

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

ANGELA MARIA MOED LOPES

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS ATRAVÉS DA  
ANÁLISE DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS E CITOCINAS EM PACIENTES  
COM LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E CÂNCER CERVICAL INVASIVO**

UBERABA – MG

2016

ANGELA MARIA MOED LOPES

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS E CITOCINAS EM PACIENTES COM LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E CÂNCER CERVICAL INVASIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, área de concentração Patologia Humana, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Antoniazi Michelin

UBERABA – MG

2016

ANGELA MARIA MOED LOPES

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS ATRAVÉS DA ANÁLISE DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS E CITOCINAS EM PACIENTES COM LESÕES INTRAEPITELIAIS CERVICAIS E CÂNCER CERVICAL INVASIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, área de concentração Patologia Humana, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, sob orientação do Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta. Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Antoniazi Michelin.

Dissertação aprovada em: 02 de fevereiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Eddie Fernando Cândido Murta Eddie Murta  
Dra. Millena Prata Jammal Millena Prata Jammal  
Dr. Paulo César Fernandes Júnior Paulo César Fernandes Júnior

## DEDICATÓRIA

...À Deus pelo seu infinito amor, que tem me sustentado diante das adversidades, pela sabedoria com que tem guiado meus passos me ensinando dia a dia seus bondosos preceitos, pela paciência diante de minhas inúmeras faltas e pela imensa misericórdia, que tem me permitido concretizar mais esta etapa em minha jornada...

...Ao meu amado pai, senhor Jan Moed, exemplo de amor e dedicação, que mesmo diante das maiores dificuldades da vida se mostrou forte, nos auxiliando na realização de nossos sonhos, sempre nos apoiando com braço forte, meu grande herói e amigo...

...A minha querida mamãe, senhora Petronella Moed, que sempre me guiou com amor e carinho, em todo momento acreditando nos meus sonhos, seu exemplo de amor ao próximo me inspira todos os dias, a ti, meu eterno amor e saudade...

...Ao meu amado esposo, Anderson, cujo apoio e amor têm sido alavancas para a conquista de meus sonhos, sua paciência e carinho têm me guiado diante de obstáculos, seu amor minha grande inspiração...

...À toda minha família, especialmente ao Michiel, Dennie, Jéssica, Rose, Willi, Giovanna e aos meus sogros Alceu e Hilda, que têm me auxiliado nesta jornada, com seu carinho e amizade incondicionais.....

...Aos meus orientadores Márcia Antoniazzi Michelin e Eddie Fernando Cândido Murta, que não só me proporcionaram a oportunidade de estar desenvolvendo este projeto e me aperfeiçoando profissionalmente, mas também contribuíram significativamente para meu crescimento pessoal, a vocês minha eterna gratidão...

## **AGRADECIMENTOS**

Meu eterno agradecimento a todos os meus professores, mestres e educadores, em especial a todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, que contribuíram de forma inenarrável para meu desenvolvimento, tanto profissional quanto pessoal.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação e aos amigos do Laboratório IPON, pelo companheirismo e amizade, em especial: Saulo, Cláudio, Renata, Polyana, Jéssica, Millena, Tauana, Letícia, Carol, Daiane, Alessandra, Andjara, Larissa, Fabiano, Douglas, André, Eduardo, Thiago, Chan, Ananda, Bruno, Lázaro, Raphael, Laís e Isadora.

Aos pacientes, que voluntariamente participaram deste projeto, meus sinceros e especiais agradecimentos.

A todos os funcionários do serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Ambulatório Maria da Glória, e da Disciplina de Imunologia, que direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), agradeço os recursos financeiros destinados ao desenvolvimento desta pesquisa.

**A felicidade depende de nós. Talvez não se trate de um final feliz, talvez se trate da história que vem antes.**

(Athena Orchard)

## RESUMO

Neste estudo buscamos avaliar o perfil de ativação de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes com lesão intraepitelial cervical de diferentes graus, submetidos a três diferentes protocolos de ativação, no intuito de verificar se o estadiamento da lesão cervical pode influenciar no processo de diferenciação destas células e se diferentes protocolos de ativação poderiam resultar em células dendríticas com maior fenótipo de maturação. Um total de 83 mulheres foi incluído neste estudo, destas pacientes foi coletado o sangue periférico para obtenção de células mononucleares que foram submetidas a três diferentes protocolos de diferenciação. No protocolo I, utilizou-se o GM-CSF, a IL-4 e o TNF- $\alpha$ , para diferenciação de monócitos em células dendríticas. No protocolo II, os monócitos foram diferenciados a partir do estímulo com GM-CSF, IL-4 e TNF- $\alpha$  e, posteriormente, co-estimuladas com células não-aderentes estimuladas com LPS. No protocolo III, as células mononucleares do sangue periférico foram estimuladas com GM-CSF, IL-4 e TNF- $\alpha$  para diferenciação de células dendríticas e, posteriormente, co-estimuladas com células mononucleares estimuladas com LPS. As células dendríticas diferenciadas foram avaliadas quanto à expressão de marcadores de superfície e moléculas co-estimulatórias e o sobrenadante da cultura foi avaliado para a presença de citocinas. Nosso estudo revelou que o processo de diferenciação e ativação das células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico de pacientes com câncer cervical invasivo está prejudicado, uma vez que observamos uma redução significativa da expressão de CD209. Os resultados observados a partir da comparação entre os protocolos utilizados revelaram também que o estímulo com LPS é capaz de induzir uma melhor diferenciação das células dendríticas ativadas com TNF- $\alpha$ , obtidas de pacientes com diagnóstico de LSIL e HSIL. Além disso, observamos também que o LPS é capaz de induzir um aumento significativo da expressão de CD86 e HLA-DR da produção de IL-12, importantes para a diferenciação do perfil de resposta imune antitumoral Th1. A presença de células não aderentes na cultura de células dendríticas parece ser essencial para seu processo de diferenciação, uma vez que sua remoção, no protocolo II, induziu uma redução significativa da expressão dos marcadores de superfície CD11c, CD86 e HLA-DR, e da síntese de IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-10. Assim, mais estudos tornam-se necessários para compreensão dos efeitos das células não aderentes e do estímulo com TNF- $\alpha$  associado ao LPS sobre o processo de diferenciação das células dendríticas. **Palavras-chave:** câncer cervical, lesão intraepitelial escamosa, células dendríticas, imunoterapia.

## ABSTRACT

The present study aimed to investigate the activation profile of monocyte-derived dendritic cells from patients with cervical intraepithelial lesions of varying degrees, undergoing three different activation protocols, in order to verify that the staging of cervical injury can influence on the process of differentiation of these cells and if different activation protocols could be result in dendritic cells with increased maturation phenotype. A total of 83 women were included in this study, of these were collected peripheral blood to obtained mononuclear cells witch were subjected to three different differentiation protocols. In protocol I was used GM-CSF, IL-4 and TNF- $\alpha$ , for the differentiation of monocytes into dendritic cells. In protocol II, monocytes were differentiated by the stimulation with GM-CSF, IL-4 and TNF- $\alpha$  and then co-stimulated with non-adherent cells stimulated with LPS. In protocol III, mononuclear cells from peripheral blood were stimulated with GM-CSF, IL-4 and TNF- $\alpha$  for the differentiation of dendritic cells and then co-stimulated with mononuclear cells stimulated by LPS. The differentiated dendritic cells were evaluated for the expression of surface markers and co-stimulatory molecules and the culture supernatant was assessed for the presence of cytokines. Our study revealed that the process of differentiation and activation of dendritic cells differentiated from peripheral blood monocytes of patients with invasive cervical cancer is impaired, since we observed a significant decrease in expression of CD209. The results observed from the comparison between the protocols used also revealed that stimulation with LPS is capable of inducing a better differentiation of dendritic cells activated with TNF- $\alpha$ , obtained from patients with LSIL and HSIL. In addition, we also observed that LPS is capable of inducing a significant increase of CD86 and HLA-DR expression and of IL-12 production, are so important for the differentiation of Th1 anti-tumor immune response profile. The presence of non-adherent cells in the culture of dendritic cells appears to be essential for their differentiation, since their removal on protocol II, induced a significant reduction of the expression of surface markers CD11c, CD86 and HLA-DR, and IL-12, TNF- $\alpha$  and IL-10 synthesis. Thus, more studies are required to understand the effects of non-adherent cells and stimulation with TNF- $\alpha$  associated with LPS on the process of differentiation of dendritic cells. **Keywords:** cervical cancer, squamous intraepithelial lesion, dendritic cell, immunotherapy.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Apresentação de antígenos e diferenciação de linfócitos T efetores.....	25
<b>Figura 2-</b>	Separação de leucócitos a partir do sangue total contendo anticoagulante.....	38
<b>Figura 3-</b>	Células dendríticas cultivadas em garrafas contendo meio IMDM completo.....	39
<b>Figura 4-</b>	Cultura de Células Dendríticas Protocolo II.....	40
<b>Figura 5-</b>	Representação do desenho experimental.....	43
<b>Figura 6-</b>	Perfil de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico através da citometria de fluxo.....	45
<b>Figura 7-</b>	Expressão de CD11c em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo I.....	46
<b>Figura 8-</b>	Expressão de CD123 em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo I.....	47
<b>Figura 9-</b>	Co-expressão de CD11c e CD123 em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo I.....	47
<b>Figura 10-</b>	Expressão de HLA-DR em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo I.....	48
<b>Figura 11-</b>	Expressão de CD209 em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo I.....	49
<b>Figura 12-</b>	Concentração de citocinas do perfil Th1 secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas de pacientes com LSIL, HSIL, câncer cervical invasivo e de pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo	

	I.....	50
<b>Figura 13-</b>	Concentração de citocinas do perfil Th2 secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas de pacientes com LSIL, HSIL, câncer cervical invasivo e de pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo I.....	51
<b>Figura 14-</b>	Concentração de TGF- $\beta$ , característica do perfil Treg, secretado no sobrenadante da cultura de células dendríticas de pacientes com LSIL, HSIL, câncer cervical invasivo e de pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo I.....	52
<b>Figura 15-</b>	Expressão de CD11c em DCs diferenciadas de acordo com protocolo II.....	53
<b>Figura 16-</b>	Expressão de CD123 em DCs diferenciadas de acordo com protocolo II.....	53
<b>Figura 17-</b>	Co-expressão de CD11c e CD123 em DCs diferenciadas de acordo com protocolo II.....	54
<b>Figura 18-</b>	Expressão de HLA-DR em DCs diferenciadas de acordo com protocolo II.....	55
<b>Figura 19-</b>	Expressão de CD209 em DCs diferenciadas de acordo com protocolo II.....	55
<b>Figura 20-</b>	Concentração de citocinas do perfil Th1 secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas de pacientes LSIL, HSIL e de pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo II.....	56
<b>Figura 21-</b>	Concentração de citocinas do perfil Th2 secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas de pacientes com LSIL, HSIL e de pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo II.....	57
<b>Figura 22-</b>	Concentração de TGF- $\beta$ , característica do perfil Treg, secretado no sobrenadante da cultura de células dendríticas de pacientes com LSIL, HSIL e pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo II.....	58
<b>Figura 23-</b>	Expressão de CD11c em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo III.....	59

<b>Figura 24-</b>	Expressão de CD123 em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo III.....	59
<b>Figura 25-</b>	Co-expressão de CD123 e CD11c em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo III.....	60
<b>Figura 26-</b>	Expressão de HLA-DR em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo III.....	60
<b>Figura 27-</b>	Expressão de CD209 em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo III.....	61
<b>Figura 28-</b>	Concentração de citocinas do perfil Th1 secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas de pacientes LSIL, HSIL e de pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo III.....	62
<b>Figura 29-</b>	Concentração de citocinas do perfil Th2 secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas de pacientes com LSIL, HSIL e de pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo III.....	63
<b>Figura 30-</b>	Concentração de TGF- $\beta$ , característica do perfil Treg, secretado no sobrenadante da cultura de células dendríticas de pacientes com LSIL, HSIL e pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo III.....	64
<b>Figura 31-</b>	Comparação da expressão dos marcadores CD11c, HLA-DR, CD80 e CD86 em DCs diferenciadas obtidas de pacientes com LSIL, HSIL e pacientes controles diferenciadas de acordo com os protocolos I, II e III.....	66
<b>Figura 32-</b>	Figura 32: Citocinas secretadas no sobrenadante da cultura de DCs diferenciadas de acordo com os protocolos I, II e III.....	69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Descrição dos Grupos Estudados.....	36
<b>Tabela 2</b>	Marcações Extracelulares para DCs diferenciadas <i>in vitro</i> .....	41
<b>Tabela 3</b>	Análise das células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos de pacientes com LSIL, HSIL, câncer cervical invasivo e pacientes controles.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
μL	Microlitro
APC	<i>Allophycocyanin</i>
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
CCL	Quimiocina
CCR	Receptor de Quimiocina
CD	Cluster of Differentiation (Molécula de Superfície)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHP	Complexo de Histocompatibilidade Principal
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO <sub>2</sub>	Gás Carbônico
DCs	<i>Dendritic Cells</i> (Células Dendríticas)
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
Fas	Receptor de Morte Programada
FasL	Ligante do Receptor de Morte Programada
FITC	<i>Fluorescein Conjugate</i>
Flt3L	Tirosina Quinase 3 Semelhante a FMS ligante
g/L	Gramas por Litro
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos
HEV	<i>High Endothelial Venules</i> (Vênulas Endoteliais Altas)

HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano de classe II
HPV	Papilomavírus Humano
HSIL	Lesões Intraepiteliais Escamosas de Alto Grau
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
iDCs	Células Dendríticas Imaturas
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LFA	Antígeno Associado à Função Leucocitária
LPS	Lipopolissacarídeo
LSIL	Lesões Intraepiteliais Escamosas de Baixo Grau
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MoDCs	Células Dendríticas derivadas de Monócitos
NK	<i>Natural Killer</i> (Assassinas Naturais)
NFκB	Fator nuclear Kappa B
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NOD	Receptores de Domínio de Oligomerização de ligação de Nucleotídeos
OX40	Membro 4 da Superfamília de Receptores do Fator de Necrose Tumoral
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato

PD-1	Receptor de Morte Programada 1
PD-L1/2	Ligante do Receptor de Morte Programada 1
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PerCP	<i>Peridinin chlorophyll protein complex</i>
pg/mL	Picogramas por mililitro
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TCR	Receptor da Célula T
TGF	Fator de Crescimento Transformador
Th	<i>T helper</i> (T auxiliaries)
TMB	<i>Tetramethylbenzidine</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TLR	Receptores semelhantes à <i>Toll</i>
Treg	Linfócitos T reguladores
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
UI	Unidades Internacionais
xg	Força Centífuga Relativa
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1</b>	<b>Câncer Cervical – Epidemiologia e Classificação.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2</b>	<b>Resposta Imune ao Tumor.....</b>	<b>20</b>
<b>1.3</b>	<b>Papel das Células Dendríticas na Resposta Imune aos Tumores.....</b>	<b>21</b>
<i>1.3.1</i>	<i>Células Dendríticas – Origem e Diferenciação.....</i>	<i>21</i>
<i>1.3.2</i>	<i>Captura e Processamento de Antígenos.....</i>	<i>22</i>
<i>1.3.3</i>	<i>Migração para os órgãos linfóides e Maturação.....</i>	<i>23</i>
<i>1.3.4</i>	<i>Apresentação de Antígenos e Ativação dos Linfócitos T.....</i>	<i>24</i>
<i>1.3.5</i>	<i>Diferenciação dos Linfócitos T Efetores.....</i>	<i>26</i>
<i>1.3.6</i>	<i>Células Efetoras da Imunidade Inata.....</i>	<i>28</i>
<b>1.4</b>	<b>Imunoterapia com Células Dendríticas.....</b>	<b>28</b>
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>32</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>34</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Casuística.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>Critérios de Inclusão.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3</b>	<b>Critérios de Exclusão.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4</b>	<b>Obtenção de Células Mononucleares.....</b>	<b>37</b>

<b>4.5</b>	<b>Cultura e Diferenciação de Células Dendríticas.....</b>	<b>38</b>
4.5.1	<i>Protocolo I.....</i>	38
4.5.2	<i>Protocolo II.....</i>	39
4.5.3	<i>Protocolo III.....</i>	40
<b>4.6</b>	<b>Avaliação das Moléculas de Superfície por Citometria de Fluxo.....</b>	<b>40</b>
<b>4.7</b>	<b>Dosagem de Citocinas por ELISA.....</b>	<b>41</b>
<b>4.8</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>42</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>5.1</b>	<b>Perfil de ativação das células dendríticas – Protocolo I.....</b>	<b>45</b>
5.1.1	<i>Expressão da molécula CD11c.....</i>	46
5.1.2	<i>Expressão da molécula CD123.....</i>	46
5.1.3	<i>Co-expressão das moléculas CD11c e CD123.....</i>	47
5.1.4	<i>Expressão da molécula HLA-DR.....</i>	48
5.1.5	<i>Expressão da molécula CD209.....</i>	48
<b>5.2</b>	<b>Produção de citocinas – Protocolo I .....</b>	<b>49</b>
5.2.1	<i>Citocinas do perfil Th1.....</i>	49
5.2.2	<i>Citocinas do perfil Th2.....</i>	51
5.2.3	<i>Citocinas do perfil Treg.....</i>	51
<b>5.3</b>	<b>Perfil de ativação das células dendríticas – Protocolo II.....</b>	<b>52</b>
5.3.1	<i>Expressão da molécula CD11c.....</i>	52
5.3.2	<i>Expressão da molécula CD123.....</i>	53
5.3.3	<i>Co-expressão das moléculas CD11c e CD123.....</i>	54

5.3.4	<i>Expressão da molécula HLA-DR.....</i>	54
5.3.5	<i>Expressão da molécula CD209.....</i>	55
<b>5.4</b>	<b>Produção de citocinas – Protocolo II.....</b>	<b>56</b>
5.4.1	<i>Citocinas do perfil Th1.....</i>	56
5.4.2	<i>Citocinas do perfil Th2.....</i>	57
5.4.3	<i>Citocinas do perfil Treg.....</i>	57
<b>5.5</b>	<b>Perfil de ativação das células dendríticas – Protocolo III.....</b>	<b>58</b>
5.5.1	<i>Expressão da molécula CD11c.....</i>	58
5.5.2	<i>Expressão da molécula CD123.....</i>	59
5.5.3	<i>Co-expressão das moléculas CD11c e CD123.....</i>	60
5.5.4	<i>Expressão da molécula HLA-DR.....</i>	60
5.5.5	<i>Expressão da molécula CD209.....</i>	61
<b>5.6</b>	<b>Produção de citocinas – Protocolo III.....</b>	<b>61</b>
5.6.1	<i>Citocinas do perfil Th1.....</i>	61
5.6.2	<i>Citocinas do perfil Th2.....</i>	62
5.3.3	<i>Citocinas do perfil Treg.....</i>	62
<b>5.7</b>	<b>Comparação entre os protocolos utilizados.....</b>	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>72</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>81</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>83</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>93</b>

# ***INTRODUÇÃO***

---

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Câncer Cervical – Epidemiologia e Classificação

O câncer do colo do útero, também conhecido como câncer cervical, é o quarto tipo de neoplasia mais comum entre as mulheres em todo o mundo, sendo considerado um importante problema de saúde pública mundial. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO – *World Health Organization*), no ano de 2012, esta neoplasia foi responsável pelo óbito de 266 mil mulheres em todo o mundo, sendo que aproximadamente 87% destes óbitos ocorreram nos países menos desenvolvidos. Estima-se que, no ano de 2015, sejam diagnosticados 12.900 novos casos deste tipo de câncer nos Estados Unidos, com risco estimado de 4.100 óbitos de mulheres neste país (FERLAY et al., 2014; INCA, 2016; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015; WHO, 2015).

No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2016, válidas também para o ano de 2017, espera-se o diagnóstico de 16.340 novos casos de câncer cervical, estimando-se a ocorrência de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres. Neste país, o câncer do colo do útero é o terceiro mais frequente na população feminina, sendo considerado o mais frequente na região Norte e o segundo mais incidente nas regiões Centro-Oeste e Nordeste (INCA, 2016).

O câncer do colo do útero desenvolve-se a partir de lesões precursoras pré-malignas, caracterizadas pelo desenvolvimento de atipias celulares, presença de imaturidade e desorganizações celulares, anormalidades nucleares, aumento da atividade mitótica e grande potencial para malignidade (APGAR; ZOSCHNICK, 2003; DE VILLIERS et al., 2004).

Estas alterações foram denominadas, no ano de 1967, como Neoplasias Intraepiteliais Cervicais, podendo ser classificadas em três graus distintos, como NIC I, NIC II e NIC III (RICHART, 1967). De acordo com o grau de comprometimento citológico, estas alterações podem também ser classificadas como Lesões Intraepiteliais Escamosas de Baixo Grau (LSIL), que incluem o NIC I ou displasia leve, o condiloma e a coilocitose, e como Lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL), que incluem NIC II e NIC III, displasia moderada ou severa e o carcinoma *in situ* (APGAR; ZOSCHNICK, 2003).

O câncer cervical e suas lesões precursoras são decorrentes da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), que é transmitido através do contato com a pele e mucosas de indivíduos infectados, sendo o contato sexual seu principal meio de transmissão (BURCHELL et al., 2006;

INCA, 2016; ZUR HAUSEN, 2009). Embora a infecção pelo HPV seja considerada a principal causa de câncer do colo do útero, apenas em cerca de 10% dos casos as pacientes com infecção por este vírus evoluem para lesões de alto grau ou câncer cervical. Diversos co-fatores têm sido relacionados ao desenvolvimento da doença, incluindo o uso de contraceptivos hormonais, tabagismo, multiparidade, co-infecção com outros agentes sexualmente transmissíveis ou outros tipos de HPV, hormônios endógenos, fatores genéticos e imunossupressão (BOSCH; SANJOSÉ, 2007; INSINGA et al., 2011; MUÑOZ et al., 2003).

Grande parte das infecções pelo HPV regride espontaneamente através da ativação de uma resposta imune antiviral, mediada principalmente pelo sistema imune adaptativo do hospedeiro. Cerca de 2 a 3 anos são necessários para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais escamosas de baixo e/ou alto grau, sendo que, se não tratada, um terço destas lesões podem evoluir para carcinoma invasivo em até dez anos (DENIS; HANZ; ALAIN, 2008; INSINGA et al., 2011).

## **1.2. Resposta Imune ao Tumor**

De acordo com a teoria da vigilância imunológica, proposta no ano de 1909, pelo imunologista alemão Paul Ehrlich e consolidada no ano de 1957, pelos pesquisadores Sir MacFarlane Burnet e Lewis Thomas, o sistema imune é responsável pelo monitoramento e controle do desenvolvimento de células precursoras tumorais, visto que as células imunes são capazes de reconhecer e eliminar clones de células mutadas antes que elas se desenvolvam em tumores (BURNET, 1957; FERRANTINI; CAPONE; BELARDELLI, 2008; THOMAS, 1982).

Estudos publicados recentemente, avaliando modelos animais ou pacientes imunodeficientes ou imunossuprimidos comprovam o importante papel do sistema imune neste controle do crescimento tumoral. Como, por exemplo, o estudo realizado por Shankaran e colaboradores, que demonstrou uma maior frequência no desenvolvimento de tumores espontâneos e tumores induzidos por carcinógenos em camundongos deficientes para linfócitos T e B ou para a via de sinalização do interferon gama do que outros tipos de camundongos (SHANKARAN et al., 2001).

As interações entre o sistema imune e o tumor são complexas e envolvem diversas linhagens celulares e mediadores, tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa, que atuam de forma integrada para a defesa do hospedeiro contra as células neoplásicas (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006; DOUGAN; DRANOFF, 2009).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos e células tumorais. Esta resposta é rapidamente induzida, não-específica e representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, moléculas solúveis e células especializadas, como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células natural killer (NK) (LEHRNBECHER et al., 2008; SHI et al., 2003).

A resposta imune adaptativa, também conhecida como adquirida, está relacionada ao desenvolvimento de uma defesa mais elaborada e tardia contra as células tumorais. Esta resposta é mediada, principalmente, pelos linfócitos T e B, que diferem das células do sistema imune inato pela expressão de receptores antigênicos, produzidos a partir de rearranjos genéticos, que lhes conferem um repertório de ação mais vasto (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006).

### **1.3. Papel das Células Dendríticas na Resposta Imune aos Tumores**

#### *1.3.1. Células Dendríticas – Origem e Diferenciação*

As células dendríticas (DCs, do inglês “*Dendritic Cells*”) fazem parte do sistema imune inato e são conhecidas como células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais. Estas células podem ser encontradas na maioria dos tecidos periféricos onde atuam sobre a iniciação e modulação da resposta imune durante infecções por patógenos, na auto-imunidade e no desenvolvimento de respostas imunes antitumorais (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; SCHLITZER et al., 2015; STEINMAN; COHN, 1973).

As DCs foram identificadas pela primeira vez no ano de 1968, em amostras de tecido cutâneo, pelo patologista alemão Paul Langerhans, sendo então nomeadas como células de Langerhans. Posteriormente, no ano de 1973, estas células também foram observadas em tecidos linfóides periféricos, pelos pesquisadores Steinman e Cohn, e desde então são consideradas fundamentais para a compreensão da resposta imunológica (LANGERHANS, 1868; RADFORD; TULLETT; LAHOUD, 2014; STEINMAN; COHN, 1973).

