



CONTAGEM CELULAR NO SANGUE PERIFÉRICO E BAÇO EM MODELO EXPERIMENTAL DE TUMOR DE MAMA

CELL COUNT IN PERIPHERAL BLOOD AND SPLEEN IN AN EXPERIMENTAL BREAST TUMOR MODEL

Autores

Luan Andrade Silva 1
 Joyce Satil Chaves da Silva 2
 Fernanda Felix de Oliveira 2
 Marília Vieira de Carvalho 2
 João Victor Carvalho Sousa 3
 Eduardo Fernandes de Oliveira 3
 Moisés Alves Rodrigues 4
 Bruna Soares de Melo Franco 2
 Mario Pires Moreira Neto 2
 Lívia Luísa Campos Afonso 3
 Diovani Goncalves Guardiero 2
 Douglas Reis Abdalla 5

Resumo

Introdução: O carcinoma da mama 4T1 é uma linha de células de tumor transplantáveis que é altamente tumorigênica e invasiva e migram para locais distantes, incluindo múltiplos nodos linfáticos, sangue, fígado, pulmão, cérebro e ossos. **Objetivo:** Realizar a contagem total e diferencial, e calcular o valor absoluto em leucócitos do sangue e do baço periféricos, para avaliar se há alterações na produção de células imunes e recrutamento destas células para o sangue e órgãos linfóides secundários. **Métodos:** Para este estudo, foram utilizados 10 camundongos fêmeas Balb / c, e divididas em dois grupos: um grupo controle (GI) - sem intervenção; e um grupo de tumor (GII) - em que os animais receberam 2×10^5 células 4T1 na almofada de gordura. Após o período experimental, o sangue a partir da cauda e tecido do baço foram recolhidas para avaliar as células do sistema imunológico. Procedeu à contagem total de leucócitos na câmara de Neubauer. Para contagens diferenciais utiliza-se um bom esfregaço. **Resultados:** O crescimento tumoral apresentou volume final de $254 \pm 65 \text{ mm}^3 \times 10^{-3}$. Em relação à faixa de tumor e contagem de células mostraram um aumento significativo no número de leucócitos (7380 mm^3 vs 19540 mm^3 , $p < 0,001$), causado por um aumento significativo de neutrófilos, na contagem diferencial apenas neutrófilos mostraram diminuição significativa no grupo de tumor ($1260,2 \text{ mm}^3$ vs $913,4 \text{ mm}^3$, $p < 0,0508$). Na contagem total de leucocitos no baço do grupo tumor foi (198400 mm^3 vs 287320 mm^3 , $p < 0,001$). Na contagem diferencial no grupo tumor houve um aumento significativo em monócitos ($8217,6 \text{ mm}^3$ vs 18967 mm^3 , $p < 0,01$) e uma redução significativa de linfócitos ($175065,5 \text{ mm}^3$ vs $47078,4 \text{ mm}^3$, $p < 0,001$). Na análise de correlação entre o volume do tumor e populações de células no sangue periférico, todas as populações mostrou correlação positiva com o volume do tumor, e de forma significativa para os linfócitos. Correlacionando as populações de células no volume do baço e do tumor, as correlações são positivas para neutrófilos e linfócitos, e correlação negativa com monócitos, embora sem significância. **Conclusão:** Conclui-se que o tumor 4T1 promoveu neutropenia no sangue periférico, monocitose e linfopenia no baço. Efeitos de uma resposta inflamatória crônica, estes resultados sugerem que pode haver neoformação tumoral e necrose tecidual.

Palavras Chaves: Contagem Total, Diferencial, Valor Absoluto, Leucócitos, Células 4T1.

