

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

LARISSA MARINELLI PEREIRA

INTERLEUCINA-12 E PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR LINFÓCITOS T
AUXILIARES PERIFÉRICOS EM MULHERES COM CÂNCER SUBMETIDAS À
IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS

UBERABA- MG

2017

LARISSA MARINELLI PEREIRA

INTERLEUCINA-12 E PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR LINFÓCITOS T
AUXILIARES PERIFÉRICOS EM MULHERES COM CÂNCER SUBMETIDAS À
IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS

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

Orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta.

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin.

UBERABA-MG

2017

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

P492i Pereira, Larissa Marinelli
Interleucina-12 e produção de citocinas por linfócitos T auxiliares periféricos em mulheres com câncer submetidas à imunoterapia com células dendríticas / Larissa Marinelli Pereira. – 2017.
63 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017
Orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta
Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazzi Michelin

1. Neoplasias. 2. Células dendríticas. 3. Imunoterapia. 4. Linfócitos T. 5. Interleucina-12. I. Murta, Eddie Fernando Candido. II. Universidade Federal Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616-006



ATESTADO DE APROVAÇÃO

Uberaba, 22 de junho de 2017.

Defesa de dissertação e exame final de **LARISSA MARINELLI PEREIRA**, candidato (a) no grau de Mestre (a) em Ciências - Patologia Humana.

A Comissão Examinadora comunica à Coordenadoria do PGCS/UFTM, para os devidos fins, que procedeu, nesta data, ao exame da Dissertação de Mestrado "INTERLEUCINA-12 E PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR LINFÓCITOS T AUXILIARES PERIFÉRICOS EM MULHERES COM CÂNCER SUBMETIDAS À IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS" do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (área de concentração Patologia Humana), bem como ao exame final.

O (a) candidato (a) foi considerado (a) aprovado.

A COMISSÃO:

Dr. Eddie Fernando Candido Murta

Eddie Murta

Dra. Renata Margarida Etchebéhere

Renata Etchebéhere

Dr. Hélio Humberto Angotti Carrara

Hélio Carrara

DEDICATÓRIA

...Á Deus, pois nada seria sem ele e sem a sua permissão para que pudesse finalizar mais uma etapa de crescimento. Á Ele sempre serei grata pela minha vida, minha família e minhas infinitas oportunidades de crescimento...

...Aos meus pais, Samuel Pereira e Rossana Marinelli Figueiredo, e meus familiares, por estarem sempre ao meu lado me apoiando em minhas decisões e me auxiliando em minhas dificuldades...

...Ao meu padrasto Edésio Oliveira de Figueiredo, por toda educação que me deu e que me auxiliou a chegar onde estou hoje, o seu amor que ainda sinto dentro de mim é o que me dá forças para não desistir de meus sonhos...

...Ao meu namorado Rosemar Júnior, por toda compreensão e paciência durante nossos anos juntos, e principalmente pela companhia nos momentos bons e de dificuldades!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta e minha co-orientadora Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin, por todo ensinamento dado e á paciência nos meus momentos de dificuldades acadêmicas e pessoais, além da oportunidade de estar em um grupo de pesquisa onde a aprendizagem está sempre em primeiro lugar.

Agradeço a todos os professores que tive durante os meus anos de estudo por todo conhecimento adquirido, em especial aos professores da Pós Graduação em Ciências da Saúde, que sempre somaram em meus conhecimentos acadêmicos.

Aos funcionários da universidade que de forma direta ou indireta também somaram em meus conhecimentos, principalmente aos funcionários da disciplina de Imunologia, do serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Ambulatório Maria da Glória e da secretaria de Pós Graduação em Ciências da Saúde.

Aos colegas do IPON (Instituto de pesquisa em oncologia) e do curso de Pós Graduação, pelo companheirismo e auxilio nos momentos de dificuldades, além dos ensinamentos compartilhados que somaram em meus conhecimentos.

A cada paciente envolvido no projeto de pesquisa, não existem palavras para expressar a gratidão que sinto.

Agradeço os recursos financeiros que foram voltados para o desenvolvimento desta pesquisa á Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

“Se lhe chegarem dores, receba-as com calma e não se deixe atingir por elas. Não coloque sua felicidade no que vem de fora. Construa sua felicidade dentro de você mesmo, fazendo consistir sua ventura no progresso constante da vida do espírito, na sabedoria do coração.”

...

“Procure, pois, aprender o máximo, aplicando á sua vida o maior mandamento: ame a todos indistintamente, e verá a felicidade morar dentro de seu coração.”

