



Universidade de Brasília

Programa de pós-graduação em Biologia Molecular

Análise de modelo murino experimental de
melanoma após protocolos de vacinação com indução
de morte celular imunogênica.

Tese de Doutorado em Biologia Molecular

Aluna: Thaís Bergmann de Castro

Orientadora: Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Brasília, DF

2024

Thaís Bergmann de Castro

Análise de modelo murino experimental de
melanoma após protocolos de vacinação com indução
de morte celular imunogênica.

Defesa apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Patologia Molecular da Universidade
de Brasília, como pré-requisito para
obtenção de Título de Doutora em
Patologia Molecular.

Aluna: Thaís Bergmann de
Castro

Orientadora: Anamélia
Lorenzetti Bocca

Brasília, DF

2024

Agradecimentos

Por saber que nunca vencemos sozinhos, sou grata por todo apoio, amor e atenção que recebi durante esses 4 anos por todos que cruzaram meu caminho e colaboraram, de alguma forma, com o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço, especialmente, aos meus colegas e amigos de laboratório: Amanda Amaral, Angelina Basso, Camila Bontempo, Camila Cardador, Clara Luna, Filipe Timboni, Gabriel Pasquerelli, Larissa Matos, Luisa Coutinho, Luisa Dan, Márcia Maciel, Mosar Corrêa, Nathalia Morais, Pedro Burgel, Raffael Castro, Stephan Oliveira, Vitória Merçon.

Um agradecimento à colega de laboratório que virou amiga e virou colega de quarto, Tatiana Herman, que foi apoio inabalável e companhia impecável, meu muito obrigada e minhas saudades constantes.

Ao amigo que zela por todos nós, Guilherme Silva, impossível não lembrar de você, dos seus planos e ambições nesse momento. Como gostaria de estar passando por essa fase ao seu lado, você é lembrança constante em minha vida.

À minha orientadora, Anamélia Bocca, que me recebeu no LIA em 2015 e manteve as portas abertas para o meu crescimento como pessoa e pesquisadora. Agradeço enormemente a compreensão, os ensinamentos e o exemplo de profissional que tive nesses quase 10 anos.

Aos meus queridos amigos: André Lourenço, Beatriz Cavendish, Breno Adaid, Caroline Fernandes, David Amorim, Gabriel Malachias, Isabela Czarneski, João Vitor Leite, Julia Faure, Leticia François, Luciano Marques, Luciana Galliac, Marina Carvalho, Priscilla Dias, Rodrigo Lameiras. Agradeço imensamente pelo acolhimento, pela convivência, pelo apoio e por todo divertimento que me geram, deixando a vida mais leve.

Aos amigos que o Ministério da Saúde trouxe e que seguraram minha mão nos últimos anos, Mariana Dornelles e João Miguel Araújo, ver vocês diariamente e poder contar com o equilíbrio perfeito entre a força e a sensatez que vocês trazem é sensacional.

À secretaria executiva da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), que acolheu minha demanda e permitiu flexibilizações para conclusão deste trabalho.

À Maya, Mischa, Mocha e Matilda, que trazem sorrisos e paz em todos os momentos, que deixaram qualquer dificuldade mais leve com suas presenças e que mantiveram sã durante a pandemia.

Aos meus irmãos, Daniel e Felipe, agradeço pelo amor, suporte e ensinamentos desde o berço, além de agradecer as maravilhosas adições à família com Lilian, Miguel e Helena.

Aos meus pais, que viabilizaram tudo para que esse momento chegasse, me faltam palavras para agradecer os 29 anos de amor e apoio incondicional, suporte, paciência e constante sacrifício para ver eu e meus irmãos felizes e realizados. Vocês são exemplos como pais e como seres humanos, fui extremamente privilegiada de crescer com o olhar e cuidado de vocês. Amo vocês absurdamente e dedico integralmente esse trabalho e esse (*esperamos*) título a vocês.

À banca, Graziella A. Joanitti, Doralina Ramos, Kelly Grace Magalhães e Sandro Martins, agradeço pelo tempo e pelas considerações feitas a fim de melhorar esse trabalho.

À CAPES, CNPQ, FAP/DF e UnB, pelo apoio financeiro.

Sumário

<i>Índice de Figuras</i>	6
<i>Índice de Tabelas</i>	7
<i>Siglas</i>	8
<i>Resumo</i>	9
<i>Abstract</i>	11
1. Introdução	13
1.1. Melanoma	13
1.2. Resposta Supressora No Câncer	14
1.3. Morte Celular	18
1.4. Morte Imunogênica	19
1.4. Vacinação Terapêutica	22
1.5. Estudos Pré-Clínicos No Tratamento Do Melanoma	24
2. Justificativa do Estudo	28
3. Objetivos	29
4. Metodologia	30
5. Resultados e Discussão	41
6. Conclusão	72
<i>Referências Bibliográficas</i>	73

Índice de Figuras

<i>Figura 1</i> Microambiente tumoral do melanoma. _____	17
<i>Figura 2</i> - Ativação do sistema imunológico adaptativo. _____	20
<i>Figura 3</i> - Mecanismos de indução de morte celular imunogênica por quimioterápicos. _____	22
<i>Tabela 1</i> - Levantamento de literatura quanto aos estudos pré-clínicos sendo desenvolvidos para o tratamento de melanoma. _____	26
<i>Tabela 2</i> - Levantamento de literatura quanto aos estudos clínicos desenvolvidos com novos tratamentos contra melanoma. _____	27
<i>Figura 4</i> - Esquema de tratamento in vivo _____	35
<i>Figura 5</i> – Avaliação de viabilidade celular por teste de MTT. _____	41
<i>Figura 6</i> – Liberação de ATP frente a tratamentos em doses diversas. _____	43
<i>Figura 7</i> – Microscopia de fluorescência de células B16F10 tratadas. _____	45
<i>Figura 8</i> - Imunofenotipagem de células dendríticas.. _____	46
<i>Figura 9</i> – Dosagem de IL-1b _____	47
<i>Figura 10</i> Dosagem de TNF- α . _____	50
<i>Figura 11</i> Dosagem de IL-10. _____	52
<i>Figura 12</i> Dosagem de IL-6. _____	54
<i>Figura 13</i> Dosagem de IFN. _____	55
<i>Figura 14</i> – Comparativo entre vacinações prévias. _____	58
<i>Figura 15</i> – Comparativo entre vacinações posteriores. _____	59
<i>Figura 16</i> – Registro dos tumores retirados ex vivo. . _____	61
<i>Figura 17</i> - Cortes de histopatológico dos tumores ex vivo. _____	63
<i>Figura 18</i> - Marcação de imunohistoquímica para células CD8+ e CD4+. _____	64
<i>Figura 19</i> - Marcação imunohistoquímica para S100 e KI67. _____	65
<i>Figura 20</i> - Painéis de marcação de citometria de fluxo. _____	67
<i>Figura 21</i> - Porcentagem de população celular encontrada em citometria de fluxo _____	69
<i>Figura 22</i> - Porcentagem de população celular encontrada em citometria de fluxo _____	71

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1 - Levantamento de literatura quanto aos estudos pré-clínicos sendo desenvolvidos para o tratamento de melanoma.</i>	26
<i>Tabela 2 - Levantamento de literatura quanto aos estudos clínicos desenvolvidos com novos tratamentos contra melanoma.</i>	27

Siglas

ANXA1	Anexina 1
ATP	Adenosina trifosfato
CALR	Calreticulina
CTL	Linfócitos T citotóxicos
DAMP	Padrões moleculares associados ao dano
DC	Células dendríticas
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
HMGB1	High mobility group Box 1
IFN-γ	Interferon gama
IL 10	Interleucina 10
IL 6	Interleucina 6
IL1β	Interleucina 1-beta
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MCI ou ICD	Morte celular imunogênica
MDSC	Células supressoras derivadas de mieloides
MHC	Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade
MIC-A	MHC class I polypeptide-related sequence A
MIC-B	MHC class I polypeptide-related sequence B
PBS	Tampão fosfato-salino
RNA	Ácido ribonucleico
SFB	Soro fetal bovino
TAA	Antígenos tumorais
TLRs	Receptores do tipo toll
TME	Microambiente tumoral
Tregs	Células T reguladoras
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

Resumo

O melanoma é um câncer de pele maligno que apresenta alta taxa de metástase e mortalidade, sendo um problema socioeconômico significativo devido ao alto custo de tratamento e acompanhamento dos pacientes. A incidência dessa doença está em crescimento rápido e é mais comum em pessoas caucasianas, afetando principalmente indivíduos jovens e de meia-idade. O melanoma surge a partir de mutações nos melanócitos, células responsáveis pela pigmentação da pele, e pode ser cutâneo ou de mucosa, sendo o primeiro mais comum e apresentando melhor prognóstico. Fatores genéticos e ambientais influenciam no desenvolvimento do melanoma, e os tratamentos disponíveis incluem quimioterapia, terapias alvo e imunoterapia. No entanto, o rápido avanço e agressividade do melanoma representam desafios no tratamento, destacando a necessidade de estudos e aprimoramento das abordagens terapêuticas. A utilização de vacinas terapêuticas, que ativam o sistema imunológico contra o tumor, é uma promessa no tratamento de tumores resistentes, incluindo o melanoma, proporcionando uma alternativa eficaz e apresentando menos efeitos colaterais em comparação aos tratamentos convencionais. Neste trabalho analisamos o papel de uma nova abordagem terapêutica a partir da vacinação com células tumorais em morte imunogênica. A morte imunogênica tem como objetivo modular a ativação da resposta imunológica no local de desenvolvimento do tumor, onde células tumorais mortas estimulam o reconhecimento e a destruição das células tumorais remanescentes. A morte imunogênica é caracterizada pela liberação de sinais de perigo, como proteínas de choque térmico e ATP, que alertam e recrutam células imunológicas para o local da morte celular. Nossos dados *in vitro* demonstraram que o tratamento com a doxorrubicina foi mais eficiente na indução da morte imunogênica nas células tumorais em estudo do que outros quimioterápicos testados. Nos ensaios *in vivo* observamos que existe uma diminuição do volume tumoral e maior recrutamento celular. O tratamento foi realizado antes e após a instalação do tumor e as duas modalidades demonstraram diminuição do crescimento do tumor quando comparado a

grupos tratados com vacinas feitas com células mortas por necrose. A vacinação realizada após a indução do tumor, além de mais realista do ponto de vista comercial, apresentou maior diminuição do tumor do que a vacinação realizada antes da instalação tumoral. Analisando as citocinas, observamos um aumento da produção de IL1b em 48 horas, um aumento de IFN- γ na mesma condição, diminuição de IL-6 em 24 e 48 horas, aumento de IL-10 e TNF- α , nos resultados *in vivo* vimos um tumor de tamanho reduzido frente à vacinação e um aumento nos números de linfócitos de memória. Nossos resultados demonstraram que a vacinação com células de melanoma em morte imunogênica contribuiu para a diminuição do tamanho tumoral, recrutamento celular e na ativação imunológica de forma geral, induzindo uma resposta antitumoral.

Abstract

Melanoma is a malignant skin cancer that has a high rate of metastasis and mortality, being a significant socioeconomic problem due to the high cost of treatment and monitoring of patients. The incidence of this disease is growing rapidly and is more common in Caucasian people, mainly affecting young and middle-aged individuals. Melanoma arises from mutations in melanocytes, cells responsible for skin pigmentation, and can be cutaneous or mucosal, the former being more common and presenting a better prognosis. Genetic and environmental factors influence the development of melanoma, and available treatments include chemotherapy, targeted therapies and immunotherapy. However, the rapid advancement and aggressiveness of melanoma represent challenges in treatment, highlighting the need for studies and improvement of therapeutic approaches. The use of therapeutic vaccines, which activate the immune system against the tumor, holds promise in the treatment of resistant tumors, including melanoma, providing an effective alternative and presenting fewer side effects compared to conventional treatments. In this work we analyze the role of a new therapeutic approach based on vaccination with tumor cells in immunogenic death. Immunogenic killing aims to modulate the activation of the immune response at the site of tumor development, where dead tumor cells stimulate the recognition and destruction of remaining tumor cells. Immunogenic death is characterized by the release of danger signals, such as heat shock proteins and ATP, that alert and recruit immune cells to the site of cell death. Our in vitro data demonstrated that treatment with doxorubicin was more efficient in inducing immunogenic death in the tumor cells under study than other chemotherapy drugs tested. In in vivo assays we observed that there is a decrease in tumor volume and greater cell recruitment. The treatment was carried out before and after the installation of the tumor and both modalities demonstrated a reduction in tumor growth when compared to groups treated with vaccines made with cells killed by necrosis. Vaccination carried out after tumor induction, in addition to being more realistic from a commercial point of view, showed greater tumor reduction than vaccination

carried out before tumor onset. Analyzing the cytokines, we observed an increase in the production of IL1b in 48 hours, an increase in IFN- γ in the same condition, a decrease in IL-6 in 24 and 48 hours, an increase in IL-10 and TNF, in the in vivo results we saw a reduced tumor size due to vaccination and an increase in the number of memory lymphocytes. Our results demonstrated that vaccination with immunogenic dying melanoma cells contributed to the reduction in tumor size, cell recruitment and overall immune activation, inducing an antitumor response.

1. Introdução

No contexto da imunidade antitumoral, o sistema imunológico desempenha um papel fundamental na identificação e eliminação de células tumorais, processo conhecido como vigilância imunológica. As células tumorais expressam neoantígenos, que são reconhecidos pelo sistema imune como estranhos. Esse reconhecimento leva à ativação de células imunes, como células NK, linfócitos T citotóxicos e macrófagos, que atuam em conjunto para eliminar as células tumorais (Xia et al., 2021). Entretanto, células tumorais podem desenvolver mecanismos de escape da resposta imune, como a expressão de moléculas imunossupressoras, a perda de expressão de antígenos tumorais e a indução de um microambiente tumoral imunossupressor (Katopodi et al., 2024). Esses mecanismos de escape contribuem para o crescimento tumoral e a progressão da doença.

A compreensão dos mecanismos de escape imune utilizados pelas células tumorais tem impulsionado o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, como a imunoterapia. A imunoterapia visa fortalecer a resposta imune contra o tumor, seja através da estimulação do sistema imune do paciente, seja através da administração de células imunes modificadas em laboratório para reconhecer e destruir células tumorais (Riley et al, 2019; Chen et al, 2017).

1.1. Melanoma

O melanoma é um tipo de câncer que se origina nos melanócitos (Barcala et. al. 2023), e representa um desafio significativo para a saúde pública brasileira (INCA, 2019). Sua alta taxa de metástase e a elevada mortalidade associada exigem atenção e investimentos para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento. No Brasil, dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2019) estimam que, para cada ano do triênio 2023-2025, sejam diagnosticados 8.440 novos casos de melanoma em homens e 8.750 em mulheres, colocando a doença entre os tipos de câncer mais incidentes na

população. A alta taxa de mortalidade, especialmente quando o diagnóstico é tardio, agrava o problema e gera grande impacto socioeconômico, considerando os altos custos relacionados ao tratamento e acompanhamento dos pacientes (Santos et al, 2020; da Veiga et al, 2021).

Embora a incidência do melanoma seja menor no Brasil em comparação a países com populações predominantemente caucasianas, como os Estados Unidos, observa-se um aumento preocupante nos últimos anos. Esse crescimento acelerado, em contraste com outros tipos de câncer, reforça a necessidade de intensificar as medidas de prevenção, com foco na conscientização sobre os riscos da exposição solar excessiva e a importância do diagnóstico precoce. A agressividade do melanoma, evidenciada por sua capacidade metastática e pelo perfil epidemiológico atingindo todas as faixas etárias, exige uma abordagem abrangente no combate à doença. Investir em pesquisa, aprimorar as técnicas de diagnóstico precoce, ampliar o acesso a tratamentos eficazes e promover a conscientização da população são medidas cruciais para reduzir a morbimortalidade associada ao melanoma no Brasil (Whiteman et al, 2016; Silva et al, 2018).

Além das estratégias de prevenção e diagnóstico, é fundamental o desenvolvimento e a implementação de terapias inovadoras que possam melhorar o prognóstico dos pacientes com melanoma. A imunoterapia, por exemplo, tem se mostrado uma abordagem promissora, utilizando o próprio sistema imunológico do paciente para combater as células cancerígenas. A utilização de anticorpos monoclonais, como os inibidores de checkpoint imunológico, tem demonstrado eficácia significativa em casos de melanoma avançado (Hodi et al, 2018; Larkin et al, 2019).

1.2. Resposta Supressora No Câncer

Uma compreensão aprofundada dos mecanismos pelos quais os tumores subvertem a imunidade é essencial para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para manipular o sistema imune e aprimorar o tratamento do câncer.

As células dendríticas (DCs) desempenham um papel fundamental na vigilância imunológica atuando como sentinelas do sistema imune. Em tecidos periféricos, as DCs residem em estado imaturo, preparadas para capturar e processar antígenos. A presença de sinais de perigo, como os encontrados no microambiente tumoral (TME), desencadeia a maturação das DCs e sua migração para os linfonodos drenantes. Nesse processo, as DCs apresentam antígenos tumorais (TAAs) aos linfócitos T, iniciando a resposta imune antitumoral. Contudo, o microambiente tumoral frequentemente se caracteriza por um estado de imunossupressão, representando um desafio para a apresentação eficaz de antígenos pelas DCs. As células tumorais desenvolvem mecanismos para evadir a vigilância imunológica, incluindo a supressão da função das DCs (Wculek et al, 2020; Binnewies et al 2019). Dentre esses mecanismos, destacam-se a secreção de fatores imunossupressores, como TGF- β , IL-10 e VEGF, que inibem a maturação, a função e a expressão de moléculas coestimuladoras pelas DCs, prejudicando sua capacidade de apresentação de antígenos (Veglia et al, 2021).

Além disso, o TME apresenta condições metabólicas desfavoráveis, como hipóxia e baixo pH, que também contribuem para a inibição da função das DCs e promovem a polarização de macrófagos em direção a um fenótipo imunossupressor. A presença de células imunossupressoras no TME, como células T reguladoras (Tregs) e células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs), exerce um efeito adicional na supressão da função das DCs, seja por meio da inibição direta ou da competição por nutrientes essenciais. Diante desse cenário desafiador, a manipulação da resposta imunológica com o objetivo de restaurar a função das DCs e promover a resposta antitumoral tem se tornado uma área de intensa pesquisa em imunoterapia do câncer (Scharping et al, 2017; Binnewies et al, 2018). Estratégias promissoras incluem o desenvolvimento de vacinas contra o câncer baseadas em DCs carregadas ex vivo com TAAs, o uso de inibidores de checkpoint imunológico para reverter a exaustão das células T e aumentar a eficácia da apresentação de antígenos pelas DCs, e a combinação de diferentes abordagens imunoterapêuticas, como vacinas e inibidores de checkpoint,

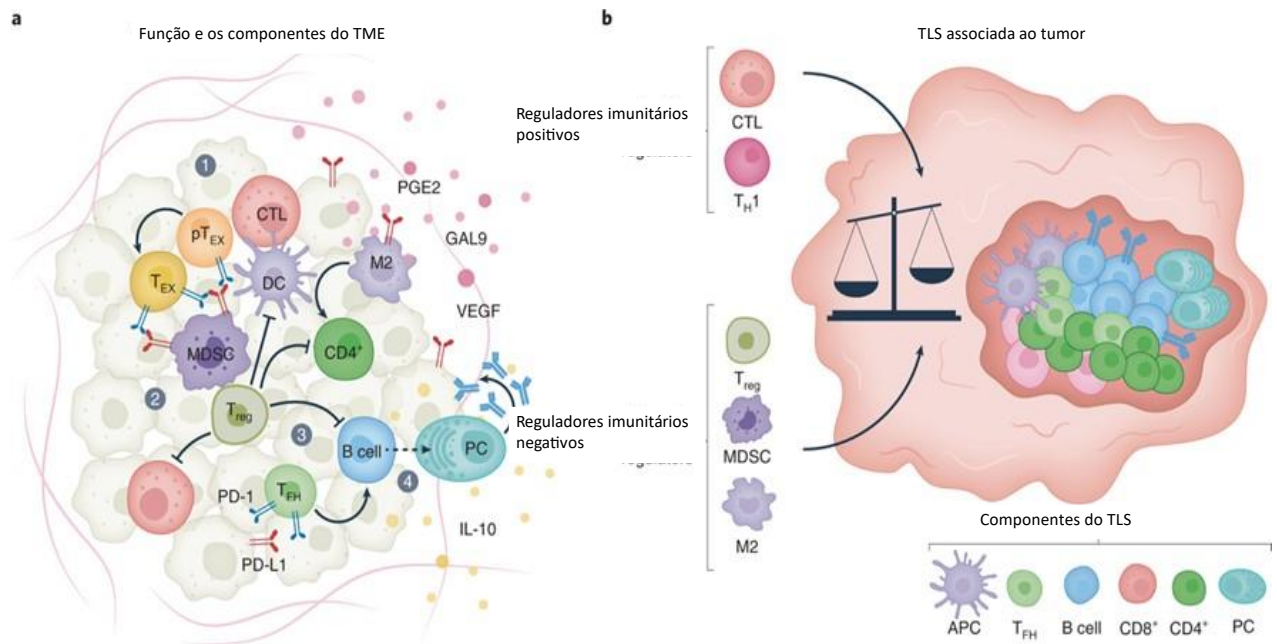
para superar a imunossupressão no TME e gerar respostas antitumorais mais eficazes (Palucka et al 2013; Ribas et al,2018).

O melanoma interage de forma complexa com o sistema imunológico. Essa interação é crucial tanto para controlar quanto para a progressão da doença. O reconhecimento das células tumorais de melanoma pelo sistema imune é um processo intrincado. Células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, capturam antígenos tumorais, processam e os apresentam às células T através de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Antígenos específicos do melanoma, como gp100, MART-1 e tirosinase, são reconhecidos pelos linfócitos T citotóxicos (CTLs) CD8+. (Ribas, A. 2015; Melief et al, 2015).

No entanto, o microambiente tumoral do melanoma é altamente desfavorável à ação do sistema imune (Figura 1), permitindo que as células tumorais escapem da vigilância imunológica. Dentre as estratégias de escape, podemos destacar a redução na expressão de moléculas MHC classe I, tornando as células tumorais menos visíveis aos CTLs. Além disso, as células de melanoma podem expressar em sua superfície moléculas como PD-L1, que se ligam a receptores inibitórios em células T, como PD-1, suprimindo sua atividade antitumoral. O microambiente tumoral também é infiltrado por células imunossupressoras, como células T reguladoras (Tregs) e células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs), que inibem a função de células T efetoras e promovem a tolerância imunológica. Para completar o arsenal de evasão, as células de melanoma secretam citocinas imunossupressoras, como TGF- β e IL-10, que inibem a proliferação e função de células T efetoras (Spranger et al, 2018; Pardoll, D.M. 2012).

Além das imunoterapias, a combinação de tratamentos, como a terapia-alvo e a radioterapia, está sendo explorada para aumentar a eficácia do combate ao melanoma. A terapia-alvo, que utiliza medicamentos para atacar especificamente as mutações genéticas presentes nas células tumorais, pode ser combinada com imunoterapias para criar um efeito sinérgico, potencializando a resposta antitumoral. A radioterapia, por sua vez, pode ser utilizada para reduzir o tamanho

tumoral e melhorar a apresentação de antígenos, facilitando a ação do sistema imunológico (Sullivan et al, 2020; Nguyen et al 2021; Luke et al



2017).

