

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM  
PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**ESTUDO *IN VIVO* DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE  
VESÍCULAS EXTRACELULARES LIBERADAS POR  
CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMARIO  
EM MODELO MURINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental.

**VANESSA XAVIER**

**SÃO PAULO**

**2023**

**UNIVERSIDADE PAULISTA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM  
PATOLOGIA AMBIENTAL E EXPERIMENTAL**

**ESTUDO *IN VIVO* DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE  
VESÍCULAS EXTRACELULARES LIBERADAS POR  
CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMARIO  
EM MODELO MURINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Cristina Perez Hurtado.

**VANESSA XAVIER**

**SÃO PAULO**

**2023**

Xavier, Vanessa.

Estudo *in vivo* do potencial terapêutico de vesículas extracelulares liberadas por células de adenocarcinoma mamário em modelo murino / Vanessa Xavier. - 2023.

53 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2023.

Área de concentração: Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elizabeth Cristina Perez Hurtado.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patricia Xander Batista.

1. Câncer de mama. 2. Células 4T1. 3. Exossomos. 4. Vacina terapêutica. 5. Imunologia tumoral. I. Hurtado, Elizabeth Cristina Perez (orientadora). II. Batista, Patricia Xander (coorientadora). III. Título.

**VANESSA XAVIER**

**ESTUDO *IN VIVO* DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE  
VESÍCULAS EXTRACELULARES LIBERADAS POR  
CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMARIO  
EM MODELO MURINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para a obtenção do título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Elizabeth Cristina Pérez Hurtado  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Anuska Marcelino Alvares Saraiva  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Guilherme Xavier  
Universidade Paulista – UNIP

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Patrícia Xander Batista  
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Elaine Guadalupe Rodrigues e  
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Dedico este trabalho as minhas avós, Edvirgens Marcon Rodrigues (*In memoriam*) e Maria dos Santos Xavier (*In memoriam*) com toda minha saudade, amor e gratidão.

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Elizabeth C. Perez pela confiança, ensinamentos e apoio, por não desistir de mim e me mostrar que apesar de todas as dificuldades existentes somos capazes de seguir em frente e ir atrás dos nossos sonhos.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Patricia Xander por me iniciar no mundo da ciência, por todo o suporte, dedicação e por ser fornecedora dos alicerces necessários para que outras pessoas possam crescer ao seu redor.

Aos professores José Guilherme Xavier, Anuska Marcelino Alvares e Ieda Maria Longo Maugéri (*In memoriam*) pela generosidade, ensinamentos e acolhimento prestado para a elaboração deste trabalho.

Aos meus colegas Talita Dupin e Aline, da Unifesp, que foram cruciais para o bom desenvolvimento desse trabalho e por toda a ajuda prestada com muito zelo.

Aos meus colegas da Unip, Débora de Oliveira Mares Silvestro, Thiago Albuquerque Viração e Thais Cristina da Silva por toda ajuda, disposição e colaboração para a realização deste projeto.

Aos funcionários da UNIP, Sandra, Joyce, Suzana, Cleide, Elza, Wilton e Aylton, por toda ajuda prestada e disposição para eu poder realizar o projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Paulista, pela oportunidade de realização do curso e pelo apoio recebido sempre que precisei.

Aos meus pais Luiz e Zenaide por sempre acreditar em mim, por entender todas as minhas chateações/ frustrações, por enxugar todas as lágrimas que insistiam em rolar, por não medir esforços para a realização dos meus sonhos e me demonstrar o meu valor diariamente.

Ao meu irmão Eduardo e minha cunhada Usla, por além de acreditar no meu esforço, me auxiliarem em tudo que foi preciso e por me presentear com meus sobrinhos Luizinho (*In memoriam*) e o Arthur, meu companheiro nas madrugadas de estudos por muitas vezes.

A minha terapeuta, Tatiana Ferreira, por me ajudar a manter o equilíbrio e a me ensinar a lidar com alguns obstáculos e aprender com eles.

Ao meu amigo, Rafael Pepinelli, por me auxiliar e compartilhar seu conhecimento para que eu pudesse obter melhores resultados.

Aos meus amigos, Julian Medeiros, Rafael Risso e Denise de Bem, por abrirem suas casas e de uma forma generosa deixar a minha disposição para que eu pudesse passar por esta fase de uma forma mais tranquila, por emprestar a internet quando eu precisava trabalhar e não teria tempo para chegar em casa, por me auxiliar com aplicativos e formas de tornar a minha vida profissional/ acadêmica em sintonia.

Ao todos meus amigos, que entenderam esta minha fase e estiveram sempre dispostos a me ajudar de todas as formas possíveis.

## RESUMO

Vesículas extracelulares de células tumorais têm potencial para serem usadas como vacinas contra o câncer, pois possuem grande número de antígenos tumorais que podem desencadear resposta imune do hospedeiro. Resultados anteriores do grupo mostraram que vesículas extracelulares (VEs) liberadas por células de adenocarcinoma mamário 4T1 (4T1-VEs) influenciaram o perfil fenotípico de macrófagos RAW 264.3 em modelo *in vitro*, entretanto seus efeitos em modelo biológico *in vivo* não foram avaliados. Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar o possível efeito terapêutico das 4T1-VEs em camundongos com tumores de mama. Para isto, coletas de sobrenadantes de cultura de células 4T1 nos tempos de 2, 4, 6, 8, 20, 24 e 48 horas foram realizadas para seleção do tempo com maior concentração de partículas, com tamanhos semelhantes as vesículas extracelulares pequenas (<100 nm). Em seguida, camundongos BALB/c foram primeiramente inoculados via subcutânea com células 4T1 e após sete e quatorze dias, 4 µg de VEs liberadas por células 4T1 após 20 h de cultura (4T1-VEs), na presença ou ausência de suspensão de *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), foram inoculadas por via intraperitoneal (i.p). Sete dias após segunda dose do tratamento, animais foram eutanasiados para análises histopatológicas do tumor, linfonodos, baço e pulmões, além de quantificação de citocinas e linfoproliferação. Avaliação do estado geral dos animais, medições do tamanho tumoral e peso foram também realizados durante todo o período de experimentação. Resultados obtidos no presente trabalho e apresentados em formato de artigo que será submetido ao periódico *Immunobiology*, demonstraram que animais tratados com 4 µg de 4T1-VEs + *P.acnes* apresentaram diminuição do volume tumoral, além de apresentar menor número das divisões celulares das células tumorais. Em conjunto, os dados aqui apresentados evidenciam pela primeira vez, o potencial de VEs liberadas por células tumorais para o desenvolvimento de vacinas com fins terapêuticos para cânceres agressivos como o câncer de mama.

**Palavras-chave:** Câncer de mama, células 4T1, vacina terapêutica, imunologia tumoral.

## ABSTRACT

Extracellular vesicles of cancer cells have the potential to be used as vaccines against cancer because they have a large number of tumor antigens which can trigger the host's immune response. Previous results from the group showed that extracellular vesicles (EVs) released by 4T1 breast adenocarcinoma cells (4T1-EVs) influenced the phenotypic profile of RAW 264.3 macrophages in an *in vitro* model, however their effects in an *in vivo* biological model were not evaluated. Thus, the objective of the present work was to investigate the possible therapeutic effect of 4T1- EVs in mice with breast tumors. For this, collections of 4T1 cell culture supernatants at times of 2, 4, 6, 8, 20, 24 and 48 hours were performed to select the time with the highest concentration of particles, with sizes similar to small EVs (<100 nm). BALB/c mice were then subcutaneously inoculated with 4T1 cells. After seven and fourteen days, 4 µg of EVs released by 4T1 cells after 20 h of culture (4T1-EVs), in the presence or in the absence of suspension of *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), were inoculated intraperitoneally (i.p). Seven days after the second dose of treatment, animals were euthanized for histopathological analysis of the tumor, lymph nodes, spleen and lungs, in addition to quantification of cytokines and lymphoproliferation. Evaluation of the general condition of the animals, measurements of tumor size and weight were also carried out during the entire period of experimentation. Results obtained in the present study and presented in the form of an article that will be submitted to the journal *Immunobiology*, demonstrated that animals treated with 4 µg of 4T1-EVs + *P.acnes* showed a decrease in tumor, in addition to presenting a lower number of cell divisions of tumor cells. Together, the data presented here evidence for the first time the potential of EVs released by tumor cells for the development of vaccines with therapeutic purposes for aggressive cancers such as breast cancer.

**Keywords:** Breast cancer, 4T1 cells, therapeutic vaccine, tumor immunology.

## SUMÁRIO

I. REVISÃO DE LITERATURA .....	10
REFERÊNCIAS.....	15
II. ARTIGO - Periódico para submissão: <i>Immunobiology</i> .....	21
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	23
2.1 Linhagem celular.....	23
2.2 Obtenção e purificação de vesículas extracelulares .....	24
2.3 Avaliação de viabilidade celular pela detecção de 7AAD/Anexina.....	24
2.4 Dosagem proteica .....	25
2.5 Avaliação da concentração e tamanho das vesículas por aparelho medidor de partículas .....	25
2.6 Animais.....	25
2.7 Adjuvante .....	26
2.8 Desafio tumoral e tratamentos .....	27
2.9 Avaliação do crescimento tumoral .....	28
2.10 Ensaio de linfoproliferação.....	28
2.11 Produção de lisado tumoral .....	29
2.12 Dosagem de anticorpos protetores IgG1 e IgG2A .....	29
2.13 Quantificação de citocinas por citometria de fluxo .....	30
2.14 Análises histopatológicas (histometria).....	30
2.15 Análises estatísticas .....	31
3. RESULTADOS.....	32
3.1 Padronização dos tempos de cultura de células 4T1 para coleta de VEs ..	32
3.2 Avaliação dos efeitos do tratamento com VEs liberadas por células 4T1 no peso e crescimento tumoral em camundongos com tumor de mama .....	34
3.3 Avaliação da linfoproliferação após contato com células 4T1 ou seu extrato celular.....	36
3.4 Perfil das respostas de anticorpos IgG1 e IgG2a em camundongos antes e após desafio tumoral .....	39
3.5 Avaliação da produção de citocinas no soro antes do tratamento, e no soro e tumor após tratamento.....	41

3.6 Avaliação histopatológica da progressão de lesões e características morfológicas .....	44
4. DISCUSSÃO.....	46
5. CONCLUSÃO .....	50
6. CONFLITOS DE INTERESSE.....	50
7. DECLARAÇÃO DE ÉTICA .....	51
8. REFERÊNCIAS .....	51
ANEXOS.....	54

## I. REVISÃO DE LITERATURA

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, 2022) e da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2022), atualmente o câncer representa a segunda maior causa de morte na população mundial. A situação é tão alarmante e assim estimasse que uma em cada quatro pessoas pode desenvolver câncer ao longo da vida (ROY e SAIKIA, 2016). Na oncogênese, o câncer surge a partir de células que sofrem alterações genéticas e/ou epigenéticas que levam à proliferação anormal e descontrolada das células para formar tumores (COTRAN, 2010; GOMES e MOREIRA, 2007). Tais alterações podem ser resultado de uma variedade de fatores intrínsecos, como mutações genéticas herdadas ou erros aleatórios na replicação do DNA e, fatores extrínsecos como dano e instabilidade genética induzida por radiação, substâncias químicas ou por infecção viral (GUIDO, 2014; LODISH, 2004; TANNOCK et al., 2005).

Entre os tipos de neoplasias, e desconsiderando o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama é o tipo mais comum e letal entre as mulheres, tanto no Brasil como no mundo, com estimativa de 66.280 novos casos em 2021 (INCA, 2022). Já na população masculina, o câncer de mama é raro, representando apenas 1% do total de casos da doença, porém em 2020 o número de mortes por câncer de mama foi de 18.032, sendo 207 homens e 17.825 mulheres (INCA, 2022).

O desenvolvimento do câncer de mama é um processo de várias etapas envolvendo vários tipos de células, e sua prevenção continua sendo um desafio no mundo, assim o diagnóstico precoce é uma das melhores abordagens para prevenir a doença (SUN et al., 2017; ANASTASIADI et al., 2017). Os tumores de mama geralmente se iniciam a partir da hiperproliferação ductal, e depois evoluem para tumores benignos ou mesmo carcinomas metastáticos após estímulo constante por vários fatores carcinogênicos (SUN et al., 2017).

Conforme a *American Cancer Society* (ACS, 2023), existem vários tipos de câncer de mama que são caracterizados pelas células específicas afetadas. Temos carcinomas tumorais malignos iniciados nas células epiteliais, e quando se formam em um epitélio glandular recebem o nome de adenocarcinoma, que acomete as células do ducto mamário ou nas glândulas produtoras de leite (lóbulo). O tipo de câncer de mama também pode ser caracterizado se o câncer tem capacidade de disseminar ou não, assim o câncer de mama *in situ* é aquele que começa no ducto de

leite e pode invadir o tecido mamário, já o câncer de mama invasivo dissemina no tecido mamário circundante (KATSURA et al., 2022; ACS, 2023). Entre os cânceres de mama invasivos, o carcinoma lobular invasivo e o carcinoma ductal invasivo, representam entre 70 a 80% dos casos (SUN et al., 2017; KATSURA et al., 2022).

Quando analisamos as moléculas envolvidas nos tumores, o triplo negativo é responsável por 10 a 15% dos casos sendo considerado um dos tipos mais agressivos pelo seu crescimento rápido, maior probabilidade de disseminar e maior chance de recidiva após tratamento (ACS, 2023). O câncer de mama triplo negativo é caracterizado por não possuir receptores de estrogênio e progesterona e não produzir uma proteína específica, chamada HER2 (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano), essas características dificultam o diagnóstico e tratamento hormonal. Este tipo de câncer tende a ser mais comum em mulheres com menos de 40 anos de idade (SUN et al., 2017; KATSURA et al., 2022; ACS, 2023). A identificação da via HER2 e sua disfunção quando o gene é expresso levou ao desenvolvimento do anticorpo monoclonal anti-HER2, trastuzumabe, que melhora significativamente a sobrevida global em cenários metastáticos e adjuvantes (ANASTASIADI et al., 2017).

Já entre os tipos menos frequentes estão o câncer de mama inflamatório, doença de Paget, tumor filóide e angiossarcoma acometem em menos de 5% dos casos (SUN et al., 2017; ANASTASIADI et al., 2017; ACS, 2023).

O câncer não é uma doença que acomete somente humanos, também é uma das principais causas de morte ou eutanásia em animais de companhia, entre os tipos mais frequentes, as neoplasias mamárias representam o tumor mais comum em fêmeas caninas e o terceiro mais comum nas felinas, porém quando avaliamos a agressividade do tumor o cenário inverte, acometendo de forma mais agressiva nas felinas quando comparado com as caninas. No entanto, em maioria essas neoplasias são malignas e podem estar associadas a mortalidade, o que justifica a preocupação atual dos oncologistas veterinários quanto ao diagnóstico precisão e estratégias terapêuticas para essa doença (RICARTE, 2021; CASSALI et al., 2020).

Assim, devido à grande ocorrência de casos, a demanda por novos tratamentos e novas metodologias para o estudo da doença vêm aumentando nos últimos anos, a fim de melhorar a qualidade de vida e sobrevida dos pacientes portadores desta doença (GUIDO, 2014). Entretanto, apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento do câncer, a formação de tumores secundários ou metástases continua sendo a causa

de mais de 90% das mortes relacionadas ao câncer tanto de mama como de outros tipos de tumores (INCA, 2022).