Carlos Torres Pastorino

RESUMO

Introdução: Inúmeras células da resposta imune são envolvidas durante uma resposta antitumoral efetiva, dentre elas, linfócitos T citotóxicos e T auxiliares (Th). Vários estudos demonstram que a regressão tumoral é dependente da produção de IL-12, tanto em situações espontâneas ou quando o paciente é submetido a algum tipo de imunoterapia. Recentemente, foi descrito um novo subtipo de Th, o Th12, que está presente em humanos e animais com tumores. Contudo, sua função e a interação desse subtipo na resposta antitumoral ainda não estão claras. Portanto, neste estudo, assumimos como objetivo esclarecer se a imunoterapia de pacientes com células dendríticas, poderia alterar a quantidade desse novo subtipo, bem como investigar quais outras citocinas, além da IL-12, estariam sendo produzidas por esses linfócitos, como a interleucina-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina-10 (IL-10). **Metodologia:** Para a análise deste trabalho, quinze pacientes oncológicos foram submetidos à imunoterapia com CDs e os linfócitos do sangue periférico foram avaliados antes e após as duas primeiras imunoterapias. **Resultados:** Como resultados, verificou-se que em mulheres com câncer, a célula CD4+/IL-12+ apresentou a %GATE aumentada (***) $p < 0.0001$) e a MFI (média de intensidade de fluorescência) diminuída (***) $p = 0,0002$) e as citocinas IFN- γ (***) $p = 0,0093$) e IL-2 (***) $p = 0,0010$) apresentaram a MFI diminuída. Durante as fases da imunoterapia, a IL-12 apresentou uma diminuição na sua %GATE (* $p = 0,0312$). **Conclusão:** Mulheres com câncer invasivo apresentam níveis aumentados de linfócitos T auxiliares IL-12 e as duas primeiras imunoterapias com CDs induziram uma diminuição da diferenciação desse tipo celular.

Palavras chave: Câncer, células dendríticas, imunoterapia e interleucina-12.

ABSTRACT

Introduction: Numerous immune cells are involved during an effective antitumor response, among them, T cytotoxic and T helper (Th) lymphocytes. Several studies demonstrated that tumoral regression is dependent on the production of IL-12, both in spontaneous situations or when the patient is under any sort of immunotherapy. Recently, a new type of Th has been described, the Th12, which is present in humans and animals with tumors, however, its function and interactions are yet unclear. The aim of this study was to clarify if the immunotherapy of patients with dendritic cells (DC) could change the quantity of this new subtype, as well as investigate which cytokines, in addition to IL-12 would have been produced by these lymphocytes, such as interleukin-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10). Methods: Fifteen oncology patients were submitted to immunotherapy with DCs and the lymphocytes from the peripheral blood were evaluated before and after the first two immunotherapies. Results: In women with cancer, the CD4⁺/IL-12⁺ cell presented an increase of %GATE (*** $p < 0.0001$) and a decrease of MFI (average fluorescence intensity) (*** $p = 0.0002$) and the cytokines IFN- γ (** $p = 0.0093$) and IL-2 (*** $p = 0.001$) presented a decrease of MFI. During the immunotherapy phases, IL-12 showed a decrease of %GATE (* $p = 0.0312$). Conclusion: Women with invasive cancer present increased levels of IL-12 T helper lymphocytes and after the first two immunotherapies with DCs there was decrease of this cellular type.

Keywords: cancer, dendritic cells, immunotherapy, interleukin-12

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A formação de células cancerígenas e do tumor	16
Figura 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016	17
Figura 3 - Identificação da população de células de interesse	37

LISTA DE GRAFICOS

Gráfico 1 -Representação da marcação para linfócitos T totais entre os grupos controle e pré terapia.....	36
Gráfico 2 -Representação da marcação para linfócitos T totais nas fases da imunoterapia	36
Gráfico 3 -Representação da marcação para linfócitos T auxiliares IL-12 entre os grupos controle e pré-terapia	39
Gráfico 4 -Representação da marcação para linfócitos T auxiliares IL-12 nas fases da imunoterapia	40
Gráfico 5 -Representação da marcação para linfócitos T auxiliares IL-12 com produção de IFN- γ entre os grupos controle e pré-terapia	40
Gráfico 6 -Representação da marcação para linfócitos T auxiliares IL-12 com produção de IFN- γ nas fases da imunoterapia	41
Gráfico 7 -Representação da marcação para linfócitos T auxiliares IL-12 com produção de IL-2 entre os grupos controle e pré-terapia	41
Gráfico 8 -Representação da marcação para linfócitos T auxiliares IL-12 com produção de IL-2 nas fases da imunoterapia	42
Gráfico 9 -Representação da marcação para linfócitos T auxiliares IL-12 com produção de TNF- α entre os grupos controle e pré-terapia	42
Gráfico 10 -Representação da marcação para linfócitos T auxiliares IL-12 com produção de TNF- α nas fases da imunoterapia.....	43
Gráfico 11 -Representação da marcação para linfócitos T auxiliares IL-12 com produção de IL-10 entre os grupos controle e pré-terapia	43
Gráfico 12 -Representação da marcação para linfócitos T auxiliares IL-12 com produção de IL-10 nas fases da imunoterapia	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -Descrição do grupo estudado	29
Tabela 2 - Protocolo de vacinação	31
Tabela 3 - Protocolo de marcação de citometria	33
Tabela 4 -Distribuição por %GATE e MFI das marcações avaliadas por citometria de fluxo dos pacientes tratados com vacina de CDs	38

