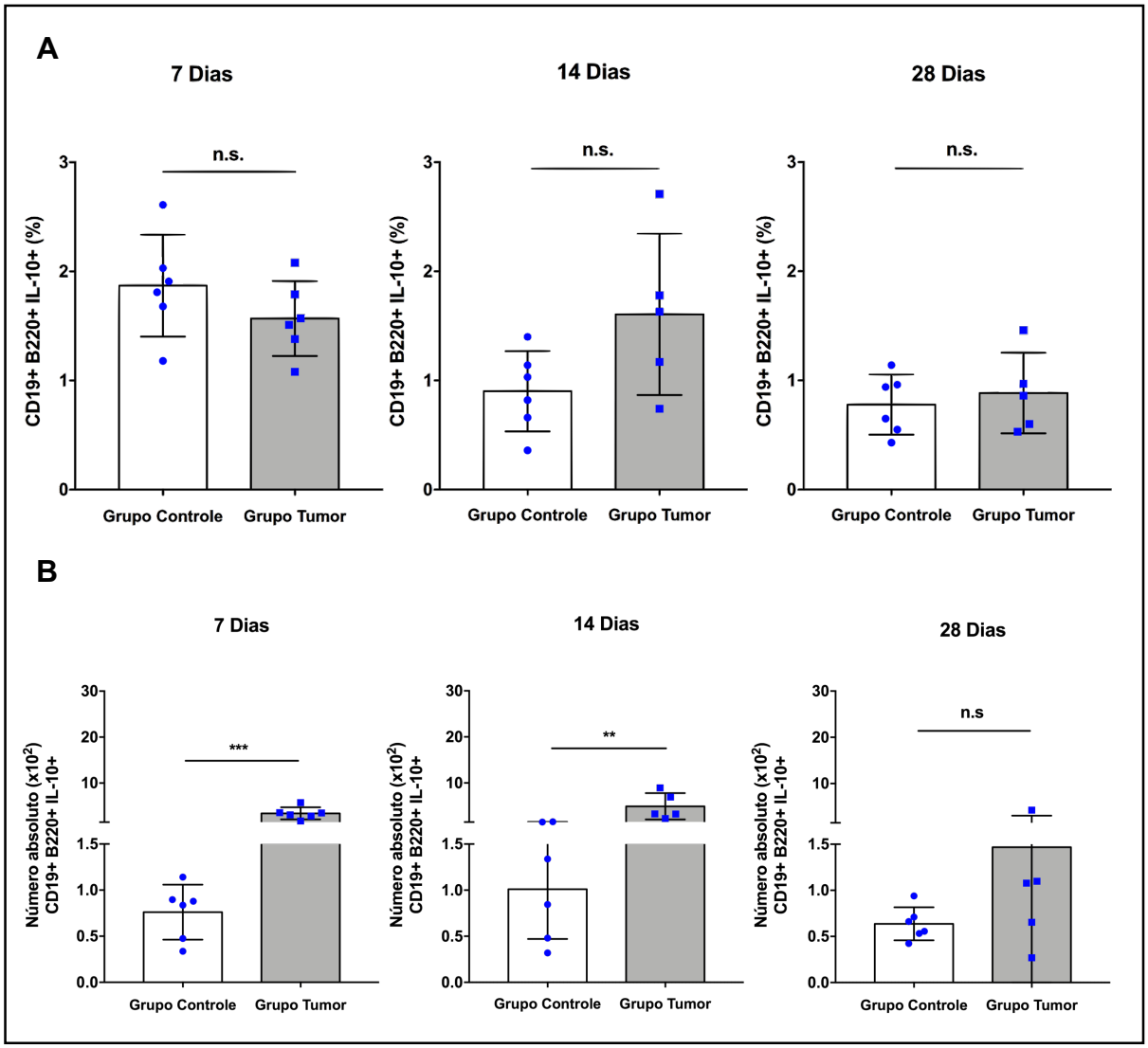

Figura 30. Frequência e número de Linfócitos B regulatórios no linfonodo em função ao desenvolvimento tumoral.

(A) Gráficos em barra representando a frequência (%) de linfócitos B regulatórios (CD19+ B220+ IL-10+) a partir do processamento do linfonodo inguinal dos camundongos pertencentes aos grupos controle (n=6) e grupo tumor (n=6) para os dias 7, 14 e 28 dias, respectivamente (B). Gráficos em barra representando o número absoluto de plasmablastos (CD19+ B220+ IL-10+) avaliados através da citometria de fluxo a partir do processamento do linfonodo inguinal dos grupos controle (n=6) e tumor (n=6). n.s. = não significativo; ** p< 0.01 *** p= 0.0001.

4.3.6. Crescimento do tumor 4T1 *in vivo* acarreta em aumento no compartimento de linfócitos B

Conforme observado nos resultados anteriores, ficou evidenciado que o crescimento das células 4T1 em camundongos da linhagem BALB/c acarretou não somente no aumento do órgão, mas também na frequência e número absoluto de linfócitos B. A partir da análise das diferentes subpopulações, ficou observado um aumento expressivo nas populações de linfócitos B naïve (Figura 31).

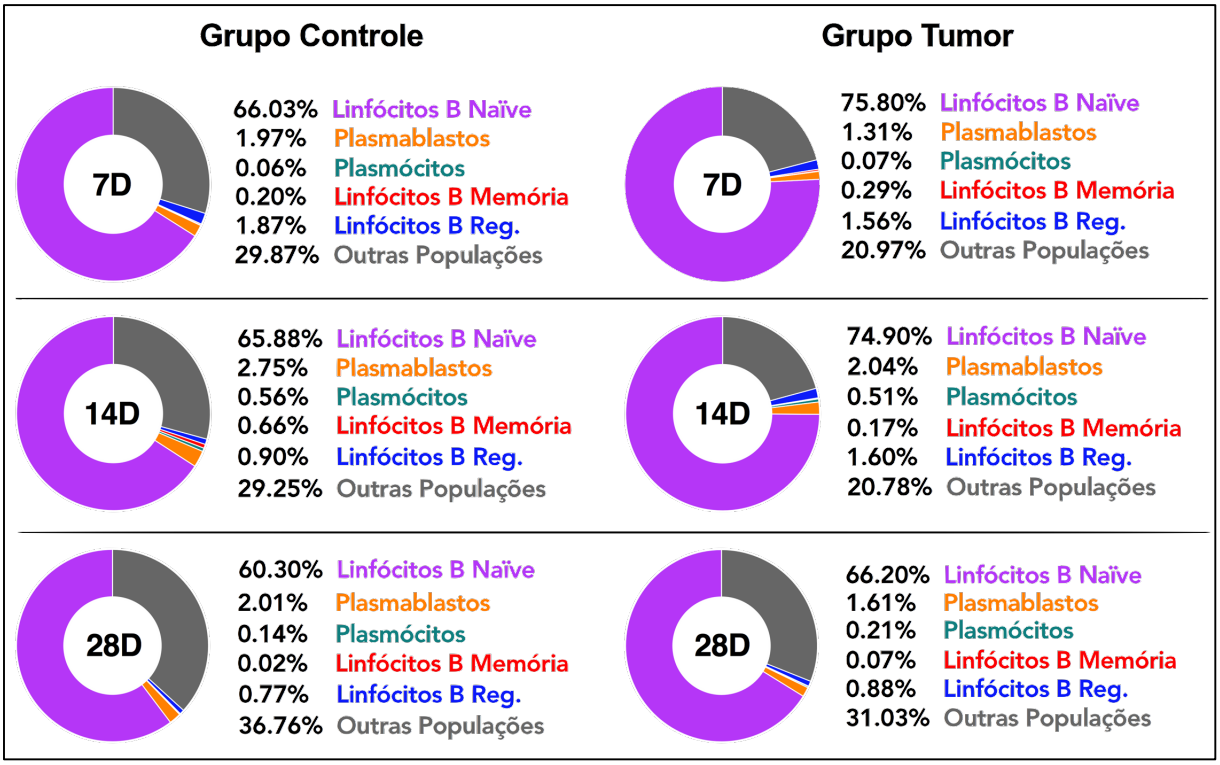

Figura 31. Frequência de diferentes subpopulações de linfócitos B no linfonodo inguinal para os grupos controle e tumor em função dos diferentes períodos de crescimento do tumor 4T1.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Modelos animais têm sido comumente empregados no estudo de diferentes tipos de neoplasia, entre estas o câncer de mama. A partir da utilização de tais modelos, é possível obter uma melhor compreensão dos diferentes mecanismos envolvidos na progressão do câncer, assim como avaliar novas abordagens terapêuticas que podem potencialmente vir a serem utilizadas no tratamento das neoplasias malignas humanas (Zhou, W., Guo, S., Gonzalez-Perez, R.R., 2011; Taylor, M.A. *et al.,* 2013; Guo, M.L. *et al.,* 2019; Sharm, B. *et al.,* 2019).

No presente estudo, fizemos o uso de células de adenocarcinoma de mama 4T1, células neoplásicas originadas através de processo espontâneo de tumorigênese em camundongos da linhagem BALB/c e caracterizadas pela elevada agressividade e capacidade de desenvolvimento de metástases de maneira espontânea em outros órgãos e tecidos (Pulaski, B.A., Ostrand-Rosenberg, S., 2000). Ainda que estas células sejam aptas a crescer virtualmente em qualquer local no corpo de camundongos BALB/c, transplantes na região dorsal ou ventral dos animais são comumente verificados na literatura (Oh, S. *et al.,* 2012; Mehta, R.R. *et al.,* 2013). Entretanto, há que ressaltar que a inoculação de células 4T1 de forma ortotópica na região mamária permite mimetizar de maneira mais fidedigna o processo de desenvolvimento tumoral de mama.