Embora a taxa de incidência de câncer de mama aumente ano após ano, esforços contínuos de pesquisa estão tornando os tratamentos mais personalizados com a esperança de minimizar os efeitos colaterais e melhorar as taxas de sobrevivência (ANASTASIADI et al., 2017). Terapias biológicas foram desenvolvidas nos últimos anos e provaram ser benéficas para o câncer de mama (KATSURA et al., 2022). A ideia de desenvolver vacinas terapêuticas contra o câncer tem sido explorada desde a descoberta inicial de antígenos específicos do tumor por Georg Klein em 1967 (ZHANG et al., 2018). Ao contrário das terapias tradicionais, as vacinas contra o câncer estimulam e fortalecem os mecanismos de defesa do indivíduo para eliminar as células tumorais de forma específica ao reconhecer antígenos expressos nas células cancerosas (ZHANG et al., 2018).

As vacinas terapêuticas que visam gerar imunidade mediada por células, representam uma opção viável para a imunoterapia ativa na qual indivíduos com a doença são capazes de montar sua própria resposta antitumoral de forma rápida e eficaz (CHUNGING et al., 2013 ; HANCOCK et al., 2018). Ao contrário das vacinas profiláticas, administradas a indivíduos saudáveis com fins preventivos (CHUNGING et al., 2013; ZHAO et al., 2021), as vacinas terapêuticas, usadas principalmente para tumores sólidos, contribuem para induzir memória antitumoral de longo prazo, causando regressão do tumor ou erradicação da doença residual mínima, prevenindo portanto a recorrência do tumor e minimizando os efeitos inespecíficos ou desagradáveis dos medicamentos antitumorais (GRUPTA et al., 2022).

Os vários mecanismos efetores imunológicos mobilizados pela vacinação terapêutica atuam especificamente nas células cancerosas e poupam as células normais (CHUNGING et al., 2013). Essas vacinas podem ser preparadas usando as mesmas células tumorais do paciente, que uma vez irradiadas são combinadas com um adjuvante imunoestimulador para serem inoculadas novamente ao paciente. Este tipo de abordagem é utilizado para inibir o crescimento de recidivas tumorais e/ou metástases que são em maioria, resistentes às terapias convencionais, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia (CHUNGING et al., 2013).

Para a produção de vacinas, o uso de adjuvantes representa uma estratégia para potencializar, acelerar ou prolongar as respostas imunológicas específicas contra o antígeno (Yan et al., 2019). Assim, o uso de adjuvantes aumenta a imunogenicidade

da vacina, por promover o tráfego/migração de células imunológicas para o local da injeção, favorecendo ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs) e células efetoras (PASTON et al., 2021; ZHAO et al., 2022). Neste contexto, o *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) é um bacilo anaeróbico gram-positivo presente na microbiota normal da pele humana, que quando usado como suspensão morta pelo calor é considerada um adjuvante, pois exerce efeitos imunomoduladores aumentando as atividades fagocítica e tumoricida dos macrófagos, promovendo a maturação e ativação de células dendríticas e linfócitos T, produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento da resposta humoral a diferentes antígenos, características frequentes nas respostas do tipo Th1 (ISHIMURA et al., 2018).

Considerando que as células T são cruciais nas respostas contra tumores, um novo pilar revolucionário no tratamento do câncer é a terapia com células T do receptor de antígeno quimérico (CAR). Embora o tratamento com células CAR-T tenha produzido respostas clínicas notáveis com certos subconjuntos de leucemia ou linfoma de células B, muitos desafios limitam a eficácia terapêutica das células CAR-T em tumores sólidos e malignidades hematológicas (MA et al., 2019; STERNER e STERNER, 2021). Os CARs são receptores sintéticos projetados que funcionam para redirecionar linfócitos, habitualmente células T, para reconhecer e eliminar células que expressam um antígeno alvo específico. Recentemente, dois medicamentos baseados em células CAR-T, Kymriah (Tisagenlecleucel) e Yescarta (Axicabtagene ciloleucel) aprovados pelo FDA dos EUA (US Food and Drug Administration) são usados para tratamento de leucemia linfoblástica aguda de células B e linfoma de células grandes, respectivamente, (MA et al., 2019; STERNER e STERNER, 2021). Vale ressaltar que no Brasil a ANVISA também aprovou em 2022 o Kymriah®, um produto de terapia avançada para câncer hematológico, porém o custo é elevadíssimo. Apesar dos progressos feitos no tratamento de neoplasias hematológicas, ainda permanecem os desafios para o uso da terapia com células CAR-T para o tratamento de tumores sólidos (MA et al., 2019; STERNER e STERNER, 2021).

Novas terapias, a fim de compreender os mecanismos envolvidos na aquisição de fenótipos mais agressivos que conferem maior resistência aos tratamentos anticâncer, autores têm demonstrado que células tumorais liberam vesículas extracelulares (VEs) para mediar interações com outras células no microambiente tumoral. Estas partículas, exibem ainda a assinatura molecular das células

progenitoras e são capazes de modular as respostas das células do sistema imune promovendo respostas favoráveis para invasão, progressão e estabelecimento de tumores secundários (ROBBINS et al., 2014; CZERNEK et al., 2015; PLATKO et al., 2019).

Estudos com VEs se iniciaram em 1956 com o Dr Fawcett, que observou pequenas estruturas esféricas intra e extracelulares nas suas análises de microscopia eletrônica (STAM et al., 2021). As vesículas extracelulares são nanopartículas membranosas secretadas por múltiplos tipos celulares, que medeiam comunicação intercelular em condições fisiológicas e patológicas. Elas estão constituídas por uma bicamada lipídica e podem ser liberadas de forma constitutiva por qualquer tipo de estímulo (LÄSSER et al., 2016).

Dependendo da sua origem, composição e tamanho, as VEs são classificadas como: VEs pequenas, onde podemos incluir o exossomos (<100 nm), formados a partir de invaginações da membrana endossomal, que permite a incorporação de biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e açúcares presentes nas porções interiores e superficiais destas partículas; VEs médias (< 200 nm) e VEs grande (> 200 nm) as quais são liberadas a partir da membrana plasmática; e corpos apoptóticos (> 1000 nm), fragmentos celulares envolvidos por membrana citoplasmática liberados por células em apoptose (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015; COLOMBO et al., 2014; RAPOSO et al., 2013; THÉRY et al., 2018).

Estudos bioquímicos mostraram que VEs podem ser constituídas por ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (revisado por CAMPOS et al., 2015). Na dependência da sua constituição, participam dos processos de comunicação intercelular por estimulação direta de células-alvo via interações com receptores ou pela transferência de várias moléculas bioativas incluindo receptores de membrana, proteínas, mRNA e/ou microRNAs (BAYER-SANTOS et al., 2012). Além de comunicação intercelular, as VEs participam também da regulação do microambiente celular por meio de: (1) apresentação e/ou internalização de antígenos e transferência de moléculas; (2) receptores na superfície celular que se ligam a uma proteína na membrana da vesícula e ativam uma via de sinalização intracelular; (3) transferência de proteínas, fatores de transcrição, partículas infecciosas ou oncogenes; (4) transferência de material genético para células receptoras por meio da fusão das vesículas à membrana celular ou, através da endocitose das vesículas, para que o RNA exossomal seja traduzido em proteínas e assim modular a função imunológica, induzir apoptose, promover

proliferação celular ou, estimular a angiogênese (GONDA et al., 2013; SKOG et al., 2008). Contudo, a participação das VEs tanto na fisiologia celular como no desenvolvimento de doenças tem sido demonstrada em vários modelos de estudo, por isto nos últimos 20 anos, pesquisas com VEs têm aumentado exponencialmente (LÄSSER et al., 2016; RAPOSO et al., 2013).

Embora essas partículas carreguem moléculas do tumor que podem estimular resposta imunológica, ainda não estão completamente esclarecidos os mecanismos de ação das VEs como potenciais alvos terapêuticos. Assim o presente trabalho tem como objetivo avaliar o papel das vesículas extracelulares no desenvolvimento e progressão do crescimento de células de adenocarcinoma mamário, com o intuito de contribuir na descoberta de novos alvos terapêuticos contra cânceres agressivos como o adenocarcinoma mamário.

## REFERÊNCIAS

ACS – American Cancer Society. Types of Breast Cancer. **cancer.org**. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/types-of-breast-cancer.html>. Acesso em: 30 jan, 2023.

ANASTASIADI,Z.; LIANOS, G.D.; IGNATIADU, E.; HARISSIS, H.V. et. al. Breast câncer in Young women: an overview. Published: 04 March 2017. **Updates Surg** (2017) 69:313-317

CAMPOS, J. H.; SOARES, R. P.; RIBEIRO, K.; ANDRADE, A. C. *et al.* Extracellular Vesicles: Role in Inflammatory Responses and Potential Uses in Vaccination in Cancer and Infectious Diseases. **J Immunol Res**, 2015, p. 832057, 2015.

CAMPBELL, V. MCKENZIE; CHANUKYA K. COLONNE; JIA HAO YEO; STUART T. FRASER. Splenomegaly: Pathophysiological bases and therapeutic options. **J Biochem Cell Bio** Jan 2018 doi: 10.1016/j.biocel.2017.11.011

CASSALI, et al.; Consensus Regarding the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine and Feline Mammary Tumors - 2019. **Braz J Vet Pathol**, 2020, 13(3), 555 – 574 DOI: 10.24070/bjvp.1983-0246.v13i3p555-574

CHUNGING G., MASOUND H. M., JOHN R. S., DEVANAND S., PAUL B. F., XIANG-YANG W. Therapeutic Cancer Vaccines: Past, Present and Future. **Adv Cancer Res**. 2013; 119: 421–475.

COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 30, p. 255-289, 2014.

COTRAN, R. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 8<sup>o</sup> ed. 2010.

CRONIN, K. A.; LAKE, A. J.; SCOTT, S.; SHERMAN, R. L. *et al.* Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part I: National cancer statistics. **Cancer**, May 2018.

CVJETKOVIC, A.; JANG, S. C.; KONEČNÁ, B.; HÖÖG, J. L. *et al.* Detailed Analysis of Protein Topology of Extracellular Vesicles-Evidence of Unconventional Membrane Protein Orientation. **Sci Rep**, 6, p. 36338, Nov 2016.

CZERNEK, L.; CHWOROS, A.; DUECHLER, M. The Uptake of Extracellular Vesicles is Affected by the Differentiation Status of Myeloid Cells. **Scand J Immunol**, 82, n. 6, p. 506-514, Dec 2015.

DENADAI, M.; SUEUR-MAFUF, L.; MARQUES, C. *et al.* Reproductive cycle of the trigonal clam *Tivela mactroides* (Bivalvia, Veneridae) in Caraguatatuba Bay, southeastern Brazil. **Marine Biology Research**, 2015.

EL ANDALOUSSI, S.; MÄGER, I.; BREAKFIELD, X. O.; WOOD, M. J. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. **Nat Rev Drug Discov**, 12, n. 5, p. 347-357, May 2013.

FAWCETT, D. W. Electron microscope observations on intracellular virus-like particles associated with the cells of the Lucké renal adenocarcinoma. **J Biophys Biochem Cytol**, 2, n. 6, p. 725-741, Nov 1956.

FRANQUESA, M.; HOOGDUIJN, M. J.; RIPOLL, E.; LUK, F. *et al.* Update on controls for isolation and quantification methodology of extracellular vesicles derived from adipose tissue mesenchymal stem cells. **Front Immunol**, 5, p. 525, 2014.

GIACOBINO, C. *et al.* Extracellular Vesicles and Their Current Role in Cancer Immunotherapy. **Cancers**, v. 13, n. 9, maio 2021.

GOMES, I. L.; MOREIRA, M. C. **Fisiopatologia**. Rio de Janeiro: 2007.

GONDA, D. D.; AKERS, J. C.; KIM, R.; KALKANIS, S. N. *et al.* Neuro-oncologic applications of exosomes, microvesicles, and other nano-sized extracellular particles. **Neurosurgery**, 72, n. 4, p. 501-510, Apr 2013.

GUO, J.; DUAN, Z.; ZHANG, C.; WANG, W. *et al.* Mouse 4T1 Breast Cancer Cell-Derived Exosomes Induce Proinflammatory Cytokine Production in Macrophages via miR-183. **J Immunol** November 15, 2020, 205 (10) 2916-2925

GRUPTA M.; WAHI A.; SHARMA P.; NAGPAL R.; RAINA N.; KAURAV M.; BATTACHARYA J.; OLIVEIRA S.; DOLMA K.; PAUL A.; PEREIRA M.; WILAIRATANA P.; Recent Advances in Cancer Vaccines: Challenges, Achievements, and Futuristic Prospects. **Vaccines (Basel)**. 2022 Dec; 10(12): 2011.

HANCOCK G.; HELNET K.; DORELL L. Therapeutic HPV vaccines. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**. Volume 47, February 2018, Pages 59-72

HOU, P.-P.; CHEN, H.-Z. Extracellular vesicles in the tumor immune microenvironment. **Cancer letters**, v. 516, p. 48–56, maio 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Câncer de mama**. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/mama>. Acesso em 21 de novembro de 2022.

ISHIMURA, M.E; TEIXEIRA, D; SILVEIRA G.P; GAMBERO, M; GAMA, G.A.C; PIMENTA, B.S.O; RODRIGUES, E.G; LONGO-MAUGÉRI, I.M; Killed *Propionibacterium acnes* enhances immunogenicity and tumor growth control of a dendritic-tumor cell hybrid vaccine in a murine melanoma model. **PLoS ONE**,2018 13(10): e0205148.

JAZEDJE, T.; RIBEIRO, A. L.; PELLATI, M.; BUENO, H.M.; NAGATA, G.; TRIERVEILER, M.; RODRIGUES, E.G.; ZATZ, M.; Human Mesenchymal Stromal Cells Transplantation May Enhance or Inhibit 4T1 Murine Breast Adenocarcinoma through Different Approaches. **J Enzyme Inhib Med Chem**. 2017; 32 (1): 1299–1304.

LIU, Z.; JIAO, D. Necroptosis, tumor necrosis and tumorigenesis. **Cell Stress**. 2020 Jan; 4(1): 1–8.

LOFGREN, J.; MILLER, A.L; LEE, C.C.S; BRADSHAW, C., *et al*. Analgesics promote welfare and sustain tumour growth in orthotopic 4T1 and B16 mouse cancer models. **Lab Anim**. 2018 Aug; 52(4): 351–364.

LOFTUS A , C. A., GEORGE C , UCCI A , SHEFFERD K , GREEN A , PAONE R , PONZETTI M , DELLE MONACHE S , MURACA M , TETI A , RUCCIN . Extracellular Vesicles from Osteotropic Breast Cancer Cells Affect Bone Resident Cells. **J Bone Miner Res**. 2020 Feb;35(2):396-412

LYNNE, U. S.; LEWIS, G. H.; NIC, R. B, Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. **Journal of Experimental Biology**, 3007-3016, 2017

LÄSSER, C.; THÉRY, C.; BUZÁS, E. I.; MATHIVANAN, S. *et al*. The International Society for Extracellular Vesicles launches the first massive open online course on extracellular vesicles. **J Extracell Vesicles**, 5, p. 34299, 2016.

KATSURA, C.; OGUNMWONYI, I.; KANKAM, H.; SAHA, S.; Breast cancer: presentation, investigation and management. **Br J Hosp Med (Lond)** . 2022 Feb 2;83(2):1-7.

MA S.; LI X.; WANG X.; CHENG L.; LI Z.; ZHANG C.; YE Z.; QIAN Q. Current Progress in CAR-T Cell Therapy for Solid Tumors. **Int J Biol Sci**. 2019 Sep 7;15(12):2548-2560.