LISTA DE SIGLAS

APCs	Células apresentadoras de antígenos;
CCR	Receptores para quimiocinas
CDs	Células dendríticas;
cCDs	Células dendríticas convencionais
pCDs	Células dendríticas plasmocitóides
EDTA	Ácido etileno tetra-acético
FT	Fator de transcrição
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
IFN- α	Interferon α
IFN- γ	Interferon γ
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-1	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
INCA	Instituto nacional do câncer
IPON	Instituto de Pesquisa em Oncologia
MFI	Média de intensidade de fluorescência
MHC	Molécula do Complexo principal de histocompatibilidade
NK	Natural Killer

OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa
SEM	Erro padrão da média
T CD4 ⁺	T auxiliar
T CD8 ⁺	T citotóxico
TCR	Receptor dos linfócitos T
TGF- β	Fator de crescimento tumoral β
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	T regulatório
UFTM	Universidade Federal do Trângulo Miniero
VLPs	Vírus semelhantes a partículas

SUMÁRIO

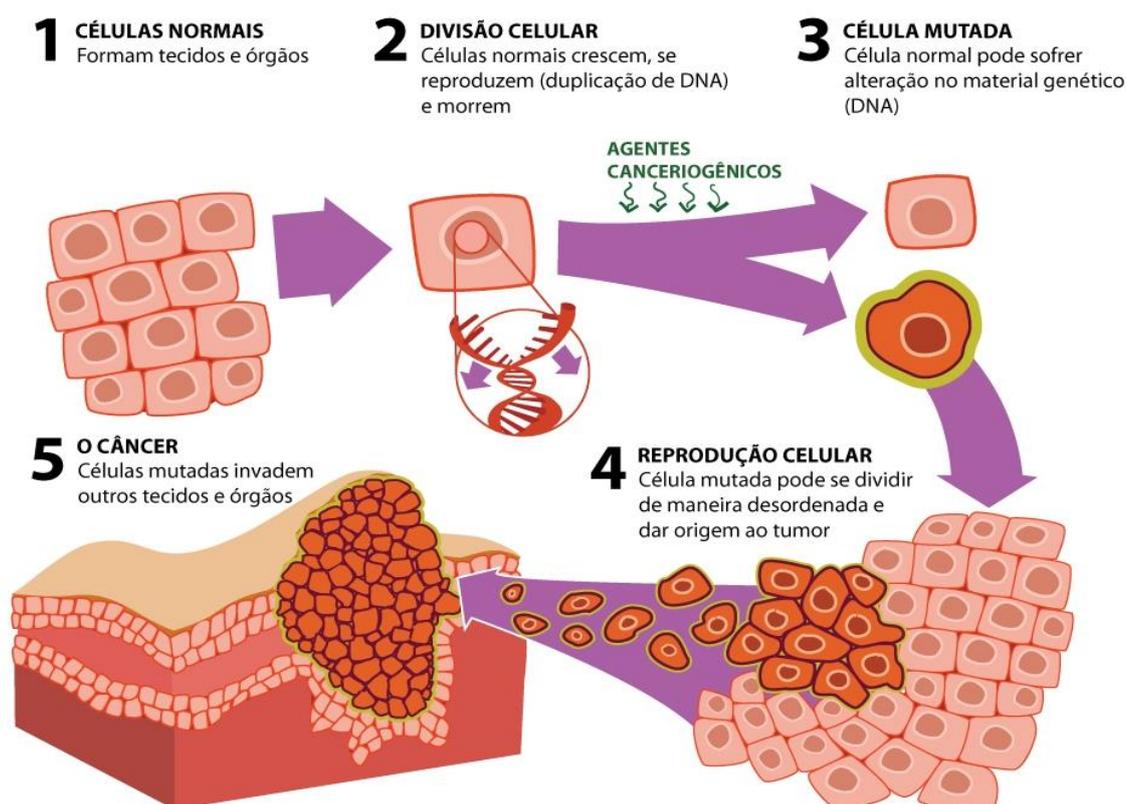
1. Introdução	15
1.1 Desenvolvimento do Câncer	16
1.2 Resposta Imune aos Tumores	18
1.2.1 Imunidade Inata e Adaptativa	18
1.2.2 Células Dendríticas	20
1.2.3 Linfócitos T Auxiliares	21
1.3 Imunoterapia de Tumores	22
1.3.1 Imunoterapia com Células Dendríticas	22
2.Objetivos	25
2.1 Objetivos Gerais	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3.Materiais e Métodos	27
3.1 Pacientes	28
3.1.1 Critérios de Inclusão	28
3.1.2 Critérios de Exclusão	28
3.2 Amostras Obtidas para Produção da Vacina e análise da resposta Imunológica	30
3.3 Obtenção das Células Mononucleares	30
3.4 Preparação da Vacina de Células Dendríticas Autólogas	31
3.5 Protocolo de Vacinação	31
3.6 Análise Celular por Citometria de Fluxo	31
3.7 Análise Estatística	33
4. Resultados	34
4.1 Identificação da população de células de interesse	35
4.2 Análise das populações de células por citometria de fluxo	35
4.2.1 Linfócitos T totais	35
4.2.2 Linfócitos T auxiliares IL-12	39
4.2.3 Linfócitos T auxiliares IL-12 com produção de IFN-γ	40