O atual trabalho demonstrou que o compartimento de linfócitos B presentes no baço e linfonodo responde de maneira distinta em função ao contínuo crescimento de células tumorais de mama. Apesar de compartilharem estruturas e funções imunológicas similares no que tange a iniciação e estabelecimento de resposta imune contra antígenos tumorais, as dinâmicas celulares e moleculares são distintas entre os dois órgãos linfoides secundários. Além disso, o trabalho caracterizou a presença de diferentes subpopulações de linfócitos B intratumorais em função do tempo da progressão da neoplasia de mama.

O crescimento de células 4T1 nos camundongos transplantados demonstrou similaridade quanto aos achados descritos na literatura considerando a concentração de células inoculadas, demonstrando consistência com o modelo tumoral proposto (Zhang, L. *et al.,* 2016; Zhang, Y. *et al.,* 2012; Lou, Y. *et al.,* 2011; Hu, G. *et al.,* 2015; Ito, K. *et al.,* 2011). Foi observado ao longo dos períodos avaliados, um contínuo

aumento do volume e peso tumoral nos animais, em destaque ao período de 28 dias. Há que destacar, porém, que a concentração de células 4T1 está associada a diferentes dinâmicas de crescimento tumoral. Segundo trabalho realizado por Gregório, A.C. *et al.,* 2016, foi observado que tumores iniciados a partir da injeção de $5x10^4$ e $1x10^6$ células cresceram em taxa aproximadamente 2 e 3 vezes mais rápida, respectivamente, em relação aqueles iniciados com 2000 e 500 células 4T1. Uma vez que o presente trabalho procurou avaliar a variação de subpopulações de linfócitos B nos períodos de 7, 14 e 28 dias em diferentes tecidos, o transplante de um baixo número de células poderia comprometer as análises posteriores, em específico em relação a extração e caracterização de linfócitos B intratumorais nos períodos de 7 e 14 dias. De acordo com Gregório, A.C. *et al.,* 2016, através da palpação do local de inoculação, o tumor só foi detectado após 16 e 17 dias após o transplante de 2000 e 500 células 4T1, respectivamente. Contrariamente, animais inoculados com $1x10^6$ e $5x10^4$ tiveram tumores detectados apenas 4 e 8 dias após transplante, respectivamente.

A análise visual e quantitativa do baço demonstrou que a formação e crescimento do tumor de mama nos animais transplantados possui plena capacidade de influenciar na morfologia e constituição celular do órgão. Apesar de quadros de esplenomegalia serem considerados achados clínicos raros em pacientes portadores de câncer de mama e estarem relacionados a formação de sítios de metástase, o aumento do baço é um achado característico para o modelo 4T1 (Lype, S., Akbar, M.A., Krishna, G., 2002; Fadli, M.E.L. *et al.,* 2017). Ao contrário do que havia sido pensado, cuja progressão tumoral acarretaria na expansão de linfócitos B devido o reconhecimento de antígenos tumorais, o contínuo aumento do órgão juntamente a elevação na contagem de leucócitos totais, não aparenta estar relacionado com a elevação do compartimento de linfócitos B, mas, pelo contrário, devido a aumento de outras populações de leucócitos.

Estudos realizados nos últimos anos verificaram que o quadro de esplenomegalia no modelo 4T1 está intimamente associado a reação leucemóide provocada pela presença das células tumorais e ação de fatores solúveis secretados. Estes estimulam a hiperplasia de precursores mielóides na medula óssea e contínua infiltração por granulócitos imaturos e maduros no baço (Kano, A., 2015). A sucessiva migração destas células provoca mudança significativa no microambiente esplênico, contribuindo para adoção de um perfil eritropoiético, de forma a estimular a expansão

e diferenciação de progenitores eritrocitários que, em última instância, contribuem para o crescimento da massa tumoral através do maior aporte de oxigênio (duPre, S.A., Kenneth, W., Hunter, J., 2007; Le, H.K. *et al.,* 2009). Dentre os fatores sintetizados por células 4T1, se destaca o fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), que além de causar supressão da atividade eritropoética na medula óssea, está estreitamente associado a supressão da linfopoese (Liu, M. *et al.,* 2015; Winkler, I.G. *et al.,* 2013).

De acordo com estudos realizados por Day, R.B. *et al.,* 2015, o tratamento de camundongos com G-CSF foi capaz de suprimir de forma significativa diferentes estágios de maturação de linfócitos B na medula óssea. Ainda que se trate de outro órgão, acredita-se que G-CSF tenha capacidade de causar supressão no compartimento de células B do baço. Estudo conduzido por Yan, J. *et al.,* 2016 reforça tal hipótese, haja vista que foi observado diminuição de células B no baço de camundongos tratados com G-CSF. Além disso, conforme observado no estudo de duPre, S.A., Kenneth, W., Hunter, J., 2007, após a implantação de células 4T1, o contínuo aumento de granulócitos e diminuição de linfócitos no órgão foi visto junto a um sucessivo aumento nas concentrações sanguíneas de G-CSF. Zheng, K. *et al.,* 2017, utilizando os mesmos intervalos temporais, constatou decréscimo contínuo na frequência de linfócitos B no sangue periférico de animais transplantados com células 4T1. Apesar disso, em estudo recente conduzido por Ravindranathan, S. *et al.,* 2018, a ablação do gene G-CSF em células 4T1 - através da técnica de CRISPR/Cas9 - não acarretou em mudança significativa quanto ao número de linfócitos B no baço cerca de 21 dias após inoculação de $1x10^6$ células de adenocarcinoma modificadas, levantando questionamento quanto ao real papel da citocina supracitada sob diferentes subpopulações de células B.

Capacitadas a estimular a sobrevivência, proliferação, diferenciação e funcionamento de neutrófilos assim como precursores, estudos realizados nos últimos anos atestaram que G-CSF possui papéis imunomodulatórios importantes e que podem contribuir com a expansão da massa tumoral, influenciando não somente a maturação de linfócitos B, mas, também, alterando a atividade de outros componentes do sistema imunológico. Hollmén, M. *et al.,* 2016, reportou que a citocina foi capaz de gerar macrófagos associados ao tumor (TAMs) em pacientes e modelos animais. Kowanetz, M. *et al.,* 2010, verificou que dentre os fatores secretados por células 4T1, G-CSF foi um dos obteve correlação positiva com habilidade de metástase. Níveis

elevados da citocina são observados para tumores de mama triplo-negativo em relação a outros subtipos moleculares, ademais, a elevação da citocina está associado a prognóstico ruim em pacientes TNBC (Mouchemore, K.A., Anderson, R.L., Hamiton, J.A., 2017).

Levando em consideração a capacidade de linfócitos B de produzir anticorpos contra antígenos tumorais, assim como modular a resposta imune a partir da interação com outras células ou mesmo eliminar diretamente células tumorais (Yuen, G.J., Demissie, E., Pillai, S., 2016), levanta-se a hipótese que clones tumorais capazes de suprimir a expansão e ativação de linfócitos B são selecionados e continuem a replicar no microambiente tumoral. Apesar de no presente trabalho ter sido observado aumento em período inicial de linfócitos B, é visível a existência de uma tendência de diminuição neste compartimento no período de 28 dias. Além disso, quando observadas as subpopulações de linfócitos B, é verificado que todas apresentam queda significativa no período tardio do desenvolvimento tumoral, dados estes que corroboram com achados obtidos nos estudos anteriormente mencionados e demonstram que células 4T1 possuem capacidade de influenciar diferentes subpopulações de linfócitos B presentes no baço através de mecanismos que permanecem por ser melhor elucidados.

Ao contrário do baço, órgão que possui localização restrita no corpo de humanos e demais animais, estando relacionado ao estabelecimento de resposta imune contra antígenos que surgem na circulação sanguínea, linfonodos encontram-se amplamente distribuídos, possuindo papel essencial na manutenção de resposta imune local e sistêmica. Responsáveis pela drenagem de fluido intersticial e antígenos nas imediações de células tumorais, linfonodos tumorais drenantes (TDLN) estão entre as primeiras estruturas a reconhecer a presença de células cancerígenas, servindo como importante indicador prognóstico e critério para avaliar respostas terapêuticas utilizadas (Zuckerman, N.S. *et al.,* 2013; Zhang, Z. *et al.,* 2013).

Apesar de compartilhar estruturas e funções, o linfonodo tende a responder a presença e sucessiva multiplicação de células 4T1 de forma mais aguda em relação ao baço, sendo visualizado e quantificado aumento significativo dos linfonodos inguinais coletadas apenas 7 dias após o transplante de células de adenocarcinoma 4T1. Especificamente, foi verificado que após uma semana, o linfonodo inguinal dos animais pertencentes ao grupo tumor dobrou de área em relação ao linfonodo dos animais do grupo controle inoculados com solução PBS. Ainda que tenham sido

utilizados outras métricas, estudos utilizando o mesmo modelo do presente trabalho também observaram elevação no órgão (Commerford, C.D. *et al.,* 2018; Gu, Y. *et al.,* 2019).