Filiação

1 Biomédico pela Faculdade de Talentos Humanos, Uberaba (MG)
 2. Médica (o) pela Universidade de Uberaba, Uberaba, MG, Brasil
 3 Acadêmica (o) de Medicina, Universidade de Uberaba, Uberaba, MG, Brasil
 4 Acadêmico de Medicina, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, Brasil
 5 2Doutor em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Triangulo Mineiro, Uberaba (MG), Brasil

Autor Correspondente

Douglas Reis Abdalla
 End: Avenida Tônico dos Santos 333,
 Uberaba/MG CEP 38100-000
 Tel: (34) 3311-7400
 E-mail: profdouglassabdalla@gmail.com

Abstract

Introduction: The 4T1 mammary carcinoma is a transplantable tumor cell line that is highly tumorigenic and invasive and migrate to multiple distant sites including lymph nodes, blood, liver, lung, brain, and bone. **Objective:** This study aimed, perform the total and differential counting, and calculating absolute value in peripheral blood and spleen leukocytes, for assessing if there are changes in the production of immune cells and recruitment of these cells to blood and secondary lymphoid organ. **Methods:** For this study, 10 female Balb/c mice were used, and divided into two groups: a control group (GI) – without intervention; and a tumor group (GII) - in which the animals received 2×10^5 4T1 cells in fat pad. After the experimental period, the blood from tail vein and spleen tissue were collected to assess the immune cells. Proceeded to total leukocyte count in Neubauer chamber. For differential counts uses up a good quality. **Results:** Tumor growth presented final volume of $254 \pm 65 \text{ mm}^3 \times 10^{-3}$. Regarding cell count tumor group showed a significant increase in total leukocytes (7380 mm^3 vs 19540 mm^3 , $p < 0,001$), caused by a significant increase of neutrophils rods, in the differential count only neutrophils showed significant reduction in tumor group ($1260,2 \text{ mm}^3$ vs $913,4 \text{ mm}^3$, $p < 0,0508$). Regarding the count in the spleen the total leukocytes again were significantly higher in the tumor group compared to the control (198400 mm^3 vs 287320 mm^3 , $p < 0,001$). In the differential count in tumor group there was significant increase in monocytes ($8217,6 \text{ mm}^3$ vs 18967 mm^3 , $p < 0,01$) and significant reduction of lymphocytes ($175065,5 \text{ mm}^3$ vs $47078,4 \text{ mm}^3$, $p < 0,001$). In the analysis of correlation between tumor volume and cell populations in peripheral blood, all populations showed correlation positive with tumor volume, and significantly for lymphocytes. Correlating the cell populations in the spleen and tumor volume, the correlations are positive for neutrophils and lymphocytes, and negative correlation with monocytes, although without significance. **Conclusion:** We conclude that the tumor 4T1 promoted neutropenia in peripheral blood, monocytosis and lymphopenia in the spleen. Effects of a chronic inflammatory response, these findings suggest that there may be sites of tumor neoformation and necrotic processes.

Key Words: Total Counting, Differential, Absolute Value, Leukocyte, 4T1 cells.

INTRODUÇÃO

Os carcinomas são a segunda patologia que mais acarreta em óbitos no mundo perdendo apenas para patologias cardiovasculares (NIGJEH et al., 2019; INCA, 2020). O câncer origina-se a partir de células normais que sofrem expansão clonal descontrolada que pode surgir devido a fatores intrínsecos, como mutações herdadas ou por erros aleatórios nas replicações do DNA aumentando a susceptibilidade do câncer, como também por fatores extrínsecos que levam a um dano no gene devido a fatores que estão diretamente relacionados com a patogênese, isso inclui fatores ambientais e biológicos, tais com o estilo de vida, tabagismo, hereditariedade e hábitos alimentares (PORTER, 2009). No entanto, uma única mutação raramente levará à formação de um tumor. Para que aconteça o processo de carcinogênese são necessárias de duas a seis modificações no DNA das células, que por sua vez irão interferir nos mecanismos de proliferação, diferenciação e apoptose que, por fim, levam ao processo de expansão clonal descontrolada (ONUCHI; CHAMMAS, 2010). Na metástase as células tumorais devem atingir a corrente sanguínea ou a circulação linfática e a partir daí invadir e colonizar outros tecidos (LIN et al., 2015).

As mamas são estruturas superficiais proeminentes na região anterior da parede torácica, nelas estão presentes as glândulas mamárias, localizadas no tecido subcutâneo anterior aos músculos peitorais. Durante a puberdade, a glândula mamária se desenvolve. É composta pelos ductos lactíferos formados a partir do brotamento de cada 15 a 20 lóbulos mamários que juntos se abrem na papila mamária (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014). A Organização Mundial da Saúde classifica o câncer de mama em diferentes tipos histológicos, dentre eles tumores epiteliais, tumores epiteliais raros, lesões proliferativas intraductais, tumores epiteliais/mioepiteliais, lesões papilares e tumores mesenquimais. Esses mesmos grupos ainda são divididos mais especificamente em subtipos de neoplasias. A remoção parcial ou total da mama, radioterapia, quimioterapia e terapia endócrina geram pequenas melhorias nos resultados clínicos. Apesar de um tratamento bem sucedido do tumor primário, recidiva e metástase subsequente, que termina geralmente de morte, ocorrem casos mais profundos de câncer que se diseminam para diversas parte do organismo humano (CHERYL; MILLER, 1992).