4.2.4	Linfócitos T auxiliares IL-12 com produção de IL-2	41
4.2.5	Linfócitos T auxiliares IL-12 com produção de TNF- α	42
4.2.6	Linfócitos T auxiliares IL-12 com produção de IL-10.....	43
5.	Discussão	45
6.	Conclusão	53
	Referências	55
	Apêndice A - Termo de Consentimento Livre, Após Esclarecimento	61
	Anexo A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa	63

1. Introdução

1.1.Desenvolvimento do Câncer

O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos (INCA, 2016). Não obstante, as células normais do organismo crescem e se multiplicam pela divisão celular, formando os órgão e tecidos. No entanto, agentes cancerígenos podem alterar a célula normal que está sendo formada, ocorrendo então uma mutação celular, em que a célula cancerígena é gerada e que, por sua vez, irá se reproduzir e invadir o tecido de origem, formando o tumor benigno ou tumor maligno (Figura 1) (HANAHAN, WEINBER, 2011;INCA, 2016).



Fonte: www.cs6acupuntura.wordpress.com/2013/10/08/a-acupuntura-no-tratamento-do-cancer/

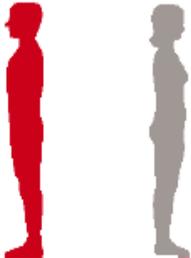
Figura 1: A formação de células cancerígenas e do tumor.

Vários fatores podem influenciar na ocorrência de uma mutação celular. Nesse cenário, observam-se os fatores extrínsecos, como tabagismo, alcoolismo, hábitos alimentares, hábitos sexuais sem o uso de preservativo, o uso de medicamentos em geral, fatores ocupacionais,

exposição à radiação, infecção por alguns patógenos e a poluição ambiental; nesse panorama, é possível destacar também o fator intrínseco da hereditariedade, sendo um fator extremamente recorrente ao se observar o desenvolvimento do câncer (CHAMMAS, *et al.* 2009; GLOBOCAN, 2012; INCA, 2016).

Estimativas mundiais feitas através do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (Iarc, do inglês International Agency for Research on Cancer), da Organização Mundial da Saúde (OMS), apontam que 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer ocorreram em todo o mundo no ano de 2012. Essas estimativas mostram que se as medidas preventivas não forem aplicadas, esse índice continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos; em 2030 a carga global poderá aumentar para 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade (GLOBOCAN, 2012; INCA, 2016).

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estima, para ano de 2016 e 2017, a ocorrência de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer, sendo o de pele do tipo não melanoma (180 mil casos novos) o mais incidente na população brasileira. Estudos do INCA também demonstram que nos homens os tipos mais frequentes de câncer são o de próstata (28,6%), pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6,0%) e cavidade oral (5,2%), já nas mulheres os mais frequentes são o de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) (Figura 2). Porém, novas estatísticas podem surgir a cada ano conforme o desenvolvimento do país, visto que as medidas de prevenção adotadas e que já demonstram resultados são de extrema importância (INCA, 2016).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%		Cólon e Reto	17.620	8,6%	
Cólon e Reto	16.660	7,8%		Colo do útero	16.340	7,9%	
Estômago	12.920	6,0%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%	
Cavidade Oral	11.140	5,2%		Estômago	7.600	3,7%	
Esôfago	7.950	3,7%		Corpo do útero	6.950	3,4%	
Bexiga	7.200	3,4%		Ovário	6.150	3,0%	
Laringe	6.360	3,0%		Glândula Tireoide	5.870	2,9%	
Leucemias	5.540	2,6%		Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%	
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%		Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%	

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Inca, 2016

Figura 2: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, 19 exceto pele não melanoma*

1.2.Resposta Imune a Tumores

Diversos componentes do sistema imunológico são ativados frente a invasão de um antígeno estranho, como células, citocinas, quimiocinas, proteínas, fatores de transcrição, receptores de ativação ou inibição, etc., que, juntos, têm como função orquestrar a ativação do sistema imunológico contra determinado antígeno invasor, como no caso dos antígenos cancerígenos. Esse sistema imunológico consiste na defesa do organismo contra micro-organismos patogênicos e não patogênicos (os chamados antígenos estranhos), através de duas linhas de defesa: a resposta imune inata e a adaptativa (ABBAS, *et al.*, 2015; BRUNO, *et al.*, 2014; PAUL, 2013).