Diferentemente do baço, foi detectado elevação na frequência do compartimento de células B em conjunto a elevação de leucócitos totais, relevando que diferentes mecanismos possivelmente atuam nos dois órgãos em função da expansão da massa tumoral. Apesar de em condições não patológicas o número de linfócitos B naïve permanecer constante (J.G. Fox. *et al.,* 2007), acredita-se que o reconhecimento de numerosos antígenos tumorais por parte de diferentes clones de linfócitos B presente nos linfonodos possa acarretar em alteração numérica de tal população. Neste ponto é interessante notar que o aumento detectado no compartimento de células B naïve – ao contrário dos achados para o baço – pode ter contribuído para o aumento do número de leucócitos no linfonodo, uma vez que a população em questão é numericamente maior que as demais subpopulações analisadas no atual trabalho.

A partir do reconhecimento antigênico, linfócitos B naïve passam por expansão clonal, podendo se diferenciar em células efetoras, tais como plasmablastos e plasmócitos, ou ainda em linfócitos B de Memória ou Regulatórios, que produzem anticorpos altamente específicos durante segundo momento de exposição a determinado patógeno e na modulação da resposta imune, respectivamente. É notável destacar que o aumento de linfócitos B naïve não acarretou necessariamente no aumento de outros estágios de diferenciação de linfócitos B. Conforme verificado a partir dos resultados, não foram constatadas alterações significativas nas frequências nas populações de plasmablastos. Apesar disso, ao avaliar o número absoluto, é possível verificar uma tendência na elevação de plasmablastos no período inicial e tardio do desenvolvimento tumoral, excetuando-se o período de 14 dias. Ainda que estes achados demonstrem uma potencial ativação do compartimento de células B, acarretando na diferenciação em plasmablastos, nenhuma alteração foi observada em relação a plasmócitos. Embora a produção de anticorpos a partir de plasmócitos possa estar associada ao estabelecimento de resposta imunológica contra antígenos tumorais, Gu, Y. *et al.,* 2019, verificou a presença de anticorpos patogênicos nos linfonodos drenantes de animais transplantados com células 4T1. Os anticorpos direcionados a proteína de membrana glicosilada HSPA4 foram capazes de ativar o eixo CXCR4/SDF1alfa, eixo este intimamente associado ao estabelecimento de

metástase. Os achados levantem o questionamento acerca do real papel de anticorpos produzidos em face a presença do tumor.

Ainda que tenham sido verificadas alteração de células B de memória em ambos os órgãos linfoides secundários, sendo constatado uma tendência de elevação no linfonodo, achado este oposto ao observado para o baço, os marcadores utilizados põem em questionamento se população estudada no presente trabalho pode de fato ser considerada de memória. Apesar de número crescente de publicações utilizarem a molécula de CD80 para delimitação de populações de linfócitos B de memória, cuja função é prover co-estimulação necessário para ativação e sobrevivência de linfócitos T; outras moléculas - em destaque CD73 e PD-L2 - são utilizadas em conjunto, de forma que a utilização isolada de CD80 pode levar a interpretação errônea quanto a população encontrada, haja vista que proteína em questão é vista em células dendríticas e monócitos (Tomayko, M.M. *et al*., 2010; Catania-Zuccarino, G.V. *et al.,* 2014; Jones, D.D., Wilmore, J.R., Allman, D., 2015). Similarmente, CD62L - molécula de adesão, é expressa constitutivamente em diferentes tipos de leucócitos, sendo frequentemente utilizada no estudo de populações de linfócitos T (Miyasaka, M., 1998). Levando em consideração estes aspectos, não é possível confirmar que as células observadas nos diferentes tecidos analisados sejam de fato população de linfócitos B de memória.

Linfócitos B que possuem atividade regulatória tem sido verificado em modelos tumorais (Ganti, S.N. *et al.,* 2015). Os efeitos imunossupressivos exercido por estas células tem sido associado a secreção de IL-10 e TGF-beta, assim como na geração de linfócitos T regulatórios (Olkhanud, P.B. *et al.,* 2011). Apesar disso, pouco se sabe sobre a dinâmica de células B regulatórias nas neoplasias malignas de mama. O trabalho atual verificou que há uma propensão ao aumento de linfócitos B regulatórios no linfonodo drenante nos animais transplantados com células 4T1, ainda que a análise estatística não tenha detectado alterações significativas relacionadas a frequência da população de linfócitos B em questão. Apesar de crescente o número de publicações abordando diferentes fenótipos e características da população regulatória (Sarvaria, A., Madrigal, J.A., Saudemont, A., 2017; Zhang, Y., Gallastegui, N., Rosenblatt, J.D., 2015), o baixo número de publicações acerca de tais populações nas neoplasias malignas de mama limita a comparação com os dados obtidos no trabalho. Mehdipour, F. *et al.,* 2016, analisando diferentes subtipos de linfócitos B em linfonodos de pacientes portadores de câncer de mama, observou elevação no

compartimento de células CD5+ CD1d+ - um dos variados fenótipos caracterizados como linfócito B regulatório – em linfonodos não metastáticos. Utilizando modelo murino de melanoma, Ganti, S.N. *et al.,* 2015, foi verificado a presença de linfócitos B regulatórios nos linfonodos drenantes dos animais inoculados. Maglioco, A., *et al*., 2013, em modelo de câncer de pele averiguou linfócitos B presentes nos linfonodos drenantes apresentaram expressão aumentada de moléculas com propriedades imunossupressoras, tais como IL-10, FASL e Granzima B. Ainda se tratando de diferentes neoplasias, acredita-se que células B regulatórias presentes nos linfonodos de pacientes portadores do câncer de mama possam contribuir para o progresso da doença, ainda assim novos estudos se fazem necessário.

Nos recentes anos, crescente tem sido o interesse na melhor compreensão do papel, assim como os mecanismos exercidos por linfócitos B nos infiltrados tumorais. Além de confirmar achados descritos na literatura acerca da elevada taxa de crescimento e expansão de células de adenocarcinoma de mama 4T1 em modelo *in vivo*, o atual trabalho demonstrou que diferentes populações de células B estão presentes no microambiente tumoral e que há variação destas no decorrer do desenvolvimento tumoral. Foi constatado que, apesar do crescimento tumoral acarretar em elevação na contagem do número de leucócitos - em especial para o período de 28 dias, não foi verificado aumento continuo no compartimento de linfócitos CD19+ B220+, pelo contrário, a tendência de aumento neste compartimento observada nas duas semanas é cessada, sendo verificado um decréscimo no último período avaliado.

Ainda que análise estatística não tenha apontado diferença significativa, observamos que a presença de linfócitos B naïve no tumor tende a diminuir com a progressão tumoral, de maneira que este decréscimo possa estar atrelado a contínua diferenciação destas células em outros subtipos que, em última instância, podem exercer papéis pró ou antitumorais. Uma vez reconhecida a capacidade de células tumorais em escapar ou manipular mecanismos de células do sistema imune afim de promover seu crescimento e levando em consideração que a implantação de células 4T1 ocasionou em sucessiva expansão da massa tumoral, especula-se que, apesar da presença de linfócitos B capazes de combater células tumorais, há um predomínio de ações imunossupressoras – efetivada por diferentes componentes celulares - que impedem a eliminação eficiente das células tumorais.

Aumento expressivo na população de plasmócitos tumorais foi observado ao longo do desenvolvimento tumoral, achado este que pode levanta a hipótese de contínua infiltração ou diferenciação de linfócitos B locais em células capazes de produzir anticorpos contra antígenos tumorais. Yeong, J. *et al.,* 2018, analisando amostras tumorais triplo-negativas de mama, observou que aqueles que apresentaram níveis mais elevados de plasmócitos e maior expressão de genes de imunoglobulinas, estiveram correlacionadas a maior período de tempo livre da doença e melhor prognóstico, respectivamente. Achados similares foram verificados em estudo conduzido por McIntire, P. *et al.,* 2018, cuja elevada densidade de plasmócitos foi associado a maior taxa de sobrevivência em pacientes TNBC. Estudos anteriores acerca da especificidade antigênica de infiltrados linfocitários sugeriram que células B presentes no microambiente tumoral passam pelo processo de hipermutação somática e maturação de afinidade *in situ* (Coronella, J.A. *et al.,* 2002; Nzula, S., Going, J.J., Stott, D.I., 2003). Em estudo recente conduzido por Garaud, S. *et al.,* 2018, a partir da comparação de anticorpos detectados no tumor e plasma de pacientes de câncer de mama foi observado que menos da metade dos pacientes tiveram anticorpos contra o mesmo antígeno tanto no plasma quanto no tecido tumoral, resultados que reforçam a hipótese da produção de anticorpos por plasmócitos *in situ.*

É necessário ressaltar que embora estudos apontem a presença de plasmócitos como fator prognóstico positivo, evidências também sugerem que a presença de plasmócitos podem desempenhar ações que contribuam para o crescimento tumoral (Shen, M., Wang, J., Ren, X., 2018). Wei, H. *et al.,* 2016, analisando amostras tumores de mama através de técnica de imunohistoquímica averiguou que amostras com predomínio de plasmócitos foram - de maneira inesperada – associados a pior taxa de sobrevivência. Embora os achados de Gu, Y. *et al.,* 2019 tenham sido constatados no linfonodo drenante, a partir dos dados expostos pelo autor levantamos a hipótese da existência de perfis similares de plasmócitos, assim como de anticorpos, no microambiente tumoral que contribuam para expansão da massa tumoral. Ainda assim, é imprescindível dizer que, apesar do presente trabalho ter constatado aumento de plasmócitos a partir do processamento tumoral, não foi possível caracterizar os papéis desempenhados por esta população, aspecto este que limita as conclusões em relação ao papel desempenhado por esta população celular em função do crescimento de células 4T1.