Com exceção das DCs foliculares, que são de origem mesenquimal, as DCs se diferenciam a partir de precursores hematopoiéticos pluripotentes, cujo marcador celular é a molécula CD34 (CD – do inglês, *Cluster of Differentiation*), localizados na medula óssea. Estes precursores apresentam duas vias distintas de diferenciação: a via mieloide que dá origem às células dendríticas mieloides, incluindo as células de Langerhans, as DCs dermais e as DCs intersticiais, caracterizadas pela expressão do marcador mieloide CD11c, e a via linfóide, que gera as células dendríticas

plasmocitóides, caracterizadas pela expressão do marcador celular CD123 (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; NIEROP; GROOT, 2002; PULENDRAN et al., 1999).

Além disso, em condições inflamatórias ou infecciosas, as células dendríticas podem se diferenciar a partir de monócitos do sangue periférico sob estímulo do GM-CSF (do inglês - *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) e da interleucina 4 (IL-4). Estas DCs são conhecidas como MoDCs, e podem ser também diferenciadas *in vitro* em meio condicionado (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; MA et al., 2013; SEGURA et al., 2013).

As células dendríticas mieloides, também conhecidas como células dendríticas convencionais (cDC), parecem estar relacionadas ao estímulo de uma resposta imune antitumoral através da ativação de linfócitos T CD8+. Contrariamente, as pDCs são importantes na resposta imune antiviral e nos processos auto-imunes, estando relacionadas ao desenvolvimento de tolerância imunológica tumoral e sua presença geralmente está associada a um mau prognóstico (DEMOULIN et al., 2013; KADOWAKI et al., 2001; SAWANT et al., 2012).

### 1.3.2. Captura e Processamento de Antígenos

As células dendríticas produzidas na medula óssea são transportadas a partir da corrente sanguínea para diferentes tecidos em uma forma imatura, conhecida como DCs imaturas (iDCs), caracterizadas pela grande capacidade de capturar e processar antígenos, entretanto, como apresentam pouca ou nenhuma expressão de moléculas co-estimulatórias, como CD40, CD80 e CD86, as iDCs possuem capacidade diminuída de ativação dos linfócitos T (KELLEHER; KNIGHT, 1998; SCHWARTZ, 1990).

Além da expressão dos receptores de quimiocinas CCR1 e CCR3, que medeiam a migração das células dendríticas da medula óssea para os tecidos periféricos, as iDCs ainda expressam diversos receptores relacionados ao processo de captura de antígenos, incluindo os receptores de reconhecimento de padrões, receptores para imunoglobulinas e receptores do complemento (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; FIGDOR; KOOYK; ADEMA, 2002; GORDON; WILLIAM, 2002; HART, 1997).

Dentre os receptores de reconhecimento de padrões incluem-se os receptores semelhantes à NOD, que reconhecem peptídeos bacterianos localizados no citoplasma das DCs, os receptores de lectina do tipo C, incluindo o CD209 (DC-SIGN) e o CD205, que estão relacionados ao reconhecimento e internalização de antígenos, à ativação das vias de sinalização intracelular,

principalmente a do fator nuclear de transcrição Kappa B (NF $\kappa$ B) e à indução da expressão de citocinas envolvidas no processo de polarização dos linfócitos T auxiliares, e os receptores semelhantes à *Toll* (TLR) (HEATH et al., 2004; KANAZAWA, 2007).

Os receptores TLR são proteínas transmembranares localizadas tanto na superfície celular quanto em compartimentos endossomais. Estes receptores estão relacionados ao reconhecimento de antígenos e à maturação e ativação das DCs, uma vez que a ativação destes receptores pelos seus ligantes específicos induz a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$ ), quimiocinas, moléculas de adesão, moléculas co-estimulatórias e moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (CHP), também conhecido como antígeno leucocitário humano (HLA) (HEATH et al., 2004; TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003).

Os antígenos capturados pelas iDCs, são clivados em pequenos fragmentos e podem ser processados através de três vias distintas: a via endocítica, na qual os antígenos extracelulares são complexados a moléculas de CHP de classe II, a via citosólica, em que os antígenos intracelulares são complexados à moléculas de CHP de classe I e, por fim, os antígenos lipídicos, que são acoplados a moléculas de CD1 (GERMAIN, 1994; PRIGOZY et al., 2001).

O complexo peptídeo-CHP formado é então transportado para a membrana citoplasmática, onde são apresentados aos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, via CHP de classe I, e aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, via CHP de classe II. Uma característica importante das DCs é a capacidade de mediar a ativação da resposta imune celular, tanto de linfócitos T CD4<sup>+</sup> quanto CD8<sup>+</sup>, para um mesmo antígeno exógeno, fenômeno conhecido como “cross-priming”, proposto por Bevan no ano de 1975 (ACKERMAN; CRESSWELL, 2004).

### *1.3.3. Migração para os órgãos linfóides e Maturação*

O reconhecimento e captura dos antígenos resulta em alterações fenotípicas e funcionais das iDCs, culminando na completa maturação destas células. Diversos fatores estão relacionados a esta maturação, incluindo o reconhecimento de produtos microbianos como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e ácidos nucleicos, e a secreção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  e as prostaglandinas (BANCHEREAU et al., 2000).

Durante este processo de maturação, as iDCs perdem as moléculas associadas ao reconhecimento de antígenos e passam a apresentar, em sua superfície, moléculas de CHP e moléculas relacionadas à adesão e à co-estimulação, como CD40, CD58, CD80 e CD86. Além

disso, estas células tornam-se capazes de secretar citocinas, como a IL-1, IL-6, IL-18 e IL-23, importantes no processo de ativação dos linfócitos T (PALUCKA; BANCHEREAU, 2012; RANDOLPH; SANCHEZ-SCHMITZ; ANGELI, 2005).

Outro processo observado durante a maturação das DCs é a diminuição da expressão dos receptores de quimiocinas CCR1 e CCR5 e o aumento de expressão de CCR7, que se liga às quimiocinas CCL21, expressa pelas células endoteliais dos vasos linfáticos, pelas vênulas endoteliais altas (HEV – do inglês: *high endothelial venules*) e pelas células estromais presentes nas zonas de células T nos linfonodos e à CCL19, produzida por DCs maduras, células do estroma e pelos tecidos linfonodais (RANDOLPH, 2001; YANAGIHARA et al., 1998).

Estas quimiocinas direcionam a migração das células dendríticas para os órgãos linfóides periféricos através dos vasos linfáticos aferentes bem como o recrutamento de linfócitos T virgens e de memória, que também expressam o receptor de quimiocina CCR7, através das HEV, para a zona de células T dos gânglios linfáticos regionais, onde ocorre o processo de apresentação de antígenos e a interação entre estes dois tipos celulares (MARTIN-FONTECHA et al., 2003; RANDOLPH, 2001).

#### *1.3.4. Apresentação de Antígenos e Ativação dos Linfócitos T*

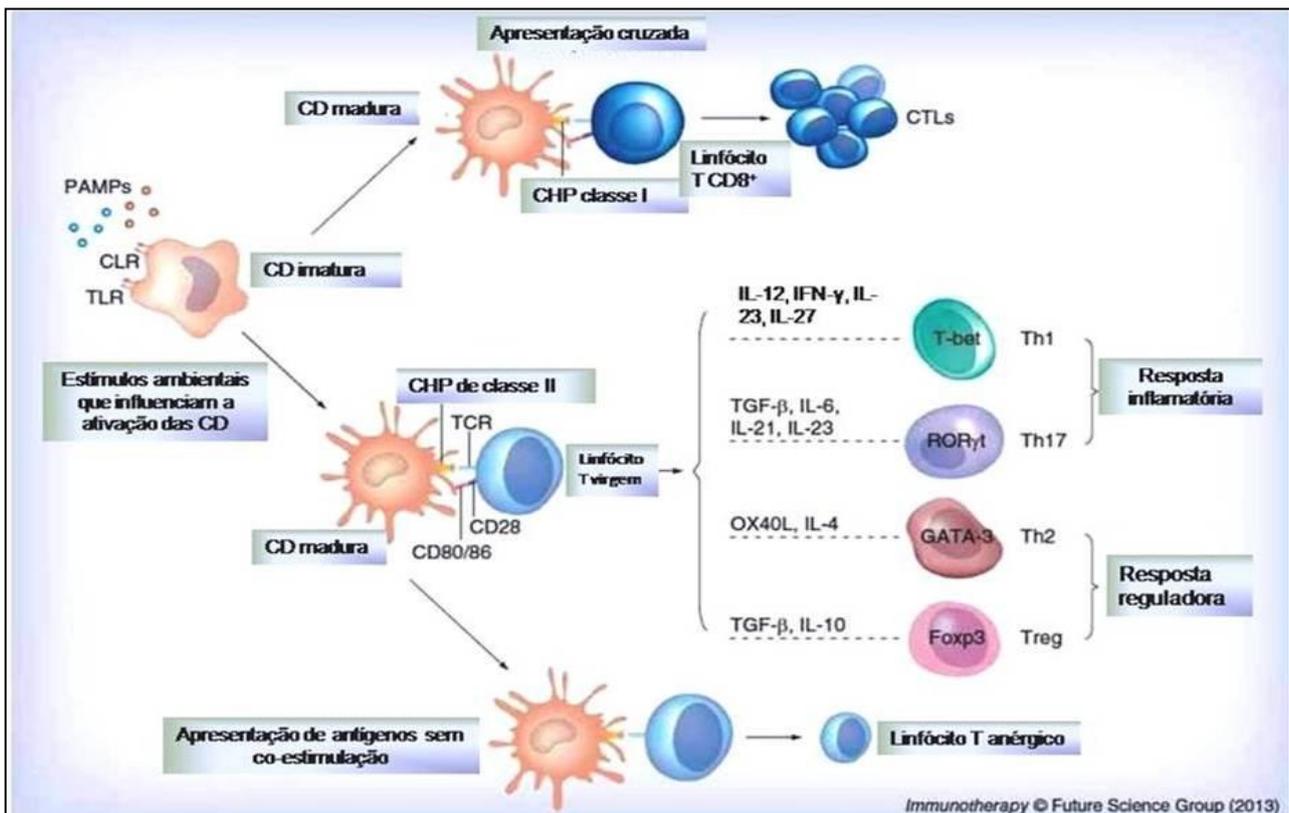
Nos linfonodos, as DCs maduras são capazes de induzir a diferenciação de linfócitos T efetores antígeno específicos com diferentes funções. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> podem se diferenciar em células T auxiliares dos perfis Th1, Th2, Th17 e Treg. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> diferenciam-se em linfócitos T citotóxicos. Além disso, as células dendríticas podem mediar diretamente e indiretamente, através da ativação de linfócitos T auxiliares, à ativação dos linfócitos B (figura 1) (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; STEINMAN; BANCHEREAU, 2007; STEINMAN; COHN, 1973).

A ativação e diferenciação dos linfócitos T têm início após o reconhecimento, pelos receptores de células T (TCR) antígeno-específicos, dos peptídeos associados ao CHP expressos pelas células dendríticas. Além disso, esta ativação é dependente da interação entre moléculas de adesão e co-estimulatórias expressas pelas células dendríticas maduras, com seus ligantes específicos expressos pelos linfócitos T (BANCHEREAU et al., 2000), incluindo as moléculas de adesão ICAM-1/LFA-1 e LFA-3/CD2, e, também, o receptor de ICAM-3, denominado DC-SIGN ou CD209, expresso pelas células dendríticas. Estas moléculas desempenham um importante papel

no estabelecimento do primeiro contato entre as DCs e os linfócitos T virgens (GEIJTENBEEK et al., 2000).

As primeiras moléculas co-estimulatórias caracterizadas foram o CD80 e o CD86, expressos pelas DCs maduras, e seu ligante correspondente CD28, expresso pelos linfócitos T virgens (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; HART, 1997). A interação entre estas moléculas, juntamente com os sinais gerados pela interação entre o TCR e o peptídeo associado ao CHP, resultam no aumento da proliferação e da sobrevivência dos linfócitos T (BOISE et al., 1995; SHAHINIAN et al., 1993).

**Figura 1: Apresentação de antígenos e diferenciação de linfócitos T efetores.** As células dendríticas imaturas são capazes de reconhecer e capturar antígenos estranhos. Depois de capturá-los, as DCs passam pelo processo de maturação e migram para os linfonodos onde apresentam os antígenos capturados para os linfócitos T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$  virgens. Para ativação dos linfócitos T  $CD4^+$  é necessário, além da ligação do CHP da DCs com o TCR do linfócito T, a interação de moléculas co-estimulatórias e a secreção de citocinas pelas DCs maduras. A ausência de moléculas co-estimulatórias está relacionada ao desenvolvimento de linfócitos T anérgicos.



Fonte: adaptado de (KERKHOFF et al., 2013).

Além disso, diversos receptores pertencentes à família do TNF estão relacionados ao processo de ativação das células T, incluindo o CD40 e o CD40 ligante, o OX40 e o OX40 ligante,

e o RANK e o RANK ligante. A interação entre o CD40 presente nas DCs e o CD40L expresso pelos linfócitos T promove a ativação das DCs e o aumento da expressão das moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 e da produção de citocinas, incluindo a IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-12 e quimiocinas por estas células (GREWAL; FLAVELL, 1996; NOELLE, 1996; VAN KOOTEN; BANCHEREAU, 2000).

A interação entre o OX40L presente nas células dendríticas e o OX40 expresso pelos linfócitos, está relacionada à promoção da proliferação e ao aumento da produção de IL-4 e do receptor de quimiocina CXCR-5 pelos linfócitos T. Enquanto que a ligação entre o RANK e seu ligante RANKL, expresso por linfócitos T ativados, induz a produção das citocinas IL-1, IL-6 e IL-12 pelas células dendríticas, levando ao aumento da sobrevivência destas células e, conseqüentemente, da proliferação das respostas dos linfócitos T (ANDERSON et al., 1997; BANCHEREAU et al., 2000).

Ademais, as células dendríticas maduras podem ainda expressar os ligantes PD-L1 e PD-L2 que se ligam ao receptor de morte celular programada-1 (PD-1), expresso pelos linfócitos T. A interação destes receptores exerce efeito inibitório sobre os processos de proliferação e produção de citocinas pelos linfócitos T (LIPSCOMB; MASTEN, 2002).

Outros fatores relacionados à diferenciação dos linfócitos T virgens em linfócitos T efetores são as características e concentrações antigênicas, a natureza e a quantidade de moléculas co-estimulatórias, o estado de maturação e quantidade de DCs que migram para os gânglios linfáticos e a produção de citocinas, incluindo o IFN- $\gamma$ , IL-12, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10 e IL-6 (BOONSTRA et al., 2002; JONG et al., 2002; MOSER; MURPHY, 2000; TANAKA et al., 2000).

### *1.3.5. Diferenciação dos Linfócitos T Efetores*

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, também chamados de citotóxicos, são os principais mediadores da eliminação das células tumorais. Estas células são ativadas mediante a apresentação de antígenos associados ao CHP de classe I, de moléculas co-estimulatórias como o CD80 e CD70, bem como por citocinas, tais como IL-12 e IL-15, que são expressos pelas APCs, principalmente as células dendríticas. Uma vez ativadas, estas células são capazes de mediar a eliminação das células alvo através da produção de IFN- $\gamma$ , enzimas líticas, incluindo a perforina e granzimas, e pela indução de apoptose através da ligação entre os receptores de morte celular programada Fas-FasL (CHEN et al., 1992; GUERMONPREZ et al., 2003; SHUFORD et al., 1997; WALDMANN, 2006).

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, ou T *helper* (Th), são ativados mediante a apresentação de peptídeos via CHP de classe II. Além de seu papel na ativação dos linfócitos citotóxicos, as células T CD4<sup>+</sup> são capazes de produzir citocinas que, por sua vez, promovem a ativação de outras células do sistema imune (CORTHAY et al., 2005).

Dependendo do estímulo de ativação e maturação das células dendríticas, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> podem se diferenciar em quatro subpopulações distintas, conhecidas como Th1, Th2, Th17 e T reguladoras (Treg). Produtos microbianos como o LPS e RNA de dupla fita, bem como o CD40 ligante e o IFN- $\gamma$ , estimulam a produção de IL-12 pelas células dendríticas, citocina relacionada à polarização de linfócitos T virgens para o perfil Th1. Em contrapartida, fatores como a prostaglandina E2, a IL-4 e o OX40 ligante inibem a expressão da IL-12, direcionando a ativação de linfócitos T para o perfil Th2 (BRADLEY, 2003; LIU, 2001).

Os linfócitos Th1 caracterizam-se pela síntese de citocinas inflamatórias como a IL-2 e o IFN- $\gamma$ . A principal função da IL-2 é a auto-regulação da proliferação dos linfócitos T, além disso, tanto a IL-2 quanto o IFN- $\gamma$ , regulam a ativação de outros leucócitos, incluindo linfócitos T CD8<sup>+</sup>, células NK e macrófagos, principais mediadores da destruição das células neoplásicas (CORTHAY et al., 2005; PARDOLL; TOPALIAN, 1998).

Em contrapartida, os linfócitos Th2 e Treg estão relacionados à inibição da diferenciação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, células NK, macrófagos, induzindo inclusive um estado imune que favorece o crescimento tumoral, mediante a produção das citocinas TGF- $\beta$ , pelas células Treg, e de IL-4 e IL-10 pelos linfócitos Th2 (BANCHEREAU et al., 2000; FUKAURA et al., 1996; RONCAROLO, 2001; SASAKI et al., 2008).

Os linfócitos Th17 estão relacionados à promoção de respostas imunológicas contra microorganismos extracelulares, como bactérias e fungos, através da produção da citocina IL-17, que promove o recrutamento de monócitos e neutrófilos, estando também associados ao desenvolvimento de algumas doenças autoimunes (CHEN et al., 2007).

As células dendríticas CD11c<sup>+</sup> diferenciadas a partir de monócitos humanos induzem, predominantemente, a diferenciação dos linfócitos T virgens em linfócitos T efetores do perfil Th1 através da produção de IL-12, enquanto que células dendríticas CD11c<sup>-</sup> induzem, prevalentemente, respostas do perfil Th2. Células dendríticas provenientes de camundongos deficientes de IL-12 não são capazes de induzir respostas do perfil Th1, sugerindo um importante papel desta citocina na polarização de linfócitos Th1 (BANCHEREAU et al., 2000; MALDONADO-LÓPEZ et al., 1999).

### *1.3.6. Células Efetoras da Imunidade Inata*

As células dendríticas também atuam sobre a ativação de células efetoras da imunidade inata, especialmente as células NK. As células NK exercem importante papel no reconhecimento e eliminação de células tumorais. Estas células podem ser ativadas pela ação de citocinas produzidas por DCs, como o a IL-12 e o IFN- $\gamma$ , produzido por linfócitos T ativados, pelo reconhecimento de células neoplásicas que expressam moléculas de CHP de classe I em quantidade reduzida ou que expressam ligantes para receptores ativadores. Uma vez ativas, estas células induzem a lise das células tumorais através da secreção dos grânulos citoplasmáticos, que contêm granzima e perforina, ou induzem a morte celular por apoptose através da ligação do receptor FasL presente nas células NK com o receptor Fas das células tumorais (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006; ENZLER et al., 2003; GELLER; MILLER, 2011; SUTLU; ALICI, 2009).

Os macrófagos também auxiliam no combate às células tumorais, podendo ser ativados pelo reconhecimento de antígenos expressos pelas células tumorais ou, indiretamente, pela produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T específicos e pelas células NK, ativadas pelas DCs. Após sua ativação, os macrófagos secretam diferentes citocinas, espécies reativas do oxigênio, óxido nítrico e enzimas lisossomais que auxiliam na destruição das células neoplásicas. Além disso, estas células também sintetizam TNF- $\alpha$ , citocina responsável pela ativação de caspases que mediam a apoptose das células tumorais (DUDLEY et al., 2002; MACCALLI; SCARAMUZZA; PARMIANI, 2009; SICA et al., 2008).

A compreensão das funções das DCs no desenvolvimento tumoral e na indução de uma resposta imune antitumoral eficiente pode representar um importante campo para investigação, sendo que sua capacidade de modular a ativação tanto da resposta imune celular quanto da resposta imune humoral faz das DCs candidatas centrais no desenvolvimento de novas técnicas imunoterapêuticas (PALUCKA; BANCHEREAU, 2012).

## **1.4. Imunoterapia com Células Dendríticas**

A imunoterapia tumoral consiste na utilização de componentes do sistema imunológico para indução de respostas imunes antitumorais específicas, sem que haja danos às células normais e com efeitos colaterais reduzidos. Diversas estratégias terapêuticas têm sido desenvolvidas utilizando-se componentes tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa com o objetivo de promover a

eliminação ou a neutralização das células neoplásicas e dos fatores associados ao crescimento tumoral. Dentre estas estratégias podemos citar a vacinação antitumoral, a inibição da supressão imunológica, a transferência adotiva de células, especialmente de linfócitos, e a administração de citocinas que mediam a ativação das células da imunidade inata (RIETHER; SCHÜRCH; OCHSENBEIN, 2013).

As vacinas antitumorais têm por objetivo a mobilização e amplificação das respostas mediadas por células do sistema imune capazes de reconhecer e induzir a eliminação das células tumorais. Diversas vacinas têm sido desenvolvidas, incluindo vacinas baseadas em DNA, vacinas de células tumorais modificadas, proteínas recombinantes, de vetores virais e bacterianos e, por fim, de células dendríticas (FELTKAMP et al., 1993; PENG et al., 2004; TILLMAN et al., 2000).

A utilização das células dendríticas como estratégia terapêutica fundamenta-se em seu potencial de captar e apresentar antígenos tumorais promovendo a ativação de uma resposta imunológica antitumoral específica e intensa, especialmente através da ativação de linfócitos do perfil Th1, linfócitos T citotóxicos e de células NK (KOIDO et al., 2011).

Estas vacinas são desenvolvidas a partir de precursores de DCs, incluindo monócitos do sangue periférico e precursores pluripotentes CD34<sup>+</sup>, que são diferenciados e carregados com antígenos tumorais autólogos, permitindo a ativação de uma resposta imune direcionada e específica. A diferenciação dos monócitos em DCs imaturas ocorre mediante a incubação com GM-CSF e IL-4, enquanto que a incubação com Flt3L e TNF- $\alpha$  induz a maturação destas células (BANCHEREAU et al., 2001; DAUER et al., 2003).

As DCs diferenciadas e carregadas com o antígeno tumoral são injetadas no paciente e migram para os tecidos linfóides onde modulam a ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Uma vez ativados, os linfócitos T efetores migram para o tecido tumoral mediando à morte das células neoplásicas e a inibição do crescimento tumoral (SABADO; BHARDWAJ, 2010).

Um estudo publicado no ano de 2014 mostrou que DCs diferenciadas a partir de monócitos, pulsadas com a proteína p53 foram capazes de induzir o aumento do número de células T e da secreção de IFN- $\gamma$ , e a diminuição de linfócitos T regulatórios em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Especula-se, a partir destes estudos, que para aumentar a eficácia da vacina contra o câncer é necessário um forte estímulo para a maturação das DCs, uma vez que a indução da imunidade é observada apenas na presença de sinais co-estimulatórios adequados, provenientes de DCs maduras, caso contrário resulta em tolerância (HAWIGER et al., 2001; PALUCKA et al., 2010; SCHULER et al., 2014).

Rodrigues e colaboradores observaram, em um estudo publicado em 2011, que a imunoterapia com DCs autólogas resulta no aumento significativo da expressão de IL-2, TNF- $\alpha$  e IL-10 em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, e de IL-2 em linfócitos T CD8<sup>+</sup> (RODRIGUES et al., 2011). Outro estudo, publicado por Matias e colaboradores, demonstrou que esta vacina é capaz de ativar uma resposta imune sistêmica que resulta no aumento da produção de citocinas do perfil Th1, incluindo IL-12 e IFN- $\gamma$ , e na redução da síntese de citocinas do perfil Th2, como a IL-4 (MATIAS et al., 2013).

Embora a imunoterapia baseada na vacinação com células dendríticas tenha demonstrado resultados clínicos satisfatórios, sua eficácia parece restrita a alguns pacientes com diferentes tipos de neoplasias sendo necessário, portanto, o aperfeiçoamento das estratégias terapêuticas já desenvolvidas (KIRKWOOD et al., 2012; PALUCKA et al., 2010).

# ***JUSTIFICATIVA***

---

## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando-se que as células dendríticas são potencialmente capazes de modular a ativação de uma resposta imune antitumoral efetiva, o propósito deste estudo é auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas baseadas na diferenciação e maturação destas células *in vitro*, a fim de aumentar a eficácia da vacina.

Para tanto, a justificativa deste estudo consiste na compreensão dos mecanismos intrínsecos, incluindo a expressão de marcadores co-estimulatórios e do complexo de histocompatibilidade principal e a capacidade de sintetizar citocinas, desenvolvidos pelas células dendríticas obtidas de pacientes com diferentes graus de lesão cervical, após sua diferenciação e maturação *in vitro*, para que sejam efetivamente capazes de mediar a ativação dos linfócitos T e de uma resposta imune antitumoral eficaz.

# ***OBJETIVOS***

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de ativação das DCs maturadas *in vitro*, diferenciadas a partir de monócitos de pacientes com câncer cervical, lesão intraepitelial cervical de diferentes graus e em pacientes normais, submetidas a diferentes estímulos e condições.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar por citometria de fluxo o perfil de ativação de DCs maturadas *in vitro*, através da análise das moléculas de superfície CD209, CD11c, CD123, CD80, CD86 e HLA-DR, obtidas de pacientes com Lesão Intraepitelial de baixo e alto grau, câncer cervical invasivo e pacientes controles.
- Avaliar por ELISA a secreção das seguintes citocinas: IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , no sobrenadante da cultura de células dendríticas diferenciadas *in vitro*, obtidas de pacientes com Lesão Intraepitelial de baixo e alto grau, câncer cervical invasivo e pacientes controles.
- Comparar os resultados obtidos das células dos pacientes controles com as pacientes com tumores em diferentes graus para verificar se o grau de lesão pode levar a uma dificuldade de maturação das células dendríticas e se diferentes protocolos de ativação poderiam resultar em células dendríticas com uma maior capacidade de ativação.

# ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Casuística

O projeto destinado à imunoterapia com células dendríticas em pacientes com câncer se encontra aprovado pelo Comitê de ética e Pesquisa da UFTM, sob o nº 683-2006/CEP (ANEXO A). Esta linha de pesquisa é financiada pela FAPEMIG e CNPq. Todas as pacientes assinaram o termo de consentimento livre após esclarecimento (ANEXO B).

Neste projeto, realizamos a avaliação do perfil de ativação das DCs maturadas *in vitro*, diferenciadas a partir de monócitos de pacientes com câncer cervical, lesão intraepitelial cervical de diferentes graus e em pacientes normais. Foram estudadas 1130 mulheres previamente selecionadas no Ambulatório Maria da Glória da Universidade Federal do Triângulo mineiro (UFTM), no período de junho de 2013 a julho de 2015. Destas, 83 pacientes (Tabela 1) foram selecionadas de acordo com os critérios de inclusão e exclusão abaixo descritos.

<b>Tabela 1: Descrição dos grupos estudados.</b>					
<b>GRUPOS</b>	<b>n °</b>	<b>IDADE (Média ± Desvio Padrão)</b>	<b>TABAGISMO (%)</b>	<b>GESTAÇÃO (Média)</b>	<b>PARIDADE (Média)</b>
<b>Controle</b>	21	30,1 ± 9,1	9,5% (2/21)	0,4	0,4
<b>LSIL</b>	30	38,2 ± 15,2	6,7% (2/30)	1,45	1,4
<b>HSIL</b>	22	31,7 ± 6,6	4,5% (1/22)	2,0	1,75
<b>INVASIVO</b>	10	46 ± 15,3	0% (0/10)	3,7	3,4

### 4.2 Critérios de inclusão

- Pacientes com diagnóstico histológico e citológico de Câncer Cervical Invasivo, Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL) e Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL).
- O grupo controle foi constituído a partir de amostras coletadas de voluntárias em bom estado geral e sem histórico de doença neoplásica ao exame citológico.

### 4.3 Critérios de Exclusão

- Pacientes portadoras de doenças imunossupressoras, incluindo a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e doenças auto-imunes severas.
- Pacientes em uso de drogas imunossupressoras, como quimioterapia ou drogas antitumorais.
- Pacientes em tratamento com radioterapia.
- Pacientes gestantes.

### 4.4 Obtenção de Células Mononucleares

Para obtenção das células dendríticas, foram coletados 20mL de sangue periférico em tubos esterilizados e descartáveis contendo heparina (100UI/ml). O sangue coletado foi disposto em tubos plásticos cônicos contendo 15mL da solução de Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS (GE Healthcare). Os tubos foram centrifugados a 600xg por 30 minutos a 18°C, em centrífuga refrigerada. Ao final da centrifugação, obteve-se um anel de células mononucleares na interface entre a solução de Ficoll e os outros tipos celulares, depositados no fundo do tubo (figura 2). O anel de células mononucleares foi cuidadosamente coletado e transferido para um tubo cônico de 50mL (FALCON). O excesso de Ficoll foi removido por centrifugação lavando-se as células por 3 vezes com 30mL de meio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium - Sigma®), em cada lavagem, a 4°C e a velocidade de 805xg por 10 minutos. As células foram finalmente ressuspensas em 5mL de IMDM contendo 4,75 g/L de HEPES, 10% de soro bovino fetal, 1,6% de L-glutamina, 3% de coquetel dos antibióticos penicilina e estreptomicina, e 0,05mg de gentamicina (todos da Sigma®). A quantidade de células obtidas foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada utilizando-se o teste do azul de tripan, sendo utilizadas amostras com mais de 95% de viabilidade. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis utilizando-se capela de fluxo laminar, com exceção da contagem de células.

**Figura 2: Separação de leucócitos a partir do sangue total contendo anticoagulante.** Tubos de centrifuga mostrando as camadas das subpopulações de leucócitos isolados. Fonte: do Autor (2015)



#### 4.5 Cultura e Diferenciação das Células Dendríticas

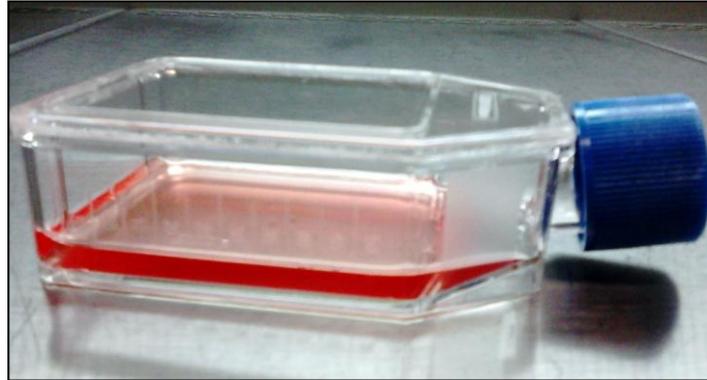
As células mononucleares isoladas foram submetidas a três diferentes protocolos de diferenciação e ativação das células dendríticas, conforme procedimentos abaixo descritos.

##### 4.5.1 Protocolo I

As células mononucleares isoladas foram cultivadas durante 8 dias em estufas com 5% de CO<sub>2</sub> e à 37°C, em garrafas de cultura com meio IMDM completo (7,5ml) contendo  $32,5 \times 10^6$  células (figura 3). Um dia após o plaqueamento, as células foram estimuladas com 3200pg/mL de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e 3200pg/mL de interleucina 4 (IL-4) para obtenção de células dendríticas imaturas e no 6º dia de cultura, com 3200pg/mL do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) para ativação destas células. Após dois dias as células foram

coletadas e submetidas à avaliação da ativação por Citometria de fluxo e o sobrenadante da cultura de células foi avaliado para a presença de citocinas pela técnica de ELISA.

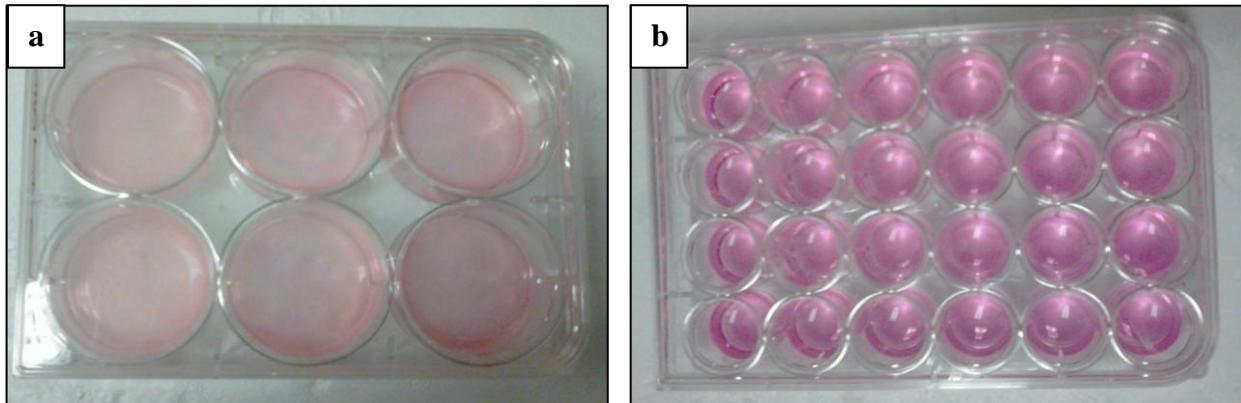
**Figura 3: células dendríticas cultivadas em garrafas contendo meio IMDM completo.** Fonte: do Autor (2015)



#### 4.5.2 Protocolo II

As células mononucleares isoladas foram mantidas em cultura *in vitro* em placas de 6 poços (figura 4a), a uma temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em 2ml de meio RPMI-1640 completo (suplementado com 40 mg/mL de gentamicina, 200mM de L-glutamina e 10% de soro bovino fetal) em uma concentração de 5x10<sup>6</sup>células/poço por 24 horas. Após a incubação, as células não aderentes foram coletadas e cultivadas separadamente em placas de 24 poços em meio RPMI completo contendo 10µg/mL de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (*Escherichia coli*) (figura 4b). O sobrenadante da cultura foi coletado 48 horas após o estímulo e congelado em freezer -80°C. As células aderentes foram cultivadas em meio IMDM completo, contendo 2000pg/mL de GM-CSF e 2000pg/mL de IL-4. No 6º dia de cultivo, as células aderentes foram estimuladas com 2000pg/mL de TNF-α e, no 7º dia, as células aderentes foram co-estimuladas com o sobrenadante de 48h, obtidos da cultura de células não aderentes. Após 24 horas as células diferenciadas foram coletadas e analisadas.

**Figura 4: Cultura de Células Dendríticas Protocolo II.** (a) cultura de células aderentes diferenciadas em DCs. (b) cultura de células não aderentes estimuladas com LPS. Fonte: do Autor (2015)



#### 4.5.3 Protocolo III

As células mononucleares isoladas foram mantidas em cultura *in vitro* em placas de 6 poços, a uma temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em 2ml de meio IMDM completo em uma concentração de 5x10<sup>6</sup> células/poço. Um dia após o plaqueamento, as células foram estimuladas com 2000pg/mL de GM-CSF e 2000pg/mL de IL-4 para diferenciação em células dendríticas e, no 6° dia, com 2000pg/mL do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Em paralelo, 1x10<sup>6</sup> células/mL de meio RPMI completo, foram cultivadas em placas de 24 poços e estimuladas com 10 $\mu$ g/mL de LPS, e seu sobrenadante foi coletado após 48 horas e congelado em freezer a -80°C. No 7° dia de cultura as células dendríticas foram co-estimuladas com 2mL do sobrenadante da cultura estimulada com LPS por 24 horas e coletadas para análise.

#### 4.6 Avaliação das Moléculas de Superfície por Citometria de Fluxo

No 8° dia de cultivo, as células dendríticas diferenciadas e ativadas foram coletadas e submetidas à avaliação da ativação por Citometria de fluxo. O perfil de ativação das células dendríticas diferenciadas *in vitro* foi avaliado a partir da determinação da presença de marcadores específicos e moléculas co-estimulatórias expressas em sua superfície. A técnica utilizada foi a citometria de fluxo (citômetro FACSCalibur™ BD®) com utilização de anticorpos BD Pharmingen™®.

As células dendríticas coletadas foram transferidas para tubo cônico de 50mL. O excesso de meio de cultura foi removido por centrifugação lavando-se as células por 3 vezes com 30ml de

PBS (solução salina tamponada com fosfato) em cada lavagem, a 4°C e a velocidade de 805xg por 10 minutos.

Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante cuidadosamente, conservando o precipitado de células que foram ressuspensas em 1 mL de PBS. Em seguida, a quantidade de células obtidas foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. A suspensão de células foi distribuída em quatro tubos de ensaio sendo realizada a marcação extracelular. Os anticorpos utilizados para a marcação dos isotipos foram Mouse IgG2a APC e Mouse IgG1 PE, e para determinação das células dendríticas os anticorpos Lin 1 (CD3, 14, 16, 19, 20, 56) FITC, CD11c APC, CD123 (Anti-IL-3R $\alpha$ ) PE, Anti-HLA-DR PerCP, CD86 PE, CD209 PerCP-Cy5.5 e CD80 APC (Tabela 2).

Após a marcação, as células foram incubadas a 4°C por 30 minutos, no escuro. Em seguida, foi feita a lavagem das células com PBS para a remoção do excesso de anticorpos. Finalmente, as células foram ressuspensas em 500 $\mu$ L de PBS para a leitura no citômetro BD FACSCalibur™.

**Tabela 2: Marcações Extracelulares para DCs diferenciadas *in vitro*.**

Tubos	Marcação Extracelular
1	Controle
2	Mouse IgG2a APC / Mouse IgG1 PE
3	Lin 1 (CD3, 14, 16, 19, 20, 56) FITC / CD11c APC / CD123 (Anti-IL-3R $\alpha$ ) PE / Anti-HLA-DR PerCP)
4	Multicolor (CD86 PE / CD209 PerCP-Cy5.5 / CD80 APC)

#### 4.7 Dosagem de Citocinas por ELISA

As citocinas presentes no sobrenadante da cultura das DCs foram dosadas por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) tipo sanduíche, utilizando pares de anticorpos monoclonais comerciais disponíveis da BD OptEIA™. Foram quantificadas as concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$ .

O procedimento foi realizado conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Placas de 384 poços foram sensibilizadas com 25 $\mu$ L de anticorpos monoclonais específicos para a captura das citocinas estudadas, mais solução tampão. Às fileiras 1 e 2 de cada placa foram adicionados 25 $\mu$ L

da citocina padrão recombinante seguindo diluições seriadas 1:2 em “assay diluent” à partir das concentrações iniciais diluídas. Às outras fileiras foram adicionados 25µL/poço do sobrenadante obtido da cultura de células dendríticas contendo a citocina a ser dosada. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 2 horas e lavadas por seis vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) acrescido de Tween 20%. A seguir, foram adicionados 25µL/poço do anticorpo anti-citocina a ser dosada, marcado com biotina diluído 1:250 em “assay diluent”. As placas foram reincubadas por 1 hora à temperatura ambiente e novamente lavadas por 6 vezes em PBS acrescido de Tween 20%. Após esta etapa, foram adicionados 25µL/poço de avidina marcado com fosfatase alcalina, diluído 1:250 em “assay diluent”. As placas foram incubadas por 1 hora e lavadas por 6 vezes com PBS acrescido de Tween 20%, quando então foram adicionados 25µL/poço de substrato TMB Substrate Reagent Set (BD OptEIA™) e após 30 minutos foram adicionados 12,5µL/poço de ácido fosfórico 1M.

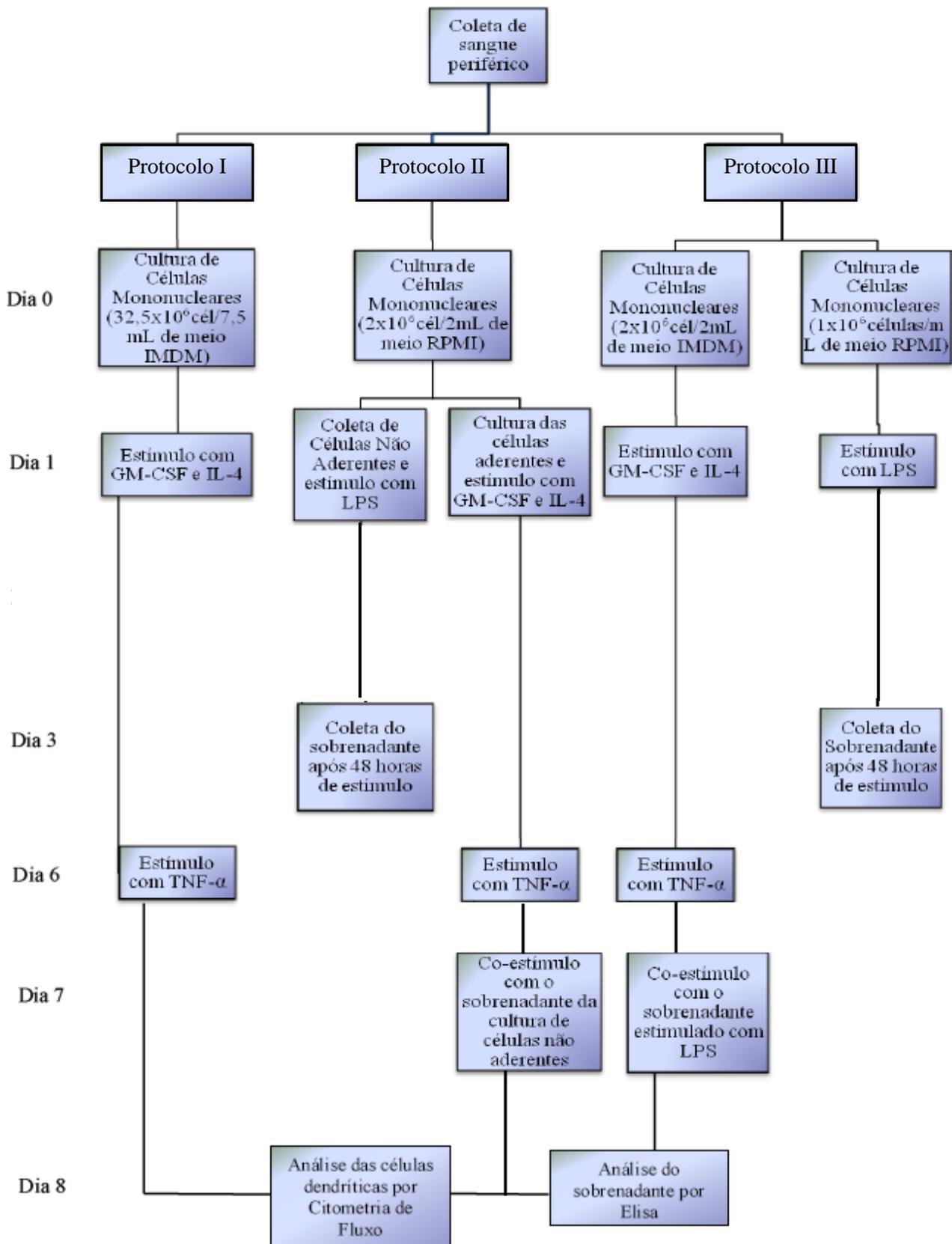
A análise da absorbância foi realizada no espectrofotômetro Spectra<sup>max</sup> 384 Plus, nas absorbâncias de 450 e 570nm. A concentração de cada citocina do sobrenadante de células dendríticas dos referidos grupos foram dosadas em pg/ml através da comparação com as absorbâncias obtidas da curva padrão da respectiva citocina, sendo realizada simultaneamente.

A figura 5 demonstra o desenho experimental, destacando os três protocolos utilizados para diferenciação e ativação das células dendríticas.

#### **4.8 Análise Estatística**

Os dados obtidos neste trabalho foram analisados através do aplicativo GraphPad Prism® 5.00. As variáveis cuja distribuição não foi normal foram analisadas utilizando-se testes não paramétricos, *Anova*, *Kruskal-Wallis test*, para comparação entre três ou mais grupos e *Mann-Whitney*, para comparação entre grupos pareados. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças em que p foi menor que 5% ( $p < 0.05$ ).

Figura 5: Representação do desenho experimental.



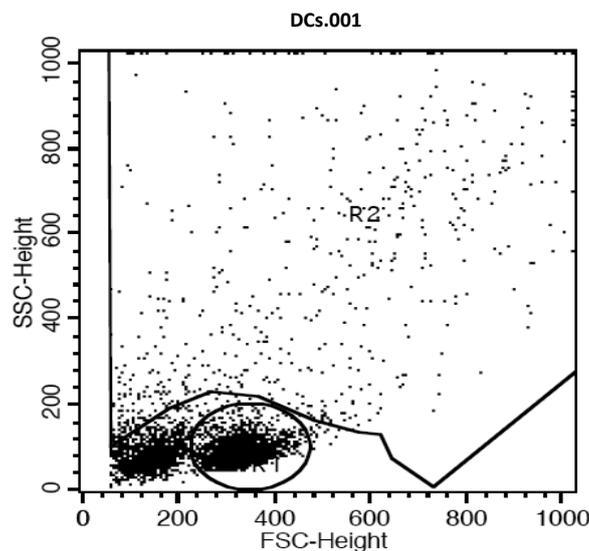
# ***RESULTADOS***

---

## 5. RESULTADOS

No presente estudo, buscamos determinar se o grau de lesão cervical pode levar a uma dificuldade na maturação das células dendríticas. Para tanto, avaliou-se o perfil fenotípico e os efeitos funcionais de combinações de citocinas sobre o processo de maturação das células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos de pacientes com câncer cervical invasivo, lesão intraepitelial cervical de diferentes graus e pacientes normais.

**Figura 6: Perfil de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico através da citometria de fluxo.** Perfil característico das populações celulares encontradas na cultura de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico em uma análise por citometria de fluxo, de acordo com características de tamanho (abscissa) e granulosidade (ordenada). A população de células delineada pela área R2 (“gate”) representa as células consideradas como nossa população de estudo.



A figura 6 exemplifica o perfil celular típico observado através da técnica de citometria de fluxo, em uma análise de “dot plot” em relação às características de tamanho (eixo das abscissas) e granulosidade (eixo das ordenadas). Podem-se observar pelo menos duas populações celulares distintas, uma menor e menos granulosa, constituída por restos celulares e linfócitos, e uma segunda população, representada por células maiores e mais granulosas, delimitada pela área R2 (“gate”), definida como nossa população de estudo.

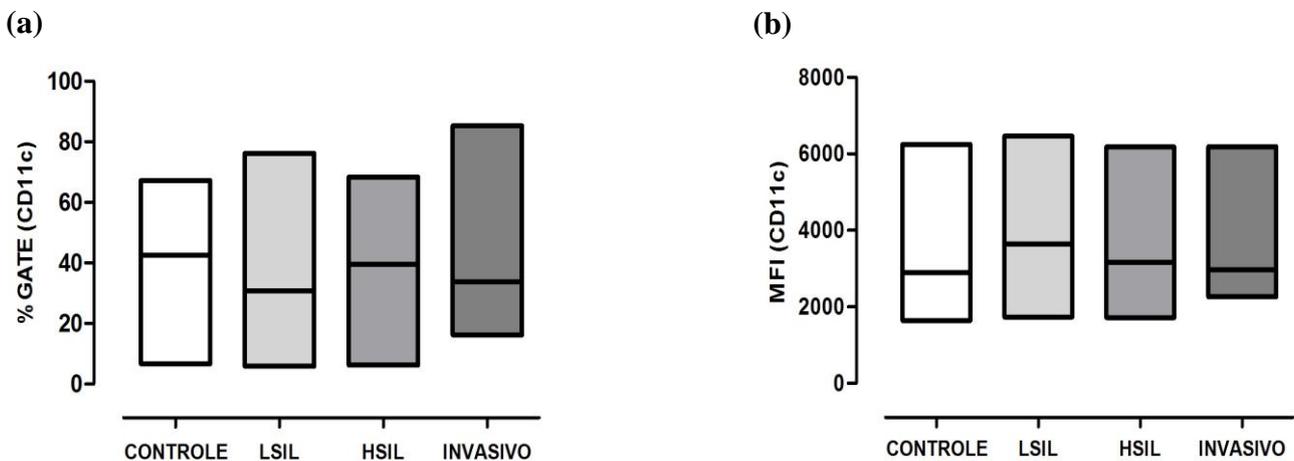
### 5.1. Perfil de ativação das células dendríticas - Protocolo I

No protocolo I foi realizada a análise da expressão de moléculas de superfície CD11c, CD123, HLA-DR, CD86, CD80 e CD209 através da citometria de fluxo, comparando-se o percentual de células positivas (% GATE) e a Intensidade Média de Fluorescência (MFI), entre os grupos de 21 pacientes controles, 30 pacientes com diagnóstico de LSIL, 22 pacientes com diagnóstico de HSIL e 10 pacientes com câncer cervical invasivo.

### 5.1.1 Expressão da molécula CD11c

Na figura 7 estão representados os resultados observados na análise da expressão da molécula CD11c. Observa-se que houve uma ligeira redução do percentual de células positivas para CD11c nos grupos LSIL (30,91%), HSIL (39,54%) e INVASIVO (33,87%) em comparação com o grupo controle (42,65%), porém sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Não encontramos diferenças significativas para a intensidade média de fluorescência entre os grupos estudados.

**Figura 7: Expressão de CD11c em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo I.** (a) Percentual de células positivas e (b) Intensidade média de Fluorescência de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes controle, pacientes com LSIL, HSIL ou câncer cervical invasivo. Resultados representados em mediana - linhas horizontais (Teste de *Kruskal-Wallis*).

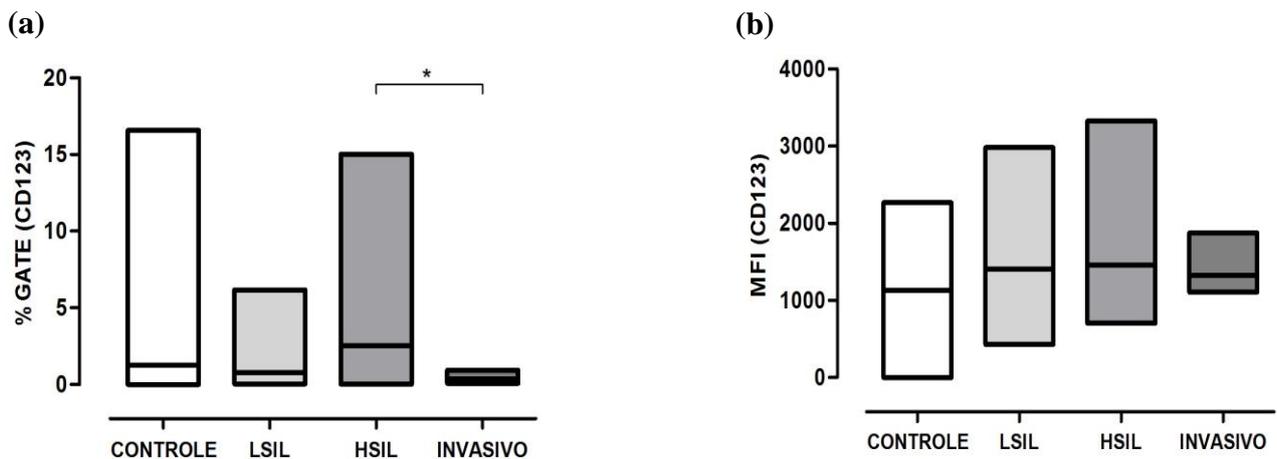


### 5.1.2 Expressão da molécula CD123

Em relação à expressão da molécula CD123, observou-se uma redução significativa do percentual de células positivas quando comparados o grupo HSIL (2,53%) ao grupo INVASIVO (0,38%) ( $p = 0,0396$ ). Os demais grupos estudados não mostraram alterações significativas ( $p > 0,05$ ).