Figura 1 Microambiente tumoral do melanoma. A representação esquemática dos principais componentes imunológicos no microambiente do melanoma distingue quatro módulos funcionais principais. O módulo CD8, representado em vermelho/laranja/amarelo, inclui células T citotóxicas (CTLs) e uma gama de células disfuncionais, como células TEX progenitoras (pTEX) e células TEX terminais. O módulo inato, em violeta/roxo, influencia o recrutamento e a ativação de células T, dependendo do potencial inflamatório tolerogênico (DCs tolerogênicas; células mieloides supressoras, MDSC), pró-tumoral (M2) ou anti-tumoral (DCs). O módulo CD4, em verde, é altamente heterogêneo e inclui células Treg imunossupressoras, células TH2 com potencial inflamatório pró-tumoral e células semelhantes a TFH, que promovem a função das células B. O módulo de células B, em azul, inclui células B em vários estágios de diferenciação até células plasmáticas (PCs), com função pró- ou anti-tumoral dependendo do perfil de imunoglobulinas produzidas (IgA, IgG2, IgG4 versus IgG1) e expressão de moléculas co-inibitórias como IL-10 e PD-L1. Cada um desses módulos imunológicos possui um programa contrarregulatório para atenuar respostas imunológicas, explicando a coexistência de células tumorais e linfócitos anti-tumorais no mesmo ambiente. O infiltrado imune no melanoma pode se organizar em agregados celulares, denominadas estruturas linfoides terciárias (TLSs), com células B no núcleo, cercadas por células T e APCs, gerando um padrão semelhante a centros germinativos. O impacto dessas estruturas na imunidade anti-tumoral é determinado pelo potencial de recrutar ou expandir CTLs e células TH1 versus células imunossupressoras ou TEX. Figura retirada de: Huang, A.C., Zappasodi, R. A decade of checkpoint blockade immunotherapy in melanoma: understanding the molecular basis for immune sensitivity and resistance. Adaptado de Nat Immunol 23, 660–670 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01141-1>

Outro aspecto importante é a personalização do tratamento, levando em consideração as características individuais de cada paciente e de seu tumor. A medicina de precisão, que utiliza informações genéticas, ambientais e de estilo de vida para personalizar o tratamento, tem o potencial de melhorar significativamente os resultados terapêuticos. Testes genéticos podem identificar mutações específicas que podem ser alvo de terapias personalizadas, enquanto a análise do microambiente tumoral pode ajudar a determinar a melhor abordagem imunoterapêutica. A integração de dados clínicos e moleculares em plataformas de inteligência artificial também está sendo explorada para otimizar a personalização do tratamento e prever a resposta terapêutica (Hanna et al, 2014).

1.3. Morte Celular

A morte celular é um processo fundamental na biologia, ocorrendo de diversas formas e com diferentes impactos no organismo. A necrose, tradicionalmente considerada uma forma de morte celular não programada, é caracterizada pela ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo celular, desencadeando uma resposta inflamatória. Seus marcadores incluem a liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), como a proteína HMGB1 e ATP extracelular. Por outro lado, a morte celular imunogênica é um tipo de morte celular programada que estimula uma resposta imune contra antígenos associados às células mortas. Este processo é marcado pela exposição de calreticulina na superfície celular, liberação de ATP e HMGB1, e a expressão de proteínas de choque térmico, como HSP70 e HSP90. A piroptose é uma forma de morte celular inflamatória programada, distinta da apoptose e necrose. Este processo é mediado pela ativação de caspases inflamatórias, principalmente a caspase-1, que leva à formação de poros na membrana celular e à liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-18. Os marcadores característicos da piroptose incluem a ativação da gasdermina D, que forma os poros na membrana, a clivagem e ativação de IL-1 β e IL-18, e a liberação de lactato desidrogenase (LDH). A piroptose desempenha um papel crucial na resposta imune inata contra patógenos

intracelulares e está implicada em várias doenças inflamatórias. Cada um desses tipos de morte celular possui mecanismos e consequências distintas para o organismo, contribuindo de maneiras únicas para processos fisiológicos e patológicos (Galuzzi et al, 2020).

1.4. Morte Imunogênica

A morte imunogênica é um processo de morte celular que, diferentemente do apoptose tradicional, é capaz de modular positivamente a resposta imune às células mortas. Enquanto a apoptose é geralmente um fenômeno imunologicamente "silencioso", onde a célula morre sem causar uma resposta inflamatória, a morte imunogênica é caracterizada pela liberação de sinais de perigo ou danos (DAMPs) que alertam o sistema imunológico para a presença de células anômalas. Esse tipo de morte celular é particularmente relevante no contexto do câncer, pois pode transformar células tumorais moribundas em vacinas endógenas que estimulam o sistema imune a atacar o tumor. A capacidade de induzir uma resposta imune robusta e específica contra células tumorais torna a morte imunogênica uma área de grande interesse na pesquisa oncológica (Chu et al, 2019; Galuzzi et al, 2020).

Os mecanismos biológicos por trás da morte imunogênica envolvem a liberação de diversos sinais e moléculas que funcionam como "alarme" para o sistema imunológico (Figura 2). Um dos principais sinais é a exposição da proteína calreticulina na superfície das células moribundas, que atua como um sinal denominado "eat me" (coma-me) para as células fagocíticas, como os dendrócitos. Além disso, a liberação de ATP e HMGB1 (High Mobility Group Box 1) durante a morte celular serve como quimioatraente e ativa as células dendríticas, respectivamente. A presença de outros sinais de perigo, como a liberação de DNA mitocondrial e a produção de espécies reativas de oxigênio, também contribui para a ativação e maturação das células imunológicas (Fucikova et al, 2019; Schiavoni et al, 2018).

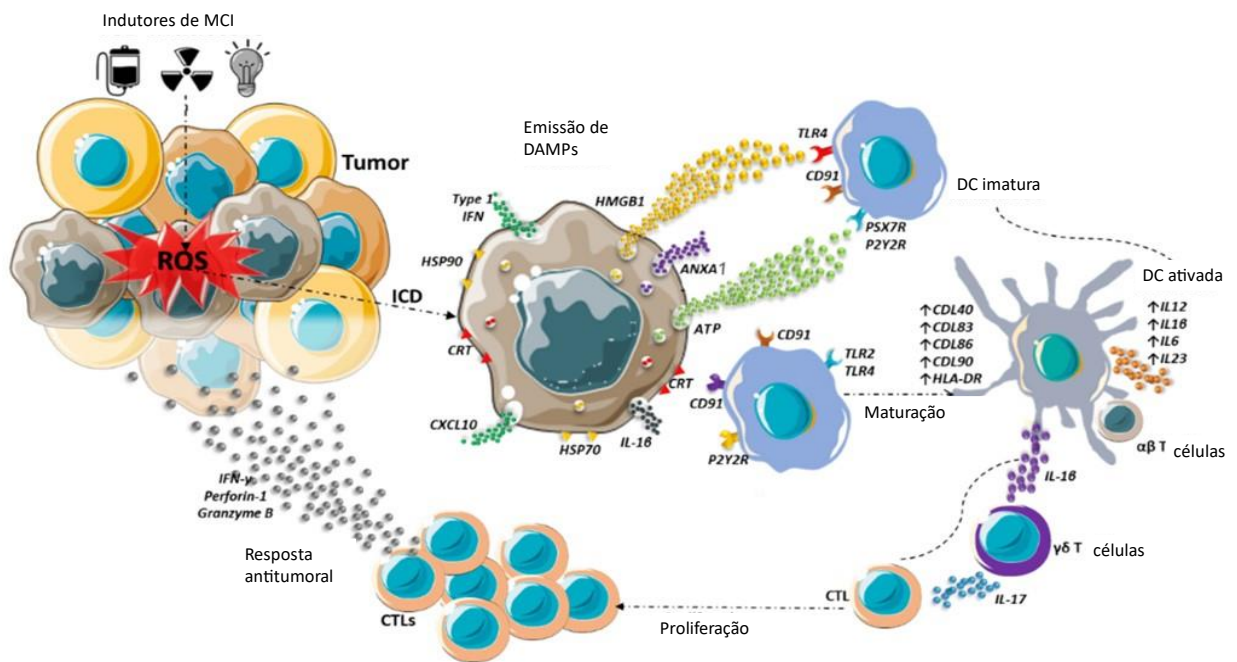


Figura 2 - Ativação do sistema imunológico adaptativo. A ativação da resposta imune adaptativa após a morte celular imunogênica em um tumor pode ser induzida por quimioterapia, radioterapia e terapia fotodinâmica. Essas terapias podem causar a morte celular imunogênica (ICD), um tipo de morte celular programada que é acompanhada pela exposição de padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Esse processo pode ocorrer, por exemplo, como resultado do estresse oxidativo no retículo endoplasmático. Alguns DAMPs, como as proteínas de choque térmico (HSP)70, HSP90 e a calreticulina, são expostos na membrana plasmática, enquanto outros, como o trifosfato de adenosina (ATP), a proteína de grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1), o ligante de quimiocina C-X-C 10 (CXCL10) e a anexina A1 (ANXA-1), são liberados no meio extracelular. Os DAMPs ativam os receptores de reconhecimento de padrões das células dendríticas (DCs) e de outras células apresentadoras de antígenos, culminando na maturação das DCs e no recrutamento e ativação das células T. Dessa forma, a ICD pode desencadear ou intensificar uma resposta imune adaptativa antitumoral. Adaptado de *Pharmaceutics*. 14. 1564. 10.3390/pharmaceutics14081564.

A relevância da morte imunogênica na terapia do câncer reside na sua capacidade de transformar células tumorais em uma fonte de antígenos que estimulam o sistema imunológico. Estudos têm demonstrado que certos tratamentos anticâncer, como a quimioterapia e radioterapia, podem induzir a morte imunogênica. Por exemplo, drogas como a doxorrubicina e a oxaliplatina são conhecidas por suas propriedades imunogênicas, além de sua capacidade citotóxica direta. Essa dualidade permite não apenas a redução do volume tumoral, mas também a ativação de uma resposta imune duradoura que pode prevenir a recorrência do câncer. A capacidade de induzir uma resposta imune

específica contra o tumor é crucial para o sucesso a longo prazo das terapias anticâncer (Kroemer et al, 2022).

Pesquisas recentes têm enfatizado o potencial terapêutico da morte imunogênica em combinação com outras formas de imunoterapia, como os inibidores de checkpoint imunológico. Esses inibidores, como o pembrolizumabe e o nivolumabe, funcionam bloqueando as vias de sinalização que as células tumorais utilizam para evadir o sistema imunológico. Quando combinados com agentes que induzem a morte imunogênica, esses tratamentos podem resultar em respostas anticancerígenas mais robustas e sustentáveis, aumentando significativamente as taxas de sucesso terapêutico em vários tipos de câncer. A combinação de diferentes abordagens terapêuticas pode potencializar a eficácia do tratamento e melhorar os resultados clínicos para os pacientes (Galon et al, 2019; Tang et al, 2018).

Estudos não-clínicos têm fornecido evidências concretas sobre a eficácia da morte imunogênica na indução de respostas imunes antitumorais (Smith et al., 2018; Chen et al., 2019; Patel et al., 2020). Em modelos animais, a indução de morte imunogênica tem demonstrado não apenas a redução do crescimento tumoral primário, mas também a prevenção de metástases e a geração de memória imunológica que protege contra a reintrodução do tumor. Ensaio clínicos em pacientes com câncer têm começado a explorar o potencial da morte imunogênica. Um exemplo notável é o uso de métodos de radioterapia fracionada, que não só danifica diretamente as células tumorais, mas também cria um ambiente inflamatório que favorece a morte imunogênica (Johnson et al., 2021; Oliveira et al., 2022; Gupta et al., 2023). Ao promover a liberação de sinais de perigo e aumentar a apresentação de antígenos tumorais, essa abordagem tem mostrado potencial em aumentar a eficácia de tratamentos combinados com imunoterapias.

Essas estratégias integradas são exemplares do futuro promissor da oncologia, onde a ativação do sistema imunológico contra o câncer pode ser otimizada para resultados terapêuticos superiores. A pesquisa contínua e os avanços tecnológicos são essenciais para a implementação eficaz dessas abordagens na prática clínica.

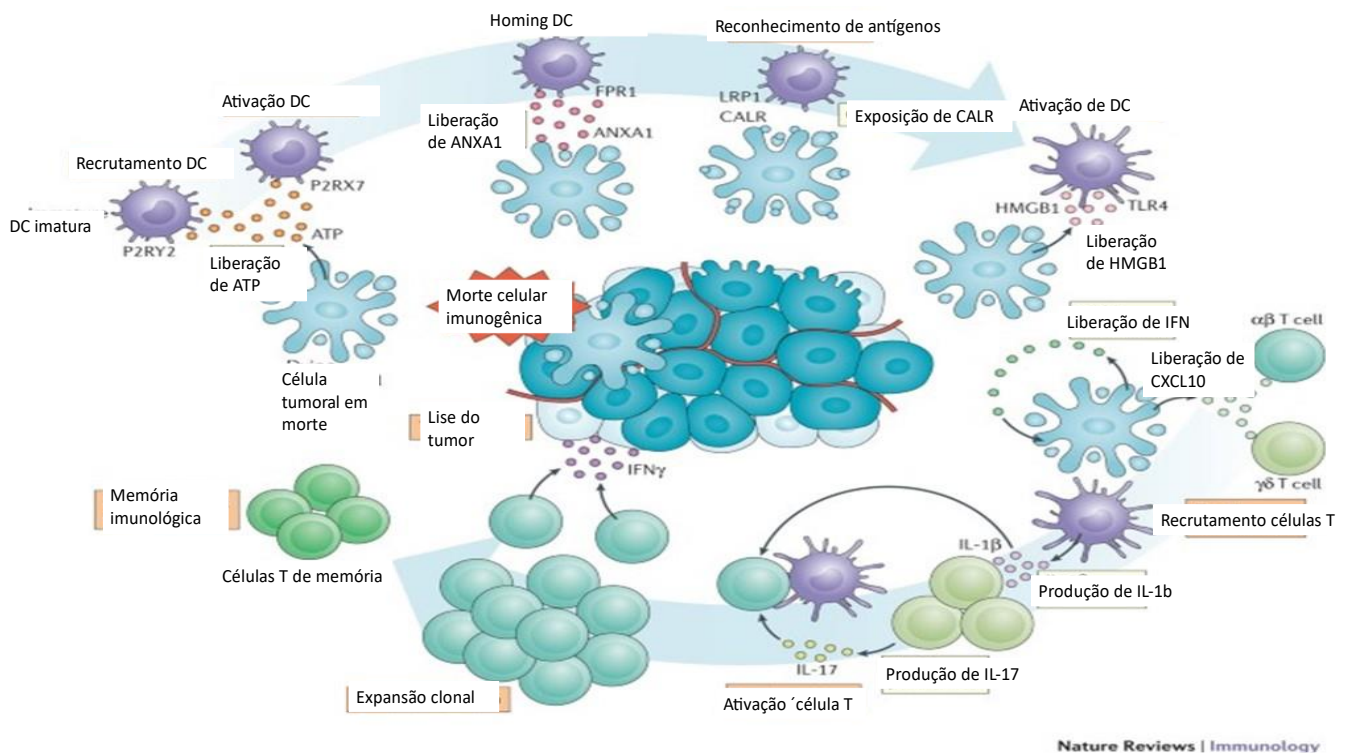


Figura 3 - Mecanismos de indução de morte celular imunogênica por quimioterápicos. Em resposta a indutores de morte celular imunogênica (ICD), como doxorubicina ou oxaliplatina, células malignas expõem calreticulina (CALR) e outras chaperonas do retículo endoplasmático na sua superfície, secretam ATP, iniciam uma resposta intrínseca de interferon tipo I (IFN) culminando na produção de ligante de quimiocina CXCL10 (CXCL10), e liberam a proteína de grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1) e anexina A1 (ANXA1). Quando esses padrões moleculares associados a danos se ligam a receptores específicos na superfície de células mieloides ou linfoides, favorecem a captação de corpos celulares e seus detritos por células apresentadoras de antígenos, incluindo células dendríticas (DCs), no contexto de sinais imunostimuladores robustos. Isso eventualmente leva à ativação de uma resposta imune adaptativa envolvendo células T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$. Além de estar associada ao estabelecimento de memória imunológica, essa resposta tem o potencial de erradicar células malignas que sobrevivem à quimioterapia por meio de um mecanismo dependente de IFN γ . Figura adaptada de: Nat Rev Immunol 17, 97–111 (2017). <https://doi.org/10.1038/nri.2016.107>

1.4. Vacinação Terapêutica

A vacinação terapêutica contra o câncer é uma abordagem inovadora que visa estimular o sistema imunológico a reconhecer e atacar células tumorais. Esta abordagem funciona potencializando a apresentação de antígenos tumorais ao sistema imunológico, treinando-o para identificar e destruir células cancerígenas. Esta estratégia tem o potencial de oferecer uma alternativa menos tóxica e mais específica em comparação com tratamentos convencionais como quimioterapia e radioterapia. Além disso, as vacinas terapêuticas podem ser

personalizadas para cada paciente, utilizando antígenos específicos do tumor, o que aumenta a precisão e a eficácia do tratamento (figura 3). Quando expostas a indutores de morte celular imunogênica (ICD), como doxorrubicina ou oxaliplatina, células malignas passam por uma série de mudanças que ativam o sistema imunológico. Essas células começam a apresentar calreticulina (CALR) e outras chaperonas do retículo endoplasmático na sua superfície celular. Além disso, elas secretam ATP e desencadeiam uma resposta intrínseca de interferon tipo I (IFN), resultando na produção de CXCL10. Paralelamente, estas células liberam proteínas como HMGB1 e anexina A1 (ANXA1). Esses padrões moleculares associados a danos são sentidos pelas células do sistema imunológico, como células mielóides e linfóides. Esse processo facilita a captura dos restos celulares por células apresentadoras de antígenos, incluindo DCs, dentro de um contexto de sinais imunológicos estimulantes. Consequentemente, isso leva à ativação de uma resposta imunológica adaptativa, que envolve tanto células T $\alpha\beta$ quanto $\gamma\delta$. Esta resposta não só contribui para a formação de memória imunológica, mas também tem o potencial de eliminar células malignas que resistem à quimioterapia, através de um mecanismo dependente de IFN- γ (Schiavoni et al, 2018; Galluzi et al, 2020).

Os benefícios esperados da utilização da morte imunogênica como parte de uma estratégia de vacinação contra o câncer são numerosos. Primeiramente, a ICD pode gerar respostas imunes mais robustas e duradouras, uma vez que promove a apresentação eficiente de antígenos tumorais ao sistema imunológico. Isso pode resultar em uma vigilância imunológica contínua, prevenindo a recorrência do tumor. Além disso, a ICD pode ajudar a superar a imunossupressão induzida pelo tumor, um dos principais obstáculos no tratamento do câncer. Outro benefício significativo é a potencial especificidade da resposta imune gerada. Como a ICD envolve a liberação de antígenos tumorais específicos, a resposta imunológica resultante é direcionada principalmente contra as células cancerígenas, minimizando danos aos tecidos saudáveis. Isso pode reduzir os efeitos colaterais associados aos tratamentos convencionais e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Além disso, a ICD pode

induzir a formação de memória imunológica, proporcionando proteção a longo prazo contra o câncer (Galluzi et al, 2017; Zitvogel et al, 2018).

A combinação de vacinas terapêuticas com agentes que induzem morte imunogênica pode atuar de forma sinérgica para melhorar os resultados clínicos. Estudos pré-clínicos e clínicos têm mostrado que essa abordagem combinada pode aumentar a infiltração de células T no tumor e melhorar a taxa de resposta em pacientes com câncer (Melero et al, 2019; Saxena et al, 2018).

1.5. Estudos Pré-Clínicos No Tratamento Do Melanoma

Os estudos pré-clínicos têm demonstrado eficácia da indução de morte imunogênica em modelos de melanoma, utilizando uma variedade de abordagens e tratamentos, conforme descrito na tabela 1. Um estudo que merece destaque aqui é o de Zhang et al (2019) que utilizou modelo murino de melanoma B16F10 para investigar a eficácia da doxorubicina, um agente quimioterápico conhecido por induzir morte imunogênica. Os camundongos foram tratados com doxorubicina por um período de duas semanas, e os resultados mostraram uma redução significativa no crescimento tumoral e aumento da infiltração de células T CD8+ no microambiente tumoral. Neste estudo foi observado a exposição de calreticulina na superfície das células tumorais, indicando a ativação de mecanismos de morte imunogênica.

Estudos recentes em modelos de melanoma murino têm demonstrado a eficácia de combinar radioterapia com inibidores de checkpoint imunológico, como o anti-PD-1, resultando em sinergia entre os tratamentos. A radioterapia fracionada seguida pela administração de anti-PD-1 aumentou a infiltração de células dendríticas e células T CD8+, além de reduzir significativamente o tamanho do tumor. A liberação de ATP e HMGB1 confirmou a indução de morte imunogênica. Vacinas baseadas em células tumorais irradiadas também mostraram uma resposta imune robusta, com aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação de células T específicas contra o tumor, sugerindo que a indução de morte imunogênica pode transformar células tumorais em vacinas endógenas eficazes. Outros estudos exploraram combinações

de morte imunogênica induzida por quimioterapia com terapia gênica, utilizando doxorrubicina e um vetor viral que expressa GM-CSF, resultando em uma resposta imune antitumoral mais robusta e duradoura. A combinação de terapia fotodinâmica (PDT) com inibidores de checkpoint imunológico também mostrou eficácia, induzindo morte imunogênica e aumentando a infiltração de células T CD8+, além de reduzir o tamanho do tumor. Além disso, a utilização de nanopartículas para entregar agentes indutores de morte imunogênica diretamente ao tumor demonstrou uma indução eficiente de morte imunogênica e uma redução significativa no crescimento tumoral, oferecendo uma abordagem promissora para aumentar a especificidade e eficácia dos tratamentos antitumorais, minimizando os efeitos colaterais sistêmicos (Smith et al., 2018; Chen et al., 2019; Patel et al., 2020; Johnson et al., 2021; Oliveira et al., 2022; Gupta et al., 2023)

Estudo	Referência	Principal achado	Mecanismo de ação
Utilização de doxorrubicina em modelos murinos de melanoma B16F10	Smith et al., 2018	Redução significativa no crescimento tumoral e aumento da infiltração de células T CD8+.	Indução de morte imunogênica ativando resposta imunológica.
Avaliação da combinação de radioterapia com inibidores de checkpoint imunológico em modelos de melanoma murino.	Chen et al., 2019	Sinergia entre tratamentos, com aumento da infiltração de células dendríticas e células T CD8+.	Radioterapia induz morte monogênica potencializando a ação dos inibidores de checkpoint.
Investigação da eficácia de vacinas baseadas em células tumorais irradiadas em modelos de melanoma transgênico.	Patel et al., 2020	Indução de resposta imune robusta com aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias.	Irradiação em células tumorais gerando morte imunogênica.
Exploração da combinação de quimioterapia com terapia gênica para	Johnson et al., 2021	Sinergia significativa entre os tratamentos.	Quimioterapia induz morte imunogênica enquanto a terapia gênica induz

aumentar a resposta imune antitumoral.			maturação de células dendríticas.
Investigação da combinação de morte imunogênica com terapia fotodinâmica (PDT) em modelos de melanoma.	Oliveira et al., 2022	PDT induzindo morte imunogênica em sinergia com o tratamento de checkpoint.	PDT gerando espécies reativas de oxigênio e morte imunogênica auxiliando na reposta positiva ao tratamento de inibição de checkpoint.
Utilização de nanopartículas para entrega de agentes indutores de morte imunogênica diretamente ao tumor.	Gupta et al., 2023	Morte imunogênica induzida levando ao aumento de infiltração de células T CD8+	Nanopartículas promovem entrega direcionada de agentes indutores de morte imunogênica, reduzindo efeitos sistêmicos.