Ainda que tenham sido reconhecidos diferentes fenótipos de linfócitos B regulatórios em humanos e animais ao longo dos últimos anos, é observado que parcela majoritária secreta IL-10 (Sarvaria, A., Madrigal, J.A., Saudemont, A., 2017; Zhang, Y., Gallastegui, N., Rosenblatt, J.D., 2015). Levando em consideração tal característica o presente trabalho procurou avaliar linfócitos B regulatórios a partir da expressão de CD19 e IL-10. Apesar dos resultados não terem revelado diferença significativa entre os períodos analisados, ainda assim é possível visualizar uma tendência de aumento no decorrer do desenvolvimento tumoral, levantando a hipótese que estas células sejam importantes para a contínua replicação de células cancerígenas no modelo estudado.

Apesar de detectadas em baixíssima frequência (<1~2%), linfócitos B regulatórios são capazes de influenciar numerosas células do sistema imune. A partir da síntese e secreção de citocinas como IL-10, IL-35, TGF-beta, além de ligantes como PD-L1, esta população de linfócitos estimula células cujas ações são imunossupressoras (de Veen, W.V. *et al.,* 2016). Zhang, Y. *et al.,* 2016 levantou a hipótese de que células cancerígenas de mama são capazes de induzir transformação de linfócitos B naïve em células B regulatórias a partir de fatores secretados. De acordo com o estudo foi verificado que o co-cultivo de células EMT-6 junto a linfócitos B naïve foi capaz de gerar células com fenótipo similar ao de células regulatórias encontradas em modelo *in vivo*. Além disso, foi verificado que ambas as células possuíam capacidade de suprimir a proliferação de células CD4+, CD8+. Em outra publicação do mesmo autor, foi verificado que células B regulatórias promovem o crescimento tumoral através do recrutamento de linfócitos T regulatórios que, por sua vez, suprimem atividade citotóxica mediada por células T contra células de câncer de mama EMT-6, além de reduzirem a infiltração por linfócitos CD8+ e células NK (Zhang, Y. *et al.,* 2013). Achados similares e que reforçam a importância do papel de células B regulatórias no microambiente tumoral foi observado no estudo de Olkhanud, P.B. *et al.*, 2011, em que foi verificado que linfócitos B regulatórios surgidos a partir da estimulação por células 4T1 contribuíram para o desenvolvimento de metástase pulmonar. Além disso, de maneira semelhante aos achados de Zhang, Y. *et al.*, 2013, foi observado que estas células foram aptas a suprimir a proliferação de linfócitos T e induzir a conversão de células naïve CD4+ em linfócitos T regulatórios.

O possível benefício terapêutico a partir da depleção de linfócitos B afim de combater o crescimento tumoral tem sido debatido. A partir do uso de diferentes

modelos animais, tem sido evidenciado que células B exercem papel importante na progressão tumoral. Conforme observado por diferentes autores (Tabela 6), a ausência de linfócitos B acarretou numa diminuição significativa na taxa de crescimento tumoral. De acordo com hipótese levantada pelos autores, a ausência de linfócitos B e, por consequência, de linfócitos B regulatório no microambiente tumoral, assim como nos órgãos linfoides secundários, permite a atuação mais eficaz de linfócitos TCD4+, TCD8+, assim como outras células do sistema. Reforçando tal hipótese, foi observado que a transferência de linfócitos B e/ou B regulatórios foi capaz de retomar o crescimento tumoral nos animais transplantados.

Apesar de camundongos *knockout* para linfócitos B demonstrarem menor susceptibilidade ao crescimento tumoral, a depleção de linfócitos B a partir do uso de anticorpo monoclonal anti-CD20 não resulta em diminuição significativa na taxa de crescimento do tumor (Zhang, Y. *et al.*, 2013). Bodogai, M. *et al.,* 2013 verificaro que a depleção de linfócitos B por anticorpos anti-CD20 antes do transplante de células 4T1 foi capaz de diminuir o número de metástases pulmonares. Similarmente, Gu, Y. *et al.,* 2019, verificou que o *knockout* de linfócitos B e administração de anti-CD20 foi capaz de reduzir o número de metástases nos animais, quadro este que foi revertido pela administração de anticorpos IgG patogênicos. Apesar disso, paradoxalmente, Bodogai, M. *et al.,* 2013 observou que a administração de anti-CD20 em camundongos com tumores já estabelecidos resultou em crescimento tumoral massivo. De acordo com os autores, acredita-se que, embora o uso de anti-CD20 seja capaz de eliminar populações de linfócitos B, diferentes fenótipos de células B regulatórias permanecem vivas e atuantes.

Autor	Modelo	Tipo de Deficiência	Resposta
Tadmor, T. *et al.,* 2011	EMT-6 BALB/c	Camundongo com depleção genética de Células B	Inibição significativa do crescimento tumoral. Diminuição no número de linfócitos T regulatórios no baço, linfonodo drenante e intratumoral.

Bodogai, M. *et al.,* 2013	4T1 Jh *knockout*	Camundongo com deleção do segmento J do locus da cadeia pesada	Diminuição significativa do crescimento tumoral. Diminuição do número de metástase pulmonar.
Zhang, Y. *et al.,* 2013	EMT-6 BALB/c	Camundongo com depleção genética de Células B	Diminuição na taxa de crescimento tumoral. Elevação no número de linfócitos T e NK. Elevação de resposta Th1 e diminuição de linfócitos T regulatórios.
Gu, Y. *et al.,* 2019	4T1 BALB/c	Camundongo com *knockout* da cadeia pesada. Camundongos tratados com anti-CD20.	Maior taxa de sobrevivência dos animais. Diminuição no número de metástases. Tratamento com anti CD-20 diminui número de metástases.

Tabela 7. Depleção de linfócitos B em diferentes modelos murinos de câncer de mama.

Embora diferentes populações de linfócitos tenham sido detectadas nos distintos compartimentos em função ao desenvolvimento tumoral, é perceptível que células extraídas do baço, linfonodo e tumor obtiverem viabilidade celular diferenciadas, achado este possivelmente associado aos procedimentos empregados na dissociação dos tecidos. Ao contrário do baço e linfonodo, o adenocarcinoma mamário 4T1 apresenta proliferação epitelial acentuada, formando uma massa tecidual densa que requer a disrupção mecânica e o uso de enzimas digestivas para que sejam extraídas as células mononucleadas infiltrantes, passos estes responsáveis por causar maior estresse às células e tornando-as mais susceptíveis a apoptose ou necrose.

Conforme observado na seção de resultados, embora número considerável de linfócitos B tenha sido verificado, o número absoluto das populações de linfócitos B regulatórias foi notavelmente baixo. Apesar de não invalidar os resultados obtidos, o baixo número de células B regulatórias intratumorais impede o estabelecimento de

maiores inferências acerca da população. Ainda que seja reconhecido que células B regulatórias sejam populações relativamente raras, acreditamos que a baixa viabilidade também tenha influenciado no número deste perfil celular. Interessante ressaltar que mesmo o uso de *pool* de células extraídas a partir de três tumores não foi suficiente para a geração de número satisfatório para este fenótipo celular. Acreditamos que uma das formas de solucionar o problema seja utilizando abordagens mais eficientes no que tange o processamento das amostras tumorais, assim como no aumento do número de amostras utilizadas.

Células cancerígenas 4T1 em crescimento no estroma mamário demonstram plena capacidade de modificar a dinâmica de linfócitos B nos órgãos linfóides secundário e no espaço intratumoral. Embora tenha sido destacado expressiva infiltração por plasmócitos no infiltrado tumoral ao longo do desenvolvimento da neoplasia de mama, os papéis desempenhados por estas células, assim como dos anticorpos presentes no local, permanecem por ser melhor elucidados. Acreditamos que a melhor compreensão dos mecanismos moleculares empregados por células adenocarcinomatosas 4T1 na modificação funcional de linfócitos B possam auxiliar no entendimento da progressão do câncer de mama, assim como ampliar possíveis e potencialmente novas abordagens terapêuticas que visam o acompanhamento e tratamento da doença.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

O contínuo e expressivo crescimento de células de adenocarcinoma mamário murino 4T1 em camundongos BALB/c acarretou em aumento dos órgãos linfoides secundários, sendo observado tendência de diminuição de linfócitos B no baço ao passo que no linfonodo foi verificado elevação para esta população. Além disso, é destacado a elevação considerável na população de plasmócitos intratumorais.

SUMÁRIO

7. SUMÁRIO

O modelo de células de adenocarcinoma de mama murino 4T1 apresenta boa reprodutibilidade e fácil estabelecimento, de forma a ser detectado crescimento das células em todos os animais transplantados.

A elevada taxa de crescimento, assim como o contínuo aumento do volume e peso tumoral está de acordo com dados descritos na literatura para o modelo e concentração utilizada.

Diferentes fenótipos do compartimento de linfócitos B presente no baço, linfonodo inguinal e tumor reagem de maneira distinta ante a presença e replicação de células 4T1.

O contínuo aumento do baço e número de células totais aparenta não ter relação com a alteração no compartimento de linfócitos B. Pelo contrário, foi verificado queda em todas as subpopulações analisadas para o período de 28 dias.

Aumento do linfonodo inguinal junto a elevação de linfócitos B, ainda que não tenha sido condicionado aumento em todas as subpopulações analisadas.

Elevação da presença de linfócitos B CD19+ B220+ até segunda semana, seguido de aumento de populações CD19- B220-. Sendo destacado a progressiva e massiva presença de plasmócitos.

Constatação da presença de diferentes fenótipos CD19+ B220+ no ambiente intratumoral, embora em baixo número.