No começo as pesquisas do câncer de mama em modelos experimentais de camundongos eram estudadas com a indução do tumor a partir de células de câncer da mama da linhagem humana e observou-se que a metástase e o crescimento do microambiente tumoral eram pobres e insuficientes. O carcinoma de mama de linhagem 4T1, são células transplantáveis derivados do tumor 410.4, isoladas por Fred Miller (MILLER, 1983). O tumor gerado pela linhagem de células 4T1 é altamente invasivo e, diferente da maior partes dos modelos experimentais de tumor, pode sofrer espontaneamente metástase do tumor primário na glândula mamária para vários órgãos e locais distantes do organismo humano, incluindo os gânglios linfáticos, sangue, fígado, pulmão, cérebro e ossos (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 1998; KOSZALKA et al., 2022). O tumor originalizado pela célula 4T1 tem inúmeras características que fazem o modelo experimental adequado para comparação do cancro da mama humana, as células tumorais são facilmente implantadas para a glândula mamária do camundongo BALB/C de modo em que o tumor primário cresça no local automaticamente correto. Tanto o cancro da mama quanto a doença metastática originada pela 4T1 desenvolve de forma espontânea a partir do tumor primário, a difusão metastática para os nódulos linfáticos de drenagem e de outros órgãos são bastante semelhantes ao do cancro da mama. As células 4T1 possui resistência à 6-tioguanina. Isso permite a

quantificação precisa das células metastáticas (PULASKI et al., 2000).

O baço, maior órgão linfóide do organismo, está localizado no hipocôndrio esquerdo, sob a proteção da arcada costal. Varia de volume conforme a idade, o estado nutricional, o imunológico e diante do aumento da pressão portal, sendo que no adulto pesa aproximadamente 150g. As funções básicas do baço são fundamentalmente hematológicas e imunológicas. Do ponto de vista hematológico, podemos ressaltar que o órgão age como um filtro, através da remoção com destruição das hemácias senescentes ou defeituosas da circulação graças a organização única de seu parênquima e vasculatura. Age ainda na regulação do fluxo sanguíneo para o fígado, armazenamento de células sanguíneas e “reciclagem” do ferro endógeno. Tão importante quanto, é sua função imunológica. O baço está claramente envolvido na resposta imune tanto que, um retardo no aparecimento e títulos máximos mais baixos de anticorpos são observados após esplenectomia. Sua função fagocitária representa 25% do total de fagocitose do organismo. A ausência esplênica provoca uma incapacidade na remoção de bactérias e células revestidas por anticorpos da circulação (CHAPMAN; NEWMAN, 1998).