MADERA, L.; GREENSHIELDS, A.; COOMBS, M.R.P.; HOSKIN, D. W. 4T1 Murine Mammary Carcinoma Cells Enhance Macrophage-Mediated Innate Inflammatory Responses. **Plos one** - Published: July 15, 2015 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133385>

MARASOVIC, M.; IVANKOVIC, S.; STOJKOVIC, R.; DJERMIC, D.; GALIC, B.; MILOS, M.; *In vitro* and *in vivo* antitumour effects of phenylboronic acid against mouse mammary adenocarcinoma 4T1 and squamous carcinoma SCCVII cells. **J Enzyme Inhib Med Chem**. 2017; 32(1): 1299–1304.

NARENDRA et al. Immune system: a double-edged sword in cancer. **Inflammation Research**, v. 62, n. 9, p. 823-834, 2013.

Organização Pan-Americana da Saúde & Organização Mundial da Saúde, Câncer. Disponível em <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>. Acesso em 18 de abril de 2022

PASTON, S. J.; BRENTVILLE, V.A.; SYMONDS, P.; DURRANT, L.G. Cancer Vaccines, Adjuvants, and Delivery Systems. **Front Immunol** .2021 Mar 30;12:627932. eCollection 2021.

PLATKO, K.; HAAS-NEILL, S.; AZIZ, T.; AL-NEDAWI, K. The role of circulating extracellular vesicles in breast cancer classification and molecular subtyping. **Breast J**, May 2019.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol**, 200, n. 4, p. 373-383, Feb 2013.

RAYAMAJHI, S.; NGUYEN, T. D. T.; MARASINI, R.; ARYAL, S. Macrophage-derived exosome-mimetic hybrid vesicles for tumor targeted drug delivery. **Acta Biomater**, May 2019.

REIS, N.; DUPIN, T.; COSTA, C.; TOLEDO, M.; Oliveira, V.; POPI, A.; TORRECILHAS, A.; XANDER, P.; *Leishmania amazonensis* promastigotes or extracellular vesicles modulate B-1 cell activation and differentiation **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Oct 2020

RICARTE, V. A.; Estudo epidemiológico de neoplasias em gatos atendidos no setor de oncologia veterinária do hospital veterinário da Universidade Federal de Uberlândia no período de 2015 a 2020. **Universidade Federal de Uberlândia** – Instituto de Biotecnologia. Outubro-2021

ROBBINS, P. D.; MORELLI, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. **Nat Rev Immunol**, 14, n. 3, p. 195-208, Mar 2014.

RODRIGUES, G. Eletroquimioterapia para tratamento de câncer - desenvolvimento e avaliação em estudo de caso com camundongos portadores de melanoma B16F10. **Interunidades em Biotecnologia**, 2014, 10. 11606/T.87.2016.tde-31082015-125429

ROY, P. S; SAIKIA, B.J. Cancer and cure: A critical analysis. **Indian J Cancer**. 2016 Jul-Sep;53(3):441-442.

SALIMI, M.; SARKAR, S.; HASHEMI, M.; SABER, R. Treatment of Breast Cancer-Bearing BALB/c Mice with Magnetic Hyperthermia using Dendrimer Functionalized Iron-Oxide Nanoparticles. **Nanomaterials** (Basel). 2020 Nov 22;10(11):2310. doi: 10.3390/nano10112310.

SKOG, J.; WÜRDINGER, T.; VAN RIJN, S.; MEIJER, D. H. *et al*. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nat Cell Biol**, 10, n. 12, p. 1470-1476, Dec 2008.

SQUAIELLA, C.; ANANIAS, R.; MUSSALEM, J.; BRAGA, E. *et al*. In vivo and in vitro effect of killed *Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on mouse bone marrow stem cells and dendritic cell differentiation. **Immunobiology**, 2006;211(1-2):105-16.

SQUAIELLA, C.C.; TEIXEIRA, D.; MUSSALEM, J.; ISHIMURA, M. *et al*. Modulation of Th1/Th2 immune responses by killed *Propionibacterium acnes* and its soluble polysaccharide fraction in a type I hypersensitivity murine model: induction of different activation status of antigen-presenting cells. **J Immunol Res**. 2015;2015:132083. Epub 2015 Apr 20.

STAM, J.; BARTEL, S.; BISCHOFF, R.; WOLTERS, J.C. Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods. **Journal of Chromatography B**. Volume 1169, 15 April 2021, 122604

STERNER R.C.; STERNER R.M; CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. **Blood Cancer J**. 2021 Apr 6;11(4):69.

SUN, Y.; RUAN, J.; JUANG, Z.; WANG, L. *et al*. Extracellular Vesicles: A New Perspective in Tumor Therapy. **BioMed Research International** / 2018

SUN, Y.; ZHAO, Z.; YANG, Z.; XU, F. *et al*. **Int J Biol Sci**. 2017 Nov 1;13(11):1387-1397.

THÉRY, C.; WITWER, K.W; AIKAWA, E.; ALCARAZ, M.J, *et al*. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **J Extracell Vesicles**. 2018 Nov 23;7(1):1535750.

VARELLA, P.P.V.; FORTE, W.C.N. *Citokines*: a review. **Rev. bras. alerg. imunopatol**. 2001; 24(4):146-154

WANG, C.; WANG, Y.; SHI, X.; TANG, X. *et al*. The TRAPs From Microglial Vesicles Protect Against. **Front Cell Neurosci**, 13, p. 199, 2019.

WANG, X.; XU, C.; HUA, Y.; SUN, L. *et al*. Exosomes play an important role in the process of psoralen reverse multidrug resistance of breast cancer. **J Exp Clin Cancer Res**, 35, n. 1, p. 186, Dec 2016.

WATANABE, H.; NUMATA, K.; ITO, T.; TAKAGI, K. *et al.* Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. **Shock**: November 2004 - Volume 22 - Issue 5 - p 460-466

YAN, X.; ZHOU, M.; YU, S. *et al.* An overview of biodegradable nanomaterials and applications in vaccines. **Vaccine**, v.38, p.1096-1104, 2019

YÁÑEZ-MÓ, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of extracellular vesicles**, v. 4, p. 27066, 14 maio 2015.

YONG NG, C. KEE, L. AL-MASAWA, M. LEE, Q. *et al.* Scalable Production of Extracellular Vesicles and Its Therapeutic Values: A Review. **Int J Mol Sci**. 2022 Jul 20;23(14):7986

ZABOROWSKI, M. P. *et al.* Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. **Bioscience**, v. 65, n. 8, p. 783–797, ago.

ZHANG, R.; BILLINGSLEY, M.M; MITCHELL, M.J; Biomaterials for vaccine-based cancer immunotherapy. **J Control Release**. 2018 Dec 28; 292: 256–276.

ZHANG, W.; PAN, Y.; GOU, P.; ZHOU, C. *et al.* Effect of xanthohumol on Th1/Th2 balance in a breast cancer mouse model. **Oncology reports**. November 13, 2017. Pages: 280-288

ZHAO, Y.; BALDIN, A; ISAVEV, O. *et al.* Cancer Vaccines: Antigen Selection Strategy. **Vaccines** (Basel) 2021 Feb; 9(2): 85. Published online 2021 Jan 25.

ZHAO, Y.; WEI, K., CHI, H.; XIA, Z. *et al.* IL-7: A promising adjuvant ensuring effective T cell responses and memory in combination with cancer vaccines?. **Front Immunol**. 2022 Oct 28;13:1022808. eCollection 2022.

ZHOU, E. *et al.* Circulating extracellular vesicles are effective biomarkers for predicting response to cancer therapy. **EBioMedicine**, v. 67, p. 103365, 2021.

## II. ARTIGO - Periódico para submissão: *Immunobiology*

# ESTUDO *IN VIVO* DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES LIBERADAS POR CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO EM MODELO MURINO

**<sup>1</sup>Vanessa Xavier, <sup>1</sup>Thiago Albuquerque Viração, <sup>2</sup>Talita Vieira Dupin, <sup>1</sup>José Guilherme Xavier, <sup>3</sup>Sandra Patricia Kalil Perdomo, <sup>1</sup>Anuska Marcelino Alvares Saraiva, <sup>2</sup>Patrícia Xander Batista, e <sup>1</sup>Elizabeth Cristina Perez Hurtado**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista, São Paulo, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Imunologia Celular e Bioquímica de Fungos e Protozoários, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema, Diadema, Brasil.

<sup>3</sup>Whitehead Institute Biomedical research, Functional Genomics Platform, Cambridge, MA, United States

## Resumo

Vesículas extracelulares (VEs) são consideradas como potenciais marcadores para o diagnóstico e tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer, devido ao seu conteúdo, que reflete a natureza de suas células de origem, e por sua importância na comunicação intercelular. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar o possível efeito terapêutico de vesículas extracelulares liberadas por células de adenocarcinoma mamário 4T1 (4T1-VEs) em camundongos com tumores de mama. Para isto, camundongos BALB/c foram primeiramente inoculados via subcutânea com células 4T1 e após sete e quatorze dias, 4 µg de VEs liberadas por células 4T1 após 20 horas de cultura (4T1-VEs), na presença ou ausência de suspensão de *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), foram inoculadas por via intraperitoneal (i.p). Resultados obtidos no presente estudo demonstraram que animais tratados com 4 µg de 4T1-VEs + *P.acnes* apresentaram diminuição do volume tumoral, além de apresentar menor número das divisões celulares das células tumorais. Já o grupo tratado com 4 µg 4T1-VEs apresentou menor peso tumoral e do baço e menor área de necrose. Entretanto, após 7 dias de desafio tumoral e antes do tratamento foi observado aumento das citocinas IL-10 e IL-4. Em conjunto, os dados aqui

apresentados evidenciam pela primeira vez, o potencial de VEs liberadas por células tumorais para o desenvolvimento de vacinas com fins terapêuticos para cânceres agressivos como o câncer de mama.

**Palavras-chave:** Câncer de mama, exossomos, células 4T1, vacina terapêutica, imunologia tumoral.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tipo mais comum e incidente entre as mulheres. Já na população masculina, o câncer de mama é raro, representando apenas 1% do total de casos da doença (INCA, 2022). Devido à grande ocorrência de casos, a demanda por novos tratamentos e novas metodologias para o estudo da doença vêm aumentando nos últimos anos a fim de melhorar a qualidade de vida e sobrevida dos pacientes (GUIDO, 2014; ANASTASIADI et al., 2017). Entretanto, apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento do câncer, a formação de tumores secundários ou metástases continua sendo a causa de mais do que 90% das mortes relacionadas ao câncer tanto de mama como de outros tipos de tumores (DILLEKAS et al., 2019; INCA, 2022).

Embora a taxa de incidência de câncer de mama aumente ano após ano, esforços contínuos de pesquisas estão tornando os tratamentos mais personalizados com a esperança de minimizar os efeitos colaterais e melhorar as taxas de sobrevida (ANASTASIADI et al., 2017). Com o intuito de compreender os mecanismos envolvidos na aquisição de fenótipos mais agressivos que conferem maior resistência aos tratamentos anticâncer, autores têm demonstrado que células tumorais liberam vesículas extracelulares (VEs) que podem modular as respostas das células do sistema imune promovendo respostas favoráveis para invasão, progressão e estabelecimento de novos tumores secundários (CZERNEK et al., 2015; ROBBINS et al., 2014). Devido a sua capacidade de carregar diferentes tipos de moléculas como proteínas, ácidos nucleicos, lipídios, açúcares entre outros, as VEs são eficientes para comunicações célula-célula, por tanto têm papel importante na regulação de diversos processos fisiológicos e/ou patológicos (FRANQUESA et al., 2014; RAPOSO et al., 2013; YONG NG et al., 2022).

Recentemente, foi descrito que as VEs derivadas de células tumorais podem ser utilizadas para o desenvolvimento de vacinas contra o câncer, pois sua membrana possui grande número de antígenos tumorais, que podem favorecer eficientes respostas antitumorais (XU et al., 2020). A vacina contra o câncer baseada em VEs, atraiu mais atenção para prevenir o desenvolvimento de tumores ou tratar tumores existentes, tem como fundamento interferir nas interações entre o tumor e outras células presentes no microambiente tumoral (PLATKO et al., 2019, GIACOBINO et al., 2021; YONG NG et al., 2022). Em comparação com as vacinas convencionais, as vacinas baseadas em VEs oferecem características únicas, com melhor biossegurança e eficiência na apresentação de antígenos e como adjuvantes (LOFTUS, 2019). Entretanto, as VEs liberadas por células tumorais também podem estar também envolvidas na formação de metástases ao promover o preparo do ambiente favorável para o crescimento e progressão tumoral (THAKUR et al., 2014; YONG NG et al., 2022). Por isto, elas podem ser usadas como biomarcadores para o diagnóstico, recorrência, e/ou prognóstico de progressão tumoral ou da resposta terapêutica (PAKRAVAN et al., 2021; AL-HUMAIDI et al., 2021; THAKUR et al., 2021; HUANG et al., 2022).

Visto que as vacinas terapêuticas estimulam e fortalecem os mecanismos de defesa do indivíduo para eliminar as células tumorais de forma específica (ZHANG et al., 2018; GRUPTA et al., 2022; HANCOCK et al., 2018), a utilização de vacinas baseadas em EVs de células tumorais poderia ser uma nova abordagem para o tratamento de tumores metastáticos e resistentes a terapia convencionais como é o adenocarcinoma mamário. Assim, para melhor compreensão do papel das VEs como alvos terapêuticos para o câncer de mama, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de VEs liberadas por células de adenocarcinoma mamário para o tratamento do câncer de mama em modelo murino.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### *2.1 Linhagem celular*

Para o presente estudo foi utilizada a linhagem de células de adenocarcinoma mamário 4T1 (células 4T1). As células foram cultivadas em garrafas de cultura,

mantidas em meio completo (R10) preparado com RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) acrescido com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina (Gibco – Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA), em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. A desaderência das células para posteriores ensaios foi realizada por breve exposição à tripsina (Thermo Fisher) e inativação com meio suplementado com SFB.

## 2.2 Obtenção e purificação de vesículas extracelulares

Vesículas extracelulares liberadas pelas células 4T1 (4T1-VEs) foram obtidas por diversas etapas de centrifugação e ultracentrifugação. Inicialmente foi padronizado o tempo de cultura para obtenção de maior número de VEs liberadas por células 4T1 viáveis. Para isto, células 4T1 foram cultivadas em garrafas médias (75 cm<sup>2</sup>) com  $2,5 \times 10^6$  células em 10 mL de meio R10. Após adesão (*overnight*), o meio R10 foi removido, e as células foram mantidas por 2, 4, 6, 8, 20, 24 e 48 horas em meio RPMI 1640, sem troca de meio até o momento da sua colheita. Sobrenadantes obtidos nesses tempos de cultura foram submetidos a: (1) centrifugação de 500 g por 10 minutos para retirada das células; (2) o sobrenadante de (1) foi centrifugado a 1500 g por 10 minutos; (3) o sobrenadante de (2) foi então centrifugado a 10.000 g por 10 minutos para remoção final de células e debris celulares; (4) o sobrenadante de (3) foi ultracentrifugado a 100.000 g por 1 hora e o pellet contendo as vesículas foi ressuspensionado em PBS 1X filtrado e novamente centrifugado a 100.000 g por 1 hora. Pellet contendo as vesículas extracelulares foi ressuspensionado em 300 µL de PBS (1X) filtrado. Cada amostra foi armazenada a temperatura de -20°C até sua utilização.