PERSPECTIVAS

8. PERSPECTIVAS

Propor novos formas de processamento tumoral em função dos diferentes períodos de crescimento;

Avaliar diferentes fenótipos de plasmócitos e linfócitos B regulatórios presentes no infiltrado tumoral;

Isolar e sequenciar região variável de anticorpos produzidos por plasmócitos intratumorais.

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., PILLAI, S. Imunologia celular e molecular. ed.7. Rio de Janeiro – RJ: Elsevier.

ACS. American Cancer Society. Breast Cancer: Facts & Figures 2017-2018. Disponível em: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/breast-cancer-facts-and-figures/breast-cancer-facts-and-figures-2017-2018.pdf>. Acesso em: 14/07/2018.

AL-MAHMOOD, S. et al. Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. Drug Delivery and Translational Research. v.8. n.5. p1483-1507. 2018.

AMIN, M.B. et al. AJCC Cancer Staging Manual. ed.8. Basileia: Springer International Publishing, 2018.

ANDERS, C.K., CAREY, L.A. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. Clinical Breast Cancer. v.9. p2-19. 2009.

ANTONIOU, A. et al. Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Dectected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. American Journal of Human Genetics. v.72. ed.5. p1117-1130. 2003.

ATAOLLAHI, M.R. et al. Breast cancer and associated factors: a review. Journal of Medicine and Life. v.8. ed.4. p6-11. 2015.

BASTIEN, R.R. et al. PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. BMC Medical Genomics. v.4. p1-12. 2012.

BEATTY, G.L., GLADNEY, W.L. Immune escape mechanism as a guide for cancer immunotherapy. Clinical Cancer Research. v.21 ed.4. p687-692. 2015.

BENSE, R.D. et al. Relevance of Tumor-infiltrating immune cell composition and functionality for disease outcome in breast cancer. Journal of National Cancer Institute. v.109. ed.1. 2017.

BERTOS, N.R., PARK, M. Breast cancer – one term, many entities. The Journal of Clinical Investigation. v.121. ed.10. 2011.

BIANCHINI, G. et al. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. Nature. v.13. p674-690. 2016.

BLAIR, P.A. et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. Immunology. v.32. p129-140. 2010.

BODOGAI, M. et al. Anti-CD20 antibody promotes cancer escape via enrichment of tumor-evoked regulatory B cells expressing low levels of CD20 and CD137L. Cancer Research. v.73. ed.7. 2013.

BOMBONATI, A., SGROI, D.C. The molecular pathology of Breast Cancer Progression. Journal of Pathology. v.233. ed.2. p307-317. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA. Câncer de mama – fatores de risco. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/outubro-rosa/2015/fatores-de-risco.asp>. Acesso em: 14/07/2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA. Casos Brasil Consolidado. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-brasil-consolidado.asp>. Acesso em: 14/07/2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA. Detecção Precoce – Câncer de Mama. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>. Acesso em: 14/07/2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA. Estimativas Brasil – 2018. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp>. Acesso em: 14/07/2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA. Taxa de mortalidade: câncer de mama. Disponível em: <http://https//mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo04/consultar.xhtml#panelResultado>. Acesso em: 14/07/2018.

BURSTEIN, H.J. et al. Ductal carcinoma in situ of the breast. The New England Journal of Medicine. v.350. ed.14. p1430-41. 2004.

BURSTEIN, M.D. et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. Clinical Cancer Research. v.21. n.7. p1688-1698. 2015.

CALEY, M.P., MARTINS, V.L.C., O'TOOLE, E.A. Metalloproteinases and Wound Healing. Advances in Wound Care. v.4. n.4. p225-234. 2015.

CAMARA, N.S.O., LEPIQUE, A.P., BASSO, A.S. Lymphocyte differentiation and effector functions. Clinical and Developmental Immunology. v.12. 2012.

CARIDADE, M., GRACA, L., RIBEIRO, R.M. Mechanisms underlying CD4+ Treg immune regulation in the adult: from experiments to models. v.4. 2013.

CECIL, D.L. et al. Vaccine targeting antigens associated with cancer stem cells/epithelial to mesenchymal transition inhibits triple negative breast cancer growth. The Journal of Immunology. v.200. n.1. 2018.

CECILIO, A.P. et al. Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. Breast Cancer: Targets and Therapy. v.7. p43-49. 2015.

CHAO, J.L., SAVAGE, P.A. Unlocking the complexities of tumor-associated regulatory T cells. The Journal of Immunology. v.200. ed.2. p415-421. 2018.

CHAVEZ, K.J., GARIMELLA, S.V., LIPKOWITZ, S. Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. Breast Disease. v.32. n.1. p35-48. 2010.

CHEN, C. et al. Circulating antibodies to p16 protein-derived peptides in breast cancer. Molecular and Clinical Oncology. v.3. ed.3. p591-594. 2015.

CORONELLA, J.A. et al. Antigen-driven oligoclonal expansion of tumor-infiltrating B cells in infiltrating ductal carcinoma of the breast. The Journal of Immunology. v.169. ed.4. p1829-1836. 2002.

COYLE, Y.M. The effect of environment on breast cancer risk. Breast Cancer Research and Treatment. ed.84, p273-288. 2004

CRETNEY, E., KALLIES, A., NUTT, S.L. Differentiation and function of Foxp3(+) effector regulatory T cells. Trends in Immunology. v.34. ed.2. p74-80. 2013.

CROFT, M. et al. Regulation of T Cell Immunity by OX40 and OX40L. Madame Curie Bioscience Database. Austin, Texas: Landes Bioscience. 2000-2013.

CROSBY, E.J. et al. Complimentary mechanisms of dual checkpoint blockade expand unique T-cell repertoires and activate adaptive anti-tumor immunity in triple-negative breast tumors. OncoImmunology. v.7. n.5. p1-16. 2018.

CRUK. Cancer Research UK. Breast cancer survival statistics. Disponível em: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/breast-cancer/survival#ref-3>. Acesso em: 14/07/2018.

CURTIS, C. et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2000 breast tumours reveals novel subgroups. Nature. v.486. p346-352. 2012.

DAY, C., MERLINO, G., DYKE, T.V. Preclinical mouse cancer models: a maze of opportunities and challenges. Cell. v.163. n.1. p39-53. 2015.

DAY, R.B. et al. Granulocyte colony-stimulating factor reprograms bone marrow stromal cells to actively suppress B lymphoiesis in mice. Blood. v.125. ed.20. p3114-3117. 2015.

DE LARCO, J.E., WUERTZ, B.R.K., FURTCHT, L.T. The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukn-8. Clinical Cancer Research. v.10. ed.15. p4895-4900. 2004.

DE MINGO PULIDO, A. et al. TIM-3 regulates CD103+ dendritic cell function and response chemotherapy in breast cancer. Cancer Cell. v.33. ed.1. p60-74. 2018.

DE VEEN, W.V. et al. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. v.138. ed.3. p654-665. 2016.

DENKERT, C. Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. The Lancet Oncology. v.19. ed.1. p40-50. 2018.

DESANTIS, C.E. et al. Breast cancer statistics, 2015: convergence of incidence rates between black and white women. CA: A Cancer Journal for Clinicians. v.66. n.1. p31-42. 2016.

DEXTER, D.L. et al. Heterogeneity of Tumor Cells from a Single Mouse Mammary Tumor. Cancer Research. v.38. p3174-3181. 1978.

DONGLAI, L. et al. Three-dimensional cell culture: A powerful tool in tumor research and drug discovery. Oncology Letters. v.14. ed.6. p6999-7010. 2013.

DUPRE, S.A., KENNETH, W., HUNTER, J. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. Experimental and Molecular Pathology. v.82. ed.1. p12-24. 2007.

DeNARDO. D.G., COUSSENS, L.M. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. Breast Cancer Research. v.9. 2007.

EISENBERG, A.L.A., PINTO, I.V., KOIFMAN, S. Triple-negative breast cancer in Brazilian women without metastasis to axillary lymph nodes: Ten-year survival and prognostic factors. British Journal of Medicine & Medical Research. v.3. n.4. p880-896. 2013.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention – CDC. How is breast cancer diagnosed. Disonível em: <https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/diagnosis.htm>. Acesso em: 14/07/2018.

ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA. National Institutes of Health. Genetics Home Reference. Breast cancer. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/breast-cancer#definition>. Acesso em: 14/07/2018.

FADLI, M.E.L. et al. Breast cancer metastasis to the spleen: a case report and literature review. v.12. 2017.

FILLATREU, S. et al. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. Nature Immunology. v.3. p944-950. 2002.

FITTALL, M.W. et al. The circulating memory B cell compartment of breast cancer patients is depleted in comparison with healthy volunteers. Cancer Immunology Research. v.4. ed.1. 2016.

FOULKES, W.D. Inherited susceptibility to common cancers. The New England Journal of Medicine. v.20. p2143-53. 2008.

FOULKES, W.D., SMITH, I.E., REIS-FILHO, J.S. Triple-negative breast cancer. The New England Journal of Medicine. v.363. n.20. 2010.

FOX, J.G. et al. The mouse in biomedical research. v.4. ed.2. Elsevier.

GANTI, S.N. et al. Regulatory B cells preferentially accumulate in tumor-draining lymph nodes and promote tumor growth. Scientific Reports. v.5. ed.12255. 2015.

GARAUD, S. et al. Antigen specificity and clinical significance of IgG and IgA autoantibodies produced in situ by tumor-infiltrating b cells in breast cancer. Frontiers in Immunology. v.9. 2018.