O sistema de defesa contra agentes invasores em nosso organismo consiste em dois tipos de reações. A imunidade inata é mediada por células e proteínas que estão sempre presentes e prontas para lutar contra os agentes, sendo chamada em ação imediatamente em resposta à infecção. Os principais componentes da imunidade inata são barreiras epiteliais da pele, trato gastrointestinal e trato respiratório, que impedem a entrada de microrganismos, leucócitos fagócitos (neutrófilos e macrófagos), um tipo de célula especializada, chamada de célula natural killer (NK) e várias proteínas plasmáticas circulantes, das quais as mais importantes são as proteínas do sistema de complemento. A resposta imune inata é capaz de prevenir e controlar muitas infecções. No entanto, muitos microrganismos patogênicos evoluíram para superar as defesas iniciais, e proteção contra essas infecções requer mecanismos mais especializados e poderosos da imunidade adaptativa (também chamada de imunidade adquirida ou específica). A imunidade adaptativa é normalmente silenciosa e responde à presença de microrganismos infecciosos, tornando-se ativa, expandindo e gerando mecanismos potentes para neutralizar e eliminar os microrganismos. Os componentes do sistema imunitário adaptativo são linfócitos e seus produtos. Por convenção, os nomes “sistema imunológico” e “resposta imunológica” referem-se à imunidade adaptativa. Na imunidade frente aos tumores o conceito de Vigilância Imunológica é bem conhecido, caracterizado como a propriedade que o sistema imunológico tem de identificar e eliminar clones de células que sofreram mutação, de modo a controlar o início e o desenvolvimento de tumores (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2011). O sistema imunológico, portanto, torna-se indispensável para o controle de neoplasias, utilizando tanto dos mecanismos da imunidade inata como os mecanismos da imunidade adaptativa para a resposta imune aos tumores (MARCUS et al., 2014). A imunidade inata vem chamando cada vez mais a atenção dos pesquisadores na vigilância imunológica. Estudos mostram o importante papel das células NK, das células dendríticas (CD) e das células fagocitárias (monócitos e macrófagos) que configuram a primeira linha de defesa diante do surgimento dos tumores (RAVAL et al., 2014). A imunidade adaptativa é a resposta intensa aos agentes agressores e é dividida entre resposta humoral mediada por linfócitos B e resposta celular mediada por linfócitos T, sendo o linfócito T a célula mais específica contra antígenos tumorais (SLANEY et al., 2013).

Os carcinomas são patologia que sem duvidas vêm aumentando seu índice com o passar do tempo, este crescimento

está relacionado com inúmeros fatores que estamos expostos ao dia a dia, com exemplo raios solares, má alimentação, stress, e outros fatores carcinogênicos. O câncer de mama é o tipo de câncer mais frequentes entre mulheres. Diversos estudos vêm mostrando o papel do sistema imunológico e suas células frente a combate de tumores. O tratamento para o câncer consiste principalmente em quimioterapia e radioterapia. São tratamentos eficazes, porem quando detectado tardiamente a cura é mais difícil. A quimioterapia e a radioterapia são também tratamentos muito agressivos, que comprometem o sistema imunológico do paciente deixando o mesmo sujeito a desenvolver várias infecções oportunistas (SILVA, 2015).

Este trabalho tem como seu principal objetivo, realizar a contagem total, diferencial e calculo do valor absoluto de leucócitos do sangue periférico e do baço de camundongos BALB/C para observar se há alterações na produção das células do sistema imunológico.

MÉDOTOS

Serão utilizadas 10 fêmeas de camundongos da linhagem Balb/c, na fase adulta, com 8 semanas de vida, oriundas do Instituto de Pesquisa em Oncologia – IPON. Os animais serão agrupados e mantidos em gaiolas plásticas, com espaço adequado para acomodação em um ciclo claro/escuro 12 horas, com ventilação e temperatura controlada, variando entre (21 ± 3 °C), com comida e água disponíveis. Eles serão divididos em 2 grupos experimentais (tabela1). Depois do período experimental (30 dias), os animais serão eutanasiados com uma overdose de Cetamina (75 mg/kg) e Xilazina (15 mg/kg), o sangue utilizado será retirado da cauda dos animais, posteriormente será retirado o baço de cada animal.

Para inoculação do tumor será utilizado a linhagem tumoral 4T1 é descrita na literatura como potente indutora de tumores de mama em roedores. As células de linhagem 4T1 são mantidas em culturas em um meio especial denominado RPMI Completo com pH 7,4. Os animais serão inoculados com uma única dose de células indutoras de tumor, com um volume de 50 µl e concentração de 2,0 x 10⁵ células por animal nos quais permanecerão vivos durante 30 dias ate o desenvolvimento do tumor, após será realizada a eutanásia para obtenção dos resultados.

Durante o experimento será realizado a aferição de medidas do volume tumoral através de um paquímetro no qual os resultados serão expressos em mm.

Tabela 1 – Distribuição dos Grupos Experimentais	
Grupo 1 - Controle (5 animais)	Sem inoculação de células 4T1
Grupo 2 - Tumor (5 animais)	Inoculação das células 4T1 na concentração de 2,0 x 10 ⁵ por animal.

Para realizar a contagem de Leucócitos Totais e necessário realizar uma diluição de $\frac{1}{20}$ do sangue total em solução de Turk.