## 2.3 Avaliação de viabilidade celular pela detecção de 7AAD/Annexina

Análises de citometria de fluxo foram realizadas para verificar a viabilidade celular das células 4T1 para coleta das VEs. Assim, no presente trabalho foi utilizado *PE annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Para isto, células tanto do sobrenadante como aderidas, foram coletadas e centrifugadas a 1500 rpm por cinco minutos. O *pellet* foi ressuspensionado em PBS 1X e, uma alíquota contendo  $10^5$  de células foi submetido a nova centrifugação e logo ressuspensionado em 100 µL de tampão do kit diluído 1x, acrescidos de 1 µL de PE Annexin V (PE) e 1 µL

de 7-Amino Actinomycin (7AAD). Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, 100 µL do tampão foram adicionados para aquisição e análises usando o citômetro *Accuri™ C6* (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

#### 2.4 Dosagem proteica

A dosagem de proteínas presentes nas 4T1-VEs foi realizada pelo método do ácido bicinconínico utilizando o kit BCA1-1KT (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA). Conforme instruções do fabricante, curva padrão foi realizada por diluição seriada de albumina bovina (INLAB, São Paulo, SP, Brasil) em concentrações de 0,5 - 200 µg/mL. A placa contendo a curva e as amostras de estudo em duplicata foi incubada com os reagentes específicos do Kit por 30 minutos a 37°C. Logo após o período de incubação, foi avaliada a densidade óptica (D.O.) em leitor de microplacas Thermoplate TP Reader NM (Thermoplate, São Paulo, SP, Brasil), no comprimento de onda de 550 nm. Os dados da D.O. gerados permitiram a construção da curva padrão, cálculo da equação da reta e quantificação de proteínas nas amostras.

#### 2.5 Avaliação da concentração e tamanho das vesículas por aparelho medidor de partículas

As 4T1-VEs coletadas foram avaliadas quanto ao tamanho e concentração no equipamento Nanosight (NS300 Malvern™), alocado no laboratório do Prof. Alvaro Pacheco da Disciplina de Nefrologia da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Para isto, 20 µL de amostra diluídos 10 X em PBS 1X filtrado foram utilizados para realização de três capturas com um minuto de duração (20 frames por segundo) a temperatura de 20°C.

#### 2.6 Animais

Total de 20 camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, *specific pathogen-free* (SPF) adultos com 8 semanas de idade, pesando entre 17 e 23 g, foram obtidos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo. Os animais foram mantidos em microisoladores, com temperatura de 20 ± 1 °C e ciclo de luz controlada (ciclo de 12

horas claro/escuro), com água autoclavada e ração esterilizada por ionização, *ad libitum*. Para a eutanásia, os animais foram submetidos a decapitação usando guilhotina.

Os experimentos do atual projeto foram delineados para minimizar ao máximo o número de camundongos empregados em cada teste, em atenção aos princípios dos 3Rs (LYNNE et al., 2017). Para calcular o N amostral do projeto foi utilizado o site [https://www.unip.br/presencial/pesquisa/comite\\_etica\\_animais/submissao\\_projetos.aspx](https://www.unip.br/presencial/pesquisa/comite_etica_animais/submissao_projetos.aspx), conforme o cálculo:

$$n = 1 + [2C*(s/d)^2], \text{ onde}$$

**C** é dependente dos valores escolhidos para a força ou poder do teste (1-β; chance de encontrar uma diferença existente) e nível de significância (α; a chance de considerar dois grupos diferentes quando eles não o são). Para pesquisadores que consideram p<0,05 o valor de α é 0,05. **s** é o desvio padrão aceitável de acordo com a projeção do pesquisador e **d** é a diferença esperada entre os grupos.

Este cálculo foi realizado considerando o nível de confiança de 90%, e o nível de significância de 0,05, com o desvio máximo de 0,2. Considerando estes parâmetros foi obtido o número mínimo por grupo de 4,36 animais, assim foi considerado o número de 5 animais por grupo, pois é o próximo número inteiro.

O delineamento experimental e todos os protocolos experimentais que foram realizados com os camundongos seguiram as normas já estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Paulista e foram executados por equipe experiente após submissão e aprovação do projeto pela, CEUA-UNIP: protocolo N° 6947240521.

## 2.7 Adjuvante

Como adjuvante foi utilizada a suspensão de *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) morta pelo calor, na concentração de 140 µg conforme protocolo desenvolvido por Ishimura e colaboradores (2018) (ISHIMURA et al., 2018). A suspensão de *P. acnes*, foi fornecida gentilmente pelo laboratório da Profa. Dra Ieda Maria Longo Maugéri (*in memoriam*) da Disciplina de Imunologia da UNIFESP, conforme descrito por Squaiella e colaboradores (2006).

## 2.8 Desafio tumoral e tratamentos

Os animais foram inoculados de forma subcutânea (s.c.) na mama esquerda caudal, com células de adenocarcinoma mamário 4T1 na concentração de  $1,5 \times 10^4$  células, ressuspendidas em 50  $\mu\text{L}$  de solução salina estéril conforme descrito previamente (JAZEDJE et al., 2015). Após 7 e 14 dias da inoculação das células tumorais, os animais foram tratados via intraperitoneal com 300  $\mu\text{L}$  de solução salina com 4T1-VEs, contendo de 4  $\mu\text{g}$  (equivalente a  $2,5 \times 10^8$  partículas) por animal (REIS et al., 2020), na presença ou ausência do adjuvante *P. acnes* (140  $\mu\text{g}$ ) (ISHIMURA et al., 2018). Passados 7 dias dos tratamentos os animais foram eutanasiados.

Os grupos experimentais foram nomeados conforme os tratamentos como:

1. Grupo Salina (controle): animais inoculados com células 4T1 e tratados intraperitonealmente com 300  $\mu\text{L}$  de solução salina estéril (salina), após 7 e 14 dias da inoculação das células tumorais (n=5).

2. Grupo *P. acnes* (adjuvante): animais inoculados com células 4T1 e tratados intraperitonealmente com 300  $\mu\text{L}$  de salina contendo 140  $\mu\text{g}$  de *P. acnes*, após 7 e 14 dias da inoculação das células tumorais (n=5).

3. Grupo 4  $\mu\text{g}$  4T1-VEs: animais inoculados com células 4T1 e tratados intraperitonealmente com 300  $\mu\text{L}$  de salina contendo 4T1-VEs na concentração de 4  $\mu\text{g}$ , após 7 e 14 dias da inoculação das células tumorais (n=5).

4. Grupo 4  $\mu\text{g}$  4T1-VEs + *P. acnes*: animais inoculados com células 4T1 e tratados intraperitonealmente com 300  $\mu\text{L}$  de salina contendo 4T1-VEs na concentração de 4  $\mu\text{g}$  e 140  $\mu\text{g}$  de *P. acnes*, após 7 e 14 dias da inoculação das células tumorais (n=5).

Observações diárias foram realizadas para detecção de óbitos ou sinais que indicarem dor (LANGFORD et al., 2010), entre elas dificuldade de locomoção, letargia ou presença de ulcerações sob as áreas de injeção dos tratamentos. Já a aferição do peso corporal foi realizada semanalmente, após inoculação das células tumorais. Coleta sanguínea foram realizadas nos dia 0 (antes do desafio tumoral), 7 e 14 (antes da inoculação dos tratamentos), o sangue foi coletado por meio submandibular (FERNANDEZ et al., 2010) .

## 2.9 Avaliação do crescimento tumoral

Após uma semana da inoculação das células tumorais o crescimento tumoral na região de injeção foi verificado em dias alternados até o dia da eutanásia dos animais, pela medição do comprimento e altura da massa tumoral com paquímetro digital Digimess® (São Paulo, Brasil).

Para o cálculo do volume tumoral foi utilizada a fórmula:

$$V (\text{mm}^3) = d^2 \cdot (D/2) \cdot FL$$

Onde d é o valor menor e D o valor maior das medidas de comprimento e largura realizadas em dias alternados (DUPRE et al., 2007).

Após eutanásia dos animais a massa tumoral foi retirada, pesada e dividida em dois fragmentos iguais, um deles para processamento de análises histopatológicas e o outro para quantificação de citocinas dos perfis Th1/Th2/Th17.

## 2.10 Ensaio de linfoproliferação

Para avaliar a capacidade de resposta dos linfócitos após cada tratamento, o índice de proliferação de esplenócitos totais foi avaliado após co-cultivo com células 4T1 integras ou seu extrato. Para isto, após eutanásia dos animais, o baço foi removido e um fragmento foi processado para coleta de esplenócitos totais. Após tratamento com tampão hemolítico, células foram lavadas e marcadas com *CellTrace™ Far Red* (Thermo Fisher), e em seguida cultivadas em placas de 96 poços com meio R10 por 48 horas na presença ou ausência de células 4T1 (4T1) ou seu extrato (e4T1). Após este período, as células coletadas do sobrenadante de cultura na presença ou ausência de e4T1 e aderentes (cultura com células 4T1) foram coletadas, lavadas e incubadas com 20 µl de anti-CD16/CD32 (Fc block) por 20 min a 4°C. Logo após lavagem, células coletadas dos sobrenadantes das culturas na presença ou ausência de e4T1 foram incubadas por 20 min a 4°C com anti-CD8 conjugado a isotiocinato de fluoresceína (FITC) e anti-CD4 conjugado ao complexo peridina-clorofil-proteína (PerCP) em uma proporção de 1:100 µl. Já as células do sobrenadante e aderentes após incubação com 4T1 foram incubadas com anti-CD8 (FITC) e 7AAD (PerCP) para identificar além da linfoproliferação, particularmente de

linfócitos citotóxicos (FarRed<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>), a morte de células 4T1 (FarRed<sup>-</sup>/7AAD<sup>+</sup>). Todos os anticorpos foram usados conforme instruções do fabricante (BD Biosciences). Após marcações, as células foram lavadas e ressuspensas em 200 µl de PBS para aquisição em citômetro BD Accuri™ C6 (BD Biosciences). Análises de expressão e frequência de proliferação foram determinadas usando o *software* FlowJo versão v10.8.1 (FlowJo™, Ashland, Oregon, USA).

### 2.11 Produção de lisado tumoral

Após eutanásia e resseção cirúrgica da massa tumoral, metade dela foi pesada individualmente, após dissociada em fragmentos com ajuda de uma tesoura e ressuspensa em volume adequado de inibidor de protease (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA), na concentração de 1%, considerando a relação de 100 µl de inibidor de protease para 100 mg de tecido. Em seguida, as amostras foram congeladas em freezer -80°C até serem processadas no homogeneizador de tecidos Precellys™ (Bertin instruments, Montigny-le-Bretonneux, France) alocado na Disciplina de Imunologia da UNIFESP, utilizando o programa de dois ciclos, nos parâmetros de 5400 rpm em dois períodos de 17 segundos cada (5400 – 2x17) e 6500 rpm em dois períodos de 20 segundos cada (6500 – 2x20). Em seguida as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante coletado e conservado em freezer – 80 °C até o momento da sua utilização para quantificação de citocinas.

### 2.12 Dosagem de anticorpos protetores IgG1 e IgG2A

Para quantificação de anticorpos associados com padrões de respostas Th1 (IgG2A) e Th2 (IgG1), sangue periférico da veia submandibular dos animais de cada grupo foram coletados antes e após 7, 14 e 21 (eutanásia) dias da inoculação das células tumorais, no volume máximo de 100 µL. Após coleta do sangue, o soro foi separado e mantido no *freezer* – 80 °C até quantificação. Para dosagem de anticorpos pelo método de ELISA, aproximadamente 4 µg/mL de extrato de células tumorais, 4T1, foi adicionado em placas de 96 poços (Costar) e incubado overnight a 4 °C. Depois, solução de PBS-BSA 1% foi adicionada para bloqueio dos sítios remanescentes por 1 hora a 37 °C. As amostras de soro foram diluídas em PBS-BSA 1% na diluição 1:50 então as placas foram incubadas por 1 hora a 37 °C. Depois, foi

adicionado o anticorpo anti-IgG1 ou anti-IgG2a (Thermo Fisher) conjugado a peroxidase diluído 1:2000 na quantidade de 50 µL/poço. Entre cada etapa, lavagens foram realizadas usando PBS acrescido de 0,05% de Tween. Em seguida, as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C e a revelação foi realizada com tetrametilbenzidina (TMB, substrato cromogênico). A reação foi interrompida após o aparecimento de cor com 100 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. Os resultados foram avaliados por leitura espectrofotométrica (Biotek, VT, USA) no comprimento de onda de 450 nm.

### 2.13 Quantificação de citocinas por citometria de fluxo

Para avaliar a produção de citocinas relacionadas aos padrões de resposta Th1/Th2/Th17 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-γ e TNF-α) em amostras de soro e dos lisados do tumor, foi utilizada a técnica *Cytometric Bead Array* (CBA) com o kit BD CBA Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences). As amostras de soro, foram coletadas antes, e após 7 e 21 (eutanásia) dias da inoculação das células tumorais, para as amostras de soro, no tempo 0 e 7 dias após o desafio tumoral foi realizado pool por grupo em duplicata. E então, 20 µL de cada amostra (tanto da curva padrão, quanto das amostras analisadas) foram incubados com 20 µL de uma mistura de *beads* de captura e do anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo phycoerythrin (PE). As amostras foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente e protegidas da luz. Após lavagem, a aquisição dos dados foi realizada utilizando o citômetro BD Accuri™ C6. A análise dos dados foi realizada utilizando o *software* de análises para CBA FCAP Array versão 3.0.1 (BD Biosciences). As concentrações de cada amostra foram calculadas com base na curva padrão, realizadas conforme indicações do fabricante do kit. Amostras com concentrações abaixo do limite de detecção determinado pelo kit para cada citocina, foram consideradas com o valor = 0 pg/mL.

### 2.14 Análises histopatológicas (histometria)

Para avaliar características morfológicas e possíveis lesões nos órgãos em cada tratamento, após a necropsia dos animais, foram retirados tumor, linfonodos, pulmões e baço, em seguida foram fixados em paraformaldeído 10%. Baço e tumor foram pesados, e todos os fragmentos dos órgãos foram submetidos ao processamento histológico de rotina: emblocagem em parafina e microtomia,

dispondo-se cortes teciduais de 5  $\mu\text{m}$  de espessura sobre lâminas histológicas para coloração com hematoxilina-eosina. As análises foram realizadas e fotografadas para realização da morfometria em fotomicroscópio OPTICAM O400S, acoplado à câmera OPTUHD 14,3 MP (OPTICAM Microscopy Technology, São Paulo, Brasil).

A caracterização do índice mitótico foi realizada no fragmento tumoral, analisada pela leitura de 10 campos no aumento de 40X. Já a quantidade da área de necrose foi analisada por morfometria considerando a ocorrência por sobreposição em pontos, a partir de uma gráticula com 25 pontos (DENADAI et al., 2015).