(figura 8a). A comparação entre os grupos estudados, em relação à intensidade média de fluorescência também não evidenciou alterações significativas para esta molécula ( $p>0,05$ ) (figura 8b).

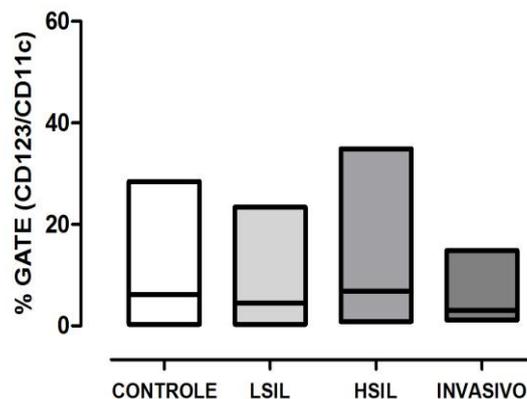
**Figura 8: Expressão de CD123 em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo I.** (a) Percentual de células positivas e (b) Intensidade média de Fluorescência de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes controle, pacientes com LSIL, HSIL ou câncer cervical invasivo. Resultados representados em mediana – linhas horizontais – e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando  $p<0,05$  (teste de *Kruskal-Wallis*). \* ( $p<0,05$ ).



### 5.1.3 Co-expressão das moléculas CD11c e CD123

Em relação à co-expressão das moléculas CD11c e CD123, não se observam alterações significativas para o percentual de células positivas entre os grupos estudados ( $p>0,05$ ) (figura 9).

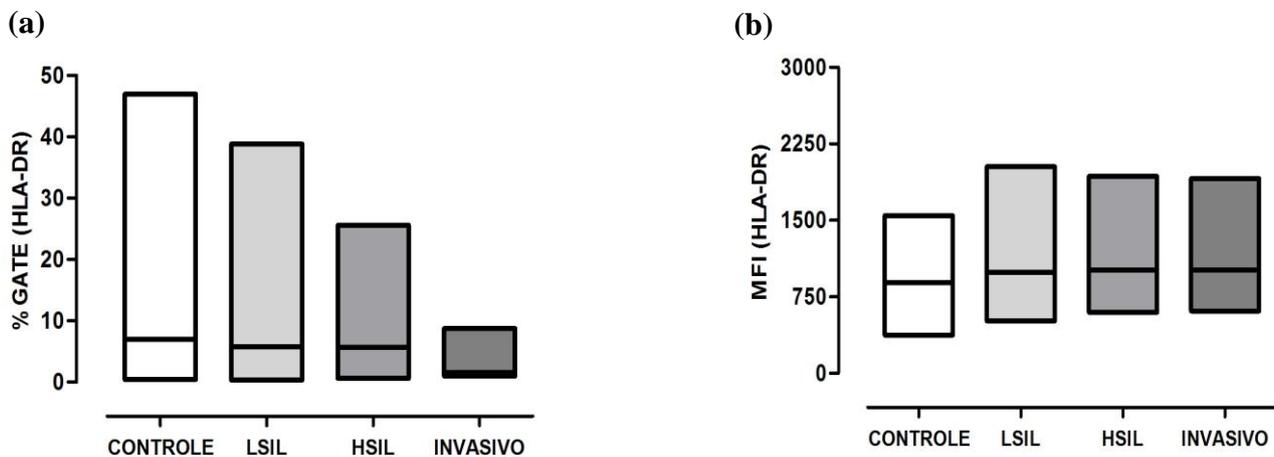
**Figura 9: Co-expressão de CD11c e CD123 em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo I.** Percentual de células positivas de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes controle, pacientes com LSIL, HSIL ou câncer cervical invasivo. Resultados representados em mediana – linhas horizontais (teste de *Kruskal-Wallis*).



### 5.1.4 Expressão da molécula HLA-DR

Pode-se observar, na figura 10a, que houve uma redução da porcentagem de células positivas para HLA-DR conforme o aumento do grau de lesão cervical, porém sem diferença estatística ( $p>0,05$ ). Não houve diferença significativa na intensidade média de fluorescência para esta molécula entre os grupos estudados ( $p>0,05$ ) (figura 10b).

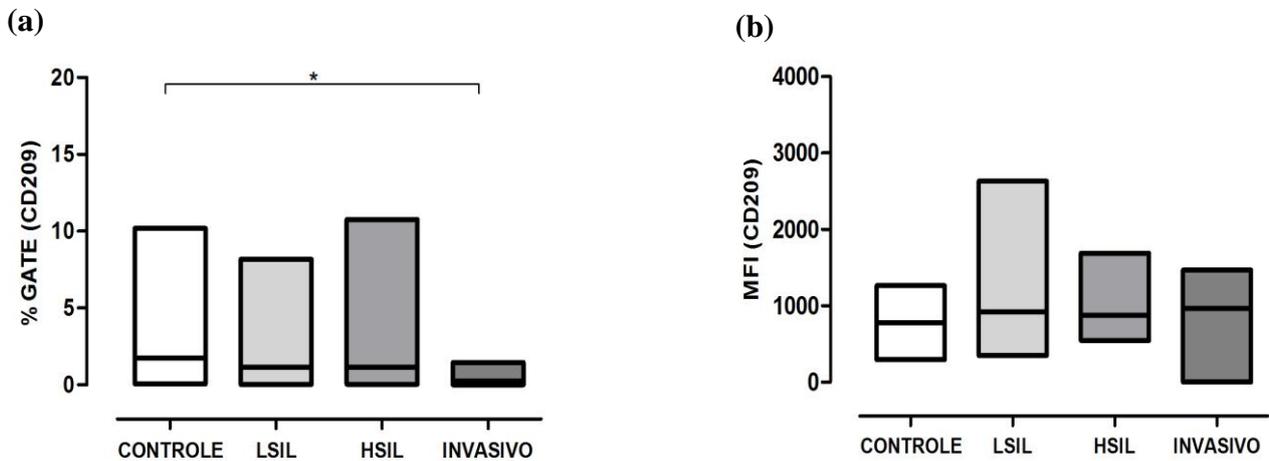
**Figura 10: Expressão de HLA-DR em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo I.** (a) Percentual de células positivas e (b) Intensidade média de Fluorescência de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes controle, pacientes com LSIL, HSIL ou câncer cervical invasivo. Resultados representados em mediana – linhas horizontais (teste de *Kruskal-Wallis*).



### 5.1.5 Expressão da molécula CD209

A análise da expressão de CD209 revelou que há uma redução do percentual de número de células positivas conforme o aumento do grau de lesão cervical e esta redução é estatisticamente significativa quando comparado o grupos controle (1,73%) ao grupo INVASIVO (0,26%) ( $p<0,05$ ) (figura 11a). A análise da intensidade média de fluorescência não revelou diferenças estatisticamente significantes para esta molécula ( $p>0,05$ ) (figura 11b).

**Figura 11: Expressão de CD209 em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo I.** (a) Percentual de células positivas e (b) Intensidade média de Fluorescência de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes controle, pacientes com LSIL, HSIL ou câncer cervical invasivo. Resultados representados em mediana – linhas horizontais - e diferenças estatisticamente significativas indicadas quando  $p < 0,05$  (teste de *Kruskal-Wallis*). \*  $p < 0,05$ .



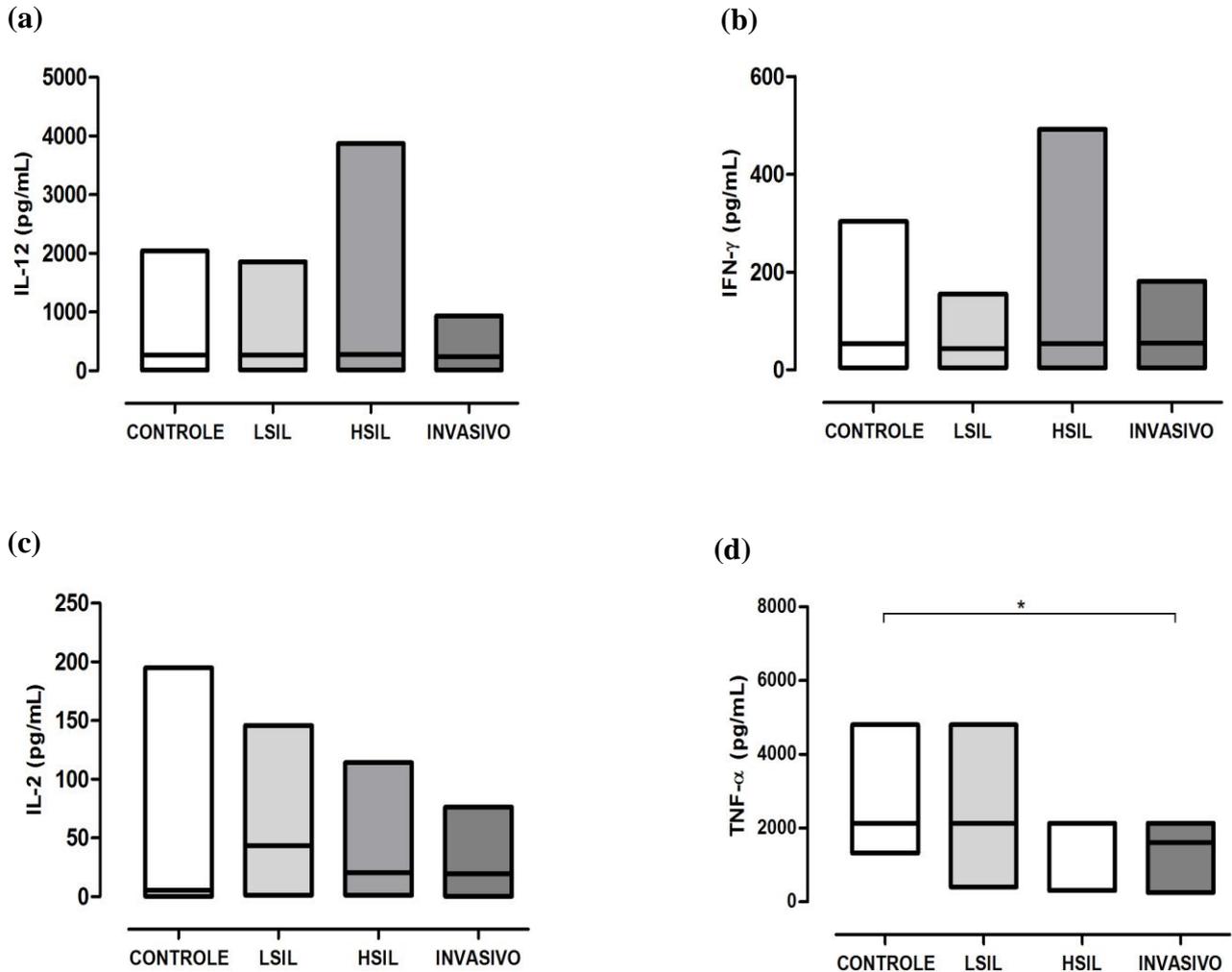
## 5.2 Produção de citocinas – Protocolo I

Na tentativa de se determinar o perfil de resposta dos linfócitos T foram dosadas, através do ELISA, as citocinas dos perfis Th1 (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-4 e IL-10) e Treg (TGF- $\beta$ ), secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico obtidos de pacientes com LSIL, HSIL, câncer cervical invasivo e pacientes controles.

### 5.2.1 Citocinas do perfil Th1

A figura 12 representa a concentração de citocinas em pg/mL do perfil Th1 secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico obtidos de pacientes com diferentes graus de lesão cervical e de pacientes controles.

**Figura 12: Concentração de citocinas do perfil Th1 secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas de pacientes com LSIL, HSIL, câncer cervical invasivo e de pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo I. (a) Concentração de IL-12 (pg/mL); (b) Concentração de IFN- $\gamma$  (pg/mL); (c) Concentração de IL-2 (pg/mL); (d) Concentração de TNF- $\alpha$  (pg/mL). Resultados representados em mediana – linhas horizontais - e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando  $p < 0,05$  (teste de *Kruskal-Wallis*). \*  $p < 0,05$ .**



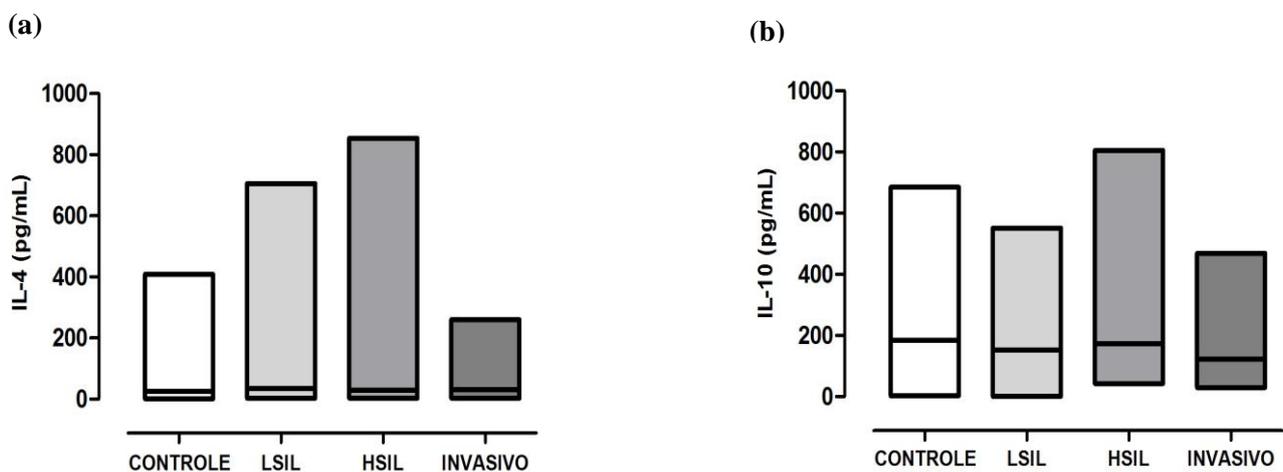
Observa-se, a partir desta figura, que não há diferença na produção das citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$  entre os grupos estudados ( $p > 0,05$ ). Quanto à produção de IL-2 (figura 14c), nota-se um ligeiro aumento da produção desta citocina nos grupos LSIL (43,31 pg/mL), HSIL (20,6 pg/mL) e INVASIVO (19,43 pg/mL) quando comparados ao grupo CONTROLE (5,49 pg/mL), no entanto não foram evidenciadas alterações significativas para a produção desta citocina ( $p > 0,05$ ). Em contrapartida, observa-se que há uma redução significativa na concentração de TNF- $\alpha$  quando

comparamos o grupo controle (2139,0pg/mL) ao grupo invasivo (1606,0pg/mL) ( $p=0,0432$ ) (figura 12d).

### 5.2.2 Citocinas do perfil Th2

A figura 13 representa a concentração de citocinas, em pg/mL, do perfil Th2 secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas diferenciadas obtidas de pacientes com diferentes graus de lesão cervical e de pacientes controles. A partir desta figura observa-se que não houve diferença na produção da IL-4 entre os grupos estudados ( $p>0,05$ ) (figura 13a). Em relação à produção de IL-10, nota-se que há uma pequena redução da produção desta citocina no sobrenadante da cultura de células dendríticas das pacientes com LSIL (153,10pg/mL), HSIL (173,70pg/mL) e INVASIVO (123,50pg/mL), quando comparados ao grupo CONTROLE (184,54pg/mL), entretanto sem diferença estatística ( $p>0,05$ ) (figura 13b).

**Figura 13: Concentração de citocinas do perfil Th2 secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas de pacientes com LSIL, HSIL, câncer cervical invasivo e de pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo I. (a) Concentração de IL-4 (pg/mL); (b) Concentração de IL-10 (pg/mL). Resultados representados em mediana – linhas horizontais (teste de *Kruskal-Wallis*).**

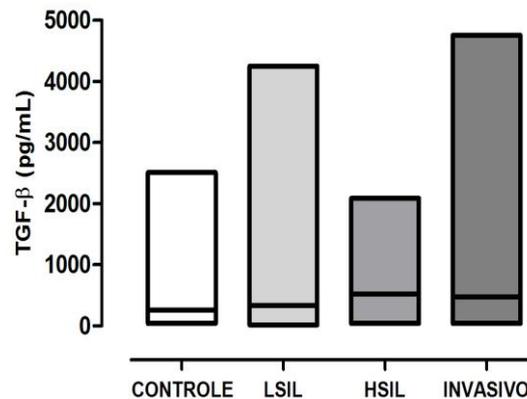


### 5.2.3 Citocinas do perfil Treg

A figura 14 representa a concentração de citocinas, em pg/mL, do perfil Treg secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas diferenciadas obtidas de pacientes com diferentes

graus de lesão cervical e de pacientes controles. Observa-se que, conforme o aumento do grau de lesão cervical há um aumento da concentração de TGF- $\beta$  no sobrenadante da cultura de células dendríticas, porém sem diferença estatística ( $p>0,05$ ).

**Figura 14: Concentração de TGF- $\beta$ , característica do perfil Treg, secretado no sobrenadante da cultura de células dendríticas de pacientes com LSIL, HSIL, câncer cervical invasivo e de pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo I. Resultados representados em mediana – linhas horizontais (teste de *Kruskal-Wallis*).**



### 5.3 Perfil de ativação das células dendríticas - Protocolo II

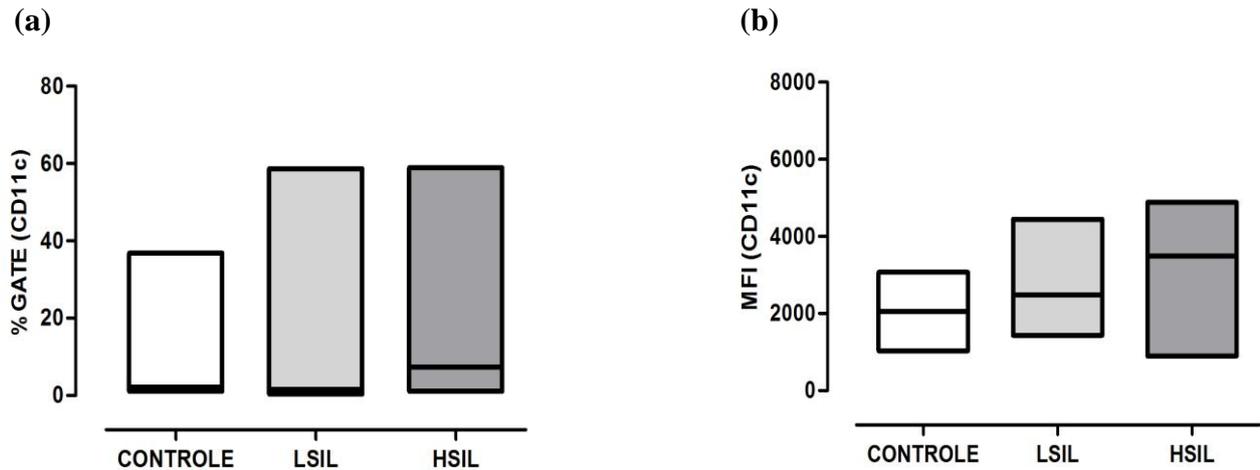
No protocolo II foi realizada a análise da expressão de moléculas de superfície através da citometria de fluxo, comparando-se o percentual de células positivas (% GATE) e a Intensidade Média de Fluorescência (MFI) de cada molécula estudada entre os grupos de 14 pacientes controles, 15 pacientes com diagnóstico de LSIL e 9 pacientes com diagnóstico de HSIL. Não foram incluídas as pacientes com diagnóstico de câncer cervical invasivo para a análise estatística devido ao número reduzido de amostras.

#### 5.3.1 Expressão da molécula CD11c

Na figura 15 estão representados os resultados obtidos a partir da análise da cultura de células dendríticas diferenciadas conforme o protocolo II, para a expressão da molécula CD11c. Observa-se um aumento do percentual de células positivas para a molécula quando comparamos o grupo HSIL (7,26%) ao grupo controle (2,19%), entretanto sem significância estatística ( $p>0,05$ ) (figura 15a). Também se observou um aumento da intensidade média de fluorescência quando

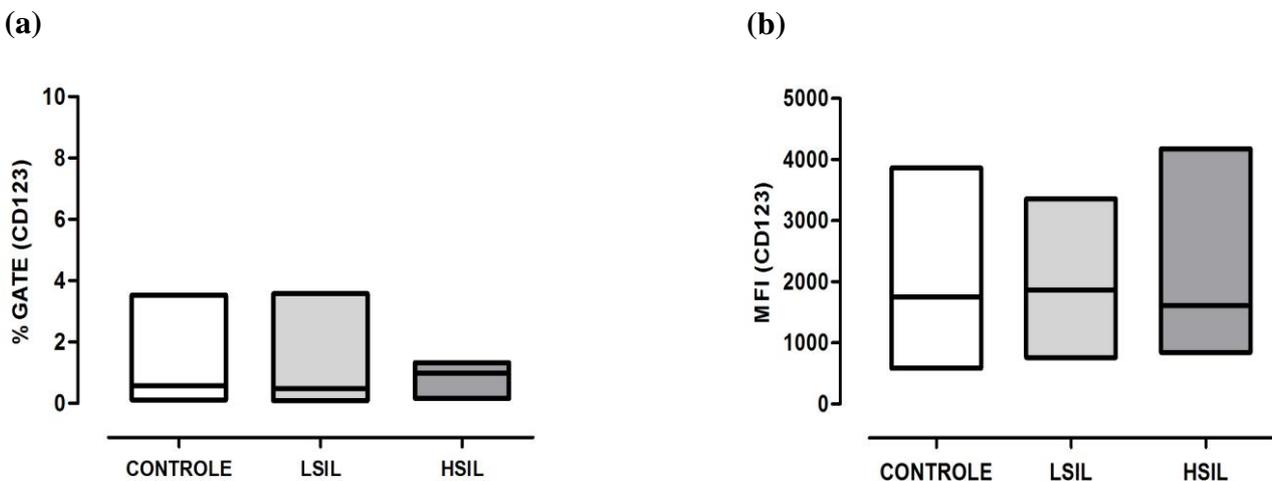
comparamos o grupo HSIL (3485,0) com o grupo controle (2057,0), sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ) (figura 15b).

**Figura 15: Expressão de CD11c em DCs diferenciadas de acordo com protocolo II.** (a) Percentual de células positivas e (b) Intensidade média de Fluorescência de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes controle, pacientes com LSIL ou HSIL. Resultados representados em mediana - linhas horizontais (Teste de *Kruskal-Wallis*).



### 5.3.2 Expressão da molécula CD123

**Figura 16: Expressão de CD123 em DCs diferenciadas de acordo com protocolo II.** (a) Percentual de células positivas e (b) Intensidade média de Fluorescência de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes controle, pacientes com LSIL ou HSIL. Resultados não-paramétricos representados em mediana - linhas horizontais (Teste de *Kruskal-Wallis*).

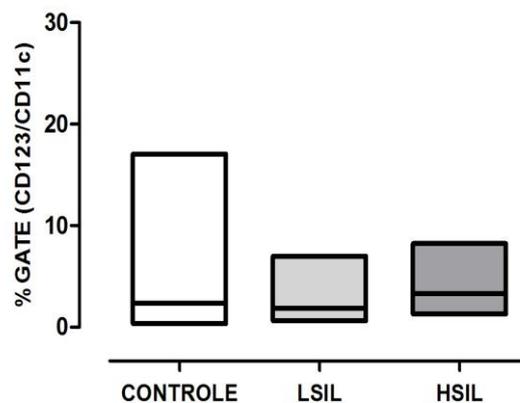


. Em relação à expressão da molécula CD123, observou-se um aumento não significativo do percentual de células positivas quando comparamos o grupo HSIL (0,99%) ao grupo CONTROLE (0,57%) (figura 16a). A análise da intensidade média de fluorescência não evidenciou diferenças significativas entre os grupos estudados (figura 16b).

### 5.3.3 Co-expressão das moléculas CD123 e CD11c

A figura 17 representa os resultados obtidos para a análise das células positivas para expressão tanto do marcador mielóide CD11c quanto para o marcador plasmocitóide CD123. Pode-se observar um aumento da porcentagem de células positivas para esta molécula quando comparamos o grupo HSIL (3,31%) aos grupos LSIL (1,87%) e controle (2,38%), porém sem significância estatística ( $p > 0,05$ ) (figura 17).