Ex: $\frac{1}{20} = \frac{20\mu\text{l Sangue Total}}{400\mu\text{l Diluente de Turk}}$

Em seguida pipeta-se a amostra na câmara de Neubauer, realiza a contagem dos 4 quadrantes laterais e multiplica-se por 50. O resultado é expresso em mm³.

A contagem diferencial informa as quantidades relativas dos diferentes tipos de leucócitos no sangue periférico. Para os exames de rotina, utiliza-se para tal contagem um esfregaço de

boa qualidade corado pelo panótico rápido que é levado ao microscópio para observação. No primeiro momento, a avaliação da lâmina é feita com uma objetiva de menor aumento (10x a 40x) e depois, com uma objetiva de imersão de maior aumento (100x). A contagem de células é realizada da metade para o fim da borda do esfregaço, especificamente na cauda do esfregaço, conta-se 100 células e o valor é expresso em %.

Quando encontrados os valores de Leucócitos Totais e do diferencial pode-se obter um dado bastante importante que é o Valor Absoluto. Este valor pode ser encontrado apartir da regra de três o que permitira saber o valor específico de cada célula encontrada nos leucócitos totais. O resultado também é expresso em mm³.

Ex: Se em 100 células do diferencial eu encontrar 50 neutrófilos, em 10.000 células dos leucócitos totais eu terei o numero de neutrófilos totais .

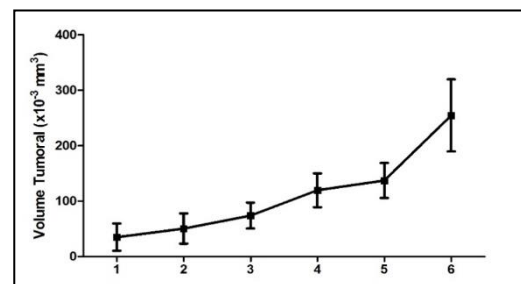
$$\frac{100}{10.000} = \frac{50\%}{x}$$

X= 5.000 neutrófilos / mm³.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante a fase experimental foi acompanhado o crescimento tumoral através de medidas com paquímetro nas quais eram dadas em mm. A figura 1 representa o tamanho do crescimento tumoral ao longo do experimento.

Figura 01 – Representação do crescimento tumoral ao longo do período experimental



O crescimento tumoral demonstrou homogêneo com volume final de 254 ± 65 mm³ x10⁻³. A utilização deste modelo está baseada no fato de que muitos autores tem usados modelos experimentais com camundongos com sucesso em estudos de câncer. Neste estudo, este modelo animal altamente contribui para a compreensão da biologia da mama com câncer. (ASLAKSON; MILLER, 1992; PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001; ATIYA et al., 2019).

Após a eutanásia dos animais foram coletadas amostras de sangue periférico na cauda de cada animal dos dois grupos e fragmentos teciduais do baço para que fossem confeccionadas laminas para o diferencial dos leucócitos e contagem total dos mesmos os resultados estão expressos nas tabelas 2 e 3.

Tabela 02 – Distribuição entre os grupos experimentais da população leucocitária, bem como das subpopulações de neutrófilos, monócitos e linfócitos, no sangue periférico.

Grupo	Leucócito Total	Neutrófilo	Monócito	Linfócito
Controle	7380,00±505,62	1260,20±83,17	1081,20±68,87	5038,60±429,56
Tumor	19540,00±1870,72	913,40±178,78	1069,60±209,31	4639,60±339,68
p-value	0,0001	0,117	0,959	0,487

Em relação à faixa de tumor a contagem de células mostraram um aumento significativo no número de leucócitos (7.380mm^3 vs 19.540mm^3 , $p < 0,001$), causado por um aumento significativo de neutrófilos hastes, na contagem diferencial apenas neutrófilos mostraram diminuição significativa no grupo de tumor ($1260,2\text{mm}^3$ vs $913,4\text{mm}^3$, $p < 0,0508$). Segundo pesquisas o reconhecimento de antígenos tumorais esta relacionado com células e moléculas do sistema imunológico. Nos tecidos neoplásicos alguns pesquisadores já encontraram macrófagos ativados, células NK, linfócitos T CD4+ e CD8+ específicos para peptídeos tumorais, assim como altos títulos de imunoglobulinas contra um vasto repertório destes antígenos (ZITVOGEL *et al.* 2004).