1.2.1.Imunidade Inata e Adaptativa

A imunidade inata, também conhecida como natural ou nativa, medeia as reações imediatas contra os micro-organismos, proporcionando uma linha de defesa inicial a partir de barreiras físicas e químicas, células fagocitárias, células *natural killer* (NK), células dendríticas, proteínas do sangue e citocinas, que reconhecem estruturas comuns nos micro-organismos e moléculas produzidas pela lesão das células do hospedeiro, sem distinguir diferenças discretas (ABBAS, *et al.*, 2015; BRUNO, *et al.*, 2014; DEN HAAN, ARENS, VAN ZELM, 2014; PAUL, 2013).

A imunidade adaptativa, também conhecida como adquirida, é a segunda linha de defesa. Ela medeia reações tardias contra os micro-organismos após a ativação da imunidade inata, proporcionando uma defesa específica através de linfócitos B, que produzem anticorpos que levam a eliminação do antígeno estranho, por linfócitos T do tipo auxiliar (T CD4⁺), que produzem citocinas que auxiliam na ativação de mais citocinas e células específicas para combater determinado antígeno estranho, e do tipo citotóxico (T CD8⁺), que produz grânulos que são citotóxicos aos antígenos estranhos que infectam as células normais. (ABBAS, *et al.*, 2015; BRUNO, *et al.*, 2014; DEN HAAN, ARENS, VAN ZELM, 2014;PAUL, 2013).

Com suas características específicas, esses linfócitos reconhecem diferenças discretas nos micro-organismos, tendo uma especificidade maior frente a uma resposta imunológica; além disso, podem ser produzidos linfócitos de memória que estão prontos para uma possível

resposta posterior ao mesmo patógeno (ABBAS, *et al.*, 2015; BRUNO, *et al.*, 2014; DEN HAAN, ARENS, VAN ZELM, 2014; PAUL, 2013).

Durante a resposta antitumoral, as principais células inatas que participam dessa resposta imunológica são as células NK, que agem destruindo principalmente as células tumorais que têm expressão reduzida de MHC (molécula principal do complexo de histocompatibilidade) de classe I e células que expressam receptores de ativação para células NK, através da liberação de grânulos que são citotóxicos às células tumorais. Além das células NK, os macrófagos também participam da resposta antitumoral inata. Os macrófagos do tipo M1 são capazes de inibir a disseminação das células tumorais através da produção de enzimas lisossômicas, de espécies reativas de oxigênio, de óxido nítrico e da citocina fator de necrose tumoral (TNF), que em conjunto levam à morte da célula tumoral (OBEID, *et al.*, 2013).

Na imunidade adaptativa são ativadas as principais células efetoras antitumorais, como os linfócitos T CD4⁺ do subtipo Th1 que produzem citocinas importantes, como interleucina-12 (IL-12), interleucina-18 (IL-18) e interferon- γ (IFN- γ) que induzem a produção e a ativação de mais citocinas e células antitumorais, e por linfócitos T CD8⁺ através da citotoxicidade contra células tumorais que apresentam MHC classe I, através da liberação de grânulos citotóxicos. Dessa forma, sabe-se que a resposta inata e adaptativa em conjunto promovem uma inflamação aguda e uma citotoxicidade no microambiente tumoral (ABBAS, *et al.*, 2012; BRUNO, *et al.*, 2014; PAUL, 2013; WHITESIDE, 2013).

Estudos demonstram a participação de anticorpos também na resposta antitumoral adaptativa, porém os resultados mais promissores são encontrados em pesquisas *in vitro*; *in vivo* as evidências efetivas de uma imunidade humoral contra as células tumorais são poucas (ABBAS, *et al.*, 2015; PAUL, 2013; THERESA, 2013).

Para que, durante uma resposta imunológica, a imunidade adaptativa seja ativada, é necessário que ocorra ativação das células apresentadoras de antígeno (APCs), que fazem a comunicação entre a imunidade inata e adaptativa, sendo compostas por três tipos celulares: as células dendríticas (CDs), os macrófagos e os linfócitos B, células que têm como função capturar o antígeno estranho no sítio de entrada, transportar, processar e apresentar o antígeno para as células da imunidade adaptativa nos gânglios linfáticos, através do MHC presente em sua superfície (ABBAS, *et al.*, 2015; PAUL, 2013).