### *2.15 Análises estatísticas*

Para os dados paramétricos as comparações estatísticas foram feitas utilizando análise de variância ANOVA de uma ou duas vias com pós-teste de Tukey ou Bonferroni. Quando necessário *outliers* foram excluídos das análises, todos os valores foram relatados como média  $\pm$  erro padrão da média, com significância de 95%, considerando  $p < 0,05$ . Análises e gráficos foram realizados utilizando o *Software* GraphPad Prism 8.0 (GraphPad *Software*, San Diego, California, USA)

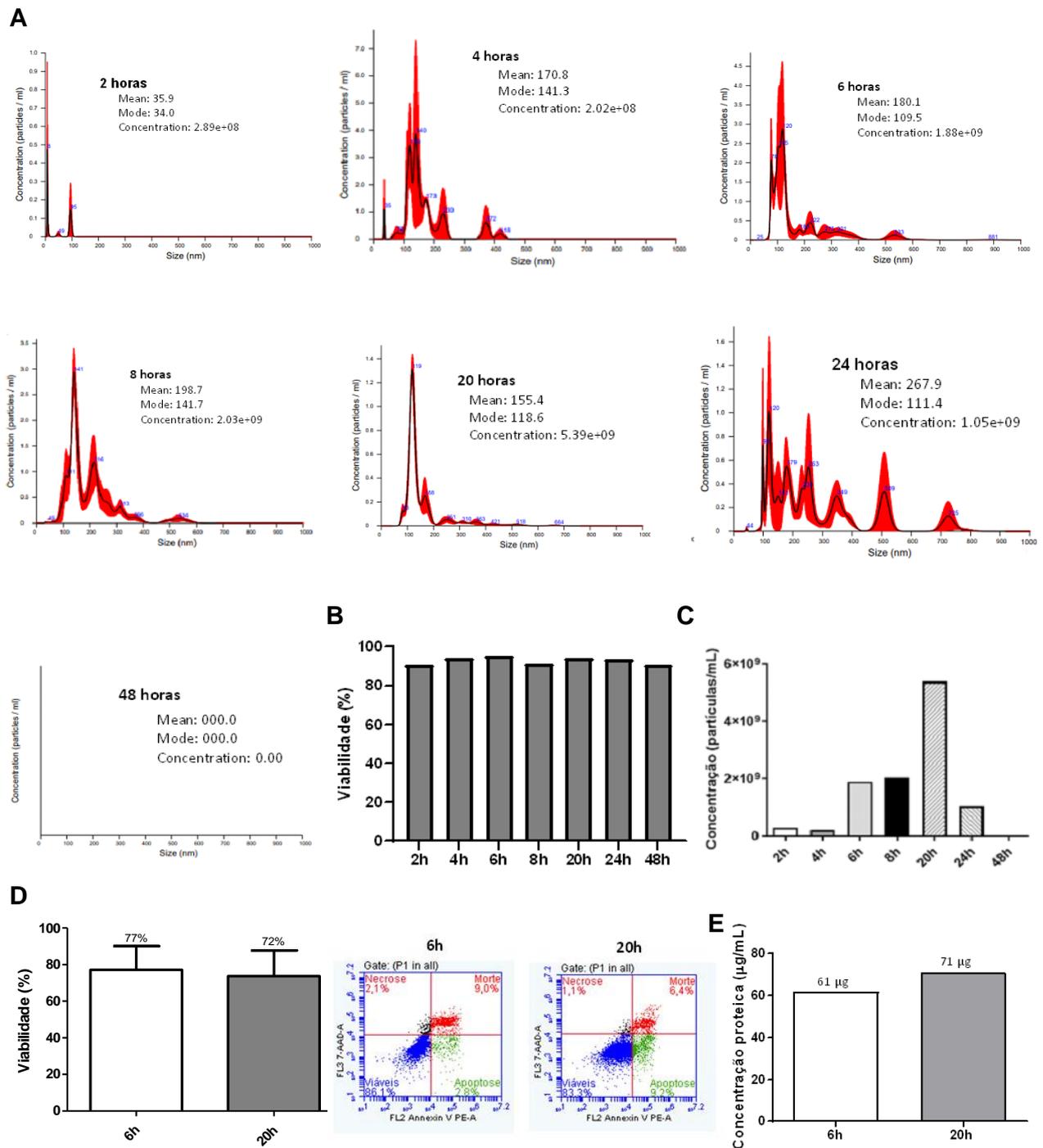
### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Padronização dos tempos de cultura de células 4T1 para coleta de VEs

Para selecionar o tempo de cultura ideal para obtenção de maior concentração de VEs, células 4T1 foram cultivadas com meio sem soro por 2, 4, 6, 8, 20, 24 e 48 horas, para coleta dos sobrenadantes e posteriormente avaliação de VEs em cada um desses tempos. Dados obtidos nas análises de rastreamento de nanopartículas por Nanosight (NTA: *Nanoparticle Tracking Analysis*), mostraram a presença de partículas com tamanhos entre 100 nm e 800 nm nos tempos de 2, 4, 6, 8, 20 e 24 h (Figura 1A). Em relação à concentração, dados do NTA mostraram concentrações que variam entre  $2,02 \times 10^8$  e  $5,39 \times 10^9$  partículas nos mesmos tempos supracitados, sendo evidenciados a maior quantidade de VEs nos tempos de 6h, 8h e 20h. Já no tempo de 48 horas não foi possível detectar quantidades de nanopartículas (Figura 1A).

Em paralelo com as análises de VEs nos respectivos tempos, a viabilidade celular foi também verificada pelo método de exclusão por azul de tripan. Conforme mostrado na Figura 1B, a viabilidade celular se manteve  $\geq 90\%$  em cada um dos tempos avaliados.

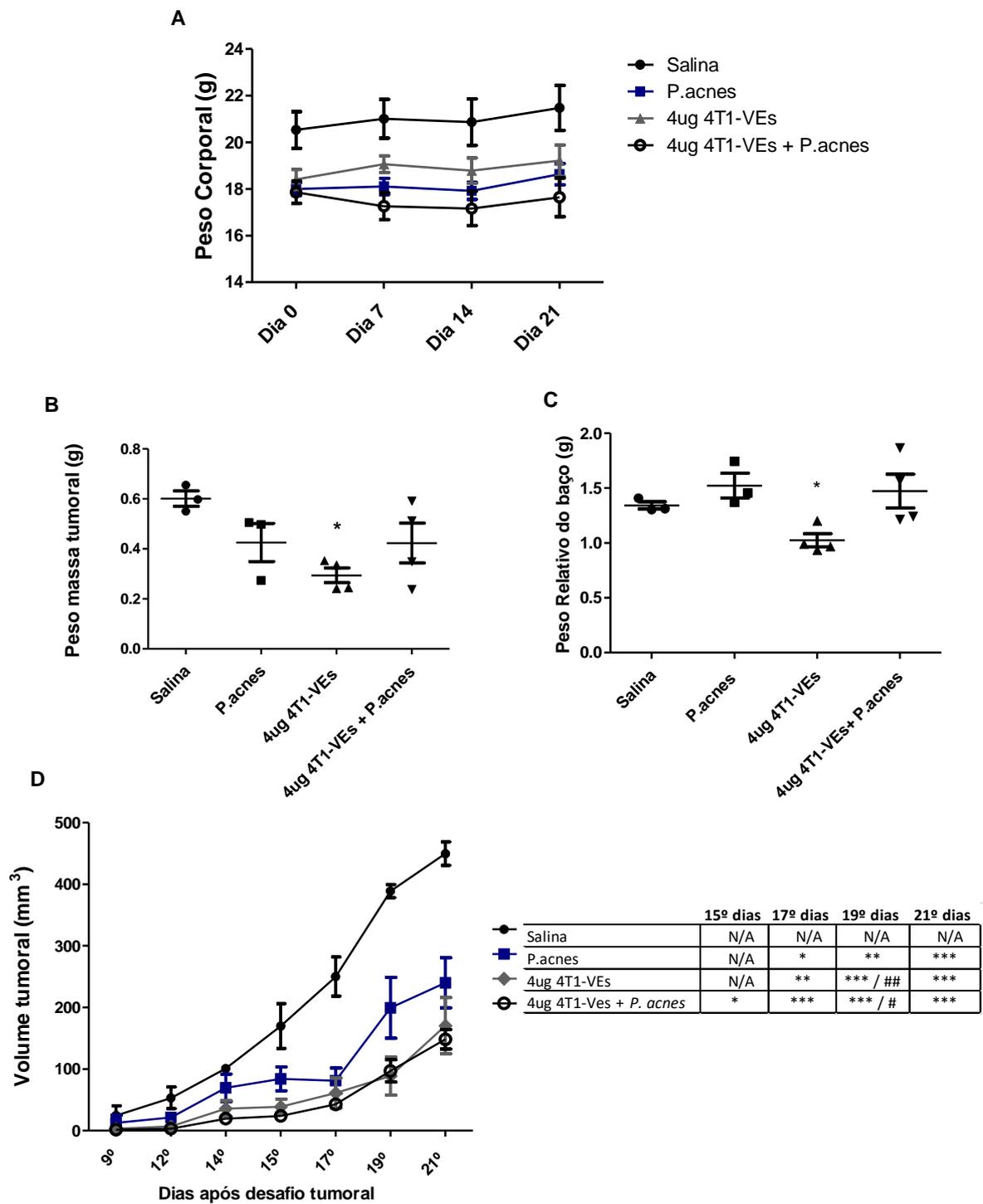
Foi realizada etapa de padronização do tempo ideal para coleta de sobrenadante com maior concentração de VEs, os tempos de cultura de 6 e 20 horas apresentaram maior presença de partículas com tamanhos semelhantes a VEs pequenas, e maior concentração de partículas/mL ( $4,96 \times 10^9$  e  $4,49 \times 10^9$ , respectivamente) (Figura 1A). Análises de citometria de fluxo, mostraram viabilidade de 77% para a coleta de 6 horas e 72% para coleta de 20 horas, dada pela ausência de 7AAD (PE) e Anexina (Fitc) (Figura 1D). Em paralelo, as concentrações de proteínas em cada amostra, mostraram quantidades respectivas de 61  $\mu\text{g/mL}$  e 71  $\mu\text{g/mL}$  nos tempos de 6h e 20h (Figura 1E). Dessa forma, perante os dados apresentados, foi determinado o tempo de 20 horas como o ideal para coleta.



**Fig. 1.** Caracterização de partículas isoladas em sobrenadantes de cultura de células 4T1 em diferentes tempos de incubação (A) Indicação de Tamanho e Intensidade das VEs por análise de rastreamento de nanopartículas por Nanosight (NTA). (B) Viabilidade celular pelo método exclusão com azul de tripan das células 4T1. (C) Concentração de partículas isoladas após cultura de células 4T1 em meio sem soro. (D) Células marcadas para análises da viabilidade com os marcadores PE Annexin V (PE) e 7-Amino Actinomycin (7AAD). *Gates* representam porcentagens de células viáveis (Anexina- 7AAD-), em apoptose (Anexina+ 7AAD-), em necrose (Anexina- 7AAD+) ou em apoptose tardia/necrose (Anexina+ 7AAD+). (E) Quantificação proteica das vesículas extracelulares liberadas por células 4T1, nos tempos de 6 horas e 20 horas.

### 3.2 Avaliação dos efeitos do tratamento com VEs liberadas por células 4T1 no peso e crescimento tumoral em camundongos com tumor de mama

Conforme descrito no item 2.8, quatro (4) grupos de tratamentos foram avaliados. Em relação ao peso dos animais avaliado antes (dia 0) e após 7 dias da inoculação do tumor (dia 7) onde foi ministrada a primeira dose do tratamento, até o dia da eutanásia (dia 21) não foram observadas diferenças significantes entre eles ao longo desses 21 dias de análises (Figura 2A). Em relação ao peso tumoral (Figura 2B) é possível verificar que em geral os animais que receberam tratamento apresentaram menor peso tumoral em relação aos animais do grupo salina. Os animais que receberam 4 µg 4T1-VEs apresentaram o menor peso tumoral em comparação ao grupo salina. Assim como foi observado na Figura 2D, o grupo que teve tratamento com 4 µg 4T1-VEs com ou sem *P. acnes* apresentou o volume tumoral menor em relação aos demais grupos. Considerando o peso do baço, o grupo que recebeu o tratamento com 4 µg 4T1-VEs apresentou tamanho menor do baço quando comparados ao salina (Figura 2C). Análises do volume tumoral apresentados na Figura 2D indicam que nos dias 17<sup>o</sup>, 19<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup>, respectivamente, os grupos tratados apresentaram menores volumes tumorais, *P. acnes* (81 mm<sup>3</sup>, 199 mm<sup>3</sup> e 239 mm<sup>3</sup>), 4T1-VEs (61 mm<sup>3</sup>, 88 mm<sup>3</sup>, 170 mm<sup>3</sup>) e 4T1-VEs + *P.acnes* (43 mm<sup>3</sup>, 96 mm<sup>3</sup> e 148 mm<sup>3</sup>) quando comparados ao grupo salina (250 mm<sup>3</sup>, 389 mm<sup>3</sup> e 450 mm<sup>3</sup>). Após 17 dias do desafio tumoral a diferença é mais notória no grupo tratado com 4 µg de VEs + *P.acnes*. Vale ressaltar que um camundongo do grupo salina foi eutanasiado dezesseis dias após o desafio tumoral por apresentar sinais de sofrimento, como olhos apertados, mudança de posição das orelhas e bigodes, que ficam apontados para baixo, além da presença de caquexia, assim também um camundongo do grupo VEs 4ug + *P. acnes* morreu dezoito dias após desafio tumoral.



**Fig. 2.** Medição do peso corporal, peso tumoral, baço dos camundongos e volume tumoral. (A) Peso corporal dos camundongos realizado semanalmente. (B) Pesagem do tumor nos camundongos inoculados com tumor mamário e após receber tratamento. (C) Peso do baço dos camundongos inoculados com tumor mamário e após receber tratamento. (D) Volume tumoral verificados em dias alternados após desenvolvimento do tumor, onde (\* =  $p < 0,05$  vs salina), (\*\* =  $p < 0,01$  vs salina), (\*\*\*) =  $p < 0,001$  vs salina), (# =  $p < 0,05$  vs *P.acnes*) e (## =  $p < 0,01$  vs *P.acnes*). Salina (n=3), *P. acnes* (n=3), 4 ug 4T1-VEs (n=4) e 4 ug 4T1-VEs + *P. acnes* (n=4).