Tabela 1 - Levantamento de literatura quanto aos estudos pré-clínicos sendo desenvolvidos para o tratamento de melanoma.

Ensaio clínico têm começado a explorar a eficácia de vacinas baseadas em morte imunogênica em pacientes com melanoma conforme demonstrado na tabela 2.

O estudo de fase II NCT01970358 investigou a eficácia de uma vacina baseada em células tumorais irradiadas combinada com o inibidor de checkpoint anti-CTLA-4, ipilimumabe, em 50 pacientes com melanoma metastático refratários a tratamentos anteriores. Os resultados mostraram uma taxa de resposta promissora com redução de 30% do volume tumoral e uma sobrevida global mediana de 18 meses, com menos eventos adversos. Estudos adicionais, como os ensaios NCT03470922, NCT03546361 e NCT03606967, estão explorando diferentes combinações terapêuticas para induzir morte imunogênica em melanoma, incluindo vacinas de células tumorais irradiadas com agonistas de TLR9, inibidores deIDO e inibidores de checkpoint anti-PD-L1. Esses estudos visam avaliar a segurança, a resposta imune e a eficácia clínica, com o potencial de estabelecer novas diretrizes para o tratamento do melanoma (Hu Z et al 2021, Hussein et al 2022, Kjeldsen et al 2022).

Estudo	Referência	Principal achado	Mecanismo de ação
Um estudo de fase I com uma vacina neoantígena personalizada contra o câncer em melanoma	Hu Z et al 2021	Taxa de resposta de 30%, sobrevida global mediana de 18 meses.	Indução de morte imunogênica através da exposição de calreticulina, combinada com bloqueio de CTLA-4 para potencializar a resposta imunológica.
Estudo de fase I sobre a combinação de vacina de células tumorais irradiadas com um agonista de TLR9 em pacientes com melanoma avançado.	Hussein et al 2022	Ativação robusta da resposta imune inata, aumento da infiltração de células T no tumor.	Indução de morte imunogênica e ativação de TLR9 para estimular a resposta imunológica inata e aumentar a infiltração de células T.
Estudo de fase II sobre a combinação de vacina de células dendríticas pulsadas com um inibidor deIDO em pacientes com melanoma metastático.	Kjeldsen et al 2022	Potencialização da eficácia da vacina, aumento da ativação de células T e produção de citocinas pró-inflamatórias.	Indução de morte imunogênica combinada com inibição deIDO para suprimir a resposta imunológica negativa e aumentar a ativação de células T.

Tabela 2 - Levantamento de literatura quanto aos estudos clínicos desenvolvidos com novos tratamentos contra melanoma.

2. Justificativa do Estudo

O desenvolvimento de pesquisas na área de novas alternativas terapêuticas, em especial aquelas indutoras de morte imunogênica, é importante porque a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à esta morte pode levar ao desenvolvimento de estratégias mais eficazes e direcionadas (Kepp et al, 2017). A elucidação desses mecanismos pode revelar novos alvos terapêuticos e otimizar as abordagens existentes. Além disso, explorar combinações terapêuticas pode aumentar significativamente a eficácia do tratamento. A integração de diferentes modalidades de tratamento, como a combinação de vacinas baseadas em morte imunogênica com inibidores de checkpoint imunológico, pode atuar de maneira sinérgica para melhorar as respostas imunológicas e os resultados clínicos. O aumento do número de estudos pré-clínicos e clínicos que investiguem essas combinações são essenciais para determinar as melhores estratégias terapêuticas (Kroemer et al, 2013).

Finalmente, a pesquisa contínua é crucial para abordar as preocupações de segurança e eficiência a longo prazo. Estudos mais extensivos e rigorosos são necessários para avaliar os efeitos adversos potenciais e garantir que os benefícios do tratamento superem os riscos. Este estudo pretende abordar algumas lacunas e desafios, contribuindo para um avanço no campo da imunoterapia do melanoma. Ao preencher essas lacunas, a pesquisa pode oferecer novas esperanças para pacientes com melanoma, melhorando a eficácia e a segurança das terapias baseadas em morte imunogênica.

3. Objetivos

- Geral

Avaliar os efeitos do tratamento com células tumorais B16 em morte imunogênica no curso do melanoma induzido por enxerto.

- Específicos

- I. Determinar o tipo de morte celular em células B16 tratadas com diferentes concentrações de medicamentos (Doxorrubicina e Paclitaxel) *in vitro*

Metas:

Avaliar a viabilidade celular da B16 frente aos tratamentos.

Avaliar a concentração de ATP no sobrenadante de células tratadas.

Avaliar translocação de calreticulina nas células tratadas.

- II. Avaliar o tipo de ativação *in vitro* do processo de reconhecimento celular de células B16 em morte imunogênica por células dendríticas.

Metas:

Avaliar a ativação das DCs pela secreção de citocinas após o co-cultivo.

- III. Avaliar o curso do desenvolvimento do melanoma murino a partir do tratamento com vacinas profiláticas ou terapêuticas de células B16 em morte imunogênica.

Metas:

Avaliar histologicamente a massa tumoral desenvolvida.

Avaliar peso dos órgãos dos animais.

Avaliar a população de linfócitos T no baço dos animais

4. Metodologia

I. Avaliação da morte celular em células B16F10 tratadas com diferentes concentrações de drogas in vitro

I.a. Cultivo celular

Foram utilizadas as células da linhagem B16F10, células de linhagem murina de melanoma, que foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr. João Paulo Longo, do Laboratório de ImunoNano da Universidade de Brasília. As células foram armazenadas em nitrogênio líquido, com uma concentração de 2×10^6 células diluídas em 2 ml de uma solução composta por 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido, marca SIGMA) e 90% de SFB (Soro Fetal Bovino, marca GIBCO). Para o descongelamento das células, os frascos contendo as células foram retirados do nitrogênio líquido, descongelados em banho-maria a 37°C e as células foram centrifugadas de 3 a 5 minutos a 300 g. O sobrenadante contendo DMSO foi descartado e as células foram ressuspensas em meio DMEM (Eagle's Minimal Essential Medium, marca GIBCO) suplementado com 10% de SFB. As células preparadas foram então colocadas em frascos de cultivo pequenos da marca TPP, contendo 20 ml de meio DMEM suplementado. Esses frascos eram mantidos em uma estufa a 37°C com 5% de CO₂ por dois dias. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio de cultura fresco na mesma proporção mencionada anteriormente. Na (ou após) segunda troca de meio, as células foram desaderidas do fundo do frasco com ajuda de um rodinho ou TrypLE (ThermoFisher ref:12604013), foram transferidas para um frasco maior, e mantidas por mais dois dias até a próxima troca de meio. Esse processo era repetido, com trocas de frascos e meio de cultura a cada dois dias, até que fosse alcançado o número de células necessário para o experimento em questão.

I.b. Determinação da viabilidade celular

As células B16-F10 foram plaqueadas em placas de 96 poços, em uma concentração de 4×10^5 células/poço. As células foram expostas a diferentes doses de Doxorubicina, Paclitaxel ou dose única de DMSO.

Após 24 horas de tratamento, os seguintes grupos foram avaliados quanto a sua viabilidade celular

- Controle negativo: apenas meio DMEM.
- Doxorubicina (Merck D2975000) nas doses de 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3,125 μM e 1,625 μM .
- Paclitaxel (Merck Y0000698) nas doses de 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3,125 μM e 1,625 μM .

Após o período de tratamento, o meio foi removido e 150 μl de reagente MTT a 10% foi adicionado para avaliação da viabilidade celular por meio de ensaio colorimétrico. As células permaneceram em contato com o reagente por 3 horas, sendo o sobrenadante descartado. Em seguida, foram adicionados 200 μl de DMSO por 30 minutos, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm.

I.c. Dosagem de ATP

Após o cultivo celular, as células B16-F10 foram soltas da garrafa utilizando um método mecânico, o rodinho (cell scraper), com o objetivo de minimizar o impacto das modificações químicas em moléculas de superfície que podem ser induzidas por agentes químicos que desempenham a mesma função. Foram plaqueadas 4×10^5 células por poço em uma placa de 96 poços, e as células foram colocadas para cultivo com os seguintes tratamentos:

- Controle negativo: apenas meio DMEM.
- Doxorubicina (Merck D2975000) nas doses de 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3,125 μM e 1,625 μM .
- Paclitaxel (Merck Y0000698) nas doses de 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3,125 μM e 1,625 μM .

A placa foi incubada no Varioskan da marca ThermoFisher, que dispensava o anticorpo (RealTime-Glo™ Extracellular ATP Assay, Promega #**GA5010**) a cada 10 minutos, conforme instruções do fabricante e a absorbância dessa mistura foi lida durante 24 horas, permitindo a visualização da curva de liberação de ATP de cada um desses poços nesse intervalo de tempo.

I.d. Translocação de calreticulina

A investigação da translocação da calreticulina foi realizada a partir do cultivo das células B16F10 e posterior tratamento conforme descrito abaixo. Foram plaqueadas 4×10^5 células por poço em uma placa de 24 poços, e as células foram submetidas aos seguintes tratamentos:

- Controle negativo: apenas meio DMEM.
- Doxorubicina (Merck D2975000) nas doses de 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3,125 μM e 1,625 μM .
- Paclitaxel (Merck Y0000698) nas doses de 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM , 3,125 μM e 1,625 μM .

Após 24 horas de cultivo com os tratamentos, as células foram centrifugadas, marcadas com anticorpo anti-calreticulina (Invitrogen, #PA3-900) e observadas sob microscópio de fluorescência (Evos, ThermoFischer – Filtro GFP).

II. Avaliação do processo de reconhecimento celular das células B16-F10 em morte imunogênica pelas células dendríticas *in vitro*:

II.a. Co-cultivo

Para a obtenção das células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDM), foram utilizados camundongos C57Bl/6 como fonte de células precursoras. As células precursoras foram obtidas da medula óssea dos fêmures e tíbias dos camundongos. O lavado das células precursoras foi realizado utilizando RPMI-1640 suplementado com 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina. Após a centrifugação a 300g por 5 minutos a 4°C, as células foram ressuspensas em um tampão de lise de hemácias (Red Blood Cell Lysis Buffer; Sigma-Aldrich) e lavadas novamente. Em seguida, as células foram contadas em uma câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para 2×10^5 células/mL em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 20 ng/mL do fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos GM-CSF (eBioscience), 50 μM de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) e gentamicina. As células foram

plaqueadas em uma placa de Petri contendo 10 mL de meio e incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após 72 horas, foram adicionados mais 10 mL de RPMI suplementado. No sexto dia de cultivo, 10mL foram retirados da placa, centrifugados e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspensionado em 10 mL de RPMI suplementado e as células foram retornadas à placa. No oitavo dia, o sobrenadante foi coletado e centrifugado por 5min a 300g, e TrypLE Express (Invitrogen) foi adicionado à placa durante 20 minutos em estufa a 37 °C para desalojar as células aderidas.

As células coletadas foram centrifugadas e ressuspensionadas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino 10% e a viabilidade das células foi avaliada através de contagem em câmara de Neubauer usando azul de Trypan. As células foram ressuspensionadas a 10⁶ células/mL em meio RPMI suplementado com gentamicina e 10% de SFB e colocadas em uma placa de cultura para descansar por 24 horas. O conteúdo da placa será centrifugado, o sobrenadante foi descartado, e um novo meio RPMI com 10% de SFB foi adicionado.

Células da linhagem B16F10: As células B16-F10 foram cultivadas como informado anteriormente.

Células T e B: Os linfócitos foram obtidos a partir do baço de animais C57BL/6. Os animais foram eutanasiados e o baço retirado, uma vez extraído, o baço é transferido para uma placa de Petri contendo meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (gentamicina). Em seguida, o baço é triturado mecanicamente utilizando duas pinças para despedaçar o baço, de modo a liberar as células esplênicas no meio de cultura. Este processo deve ser realizado com cuidado para garantir a dissociação completa do tecido sem comprometer a integridade celular. O homogeneizado resultante é então filtrado através de uma malha de nylon com poros de 40µm para remover detritos e agregados celulares. O filtrado é coletado em tubos cônicos de 50 mL e submetido a uma centrifugação a 300g por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante é descartado e o pellet celular é ressuspensionado em tampão de lise de hemácias (Red Blood Cell Lysis Buffer; Sigma-Aldrich) para eliminar os eritrócitos presentes na suspensão

celular. A suspensão é incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, seguida de uma nova centrifugação nas mesmas condições anteriores. O pellet celular é então ressuspendido em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB. As células são contadas utilizando uma câmara de Neubauer e a viabilidade celular é avaliada através da coloração com azul de Trypan. A concentração celular é ajustada conforme necessário para os experimentos subsequentes.

As células foram então plaqueadas na proporção de 1 célula DC para 5 células B16F10 para 10 linfócitos. Esse cultivo era mantido por 24h ou 48h e o sobrenadante coletado para análises posteriores.

ELISA

Foram analisadas as citocinas secretadas pelas DC pelo método de Elisa. Foram analisadas as citocinas IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-10 e IL-1b, conforme instrução do fabricante (Invitrogen, referências 88706488, 88732488, 88731488, 14712268, 88710588 e 88701388 respectivamente). A intensidade da reação foi determinada utilizando um leitor de microplacas, em comprimento de onda de 450nm.

III. Avaliação da sobrevivência de animais tratados com vacinas profiláticas ou terapêuticas de células B16F10 em morte imunogênica e determinação de biomarcadores:

III.a. Animais

Foram utilizados 42 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem C57Bl/6 de idade entre 8 e 12 semanas provenientes do biotério do Biotério da Universidade Federal de Uberlândia e estes foram acomodados em caixas com sistema de purificação de ar, ração e água livres de contaminantes, sob livre demanda. Os animais receberam a vacinação e a indução tumoral sob anestesia inalatória com isoflurano, as vacinações foram aplicadas de forma subcutânea no flanco esquerdo enquanto a indução tumoral foi aplicada de forma subcutânea no flanco direito, ambas foram feitas usando agulha de 4mm para minimizar danos ao animal. Na eutanásia, os animais foram anestesiados com tiopental e

colocados na câmara de CO₂ conforme previsto no CEUA de nº 23106.066588/2023-86.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- Vacinação (V)
- Indução Tumoral (T)
- Eutanásia (E)

Os esquemas de tratamento seguem os modelos apresentados abaixo:

Cada grupo foi iniciado com 6 animais e seguiram os seguintes cronogramas:


















	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7
Vac Profilática								
Vac Terapêutica								
Vacina sem tumor								
Controle tumor								
Controle sem intervenção								

Figura 4 - Esquema de tratamento in vivo

1 - Grupo de Vacinação profilática:

Os animais receberam três doses vacinais com intervalos de sete dias entre elas no flanco esquerdo, uma semana após a última vacina tiveram a indução do tumor no flanco direito. Quatro semanas após a indução, os animais foram eutanasiados.

2- Grupo de Vacinação terapêutica:

Os animais receberam indução tumoral no flanco direito e após uma semana da indução passaram por três doses de vacinação separadas por sete dias no flanco esquerdo. Uma semana após a última vacinação, os animais foram eutanasiados.

3- Grupo Vacinação profilática sem tumor:

Os animais receberam três doses vacinais separadas por 7 dias e foram eutanasiados uma semana após a última dose.

4- Grupo Controle somente tumor:

Os animais receberam indução de tumor no flanco direito e foram eutanasiados 4 semanas após o procedimento

5- Grupo Controle Negativo:

Os animais não receberam nenhuma intervenção.

III.b. Vacinações

Vacinação utilizando células em morte imunogênica:

As vacinações foram feitas a partir de células B16F10 em cultivo com meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino. As células eram desaderidas com o auxílio de um rodinho (cell Scraper), contadas para 1×10^5 células por animal e colocadas em nova garrafa com PBS (Tampão Fosfato Salino) com doxorubicina na dose de 50uM. Após 24 horas nesta solução, as células foram centrifugadas, ressuspensas em PBS por três vezes consecutivas e então ressuspensas em volume correspondente a 100µL por animal e aplicadas no flanco esquerdo do animal anestesiado com anestesia inalatória de isofluorano.

Vacinação utilizando células em morte necrótica:

As vacinações foram feitas a partir de células B16F10 em cultivo com meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino. As células eram desaderidas com o auxílio de um rodinho (cell Scraper), contadas

para 1×10^5 células por animal e colocadas em nova garrafa com PBS (Tampão Fosfato Salino). Após 24 horas nesta solução, as células foram centrifugadas, ressuspendidas em PBS limpo em volume correspondente a $100 \mu\text{L}$ por animal, colocadas no banho maria a 50°C por um minuto e imediatamente colocadas a -80°C por mais um minuto, este passo era repetido três vezes. Já em processo de necrose, as células eram aplicadas no flanco do animal anestesiado com anestesia inalatória de isoflurano.

III.c. - Indução do tumor

Para indução do tumor, foram usadas células B16F10 em cultivo com meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino, as células viáveis eram desadheridas com o auxílio do rodinho e contadas para atingir $3,5 \times 10^5$ por animal. As células foram lavadas e ressuspendidas em PBS em um volume de $100 \mu\text{L}$ por dose, e injetadas no flanco oposto ao usado na vacinação com os animais anestesiados por uma mistura de anestésico (Quetamina, marca Ceva - Dopalen) e relaxante muscular (Xilazina, marca Ceva - Anasedan).

III.d. Avaliação da atividade in vivo das vacinações

Após a eutanásia dos animais, foram retirados o fígado, o baço, o pulmão e o tumor. Pulmão e fígado foram usados apenas para pesagem e em seguida foram descartados. O tumor foi pesado, fotografado e seccionado para análise de HE e imuno-histoquímica. O baço, por sua vez, foi pesado e usado para obtenção de linfócitos para citometria de fluxo e para o co-cultivo descrito anteriormente.

III.e. Análise HE e Imunohistoquímica

As amostras de tumores dos animais foram colocadas em cassetes e preservadas em formol 10% tamponado até serem enviadas ao Laboratório externo para confecção das lâminas. As amostras foram preparadas e seccionadas em cortes de 5 mm, que foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) ou marcadas com anticorpo anti CD4, CD8, S100 e KI67 por André Rezende, parceiro do laboratório. As lâminas foram

levadas para o Laboratório MICRA para escaneamento e foram analisadas posteriormente.

III.f. Caracterização de células T purificadas

Inicialmente, foi preparada uma suspensão de células a partir de baço de camundongos. As células foram ressuspendidas em um volume adequado de meio de ligação, tampão PBS com 2% de soro fetal bovino (FBS) e 1 mM de EDTA, a uma concentração de 5×10^7 células/mL. Foi adicionado a mistura de anticorpos EasySep Mouse T Cell Isolation Cocktail (EasySep™ Mouse T Cell Isolation Kit - Catalog #19851 - StemCell) à suspensão celular. Esta mistura contém anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a células não-T, como células B, células NK, monócitos, granulócitos, células dendríticas e eritrócitos. A suspensão celular foi incubada com a mistura de anticorpos por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação com os anticorpos, foram adicionadas as partículas magnéticas EasySep Dextran RapidSpheres à suspensão celular e incubadas por mais 5 minutos à temperatura ambiente. O tubo contendo a suspensão celular foi colocado em um separador magnético EasySep. O tubo permaneceu por cerca de 3 minutos no separador magnético e com o auxílio de uma pipeta, o sobrenadante foi retirado. As células foram contadas e marcadas com anticorpos para serem analisadas em citometria de fluxo.

III.g. Citometria de fluxo

A marcação das células envolve a incubação com anticorpos específicos conjugados a fluorocromos, que são moléculas fluorescentes. Esses anticorpos são escolhidos com base nos marcadores de superfície ou intracelulares que se deseja analisar. A escolha dos fluorocromos é crítica e deve considerar a compatibilidade com o citômetro de fluxo disponível, evitando a sobreposição espectral que pode causar interferência na detecção dos sinais fluorescentes. Neste trabalho foram selecionados os seguintes anticorpos:

- CD3 - BioLegend #100221
- CD4- BD Pharmigen #552775

- CD62L- BioLegend #104405
- CD45RA – BD Pharmingen #564359
- CD127- BioLegend #135009
- CD44 - BioLegend #103011

Todos os anticorpos foram usados nas concentrações indicadas pelo fabricante. A incubação dos anticorpos com as células geralmente ocorre em um período de 20 a 30 minutos, em temperatura adequada (geralmente 4°C ou temperatura ambiente), e em condições de escuridão para proteger os fluorocromos da fotodegradação.

Após a incubação, as células são lavadas novamente com a solução tampão para remover o excesso de anticorpos não ligados. Em alguns casos, pode ser necessário realizar uma fixação das células, especialmente quando se deseja analisar marcadores intracelulares. A fixação é feita com agentes como formaldeído, que preservam a integridade celular e permitem a permeabilização das membranas para a marcação intracelular.

III.h. Análise estatística

Todos os resultados desta parte do trabalho foram analisados com desvio padrão da média (SEM) da triplicata biológica feita de um dos experimentos independentes, de um total de três análises técnicas. Para avaliar estatisticamente diferenças entre grupos experimentais a análise da variância (ANOVA), seguida pelos métodos Sidak, Turkey e Dunnett's foram utilizados pelo software GraphPad Prism (versão 9.0). Os dados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

O tamanho amostral de cada grupo terá $n=5$, já que: o tamanho amostral (n) de acordo com a fórmula proposta pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Brasília

(CEUA-UnB):

$$n= 1 + [2C*(s/d) 2]$$

Onde:

$$C= (z\alpha + z\beta) 2$$

α = nível de significância

β = poder do teste

z= valor tabelado

s= desvio padrão

d= diferença esperada entre os grupos

Considerando o poder do teste 90% e nível de significância 0,05, o valor de: C será de $(1,96 + 1,282)^2 = 10,51$

Considerando ainda um desvio máximo de 20% (s= 0,2) e uma diferença esperada entre os grupos de 50% (d= 0,5), ao aplicarmos a fórmula:

$$n = 1 + [2 * 10,51 * (0,2/0,5)^2]$$

$$n = 4,36$$

O tamanho amostral calculado é de 4,36, que será arredondado para o próximo número inteiro. Logo n= 5 por grupo.

5. Resultados e Discussão

5.1. Indução de Morte Celular Imunogênica em células B16 tratadas com Doxorubicina:

Como o primeiro passo no desenvolvimento de alternativas terapêuticas no tratamento do melanoma, avaliamos os fármacos doxorubicina e o paclitaxel, comumente utilizadas no tratamento deste tumor, para indução da morte imunogênica. Inicialmente realizamos os ensaios de viabilidade celular, com diferentes doses das drogas em estudo (Figura 5).