GAUTAM, J. et al. Down-regulation of cathepsin S and matrix metalloproteinase-9 via Src, a non-receptor tyrosine kinase, suppresses triple-negative breast cancer growth and metastasis. Experimental & Molecular Medicine. v.50. n.118. 2018.

GEBREMESKEL, S. et al. Natural Killer T-cell immunotherapy in combination with chemotherapy-induced immunogenic cell death targets metastatic breast cancer. Cancer Immunology Research. v.5. n.12. p1086-1097. 2017.

GOUDIN, N. et al. Depletion of regulatory T cells induces high numbers of dendritic cells and unmasks a subset of anti-tumor CD8+ CD11c+ PD-1lo effector T cells. PLOS One. v.11. n.6. 2016.

GREGÓRIO, A.C. et al. Inoculated cell density as a determinant factor of the growth dynamics and metastatic efficiency of a breast cancer murine model. v.11. ed.11. 2016.

GRETCHEN, G.L., BURKE, A., ANDERSON, W.F. Epidemiology of triple negative breast cancers. Breast Disease. v.32. p5-24. 2010.

GU, Y. *et al.* Tumor-educated B cells selectively promote breast cancer lymph node metastasis by HSPA4-targeting IgG. v.25. p312-322. 2019.

GU-TRANTIEN, C. et al. CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. The Journal of Clinical Investigation. v.123. ed.7. 2013.

GUAN, H. et al. PD-L1 is a critical mediator of regulatory B cells and T cells in invasive breast cancer. Scientific Reports. v.6. 2016.

GUNGOR, N. et al. Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. Mutagenesis. v.25. ed.2. p149-154. 2010.

GUO, M.L. et al. Proteomic analysis of the effects of cell culture density on the metastasis of breast cancer cells. v.37. ed.2. p72-83. 2019.

GWAK, J.M. et al. Prognostic value of tumor-associated macrohages according to histologic locations and hormone receptor status in breast cancer. Plos One. v.10. n.4. p1-14. 2015.

GÓMEZ-CUADRADO, L. et al. Mouse models of metastasis: progress and prospects. Disease Models & Mechanisms. v.10. p1061-1074. 2017.

HANSEN, M.H., NIELSEN, H., DITZEL, H.J. The tumor-infiltrating B cell response in medullary breast cancer is oligoclonal and directed against the autoantigen actin exposed on the surface of apoptotic cancer cells. PNAS: Medical Sciences. v.98. ed.22. 2001.

HE, Y. et al. The roles of regulatory B cells in cancer. Journal of Immunology Research. v.2014. 2014.

HOLEN, I. et al. In vivo models in breast cancer research: progress, challenges and future directions. Disease Models & Mechnisms. v.10. ed.4. p359-371. 2017.

HOLLERN, D.P., ANDRECHEK, E.R. A genomic analysis of mouse models of breast cancer reveals molecular features of mouse models and relationships to human breast cancer. Breast Cancer Research. v.16. n.3. 2014.

HOLLMÉN, M. et al. G-CSF regulates macrophage phenotype and associates with poor overall survival in human triple-negative breast cancer. Oncoimmunology. v.5. 2016.

HONEGGER, P. Overview of cell and tissue culture techniques. Current Protocolos in Pharmacology. Chapter 12: Unit 12.1. 2001.

HORIKAWA, M. et al. Regulatory B cell (B10 cell) expansion during Listeria infection governs innate and cellular immune responses in mice. Journal of Immunology. v.130. ed.3. p1158-1168. 2012.

HOUGHTON, A.N., GUEVARA-PATINO, J.A. Immune recognition of self in immunity against cancer. The Journal of Clinical Investigation. v.114. ed. 4. P468-471. 2004.

HOWLADER, N., NOONE, A.M., KRAPCHO, M. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009. National Cancer Institute. Bethesda. 2012.

HU, G. et al. Peptide mediated active targeting and intelligent particle size reduction-mediated enhanced penetrating of fabricated nanoparticles for triple-negative breast cancer treatment. Oncotarget. v.6. ed.38. 2015.

HUANG, C. et al. Study on mouse model of triple-negative breast cancer: association between higher parity and triple-negative breast cancer. Target Oncology. v.10. n.1. p85-97. 2015.

HUANG, T.H. et al. Prophylactic administration of fucoidan represses cancer metastasis by inhibiting vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinases (MMPs) in Lewis tumor-bearing mice. Marine Drugs. v.13. p1882-1900. 2015.

HUDIS, C.A., GIANNI, L. Triple-negative breast cancer: an unmet medical need. The Oncologist. v.16. p1-11. 2011.

IOACHIM, H.L. The stromal reaction of tumors: an expression of immune surveillance. Journal of the National Cancer Institute. v.57. n.3. p465-475. 1976.

ITO, K. et al. Thiodigalactoside inhibits murine cancers by concurrently blocking effects of galectin-1 on immune dysregulation, angionesis and protection against oxidative stress. Angiogenesis. v.14. 2011.

ITO, T. et al. Class distribution of immunoglobulin-containing plasma cells in the stroma of medullary carcinoma of breast. Breast Cancer Research and Treatment. v.7. ed.2. p97-103. 1986.

IWATA, Y. et al. Characterization of rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. Blood. v.117. ed.2. p530-541. 2011.

JI, R. Lymph nodes and cancer metastasis: new perspectives on the role of intranodal lymphatic sinuses. International Journal of Molecular Sciences. v.18. ed.1. p51. 2017.

JONES, D.D., WILMORE, J.R., ALLMAN, D. Cellular dynamics of memory B cell populations: IgM+ and IgG+ memory B cells persist indefinitely as quiescent cells. The Journal of Immunology. v.195. ed.10. p4753-4759. 2015.

JONULEIT, H., SCHMITT, E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. The Journal of Immmunology. v.171. ed.12. p6323-6327. 2003.

KAKOSCHKY, B. et al. Selective targeting of tumor associated macrophages in different tumor models. PLOS One. v.32. n.2. 2018.

KANO, A. Tumor cell secretion of soluble factor(s) for specific immunosuppression. Scientific Reports. n.8913. 2015.

KATZ, S.I., PARKER, D., TURK, J.L. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. Nature. v.251. p550-551. 1974.

KAUR, P. et al. A mouse model for triple-negative breast cancer tumor-initiating cells (TNBC-TICs) exhibits similar aggressive phenotype to the human disease. BMC Cancer. v.12. p1-12. 2012.

KERSTEN, K. et al. Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. EMBO Molecular Medicine. n.9. v.2. p137-153. 2017.

KIM, G.E. et al. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in different immunohistochemical-based molecular subtypes of breast cancer. BMC Cancer. v.14. 2014.

KING, M. et al. Breast and Ovarian Cancer Risks due to Inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. Science. v.302. 2003.

KOWANETZ, M. et al. Granulocyte-colony stimulating factor promotes lung metastasis through mobilization of Ly6G+Ly6C+ granulocytes. PNAS. v.107. ed.50. 2010.

LE, H.K. et al. Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice. International Immunopharmacology. v.9. ed.7-8. p900-909. 2009.

LEE, B.L. et al. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. Lancet Oncology. v.13. n.3. p95-103. 2012.

LEHMANN, B.D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. The Journal of Clinical Investigation. v.121. n.7. p2750-2767. 2011.

LEHMANN, B.D. et al. Refinement of triple-negative breast cancer molecular subtypes: implications for neoadjuvant chemotherapy selection. Plos One. v.11. n.6. p1-22. 2016.

LEI, Z. et al. Immunocompromised and immunocompetent mouse models for head and neck squamous cell carcinoma. OncoTargets and Therapy. v.9. p545-555. 2016.

LENNER, P. et al. Serum antibodies against p53 in relation to cancer risk and prognosis in breast cancer: a population-based epidemiological study. British Journal of Cancer. v.79. ed.5. p927-932. 1999.

LIAN, C. et al. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor as a potent target for breast cancer therapy. Cancer Biotherapy & Radiopharmaceutics. v.31. ed.3. p85-90. 2016.

LIU, M. et al. Macrophages support splenic erythropoiesis in 4T1 tumor-bearing mice. PLOS One. v.10. ed.3. 2015.

LIU, S. et al. Prognostic significance of FOXP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer depends on estrogen receptor and human epidermal growth factor receptor-2 expression status and concurrent cytotoxic T-cell infiltration. Breast Cancer Research. v.16. ed.5. 2014.

LIU, T. et al. Study of circulating antibodies against cd25 and FOXP3 in breast cancer. Tumor Biology. v.35. ed.4. p3779-3783. 2014.

LIU, Y., CAO, X. The origin and function of tumor-associated macrophages. Cellular & Molecular Immunology. v.12. n1. 2015.

LIU, Y., ZENG, G. Cancer and Innate Immune system interactions: Translational potentials for cancer immunotherapy. Journal of Immunotherapy. v.35. ed.4. p299-308. 2012.

LIU, Z. et al. A comprehensive immunologic portrait of triple-negative breast cancer. Translational Oncology. v.11. ed.2. p311-329. 2018.

LOU, Y. et al. Targeting tumor hypoxia: suppression of breast tumor growth and metastasis by novel carbonic anhydrase IX inhibitors. Cancer Research. v.71. ed.9. 2011.

LUCEY, B.P., NELSON-REES, W.A., HUTCHINS, G.M. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. v.133. ed.9. p1463-1467. 2009.

LYPE, S., AKBAR, M.A., KRISHNA, G. Isolated splenic metastasis from carcinoma of the breast. Postgraduate Medical Journal. v.78. ed.917. 2002.

MAGEE, P.J. et al. R-(+)equol and S-(-)equol inhibit the invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells potentially via the down-regulation of matrix metalloproteinase-2. European Journal of Nutrition. v.53. p345-350. 2014.