### 3.3 Avaliação da linfoproliferação após contato com células 4T1 ou seu extrato celular

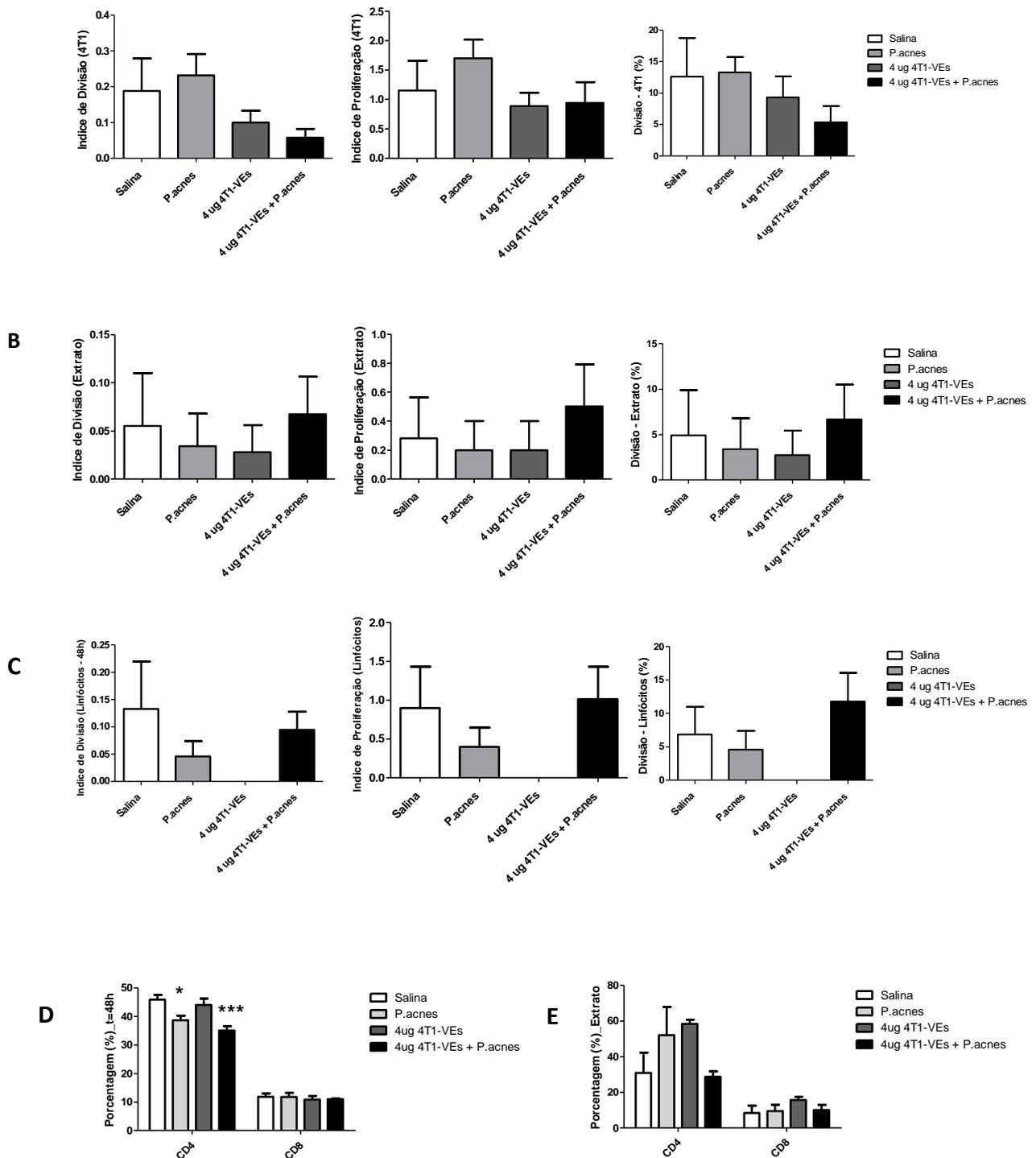
Para análises da linfoproliferação de esplenócitos totais após co-cultivo com células 4T1 integras ou seu extrato (e4T1), foi utilizado os dados de índice de divisão, índice de proliferação e porcentagem de divisão.

Análise do índice de divisão dos linfócitos na presença das células 4T1, os esplenócitos coletados dos animais tratados com *P.acnes* apresentaram maior índice de divisão entre os grupos, porém nesta avaliação o grupo que recebeu o tratamento 4 ug 4T1-VEs + *P. acnes* demonstrou o menor valor de índice de divisão, semelhantemente no índice de proliferação o perfil é mantido, já na porcentagem de divisão não é observado alteração entre os grupos salina e *P.acnes* apresentando maior porcentagem, seguida do grupo 4 ug 4T1-VEs e posteriormente 4 ug 4T1-VEs + *P. acnes* (Figura 3A).. Quando avaliado a linfoproliferação das células esplênicas em contato com o extrato das células 4T1 foi observado o mesmo perfil nas avaliações de divisão, proliferação e porcentagem, dessa forma o grupo 4 ug 4T1-VEs + *P. acnes* apresentou a maior proporção em comparação aos grupos, assim como é observado este aumento na salina, em relação a *P. acnes* e o grupo que recebeu tratamento 4 ug 4T1-VEs (Figura 3B).

Análises dos linfócitos na ausência do antígeno (células 4T1 ou seu extrato), os esplenócitos coletados dos animais que receberam salina apresentaram maior índice de divisão, porém na avaliação de índice de proliferação e porcentagem de divisão o perfil foi semelhante, o grupo tratado com 4 ug 4T1-VEs + *P. acnes* apresentou maior valor em comparação a salina, e essencialmente a *P. acnes*, porém o grupo 4 ug 4T1-VEs não apresenta divisão ou proliferação celular, nas avaliações de índice de divisão, proliferação e porcentagem de divisão (Figura 3C).

Com o intuito de analisar a resposta das células T, o percentual de linfócitos T CD4 e CD8 iniciais nos camundongos de cada grupo de tratamento foi determinada. Animais dos grupos tratados com *P.acnes* apresentam CD4+ significativamente diminuída (*P.acnes*: 38,7% e, 4 ug 4T1-VEs + *P.acnes*: 35,1%) em relação aos grupos que não receberam *P.acnes* (salina: 46% e 4 ug 4T1-VEs: 44,1%) (Figura 3D). Já na resposta CD8 não foram observadas alterações significativas entre os grupos (salina: 12%; *P.acnes*: 11,8%; 4 ug 4T1-VEs: 10,9% e 4 ug 4T1-VEs + *P.acnes*: 11%) (Figura 3D). Análises de linfócitos CD4+ após incubação com e4T1, a porcentagem maior foi vista no grupo 4 ug 4T1-VEs (58,3%), em comparação aos demais grupos (salina:

30,9%; *P.acnes*: 52,1% e 4 ug 4T1-VEs + *P.acnes*: 28,8%) (Figura 3E). Em relação ao percentual dos linfócitos CD8+ as diferenças observadas entre os grupos foram salina: 8,48%; *P.acnes*: 9,48%; 4 ug 4T1-VEs: 15,8% e 4 ug 4T1-VEs + *P.acnes*: 10,2% (Figura 3E).

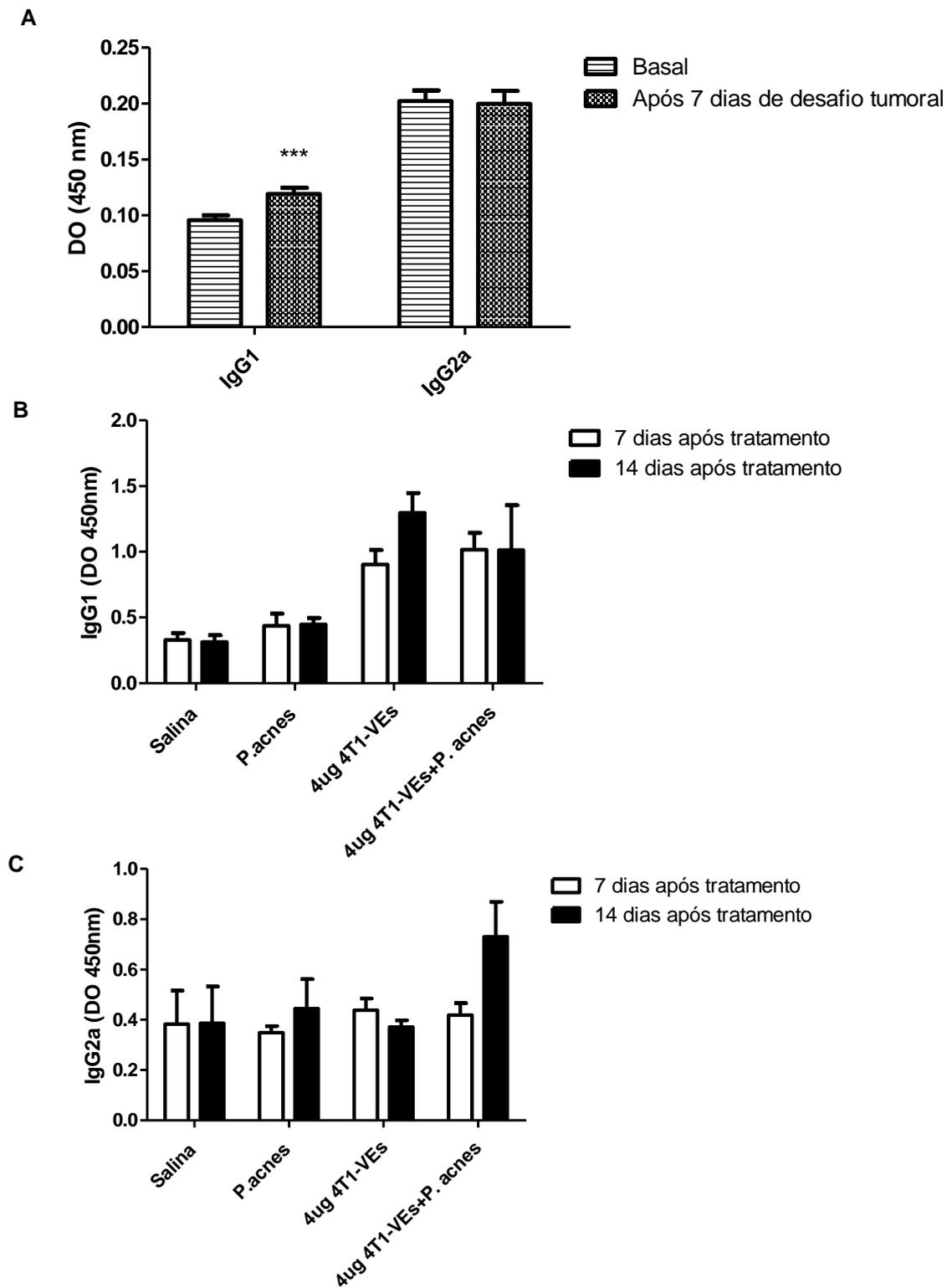


**Fig. 3.** Avaliação da resposta linfoproliferativa. (A) Índice de divisão, proliferação e porcentagem de divisão dos linfócitos após 48 horas em co-cultivo com células 4T1 (B) Índice de divisão, proliferação e porcentagem de divisão dos linfócitos após com e4T1 (C) Índice de divisão, proliferação e porcentagem de divisão dos linfócitos após 48 horas em cultura (D) Porcentagem dos linfócitos CD4+ e CD8+ após 48 horas em cultura. (E) Porcentagem dos linfócitos CD4+ e CD8+ após interação com extrato da célula 4T1.

### 3.4 Perfil das respostas de anticorpos IgG1 e IgG2a em camundongos antes e após desafio tumoral

Os camundongos após o desafio tumoral desenvolveram responsividade de IgG1, com resposta Th2 dominante (0,096 no período basal e 0,119 após desafio tumoral). Já o perfil IgG2a se manteve constante antes e após o desafio tumoral (0,202 no período basal e 0,190 após desafio tumoral), evidenciando uma ausência de resposta Th1 após inoculação das células de adenocarcinoma mamário, o que corrobora com o perfil das citocinas (Figura 4A).

Após duas doses de tratamento com as VEs, apesar de apresentar um dado apenas numérico, sem significância estatística foi observado no grupo 4ug 4T1-VEs aumento dos anticorpos IgG1 (0,90), evidenciando um padrão de resposta Th2, em comparação aos demais grupos, e após 14 dias de tratamento o aumento foi mais acentuado (1,29) (Figura 4B). Já os demais grupos não mostraram alteração após as doses, quando observamos a resposta IgG1, mantendo o mesmo padrão após 7 e 14 dias do tratamento, como observado respectivamente nos outros grupos (salina: 0,33 e 0,32; *P.acnes*: 0,44 e 0,45 e 4ug 4T1-VEs + *P.acnes*: 1,02 e 1,01) (Figura 4B). Esses valores são ainda maiores quando comparados com as análises do IgG2a (Figura 4C). Quando observado o IgG2a, o grupo que recebeu 4ug 4T1-VEs + *P. acnes* apresenta responsividade evidenciada após 14 dias de tratamento (0,73) em relação a primeira dose de tratamento (0,42), que implica no padrão de resposta Th1, o que era esperado por expressar uma resposta imunológica celular, mediada diretamente pelos linfócitos T (Figura 4C). Os demais grupos, não apresentaram alterações significativas após 7 e 14 dias do tratamento respectivamente (salina: 0,38 e 0,39; *P.acnes*: 0,35 e 0,44 e 4ug 4T1-VEs: 0,44 e 0,37) (Figura 4C).



**Fig. 4.** Quantificação de anticorpos IgG1 e IgG2a. (A) Coleta do soro foram analisadas antes (basal) e após 7 dias do desafio tumoral para IgG1 e IgG2a. (B) Níveis de IgG1 em soro analisados após 7 e 14 dias após tratamento. (C) Níveis de IgG2a em soro analisado após 7 e 14 dias após tratamento. Onde (\*\*\*) =  $p < 0,001$  e (N=5).

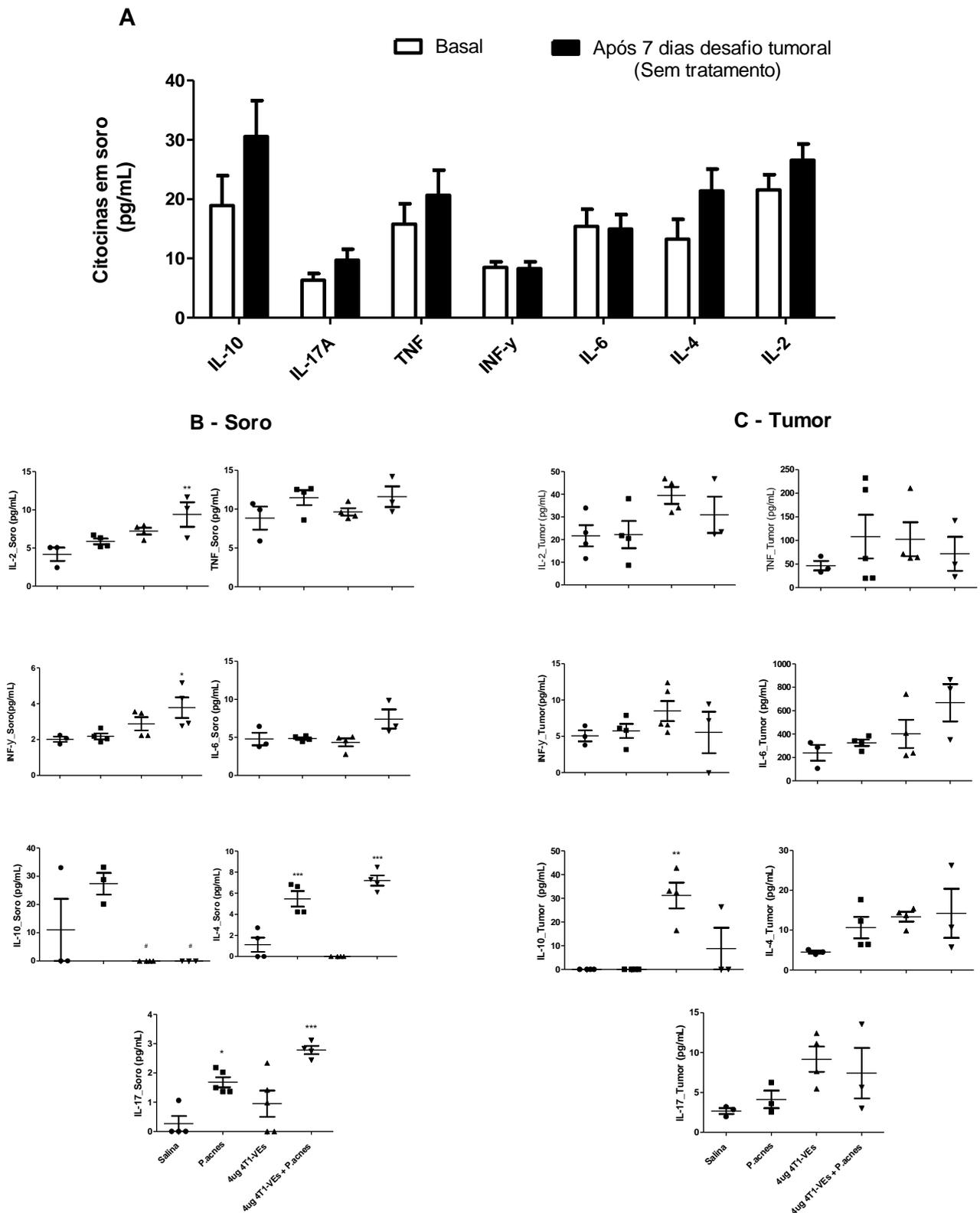
### 3.5 Avaliação da produção de citocinas no soro antes do tratamento, e no soro e tumor após tratamento

Com o intuito de verificar o padrão de resposta imunológica antes e após o desafio tumoral e, após tratamento com 4T1-VEs na ausência ou presença de *P. acnes*, citocinas características dos padrões Th1, Th2 e Th17 em soro e tumor foram avaliadas por citometria de fluxo. Conforme mostrado na Figura 5A, os níveis dessas citocinas no soro dos animais de cada grupo foi avaliado, e apesar de não apresentar diferenças estatísticas, foi observado aumento numérico na produção das citocinas após o desafio tumoral (Figura 5A). A produção das citocinas IL-10 e IL-4, (anti-inflamatórias, padrão Th2), foram detectadas em maior quantidade no soro após 7 dias dos camundongos serem desafiado com as células 4T1, 31 pg/mL e 17 pg/mL, respectivamente em relação aos valores basal de 27 pg/mL e 13 pg/mL (Figura 5A). IL-2 e TNF apresentaram um aumento discreto na produção após o desafio tumoral, em contraste, a IL-6 e IFN- $\gamma$  não apresentaram alterações significativas no padrão de expressão antes ou após o desafio tumoral (Figura 5A).