Na figura 5a, observamos a viabilidade frente a concentrações de doxorubicina, sendo uma medicação bem efetiva capaz de alcançar o IC50 a partir da concentração de 3,12 μ M. Na figura 5b, temos o resultado frente ao paclitaxel. O Paclitaxel atingiu o IC50 apenas em dosagens maiores que 100 μ M mostrando que esse tratamento não é ideal para combater essa linhagem células de melanoma (Hickman, J.A. 1992). O método de viabilidade celular utilizando o ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é

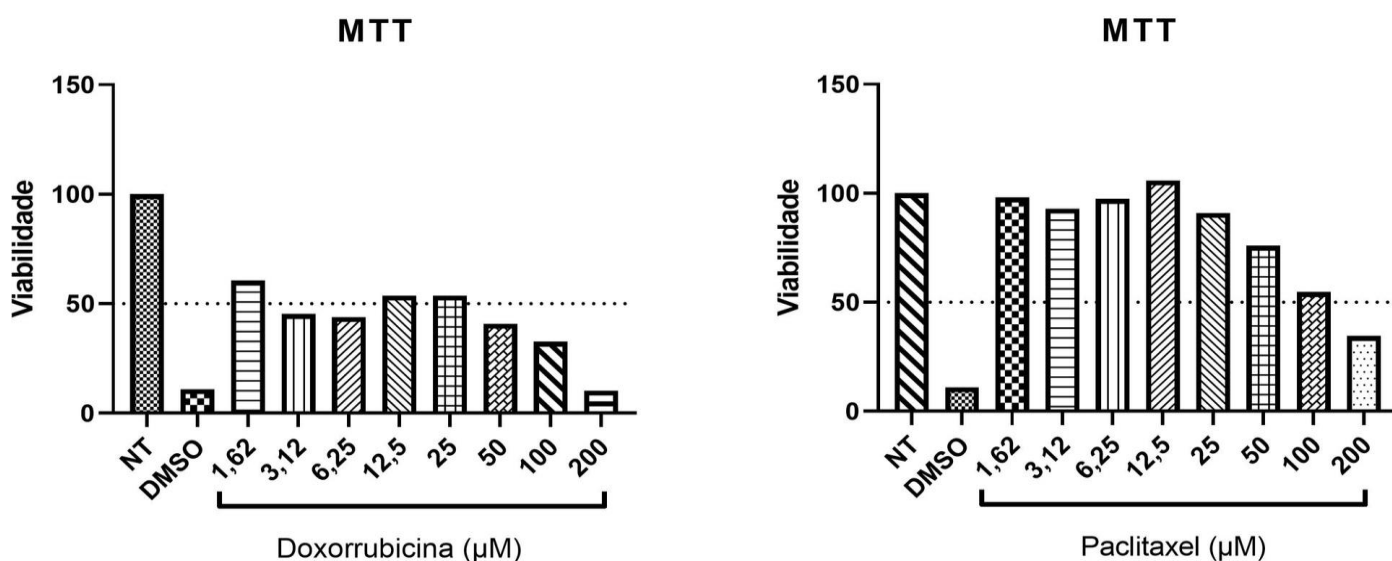


Figura 5 – Avaliação de viabilidade celular por teste de MTT. Células B16F10 foram cultivadas em meio de cultura DMEM com gentamicina e SFB 10% com diferentes doses dos tratamentos (200 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M, 3,12 μ M e 1,62 μ M) com quimioterápicos para avaliar a viabilidade celular após 24h de interação. (a) Células B16F10 cultivadas em garrafa para cultivo e meio RPMI suplementado, tratadas com Doxorubicina (DOX) em doses de 200 μ M de concentração até 1,62 μ M de concentração. (b) Células B16F10 cultivadas em garrafa para cultivo e meio DMEM suplementado tratadas com Paclitaxel (PTX) em doses de 200 μ M de concentração até 1,62 μ M de concentração. Experimento repetido em triplicata biológica e experimental.

amplamente empregada em estudos de citotoxicidade e avaliação de proliferação celular (Van Tonder et al, 2015; Riss et al, 2016).

No tratamento do melanoma em humanos, o paclitaxel é frequentemente administrado em doses de aproximadamente 175 mg/m² por infusão intravenosa a cada três semanas, enquanto a doxorubicina é utilizada em doses de 60-75 mg/m² a cada 21 dias, dependendo da resposta do paciente e da tolerância aos efeitos colaterais (Hauschild et al 2009; Lopez et al 1984). Em estudos in vitro, as concentrações de paclitaxel e doxorubicina variam amplamente, mas são geralmente ajustadas para atingir níveis eficazes que induzem morte celular sem causar toxicidade excessiva às células normais, neste estudo delimitamos essa dosagem como sendo, no mínimo 3,12uM para Doxorubicina e 100uM para Paclitaxel baseado nos resultados vistos anteriormente.

A seguir, foi dosado a concentração de ATP liberado no meio de cultura das células submetidas aos tratamentos, para comprovar o tipo de morte celular induzida pelos fármacos em cultura de células tumorais B16F10 (Figura 6). Na figura 6a, as células tratadas com doses de 25uM mostram diferença na liberação de ATP que atinge um pico em 50uM e por essa razão, continuamos esse trabalho com a dose de 50uM no tratamento das células. Na figura 6b, foi utilizado o paclitaxel como imunoterápico e não se observou nenhum pico de liberação de ATP mesmo nas concentrações 100uM e 200uM, doses estas que haviam atingido o IC50 (figura 5b).

A liberação de ATP na morte imunogênica é um processo importante, uma vez que corresponde a um dos sinais de perigo, conhecidos como padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (Ma et al 2013). O aumento de ATP no sobrenadante indica que as células estão passando por um processo de morte imunogênica, uma vez que a ICD é um processo de morte celular que ativa o sistema imunológico, e a liberação aumentada de ATP é um dos eventos chave nesse processo. O ATP liberado atua como um sinal de "perigo" que atrai células dendríticas e outros componentes do sistema imunológico para o local da célula moribunda, promovendo uma resposta imune adaptativa eficaz. A pesquisa de Galluzzi et al. (2020) destaca que a liberação de ATP é um evento crucial na MCI, promovendo a ativação de células dendríticas e a subsequente resposta imune contra tumores.

Além disso, o estudo de Di Virgilio et al. (2021) reforça o papel do ATP extracelular como um mediador chave na comunicação entre células moribundas e o sistema imunológico, facilitando a apresentação de antígenos e a ativação de células T. Esses achados são fundamentais para o desenvolvimento de terapias que visam melhorar a eficácia das respostas imunes antitumorais. Esses mecanismos são fundamentais para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que buscam aproveitar a MCI para melhorar a eficácia das imunoterapias contra o câncer. O ATP, outro DAMP importante, é liberado no microambiente extracelular durante a morte imunogênica. O ATP atua como um quimioatraente para células dendríticas imaturas e outras células do sistema imunológico, promovendo sua migração para o local da morte celular. Além disso, o ATP ativa receptores purinérgicos em células dendríticas, estimulando a maturação dessas células e aumentando sua capacidade de apresentar antígenos às células T (Elliot, M. R. & Ravichandran, K. S. 2016). Baseado nos resultados obtidos, delimitamos a dose de Doxorubicina em 50 μ M e excluímos Paclitaxel como indutor de morte imunogênica neste trabalho.

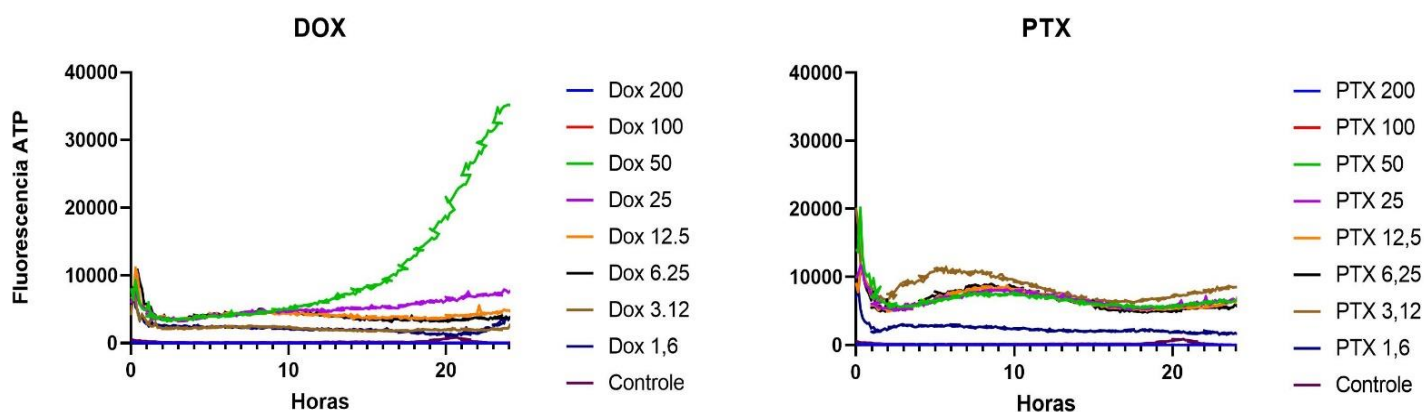


Figura 6 – Liberação de ATP frente a tratamentos em doses diversas. As células B16/F10 foram cultivadas em garrafas com meio de cultura DMEM, gentamicina e 10% de SFB e diferentes doses de quimioterápicos (200 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 12.5 μ M, 6.25 μ M, 3.12 μ M e 1,62 μ M) por 24 horas incubadas no Varioskan com dispensação de anticorpo anti-ATP e medições de fluorescência a cada 30min. Curva de fluorescência de ATP após 24h de tratamento em diferentes dosagens. (a) células B16F10 tratadas com Doxorubicina em dosagens de 200 μ M a 1,6 μ M. (b) células B16F10 tratadas com Paclitaxel em dosagens de 200 μ M a 1.6 μ M. Experimento repetido em triplicata biológica e duplicata experimental.

Continuando a avaliação da indução de morte imunogênica, foram feitas induções de morte com doxorubicina e as células foram posteriormente

marcadas com um anticorpo anti-calreticulina para mostrar a migração da calreticulina para a membrana plasmática (figura 7).

A importância da migração da calreticulina no processo de morte imunogênica é um aspecto crucial na compreensão da resposta imune antitumoral. A calreticulina é uma proteína chaperona localizada predominantemente no retículo endoplasmático, onde desempenha funções essenciais na homeostase do cálcio e no dobramento de proteínas. A importância da migração da calreticulina no processo de morte imunogênica é um aspecto crucial na compreensão da resposta imune antitumoral.

A calreticulina é uma proteína chaperona localizada predominantemente no retículo endoplasmático, onde desempenha funções essenciais na homeostase do cálcio e no dobramento de proteínas. No entanto, durante a morte imunogênica, a calreticulina é translocada para a superfície celular, onde atua como um sinal de perigo ou "eat-me signal" para o sistema imunológico (Obeid et al 2007). Na figura 7, vemos que quando existe contato entre as células tumorais e o quimioterápico, a marcação feita pelo anticorpo anti-calreticulina é majoritariamente na membrana plasmática (7a e 7b) enquanto no grupo que não entra em contato (7c) a marcação é majoritária no citoplasma.

A exposição da calreticulina na superfície das células em processo de morte celular é um evento chave na indução de uma resposta imune eficaz contra tumores. A calreticulina na superfície celular é reconhecida por receptores específicos, o receptor mais conhecido que interage com a calreticulina é o receptor de lipoproteína de baixa densidade relacionado à proteína 1 (LRP1), também conhecido como CD91, em células fagocíticas, como macrófagos e células dendríticas, promovendo a fagocitose das células tumorais apoptóticas. Este processo é essencial para a apresentação de antígenos tumorais às células T, iniciando uma resposta imune adaptativa que pode levar à eliminação das células tumorais remanescentes (Fucikova et al 2020; Obeid et al 2007).

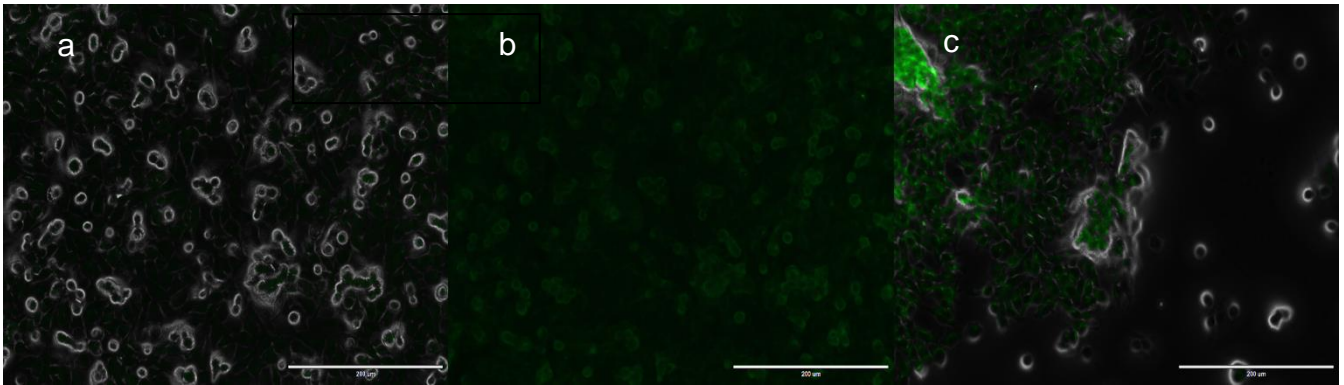


Figura 7 – Microscopia de fluorescência de células B16F10 tratadas. Células B16F10 foram descongeladas e cultivadas em garrafa por 2 dias, então desadidas, contadas e plaqueadas na concentração de 4×10^5 em placas de 24 poços. As células ficaram 24 horas em placa para adesão antes do tratamento com doses de $1 \mu\text{M}$ (imagens 1 e 4), $5 \mu\text{M}$ (imagens 2 e 5) e $10 \mu\text{M}$ (imagens 3 e 6). As células foram expostas ao tratamento por 24 horas em estufa a 37°C .

Além disso, a migração da calreticulina para a superfície celular está associada à liberação de outros sinais de perigo, como ATP e HMGB1, que juntos orquestram uma resposta imune coordenada. A presença de calreticulina na superfície das células tumorais é, portanto, um marcador importante de morte imunogênica e um indicativo de que a terapia antitumoral está induzindo uma resposta imune desejada (Garg et al 2012; Obeid et al 2007).

5.II. Avaliação do processo de reconhecimento celular das células B16F10 em morte imunogênica pelas células dendríticas *in vitro*:

A interação das DCs e as células tumorais é importante para a correta ativação da resposta imunológica do indivíduo então foi realizado o cocultivo celular, com células tumorais tratadas ou não com doxorrubicina, células dendríticas de animais C57Bl/6 e linfócitos da mesma linhagem de camundongos. Tal cultivo teve como objetivo entender qual as vias ativadas durante esse processo de reconhecimento e combate ao crescimento das células tumorais de melanoma. Para garantir que as células usadas neste experimento eram células dendríticas e validar nossa metodologia, uma imunofenotipagem foi feita com células após a diferenciação e marcadas com CD11c (Figura 8).

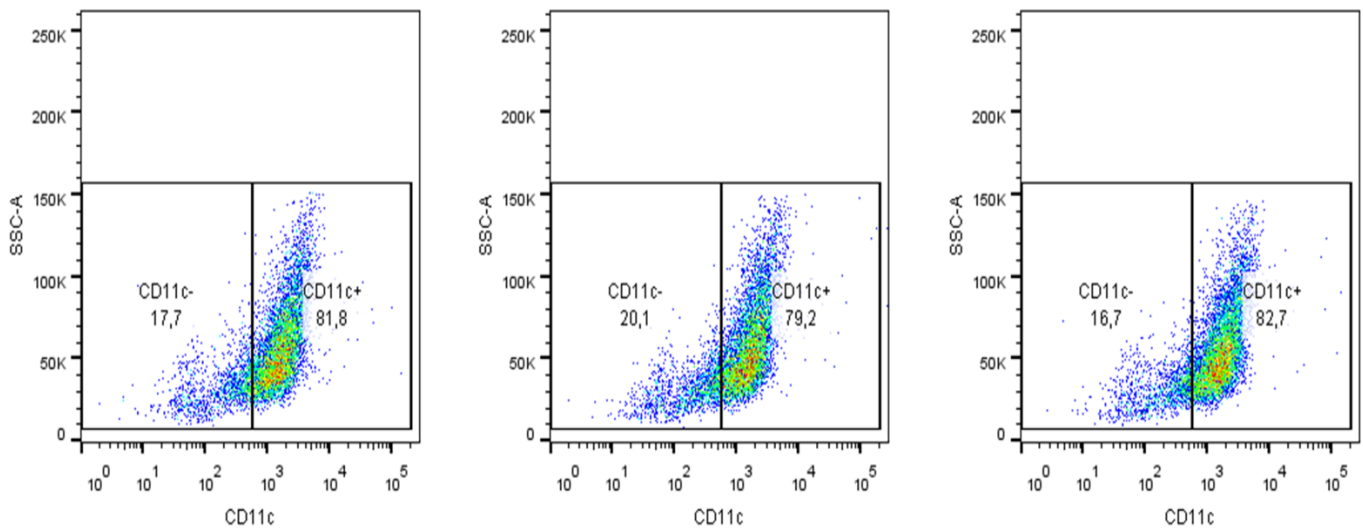


Figura 8 - Imunofenotipagem de células dendríticas. As células foram retiradas da medula de animais C57Bl/6 de 8 a 12 semanas de idade e submetidas ao protocolo de diferenciação com GM-CSF. Após o fim dos 10 dias de diferenciação, as células foram marcadas com CD11c e levadas para análise no citômetro em triplicata.

No gráfico 9A, temos a dosagem da citocina IL-1b nas células submetidas ao co-cultivo, e não houve diferença estatística entre os grupos após 24 horas de cultivo e na figura 9B apenas a comparação entre o grupo com célula DC e linfócitos e o grupo com esses mesmos componentes e a célula tumoral tratada e o estímulo do LPS apresenta diferença. Em 9C e 9D temos a dosagem após 48 horas de co-cultivo, em 9c vemos diferença estatística entre os grupos DC e ou DC+Linfócito quando comparados aos grupos experimentais com DC+Linfócitos+Célula tumoral tratada com ou sem a presença de LPS (9d). Percebemos nesse resultado, que a presença da célula tumoral saudável (B16v) não é suficiente para o aumento da produção de IL1b (B16v+DC) e que nem a célula morta por outro mecanismo (B16+DMSO) ou a célula saudável (B16) produz essa citocina sendo atribuída ao processo de morte imunogênica este aumento como visto em Leucemia por Long et al (2023).

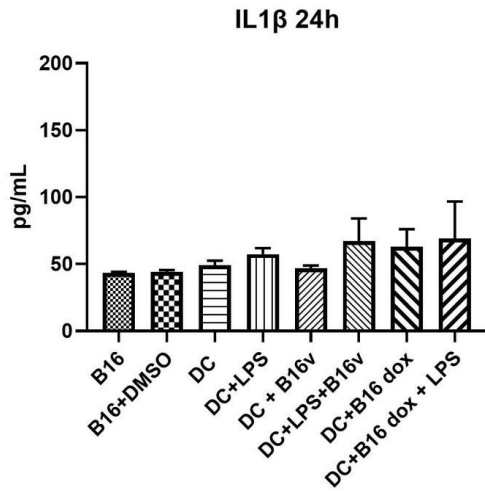
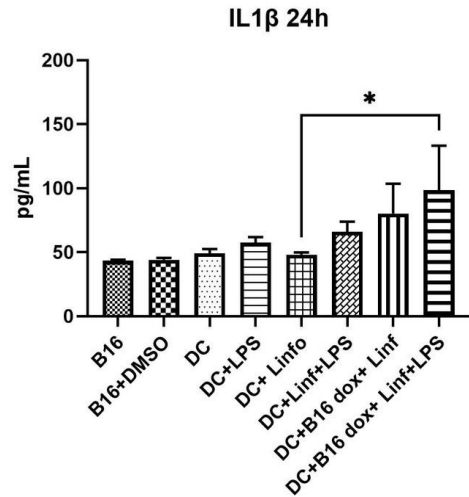
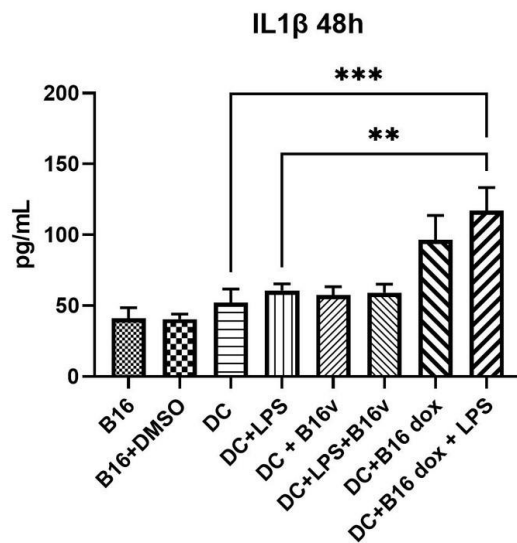
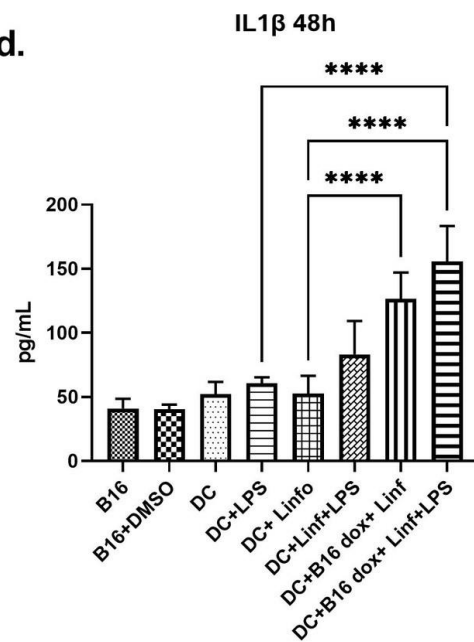
a.**b.****c.****d.**

Figura 9 – Dosagem de IL-1 β Células B16F10 foram cultivadas em garrafa de cultura com meio DMEM suplementado com gentamicina e soro fetal bovino, foram contadas e adicionadas 5×10^4 por poço e tratadas com 50 μ M de Doxorrubicina por 24 horas. As células tratadas foram centrifugadas e lavadas com meio DMEM suplementado antes de adicionarmos as células dendríticas que foram obtidas por meio de lavado de medula de animal C57Bl/6 seguido de uma diferenciação celular, na concentração de 1×10^5 células por poço e 1×10^6 linfócitos por poço que foram adquiridos a partir do baço de animais C57Bl/6. Essa interação foi mantida em estufa aquecida a 37°C e 5% de CO $_2$ por 24 ou 48 horas, seu sobrenadante foi coletado e o ELISA foi realizado conforme indicação do fabricante. Experimento repetido em triplicata biológica. p significativa quando < 0,01.

No contexto antitumoral, as DCs imaturas, que residem em tecidos periféricos, capturam antígenos tumorais através de fagocitose, endocitose ou pinocitose. A presença de sinais de perigo, como os DAMPs liberados durante a morte imunogênica, é fundamental para desencadear a maturação das DCs. Esses sinais incluem a calreticulina, o ATP e a proteína de alta mobilidade do grupo B1 (HMGB1), que interagem com receptores específicos nas DCs, promovendo sua ativação e maturação (Zitvogel et al 2010; Galluzi et al 2017).