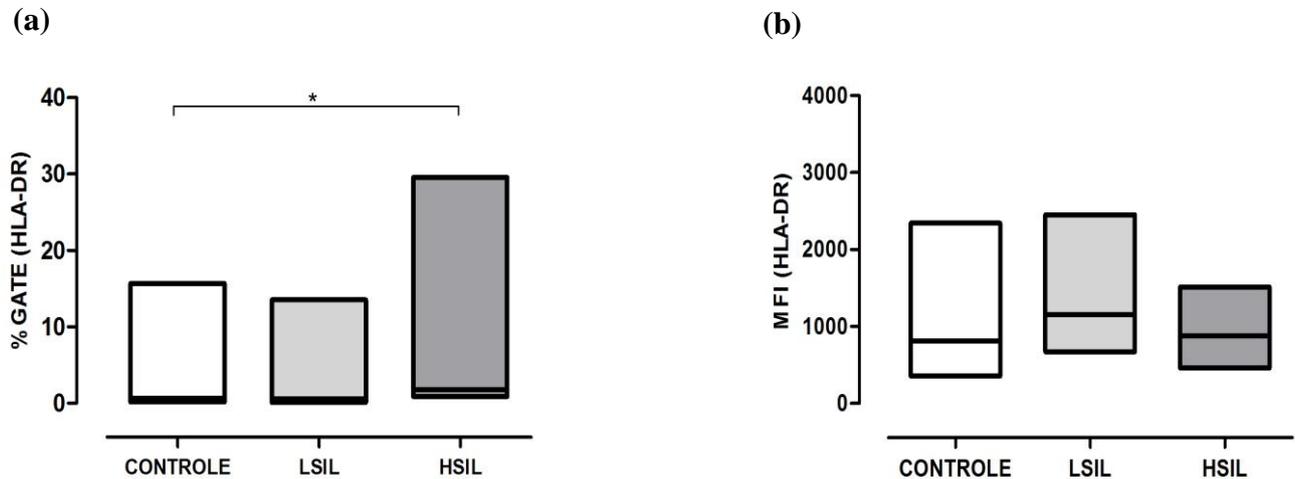
**Figura 17: Co-expressão de CD11c e CD123 em DCs diferenciadas de acordo com protocolo II.** (a) Percentual de células positivas de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes controle, pacientes com LSIL ou HSIL. Resultados representados em mediana - linhas horizontais (Teste de *Kruskal-Wallis*).



### 5.3.4 Expressão da molécula HLA-DR

Ao avaliar-se o percentual de células positivas para a molécula HLA-DR, observa-se um aumento significativo da expressão desta molécula quando comparamos o grupo HSIL (1,76%) ao grupo controle (0,7%) ( $p = 0,0269$ ) (figura 18a). Não se evidenciou diferença estatística na intensidade média de fluorescência entre os grupos estudados (figura 18b).

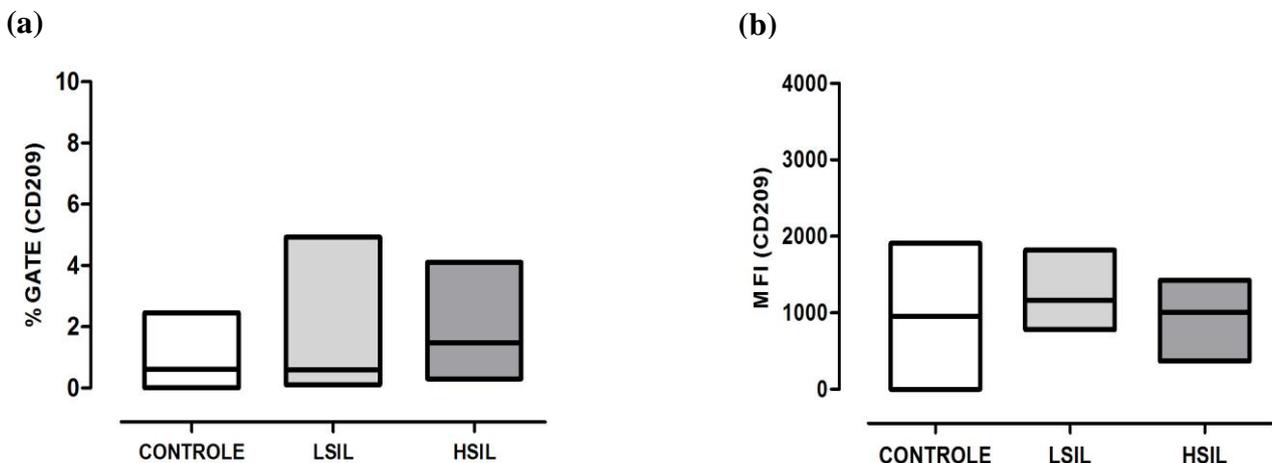
**Figura 18: Expressão de HLA-DR em DCs diferenciadas de acordo com protocolo II.** (a) Percentual de células positivas e (b) Intensidade média de fluorescência de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes controle, pacientes com LSIL ou HSIL. Resultados representados em mediana - linhas horizontais - e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando  $p < 0,05$  (Teste de *Kruskal-Wallis*). \*  $p < 0,05$ .



### 5.3.5 Expressão da molécula CD209

Observa-se, na figura 19a, que houve um aumento do percentual de células positivas para a molécula CD209 quando comparamos o grupo HSIL (1,49%) ao grupo controle (0,62%), entretanto este aumento não foi significativo ( $p > 0,05$ ). Em relação à intensidade média de fluorescência para esta molécula, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (figura 19b).

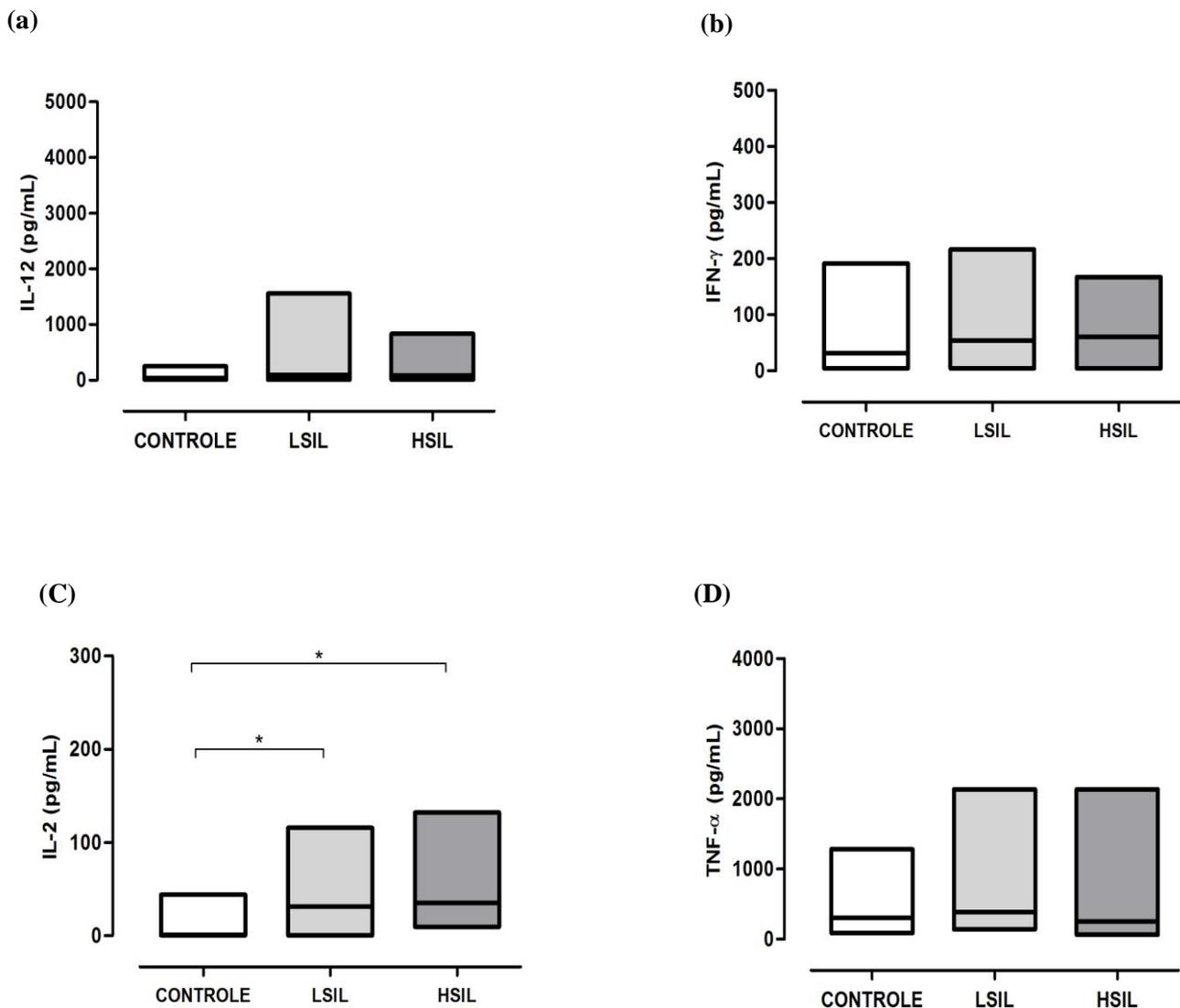
**Figura 19: Expressão de CD209 em DCs diferenciadas de acordo com protocolo II.** (a) Percentual de células positivas e (b) Intensidade média de fluorescência de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes controle, pacientes com LSIL ou HSIL. Resultados representados em mediana - linhas horizontais (Teste de *Kruskal-Wallis*).



## 5.4 Produção de citocinas – Protocolo II

### 5.4.1 Citocinas do perfil Th1

**Figura 20:** Concentração de citocinas do perfil Th1 secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas de pacientes LSIL, HSIL e de pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo II. (a) Concentração de IL-12 (pg/mL); (b) Concentração de IFN- $\gamma$  (pg/mL); (c) Concentração de IL-2 (pg/mL); (d) Concentração de TNF- $\alpha$  (pg/mL). Resultados representados em mediana – linhas horizontais - e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando  $p < 0,05$  (teste de *Kruskal-Wallis*). \* ( $p < 0,05$ ).



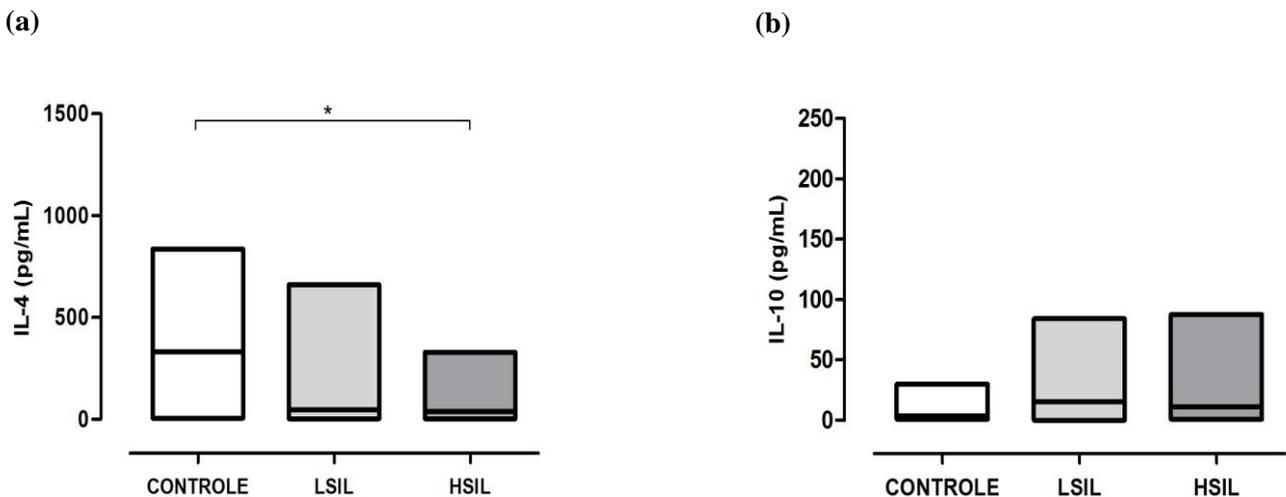
A figura 20 representa a concentração de citocinas (pg/mL) do perfil Th1 secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas diferenciadas de acordo com o protocolo II. Observa-

se, a partir desta figura, que não há diferença para a produção das citocinas IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  entre os grupos estudados. Em relação à produção de IL-2, verifica-se que há um aumento estatisticamente significativo da produção desta citocina no sobrenadante da cultura de células dendríticas quando comparamos os grupos LSIL (31,33pg/mL) e HSIL (35,44pg/mL) ao grupo controle (1,23pg/mL) ( $p=0,0003$ ) (figura 20c).

#### 5.4.2 Citocinas do perfil Th2

A figura 21 representa a concentração de citocinas, em pg/mL, do perfil Th2 secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas diferenciadas de acordo com o protocolo II. A partir desta figura observa-se que houve uma redução significativa da produção da IL-4, quando comparamos o grupo HSIL (39,16pg/mL) ao grupo controle (330,6pg/mL) ( $p=0,0102$ ). Comparando-se o grupo LSIL (47,31pg/mL) ao grupo controle (330,6pg/mL) observa-se também uma redução da produção desta citocina, porém esta redução não é significativa ( $p>0,05$ ) (figura 25a). Não foram evidenciadas alterações no padrão de secreção da IL-10 entre os grupos estudados (figura 21b).

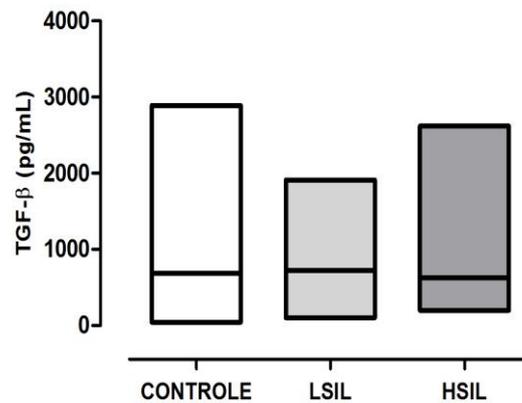
**Figura 21: Concentração de citocinas do perfil Th2 secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas de pacientes com LSIL, HSIL e de pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo II. (a) Concentração de IL-4 (pg/mL); (b) Concentração de IL-10 (pg/mL). Resultados representados em mediana – linhas horizontais - e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando  $p<0,05$  (teste de *Kruskal-Wallis*). \*  $p<0,05$ .**



#### 5.4.3 Citocinas do perfil Treg

A figura 22 representa a concentração de TGF- $\beta$  secretada no sobrenadante da cultura de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico. Observa-se, a partir desta figura, que não houve diferença na produção desta citocina entre os grupos estudados ( $p>0,05$ ).

**Figura 22: Concentração de TGF- $\beta$ , característica do perfil Treg, secretado no sobrenadante da cultura de células dendríticas de pacientes com LSIL, HSIL e pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo II. Resultados representados em mediana – linhas horizontais (teste de *Kruskal-Wallis*).**



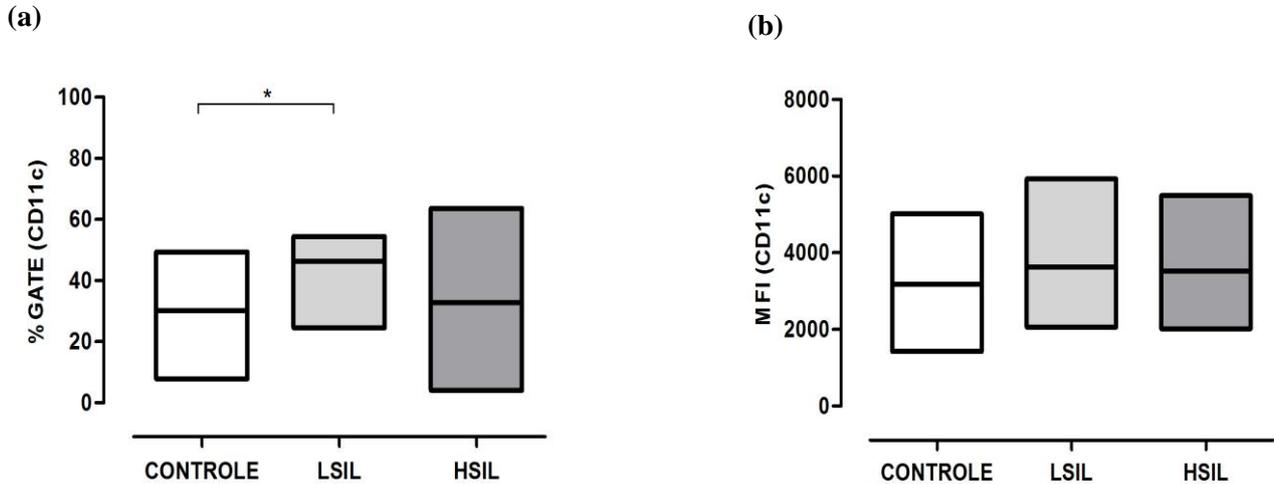
### 5.5 Perfil de ativação das Células Dendríticas – Protocolo III

No protocolo III foi realizada a análise da expressão de moléculas de superfície através da citometria de fluxo, comparando-se o percentual de células positivas (% GATE) e a Intensidade Média de Fluorescência (MFI) de cada molécula estudada entre os grupos de 11 pacientes controles, 11 pacientes com diagnóstico de LSIL e 6 pacientes com diagnóstico de HSIL. Não foram incluídas as pacientes com diagnóstico de câncer cervical invasivo para a análise estatística devido ao número reduzido de amostras.

#### 5.5.1 Expressão da molécula CD11c

Ao analisar-se o percentual de células positivas para o marcador mieloide CD11c, observa-se um aumento significativo comparando-se o grupo LSIL (46,36%) ao grupo controle (30,17%) ( $p=0,0231$ ) (figura 23a). Não se evidenciou diferença significativa para a intensidade média de fluorescência entre os grupos estudados (figura 23b).

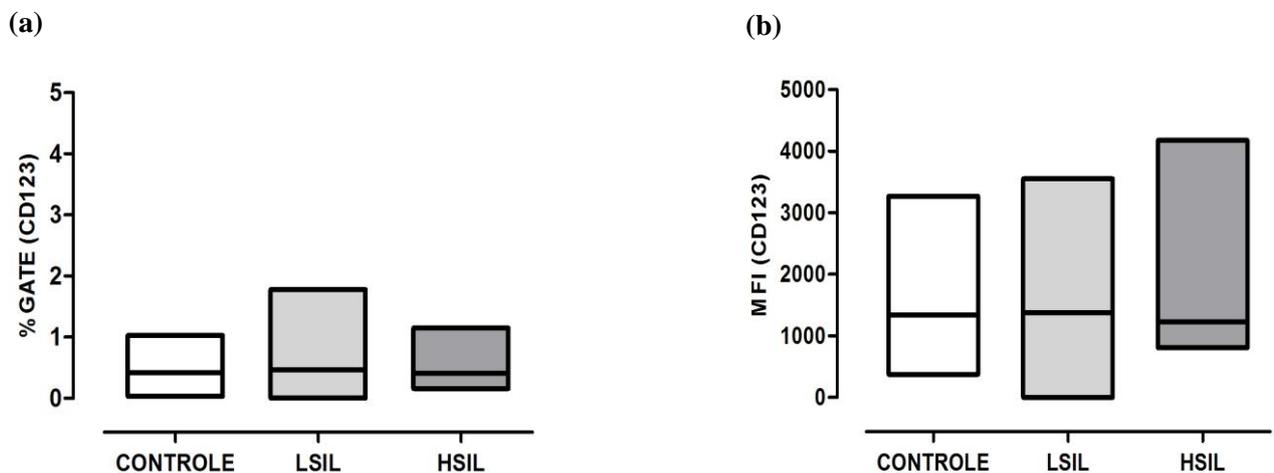
**Figura 23: Expressão de CD11c em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo III.** (a) Percentual de células positivas e (b) Intensidade média de fluorescência de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes controle e pacientes com LSIL, HSIL. Resultados representados em mediana - linhas horizontais - e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando  $p < 0,05$  (Teste de *Kruskal-Wallis*). \*  $p < 0,05$ .



### 5.5.2 Expressão da molécula CD123

Não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significantes em relação ao percentual de células positivas e à intensidade média de fluorescência para o marcador de células dendríticas plasmocitóides CD123 ( $p > 0,05$ ) (figura 24).

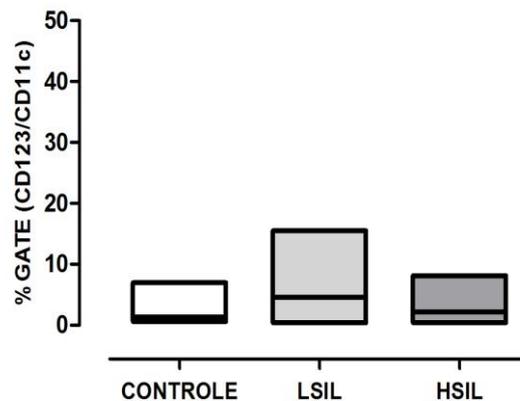
**Figura 24: Expressão de CD123 em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo III.** (a) Percentual de células positivas e (b) Intensidade média de fluorescência de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes controle e pacientes com LSIL, HSIL. Resultados representados em mediana - linhas horizontais (Teste de *Kruskal-Wallis*).



### 5.5.3 Co-expressão das moléculas CD11c e CD123

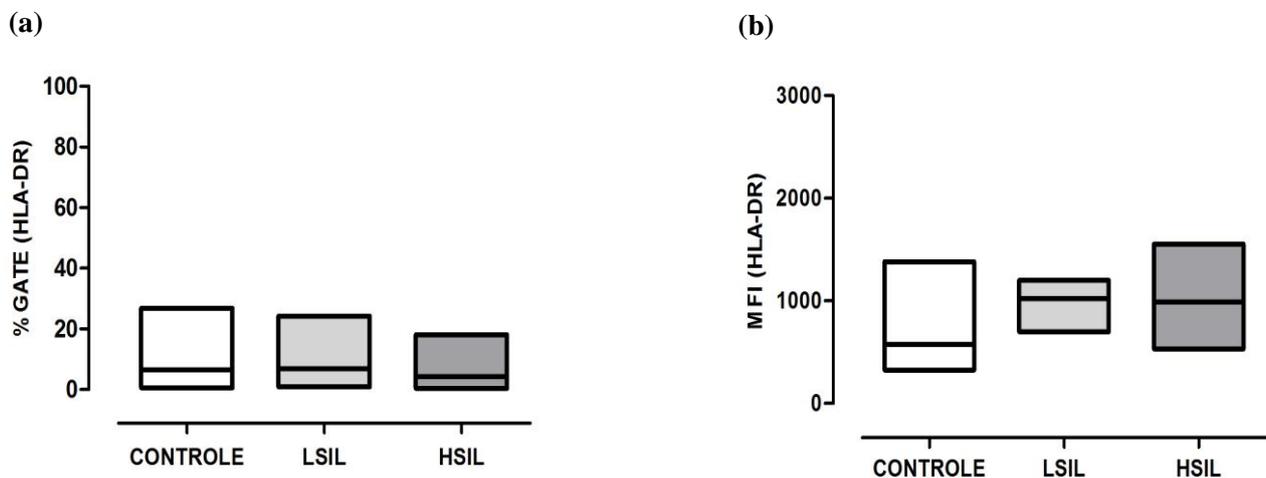
A figura 25 representa os resultados obtidos da análise da co-expressão das moléculas CD11c e CD123. Pode-se observar um pequeno aumento da porcentagem de células positivas para estas moléculas quando comparamos o grupo LSIL (4,56%) em relação ao grupo controle (1,36%), porém sem significância estatística ( $p > 0,05$ ) (figura 25).

**Figura 25: Co-expressão de CD123 e CD11c em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo III.** (a) Percentual de células positivas de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes controle e pacientes com LSIL, HSIL. Resultados representados em mediana - linhas horizontais (Teste de *Kruskal-Wallis*).



### 5.5.4 Expressão da molécula HLA-DR

**Figura 26: Expressão de HLA-DR em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo III.** (a) Percentual de células positivas e (b) Intensidade média de fluorescência de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes controle e pacientes com LSIL e HSIL. Resultados representados em mediana - linhas horizontais (Teste de *Kruskal-Wallis*).

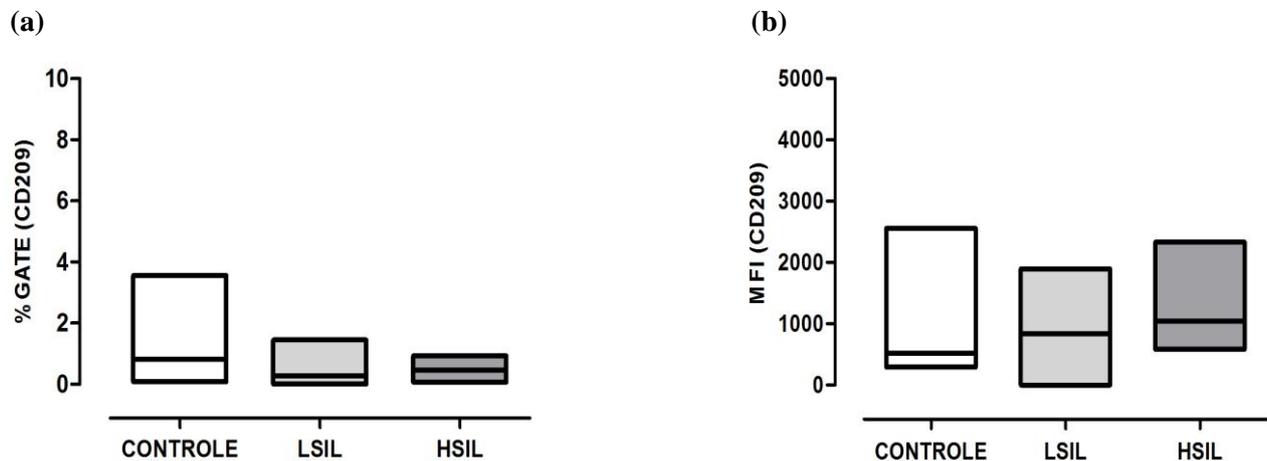


Em relação à expressão da molécula HLA-DR, observa-se que não há diferença para o percentual de células positivas entre os grupos estudados (figura 26a). Observa-se, também, um aumento não significativo da intensidade média de fluorescência quando comparamos os grupos LSIL (1022,0) e HSIL (986,6) ao grupo controle (572,3) ( $p>0,05$ ) (figura 26b).