Após 21 dias do desafio tumoral (eutanásia), o grupo que recebeu o tratamento com 4 ug 4T1-VEs + *P. acnes* apresenta aumento em todas as citocinas pró-inflamatória presente no soro, IL-2, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-6 (Figura 5B) em comparação ao grupo controle (grupo salina). Já para as citocinas envolvidas na resposta Th2, os grupos que receberam tratamento com 4T1-VEs com ou sem *P.acnes*, apresentaram uma ausência total na produção de citocina IL-10 (Figura 5B). No entanto, os grupos que receberam *P.acnes* apresentaram um aumento significativo na produção da citocina IL-4 quando comparamos com o grupo salina, e também é observado este aumento em relação ao grupo que recebeu tratamento apenas com as 4T1-VEs (Figura 5B).

Independente do tratamento, a produção de citocinas foi maior no tumor quando comparado ao soro. Neste caso, apenas a produção da citocina anti-inflamatória, IL-10, foi detectada em maior quantidade no soro nos grupos não tratados quando comparado com os grupos que receberam tratamento (Figura 5B), porém no tumor a produção de IL-10 foi maior no grupo tratado com 4ug 4T1-VEs e tratado com 4ug 4T1-VEs + *P. acnes* (Figura 5C). Apesar da *P. acnes* induzir uma resposta Th1, sabemos que os camundongos Balb/c apresentam uma predisposição a resposta Th2, o que pode estar relacionando esta resposta.

No tumor, a produção de citocinas do padrão Th1, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-6 (Figura 5C), apresentam uma resposta com menor produção no grupo salina em comparação dos demais grupos. O IL-6 foi detectado em maior quantidade (Figura 5C). Já no padrão Th2, a produção de IL-10 no tumor foi observado nos grupos que receberam tratamento com 4T1-VEs com ou sem *P.acnes* (Figura 5C). Considerando os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-6) elas estão em maior quantidade nos tumores, sugerindo possível predomínio de respostas do tipo Th1(Figura 5C).



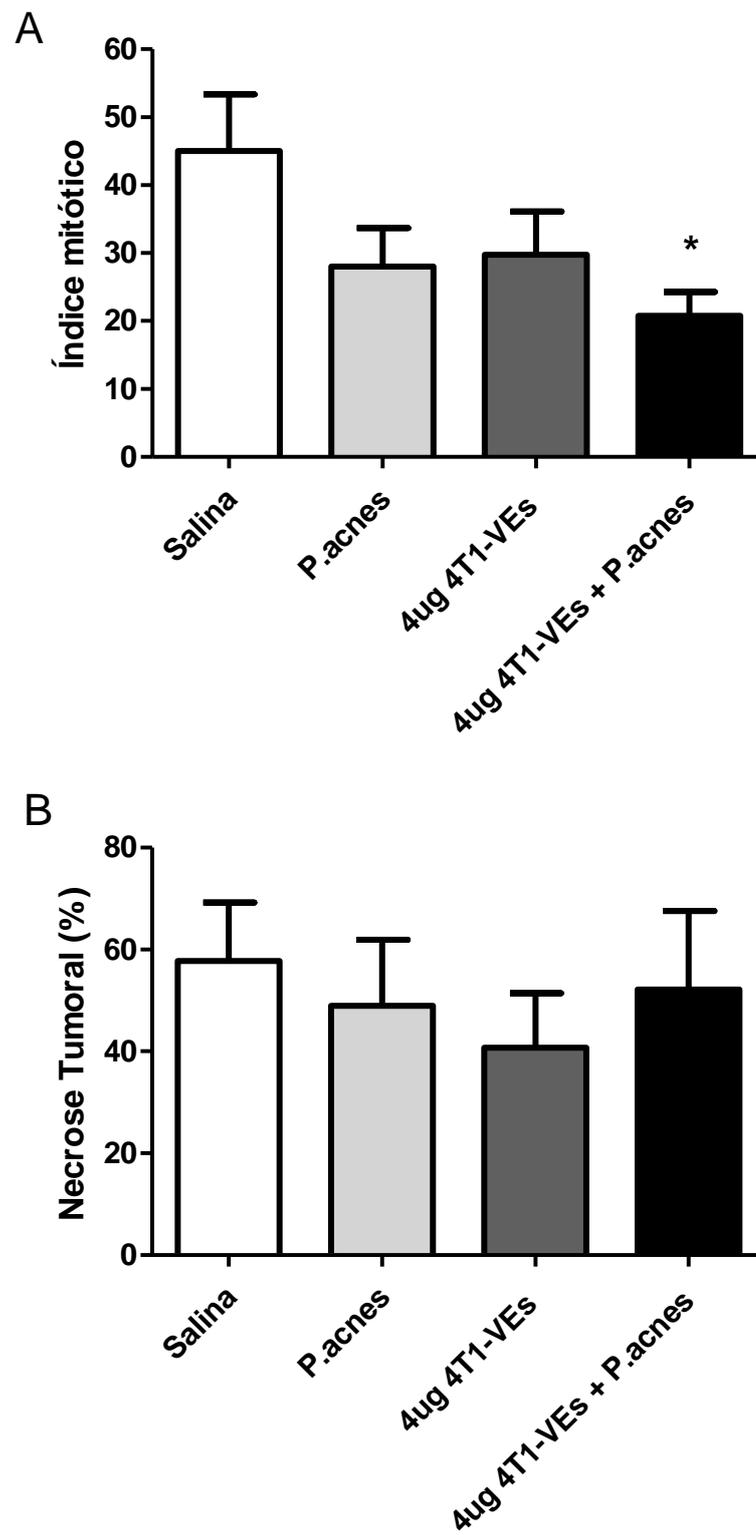
**Fig. 5.** Quantificação de citocinas relacionadas aos padrões Th1, Th2 e Th17. (A) Animais Balb/c antes e após 7 dias do desafio tumoral. (B) Amostras de soro após 21 dias do desafio tumoral (C) Amostras em tumor após 21 dias do desafio tumoral, onde (\* =  $p < 0,05$  vs salina), (\*\*\*) =  $p < 0,001$  vs salina) e (# =  $p < 0,05$  vs *P.acnes*).

### 3.6 Avaliação histopatológica da progressão de lesões e características morfológicas

O índice mitótico é um método eficaz para análise da proliferação celular, assim foi observado que os animais do grupo salina apresentaram maior número das divisões celulares, 45 mitoses em 10 campos, em comparação com os demais grupos (Figura 6A). Observando os grupos *P.acnes* e 4 ug 4T1-VEs não foi verificada diferença expressiva na contagem de mitose (28 e 30 respectivamente) (Figura 6A). Sendo assim, o grupo que apresentou significativamente o menor índice mitótico foi o que recebeu o tratamento com as 4 ug 4T1-VEs + *P. acnes* (21 mitoses) (Figura 6A).

A avaliação da ocorrência de necrose tumoral, foi realizada por método histológico, o qual mostrou que animais do grupo tratado com 4 ug 4T1-VEs apresentou menor área de tecido necrótico (40,7%), e nos grupos salina e *P. acnes* as respostas foram 57,8% e 49% respectivamente, já o grupo que recebeu tratamento com 4 ug 4T1-VEs + *P.acnes* a resposta necrótica foi de 52,2%, importante evidenciar que neste grupo temos a ausência de um dado, pois não foi possível avaliar a amostra de um camundongo, devido a material insuficiente.

Em relação a avaliação dos pulmões tivemos em todos os grupos, pneumonia intersticial e focos hemorrágicos. Também foram realizadas as análises de linfonodos e baço, porém não foram observadas diferenças significativas nesses órgãos nos diferentes grupos.



**Fig.6.** Avaliação histopatológica em tumor de mama em camundongos. (A) Atividade mitótica, por contagem das mitoses em 10 campos de grande aumento (40x) em lamínas com amostras de tumor mamário coradas com hematoxilina-eosina. (B) Morfometria dos tumores, por meio da quantificação por sobreposição em pontos, a partir de uma graticula com 25 pontos, considerando o ocorrência de necrose. Onde (\* =  $p < 0,05$  vs salina).

#### 4. DISCUSSÃO

Recentemente, as VEs receberam muita atenção, pois são ricas em componentes biológicos, como ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, que desempenham papéis essenciais na regeneração tecidual e na modificação de doenças (YONG NG et al., 2022). Além de fornecer informações sobre a célula originária, e possuir capacidade de mediar comunicação intercelular (Porcelli et al., 2021).

Muitos tipos de células podem secretar vesículas extracelulares, incluindo células tumorais (SUN et al., 2018), sabemos que para obter VEs precisamos cultivar as células de interesse. A fim de manter as células cultivadas em uma condição saudável para que continuem a liberar VEs, o soro fetal bovino (SFB) é adicionado como um suplemento no meio de cultura celular. No entanto, o soro bovino contém grandes quantidades de vesículas extracelulares de origem bovina que dificultam o estudo das VEs produzidas pelas células não bovinas cultivadas (PHAM et al., 2021; BOST et al., 2022). Dessa forma, foi padronizada a produção das VEs em meio sem SFB, para garantimos a presença de VEs apenas das nossas células de interesse, ou seja 4T1-VEs.

Vesículas extracelulares de células cancerosas têm potencial para serem usados como vacinas contra o câncer (YONG NG et al., 2022), pois possuem um grande número de antígenos tumorais, que podem desencadear as respostas imunes do hospedeiro para inibir o crescimento do tumor, ou também podem ser empregados como biomarcadores no diagnóstico de câncer, uma vez que contêm carga que reflete o estado genético e mutacional do tumor (YONG NG et al., 2022, PORCELLI et al., 2021). As VEs podem atuar no sistema imunológico, destacando uma nova estratégia potencial para a pesquisa de vacinas contra o câncer, dessa forma as vacinas terapêuticas representam uma opção viável para a imunoterapia ativa de câncer que visa tratar a doença usando o próprio sistema imunológico (YONG NG et al., 2022, PORCELLI et al., 2021).

Neste estudo, foram avaliados os efeitos das VEs no desenvolvimento do tumor de células de adenocarcinoma mamário (4T1) para uma possível descoberta de novos alvos terapêuticos. O adenocarcinoma mamário murino 4T1 é um modelo experimental muito utilizado na avaliação e apresenta melhor compreensão da biologia dos tumores. Trata-se de uma linhagem celular altamente tumorigênica e

invasiva, onde são observadas metástases em diversos órgãos. A progressão da doença desse modelo é clinicamente semelhante ao câncer de mama avançado em humanos e, como resultado disso, o modelo de metástase de câncer de mama 4T1 é amplamente utilizado em estudos pré-clínicos (YANG et al., 2020). Em paralelo, quando pensamos em um modelo de câncer de mama que acomete humanos, sabemos que um dos tipos mais agressivos é o triplo negativo, pois tem crescimento rápido, maior probabilidade de disseminar e maior chance de recidiva após tratamento (ACS, 2023). Devido a esta comparação, e por ser câncer que têm capacidade metastática espontânea escolhemos o modelo 4T1 para o estudo.

Como modelo experimental foi utilizado camundongos Balb/c, já que os mesmos têm sido amplamente empregados para investigação em câncer de mama (LOFGREN et al., 2018, SALIMI et al., 2020). Assim, os camundongos foram desafiados com células de adenocarcinoma mamário, e posteriormente tratados com VEs, observamos que o peso corporal não apresentou variação significativas entre os grupos ao decorrer dos dias, e a alteração vista provavelmente está ligada com o desenvolvimento do tumor. Os camundongos do grupo salina apresentaram em geral o peso maior entre os grupos, mas vale ressaltar que os animais já vieram do centro CEDEME com essa diferença de peso. O baço faz parte do sistema linfático e tem como função retirar da circulação células envelhecidas ou danificadas e auxiliar na resposta imunológica, aumentando a produção de anticorpos e de glóbulos brancos que atuam diretamente na defesa do organismo (CAMPBELL et al., 2018), observamos que o grupo 4 ug 4T1-VEs apresentou o menor peso de baço em relação aos demais grupos, o que pode estar relacionado com a resposta imunológica dos animais, vale ressaltar que apesar deste dado o baço mantém sua função preservada. Nossos resultados mostraram que o peso da massa tumoral e volume tumoral nos camundongos tratados com 4 ug 4T1-VEs diminuiu significativamente quando comparado com o controle. O volume tumoral é um dos parâmetros mais importantes para demonstrar a eficácia do tratamento, portanto, muitos estudos relatam o volume final do tumor (SALIMI et al., 2020).

Com taxa de incidência de câncer de mama aumentando anualmente, o mesmo cenário é observado na pesquisa de novos tratamentos, sendo explorado os tratamentos mais personalizados, com a esperança de minimizar os efeitos colaterais e melhorar as taxas de sobrevida (ANASTASIADI et al., 2017). As vacinas terapêuticas visam gerar imunidade mediada por células, representam uma opção

viável para a imunoterapia ativa contra o câncer que objetiva tratar a doença usando o próprio sistema imunológico do paciente (CHUNGING et al., 2013; HANCOCK et al., 2018). Porém para potencializar a resposta imunológica, o uso de adjuvantes é uma das estratégias na produção dessas vacinas, para acelerar, prolongar ou aumentar as respostas imunológicas específicas do antígeno (Yan et al., 2019). No presente estudo foi usado o *P. acnes* como adjuvante, pois exerce efeitos imunomoduladores aumentando as atividades fagocítica e tumoricida de células efectoras, além de desencadear um padrão particular de produção de citocinas que leva o seu uso como indutor da resposta Th1, caracterizada por desencadear resposta celular potente (Gambero et al., 2016; ISHIMURA et al., 2018).

Dessa forma, frente ao estímulo das citocinas pró-inflamatórias (IL-2, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-6) os resultados aqui apresentados, mostram aumento no soro, principalmente no grupo que recebeu tratamento 4 ug de 4T1-VEs + *P. acnes*. Já para as citocinas envolvidas na resposta Th2 (anti-inflamatório) todos os animais que receberam tratamento com VEs não apresentaram produção de citocina IL-10 no soro. As células T auxiliares em repouso (Th0) podem se diferenciar em Th1 ou Th2 conforme as citocinas produzidas, Th1 são responsáveis pela síntese de IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-6, todas aumentam à resposta inflamatória, o qual corrobora com nossos resultados, enquanto que Th2 tem como característica a produção de IL-10 e IL-4 (VARELLA e FORTE, 2001).