A ativação correta das DCs é crucial por várias razões. Primeiramente, ela garante a apresentação eficiente de antígenos tumorais às células T, o que é essencial para a geração de uma resposta imune adaptativa específica contra o tumor. Sem a ativação adequada das DCs, a apresentação de antígenos pode ser insuficiente, resultando em uma resposta imune fraca ou até supressora. Outra razão pela qual a ativação correta das DCs é importante no contexto antitumoral é a indução de memória imunológica.

No entanto, o TME frequentemente apresenta desafios significativos para a ativação adequada das DCs. O TME é caracterizado por condições

imunossupressoras, como a presença de citocinas imunossupressoras (TGF- β , IL-10), Tregs e células supressoras MDSCs, que inibem a função das DCs. Além disso, fatores como a hipóxia e o baixo pH no TME podem prejudicar a maturação e a função das DCs, limitando sua capacidade de apresentar antígenos e ativar células T (Gajewski et al 2013).

Uma abordagem promissora para superar essas barreiras é o uso de vacinas baseadas em DCs, onde são isoladas do paciente, 'treinadas' *ex vivo* com antígenos tumorais e reintroduzidas no paciente para estimular uma resposta imune específica. Outra estratégia envolve o uso de inibidores de checkpoint imunológico, como anticorpos anti-PD-1/PD-L1, que podem reverter a exaustão das células T e aumentar a eficácia da apresentação de antígenos pelas DCs. Além disso, a combinação de diferentes abordagens imunoterapêuticas, como vacinas de DCs e inibidores de checkpoint, pode sinergizar para superar a imunossupressão no TME e gerar respostas antitumorais mais eficazes (Topalian et al 2015).

No contexto antitumoral, citocinas como IL-1 β , TNF, IL-10, IL-6 e IFN- γ têm funções distintas e interdependentes que influenciam a ativação e a eficácia das respostas imunes. No contexto antitumoral, a IL-1 β desempenha um papel

na ativação e maturação das DCs. Ela promove a expressão de moléculas coestimuladoras e a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF, que são essenciais para a ativação de linfócitos T. Além disso, a IL-1 β pode aumentar a infiltração de células imunes no microambiente tumoral, potencializando a resposta antitumoral. Bergsbaken et al (2010), demonstraram que o aumento dessa citocina num contexto de morte celular pode ser associado a piroptose, no entanto, vemos que essa produção foi tardia e provavelmente mediada por linfócito e não associado a morte visto que o grupo DCs com as células tratadas com Doxorrubicina não apresenta esse aumento significativo.

O TNF é outra citocina pró-inflamatória crucial na resposta imune antitumoral. Na figura 10, quando observamos os resultados de 24 horas de interação, vemos diferença estatística apenas no grupo com todos os estímulos (DC+B16dox+Linfócito+LPS) quando comparado ao grupo com apenas DC ou com as mesmas populações celulares e sem o estímulo do LPS. Ao olhar para 48 horas de estímulo, temos diferença onde há presença de LPS que gera uma maior liberação dessa citocina. Assim, o aumento de TNF visto na figura 10, é dual, onde o equilíbrio entre seus efeitos citotóxicos e pró-inflamatórios pode influenciar significativamente a progressão tumoral e a resposta ao tratamento como mostrado por Balkwill, F. (2009) e Aggarwal, B. (2003).

Produzido por várias células do sistema imunológico, incluindo macrófagos, células T e células NK, o TNF pode induzir a apoptose de células tumorais diretamente. O TNF também contribui para a remodelação do microambiente tumoral, facilitando a infiltração de células imunes efetoras (Balkwill et al 2009; Dinarello, C. A. 2011). O fator de necrose tumoral (TNF) apresenta um papel complexo e duplo no contexto tumoral, possuindo tanto

efeitos pró-tumorais quanto antitumorais. Em termos de importância, o aumento

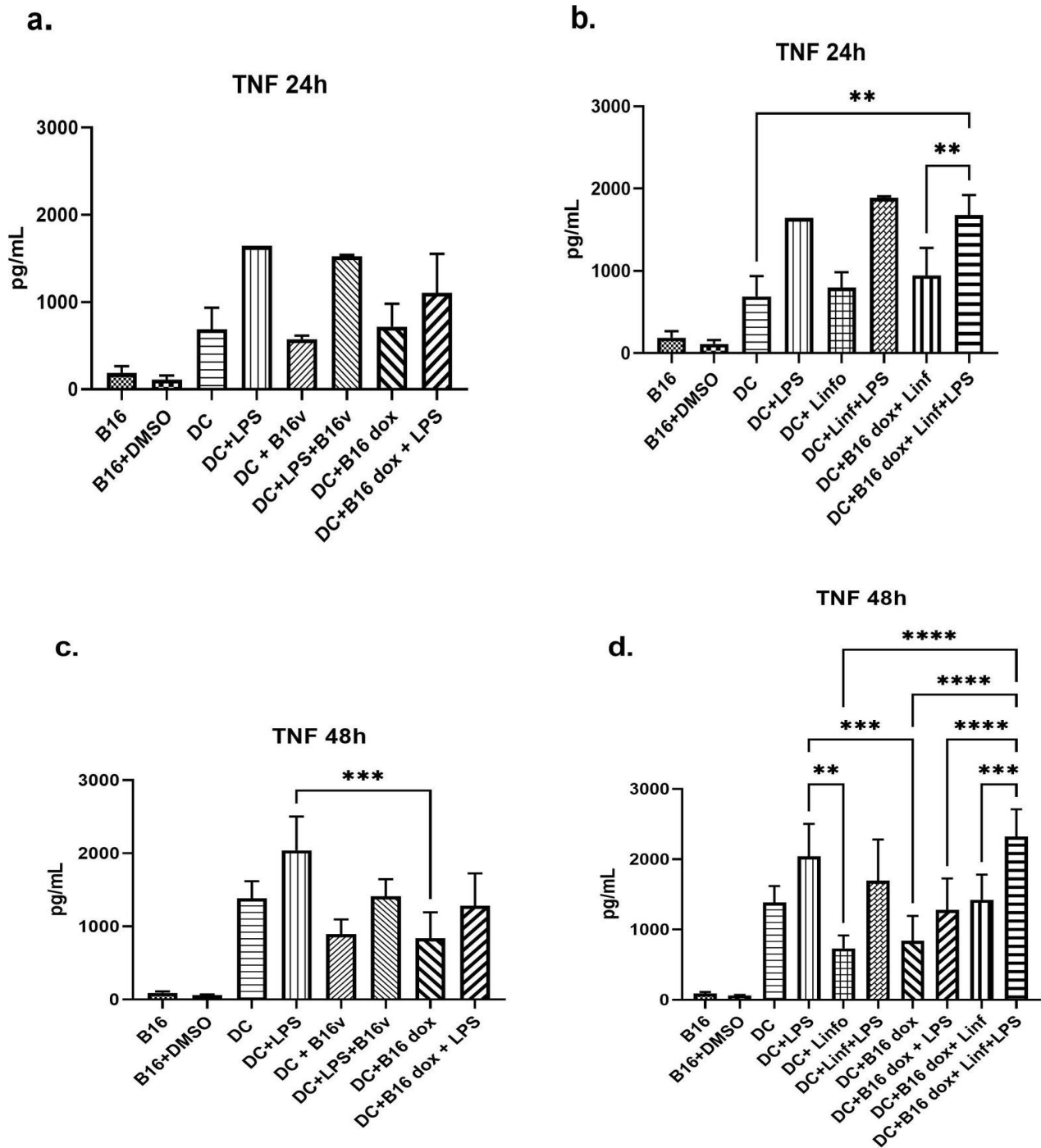


Figura 10 Dosagem de TNF- α . Células B16F10 foram cultivadas em garrafa de cultura com meio DMEM suplementado com gentamicina e soro fetal bovino, foram contadas e adicionadas 5×10^4 por poço e tratadas com 50uM de Doxorubicina por 24 horas. As células tratadas foram centrifugadas e lavadas com meio DMEM suplementado antes de adicionarmos as células dendríticas que foram obtidas por meio de lavado de medula de animal C57Bl/6 seguido de uma diferenciação celular, na concentração de 1×10^5 células por poço e 1×10^6 linfócitos por poço que foram adquiridos a partir do baço de animais C57Bl/6. Essa interação foi mantida em estufa aquecida a 37°C e 5% de CO_2 por 24 ou 48 horas, seu sobrenadante foi coletado e o ELISA foi realizado conforme indicação do fabricante. Experimento repetido em triplicata biológica. p significante quando $< 0,01$.

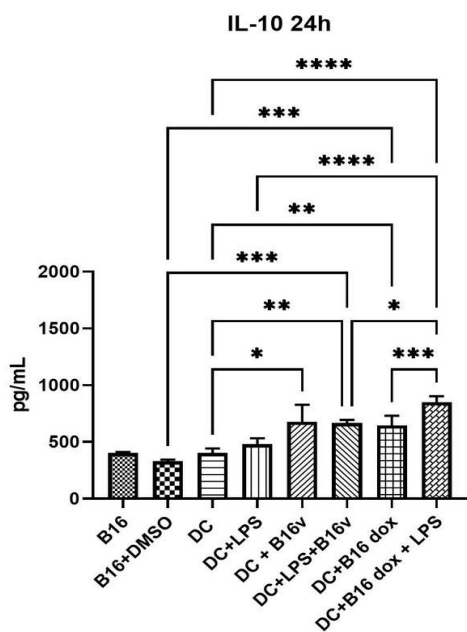
de TNF pode inicialmente parecer benéfico devido à sua capacidade de induzir apoptose em células tumorais e de mediar respostas inflamatórias que recrutam células do sistema imunológico para o local do tumor. No entanto, em um contexto tumoral crônico, níveis elevados de TNF podem promover a progressão do câncer. Isso ocorre porque o TNF pode contribuir para a inflamação crônica, que está associada à promoção do crescimento tumoral, angiogênese e metástase. Além disso, o TNF pode induzir a ativação de vias de sinalização que promovem a sobrevivência celular e a resistência a tratamentos. Em Tian et al (2023) é demonstrada a importância do TNF- α na morte imunogênica juntamente com outras 9 vias imunitárias devido a sua participação na ativação e recrutamento de monócitos.

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que desempenha um papel dual no contexto antitumoral. No gráfico 11, podemos ver que tanto em 24 horas quanto em 48 horas, existe um aumento significativo de IL-10 nos grupos em contato com células em processo de morte imunogênica. Em 11a e 11b, temos a produção de IL-10 em 24 horas de interação mostrando aumento de produção inclusive nos grupos que tem apenas a célula tumoral saudável (B16v) mas o aumento é maior nos grupos que tem a célula em processo de morte imunogênica. Em 48 horas de interação (11c e 11d), vemos a manutenção desses resultados para os grupos com a célula tumoral tratada, mas não temos mais o aumento dessa produção frente a célula tumoral saudável.

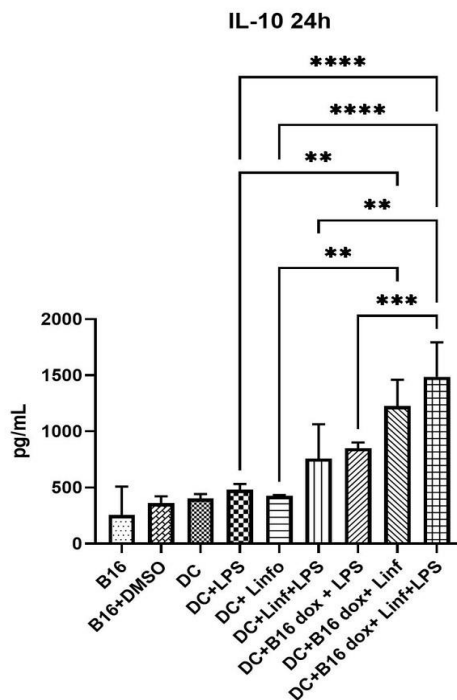
Embora seja conhecida por suas propriedades imunossupressoras, inibindo a função de macrófagos e DCs e promovendo a tolerância imunológica, a IL-10 também pode ter efeitos antitumorais em certos contextos. Por exemplo, a IL-10 pode limitar a inflamação crônica e o dano tecidual, que podem favorecer o crescimento tumoral. Além disso, a IL-10 pode modular a resposta imune de maneira a favorecer a ativação de células T (Mocellin et al 2007; Kundu et al 2002). A literatura indica aumento de IL-10 como uma característica puramente antitumoral nos estudos trazendo morte imunogênica, mas estudos de melanoma como Wiguna et al (2015) trazem indicativos que a análise *in vitro* dessa interação entre célula tumoral e célula imunitária induz o aumento da produção de IL-10.

Na figura 12, temos a produção de IL-6 em 24 e 48 horas de estímulo. Em 12a e 12b, vemos a diminuição da produção dessa citocina nos grupos em

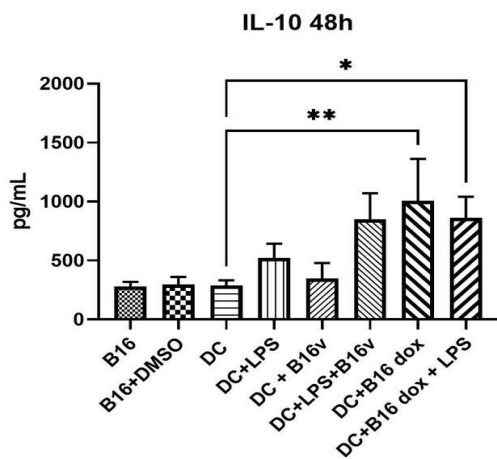
a.



b.



c.



d.

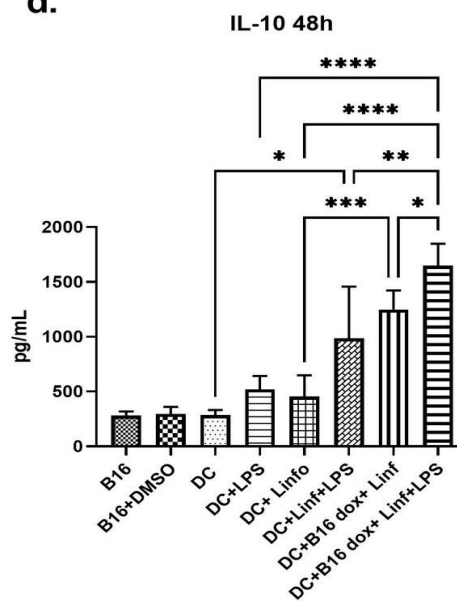


Figura 11 Dosagem de IL-10. Células B16F10 foram cultivadas em garrafa de cultura com meio DMEM suplementado com gentamicina e soro fetal bovino, foram contadas e adicionadas 5×10^4 por poço e tratadas com 50uM de Doxorrubicina por 24 horas. As células tratadas foram centrifugadas e lavadas com meio DMEM suplementado antes de adicionarmos as células dendríticas que foram obtidas por meio de lavado de medula de animal C57Bl/6 seguido de uma diferenciação celular, na concentração de 1×10^5 células por poço e 1×10^6 linfócitos por poço que foram adquiridos a partir do baço de animais C57Bl/6. Essa interação foi mantida em estufa aquecida a 37°C e 5% de CO_2 por 24 ou 48 horas, seu sobrenadante foi coletado e o ELISA foi realizado conforme indicação do fabricante. Experimento repetido em triplicata biológica. p significante quando $< 0,01$.

12d, temos essa diminuição inclusive nos grupos com o estímulo de LPS. A IL-6 pode ter efeitos tanto pró-tumorais quanto antitumorais. Ela é produzida por várias células, incluindo macrófagos, células T e células tumorais. A IL-6 pode promover a ativação e a maturação das DCs, aumentando a apresentação de antígenos e a ativação de linfócitos T. Por outro lado, IL-6 pode estimular a proliferação de células tumorais e proteger essas células da apoptose, contribuindo para o crescimento e a sobrevivência do tumor. Além de estar envolvida na promoção da angiogênese, na imunossupressão no TME e ser capaz de perpetuar um estado de inflamação crônica que está associado à progressão tumoral e à resistência a tratamentos (Scheller et al, 2011; Kishimoto, T. 2005).

O IFN- γ é uma citocina crítica na resposta imune antitumoral, produzida principalmente por células T citotóxicas e células NK. O IFN- γ tem múltiplos efeitos antitumorais, incluindo a indução de apoptose em células tumorais, a inibição da angiogênese tumoral e a promoção da apresentação de antígenos pelas DCs. O IFN- γ aumenta a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) nas células tumorais, tornando-as mais visíveis para as células T citotóxicas. Além disso, o IFN- γ promove a polarização das células T em direção a um fenótipo Th1, que é crucial para a resposta imune citotóxica contra tumores (Ikeda et al 2002; Dunn et al 2004). Na figura 13, é significativa a diminuição de Interferon gama nas primeiras 24 horas de contato (13a e 13b) nos grupos com células dendríticas em contato com a célula B16F10 tratada, que é revertido em 48 horas quando se vê um aumento dessa mesma citocina (13c e 13d) nos grupos em contato com a célula tratada com Doxorubicina com ou sem o estímulo de LPS.

Em Showalter et al (2017), o aumento de IFN- γ durante o processo de morte imunogênica é atribuído aos linfócitos T citotóxicos o que explicaria a produção tardia mostarda na figura 13c e 13d.

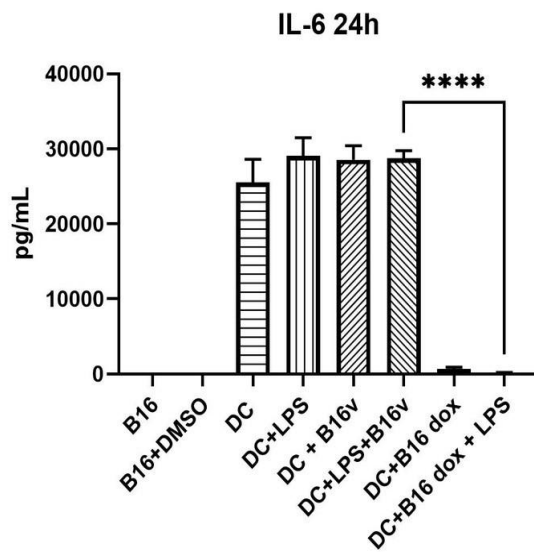
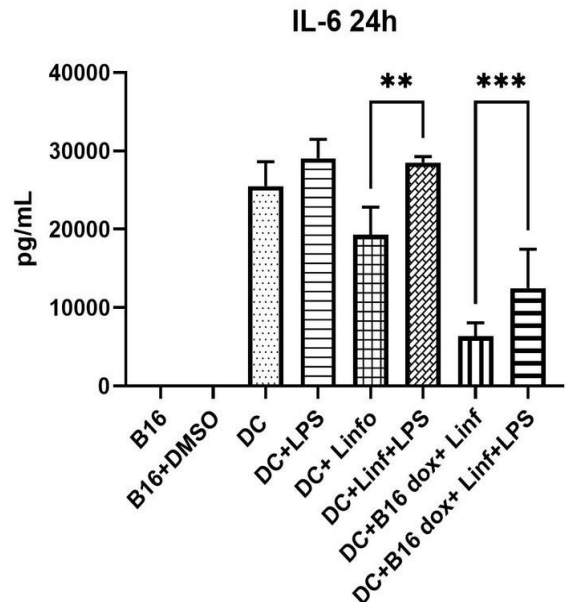
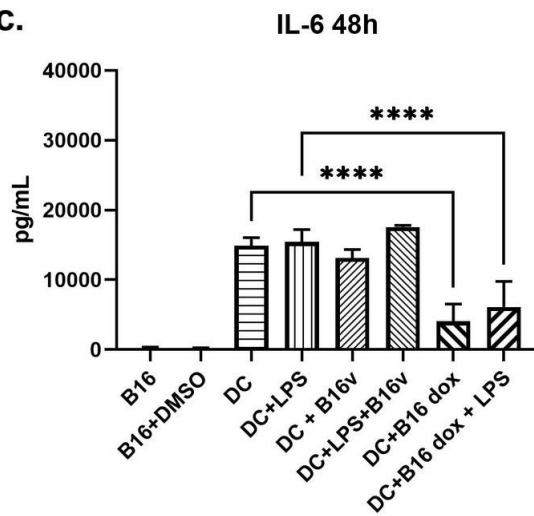
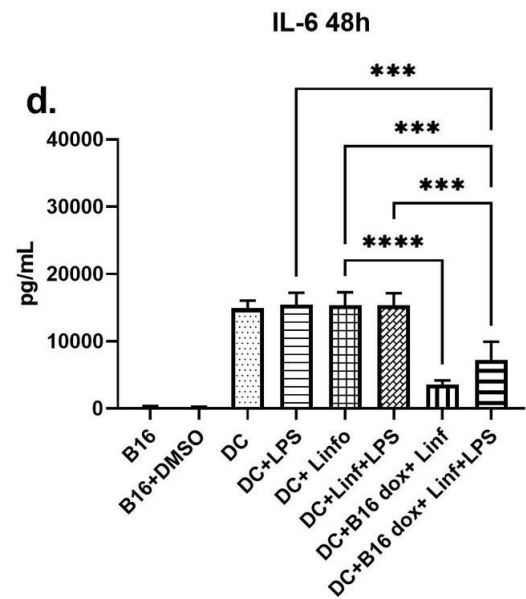
a.**b.****c.****d.**

Figura 12 Dosagem de IL-6. Células B16F10 foram cultivadas em garrafa de cultura com meio DMEM suplementado com gentamicina e soro fetal bovino, foram contadas e adicionadas 5×10^4 por poço e tratadas com 50uM de Doxorubicina por 24 horas. As células tratadas foram centrifugadas e lavadas com meio DMEM suplementado antes de adicionarmos as células dendríticas que foram obtidas por meio de lavado de medula de animal C57Bl/6 seguido de uma diferenciação celular, na concentração de 1×10^5 células por poço e 1×10^6 linfócitos por poço que foram adquiridos a partir do baço de animais C57Bl/6. Essa interação foi mantida em estufa aquecida a 37°C e 5% de CO_2 , por 24 ou 48 horas, seu sobrenadante foi coletado e o ELISA foi realizado conforme indicação do fabricante. Experimento repetido em triplicata biológica. p significante quando $< 0,01$.