### 5.5.5 Expressão da molécula CD209

Em relação à expressão de CD209 em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo III, observa-se uma redução não significativa do percentual de células positivas nos grupos LSIL (0,27%) e HSIL (0,45%) quando comparados ao grupo controle (0,82%) (figura 27a). Em contrapartida, a intensidade média de fluorescência revela um aumento, também não significativo, quando comparamos os grupos LSIL (841,9) e HSIL (1047,0) ao grupo controle (520,1) ( $p>0,05$ ) (figura 27b).

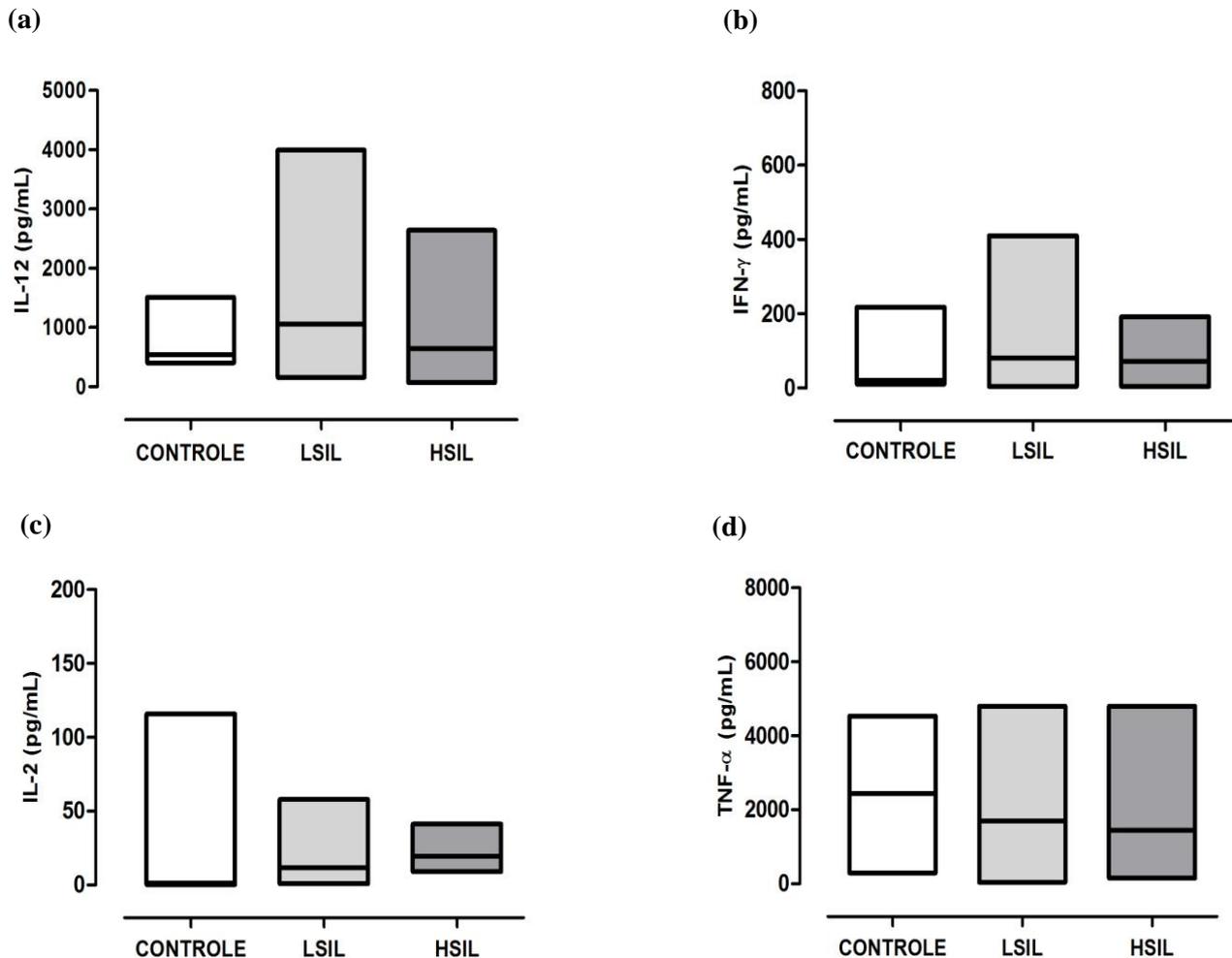
**Figura 27: Expressão de CD209 em DCs diferenciadas de acordo com o protocolo III.** (a) Percentual de células positivas e (b) Intensidade média de fluorescência de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes controles e pacientes com LSIL, HSIL. Resultados representados em mediana - linhas horizontais (Teste de *Kruskal-Wallis*).



## 5.6 Produção de citocinas – Protocolo III

### 5.6.1 Citocinas do perfil Th1

**Figura 28: Concentração de citocinas do perfil Th1 secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas de pacientes com LSIL, HSIL e de pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo III. (a) Concentração de IL-12 (pg/mL); (b) Concentração de IFN- $\gamma$  (pg/mL); (c) Concentração de IL-2 (pg/mL); (d) Concentração de TNF- $\alpha$  (pg/mL). Resultados representados em mediana – linhas horizontais (teste de *Kruskal-Wallis*).**



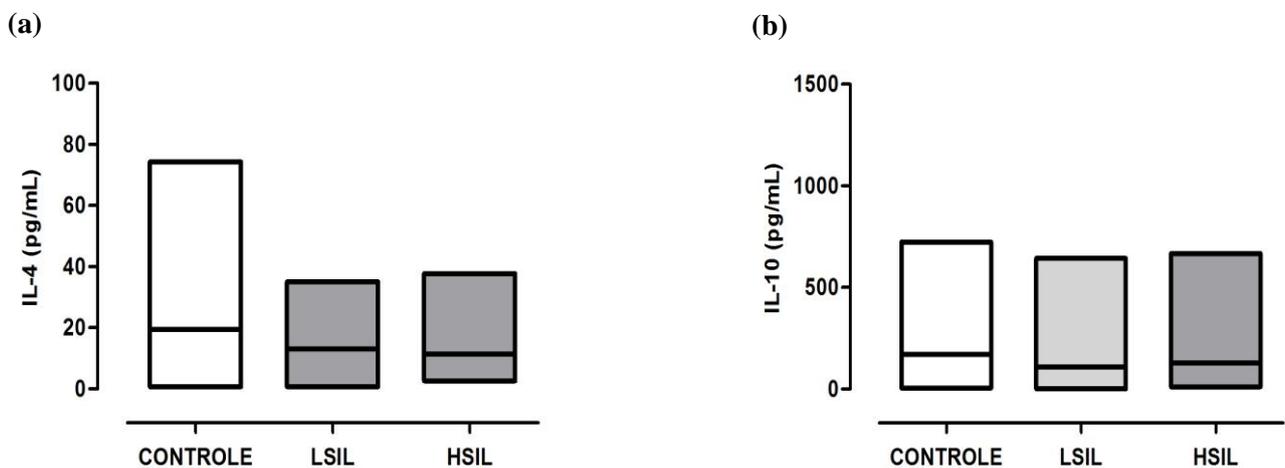
A figura 28 representa a concentração de citocinas (pg/mL) do perfil Th1 secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas diferenciadas conforme protocolo III. Observa-se, nesta figura, que há um aumento da produção de IFN- $\gamma$  nos grupos LSIL (81,07pg/mL) e HSIL (72,54pg/mL) em comparação ao grupo controle (20,29pg/mL), porém este aumento não é significativo ( $p>0,05$ ) (figura 28b). Também se observou um aumento não significativo da produção de IL-2 nos grupos LSIL (11,74pg/mL) e HSIL (19,52pg/mL) em comparação ao grupo controle (1,23pg/mL) ( $p>0,05$ ) (figura 33c). Em relação à produção da IL-12 (figura 28a), nota-se uma maior produção desta citocina nas pacientes com diagnóstico de LSIL (1059,0pg/mL) em comparação ao grupo controle (544,0pg/mL), entretanto sem significância estatística ( $p>0,05$ ).

Também se evidencia uma redução da produção de TNF- $\alpha$  nos grupos LSIL (1691,0pg/mL) e HSIL (1443,0pg/mL) em comparação ao grupo controle (2436,0pg/mL), sem significância estatística ( $p>0,05$ ) (figura 28b).

### 5.6.2 Citocinas do perfil Th2

A figura 29 representa a concentração de citocinas, em pg/mL, do perfil Th2 secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas diferenciadas de acordo com o protocolo III. A partir desta figura observa-se que houve uma redução, não significativa, da produção da IL-4, quando comparamos os grupos LSIL (13,02pg/mL) e HSIL (11,34pg/mL) ao grupo controle (19,43pg/mL) ( $p>0,05$ ) (figura 35a). Não foram observadas alterações no padrão de secreção da IL-10 entre os grupos estudados (figura 29b).

**Figura 29:** Concentração de citocinas do perfil Th2 secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas de pacientes com LSIL, HSIL e pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo III. (a) Concentração de IL-4 (pg/mL); (b) Concentração de IL-10 (pg/mL). Resultados representados em mediana – linhas horizontais (teste de *Kruskal-Wallis*).

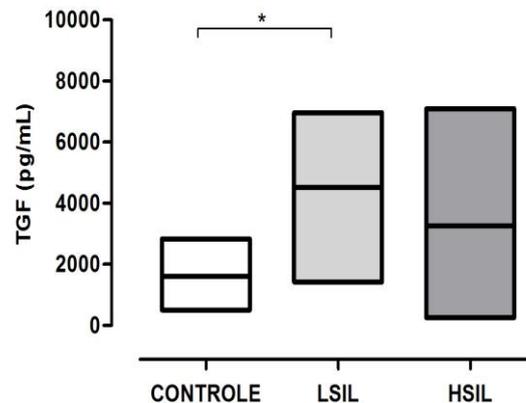


### 5.6.3 Citocinas do perfil Treg

Observa-se, na figura 30, que houve um aumento significativo da concentração de TGF- $\beta$  no grupo LSIL (4525,0pg/mL) em comparação o grupo controle (1602,0pg/mL) ( $p=0,0048$ ). Quando

comparados o grupo HSIL (3254,0pg/mL) ao grupo controle (1602,0pg/mL), também se observa um aumento da concentração desta citocina, entretanto sem diferença estatística ( $p>0,05$ ).

**Figura 30: Concentração de TGF- $\beta$ , secretado no sobrenadante da cultura de células dendríticas de pacientes com LSIL, HSIL e pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo III.** Resultados representados em mediana – linhas horizontais – e diferenças estatisticamente significantes indicadas quando  $p<0,05$  (teste de *Kruskal-Wallis*). \*  $p<0,05$ .



### 5.7 Comparação entre os protocolos utilizados

Para avaliarmos se os diferentes protocolos de diferenciação utilizados poderiam resultar em células dendríticas com maior capacidade de ativação de linfócitos do perfil Th1, comparou-se a expressão dos marcadores de superfície CD11c, HLA-DR, CD86 e CD80 em DCs diferenciadas de acordo com os protocolos I, II e III, obtidas de pacientes com LSIL, HSIL e pacientes controles.

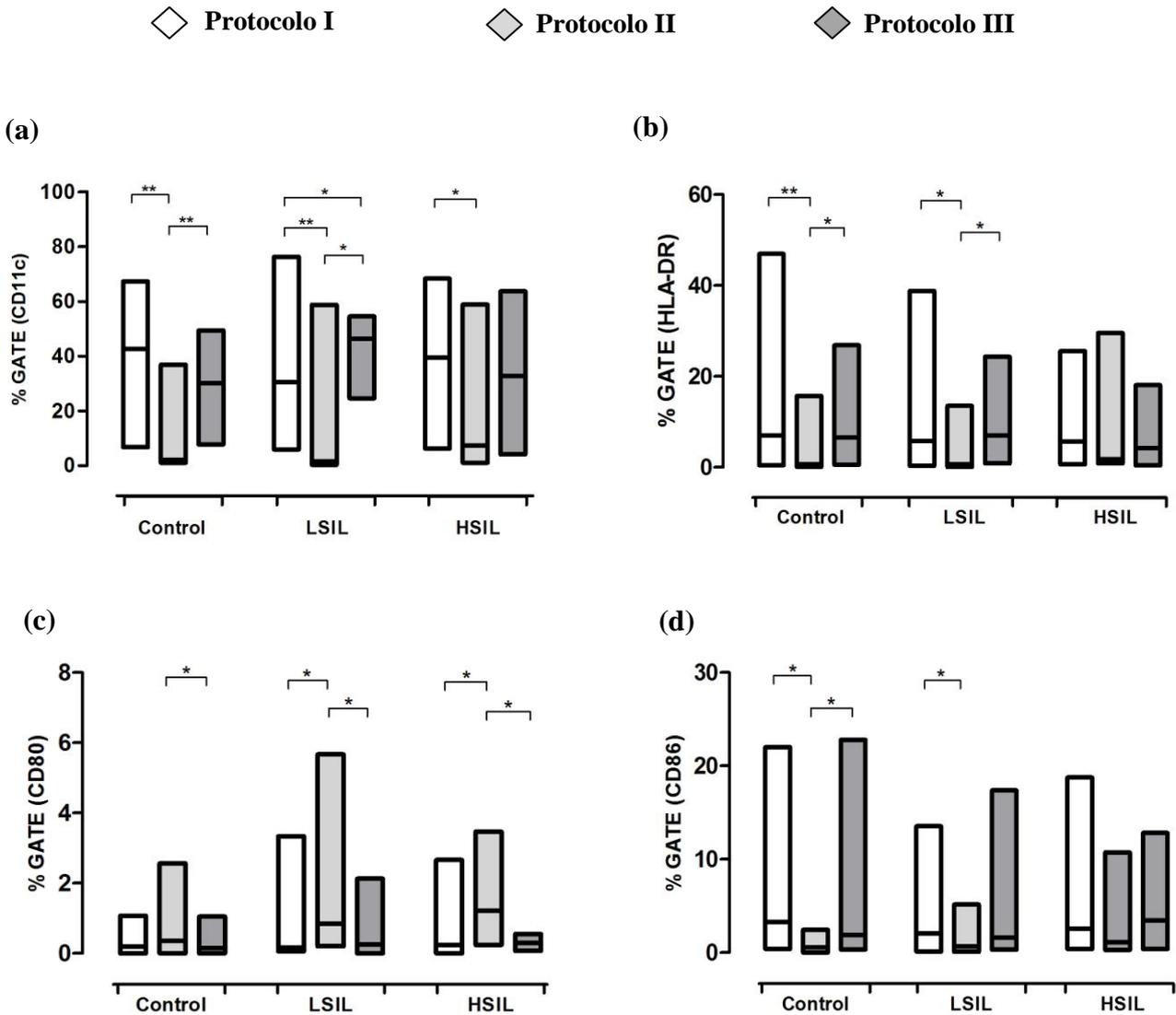
A figura 31 representa os resultados obtidos para a comparação entre os diferentes protocolos utilizados. Observa-se que DCs obtidas de pacientes controles diferenciadas de acordo com o protocolo II, apresentam uma redução significativa do percentual de células positivas para CD11c (2,19%) em comparação com os protocolos I (42,65%) e III (30,17%) ( $p<0,001$ ). Nas pacientes com diagnóstico de LSIL, observou-se uma redução significativa do percentual de células positivas para CD11c no protocolo II (1,57%) em comparação aos protocolos I (30,91%) ( $p<0,0001$ ) e III (46,36%) ( $p=0,0003$ ). Além disso, observa-se também, para este grupo de pacientes, um aumento significativo do percentual de células positivas para CD11c quando comparamos o protocolo III (46,36%) ao protocolo I (30,91%) ( $p=0,0439$ ). Nas pacientes com

diagnóstico de HSIL observou-se uma redução do percentual de células positivas para CD11c quando comparamos os protocolos I (39,54) e III (32,76%) ao protocolo II (7,26%), sendo estatisticamente significativo quando comparamos os protocolos I e II ( $p=0,0348$ ) (figura 31a).

Ao avaliar-se o percentual de células positivas para HLA-DR, observa-se uma redução significativa quando comparamos o protocolo II (0,7%) aos protocolos I (6,96%) ( $p<0,0001$ ) e III (6,6%) ( $p=0,0002$ ), para os pacientes controles. As pacientes com LSIL também apresentam uma redução significativa da expressão deste marcador quando comparamos o protocolo II (0,62%) aos protocolos I (5,75%) ( $p=0,0001$ ) e III (6,95%) ( $p=0,0024$ ). Nas pacientes com diagnóstico de HSIL observa-se uma redução do percentual de células positivas para HLA-DR quando comparamos o protocolo II (1,76%) aos protocolos I (5,65%) e III (4,24%), entretanto esta redução não é significativa (figura 31b).

Em relação ao percentual de células positivas para a molécula CD80 nos pacientes controle, observa-se que houve um aumento significativo quando comparamos o protocolo II (0,36%) ao protocolo III (0,15%) ( $p=0,0083$ ). Quando comparamos o protocolo II (0,36%) ao protocolo I (0,19%) também observamos este aumento do percentual de células positivas para CD80, entretanto sem relevância estatística. Nas pacientes com diagnóstico de LSIL, pode-se observar um aumento estatisticamente significativo do percentual de células positivas para CD80 quando comparamos o protocolo II (0,84%) aos protocolos I (0,18%) ( $p=0,0012$ ) e III (0,25%) ( $p=0,0271$ ). Em relação ao percentual de células positivas para esta molécula nas pacientes com HSIL, observa-se que também há um aumento significativo quando comparamos o protocolo II (1,21%) aos protocolos I (0,1%) ( $p=0,0131$ ) e III (0,3%) ( $p=0,0337$ ) (figura 31c).

Em relação à expressão da molécula co-estimulatória CD86, observa-se que no grupo controle, há uma redução significativa do percentual de células positivas quando comparamos o protocolo II (0,57%) aos protocolos I (3,25%) ( $p=0,0003$ ) e III (1,91%) ( $p=0,0017$ ). Nas pacientes com LSIL se observa uma redução significativa do percentual de células positivas para CD86 quando comparamos o protocolo II (0,67%) ao protocolo I (2,1%) ( $p=0,0201$ ). Ao comparar-se o protocolo II (0,67%) ao protocolo III (1,60%) também se observa uma redução do percentual de células positivas, entretanto sem relevância estatística. Nas pacientes com HSIL, é possível observar-se uma redução do percentual de células positivas para CD86 no protocolo II (1,11%) quando comparado aos protocolos I (2,56%) e III (3,44%), entretanto esta redução não é estatisticamente significativa (figura 31d).



**Figura 31: Comparação da expressão dos marcadores CD11c, HLA-DR, CD80 e CD86 em DCs diferenciadas obtidas de pacientes com LSIL, HSIL e pacientes controles diferenciadas de acordo com os protocolos I, II e III.** (a) Percentual de células positivas para CD11c em DCs diferenciadas de acordo com os protocolos I, II e III; (b) Percentual de células positivas para HLA-DR em DCs diferenciadas de acordo com os protocolos I, II e III; (c) Percentual de células positivas para CD80 em DCs diferenciadas de acordo com os protocolos I, II e III; (d) Percentual de células positivas para CD86 em DCs diferenciadas de acordo com os protocolos I, II e III. Resultados expressos em mediana – linhas horizontais – e diferenças estatisticamente significantes representadas quando  $p < 0,05$  (teste de *Mann Whitney*). \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,0001$ ).

Assim como os protocolos de diferenciação utilizados podem alterar o perfil fenotípico das células dendríticas, investigou-se a sua influência sobre a produção de citocinas no sobrenadante da cultura de DCs.

A figura 5 representa as concentrações de citocinas secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas diferenciadas de acordo com os três diferentes protocolos. Observa-se, a partir

desta figura, que há uma redução significativa da produção de IL-12 quando comparamos o protocolo II (42,7pg/mL) aos protocolos I (272,8pg/mL) e III (544,0pg/mL) para os pacientes controles ( $p < 0,0001$ ). Além disso, pode-se observar também, um aumento significativo da produção desta citocina quando comparamos o protocolo III (544,0pg/mL) ao protocolo I (272,8pg/mL) neste grupo de pacientes ( $p = 0,0027$ ). Nas pacientes com diagnóstico de LSIL observa-se uma redução da produção de IL-12 no protocolo II (105,0pg/mL) quando comparado aos protocolos I (271,5pg/mL) e III (1059,0pg/mL), sendo esta redução estatisticamente significativa quando comparamos os protocolos II e III ( $p = 0,0006$ ). Ademais, é possível observar-se um aumento significativo da produção desta citocina quando comparamos o protocolo III (1059,0pg/mL) ao protocolo I (271,5pg/mL) ( $p = 0,0033$ ), neste grupo de pacientes. Nas pacientes do grupo HSIL, se observa uma redução da produção de IL-12 no protocolo II (84,2pg/mL) em comparação aos protocolos I (277,2pg/mL) e III (641,0pg/mL) e um aumento da produção desta citocina quando comparamos o protocolo III (641,0pg/mL) ao protocolo I (277,2pg/mL), entretanto sem diferença estatística (figura 32a).

Em relação à produção de TNF- $\alpha$ , pode-se observar que houve uma redução estatisticamente significativa da produção desta citocina quando comparamos o protocolo II (306,4pg/mL) aos protocolos I (2139,0pg/mL) ( $p < 0,0001$ ) e III (2436,0pg/mL) ( $p = 0,0009$ ) no grupo controle. Nas pacientes com LSIL se observa uma redução da produção desta citocina no protocolo II (391,9pg/mL) quando comparado aos protocolos I (2139,0pg/mL) e III (1691,0pg/mL), sendo esta redução estatisticamente significativa quando comparados os protocolos I e II ( $p < 0,0001$ ). Nas pacientes com diagnóstico de HSIL observou-se uma redução significativa da produção desta citocina quando comparamos o protocolo II (250,2pg/mL) ao protocolo I (2139,0pg/mL) ( $p = 0,0001$ ). Também é possível observar esta redução quando comparamos o protocolo II (250,2pg/mL) ao protocolo III (1443,0pg/ml), entretanto sem relevância estatística (figura 32b).

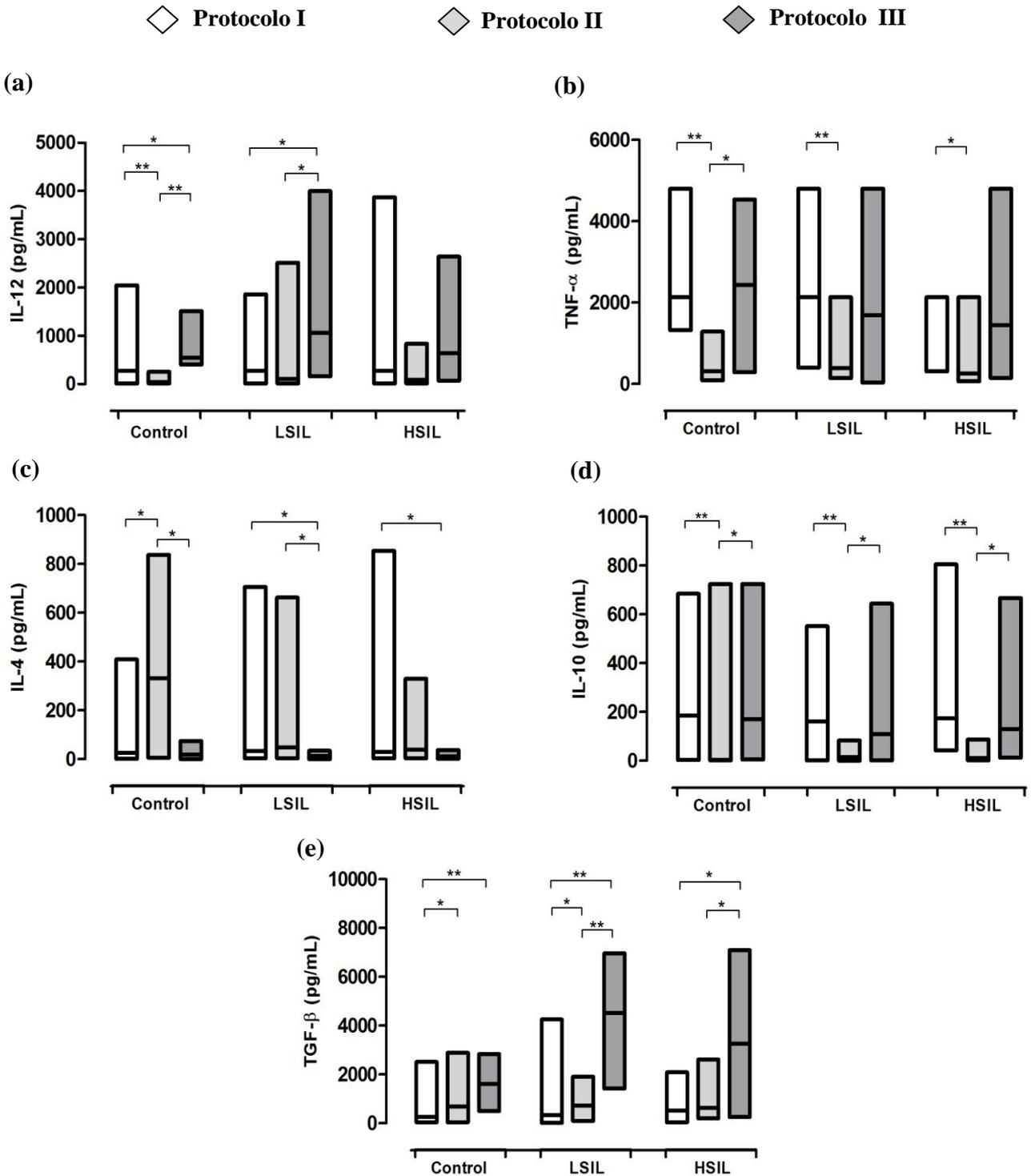
A figura 32c representa a concentração de IL-4, característica do perfil Th2, secretadas no sobrenadante da cultura de células dendríticas diferenciadas de acordo com os três protocolos utilizados. Observa-se que nos pacientes controles, há um aumento significativo da produção de IL-4 quando comparamos o protocolo II (330,6pg/mL) aos protocolos I (26,7pg/mL) ( $p = 0,0012$ ) e II (19,4pg/mL) ( $p = 0,0002$ ). Nas pacientes com diagnóstico de LSIL, pode-se observar uma redução estatisticamente significativa da produção desta citocina quando comparamos o protocolo III (13,0pg/mL) aos protocolos I (34,9pg/mL) ( $p = 0,0019$ ) e II (47,3pg/mL) ( $p = 0,0048$ ). Esta redução

também pode ser observada nas pacientes com diagnóstico de HSIL, quando comparamos o protocolo III (11,3pg/mL) ao protocolo I (29,9pg/mL) ( $p=0,0287$ ).