A função das células Th1 e Th2 depende da secreção de diferentes citocinas (ZHANG et al., 2017). Para investigar as citocinas associadas aos perfis de respostas Th1 e Th2, análises no tumor e no soro foram realizadas, os dados obtidos mostraram uma quantidade maior de citocinas no tumor quando comparada aos níveis séricos, principalmente da interleucina IL-6, que influencia respostas imune antígeno específicas e reações inflamatórias, sendo um dos maiores mediadores da fase aguda da inflamação (VARELLA e FORTE, 2001, ZHANG et al., 2017). O aumento significativo da expressão de citocinas Th1 (incluindo IL-2 e IFN- $\gamma$ ) e diminuição dos níveis de citocinas Th2, principalmente IL-10 nos níveis séricos, é compreensível devido ao fato de Th1 e Th2 serem mutuamente inibitórios.

Os camundongos após o desafio tumoral apresentaram resposta Th2, e assim predominou os anticorpos IgG1. Já quando avaliamos o IgG2a antes e após desafio tumoral o perfil permaneceu. Embora os cânceres muitas vezes tenham impacto na imunidade do hospedeiro, o inverso também é verdadeiro, uma vez que as condições

inflamatórias geralmente precedem o desenvolvimento de malignidades (GUO et al., 2020), portanto observando a resposta Th2 que tem responsividade anti-inflamatória, os anticorpos IgG1 apresentam um padrão de resposta Th2 que aumentaram após tratamento, e de forma acentuada após a segunda dose, mesmo nos grupos com *P.acnes*. Avanços recentes em adjuvantes aceleraram o desenvolvimento de vacinas contra o câncer e este tende a induzir respostas imunes mais fortes do que a entrega de antígenos solúveis (ZHANG, 2018). Sabemos que o adjuvante utilizado, *P. acnes*, desencadeia uma resposta Th1, e assim observamos que o grupo que recebeu 4ug 4T1-VEs + *P. acnes*, apresentou responsividade evidenciada de IgG2a após 14 dias de tratamento, que implica no padrão de resposta Th1, que era de nosso interesse, por apresentar uma resposta mais específica contra o tumor.

Com a finalidade de compreender se os linfócitos T geraram memória, avaliamos a atividade linfoproliferativa das células T em frente aos tratamentos, e assim, foi observado que os grupos os quais receberam *P.acnes* (*P.acnes* e 4 ug 4T1-VEs + *P. acnes*) apresentaram maior atividade linfoproliferativa após 48 horas de incubação. Porém, quando estimulados com o e4T1, verificamos nos grupos que receberam as VEs aumento da linfoproliferação, e de maneira mais acentuada com grupo 4 ug 4T1-VEs, isso nos demonstra que neste grupo a resposta linfoproliferativa contra o antígeno foi maior, e curiosamente foi observado que neste mesmo grupo ocorreu a inibição do crescimento do tumor. O mesmo cenário ocorre na análise de citotoxicidade, quando comparamos os grupos, porém em todos os grupos não foi observado atividade linfoproliferativa após 48h de incubação com as 4T1, talvez para melhor avaliação seria melhor estudar os valores após 24 horas de incubação também, assim poderíamos verificar o declínio dessa resposta em frente as células 4T1.

Entre as células T efetoras, temos os linfócitos T auxiliares (helper) e os linfócitos T citotóxicos, que carregam em suas superfícies moléculas de CD4 e CD8, respectivamente. As células Th CD4+ são orquestrantes da resposta imune, reconhecendo antígenos externos, e ativando outros caminhos da resposta imune mediada por células com o intuito de erradicar o patógeno. As células T CD8 lisam as células-alvo que apresentam fragmentos antigênicos, ligados à moléculas MHC de classe I (DELVES et al., 2000; SHARP, 2014). De uma forma já esperada, os linfócitos CD4 apresentaram maior proporção em comparação aos CD8 após estímulo com e4T1, principalmente no grupo que recebeu 4 ug de 4T1-VEs.

Nas células cancerígenas ocorrem anomalias durante o ciclo celular, a mitose perde o seu controle crescendo cada vez mais originando um tumor. Assim, essa alta taxa de proliferação é uma característica do próprio câncer (RODRIGUES, 2014). Os números mais altos de mitose no grupo salina corroboram com os resultados do volume tumoral, observamos em ambos os casos o aumento neste grupo em relação aos quais receberam tratamento. Quando foi verificado a necrose tumoral, que são focos de morte celular comumente observados como resultado de vascularização inadequada e subsequente estresse metabólico, como hipóxia e privação de nutrientes, e é frequentemente associada ao desenvolvimento tumoral agressivo e metastático, considerando uma indicação de mau prognóstico de pacientes com câncer de mama (Liu e Jiao, 2020), também é observado a maior porcentagem no grupo salina quando comparamos com os grupos que recebeu tratamento, mas neste caso a menor porcentagem foi apresentada no grupo que recebeu 4 $\mu$ g 4T1-VEs.

Contudo, em relação aos parâmetros imunológicos, o tratamento com as VEs foi capaz de inibir o crescimento do tumor, este estudo inicial nos demonstra que o grande avanço das vacinas terapêuticas, não apenas fornece uma nova modalidade de tratamento para o câncer, mas também abre o caminho para a concepção e otimização de futuras vacinas com eficácia anticâncer aprimorada.

## **5. CONCLUSÃO**

- Células 4T1 apresentam maior liberação de VEs em sobrenadantes de cultura após 20 horas;
- 4T1-VEs podem ser promissoras para elaboração de vacinas terapêuticas, uma vez que interferem com crescimento tumoral provavelmente pela ativação de respostas celulares específicas, eficientes e que geram memória;

## **6. CONFLITOS DE INTERESSE**

Os autores declaram que a pesquisa foi conduzida na ausência de relações comerciais ou financeiras que pudessem ser interpretadas como um potencial conflito de interesses.

## 7. DECLARAÇÃO DE ÉTICA

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Paulista (UNIP) sob número do protocolo 3281170620.

## 8. REFERÊNCIAS

AL-HUMAIDI, R.B., FAYED, B., SHARIF, S.I., NOREDDIN A., SOLIMAN, S.S.M. Role of Exosomes in Breast Cancer Management: Evidence-Based Review. **Curr Cancer Drug Targets**. 2021;21(8):666-675.

ANASTASIADI,Z.; LIANOS, G.D.; IGNATIADU, E.; HARISSIS, H.V. et. al. Breast câncer in Young women: an overview. Published: 04 March 2017. **Updates Surg** .2017 69:313-317

BOST, J.; SAHER, O.; HAGEY, D.; MAMAND, D. et. al. Growth Media Conditions Influence the Secretion Route and Release Levels of Engineered Extracelular Vesicles. **Adv Healthc Mater**. 2022, Mar;11 (5): e 2101658

CZERNEK, L.; CHWOROS, A.; DUECHLER, M. The Uptake of Extracellular Vesicles is Affected by the Differentiation Status of Myeloid Cells. **Scand J Immunol**, 82, n. 6, p. 506-514, Dec 2015.

DENADAI, M. R.; SUEUR-MAFUF, L.L.; MARQUES, C.G.; AMARAL, A.C.Z. et al. Reproductive cycle of the trigonal clam *Tivela mactroides* (Bivalvia, Veneridae) in Caraguatatuba Bay, southeastern Brazil. **Marine Biology Research**. Volume 11, 2015

DILLEKAS, H.; MICHAEL, S.R.; STRAUME, O. Are 90% of deaths from cancer cused by metastases? **Cancer Med**. 2019 Sep;8(12):5574-5576.

FERNANDEZ, I., ARANTZA, P., DEL TESO, N., PEREZ, V. et al. Clinical biochemistry parameters in C57BL/6J mice after blood collection from the submandibular vein and retroorbital plexus. **Journal of Americam Association of Laboratory Animal Science**. 49:2. 202-210, 2010.

FRANQUESA, M.; HOOGDUIJN, M. J.; RIPOLL, E.; LUK, F. et al. Update on controls for isolation and quantification methodology of extracellular vesicles derived from adipose tissue mesenchymal stem cells. **Front Immunol**, 5, p. 525, 2014.

GAMBERO, M.; TEIXEIRA, D.; BUTIN, L.; ISHIMURA, M. et al. Propionibacterium acnes induces an adjuvant effect in B-1 cells and affects their phagocyte differentiation via a TLR2-mediated mechanism. **Immunobiology**. 2016 Sep;221(9):1001-11. Epub 2016 May 7.

GIACOBINO, C.; CANTA, M.; FORNAGUERA, C.; BORRÓS, S.; CAUDA, V. Extracellular Vesicles and Their Current Role in Cancer Immunotherapy. **Cancers** 2021 , 13 , 2280

GRUPTA M.; WAHI A.; SHARMA P.; NAGPAL R.; RAINA N.; KAURAV M.; BATTACHARYA J.; OLIVEIRA S.; DOLMA K.; PAUL A.; PEREIRA M.; WILAIRATANA P.; Recent Advances in Cancer Vaccines: Challenges, Achievements, and Futuristic Prospects. **Vaccines (Basel)**. 2022 Dec; 10(12): 2011.

HANCOCK G.; HELLNET K.; DORELL L. Therapeutic HPV vaccines. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**. Volume 47, February 2018, Pages 59-72

HUANG, L., RONG, Y., TANG, X., YI, K., QI, P., HOU, J., LIU, W., HE, Y., YUAN, C., WANG, F. Engineered exosomes as an *in situ* DC-primed vaccine to boost antitumor immunity in breast cancer. **Mol Cancer**. 2022 Feb 11;21(1):45.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Câncer de mama**. Rio de Janeiro. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/mama>. Acesso em 21 de novembro de 2022.

ISHIMURA, M.E; TEIXEIRA, D; SILVEIRA G.P; GAMBERO, M; GAMA, G.A.C; PIMENTA, B.S.O; RODRIGUES, E.G; LONGO-MAUGÉRI, I.M; Killed *Propionibacterium acnes* enhances immunogenicity and tumor growth control of a dendritic-tumor cell hybrid vaccine in a murine melanoma model. **PLoS ONE**, 2018 13(10): e0205148.

KATSURA, C.; OGUNMWONYI, I.; KANKAM, H.; SAHA, S.; Breast cancer: presentation, investigation and management. **Br J Hosp Med (Lond)** . 2022 Feb 2;83(2):1-7.

LOFTUS A , C. A., GEORGE C , UCCI A , SHEFFERD K , GREEN A , PAONE R , PONZETTI M , DELLE MONACHE S , MURACA M , TETI A , RUCCI N . Extracellular Vesicles from Osteotropic Breast Cancer Cells Affect Bone Resident Cells. Outubro 2019.

PAKRAVAN, N., ABBASI, A., HASSAN, Z. Immunotherapy Using Oxygenated Water and Tumor-Derived Exosomes Potentiates Antitumor Immune Response and Attenuates Malignancy Tendency in Mice Model of Breast Cancer. **Oxid Med Cell Longev**. 2021 May 28;2021:5529484.

PLATKO, K.; HAAS-NEILL, S.; AZIZ, T.; AL-NEDAWI, K. The role of circulating extracellular vesicles in breast cancer classification and molecular subtyping. **Breast J**, May 2019.

RAPOSO, G.; STOOBVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol**, 200, n. 4, p. 373-383, Feb 2013.

REIS, N.; DUPIN, T.; COSTA, C.; TOLEDO, M.; Oliveira, V.; POPI, A.; TORRECILHAS, A.; XANDER, P.; *Leishmania amazonensis* promastigotes or extracellular vesicles modulate B-1 cell activation and differentiation **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Oct 2020

RICARTE, V. A.; Estudo epidemiológico de neoplasias em gatos atendidos no setor de oncologia veterinária do hospital veterinário da Universidade Federal de Uberlândia no período de 2015 à 2020. **Universidade Federal de Uberlândia** – Instituto de Biotecnologia. Outubro-2021

ROBBINS, P. D.; MORELLI, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. **Nat Rev Immunol**, 14, n. 3, p. 195-208, Mar 2014.

RODRIGUES, G. Eletroquimioterapia para tratamento de câncer - desenvolvimento e avaliação em estudo de caso com camundongos portadores de melanoma B16F10. **Interunidades em Biotecnologia**, 2014, 10. 11606/T.87.2016.tde-31082015-125429

SQUAIELLA, C.; ANANIAS, R.; MUSSALEM, J.; BRAGA, E. *et al.* In vivo and in vitro effect of killed *Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on mouse bone marrow stem cells and dendritic cell differentiation. **Immunobiology**, 2006;211(1-2):105-16.

THÉRY, C.; WITWER, K.W; AIKAWA, E.; ALCARAZ, M.J, *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **J Extracell Vesicles**. 2018 Nov 23;7(1):1535750.

XU, Z.; ZENG, S.; GONG, Z.; YAN, Y. Exosome-Based Immunotherapy: A Promising Approach for Cancer Treatment. **Mol. Cancer** 2020, 19, 160

YANG,L.; YONG, L.; ZHU, X.; FENG, Y. *et al.* Disease progression model of 4T1 metastatic breast cancer. **J Pharmacokinet Pharmacodyn**. 2020 Feb;47(1):105-116. Epub 2020 Jan 22.

YONG NG, C. KEE, L. AL-MASAWA,M. LEE,Q. *et al.* Scalable Production of Extracellular Vesicles and Its Therapeutic Values: A Review. **Int J Mol Sci**. 2022 Jul 20;23(14):7986

ZHANG, R.; BILLINGSLEY, M.M; MITCHELL, M.J; Biomaterials for vaccine-based cancer immunotherapy. **J Control Release**. 2018 Dec 28; 292: 256–276.

ZHANG, W.; PAN, Y.; GOU, P.; ZHOU, C. *et al.* Effect of xanthohumol on Th1/Th2 balance in a breast cancer mouse model. **Oncology reports**. November 13, 2017. Pages: 280-288

## ANEXOS

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo in vivo do papel das vesículas extracelulares liberadas por células 4T1 no desenvolvimento e progressão do tumor de mama ", protocolada sob o CEUA nº 3281170620 (ID 000554), sob a responsabilidade de **Elizabeth Cristina Pérez Hurtado e equipe; Vanessa Xavier** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Paulista (CEUA/UNIP) na reunião de 07/10/2020.

We certify that the proposal "In vivo study of the role of extracellular vesicles released by 4T1 cells in the breast tumor development and progression", utilizing 25 Isogenics mice (25 females), protocol number CEUA 3281170620 (ID 000554), under the responsibility of **Elizabeth Cristina Pérez Hurtado and team; Vanessa Xavier** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Paulista University (CEUA/UNIP) in the meeting of 10/07/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [07/2020](#) a [12/2021](#)

Área: [Patologia Ambiental E Experimental](#)

Origem: [Biotério de Experimentação](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [8 a 10 semanas](#) N: [25](#)

Linhagem: [BALB/c, specific pathogen-free](#)

Peso: [17 a 23 g](#)

Local do experimento: Todos os experimentos envolvendo animais serão realizados no Biotério e Laboratório de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa da Universidade Paulista.

São Paulo, 28 de março de 2021



Prof. Dr. Vicente Borelli  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Paulista



Profa. Dra. Maria Martha Bernardi  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Paulista