1.2.2. Células Dendríticas

As CDs fazem parte da linhagem mielóide de células hematopoiéticas, elas possuem longas projeções membranosas e estão distribuídas nos tecidos linfoides, no epitélio das mucosas e no parênquima dos órgãos. Consideradas células da imunidade inata e adquirida, por fazer a ponte de ligação entre as duas linhas de defesa, as CDs são as principais APCs, sendo as mais eficazes por expressarem receptores que reconhecem moléculas típicas dos micro-organismos e responderem com a produção de citocinas, além de processar o antígeno e apresentar-lo para as células da imunidade adquirida (ALVAREZ, VOLLMANN, VON ANDRIAN, *et al.*, 2008; DEN HAAN, ARENS, VAN ZELM, 2014).

Em sua forma imatura, as CDs são encontradas no sangue e em tecidos linfoides secundários e apresentam um fenótipo com altos níveis de alguns receptores para quimoquinas (CCR) como o CCR1, CCR2 e CCR6 e baixos níveis de CCR7 e de moléculas co-estimuladoras que auxiliam na ativação de linfócitos T como a CD80, CD86 e CD40. Ao capturar o antígeno, as CDs se tornam maduras e apresentam o antígeno para o linfócito T nos tecidos linfoides secundários, dessa forma as CDs adquirem um fenótipo com alta expressão de MHC de classe II, CCR7, CD80, CD86 e CD40. Outras moléculas importantes são as CD11b⁺ e CD11c⁺, marcadores de superfície de CDs e em alta expressão nas CDs maduras (ABBAS, *et al.*, 2015; SOUTO, MESQUITA, COSTA, 2014; PAUL, 2013).

Existem dois tipos de CDs, as convencionais (cCDs) que secretam IL-12 e as plasmocitóides (pCDs) que liberam interferon α (IFN- α). A IL-12 secretada por macrófagos e cCDs estimula a produção de IFN- γ por células NK e por linfócitos T CD4⁺ do subtipo Th1, aumentando dessa forma a citotoxicidade de células NK e de linfócitos T CD8⁺. A diferenciação dos linfócitos T CD4⁺ para o subtipo Th1 também depende da secreção de IL-12, sendo um estímulo direto na diferenciação e indireto pelo estímulo da produção de IFN- γ . (DEN HAAN, ARENS, VAN ZELM, 2014; KAH-WAI, *et al.* 2006; SOUTO, MESQUITA, COSTA, 2014; WALLET, SEN, TISCH, 2005). Outros estudos mostram que a IL-12 também é capaz de inibir a angiogênese no microambiente tumoral, inibindo dessa forma a progressão do tumor (BRUNO, *et al.*, 2014).

1.2.3. Linfócitos T Auxiliares

Os linfócitos são as principais células da resposta imune adquirida. Quando ocorre uma invasão por um antígeno estranho eles fazem o reconhecimento através de seu receptor que é distribuído clonalmente e posteriormente são ativados, desenvolvendo respostas específicas para antígeno em questão (ABBAS, *et al.* 2015; PAUL, 2013).

O receptor dos linfócitos T (TCR) possui, na sua região de ligação ao antígeno, rearranjos genéticos, essa característica permite que o linfócito T se ligue a um grande repertório de antígenos diferentes (OBENAU, 2015). Para que ocorra a ativação do linfócito T, ele deve receber três sinais de ativação.

O primeiro sinal é o reconhecimento do antígeno que é apresentado através do MHC presente na superfície da APC; o segundo é a ligação entre moléculas coestimulatórias como o CD80, CD86 e CD40, que estão presentes na superfície do linfócito T e da APC; e o terceiro sinal é enviado por citocinas, como a interleucina-2 (IL-2) responsável pela sobrevivência, proliferação e diferenciação das células T ativadas, permitindo a expansão clonal de linfócitos ativados específicos para o antígeno que foi apresentado. (DEN HAAN, KENNEDY, CELIS, 2008; GUTCHER, BECHER, 2007; SOUTO, MESQUITA, COSTA, 2014; YAMANE, PAUL, 2013). Outrossim, a IL-2 permite a proliferação e diferenciação de linfócitos de memória de vida longa (SMIGIEL, *et al.* 2014; YAMANE, PAUL, 2013).

Os linfócitos T ativados podem então se diferenciar em linfócitos T CD4⁺, que respondem a antígenos extracelulares, sendo ativados pela apresentação de MHC de classe II, ou em linfócitos T CD8⁺, que respondem a antígenos intracelulares, sendo ativados pela apresentação de MHC de classe I (DEN HAAN, ARENS, VAN ZELM, 2014; KENNEDY, CELIS, 2008; SWAIN, MCKINSTRY, STRUTT, 2012; YAMANE, PAUL, 2013).