Nenhum modelo experimental descreve a atuação de células do sistema imunológico presentes no sangue periférico de animais.

No que respeita à contagem no baço dos leucócitos totais foram significativamente maiores de novo no grupo do tumor em comparação com o controle (198.400mm^3 vs 287.320mm^3 , $p < 0,001$). Na contagem diferencial no grupo tumor houve um aumento significativo em monócitos ($8.217,6\text{mm}^3$ vs 18.967mm^3 , $p < 0,01$) com grande presença de neutrófilos e uma redução significativa de linfócitos ($175.065,5\text{mm}^3$ vs $47.078,4\text{mm}^3$, $p < 0,001$).

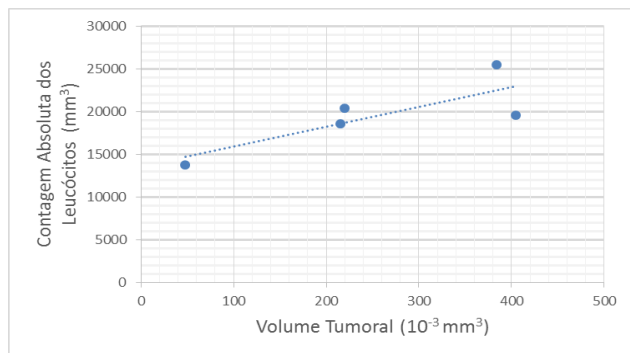
Tabela 03 – Distribuição entre os grupos experimentais da população leucocitária, bem como das subpopulações de neutrófilos, monócitos e linfócitos, no baço.

Grupo	Leucócito Total	Neutrófilo	Monócito	Linfócito
Controle	$198400,00 \pm 5986,65$	$15116,80 \pm 1590$	$8217,60 \pm 1128$	175065 ± 6139
Tumor	$287320,00 \pm 6450,92$	16739 ± 4690	$18967 \pm 1780,74$	47078 ± 5007
p-value	0,0001	0,752	0,001	0,0001

Segundo autores o baço é um órgão do sistema mononuclear fagocitário, com importante papel na defesa orgânica devido a seus mecanismos de filtração e fagocitose, além da produção de fatores do complemento e imunoglobulinas, em especial a IgM. (Babcock *et al.* 1989).

Nas figuras 02 e 03 estão representados os dados dos leucócitos totais e subpopulações no sangue periférico correlacionadas com o volume tumoral.

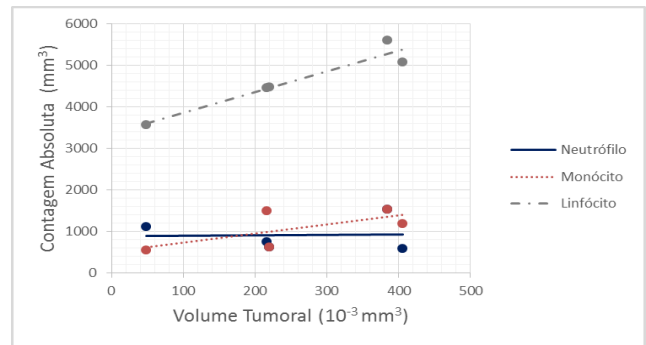
Figura 02 – Correlação Leucócitos Totais no sangue periférico e volume tumoral.



Correlacionando Leucócitos Totais do sangue periférico com o volume tumoral pode-se observar o aumento das células do sistema imunológico durante o período de crescimento tumoral e no grupo tumor a contagem total de leucócitos variou de 13.750mm^3 vs 25.450mm^3 . A reação inflamatória caracteriza-se por eventos inter-relacionados, entre os quais aumento no fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular na região afetada, exsudação

de fluido (edema), dor localizada, migração e acúmulo de leucócitos inflamatórios dos vasos sanguíneos para dentro do tecido, formação de tecido de granulação, reparo ou necrose tecidual (GOMES-LEAL, 2002).