MAGLIOCO, A. et al. Regulatory B cells present in lymph nodes draining a murine tumor. Medicina. v.74. p185-188. 2013.

MAKKI, J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. Clinical Medicine Insights: Pathology. v.8. p23-31. 2015.

MALHOTRA, G.K. et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. Cancer Biology & Therapy. v.10. ed.10. p955-960. 2010.

MARRUFO, A.M. et al. Blocking LLT1 (CLEC2D, OCIL)-NKRP1A (CD161) interaction enhances natural killer cell-mediated lysis of triple-negative breast cancer cells. American Journal of Cancer Research. v.8. n.6. p1050-1063. 2018.

MASUDA, H. et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. Clinical Cancer Research. v.19. n.19. p5533-5540. 2013.

MATSUMOTO, H. et al. Increased CD4 and CD8-positive T cell infiltrate signifies good prognosis in a subset of triple-negative breast cancer. v.156. ed.2. p237-247. 2016.

MATSUMOTO, M. et al. Interleukin-10-producing plasmasblasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. Immunity. v.41. p1040-1051. 2014.

MATSUSHITA, T. et al. Regulatory B cells (B10 cells) and Regulatory T cells have independent roles in controlling EAE initiation and late-phase immunopathogenesis. Journal of Immunology. v.185. ed. 4. p2240-2252. 2010.

MAURI, C. et al. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. Journal of Experimental Medicine. v.197. p489-501. 2003.

MCDANIEL, J.R. et al. Identification of tumor-reactive B cells and systemic IgG in breast cancer based on clonal frequency in the sentinel lymph node. Cancer Immunology, Immunotherapy. v.67. ed.5. p729-738. 2018.

MCINTIRE, P. et al. Triple-negative breast cancers (TNBCs) rich in plasma cell have improved prognosis. American Journal of Clinical Pathology. v.149. 2018.

MEDRANO, R.F.V. et al. Immunomodulatory and antitumor effects of type I interferons and their application in cancer therapy. Oncotarget. v.8. p71249-71284. 2017.

MEHDIPOUR, F. et al. Increased B regulatory phenotype in non-metastatic lymph nodes of node-positive breast cancer patients. Scandinavian Journal of Immunology. v.83. ed.3. p195-202. 2016.

MEHRGOU, A., AKOUCHEKIAN, M. The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. Medical Journal of the Islamic Republic of Iran. v.30. p369. 2016.

MEHTA, R.R. et al. Efficacy and mechanism of action of Deguelin in suppressing metastasis of 4T1 cells. Clinical & Experimental Metastasis. v.30. ed.7. 2013.

MILLER, F.R. Tumor subpopulation interactions in metastasis. Invasion Metastasis. v.3. ed.4. p234-42. 1983.

MILLER, F.R., MILLER, B.E., HEPPNER, G.H. Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. Invasion Metastasis. v.3. ed.1. p22-31. 1983.

MIYASAKA, M. Selectins (CD62-E/L/P). Encyclopedia of Immunology. 2.ed. p2158-2161. 1998.

MIZOGUCHI, A. et al. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset by CD1d upregulation. Immunity. v.16. p219-230. 2002.

MOUCHEMORE, K.A., ANDERSON, R.L, HAMILTON, J.A. Neutrophils, G-CSF and their contribution to breast cancer metastasis. The FEBS Journal. v.285. ed.4. p665-679. 2017.

NASTI, T.H., BULLARD, D.C., YUSUF, N. P-selectin enhances growth and metastasis of mouse mammary tumors by promoting regulatory T cell infiltration into tumors. Life Sciences. v.131. p11-18. 2015.

NZULA, S., GOING, J.J., STOTT, D.I. Antigen-driven clonal proliferation, somatic hypermutation, and selection of B lymphocytes infiltrating human ductal breast carcinomas. Cancer Research. v.63. ed.12. p3275-3280. 2003.

NZULA, S., GOING, J.J., STOTT, D.I. Antigen-driven clonal proliferation, somatic hypermutation, and selection of B lymphocytes infiltrating human ductal breast carcinomas. Cancer Research. v.63. p3275-3280. 2003.

OH, S. et al. NDRG2 correlated with favorable recurrence-free survival inhibits metastasis of mouse breast cancer cells via attenuation of active TGF-beta production. Carcinogenesis. v.33. ed.10. p1882-1888. 2012.

OLKHANUD, P.B. et al. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4+ t cells to T-regulatory cells. Cancer Research. v.71. ed.10. p3505-3515. 2011.

ONESTI, C.E. et al. Predictive and prognostic role of peripheral blood eosinophil count in triple-negative and hormone receptor-negative/HER2-positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant treatment. Oncotarget. v.9. ed.72. p33719-33733. 2018.

PALUCKA, K., COUSSENS, L.M., O'SHAUGHNESSY, J. Dendritic Cells, Inflammation and Breast Cancer. Cancer Journal. v.19. n.6. 2013.

PAPA, A. et al. Triple-negative breast cancer: investigating potential molecular therapeutic target. Expert opinion on Therapeutic Targets. v.19. ed.1. 2015.

PAPAGEORGIS, P. et al. Targeting IL13Ralpha2 activated STAT6-TP63 pathway to suppress breast cancer lung metastasis. Breast Cancer Research. v.18. ed.98. p2-15. 2015.

PARK, K.Y., LEWIS, D., GERECHT, S. Bioinspired Hydrogels to Engineer Cancer Microenvironments. Annual Review of Biomedical Engineering. v.19. p109-133. 2017

PARLATO, S. et al. 3D Microfluidic model for evaluatiing immunotherapy efficacy by tracking dendritic cell behaviour toward tumor cells. Nature – Scientific Reports. 2017.

PAVONI, E. et al. Tumor-infiltrating B lymphocytes as an efficient source of highly specific immunoglobulins recognizing tumor cells. BMC Biotechnology. v.7. 2007.

PEDRO-GONZALEZ, A. et al. Thymic stromal lymphopoietin fosters human breast tumor growth by promoting type 2 inflammation. The Journal of experimental medicine. v.208. ed.3. p470-490. 2011.

PENTO, J.T. Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. Anticancer Research. v.37. n.11. p5935-5939. 2017.

PEROU, C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. v.406. p747-752. 2000.

PETRUCELLI, N., DALY, M.B., PAL, T. BRCA1 and BRCA2-associated hereditary breast and ovarian cancer. GeneReviews. 2016.

PLITAS, G., RUDENSKY, A.Y. Regulatory T cells: Differentiation and Function. Cancer Immunology Research. v.4. ed.9. 2016.

PRADHAN, S. et al. A three-dimensional spheroidal cancer model based on PEG-fibrinogen hydrogel microspheres. Biomaterials. v.115. p141-154. 2017

PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. Breast Cancer Research. v.12. p1-18. 2010.

PRAT, A., PEROU, C.M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. Molecular Oncology. v.5. n.1. p5-23. 2011.

PULASKI, B.A., OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. Current Protocols in Immunology. v.39. ed.1. 2000.

RAVELLI, A. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and breast cancer: beyond the prognostic and predictive utility. Tumor Biology. v.39. n.4. p1-8. 2017.

RAVINDRANATHAN, S. et al. Tumor-derived granulocyte colony-stimulating fator diminishes efficacy of breast tumor cell vaccines. Breast Cancer Research. v.20. ed.126. 2018.

RENNHACK, J. et al. Mouse models of breast cancer share amplification and deletion events with human breast cancer. Journal of Mammary Gland Biology Neoplasia. n.22. v.1 p71-84. 2017.

RIBATTI, D. Mast cells and macrophages exert beneficial and detrimental effects on tumor progression and angiogenesis. Immunology Letters. v.152. ed. 2. p83-88. 2013.

ROOMI, M.W. et al. Modulation of u-PA, MMPs and their inhibitors by a novel nutrient mixture in human female cancer cell lines. Oncology Reports. v.28. p768-76. 2012.

ROSSER, E.C., MAURI, C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. Immunity. v.42. p607-612. 2015.

SAID, S.M. et al. Flat Epithelial Atypia and Risk of Breast Cancer: A Mayo Cohort Study. Cancer. v.121. ed.10. p1548-1555. 2015.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self-tolerance maintained by active T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. v.115. ed.3. p1151-1164. 1995.

SARVARIA, A., MADRIGAL, J.A., SAUDEMONT, A. B regulation in cancer and anti-tumor immunity. Cellular & Molecular Immunology. v.14. ed.8. p662-674. 2017.

SCHNEBLE, E., JINGA, D., PEOPLES, G. Breast cancer immunotherapy. Maedica – A Jornal of Clinical Medicine. v.10. n.2. p185-191. 2015.

SCOTT, A.M., ALLISON, J.P., WOLCHOK, J.D. Monoclonal antibodies in cancer therapy. Cancer Immunity. v.12. p1-14. 2012.

SHABANI, F., MCNEIL, J., TIPPETT, L. The oxidative inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) by hypochlorous acid (HOCl) is suppressed by anti-rheumatic drugs. Free Radical Research. v.28. ed.2. p115-123. 1998.

SHANG, B. et al. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. Scientific Reports. v.5. n. 15179. 2015.

SHARMA, B. et al. CXCR2: A novel mediator of mammary tumor bone metastasis. v.20. ed.5. 2019.

SHEN, M. et al. A novel MDSC-induced PD-1-PD-L1+ B-cell subset in breast tumor microenvironment possesses immune-suppressive properties. Oncoimmunology. v.7. ed.4. 2018.