Os linfócitos T auxiliares (CD4⁺) possuem subtipos de células efetoras que se diferenciam para ativar uma resposta específica a determinados tipos de antígenos estranhos. Atualmente, nos livros acadêmicos, encontram-se descritos os subtipos Th1, Th2, Th17 e T regulatório (Treg). No entanto, diversas pesquisas demonstram a descoberta de outros subtipos, como o Th9 (VEGRAN, *et al.* 2016), Th12 (MICHELIN, *et al.* 2013) e Th22 (FUJITA, 2013).

Cada subtipo é caracterizado pelas suas funções que são desencadeadas por citocinas específicas que ativam fatores de transcrição (FT) específicos. (GUTCHER, BECHER, 2007; KENNEDY, CELIS, 2008; SWAIN, MCKINSTRY, STRUTT, 2012; YAMANE, PAUL, 2013).

1.3.Imunoterapias de Tumores

As imunoterapias têm como objetivo realizar o tratamento contra determinada doença através de componentes do sistema imunológico, podendo ser uma imunoterapia ativa ou passiva. Na imunoterapia ativa são administradas determinadas substâncias que potencializam a fraca resposta imunológica, já na imunoterapia passiva são administradas determinadas substâncias que estão prontas para o combate imunológico (ABBAS, 2015; LESTERHUIS, HAANEN, PUNT, 2011).

As imunoterapias no combate tumoral já vêm sendo muito exploradas. Estudos apresentam imunoterapias ativas contra o câncer que utilizam antígenos tumorais atenuados, citocinas e coestimuladores, bloqueadores de vias inibitórias, entre outros; em imunoterapias passivas apresentam a utilização de anticorpos monoclonais e linfócitos específicos ativados (ABBAS, 2015; LESTERHUIS, HAANEN, PUNT, 2011; ZHOU, 2014).

Pesquisas envolvendo o sistema imune já desenvolveram diversas imunoterapias com imunoestimulantes, anticorpos, citocinas ou terapias celulares (DOUNGAN; DRANOFF, 2009; RODRIGUES, *et al.* 2011), outras alternativas terapêuticas produziram vacinas baseadas em DNA, células tumorais modificadas, proteínas recombinantes, peptídeos sintéticos, além de vetores virais, bacterianos e vírus semelhantes a partículas (VLPs) quiméricos (MATIAS, *et al.*, 2013).

1.3.1. Imunoterapias com Células Dendríticas

A imunoterapia com células dendríticas tem sido muito estudada contra o câncer, em modelos experimentais e em humanos, por ser uma técnica promissora (ALEIXO; MICHELIN, MURTA, 2013; FIGDOR, *et al.*, 2004). Não obstante, vários estudos ainda estão

sendo realizados com o objetivo de aperfeiçoar essa técnica. No combate tumoral, a técnica tem o objetivo de induzir respostas de células T específicas contra o tumor e a produção de memória imunológica para o combate em casos de reincidência tumoral (PALUCKA; BANCHEREAU, 2012; OLIVEIRA, MURTA, MICHELIN, 2014).

Trabalhos com CDs revelaram alterações positivas no número dessas células no sangue de pacientes com câncer de cabeça e pescoço (tipo carcinoma de células escamosas), e outros tumores metastáticos de mama, colorretal, gástrico, pulmão, cérvix, endométrio e renal, e em alguns tumores primários (ANGUILLE *et al.* 2014, OLIVEIRA, MURTA, MICHELIN, 2011; PALUCKA, BANCHEREAU, 2012).

No ambiente tumoral, as CDs podem não desempenhar as suas funções de maneira eficaz, devido à presença de citocinas imunossupressoras (TGF- β , IL-10, IL-6), macrófagos imunossupressores e células Treg, por isso a imunoterapia deve ser feita com precursores de CDs e monócitos do sangue periférico de pacientes com câncer para estimular respostas imunes mais eficazes e específicas (BRUSSEL; BERNEMAN; COOLS, 2012; OLIVEIRA, MURTA, MICHELIN, 2014).

Conforme o estudo de Aleixo, Michelin e Murta (2014), a diferenciação dessas células pode ocorrer de diversas formas, mas principalmente pela indução da citocina interleucina 4 (IL-4), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e citocinas pró-inflamatórias de CD imaturas.

Ainda de acordo com os pesquisadores, em cultura elas sofrem maturação de 3 a 5 dias após a indução, em seguida as CDs maturadas são carregadas com antígenos associados ao tumor e injetadas no paciente. Após injetadas, essas células migram para linfonodos onde causam a ativação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ que migram para o tecido tumoral inibindo o seu crescimento.

Para obter um bom resultado através das vacinas com CDs, alguns fatores devem ser observados, como as condições da cultura de CDs, a escolha das CDs (subpopulações), o estágio de maturação do preparado de CDs, os meios de cultura de antígenos, a via de administração das CDs (tecido periférico ou no sistema linfático) (VERDIJK *et al.*, 2008), a dose e a frequência da vacinação, dentre outras variáveis (ZHONG *et al.*, 2007).