Em relação à produção de IL-10, pode observar-se que, no grupo controle, há uma redução estatisticamente significativa quando comparamos o protocolo II (3,6pg/mL) aos protocolos I (184,5pg/mL) ( $p<0,0001$ ) e III (169,7pg/mL) ( $p=0,0002$ ). Nas pacientes com LSIL, se observa uma redução estatisticamente significativa para a produção desta citocina quando comparamos o protocolo II (15,49pg/mL) aos protocolos I (184,5pg/mL) ( $p<0,0001$ ) e III (108,6pg/mL) ( $p=0,0158$ ). É possível observar-se também esta redução quando comparamos o protocolo II (11,0pg/mL) aos protocolos I (173,7pg/mL) ( $p<0,0001$ ) e III (129,6pg/mL) ( $p=0,0160$ ) nas pacientes com diagnóstico de HSIL (figura 32d).

Em relação à produção de TGF- $\beta$ , citocina característica do perfil T regulatório, pode-se observar que há um aumento da produção desta citocina nos protocolos II (688,3pg/mL) ( $p=0,0192$ ) e III (1602,0pg/mL) ( $p<0,0001$ ) quando comparados ao protocolo I (260,2pg/mL) nos pacientes controle. Nas pacientes com LSIL, pode-se observar um aumento estatisticamente significativo da produção desta citocina no protocolo III (4525,0pg/mL) quando comparado aos protocolos I (334,5pg/mL) e II (721,9pg/mL) ( $p<0,0001$ ). Além disso, observa-se também um aumento significativo da produção desta citocina quando comparamos o protocolo II (721,9pg/mL) ao protocolo I (334,5pg/mL) ( $p=0,0337$ ). Nas pacientes com HSIL, observa-se, um aumento estatisticamente significativo da produção de TGF- $\beta$  no protocolo III (3254,0pg/mL) quando comparado aos protocolos I (526,5pg/mL) ( $p=0,0067$ ) e II (626,1pg/mL) ( $p=0,0420$ ) (figura 32e).

A tabela 3 apresenta os resultados obtidos através da análise por citometria de fluxo e ELISA, das células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico de pacientes com LSIL, HSIL, câncer cervical invasivo e pacientes controle, submetidos a três diferentes protocolos de ativação. Os resultados estão representados em mediana (teste de *Kruskal-Wallis*).



**Figura 32: Citocinas secretadas no sobrenadante da cultura de DCs diferenciadas de acordo com os protocolos I, II e III.** (a) Concentração de IL-12 no sobrenadante da cultura de DCs diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes com LSIL, HSIL e pacientes controles; (b) Concentração de TNF- $\alpha$  no sobrenadante da cultura de DCs diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes com LSIL, HSIL e pacientes controles; (c) Concentração de IL-4 no sobrenadante da cultura de DCs diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes com LSIL, HSIL e pacientes controles; (d) Concentração de IL-10 no sobrenadante da cultura de DCs diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes com LSIL, HSIL e pacientes controles; (e) Concentração de TGF- $\beta$  no sobrenadante da cultura de DCs diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes com LSIL, HSIL e pacientes controles. Resultados representados em mediana – linhas horizontais – e diferenças estatisticamente significantes representadas quando  $p < 0,05$  (teste de *Kruskal-Wallis*). \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,0001$ ).

**Tabela 3: Análise das células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos de pacientes com LSIL, HSIL, câncer cervical invasivo e pacientes controle.**

	PROTOCOLO I				PROTOCOLO II			PROTOCOLO III			
	Frequencia de Células Positivas (%)										
	Controle	LSIL	HSIL	INVASIVO	Controle	LSIL	HSIL	Controle	LSIL	HSIL	
<b>CD11c</b>	42,65	30,91	39,54	33,87	2,19	1,57	7,26	30,17	46,36	32,76	
<b>CD123</b>	1,25	0,82	2,535	0,38	0,57	0,49	0,99	0,42	0,47	0,415	
<b>CD123/CD11c</b>	6,22	4,5	6,85	3,02	2,38	1,87	3,31	1,36	4,56	2,21	
<b>HLA-DR</b>	6,96	5,755	5,65	1,595	0,7	0,62	1,76	6,6	6,95	4,235	
<b>CD86</b>	3,25	2,05	2,56	1,12	0,57	0,67	1,11	1,91	1,595	3,44	
<b>CD80</b>	0,19	0,175	0,23	0,1	0,36	0,84	1,21	0,15	0,245	0,3	
<b>CD209</b>	1,73	1,15	1,16	0,265	0,62	0,6	1,49	0,82	0,27	0,455	
	Intensidade Média de Fluorescência (MFI)										
<b>CD11c</b>	2895	3650	3164	2966	2057	2488	3485	3174	3630	3531	
<b>CD123</b>	1134	1405	1459	1323	1754	1863	1611	1346	1376	1233	
<b>CD123/CD11c</b>	4788	4294	4358	3080	1346	1491	1834	4794	6352	2712	
<b>HLA-DR</b>	891,4	990,2	1015	1014	809,1	1153	881,1	572,3	1022	986,6	
<b>CD86</b>	1425	1400	1436	1330	1436	1736	1562	1191	1317	1160	
<b>CD80</b>	1640	1810	1717	1833	2455	2318	1847	1268	1505	2149	
<b>CD209</b>	776,1	919,9	877,1	969,3	952,9	1160	1009	520,1	841,9	1047	
	Produção de Citocinas (pg/mL)										
<b>IL-2</b>	5,492	43,31	20,6	19,43	1,238	31,33	35,44	1,238	11,74	19,52	
<b>IL-4</b>	26,68	34,97	29,95	31,3	330,6	47,31	39,16	19,43	13,02	11,34	
<b>IL-10</b>	184,5	153,1	173,7	123,5	3,602	15,49	11,01	169,7	108,6	129,6	
<b>IL-12</b>	272,8	271,5	277,2	244,6	42,77	105	84,21	544	1059	641	
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	53,83	43,5	53,34	55,42	31,13	54,55	60,42	20,29	81,07	72,54	
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	2139	2139	2139	1606	306,4	391,9	250,2	2436	1691	1443	
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	260,2	334,5	526,5	479,3	688,3	721,9	626,1	1602	4525	3254	

# ***DISCUSSÃO***

---

## 6. DISCUSSÃO

Os tratamentos antitumorais tradicionais conquistaram importante avanço clínico com o passar dos anos, entretanto, devido a algumas limitações, nem sempre se observa a completa erradicação da doença. A cirurgia e a radioterapia, por exemplo, são importantes no tratamento de tumores localizados. Nos estágios mais avançados, em que se observa a disseminação da doença, a quimioterapia é mais utilizada, porém, seus efeitos tóxicos sobre os tecidos normais podem limitar sua utilização. A descoberta de respostas imunológicas específicas para o tumor em pacientes com câncer estimulou o desenvolvimento de imunoterapias que visam aumentar as respostas imunes antitumorais (BAXEVANIS; PEREZ; PAPAMICHAIL, 2009).

No ano de 1994, os pesquisadores Federica Sallusto e Antonio Lanzavecchia desenvolveram uma técnica capaz de induzir a diferenciação de células dendríticas maduras a partir de monócitos do sangue periférico utilizando a combinação das citocinas IL-4, GM-CSF e TNF- $\alpha$ . Desde então, diversos protocolos têm sido desenvolvidos no intuito de aprimorar a função destas células, uma vez que sua capacidade de ativar linfócitos T virgens e iniciar uma resposta imunológica depende do seu estado de maturação (APOSTOLOPOULOS et al., 2014; FIGDOR et al., 2004; SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994).

Diversos estudos têm demonstrado que células dendríticas obtidas de pacientes com câncer apresentam propriedades tolerogênicas (FRICK; GRÜNEBACH; AUTENRIETH, 2010) e disfuncionais, particularmente no que se diz respeito à capacidade de gerar respostas de linfócitos T (SATTHAPORN et al., 2004). Tomando-se por base estas informações, neste estudo buscamos avaliar, através da expressão de marcadores de superfície e da produção de citocinas, o perfil de ativação das DCs diferenciadas a partir de monócitos obtidos de pacientes com câncer cervical invasivo, lesão intraepitelial cervical de diferentes graus e pacientes normais, submetidos a três diferentes protocolos de ativação, no intuito de verificar se o estadiamento da lesão cervical pode influenciar no processo de diferenciação e maturação destas células.

No câncer, diversas características das células mieloides, incluindo as propriedades migratórias e funcionais, estão alteradas (RICHARDS; HETTINGER; FEUERER, 2013). Além disso, estudos mostram que pacientes com diversos tipos de tumores, incluindo mama, próstata e glioma, apresentam uma prevalência de células dendríticas imaturas, com diminuída capacidade funcional, no sangue periférico dos pacientes com a doença em estágios mais avançados (PINZON-CHARRY; MAXWELL; LÓPEZ, 2005).

Em nosso estudo, a análise da expressão dos marcadores de superfície mieloide e plasmocitóide nas células dendríticas diferenciadas de monócitos obtidos de pacientes com diagnóstico de LSIL, HSIL e câncer cervical invasivo, comparada ao perfil observado nos pacientes controles revelou que, no protocolo I, houve uma tendência à diminuição do percentual de células positivas para a molécula CD11c de acordo com o estadiamento da lesão, entretanto sem significância estatística. Além disso, observou-se também uma redução significativa da porcentagem de células positivas para a molécula CD123, característica das células dendríticas plasmocitóides, nas pacientes com diagnóstico de câncer cervical invasivo em relação ao grupo HSIL, sugerindo que a capacidade de diferenciação dos monócitos em DCs pode estar comprometida nas pacientes com câncer cervical. Esta deficiência no processo de diferenciação das células dendríticas também foi observada em pacientes com câncer colorretal, em um estudo publicado por Orsini e colaboradores, no ano de 2013 (ORSINI et al., 2013).

Em contrapartida, as células dendríticas diferenciadas utilizando-se o protocolo II, apresentaram uma tendência ao aumento do percentual de células positivas para as moléculas CD123 e CD11c nas pacientes com lesão intraepitelial de alto grau em comparação ao grupo controle, sem significância estatística, o que também foi observado na protocolo III, em relação à expressão de CD11c, sendo este aumento estatisticamente significativo quando comparamos o grupo LSIL ao grupo controle, neste protocolo. Estes resultados sugerem que o estímulo indireto com LPS possa contribuir para o processo de diferenciação das DCs, revertendo o comprometimento observado nas pacientes com diferentes estadiamentos de lesão cervical.

O LPS é o principal componente da membrana externa de bactérias gram-negativas. O reconhecimento desta molécula pelo receptor de membrana TLR4 ativa diversas vias de sinalização intracelular, incluindo a IKK (*I kappa B kinase*) e as MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*). Estas vias de sinalização por sua vez ativam uma variedade de fatores de transcrição, incluindo o NF- $\kappa$ B e a AP-1, relacionadas à indução de diferentes genes que codificam moléculas inflamatórias (GUHA; MACKMAN, 2001). De acordo com o estudo publicado por NOTI e colaboradores no ano de 1996, o fator de transcrição AP-1 é capaz de regular diretamente a expressão da molécula CD11c (NOTI; REINEMANN; PETRUS, 1996), o que condiz com os achados encontrados em nosso estudo.

Curiosamente, observamos a presença de uma pequena porcentagem de células positivas para ambas as marcações, mieloide e plasmocitóide, utilizando-se os três protocolos para diferenciação das células dendríticas. Segundo Shi e colaboradores, estas células representam um

estágio inicial imaturo de células dendríticas mieloides com grande potencial antitumoral (SHI et al., 2008) e são importantes candidatas para o uso em protocolos de imunoterapia com células T adotivas (WARD; STEWART; SCHWARER, 2006).

O CD209, também conhecido como DC-SIGN, é uma importante molécula de adesão envolvida na interação entre células dendríticas e linfócitos T (GEIJTENBEEK et al., 2000). A expressão deste marcador nas células dendríticas é dependente do estímulo com IL-4 e pode ser regulada negativamente através do estímulo com TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e agentes anti-inflamatórios (RELLOSO et al., 2002).

Nossos resultados mostraram que há uma redução significativa da porcentagem de células positivas para CD209 nas pacientes com câncer cervical invasivo comparado ao grupo controle no protocolo I, sugerindo que não apenas o processo de diferenciação, mas também o processo de maturação possa estar comprometido nas pacientes com câncer cervical. Os demais protocolos utilizados não evidenciaram alterações significativas para expressão desta molécula.

A molécula de HLA-DR é uma molécula de CHP de classe II importante para a apresentação de antígenos peptídicos processados pelas células dendríticas. Em nosso estudo não observamos alteração na expressão desta molécula nas células obtidas das pacientes com lesão cervical em comparação ao grupo controle utilizando o protocolo I, sugerido que o grau de lesão não interfere na expressão deste marcador, o que também foi observado em células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico de pacientes com câncer de mama e pacientes normais (GABRILOVICH et al., 1997).

No ano de 2003, Wolf e colaboradores demonstraram que há um aumento do número de linfócitos T regulatórios no sangue periférico de pacientes com diferentes tipos de câncer (WOLF et al., 2003). Estas células sintetizam o TGF- $\beta$ , uma citocina capaz de auxiliar no desenvolvimento tumoral (BLOBE; SCHIEMANN; LODISH, 2000). Luttmann e colaboradores observaram que esta citocina é capaz de inibir a expressão de HLA-DR em eosinófilos ativados do sangue periférico (LUTTMANN et al., 1998). O aumento significativo da expressão de HLA-DR nas pacientes com diagnóstico de HSIL comparado ao grupo controle, utilizando-se a protocolo II para a ativação das células dendríticas, observado em nosso estudo pode estar relacionado à ausência de linfócitos T regulatórios no sobrenadante de cultura de DCs, que neste protocolo foram cultivadas isoladamente.

Assim como o estadiamento da lesão pode influenciar na expressão de marcadores de superfície, é possível que também ocorram alterações na produção de citocinas no sobrenadante da cultura de células dendríticas.

No ano de 1986, Mosmann e colaboradores observaram que os clones de células T auxiliares poderiam ser divididos em duas classes, Th1 e Th2, de acordo com o perfil de citocinas sintetizadas por estas células (MOSMANN et al., 1986). Posteriormente foi descrito outra subpopulação de linfócitos T auxiliares, denominados de linfócitos T reguladores (Treg) (SAKAGUCHI, 2004).

A diferenciação de linfócitos do perfil Th1 ocorre através do estímulo com IL-12, uma vez ativadas, estas células produzem IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ , que intensificam a resposta imunológica mediada por células (ATHIE-MORALES et al., 2004). Os linfócitos do perfil Th2 são induzidos mediante estímulo com IL-4 e sintetizam IL-4 e IL-5, citocinas importantes no desenvolvimento de respostas imunes humorais (MOWEN; GLIMCHER, 2004). A geração de respostas do perfil Th1 parece estar envolvida no desenvolvimento de uma resposta antitumoral eficaz, o mesmo não ocorre na geração de células do perfil Th2 (KENNEDY; CELIS, 2008; SREDNI et al., 1996).

Os linfócitos T reguladores exercem papel imunossupressor, principalmente mediante a produção de TGF- $\beta$ , e estão envolvidas na manutenção da autotolerância, prevenção de doenças autoimunes e de respostas exacerbadas contra microorganismos (SAKAGUCHI, 2004). Além disso, estas células podem contribuir para o desenvolvimento tumoral através da supressão da resposta imunológica (BEYER; SCHULTZE, 2006).

A IL-12 é uma importante citocina envolvida na ativação de linfócitos do perfil Th1. Além disso, esta citocina é capaz de estimular a citotoxicidade e a produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e células NK (DORMAN; HOLLAND, 2000; HEISER et al., 2002). Em nosso estudo não observamos diferenças estatisticamente significantes para a produção desta citocina entre os grupos estudados. Sugerindo que o grau de lesão cervical não tem influência sob a produção desta citocina.

A IL-2 é um importante fator envolvido na proliferação de linfócitos T durante o processo de apresentação antigênica. Esta citocina é capaz de induzir mecanismos anti-apoptóticos que inibem a morte das células do sistema imune (SWAIN, 1991). Em nosso estudo observamos que, para todos os protocolos utilizados, há uma maior produção desta citocina nas pacientes com lesão cervical em comparação com os pacientes controle. Este aumento foi significativo apenas quando comparamos os grupos LSIL e HSIL ao grupo controle no protocolo II. Este aumento pode estar relacionado ao estado proliferativo observado nestas pacientes, além disso, existem evidências de que as próprias células tumorais das pacientes com câncer cervical são capazes de sintetizar IL-2 como um fator de crescimento autócrino (RANGEL-CORONA et al., 2010).

O INF- $\gamma$  também está relacionado à indução de respostas do perfil Th1, além disso, esta citocina é capaz de mediar a ativação de macrófagos e linfócitos T citotóxicos, que exercem

importante papel na resposta imune antitumoral (IKEDA; OLD; SCHREIBER, 2002; MURPHY et al., 2000). Em nosso estudo não observamos alterações significativas para a produção desta citocina entre os grupos e protocolos estudados.

O TNF- $\alpha$  é uma importante citocina inflamatória, envolvida na apoptose, sobrevida e proliferação celular. Esta citocina aumenta a expressão de moléculas de CHP de classe I e a sensibilidade das células neoplásicas à lise, potencializando, desta forma uma resposta imune antitumoral (DESHPANDE et al., 2005; DUARTE et al., 2005).

A quantificação de citocinas no sobrenadante da cultura de células dendríticas diferenciadas a partir do protocolo I sugere que exista uma diminuição da polarização de linfócitos T do perfil Th1, pois se observou uma redução significativa da produção de TNF- $\alpha$ , quando comparamos o grupo invasivo ao grupo controle. Esta redução pode estar relacionada à maturação das células dendríticas, que como foi observado anteriormente, através da expressão de CD209, está reduzida nestas pacientes.

A IL-4 é a principal citocina secretada por linfócitos do perfil Th2. Nossos resultados mostram que no protocolo I não houve diferença estatisticamente significante para a síntese desta citocina entre os grupos estudados, sugerindo que o grau de lesão cervical não interfere em sua produção. Por outro lado, observamos que houve uma redução significativa da produção desta citocina no grupo HSIL comparado ao grupo controle, no protocolo II. Estes achados, em associação ao aumento de IL-2, observado nos mesmos grupos, sugerem que há uma tendência à polarização de uma resposta Th1 utilizando-se este protocolo.

Nas células normais, o TGF- $\beta$  atua como um supressor tumoral, pois é capaz de inibir a proliferação celular ou promover a diferenciação celular e apoptose. No entanto, nos estágios iniciais da tumorigênese, as células perdem a inibição do crescimento mediada pelo TGF- $\beta$ , como resultado de mutação ou perda da expressão dos genes relacionados à via de sinalização do TGF- $\beta$ . Uma vez resistente à inibição do crescimento por TGF- $\beta$ , as células tumorais e as células estromais presentes no tumor aumentam sua produção de TGF- $\beta$ , que estimula a angiogênese, a motilidade celular e a supressão do sistema imune, favorecendo o processo de invasão e metástase das células tumorais (BLOBE; SCHIEMANN; LODISH, 2000).

No protocolo III, evidenciou-se um aumento expressivo do TGF- $\beta$  nas pacientes com lesões intraepiteliais escamosas, significativo nas pacientes com LSIL em comparação ao grupo controle, o que pode estar relacionado à presença de linfócitos T reguladores no sobrenadante da cultura, que,

segundo Caramalho e colaboradores, podem ser ativados mediante estímulo com LPS (CARAMALHO et al., 2003).

Diversos protocolos têm sido descritos para maturação de DCs a partir de células dendríticas imaturas, incluindo estímulos com TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , produtos bacterianos, como o LPS, interferons e prostaglandinas (HAN et al., 2009; SNIJDERS et al., 1998; TEN BRINKE et al., 2007). Os protocolos de maturação convencionais utilizam a combinação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e prostaglandina E2 capazes induzir a diferenciação de DCs maduras com grande capacidade co-estimulatória e de migração, mas com capacidade reduzida de produção da IL-12 (JONULEIT et al., 1997; NICOLETTE et al., 2007).

O estímulo com LPS está relacionado à maior expressão da molécula co-estimulatória CD80 e ao aumento da produção da IL-12 (ELKORD et al., 2005; SNIJDERS et al., 1998; TEN BRINKE et al., 2007). Han e colaboradores publicaram em 2009 um estudo em que avaliaram se a maturação das células dendríticas ativadas com LPS e IFN- $\gamma$  poderia ser melhorada através do estímulo com outras citocinas, como a IL-1 e o TNF- $\alpha$ . Neste estudo os autores observaram que não houve diferenças estatísticas para a expressão de moléculas co-estimulatórias, HLA-DR e para a produção de IL-12 utilizando ambos os coquetéis de citocinas (HAN et al., 2009).

Em nosso estudo avaliamos se o estímulo com o LPS poderia melhorar a maturação observada em células dendríticas ativadas através do estímulo com TNF- $\alpha$ . Não foram encontrados na literatura, ao que sabemos pesquisas semelhantes que tenham utilizado as mesmas combinações de citocinas ou os mesmos protocolos utilizados nesta pesquisa.

Nossos resultados evidenciaram uma redução significativa do percentual de células positivas para CD11c quando comparamos o protocolo II aos demais protocolos utilizados para diferenciação de DCs, sugerindo que a presença de células não aderentes no sobrenadante da cultura de monócitos do sangue periférico possa auxiliar na diferenciação das células dendríticas.

Ao avaliar-se a expressão do HLA-DR entre os protocolos utilizados, podemos observar que há uma redução do percentual de células positivas para esta molécula quando comparamos o protocolo II aos protocolos I e III, em todos os grupos de pacientes estudados. Esta redução foi estatisticamente significativa quando comparamos o protocolo II aos protocolos I e III nas pacientes com diagnóstico de LSIL e nos pacientes controles, sugerindo que o processo de maturação das células dendríticas também seja influenciado pela presença de células não aderentes no sobrenadante da cultura destas células.

Evidenciou-se, também uma menor expressão de CD86 nas DCs diferenciadas de acordo com o protocolo II em comparação aos demais protocolos utilizados. Esta redução do percentual de células positivas para CD86 foi significativa quando comparamos o protocolo II aos protocolos I e III nos pacientes controles e quando comparamos o protocolo II ao protocolo I nas pacientes com diagnóstico de LSIL. Sugerindo que as células não aderentes presentes no sobrenadante da cultura estimulam não só a expressão de HLA-DR como também a expressão de CD86 nas DCs diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico.

Comparando-se os protocolos utilizados para diferenciação, observamos que houve uma menor produção desta citocina utilizando-se o protocolo II em comparação aos protocolos I e III, para todos os grupos de pacientes avaliados. Esta redução foi estatisticamente significativa quando comparamos o protocolo II aos protocolos I e III nos pacientes controles, e quando comparamos o protocolo II ao protocolo III nas pacientes com LSIL. Esta redução da produção de IL-12 está diretamente relacionada ao percentual de células dendríticas CD11c<sup>+</sup> que, como já foi mencionado anteriormente, é reduzido neste protocolo.

Além disso, podemos observar que para todas as pacientes avaliadas, há um aumento da produção de IL-12 quando utilizamos o protocolo III para diferenciação das DCs. Este aumento é estatisticamente significativo quando comparamos o protocolo III aos protocolos I e II nos grupos LSIL e controle, sugerindo que o estímulo com TNF- $\alpha$  associado ao LPS induz a uma maior produção desta citocina por células dendríticas.

Em nosso estudo, evidenciou-se uma redução da síntese de TNF- $\alpha$  na cultura de DCs diferenciadas segundo o protocolo II. Esta redução foi estatisticamente significante quando comparamos o protocolo II aos protocolos I e III para os pacientes controles, e quando comparamos o protocolo II ao protocolo I, nas pacientes com diagnóstico de LSIL e HSIL, sugerindo que este protocolo de diferenciação possa reduzir a síntese de citocinas do perfil Th1.