SHEN, M., WANG, J., REN, X. New insights into tumor-infiltrating B lymphocytes in breast cancer: clinical impacts and regulatory mechanisms. Frontiers in Immunology. v.9. ed.470. 2018.

SHEVACH, E.M. Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. Immunity. v.30. ed.5. p636-645. 2009.

SIKANDAR, B. et al. Increased tumor infiltration of CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in patients with triple-negative breast cancer suggests susceptibility to immune therapy. v.18. ed.7. p1827-1832. 2017.

SIMSA, P. et al. Tumor-infiltrating B cell immunoglobulin variable region gene usage in invasive ductal breast carcinoma. Pathology & Oncology Research. v.11. ed.2. p92-97. 2005.

SINN, H., KREIPE, H. A brief overview of the WHO classification of the Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. Breast Care. v.8. ed.2. p149-154. 2013.

SORLIE, T. et al. Gene expression. Patterns of breast carconimas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v.98. ed.19. p10896-10874. 2001.

SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v.100. ed.14. p8418-8423. 2003.

STEENBRUGGE, J.E. et al. Anti-inflammatory signaling by mammary tumor cells mediates prometastatic macrophage polarization in an innovative intraductal mouse model for triple-negative breast cancer. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. v.37. n.1. 2018.

STEWART, B.W., WILD, C.P. World Cancer Report 2014. World Health Organization. Disponível em: < http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>. Acesso em: 14/07/2018.

TADMOR, T. et al. The absence of B lymphocyte reduces the number and function of T-regulatory cells and enhances the anti-tumor response in a murine tumor model. Cancer Immunology, Immunotherapy. v.60. ed.5. p609-619. 2011.

TADMOR, T. et al. The absence of B lymphocytes reduces the number and function of T-regulatory cells and enhances the anti-tumor response in a murine tumor model. Cancer Immunology. Immunotherapy. v.60. 2011.

TAN, G. et al. Cathepsins mediate tumor metastasis. World Journal of Biological Chemistry. v.4. n.4. p91-101. 2013.

TANG, P., TSE, G.M. Immunohistochemical Surrogates for Molecular Classification of Breast Carcinoma. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. v.140. p806-814. 2016.

TAO, K. et al. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. BMC Cancer. v.8. p1-20. 2008.

TARTE, K. et al. Gene expression profiling of plasma cells and plasmablasts: toward a better understanding of the late stages of B-cell differentiation. Blood. v.102. ed.2. p592-600. 2003.

TASHNIZI, A.H. et al. Th1 and Th2 cytokine gene expression in the peripheral blood of breast cancer patients compared to controls. Middle East Journal of Cancer. v.5. ed.3. p119-127. 2014.

TAYLOR, M.A. et al. Upregulated WAVE3 expression is essential for TGF-beta-mediated EMT and metastasis of triple-negative breast cancer cells. Breast cancer research and treatment. v.142. ed.2. p341-353. 2013.

TERABE, M., PARK, J.M., BERZOFSKY. J.A. Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth. Cancer Immunology, Immunotherapy. v.53. ed. 2. p79-85. 2004.

THOMPSON, E. et al. The immune microenvironment of breast ductal carcinoma in situ. Modern Pathology. v.29. n.3. p249-258. 2016.

TOMAYKO, M.M. et al. Cutting Edge: Hierarchy of Maturity of murine memory B cell subsets. The Journal of Immunology. v.185. ed.12. p7146-7150. 2010.

TSIATAS, M. et al. Evaluation of the prognostic value of CD3, CD8, and FOXP3 mRNA expression in early-stage breast cancer patients treated with anthracycline-based adjuvant chemotherapy. Cancer Medicine. v.7. ed.10. 2018.

TSUDA, B. et al. B-cell populations are expanded in breast cancer patients compared with healthy controls. Breast Cancer. v.25. ed.3. p284-291. 2018.

UNDERWOOD, J.C. Lymphoreticular infiltration in human tumours: prognostic and biological implications: a review. British Journal of Cancer. v.30. n.6. p538-548. 1974.

USARY, J. et al. Genetically engineered mouse models of distinct breast cancer subtypes. Current Protocols of Pharmacology. n.72. p1-19. 2017.

VARN, F.S. et al. Adaptive immunity programs in breast cancer. Immunology. v.150. p25-34. 2016.

VERNON, A.E., BAKEWELL, S.J., CHODOSH, L.A. Deciphering the molecular basis of breast cancer metastasis with mouse models. Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders. v.8. n.3. p199-213. 2007.

WANG, K. et al. The CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes at the tumor-host interface has prognostic value in triple-negative breast cancer. v.69. p110-117. 2017.

WATANABE, M.A.E. et al. Regulatory T cells and breast cancer: implications for immunopathogensis. Cancer and Metastasis Review. v.29. ed. 4. p569-579. 2010.

WEI, H. et al. Breast cancer stem cells phenotype and plasma-cell predominant breast cancer independetly indicate poor survival. Pathology, Research and Practice. v.212. ed.4. p294-301. 2016.

WEJKSZA, K. et al. Cancer-produced metabolites of 5-lipoxygenase induce tumor-evoked regulatory B cells via peroxisome proliferator-activated receptor alfa. Journal of Immunology. v.190. 2013.

WEST, N.R. et al. Tumor-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. British Journal of Cancer. v.108. ed.1. 2013.

WHO. World Health Organization. Breast Cancer. Disponível em: < http://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>. Acesso em: 14/07/2018.

WINKLER, I.G. et al. B-lymphopoiesis is stopped by mobilizing doses of G-CSF and is rescued by overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl2. Haematologica. v.98. ed.3. p325-333. 2013.

WOO, S.R., CORRALES, L., GAJEWSKI, T.F. Innate imune recognition of cancer. Annual Review of Immunology. v.33. p445-474. 2015.

WORTEL, C.M., HEIDT, S. Regulatory B cells: phenotype, function and role in transplantation. v.41. p1-9. 2017.

WOUTERS, M.C.A., NELSON, B.H. Prognostic significance of tumor-infiltrating B cells and plasma cells in human cancers. Clinical Cancer Research. v.24. ed.24. 2018.

YAN, J-J. et al. Granulocyte colony-stimulating factor treatment ameliorates lupus nephritis through the expansion of regulatory T cells. v.17. ed.1. 2016.

YANG, W. et al. Interleukin-4 supports the suppressive immune responses elicited by Regulatory T cells. Frontiers in Immunology. v.8. 2017.

YEONG, J. et al. High densities of tumor-associated plasma cells predict improved prognosis in triple negative breast cancer. Frontiers in Immunology. v.9. 2018.

YEONG, J. et al. Higher densities of FOXP3+ regulatory T cells are associated with better prognosis in triple-negative breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment. v.163. ed.1. p21-35. 2017.

YUEN, G.J., DEMISSIE, E., PILLAI, S. B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. Trends Cancer. v.2. ed.12. p747-757. 2016.

ZHANG, L. et al. A simple method to improve the stability of docetaxel micelles. Scientific Reports. v.6. 2016.

ZHANG, Y. et al. B lymphocyte inhibition of anti-tumor response depends on expansion of Treg but is independente of B-cell IL-10 secretion. Cancer Immunology and Immunotherapy. v.62. p87-99. 2013.

ZHANG, Y. et al. Escherichia coli Nissle 1917 Targets and Restrains mouse B16 melanoma and 4T1 Breast tumor through expression of azurin protein. Applied and Environmental Microbiology. v.78. ed.21. p7603-7610. 2012.

ZHANG, Y. et al. Mammary-tumor-educated B cells acquire LAP/TGF-beta and PD-L1 expression and suppress anti-tumor immune responses. International Immunology. v.28. ed.9. p423-433. 2016.

ZHANG, Y., GALLASTEGUI, N., ROSENBLATT, J.D. Regulatory B cells in anti-tumor immunity. International Immunology. v.27. ed.10. p521-530. 2015.

ZHANG, Z. et al. High resolution MRI for non-invasive mouse lymph node mapping. Journal of Immunological Methods. v.401. p23-29. 2013.

ZHANG, Z. et al. Yin-yang effect of tumor infiltrating B cells in breast cancer: From mechanism to immunotherapy. Cancer Letters. v.393. p1-7. 2017.

ZHAO, X. et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. Oncotarget. v.8. n.18. p30576-30586. 2017.

ZHENG, K. et al. Inhibitory effects of 4T1 breast tumor transplantation on mouse peripheral blood immune cell populations. Biotechnology Journal International. v.19. ed.4. p1-12. 2017.

ZHOU, W., GUO, S., GONZALEZ-PEREZ, R.R. Leptin pro-angiogenic signature in breast cancer is linked to IL-1 signalling. British Journal of Cancer. v.104. ed.1. p128-137. 2011.

ZHOU, Y. et al. Prognostic value of tumor-infiltrating FOXP3+ regulatory T cells in patients with breast cancer: a meta-analysis. Journal of Cancer. v.8. ed.19. p4098-4105. 2017.

ZHU, S. et al. CD21lo/med CD27+ proinflammatory B cells are enriched in breast cancer patients and promote antitumor T cell responses. Experimental Cell Research. v.361. ed.1. p149-154. 2017.

ZUCCARINO-CATANIA, G.V. et al. CD80 and PD-L2 define functionally distinct memory B cell subsets that are independent of antibody isotype. v.15. p631-637. 2014.

ZUCKERMAN, N.S. et al. Altered local and systemic immune profiles underlie lymph node metastasis in breast cancer patients. International Journal of Cancer. v.132. ed.11. p2537-2547. 2013.