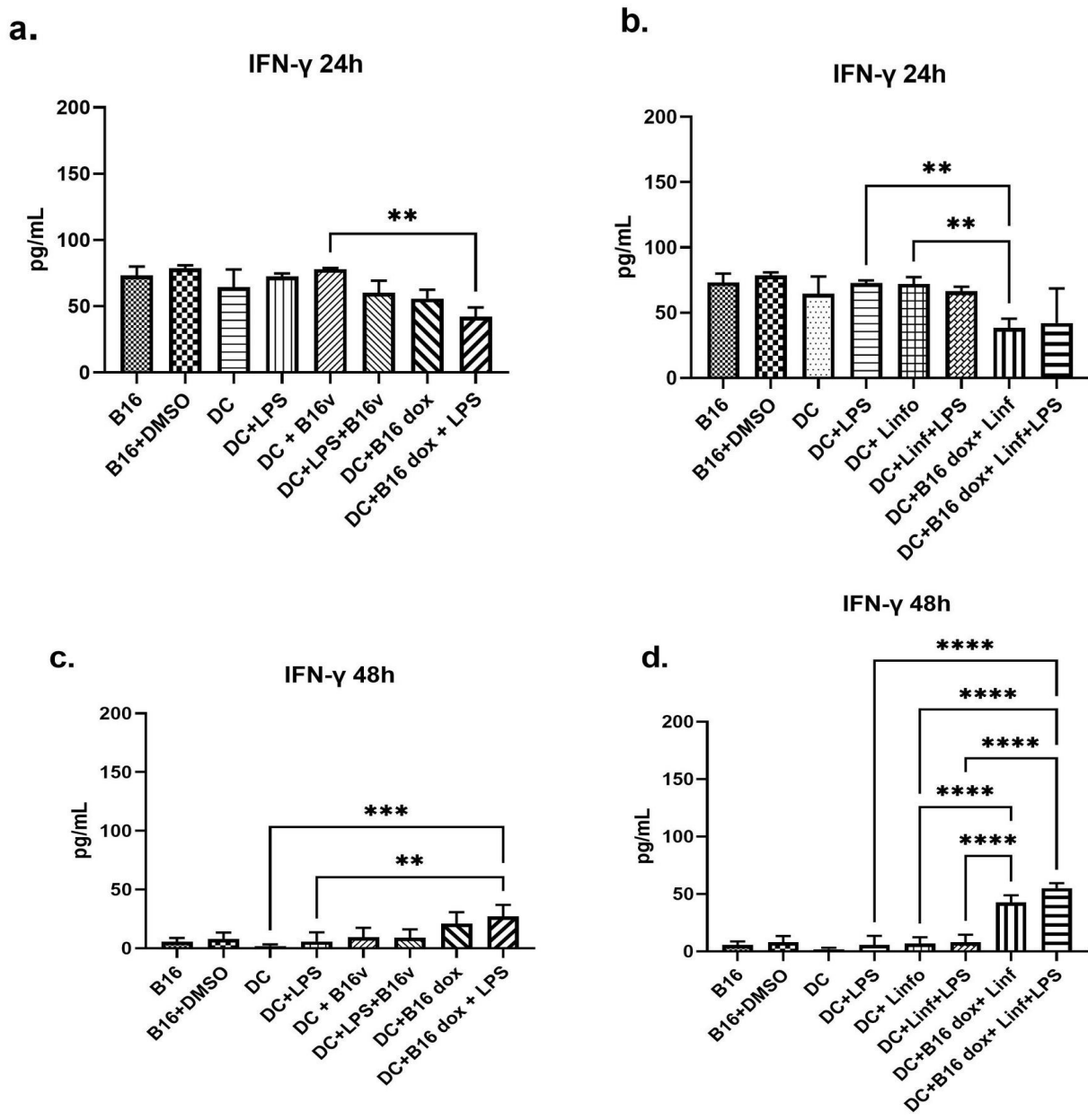


Figura 13 Dosagem de IFN. Células B16F10 foram cultivadas em garrafa de cultura com meio DMEM suplementado com gentamicina e soro fetal bovino, foram contadas e adicionadas 5×10^4 por poço e tratadas com 50 μ M de Doxorubicina por 24 horas. As células tratadas foram centrifugadas e lavadas com meio DMEM suplementado antes de adicionarmos as células dendríticas que foram obtidas por meio de lavado de medula de animal C57Bl/6 seguido de uma diferenciação celular, na concentração de 1×10^5 células por poço e 1×10^6 linfócitos por poço que foram adquiridos a partir do baço de animais C57Bl/6. Essa interação foi mantida em estufa aquecida a 37°C e 5% de CO₂ p por 24 ou 48 horas, seu sobrenadante foi coletado e o ELISA foi realizado conforme indicação do fabricante. Experimento repetido em triplicata biológica. p significante quando < 0,01.

III. Avaliação da evolução do melanoma em animais tratados com vacinas profiláticas ou terapêuticas de células B16F10 em morte imunogênica e determinação de biomarcadores:

Entendendo melhor as possíveis vias de ativação associadas nesse processo, avançamos para o estudo em modelo *in vivo* com dois modelos de vacinação, a profilática e a terapêutica. Do ponto de vista imunológico, esses dois tipos de vacinação têm objetivos, mecanismos de ação e contextos de aplicação distintos (Saxena et al 2015; Finn, O. J. 2008).

Os animais submetidos a vacinação prévia não mostraram diferença estatística entre o grupo tratado e o não tratado quanto ao peso de pulmão (14a) e baço (14b). Olhando para o peso do fígado, percebemos que os animais vacinados com células B16 em morte imunogênica apresenta uma diminuição do peso do fígado compatível com uma possível intoxicação dos animais por resquícios do quimioterápico nas vacinações apesar das lavagens das células antes da injeção. Em 14d vemos o grupo vacinado com menor média de peso tumoral que não foi significativa estatisticamente, mas que mostra que em 75% dos casos, a vacina induziu diminuição do volume tumoral. No peso total, vemos aumento de peso nos grupos que receberam a indução tumoral, o que era esperado já que o tumor pode ser até um terço do peso do animal em alguns estágios.

Nos animais vacinados após a indução do tumor, não observamos diferença estatística no peso do pulmão (15a) ou do peso baço (15b). É possível observar novamente mudanças significativas do peso do fígado (15c) frente aos diferentes tratamentos e uma diminuição acentuada nos animais que receberam a vacina com células B16 em morte imunogênica. Neste caso, mesmo os animais tratados com células que não tiveram contato com quimioterápico apresentam diminuição do volume de fígado o que indicaria que a diminuição não teria a ver com intoxicação por resquícios do quimioterápico. Com a vacina MCI, os animais apresentaram diminuição do peso do tumor em comparação com os animais não tratados.

A vacinação profilática tem como objetivo principal prevenir a ocorrência de uma doença antes que o indivíduo seja exposto ao agente patogênico. Este tipo de vacinação é amplamente utilizado para proteger contra doenças infecciosas, como sarampo, poliomielite, hepatite B, entre outras. Do ponto de vista imunológico, a vacinação profilática funciona através da introdução de antígenos derivados do patógeno, que podem ser na forma de vírus ou bactérias inativados, atenuados, subunidades proteicas, toxóides ou material genético (como DNA ou RNA mensageiro). Esses antígenos são introduzidos no organismo para estimular uma resposta imune sem causar a doença. A exposição ao antígeno leva à ativação de células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas, que processam e apresentam os antígenos aos linfócitos T nos linfonodos. Isso resulta na ativação e proliferação de linfócitos T e B específicos para o antígeno, culminando na produção de anticorpos e na geração de células de memória imunológica (Plotkin, S. 2010; Pulendran, B. & Ahmed, R. 2011).

Por outro lado, a vacinação terapêutica é projetada para tratar uma doença já estabelecida, em vez de prevenir sua ocorrência. Este tipo de vacinação é frequentemente utilizado no contexto de doenças crônicas, como câncer, infecções virais crônicas (por exemplo, HIV e hepatite C) e doenças autoimunes. Do ponto de vista imunológico, a vacinação terapêutica visa estimular o sistema imunológico a reconhecer e atacar células ou agentes patogênicos específicos que já estão presentes no organismo. A administração desses antígenos leva à ativação de células apresentadoras de antígenos, que, por sua vez, ativam linfócitos T citotóxicos e linfócitos B. Além disso, a vacinação terapêutica pode ser combinada com outras formas de imunoterapia, como inibidores de checkpoint imunológico, para aumentar a eficácia da resposta imune (Melief et al 2015; Rosenberg et al 2015).

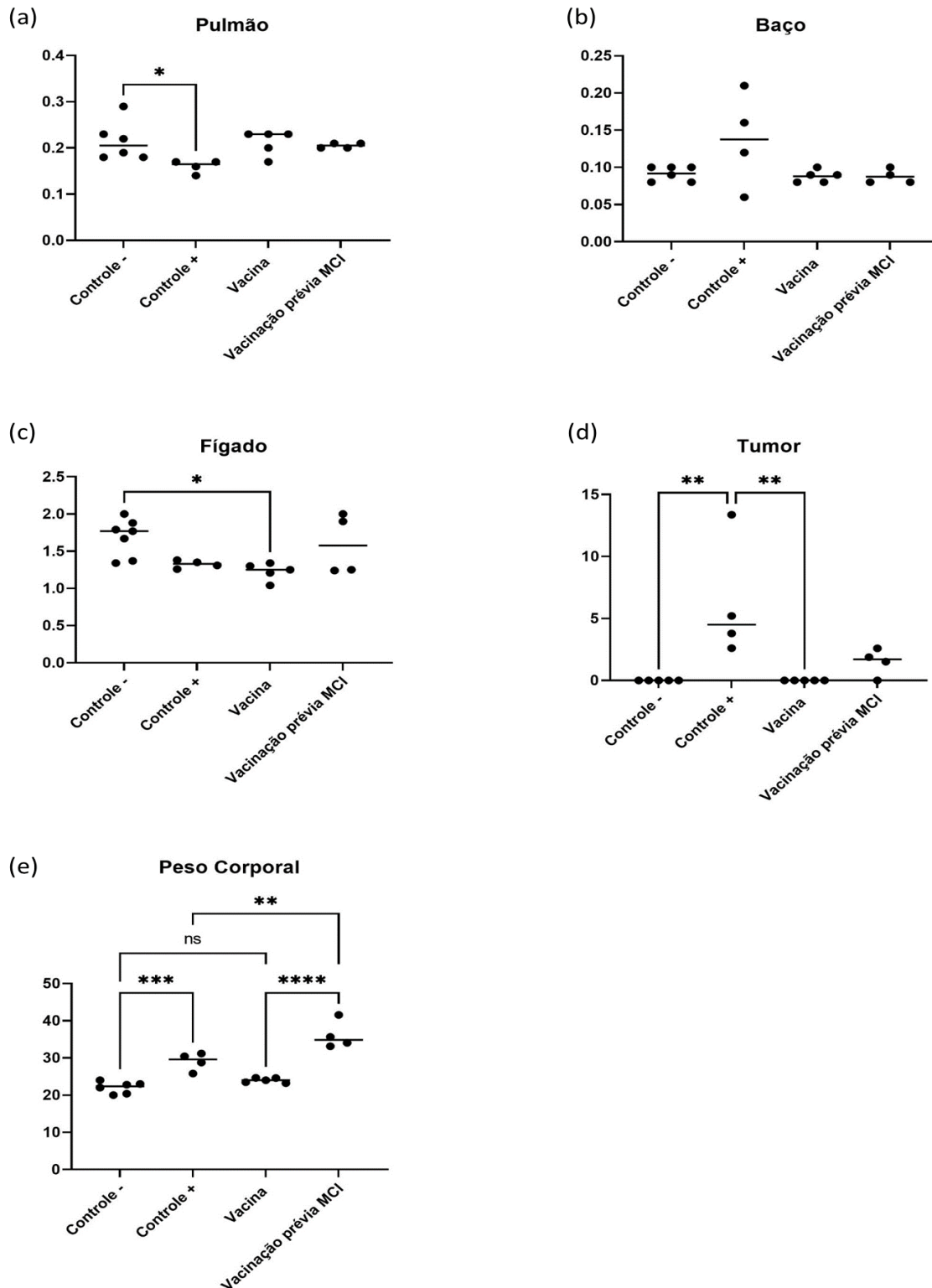


Figura 14 – Comparativo entre vacinações prévias. Animais de cada grupo (n=5) receberam 3 doses de vacinação, administradas uma vez por semana no flanco de forma subcutânea antes da indução de tumor. (a) peso em gramas do pulmão retirado dos animais. (b) peso em gramas do baço retirado dos animais. (c) peso em gramas do fígado retirado dos animais. (d) peso em gramas do tumor retirado dos animais. (e) peso corporal total em gramas dos animais submetidos ao tratamento. Experimento repetido em triplicata biológica. p significativa quando < 0,05.

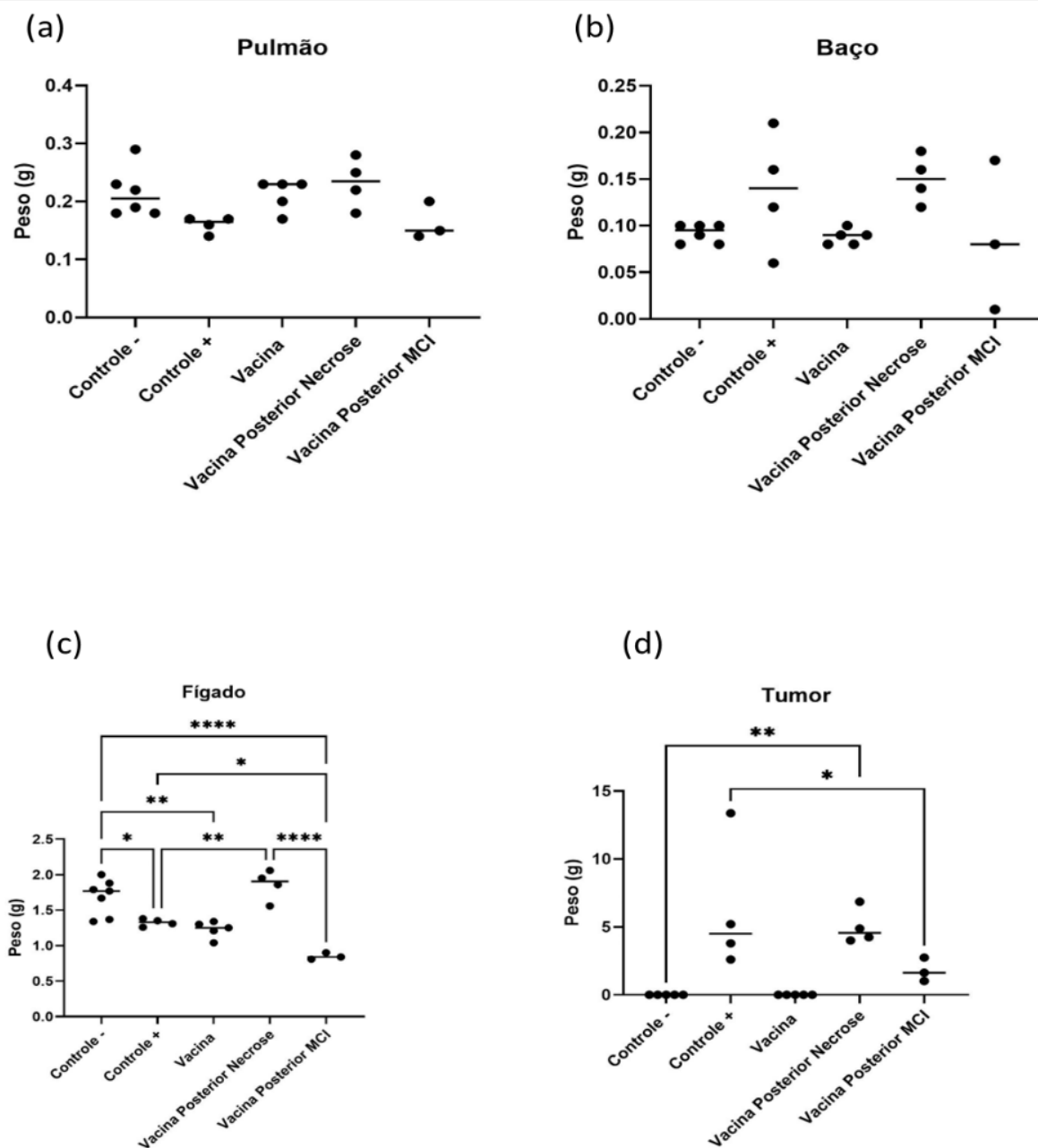


Figura 15– Comparativo entre vacinações posteriores. Animais de cada grupo (n=5) foram submetidos a três doses de vacinação posterior a indução tumoral. (a) peso em gramas do pulmão retirado dos animais. (b) peso em gramas do baço retirado dos animais. (c) peso em gramas do fígado retirado dos animais. (d) peso em gramas do tumor retirado dos animais. (e) peso corporal total em gramas dos animais submetidos ao tratamento. Experimento repetido em triplicata biológica. p significativa quando $< 0,05$.

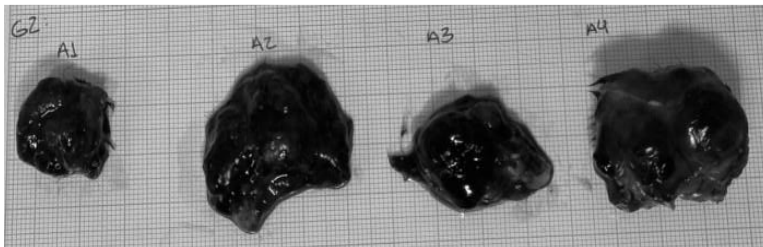
A heterogeneidade tumoral representa um desafio significativo. Outro desafio importante é a imunossupressão associada ao microambiente tumoral. Esse microambiente pode incluir a presença de células imunossupressoras, como células T reguladoras (Tregs) e células supressoras derivadas de mielóides (MDSCs), bem como a produção de citocinas imunossupressoras, como TGF- β e IL-10. A imunossupressão no microambiente tumoral pode dificultar a indução de uma resposta imune eficaz pela vacina preventiva (Gajewski et al 2013).

A visualização dos tumores retirados dos diferentes grupos de tratamento deixa evidente a diminuição tumoral nos grupos vacinados com posterior a indução do tumor e fica claro que houve uma diminuição do volume tumoral em até 75% dos animais que receberam a vacinação com células B16 em morte imunogênica (Figura 16). Podemos observar na figura 16, os tumores removidos dos animais estudados. Na primeira linha temos os animais que receberam apenas indução tumoral mostrando tumores maiores e que chegavam a representar metade do peso do animal, na segunda linha temos os tumores de animais tratados com vacinação anterior a indução tumoral e percebemos uma diminuição visível no tamanho dos tumores extraídos. Na terceira linha, analisamos os tumores retirados de animais que receberam vacinação com células em processo de morte imunogênica após a indução tumoral e percebemos ser a diminuição mais significativa entre os grupos apresentados. Na última linha, temos os animais que receberam vacinação com células em necrose posterior a indução tumoral e não é perceptível a diminuição do tumor quando comparado ao controle (primeira linha).

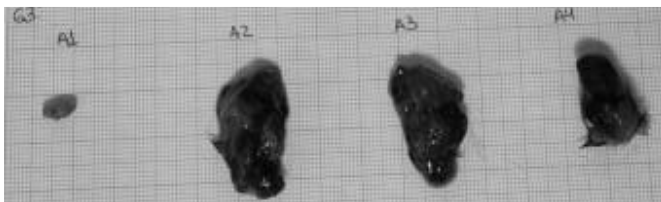
A melanização foi observada também as análises histopatológicas. Na Figura 17 podemos notar que apesar da melanização ocorrer em todos os animais, ela é mais evidente no grupo não receptor de tratamento (17a, 17b e 17c).

A presença de melanina na lâmina patológica de um melanoma pode ser um indicativo de pior prognóstico devido a vários fatores associados à agressividade do tumor. Melanomas altamente pigmentados podem estar relacionados a uma maior capacidade de invasão e resistência a tratamentos conforme visto por Slominski, A. (2012) e Sarna,

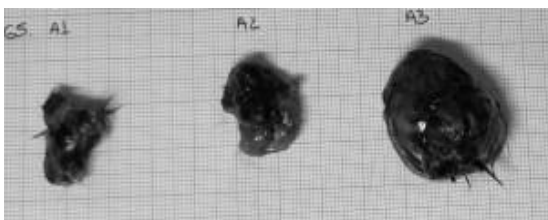
T. (2013). A melanina pode proteger as células tumorais dos danos induzidos por radiação ultravioleta e quimioterapias, devido às suas propriedades antioxidantes, que neutralizam espécies reativas de oxigênio. Além disso, a produção excessiva de melanina pode estar associada a mutações genéticas que promovem a proliferação celular e a progressão tumoral.



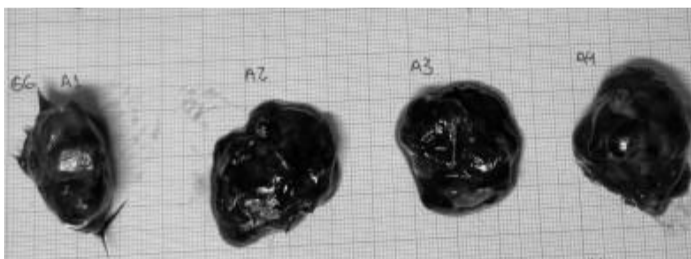
Controle Positivo



Vacinação Prévia - MCI



Vacinação Posterior - MCI



Vacinação Posterior - NEC

Figura 16 – Registro dos tumores retirados ex vivo. Animais C57Bl/6 de 8 a 12 semanas de vida foram submetidos a indução tumoral com a presença ou ausência de vacinação. (a) animais tiveram o tumor induzido, não foram submetidos a tratamento e foram eutanasiados após 4 semanas. (b) animais receberam 3 doses semanais de células B16 mortas por exposição a doxorrubicina, tiveram o tumor induzido e foram eutanasiados após 4 semanas. (c) animais tiveram tumor induzido e recebem 3 doses semanais de vacina, foram eutanasiados uma semana após a última vacina feita com exposição de b16 a doxorrubicina. (d) animais tiveram tumor induzido e recebem 3 doses semanais de vacina, foram eutanasiados uma semana após a última vacina feita com exposição de b16 a picos de temperatura levando a necrose.

Tumores com alta pigmentação também pode ser mais difíceis de tratar devido à sua heterogeneidade celular e à capacidade das células pigmentadas de se adaptarem a diferentes ambientes teciduais. Assim, a observação de melanina em lâminas patológicas de melanoma pode sinalizar um comportamento mais agressivo do tumor e, conseqüentemente, um prognóstico menos favorável. No grupo tratado com vacinação anterior a indução tumoral (17d, 17e e 17f), podemos observar infiltrados inflamatórios leves. A presença de infiltrados inflamatórios indica um prognóstico levemente melhor, pois sugere uma resposta imune ativa contra o tumor. Uma infiltração inflamatória robusta, como visto nos grupos tratados após a indução do tumor (17g, 17h, 17i, 17j, 17k e 17l) pode estar associada à limitação do crescimento tumoral e à redução do potencial metastático, uma vez que essas células imunes podem destruir células cancerígenas ou inibir sua proliferação. Assim, a presença de tais infiltrados é frequentemente considerada um sinal positivo, indicando que o sistema imunológico está envolvido na contenção do melanoma, o que pode contribuir para um melhor desfecho clínico como demonstrado por Clemente C., G. (1996), Galon et al (2006) e Azimi, F. (2012).

A fim de analisar as diferenças nas populações de células no microambiente tumoral, fizemos uma imuno-histoquímica das amostras obtidas (Figuras 18 e 19).

Na figura 18, vemos as mesmas lâminas marcadas para CD4 e CD8. É possível perceber que os grupos que receberam tratamento tanto anterior quanto posterior a indução tumoral com a vacinação com células em morte imunogênica mostra um maior número de células CD4+ e CD8+ quando comparado aos controles e com o grupo que recebeu vacinação de células em necrose.

Na Figura 19, vemos as lâminas marcadas para S100 e KI67, conhecidos marcadores de progressão tumoral. Percebemos a diminuição destes marcadores nos grupos que receberam o tratamento com células em morte imunogênica, o que não é visto no controle ou no grupo que recebeu vacinação com células em necrose.