Em relação à produção da IL-10 não observamos alterações na produção desta citocina entre as pacientes avaliadas. No entanto, podemos observar que houve redução significativa da produção desta citocina utilizando-se o protocolo II para diferenciação das células dendríticas em comparação aos demais protocolos utilizados. Esta citocina pode ser produzida por diferentes tipos de células (BINGISSER et al., 2000) e apesar de estar incluída no perfil de resposta Th2, devido às suas propriedades imunossupressoras e sua capacidade de estimular linfócitos B, existem estudos mostrando que esta citocina pode ser produzida por células do perfil Th1 (GROUX et al., 1998; TRINCHIERI, 2007).

Comparando-se os protocolos utilizados observou-se que houve um aumento da produção de TGF- $\beta$  nos protocolos II e III em comparação ao protocolo I para todos os grupos de pacientes avaliados. Este aumento pode estar relacionado ao estímulo com LPS que, como descrito anteriormente, é capaz de ativar linfócitos T reguladores, produtores desta citocina.

# ***CONCLUSÃO***

---

## 7. CONCLUSÃO

Nosso estudo revelou que o processo de diferenciação e ativação das células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico de pacientes com câncer cervical invasivo está prejudicado.

Os resultados observados a partir da comparação entre os protocolos utilizados revelam que o estímulo com LPS é capaz de induzir uma melhor diferenciação das células dendríticas ativadas com TNF- $\alpha$ , obtidas de pacientes com diagnóstico de LSIL e HSIL. Além disso, observamos também que o LPS é capaz de induzir o aumento da expressão de CD86 e HLA-DR e de induzir respostas do perfil Th1, o que pode ser observado pelo aumento da produção de IL-12, característica deste perfil, e pela redução da síntese de IL-4, citocina produzida por linfócitos do perfil Th2.

A presença de células não aderentes na cultura de células dendríticas parece ser essencial para seu processo de diferenciação, uma vez que sua remoção, no protocolo II, induziu uma redução significativa da expressão dos marcadores de superfície CD11c, CD86 e HLA-DR, e da síntese de IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-10. Assim, mais estudos tornam-se necessários para compreensão dos efeitos das células não aderentes e do estímulo com TNF- $\alpha$  associado ao LPS sobre o processo de diferenciação e maturação das células dendríticas.

# *REFERÊNCIAS*

---

## REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, A. L.; CRESSWELL, P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. **Nature immunology**, v. 5, n. 7, p. 678–84, jul. 2004.
- ANDERSON, D. M. et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. **Nature**, v. 390, n. 6656, p. 175–179, 1997.
- APGAR, B. S.; ZOSCHNICK, L. The 2001 Bethesda System Terminology. **American Family Physician**, v. 68, n. 10, p. 1992–1998, 2003.
- APOSTOLOPOULOS, V. et al. Dendritic cell immunotherapy: clinical outcomes. **Clinical & Translational Immunology**, v. 3, n. 7, p. e21, 2014.
- ATHIE-MORALES, V. et al. Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 172, n. 1, p. 61–69, 2004.
- BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of Dendritic Cells. **Annual review of immunology**, v. 18, p. 767–811, 2000.
- BANCHEREAU, J. et al. Immune and Clinical Responses in Patients with Metastatic Melanoma to CD34+ Progenitor-derived Dendritic Cell Vaccine. **Cancer research**, v. 61, p. 6451–6458, 2001.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, p. 245–252, 1998.
- BAXEVANIS, C. N.; PEREZ, S. A.; PAPAMICHAIL, M. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 58, n. 3, p. 317–324, 2009.
- BEYER, M.; SCHULTZE, J. L. Regulatory T cells in cancer. **Blood**, v. 108, n. 3, p. 804–811, 2006.
- BINGISSER, R. et al. Interleukin-10 secretion by alveolar macrophages and monocytes in sarcoidosis. **Respiration; international review of thoracic diseases**, v. 67, n. 3, p. 280–286, 2000.
- BLOBE, G. C.; SCHIEMANN, W. P.; LODISH, H. F. Role of Transforming Growth Factor  $\beta$  in Human Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 4, n. May, p. 1350 – 1358, 2000.
- BOISE, L. H. et al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. **Immunity**, v. 3, n. 1, p. 87–98, 1995.
- BOONSTRA, A. et al. Flexibility of Mouse Classical and Plasmacytoid-derived Dendritic Cells in Directing T Helper Type 1 and 2 Cell Development: Dependency on Antigen Dose and Differential Toll-like Receptor Ligation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 1, p. 101–109, 23 dez. 2002.
- BOSCH, F. X.; SANJOSE, S. DE. The epidemiology of human papillomavirus infection and

cervical cancer. **Disease Markers**, v. 23, p. 213–227, 2007.

BRADLEY, L. M. Migration and T-lymphocyte effector function. **Current Opinion in Immunology**, v. 15, n. 3, p. 343–348, jun. 2003.

BURCHELL, A. N. et al. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. 52–61, 31 ago. 2006.

BURNET, S. M. Cancer - A Biological Approach. **British Medical Journal**, v. 1, p. 841–47, 1957.

CARAMALHO, I. et al. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 4, p. 403–411, 2003.

CHEN, L. et al. Costimulation of Antitumor Immunity by the B7 Counterreceptor for the T Lymphocyte Molecules CD28 and CTLA-4. **Cell**, v. 71, p. 1093–1102, 1992.

CHEN, Z. et al. Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes. **Arthritis and rheumatism**, v. 56, n. 9, p. 2936–46, set. 2007.

CORTHAY, A. et al. Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. **Immunity**, v. 22, n. 3, p. 371–83, mar. 2005.

DAUER, M. et al. Mature Dendritic Cells Derived from Human Monocytes Within 48 Hours: A Novel Strategy for Dendritic Cell Differentiation from Blood Precursors. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 8, p. 4069–4076, 15 abr. 2003.

DE VILLIERS, E.-M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 20 jun. 2004.

DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 1, p. 24–37, jan. 2006.

DEMOULIN, S. et al. Tumor microenvironment converts plasmacytoid dendritic cells into immunosuppressive/tolerogenic cells: insight into the molecular mechanisms. **Journal of leukocyte biology**, v. 93, n. 3, p. 343–52, mar. 2013.

DENIS, F.; HANZ, S.; ALAIN, S. Clearance, persistence and recurrence of HPV infection. **Gynécologie, obstétrique & fertilité**, v. 36, n. 4, p. 430–40, abr. 2008.

DESHPANDE, A. et al. TNF-alpha promoter polymorphisms and susceptibility to human papillomavirus 16-associated cervical cancer. **The Journal of infectious diseases**, v. 191, n. 6, p. 969–976, 2005.

DORMAN, S. E.; HOLLAND, S. M. Interferon- $\gamma$  and interleukin-12 pathway defects and human disease. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 11, n. 4, p. 321–333, 2000.

DOUGAN, M.; DRANOFF, G. Immune therapy for cancer. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 83–117, jan. 2009.

- DUARTE, I. et al. G-308A TNF- $\alpha$  polymorphism is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 334, n. 2, p. 588–592, 2005.
- DUDLEY, M. E. et al. Cancer Regression and Autoimmunity in Patients After Clonal Repopulation with Antitumor Lymphocytes. **Science**, v. 298, n. 5594, p. 850–854, 2002.
- ELKORD, E. et al. Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. **Immunology**, v. 114, n. 2, p. 204–212, 2005.
- ENZLER, T. et al. Deficiencies of GM-CSF and interferon gamma link inflammation and cancer. **The Journal of experimental medicine**, v. 197, n. 9, p. 1213–9, 5 maio 2003.
- FELTKAMP, M. C.; VREUGDENHIL, G. R.; VIERBOOM, M. P. et al. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. **European Journal of Immunology**. v. 23, n. 9, p. 2242–2249, 1993.
- FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 136, p. E359–E386, 13 set. 2014.
- FERRANTINI, M.; CAPONE, I.; BELARDELLI, F. Dendritic cells and cytokines in immune rejection of cancer. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 19, n. 1, p. 93–107, fev. 2008.
- FIGDOR, C. G. et al. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. **Nature medicine**, v. 10, n. 5, p. 475–480, 2004.
- FIGDOR, C. G.; KOOYK, Y. VAN; ADEMA, G. J. C-Type Lectin Receptors on Dendritic Cells and Langerhans Cells. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, p. 77–84, 2002.
- FRICK, J.S.; GRÜNEBACH, F.; AUTENRIETH, I. B. Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 300, n. 1, p. 19–24, 2010.
- FUKAURA, H. et al. Induction of Circulating Myelin Basic Protein and Proteolipid Protein-specific Transforming Growth Factor- $\beta$  1 – secreting Th3 T Cells by Oral Administration of Myelin in Multiple Sclerosis Patients. **J Clin Invest**, v. 98, n. 1, p. 70–77, 1996.
- GABRILOVICH, D. I. et al. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 3, n. 3, p. 483–490, 1997.
- GEIJTENBEEK, T. B. et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. **Cell**, v. 100, n. 5, p. 575–585, 2000.
- GELLER, M. A.; MILLER, J. S. Use of allogeneic NK cells for cancer immunotherapy. **Immunotherapy**, v. 3, n. 12, p. 1445–1459, 2011.

GERMAIN, R. N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: Providing ligands for T lymphocyte activation. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 287–299, 1994.

GORDON, S.; WILLIAM, S. Pattern Recognition Receptors : Doubling Up for the Innate Immune Response. **Cell**, v. 111, p. 927–930, 2002.

GREWAL, I. S.; FLAVELL, R. A. A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses. **Immunology Today**, v. 17, n. 9, p. 410–414, 1996.

GROUX, H. et al. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 160, n. 7, p. 3188–3193, 1998.

GUERMONPREZ, P. et al. ER – phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. **Nature**, v. 425, p. 397–402, 2003.

GUHA, M.; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. **Cellular signalling**, v. 13, n. 2, p. 85–94, 2001.

HAN, T. H. et al. Evaluation of Three Clinical Dendritic Cell Maturation Protocols Containing Lipopolysaccharide and Interferon-gamma. **J Immunother**, v. 32, n. 4, p. 399–407, 2009.

HART, D. N. J. Dendritic Cells: Unique Leukocyte Populations Which Control the Primary Immune Response. **Blood**, v. 90, n. 9, p. 3245–3288, 1997.

HAWIGER, D. et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 194, n. 6, p. 769–779, 2001.

HEATH, W. R. et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. **Immunological Reviews**, v. 199, p. 9–26, 2004.

HEISER, A. et al. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 3, p. 409–417, 2002.

IKEDA, H.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 13, n. 2, p. 95–109, 2002.

INCA. INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da Saúde. **Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil.** [s.l: s.n.].

INSINGA, R. P. et al. Incident cervical HPV infections in young women: transition probabilities for CIN and infection clearance. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 20, n. 2, p. 287–96, fev. 2011.

JONG, E. C. DE et al. Microbial Compounds Selectively Induce Th1 Cell-Promoting or Th2 Cell-

Promoting Dendritic Cells In Vitro with Diverse Th Cell-Polarizing Signals 1. **The Journal of Immunology**, v. 168, p. 1704–1709, 2002.

JONULEIT, H. et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. **European Journal of Immunology**, v. 27, n. 12, p. 3135–3142, 1997.

KADOWAKI, N. et al. Subsets of Human Dendritic Cell Precursors Express Different Toll-like Receptors and Respond to Different Microbial Antigens. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 6, p. 863–869, 2001.

KANAZAWA, N. Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. **Journal of Dermatological Science**, v. 45, n. 2, p. 77–86, 2007.

KELLEHER, P.; KNIGHT, S. C. IL-12 increases CD80 expression and the stimulatory capacity of bone marrow-derived dendritic cells. **International Immunology**, v. 10, n. 6, p. 749–755, 1998.

KENNEDY, R.; CELIS, E. Multiple roles for CD4<sup>+</sup> T cells in anti-tumor immune responses. **Immunol Rev**, v. 222, p. 129–144, 2008.

KERKHOFF, N. et al. Dendritic Cells in Myelodysplastic Syndromes. **Immunotherapy**, v. 5, n. 6, p. 621–637, 2013.

KIRKWOOD, J. M. et al. Immunotherapy of Cancer in 2012. **CA Cancer J Clin**, v. 62, n. 5, p. 309–335, 2012.

KOIDO, S. et al. Current immunotherapeutic approaches in pancreatic cancer. **Clinical & developmental immunology**, v. 2011, n. 1, p. 1–15, jan. 2011.

LANGERHANS, P. Über die Nerven der menschlichen Haut. **Virchow Archives of Pathological Anatomy and Histology**. v. 44, p. 325–337, 1868.

LEHRNBECHER, T. et al. Changes in host defence induced by malignancies and antineoplastic treatment : implication for immuno- therapeutic strategies. **Lancet Oncol**, v. 9, p. 269–278, 2008.

LIPSCOMB, M. F.; MASTEN, B. J. Dendritic Cells : Immune Regulators in Health and Disease. **Physiol Rev**, v. 82, p. 97–130, 2002.

LIU, Y. J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 259–262, 2001.

LUTTMANN, W. et al. Inhibition of HLA-DR expression on activated human blood eosinophils by transforming growth factor-beta1. **Scandinavian journal of immunology**, v. 48, n. 6, p. 667–671, 1998.

MA, Y. et al. Anticancer chemotherapy-induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 729–41, 18 abr. 2013.

- MACCALLI, C.; SCARAMUZZA, S.; PARMIANI, G. TNK cells (NKG2D+ CD8+ or CD4+ T lymphocytes) in the control of human tumors. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 58, n. 5, p. 801–8, maio 2009.
- MALDONADO-LÓPEZ, R. et al. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. **The Journal of experimental medicine**, v. 189, n. 3, p. 587–592, 1999.
- MARTIN-FONTECHA, A. et al. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. **The Journal of experimental medicine**, v. 198, n. 4, p. 615–21, 18 ago. 2003.
- MATIAS, B. F. et al. Influence of immunotherapy with autologous dendritic cells on innate and adaptive immune response in cancer. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, v. 7, p. 165–172, 2013.
- MOSER, M.; MURPHY, K. M. Dendritic cell regulation of T H 1-T H 2 development. **Nature Immunology**, v. 1, n. 3, p. 199–205, 2000.
- MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 136, n. 7, p. 2348–2357, 1986.
- MOWEN, K. A.; GLIMCHER, L. H. Signaling pathways in Th2 development. **Immunological Reviews**, v. 202, p. 203–222, 2004.
- MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 518–527, 2003.
- MURPHY, K. M. et al. Signaling and Transcription in T helper Development. **Annu. Rev. Immunol**, v. 18, p. 451–494, 2000.
- NICOLETTE, C. A. et al. Dendritic cells for active immunotherapy: Optimizing design and manufacture in order to develop commercially and clinically viable products. **Vaccine**, v. 25, n. SUPPL. 2, 2007.
- NIEROP, K. VAN; GROOT, C. DE. Human follicular dendritic cells: function, origin and development. **Seminars in Immunology**, v. 14, p. 251–257, 2002.
- NOELLE, R. J. CD40 and Its Ligand in Host Defense. **Immunity**, v. 4, p. 415–419, 1996.
- NOTI, J. D.; REINEMANN, B. C.; PETRUS, M. N. Regulation of the leukocyte integrin gene CD11c is mediated by AP1 and Ets transcription factors. **Molecular Immunology**, v. 33, n. 2, p. 115–127, 1996.
- ORSINI, G. et al. Defective generation and maturation of dendritic cells from monocytes in colorectal cancer patients during the course of disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p. 22022–22041, 2013.

- PALUCKA, K. et al. Dendritic Cells: Are They Clinically Relevant? **The Cancer Journal**, v. 16, n. 4, p. 318–324, 2010.
- PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 4, p. 265–77, abr. 2012.
- PARDOLL, D. M.; TOPALIAN, S. L. The role of CD4 + T cell responses in antitumor immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, p. 588–594, 1998.
- PENG, S.; TOMSON, T.; TRIMBLE, C. et al. Development of a DNA vaccine targeting HPV-16 oncogenic protein E6. **The Journal of Virology**. v. 78, p. 8468-8476, 2004.
- PINZON-CHARRY, A.; MAXWELL, T.; LÓPEZ, J. A. Dendritic cell dysfunction in cancer: A mechanism for immunosuppression. **Immunology and Cell Biology**, v. 83, n. 5, p. 451–461, 2005.
- PRIGOZY, T. I. et al. Glycolipid antigen processing for presentation by CD1d molecules. **Science (New York, N.Y.)**, v. 291, n. 5504, p. 664–667, 2001.
- PULENDRAN, B. P. et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 96, p. 1036–1041, 1999.
- RADFORD, K. J.; TULLETT, K. M.; LAHOUD, M. H. Dendritic cells and cancer immunotherapy. **Current opinion in immunology**, v. 27, n. DC, p. 26–32, abr. 2014.
- RANDOLPH, G. J. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. **Seminars in immunology**, v. 13, n. 5, p. 267–74, out. 2001.
- RANDOLPH, G. J.; SANCHEZ-SCHMITZ, G.; ANGELI, V. Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances. **Springer seminars in immunopathology**, v. 26, n. 3, p. 273–87, jan. 2005.
- RANGEL-CORONA, R. et al. Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. **Cytokine**, v. 50, n. 3, p. 273–277, 2010.
- RELLOSO, M. et al. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. **Journal of immunology**, v. 168, n. 6, p. 2634–2643, 2002.
- RICHARDS, D. M.; HETTINGER, J.; FEUERER, M. Monocytes and macrophages in cancer: Development and functions. **Cancer Microenvironment**, v. 6, n. 2, p. 179–191, 2013.
- RIETHER, C.; SCHÜRCH, C.; OCHSENBEIN, A. F. From “magic bullets” to specific cancer immunotherapy. **Swiss medical weekly**, v. 143, n. January, p. w13734, jan. 2013.
- RICHART, R.M. The natural history of cervical intraepithelial neoplasia. **Clin Obstet Gynecol**, v. 10, p. 748-84, 1967.

- RODRIGUES, C. M. et al. The role of T lymphocytes in cancer patients undergoing immunotherapy with autologous dendritic cells. **Clinical Medicine Insights. Oncology**, v. 5, p. 107–115, 2011.
- RONCAROLO, M. G. Type 1 T regulatory cells. **Immunological Reviews**, v. 182, p. 68–79, 2001.
- SABADO, R. L.; BHARDWAJ, N. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. **Immunotherapy**, v. 2, n. 1, p. 37–56, 2010.
- SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annual review of immunology**, v. 22, p. 531–562, 2004.
- SALLUSTO, B. F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human Dendritic Cells Is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor Plus Interleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. April, p. 1109 – 1118, 1994.
- SASAKI, K. et al. IL-4 inhibits VLA-4 expression on Tc1 cells resulting in poor tumor infiltration and reduced therapy benefit. **European journal of immunology**, v. 38, n. 10, p. 2865–73, out. 2008.
- SATTHAPORN, S. et al. Dendritic cells are dysfunctional in patients with operable breast cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 53, n. 6, p. 510–518, 2004.
- SAWANT, A. et al. Depletion of plasmacytoid dendritic cells inhibits tumor growth and prevents bone metastasis of breast cancer cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 189, n. 9, p. 4258–65, 1 nov. 2012.
- SCHLITZER, A. et al. Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. **Nature Immunology**, n. June, p. 1–13, 2015.
- SCHULER, P. J. et al. Phase I dendritic cell p53 peptide vaccine for head and neck cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 20, n. 9, p. 2433–2444, 2014.
- SCHWARTZ, R. H. Culture Model for T Lymphocyte Clonal Anergy. **Science**, v. 248, p. 1349–1356, 1990.
- SEGURA, E. et al. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. **Immunity**, v. 38, n. 2, p. 336–48, 21 fev. 2013.
- SHAHINIAN, A et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. **Science (New York, N.Y.)**, v. 261, n. 5121, p. 609–612, 1993.
- SHANKARAN, V. et al. IFN  $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature**, v. 410, p. 1107–1111, 2001.
- SHI, Y., EVANS, J.E., ROCK, K.L. Molecular identification of a danger signal that alerts the

immune system to dying cells. **Nature**. v. 425, p. 516-521, 2003.

SHUFORD, B. W. W. et al. 4-1BB Costimulatory Signals Preferentially Induce CD8 T Cell Proliferation and Lead to the Amplification In Vivo of Cytotoxic T Cell Responses. **Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 1, p. 47–55, 1997.

SICA, A. et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Seminars in cancer biology**, v. 18, n. 5, p. 349–55, out. 2008.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2015. **CA Cancer J Clin**, v. 65, n. 1, p. 5–29, 2015.

SNIJDERS, A et al. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. **International immunology**, v. 10, n. 11, p. 1593–1598, 1998.

SREDNI, B. et al. Predominance of TH1 response in tumor-bearing mice and cancer patients treated with AS101. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n. 18, p. 1276–1284, 1996.

STEINMAN, R. M.; BANCHEREAU, J. Taking dendritic cells into medicine. **Nature**, v. 449, n. 7161, p. 419–26, 27 set. 2007.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 137, p. 1142–1162, 1973.

SUTLU, T.; ALICI, E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. **Journal of internal medicine**, v. 266, n. 2, p. 154–81, ago. 2009.

SWAIN, S. L. Lymphokines and the Immune Response: the central role of interleukin-2. **Current opinion in immunology**, v. 3, n. 3, p. 304–310, 1991.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual review of immunology**, v. 21, n. 1, p. 335–376, 2003.

TANAKA, B. H. et al. Human Monocyte – derived Dendritic Cells Induce Naive T Cell Differentiation into T Helper Cell Type 2 (Th2) or Th1/Th2 Effectors: Role of Stimulator/Responder Ratio. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 3, p. 405–411, 2000.

TEN BRINKE, A. et al. The clinical grade maturation cocktail monophosphoryl lipid A plus IFN $\gamma$  generates monocyte-derived dendritic cells with the capacity to migrate and induce Th1 polarization. **Vaccine**, v. 25, n. 41, p. 7145–7152, 2007.

THOMAS, L. On Immunosurveillance in Human Cancer. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 55, p. 329–333, 1982.

TILLMAN, B., et al. Adenoviral vectors targeted to cd40 enhance the efficacy of dendritic cell-based vaccination against human papillomavirus 16-induced tumor cells in a murine model. **Cancer Research**. v. 60, p. 5456-5463, 2000.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 2, p. 239–243, 2007.

VAN KOOTEN, C.; BANCHEREAU, J. CD40-CD40 ligand. **Journal of leukocyte biology**, v. 67, n. 1, p. 2–17, 2000.

WALDMANN, T. A. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 8, p. 595–601, ago. 2006.

WARD, K. A; STEWART, L. A; SCHWARER, A P. CD34+-derived CD11c+ + + BDCA-1+ + CD123+ + DC: expansion of a phenotypically undescribed myeloid DC1 population for use in adoptive immunotherapy. **Cytotherapy**, v. 8, n. 2, p. 130–140, 2006.

WHO. World Cancer Report 2014. **Lyon: International Agency for Research on Cancer**, 2015.

WOLF, A. M. et al. Increase of Regulatory T Cells in the Peripheral Blood of Cancer Patients Advances in Brief Increase of Regulatory T Cells in the Peripheral Blood of Cancer Patients. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. February, p. 606–612, 2003.

YANAGIHARA, S. et al. EB1/CCR7 Is a New Member of Dendritic Cell Chemokine Receptor That Is Up-Regulated upon Maturation. **The Journal of Immunology**, v. 161, p. 3096–3102, 1998.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 260–5, 20 fev. 2009.

ANEXO A – Cópia do aceite do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM (683-2006/CEP).



Mem 09/08/IPON/UFTM  
Uberaba, 10 de Junho de 2008

Ao Sr. João Batista Ribeiro  
Coordenador do CEP-UFTM

Prezado Coordenador,

Venho por meio deste solicitar que no Parecer Consubstanciado (Parecer 683 de 10/03/2006), que trata de Imunoterapia com Células Dendríticas, sejam incluídos grupos de pacientes com neoplasias em outros órgãos, além do colo uterino. A presente solicitação justifica-se pelo fato de que a terapia citada pode ser aplicada no tratamento de neoplasia em outros órgãos por se tratar da mesma metodologia e dos mesmos reagentes descritos anteriormente, constituindo-se em um avanço para pacientes cujas terapias convencionais não são possíveis de serem realizadas, ou que não apresentaram resultados clínicos.

Atenciosamente,

  
 Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta  
 Prof. Titular – Disciplina de Ginecologia e Obstetria  
 Instituto de Pesquisa em Oncologia – IPON  
 Coordenador do Projeto

  
 João Batista Ribeiro  
 Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM

**ANEXO B – Modelo do termo de consentimento livre após esclarecimento.**

**TERMO DE ESCLARECIMENTO**

Você está sendo convidado a participar do estudo **“Imunoterapia com células dendríticas no tratamento do câncer”**. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso sua participação é importante. O objetivo deste estudo é:

- Estudar possíveis alterações imunológicas e patológicas de tumores.
- Avaliar o tratamento imunoterapêutico. Sintomas como dor muscular e aumento da temperatura podem ocorrer. Estas alterações podem ser tratadas e os pesquisadores orientarão sobre a medicação.
- Caso você participe, será necessário coletar amostra de sangue e do tumor (biópsia) para o estudo que estamos propondo e que normalmente é coletado para seus exames ou tratamentos, e que não lhe trazem risco de vida.

Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO**

Eu,....., li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.