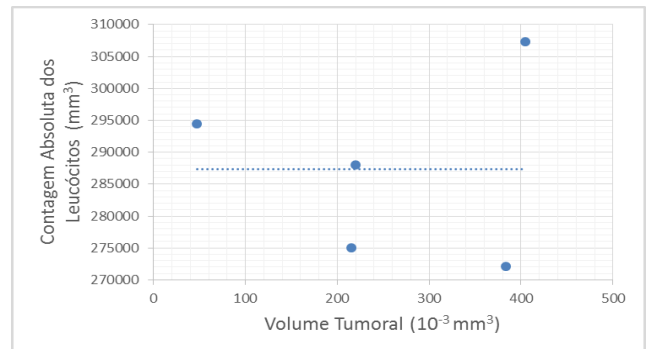
Figura 03 – Correlação Subpopulações celulares no sangue periférico e volume tumoral



Na análise de correlação entre o volume do tumor e populações de células no sangue periférico, todas as populações mostrou correlação positiva com o volume do tumor, e de forma significativa para os linfócitos. Nishimura em 1994 através de suas pesquisas viu que Linfócitos T CD8+ citotóxicos, juntamente com as células NK, são as principais células efetoras da imunidade celular tumoral em humanos.

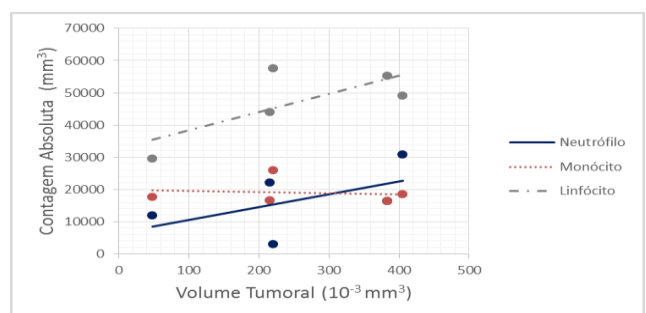
Nas figuras 04 e 05 estão representados os dados dos leucócitos totais e subpopulações no baço correlacionadas com o volume tumoral.

Figura 04 – Correlação Leucócitos Totais no baço e volume tumoral.



Assim como no sangue periférico no baço houve aumento das populações de leucócitos totais por mm^3 com conectado a circulação sanguínea, após experimentos com doenças parasitárias Maioli observou que neste órgão estão presentes células como linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas.

Figura 05 – Correlação Subpopulações celulares no baço e volume tumoral.



Correlacionando as populações de células no volume do baço e do tumor, as correlações são positivas para neutrófilos e linfócitos, e correlação negativa com monócitos, embora sem significância. A remoção das células tumorais necessita do envolvimento dos componentes da imunidade inata e imunidade adaptativa (ABBAS *et al.* 2000). No esfregaço pode-se observar a presença de neutrófilos hastes e linfócitos.