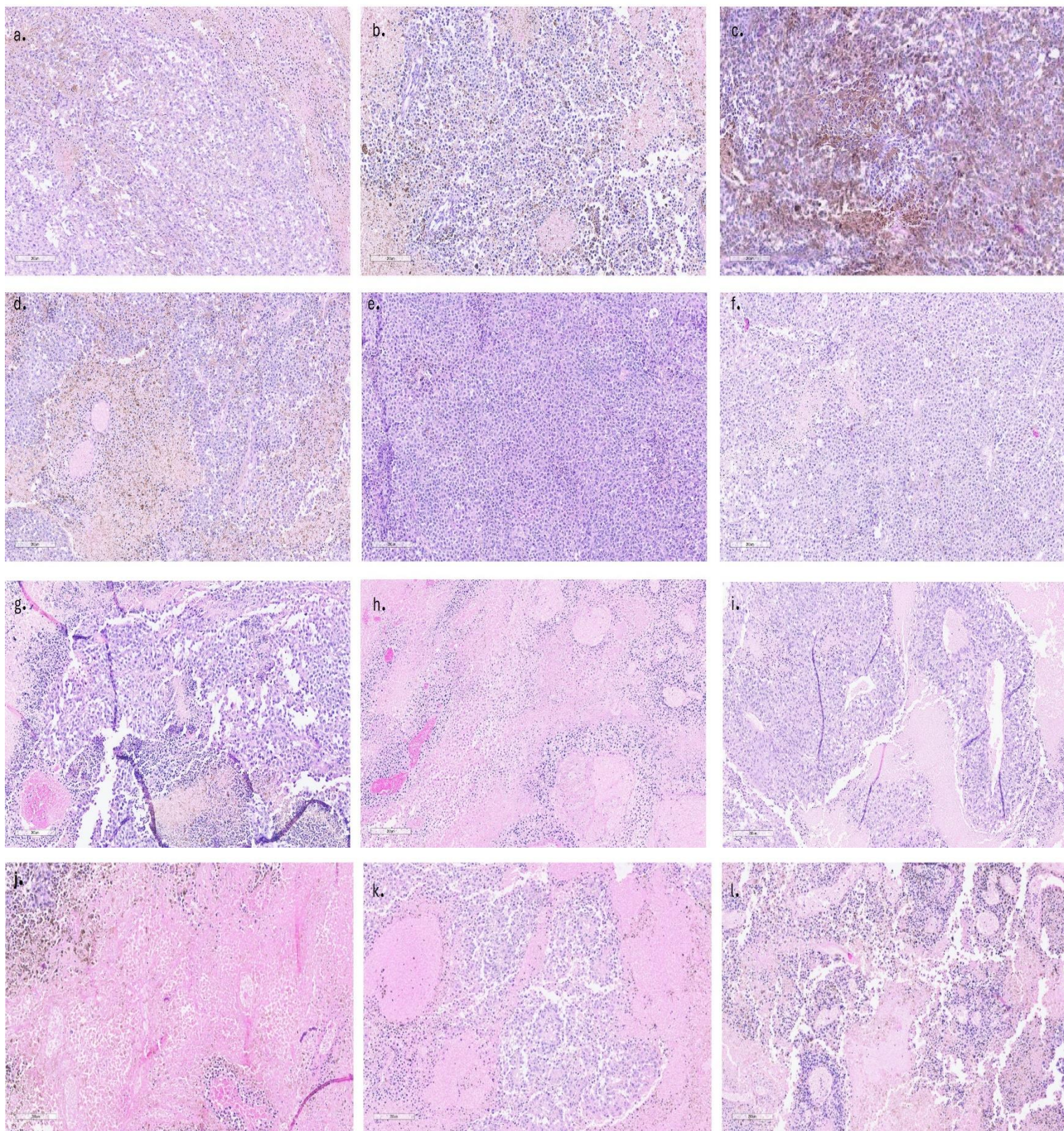


Figura 17 - Cortes de histopatológico dos tumores ex vivo. Os animais C57Bl/6 de 8 a 12 semanas de vida foram submetidos a quatro diferentes condições, sendo: 1. As lâminas a, b e c são animais componentes do grupo que recebeu indução de tumor mas não recebeu nenhum tratamento. 2. As lâminas d, e e f são de animais que receberam a indução tumoral após 3 semanas de vacinação com B16F10 em processo de morte imunogênica. 3. As lâminas g, h e i são animais que receberam a indução de tumor e posteriormente receberam 3 doses vacinais de células B16F10 em processo de morte imunogênica. 4. As lâminas j, k e l são de animais que receberam a indução do tumor e posteriormente receberam 3 doses vacinais de células B16F10 em processo de necrose. Todos os HES foram corados usando o mesmo método de hematoxilina-eosina.

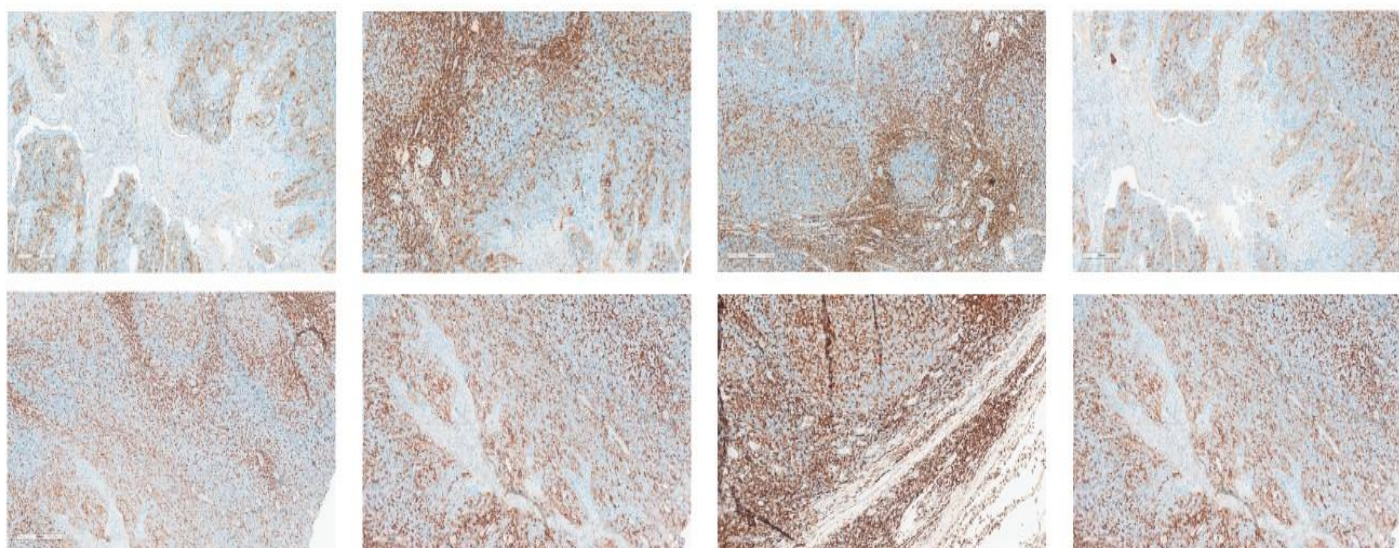
CD4

C+

MCI PREV

MCI POST

NEC POST



CD8

C+

MCI PREV

MCI POST

NEC POST

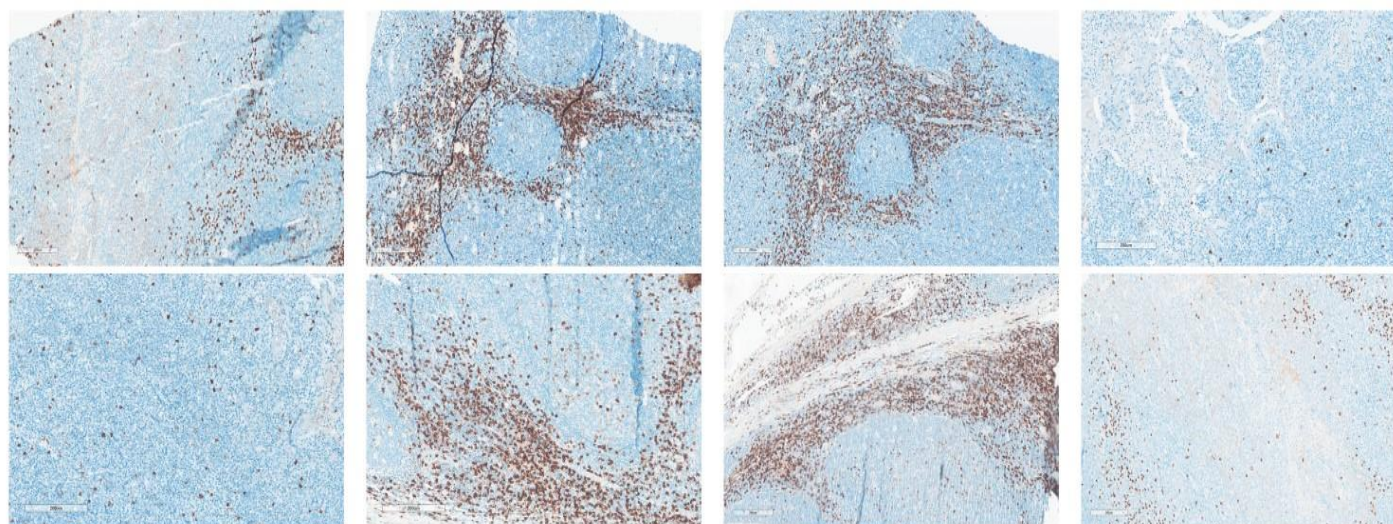


Figura 18 - Marcação de imunohistoquímica para células CD8+ e CD4+.

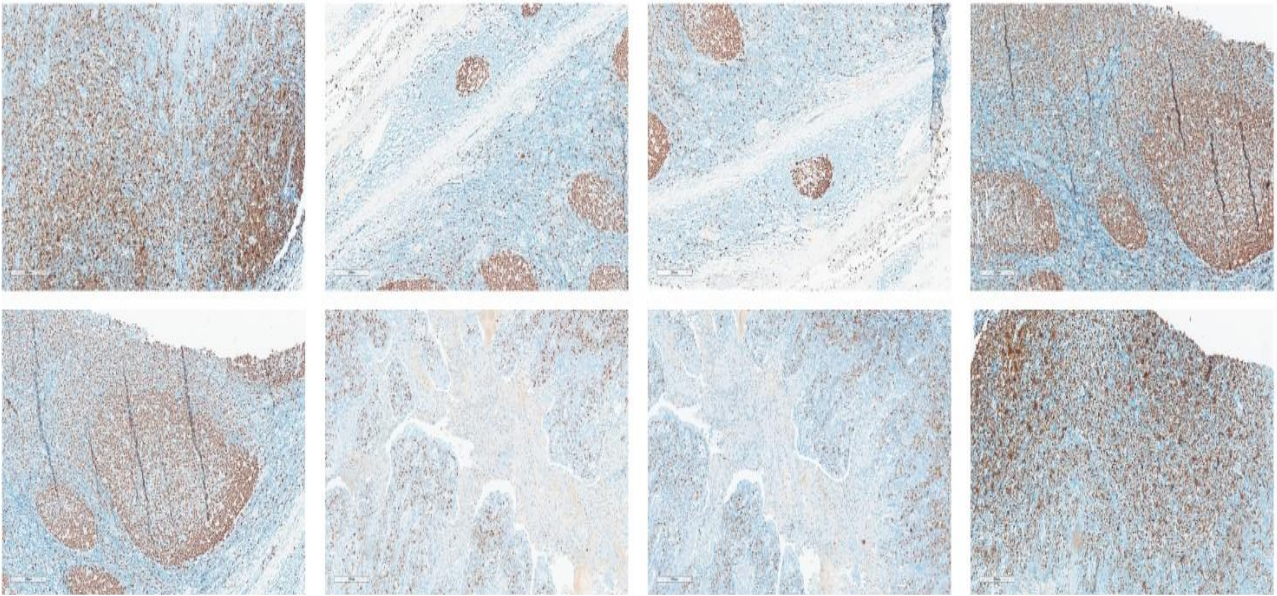
KI67

C+

MCI PREV

MCI POST

NEC POST



S100

C+

MCI PREV

MCI POST

NEC POST

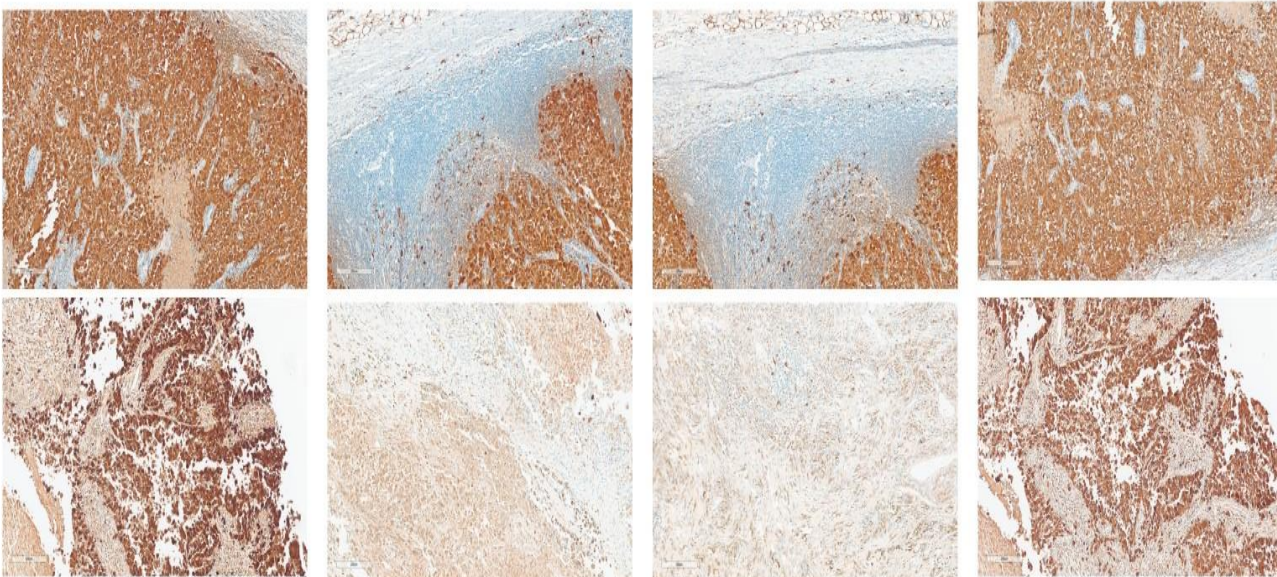
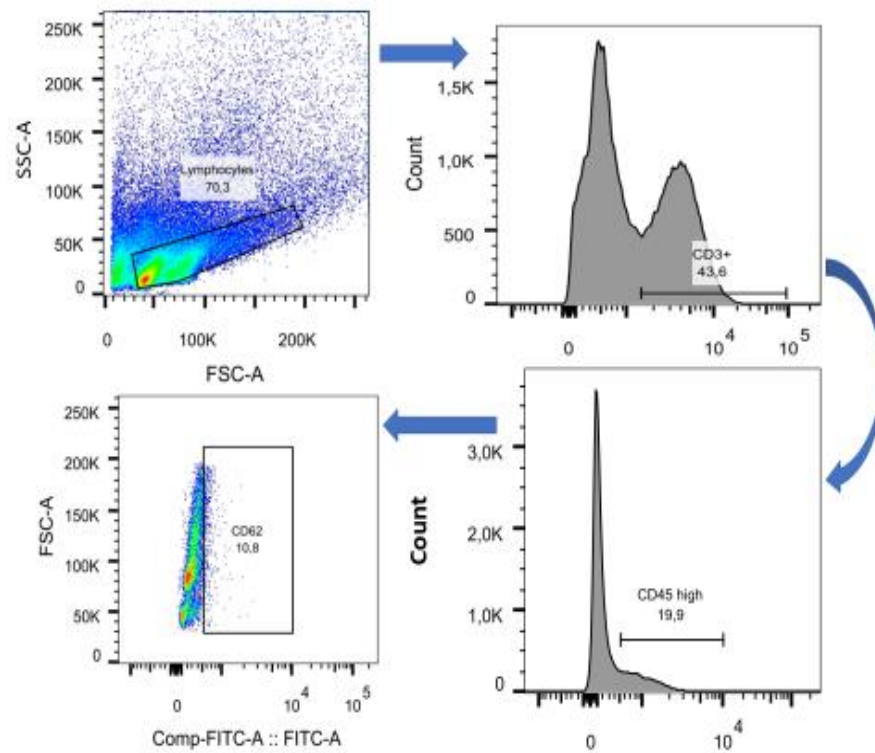


Figura 19 - Marcação imunohistoquímica para S100 e KI67.

Na figura 20, está demonstrado a estratégia das análises. No painel 1, as células CD3+ foram delimitadas, a partir disso delimitadas as células positivas também para CD4, essa população por sua vez foi diminuída para uma população também positiva para CD62 e negativa para CD45RA. No painel 2, as células foram isoladas também para chegar em uma população CD3+ e CD4+ e finalmente delimitada a população também CD25+. As marcações foram feitas separadamente porque a fluorescência dos anticorpos CD62 e do CD25 eram do mesmo comprimento de onda. Na população de linfócitos T (a), vemos diferenças significativas entre praticamente todos os grupos de tratamento. No gráfico (b), vemos diferença estatística entre as populações tratadas com vacina prévia feita com MCI e o grupo que teve apenas a vacinação, sem o a indução tumoral. Em (c), delimitamos a população de células de memória central e não foi encontrado diferença estatística. Finalmente em (d), temos a população de células T regulatórias que mostram diferença entre o grupo sadio, o grupo com tumor não tratado, o grupo vacinado com MCI posteriormente e o grupo somente vacinado sem tumor.

Painel 1 – CD3+/CD45+/CD62



Painel 2 – CD3+/CD4+/CD25

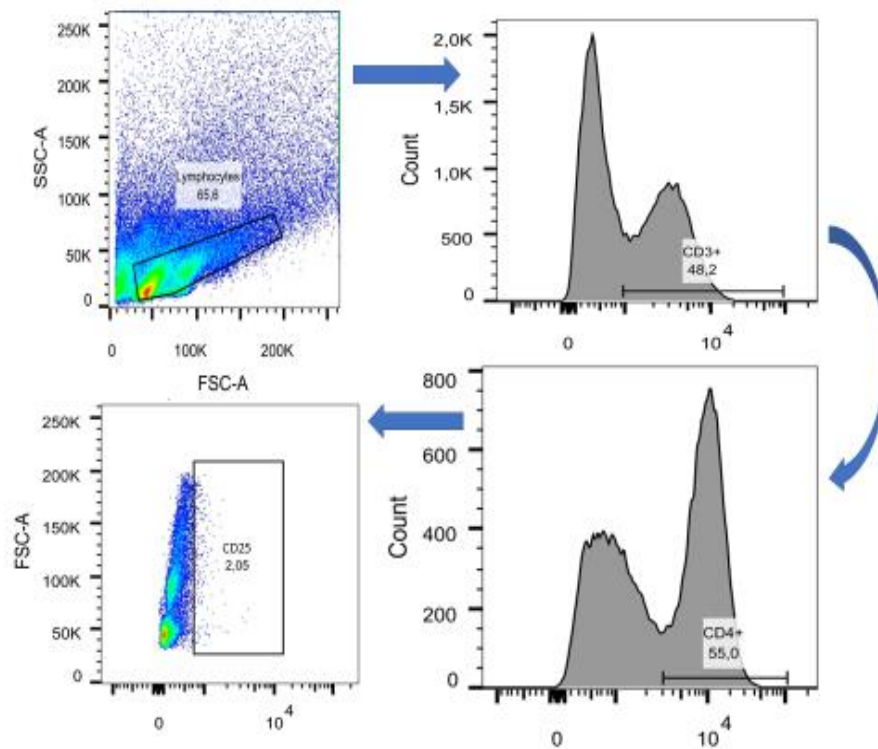


Figura 20 - Painéis de marcação de citometria de fluxo. Painel 1 foi feito com um gate isolando células CD3+, dessa população, um novo gate foi criado para populações CD45+ e novamente para células CD62+ resultando em células CD3+ CD45+ CD62+. Para o segundo painel, foi criado inicialmente um gate para células positivas para CD3, dentro desse grupo, as células positivas para CD4 foram selecionadas e finalmente as células CD25+, gerando um grupo celular que é CD3+ CD4+ CD25+.

Na figura 21, podemos reparar as diferenças na quantidade de células entre os grupos. O grupo saudável apresenta maior número de células CD3+ no baço do que os grupos tratados com vacinações. Também podemos ver que não há diferença significativa entre os grupos quanto a população CD3+CD4+, apenas no grupo que recebeu vacinação com células em processo de morte imunogênica podemos ver uma diminuição nessa população celular. Não houve diferença estatística quanto a população CD3+CD4+CD62L+CD45RA- e vemos uma diminuição de células CD3+CD4+CD25+ nos grupos que receberam vacinação após a indução tumoral com células em necrose, no grupo que recebeu apenas a indução tumoral e no grupo que recebeu apenas vacinação. Essa diminuição vista pode ser um indicativo de recrutamento celular do baço para o TME.

A diminuição de células CD3+CD4+CD62L+CD45RA- no baço pode ser um indicativo de maior migração celular para o tumor, refletindo uma resposta imune ativa e direcionada. Essas células, conhecidas como células T de memória efetoras, são essenciais na resposta imune adaptativa e são capazes de migrar rapidamente para locais de inflamação ou infecção, incluindo tumores. A redução de sua presença no baço pode sugerir que elas estão sendo recrutadas para o microambiente tumoral, onde exercem funções efetoras, como a secreção de citocinas e a promoção da destruição de células tumorais. Esse fenômeno pode indicar uma tentativa do sistema imunológico de conter o crescimento tumoral, potencialmente associando-se a um melhor prognóstico dependendo da eficácia dessa resposta imune local. Assim como as células de memória central mencionadas acima, as células T regulatórias (CD3+CD4+CD25+) reduzidas no baço frente a vacinação pode indicar migração celular como mostrado em Sallusto, F. et al (2004), Masopust, D. (2013) e Mueller et al (2016).