CONCLUSÃO

Através deste estudo conclui-se que o tumor 4T1 promove neutropenia no sangue periférico, monocitose e linfopenia no baço. Efeitos de uma resposta inflamatória crônica, estes resultados sugerem que pode haver locais de neoformação tumoral e necrose tecidual.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7^a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, p. 389-405.
- ASLAKSON, C.J; MILLER F.R. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res* 1992, 52(6): 1399-1405.
- ATIYA, HI; DVORKIN-GHEVA, A; HASSELL J; et al. Intraductal Adaptation of the 4T1 Mouse Model of Breast Cancer Reveals Effects of the Epithelial Microenvironment on Tumor Progression and Metastasis. *Anticancer Research*, 2019. 39: 2277-2287.
- BABCOCK G.; AMOSCATO A.A; NISHIODA K. Effect of tuftsin on the migration, chemotaxis, and differentiation of macrophages and granulocytes. *Ann NY Acad Sci* 1983; 419:64-75
- CHERYL, J. A; MILLER, R. F. Selective Events in the Metastatic Process Defined by Analysis of the Sequential Dissemination of Subpopulations of a Mouse Mammary Tumor. *Cancer Research.*, v.52, p.1399-1405, 1992.
- CHAPMAN C W, NEWMAN N. Disorders of the spleen. *Wintrob's Clinical Hematology*. 10th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998.p. 1968-89.
- GOMES-LEAL, W. Inflamação Aguda, Resposta Glial e Degeneração Axonal em um Modelo de Excitotoxicidade na Medula Espinhal. 20D2. 197f. Tese (Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Neurociências) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2002.
- INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Incidência do Câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância 2020. Rio de Janeiro.
- KOSZALKA, P.; KUTRYB-ZAJAC, B.; MIERZEJEWSKA, P.; TOMCZYK, M.; WIETRZYK, J.; SERAFIN, P.K.; SMOLENSKI, R.T.; SLOMINSKA, E.M. 4-Pyridone-3-carboxamide-1- β -D-ribose (4PYR)—A Novel Oncometabolite Modulating Cancer-Endothelial Interactions in Breast Cancer Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 5774.
- LIN, Z.-W., WU, L.-X., XIE, Y., OU, X., TIAN, P.-K., LIU, X.-P., OU, Q.-J. The expression levels of transcription factors T-bet, GATA-3, ROR γ t and FOXP3 in peripheral blood lymphocyte (PBL) of patients with liver cancer and their significance. *International Journal of Medical Sciences.*, v.12, p.7–16, 2015.
- MAIOLI, T.U. O efeito da esplenectomia na resposta imune às infecções causadas pela *Leishmania major* e pelo *Trypanosoma cruzi*. 2008. Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.
- MARCUS, A.; GOWEN, B. G.; Thompson, T. W.; IANNELLO, A.; ARDOLINO, M.; DENG, W.; WANG, LIN.; SHIFRIN, N.; RAULET, D. H.; Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Advances in immunology.*, v. 122, p. 91, 2014.
- MILLER, B. E., ROI, L. D., HOWARD, L. M.; MILLER, F. R. Quantitative Selectivity of Contact-mediated Intercellular Communication in a Metastatic Mouse Mammary Tumor Line. *Cancer Research.*, p. 4102-4107, 1983.
- MOORE, K. L.; DALLEY, A. F.; AGUR, A. M. R.; **Anatomia orientada para a clínica**. 7^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
- NIGJEH, SE; YEAP, SK; NORDIN, N; et al. In Vivo Anti-Tumor Effects of Citral on 4T1 Breast Cancer Cells via Induction of Apoptosis and Downregulation of Aldehyde Dehydrogenase Activity. *Molecules* 2019, 24, 3241.
- NISHIMURA, M., KWON, K. S., SHIBUTA, K. et al. An improved method for DNA diagnosis of leprosy using formaldehyde-fixed, paraffin-embedded skin biopsies. *Modern Pathology*. V. 7, n. 2, p. 253-256, 1994.
- ONUCHIC A. C., CHAMMAS R. Câncer e o microambiente tumoral. *Rev Med (São Paulo).*, v.89, p. 21-31, 2010.
- PORTER, P.L. Global trends in breast cancer incidence and mortality. *Salud Pública de Mexico.*, v.51, p.141-146, 2009.
- PULASKI, B. A. and OSTRAND-ROSENBERG, S. Reduction of established spontaneous mammary carcinoma metastases following immunotherapy with major histocompatibility complex class II and B7.1 cell-based tumor vaccines. *Cancer Research.*, v.58, p.1486-1493, 1998.
- PULASKI, B. A., TERMAN, D., KHAN, S., MEULLER, E., and OSTRAND-ROSENBERG, S. Cooperativity of Staphylococcal aureus enterotoxin B superantigen, major histocompatibility complex class II, and CD80 for immunotherapy of advanced metastases in a clinically relevant post-operative mouse breast cancer model. *Cancer Research.*, v.60, p. 2710-2715, 2000.
- RAVAL, R. R.; SHARABI, A. B.; WALKER, A. J.; DRAKE, C. G.; SHARMA, P.; Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. *J Immunother Cancer*, v.14, p.2-14, 2014.

SLANEY, C. Y.; RAUTELA, J.; PARKER, B. S. The emerging role of immunosurveillance in dictating metastatic spread in breast cancer. **Cancer Research.**, v. 73, n. 19, p. 5852-5857, 2013.

SILVA, S.F.M. Influência da imunoterapia com células dendríticas na expressão de Fatores de Transcrição em células esplênicas obtidas de camundongos com tumores de mama induzidos por células 4T1. 2015. Programa de Pós-Graduação em ciências da saúde, Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Uberaba, 2015.

ZITVOGEL, L.; CASARES, N.; PÉQUIGNOT, M.O; CHAPUT, N.; ALBERT, M.L; KROEMER, G. The immune response against dying tumor cells. *Advances in immunology*, v.84, p. 131-17, 2004.