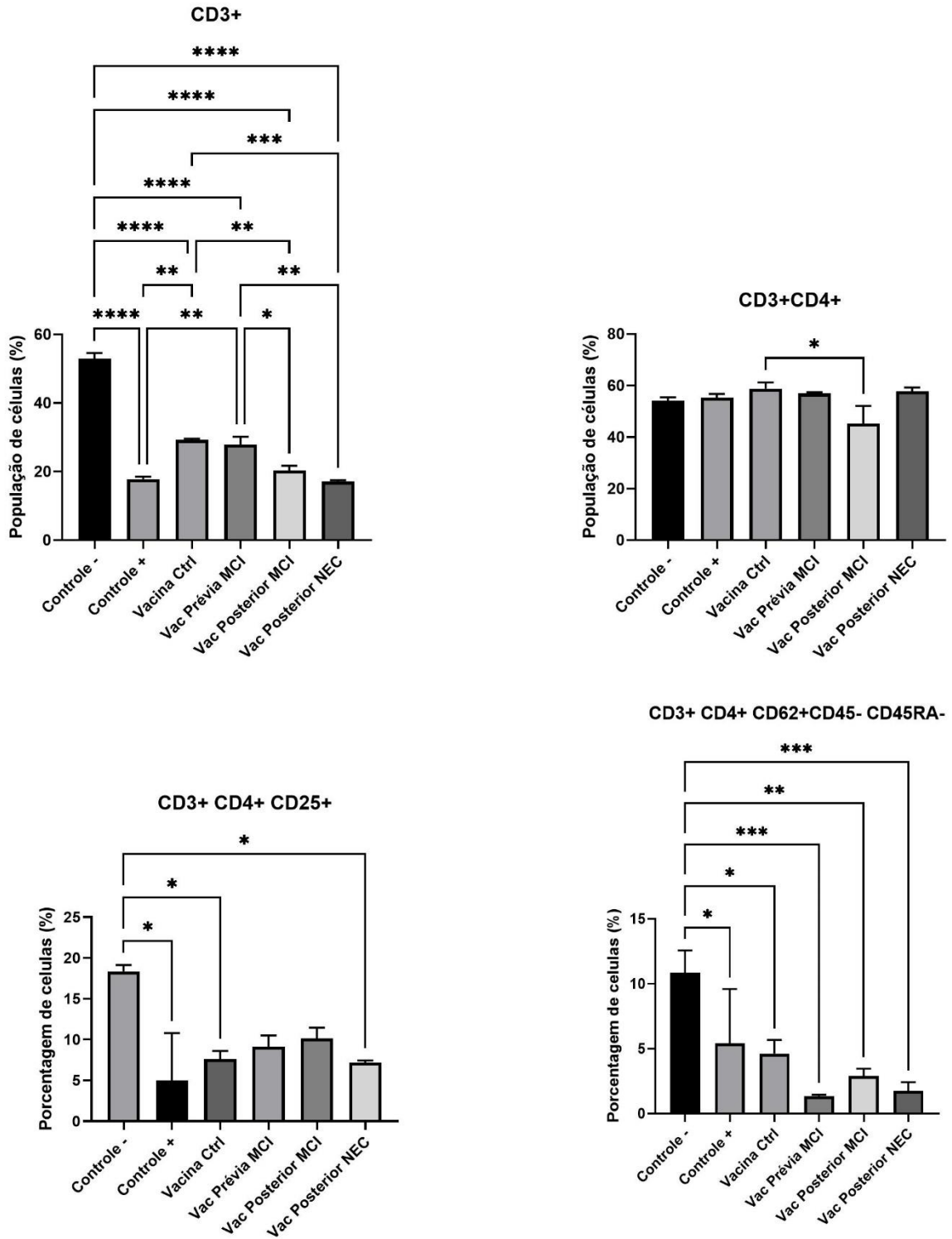


Figura 21 - Porcentagem de população celular encontrada em citometria de fluxo feita com amostras ex vivo de animais C57Bl/6 com idade entre 8 e 12 semanas que foram submetidos a vacinação prévia ou posterior dependendo do grupo, elucidado nos materiais e métodos deste arquivo. (a) a população de células positivas para CD3 foi dosada nos diferentes grupos, essa marcação comumente é feita para determinar a população de linfócitos. (b) população positiva tanto positiva para CD3 e CD4, diferença estatística foi encontrada entre o grupo vacinado previamente com células MCI e o grupo apenas vacinado com as mesmas células. Marcação utilizada para determinar população de linfócito T CD4+ (c) População positiva para CD62 e negativa para CD45RA, caracterizando células de memória central. (d) células positivas para CD3, CD4 e CD25 que configuram células T regulatórias e que mostram diferença estatística entre o grupo não tratado e os grupos tratados. Experimento repetido em triplicata biológica. p significativa quando < 0,05.

Além da diferença significativa no número de células de memória central e de células T regulatórias, quando comparamos apenas o grupo saudável com o grupo que recebeu apenas a vacinação, temos uma diferença no número de células de memória efetora (Figura 22). O aumento do recrutamento de células de memória central (T_{CM}) e células de memória efetora (T_{EM}) é fundamental para garantir o funcionamento eficaz de vacinas, especialmente aquelas voltadas para doenças crônicas ou câncer. As células T_{CM} são caracterizadas por sua capacidade de autorrenovação e de gerar rapidamente células efetoras em resposta a um antígeno previamente encontrado. Elas residem principalmente em órgãos linfóides secundários e são essenciais para a manutenção de uma vigilância imunológica a longo prazo. Por outro lado, as células T_{EM} circulam por tecidos periféricos e são responsáveis por respostas imunes rápidas e eficazes ao reconhecerem antígenos específicos. Em um contexto de vacinação, o aumento dessas populações celulares indica que o sistema imunológico está bem-preparado para responder rapidamente a exposições subsequentes ao patógeno ou antígeno alvo. Esse recrutamento e expansão celular são frequentemente associados a uma resposta imune robusta e duradoura, aumentando a eficácia da vacina em conferir proteção. Assim, o equilíbrio entre células de memória central e efetora é crucial para uma resposta imune adaptativa eficiente, garantindo que o organismo possa responder prontamente a desafios infecciosos ou tumorais como abordado por Williams et al (2007) e Pepper et al (2011).

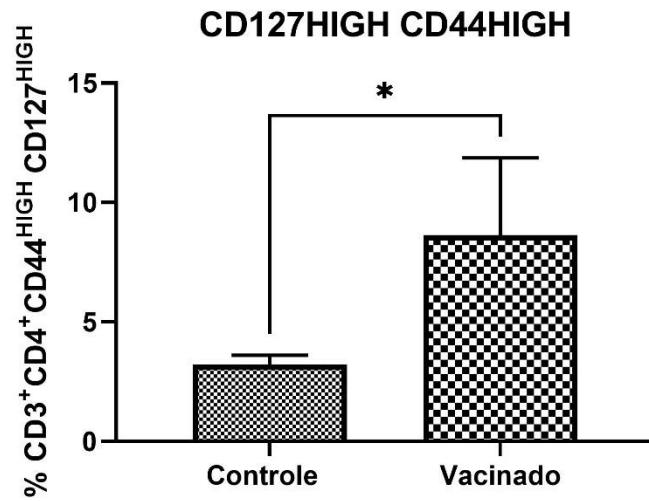
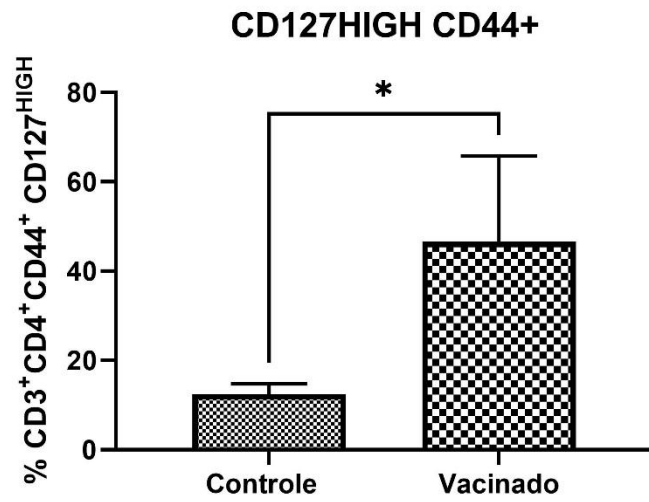


Figura 22 - Porcentagem de população celular encontrada em citometria de fluxo feita com amostras ex vivo de animais C57Bl/6 com idade entre 8 e 12. A população de células positivas para CD3, CD4, Cd44 e Cd127 foi dosada nos diferentes grupos, essa marcação comumente é feita para determinar a população de linfócitos. Experimento repetido em triplicata biológica. p significativa quando < 0,05.

6. Conclusão

Com base nos resultados mostrados neste trabalho, podemos afirmar que a vacinação com células B16F10 em processo de morte imunogênica induzida por Doxorrubicina é benéfica na diminuição do volume tumoral, na construção de um sistema imunológico ativado em um perfil antitumoral e na indução de uma resposta de memória.

Embora alguns estudos, assim como este, tenham mostrado resultados promissores, a taxa de resposta a vacinações com células tumorais em morte imunogênica ainda é variável, e os eventos adversos, como inflamações autoimunes, podem limitar a aplicabilidade. A segurança a longo prazo desses tratamentos também permanece incerta, necessitando de estudos mais extensivos.

Referências Bibliográficas

Aggarwal, B. B. (2003). "Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword." *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 745-756. doi:10.1038/nri1184.
and Immunity by Dendritic Cells: Mechanisms and Clinical Applications. *Front Immunol.* 2019;10:2393. Published 2019 Oct 29. doi:10.3389/fimmu.2019.02393

Azimi, F., et al. (2012). "Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in cutaneous melanoma." *Journal of Clinical Oncology*, 30(21), 2678-2683. doi:10.1200/JCO.2011.37.8539.

Balkwill, F. (2009). "Tumour necrosis factor and cancer." *Nature Reviews Cancer*, 9(5), 361-371. doi:10.1038/nrc2628.

Binnewies, M., Mujal, A. M., Pollack, J. L., Combes, A. J., Hardison, E. A., Barry, K. C., ... & Krummel, M. F. (2019). Unleashing type-2 dendritic cells to drive protective antitumor CD4+ T cell immunity. *Cell*, 177(3), 556-571.e16. doi:10.1016/j.cell.2019.02.005.

Binnewies, M., Roberts, E. W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D. F., Merad, M., ... & Krummel, M. F. (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nature Medicine*, 24(5), 541-550. doi:10.1038/s41591-018-0014-x.

Chen, D. S., & Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 541(7637), 321-330. doi:10.1038/nature21349.

Clemente, C. G., et al. (1996). "Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma." *Cancer*, 77(7), 1303-1310. doi:10.1002/(SICI)1097-0142(19960401)77:7<1303::AID-CNCR8>3.0.CO;2-5.

da Veiga CRP, da Veiga CP, Souza A, Wainstein AJA, de Melo AC, Drummond-Lage AP. Cutaneous melanoma: cost of illness under Brazilian health system perspectives. *BMC Health Serv Res.* 2021 Mar 29;21(1):284. doi: 10.1186/s12913-021-06246-1. PMID: 33781270; PMCID: PMC8008665.

Di Virgilio, F., Adinolfi, E., & Pinton, P. (2021). Signals from the dead: The extracellular ATP dilemma. *Cell Death & Differentiation*, 28(1), 1-4.

Dinarello, C. A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 117(14), 3720-3732. doi:10.1182/blood-2010-07-273417.

Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). "The immunobiology of cancer immunoediting and the status of cancer immunotherapy: An overview." *Nature Reviews Immunology*, 4(11), 837-848. doi:10.1038/nri1492.

El-Ashmawy, N. E., Salem, M. L., Khedr, E. G., El-Zamarany, E. A., & Ibrahim, A. O. (2019). Dual-targeted therapeutic strategy combining CSC–DC-based vaccine and cisplatin overcomes chemo-resistance in experimental mice model. *Clinical and Translational Oncology*. doi:10.1007/s12094-019-02242-4

Elliott, M. R., & Ravichandran, K. S. (2016). "The dynamics of apoptotic cell clearance." *Developmental Cell*, 38(2), 147-160. doi:10.1016/j.devcel.2016.06.029.

Finn, O. J. (2008). "Cancer immunology." *New England Journal of Medicine*, 358(25), 2704-2715. doi:10.1056/NEJMra072739.

Forte GI, Calà C, Scola L, Crivello A, Gullo A, Marasà L, Giacalone A, Bonura C, Caruso C, Lio D, Giammanco A. Role of environmental and genetic factor interaction in age-related disease development: the gastric cancer paradigm. *Rejuvenation Res.* 2008 Apr;11(2):509-12. doi: 10.1089/rej.2008.0678. PMID: 18393655.

Fucikova, J., Becht, E., Iribarren, K., Finotello, F., Helm, D., Bolck, H. A., ... & Kroemer, G. (2020). Calreticulin exposure in cancer: from benchside research to clinical trials. *Journal of Immunotherapy of Cancer*, 8(2), e000673. doi:10.1136/jitc-2020-000673.

Fucikova, J., Kepp, O., Kasikova, L. et al. Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. *Cell Death Dis* 11, 1013 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03221-2>

Gajewski, T. F., Schreiber, H., & Fu, Y. X. (2013). "Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment." *Nature Immunology*, 14(10), 1014-1022. doi:10.1038/ni.2703.

Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2017). Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, 17(2), 97-111. doi:10.1038/nri.2016.107.

Galluzzi, L., Vitale, I., Warren, S., Adjemian, S., Agostinis, P., Martinez, A. B., ... & Kroemer, G. (2020). Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(1), e000337.

Galon, J., & Bruni, D. (2019). Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(3), 197-218. doi:10.1038/s41573-018-0007-y.

Galon, J., et al. (2006). "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome." *Science*, 313(5795), 1960-1964. doi:10.1126/science.1129139.

Gregg RK. Model Systems for the Study of Malignant Melanoma. *Methods Mol Biol.* 2021;2265:1-21. doi: 10.1007/978-1-0716-1205-7_1. PMID: 33704702.

Han J, Khatwani N, Searles TG, Turk MJ, Angeles CV. Memory CD8+ T cell responses to cancer. *Semin Immunol.* 2020 Jun;49:101435. doi: 10.1016/j.smim.2020.101435. Epub 2020 Nov 30. PMID: 33272898; PMCID: PMC7738415.

Hanna, G. J., & Liu, H. (2014). Personalized medicine for cancer: from mutation to therapy. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 95(3), 321-328. doi:10.1038/clpt.2013.234.

Hauschild, A., et al. (2009). "Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma." *Journal of Clinical Oncology*, 27(17), 2823-2830. doi:10.1200/JCO.2008.21.1443.

Hickman, J. A. (1992). "Apoptosis induced by anticancer drugs." *Cancer and Metastasis Reviews*, 11(2), 121-139. doi:10.1007/BF00048058.

Hodi, F. S., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Rutkowski, P., Cowey, C. L., ... & Wolchok, J. D. (2018). Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab in untreated melanoma. *New England Journal of Medicine*, 379(2), 122-133. doi:10.1056/NEJMoa1709684.

Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). "The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting." *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13(2), 95-109. doi:10.1016/S1359-6101(01)00038-7.

Kepp, O., et al. (2017). "Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death." *Oncotimmunology*, 6(12), e1356153. doi:10.1080/2162402X.2017.1356153.

Kishimoto, T. (2005). "Interleukin-6: Discovery of a pleiotropic cytokine." *Arthritis Research & Therapy*, 8(Suppl 2), S2. doi:10.1186/ar1916.

Kroemer, G., Galassi, C., Zitvogel, L. et al. Immunogenic cell stress and death. *Nat Immunol* 23, 487–500 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01132-2>

Kroemer, G., Galluzzi, L., Kepp, O., & Zitvogel, L. (2013). "Immunogenic cell death in cancer therapy." *Annual Review of Immunology*, 31, 51-72. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-100008.

Kundu, N., & Fulton, A. M. (2002). "Interleukin-10 inhibits tumor metastasis, downregulates MHC class I, and enhances NK lysis." *Cellular Immunology*, 220(2), 97-102. doi:10.1016/S0008-8749(03)00003-2.

Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Cowey, C. L., Lao, C. D., ... & Wolchok, J. D. (2019). Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *New England Journal of Medicine*, 381(16), 1535-1546. doi:10.1056/NEJMoa1910836.

Leven, C., Padelli, M., Carré, J.-L., Bellissant, E., & Misery, L. (2019). Immune Checkpoint Inhibitors in Melanoma: A Review of Pharmacokinetics and Exposure–Response Relationships. *Clinical Pharmacokinetics*. doi:10.1007/s40262-019-00789-7

Lewandowska AM, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B. Environmental risk factors for cancer - review paper. *Ann Agric Environ Med*. 2019 Mar 22;26(1):1-7. doi: 10.26444/aaem/94299. Epub 2018 Oct 17. PMID: 30922021.

Lopez M, Perno CF, Papaldo P, Di Lauro L, Ganzina F, Barduagni A. Phase II study of epirubicin in advanced malignant melanoma. *Invest New Drugs*. 1984;2(3):315-7. doi: 10.1007/BF00175383. PMID: 6595241.

Luke, J. J., Flaherty, K. T., Ribas, A., & Long, G. V. (2017). "Targeted agents and immunotherapies: Optimizing outcomes in melanoma." *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(8), 463-482. doi:10.1038/nrclinonc.2017.43.

Ma, Y., et al. (2013). "ATP-dependent recruitment of cellular proteases by dying cells promotes their immunogenicity." *Nature Immunology*, 14(5), 509-514. doi:10.1038/ni.2556.

Melero, I., Castanon, E., Alvarez, M., Champiat, S., & Marabelle, A. (2019). Intratumoural administration and tumour tissue targeting of cancer immunotherapies. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 18(9), 558-576. doi:10.1038/s41571-019-0248-6.

Melief, C. J. M., van Hall, T., Arens, R., Ossendorp, F., & van der Burg, S. H. (2015). Therapeutic cancer vaccines. *Journal of Clinical Investigation*, 125(9), 3401-3412. doi:10.1172/JCI80009.

Mocellin, S., & Rossi, C. R. (2007). "Understanding the multifaceted biology of IL-10 and its implications in cancer immunology." *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 56(11), 1531-1539. doi:10.1007/s00262-007-0314-8.

Nguyen, C., & Majewski, S. (2021). "Radiotherapy and immunotherapy combinations in melanoma: Mechanisms and clinical applications." *Cancer Journal*, 27(6), 435-445. doi:10.1097/PPO.0000000000000542.

Obeid, M., et al. (2007). "Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death." *Nature Medicine*, 13(1), 54-61. doi:10.1038/nm1523.

Palucka, K., & Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 265-277. doi:10.1038/nrc3258.

Palucka, K., & Banchereau, J. (2013). Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity*, 39(1), 38-48. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.004.

Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 252-264. doi:10.1038/nrc3239.

Plotkin, S. A. (2010). "Correlates of protection induced by vaccination." *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(7), 1055-1065. doi:10.1128/CVI.00131-10.

Pulendran, B., & Ahmed, R. (2011). "Immunity to viruses: Learning from successful human vaccines." *Immunity*, 33(4), 516-529. doi:10.1016/j.immuni.2010.10.009.

Rastrelli, M. et al. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. In Vivo November-December 2014 vol. 28 no. 6 1005-1011

Ribas, A. (2015). Adaptive immune resistance: how cancer protects from immune attack. *Cancer Discovery*, 5(9), 915-919. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0563.

Ribas, A., & Wolchok, J. D. (2018). Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science*, 359(6382), 1350-1355. doi:10.1126/science.aar4060.

Riley, R. S., June, C. H., Langer, R., & Mitchell, M. J. (2019). Delivery technologies for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(3), 175-196. doi:10.1038/s41573-018-0006-z.

Riss, T. L., et al. (2016). "Cell Viability Assays." In: *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2015). "Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer." *Science*, 348(6230), 62-68. doi:10.1126/science.aaa4967.

Santos, M. O., & Souza, D. L. B. (2020). Patterns of cancer mortality in Brazilian capitals: 2000-2015. *Revista de Saúde Pública*, 54, 28. doi:10.11606/s1518-8787.2020054001715.

Sarna, T., et al. (2013). "The role of melanin in melanoma biology: Recent advances." *Pigment Cell & Melanoma Research*, 26(6), 701-712. doi:10.1111/pcmr.12142.

Saxena, M., & Bhardwaj, N. (2018). Re-Emergence of Dendritic Cell Vaccines for Cancer Treatment. *Trends in Cancer*, 4(2), 119-137. doi:10.1016/j.trecan.2017.12.005.

Saxena, M., & van der Burg, S. H. (2015). "Therapeutic cancer vaccines." *Nature Reviews Cancer*, 15(5), 299-312. doi:10.1038/nrc3913.

Scharping, N. E., Rivadeneira, D. B., Menk, A. V., Vignali, P. D. A., Ford, B. R., Rittenhouse, N. L., ... & Delgoffe, G. M. (2017). Mitochondrial stress induced by continuous stimulation under hypoxia rapidly drives T cell exhaustion. *Nature Immunology*, 18(9), 1022-1032. doi:10.1038/ni.3771.

Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011). "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(5), 878-888. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.

Schiavoni, G., Gabriele, L., & Mattei, F. (2018). The tumor microenvironment: a pitch for multiple players. *Frontiers in Oncology*, 8, 515. doi:10.3389/fonc.2018.00515.

Silva, G. A., Nogueira, M. C., Lima, F. R., & Ferreira, L. M. (2018). Câncer de pele no Brasil: uma análise do Sistema de Informações Hospitalares do SUS, 2008 a 2012. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 27(1), e2017170. doi:10.5123/s1679-49742018000100009.

Slominski, A., Zmijewski, M. A., & Pawelek, J. (2012). "L-tyrosine and L-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte functions."

Pigment Cell & Melanoma Research, 25(1), 14-27. doi:10.1111/j.1755-148X.2011.00898.x.

Speiser DE, Chijioke O, Schaeuble K, Münz C. CD4+ T cells in cancer. *Nat Cancer*. 2023 Mar;4(3):317-329. doi: 10.1038/s43018-023-00521-2. Epub 2023 Mar 9. PMID: 36894637.

Spranger, S., & Gajewski, T. F. (2018). Impact of oncogenic pathways on evasion of antitumour immune responses. *Nature Reviews Cancer*, 18(3), 139-147. doi:10.1038/nrc.2017.117.

Steinman, R. M., & Banchereau, J. (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, 449(7161), 419-426. doi:10.1038/nature06175.

Sullivan, R. J., & Atkins, M. B. (2020). "Combination therapy for melanoma: A new standard of care." *Journal of Clinical Oncology*, 38(5), 599-610. doi:10.1200/JCO.19.02393.

Tang, J., Shalabi, A., & Hubbard-Lucey, V. M. (2018). Comprehensive analysis of the clinical immuno-oncology landscape. *Annals of Oncology*, 29(1), 84-91. doi:10.1093/annonc/mdx755.

Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2015). Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*, 27(4), 450-461. doi:10.1016/j.ccell.2015.03.001.

van Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). "Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays." *BMC Research Notes*, 8, 47. doi:10.1186/s13104-015-1000-8.

Veglia, F., Sanseviero, E., & Gabrilovich, D. I. (2021). Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. *Nature Reviews Immunology*, 21(8), 485-498. doi:10.1038/s41577-021-00538-4.

Wculek, S. K., Cueto, F. J., Mujal, A. M., Melero, I., Krummel, M. F., & Sancho, D. (2020). Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, 20(1), 7-24. doi:10.1038/s41577-019-0210-z.

Whiteman, D. C., Green, A. C., & Olsen, C. M. (2016). The growing burden of invasive melanoma: projections of incidence rates and numbers of new cases in six susceptible populations through 2031. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(6), 1161-1171. doi:10.1016/j.jid.2016.01.035.

Yde, S. S., Sjoegren, P., Heje, M., & Stolle, L. B. (2018). Mucosal Melanoma: a Literature Review. *Current Oncology Reports*, 20(3). doi:10.1007/s11912-018-0675-0

Zhang, Y., Zhang, Z., & Ding, Y. (2019). Doxorubicin induces immunogenic cell death in murine models of lymphoma and melanoma. *Cell Death & Disease*, 10(12), 949. doi:10.1038/s41419-019-2166-5.

Zhu, Y., Knolhoff, B. L., Meyer, M. A., Nywening, T. M., West, B. L., Luo, J., ... & DeNardo, D. G. (2019). CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Research*, 79(1), 132-145. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1252.

Zitvogel, L., Galluzzi, L., Kepp, O., Smyth, M. J., & Kroemer, G. (2018). Type I interferons in anticancer immunity. *Nature Reviews Immunology*, 15(7), 405-414. doi:10.1038/nri3845.

Zitvogel, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2010). Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell*, 140(6), 798-804. doi:10.1016/j.cell.2010.02.015.