Portanto, vê-se a importância de estudar melhor como essa imunoterapia com CDs pode ativar as células do sistema imunológico contra o câncer, principalmente os novos tipos

celulares, como os linfócitos T auxiliares Th12 e a indução da produção de outras citocinas, como IL-2, IFN- γ , fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e IL-10, por esse novo subtipo celular de linfócitos T auxiliares.

Frente aos dados encontrados até hoje na literatura acreditamos que a imunoterapia com CDs melhora a desempenho do paciente no combate ao câncer, ao mesmo tempo acreditamos que a IL-12 pode estar atuando com um papel antitumoral.

Objetivos

2. Objetivos

Através do sangue periférico avaliar a presença de linfócitos T CD4⁺/IL-12⁺ e avaliar se as citocinas IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-10, estão sendo produzidas junto com os linfócito T produtores de IL-12, em pacientes com câncer em fase avançada antes e durante as duas primeiras imunoterapias com células dendríticas.

Materiais e Métodos

3. Materiais e métodos

3.1. Pacientes

O projeto destinado à imunoterapia com células dendríticas em pacientes com câncer foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), protocolo número 683-2006 (ANEXO A). Foram estudados 15 pacientes, conforme acessibilidade, onde a maioria foi diagnosticada com câncer invasivo, selecionados no Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) do Hospital das Clínicas da UFTM, de junho de 2008 a dezembro de 2016 (Tabela 1). Todos os pacientes selecionados assinaram o termo de consentimento livre após esclarecimento (APÊNDICE A).

O grupo controle foi constituído por 19 mulheres acima de 18 anos, também conforme acessibilidade, saudáveis, sem histórico pessoal de câncer e voluntárias na doação de sangue para participar do estudo. Todas as participantes do projeto assinaram o termo de consentimento livre após esclarecimento.

3.1.1. Critérios de Inclusão

- Pacientes com qualquer tipo de neoplasia, com tumores sólidos passíveis de biópsia;
- Pacientes de qualquer sexo;
- Pacientes acima de 18 anos

3.1.2. Critérios de Exclusão

- Pacientes com doenças imunossupressoras, à exceção do câncer, como SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e doenças auto-imunes severas;
- Pacientes que fazem qualquer outra terapia adicional, seja ela a quimioterapia, a radioterapia, ou até o uso de drogas antitumorais;
- Pacientes com menos de dois meses de término de tratamento por quimioterapia ou radioterapia

Tabela 1 - Descrição do grupo estudado

Idade	Paridade	Diagnostico	Estadiamento	Falecimento	
1	33	G5 P4 (N4) A1	Neoplasia Maligna do Colo do Útero	II A	Sim
2	81	G0 P0 A0	Neoplasia Maligna do Colo do Útero	III	Sim
3	77	G8 P8 (N8) A0	Melanoma Maligno de Vagina	III	Sim
4	50	G1 P1 (C1) A0	Neoplasia Maligna do colo do Útero Transformação	III	Não
5	40	G0 P0 A0	Sarcomatosa de Ameloblastoma	IV	Sim
6	65	G3 P1 (C1) A2	Neoplasia Maligna da Mama	IV	Não
7	27	G4 P3 (C3) A1	Neoplasia Maligna da Mama	II B	Sim
8	80	G3 P2 (N2) A1	Neoplasia Maligna da Mama	III C	Sim
9	50	G3 P1 (N1) A2	Neoplasia Maligna do Ovário	III C	Sim
10	76	G1 P1 (C1) A0	Neoplasia Maligna do Endométrio	III A	Sim
11	72	G3 P2 (N2) A1	Leiomiossarcoma Simplastico de Útero	IV	Sim
12	57	G11 P11 (N11) A0	Neoplasia Maligna de Ovário	I A	Não
13	41	G1 P1 (C1) A0	Neoplasia Maligna da Mama	III A	Sim
14	59	G1 P1 (N1) A0	Neoplasia Maligna do Colo do Útero	III	Sim
15	54	G2 P2 (N2) A0	Neoplasia Maligna do Endométrio	III C	Sim

3.2. Amostras Obtidas para Produção da Vacina e Análise da Resposta Imunológica

Cada paciente envolvido no estudo foi submetido à coleta de amostra de biópsia para extração de proteínas tumorais e produção da vacina de CDs. Também foram colhidas amostras de sangue periférico antes da primeira vacina, o que permitiu a obtenção de leucócitos e a realização da avaliação da resposta imunológica antes e durante o tratamento com vacina de CDs e obtenção de células mononucleares para produção da vacina de CDs.

3.3. Obtenção das Células Mononucleares

A obtenção das CDs iniciou-se na coleta de 20mL de sangue periférico do paciente em tubos esterilizados e descartáveis que continham heparina (100UI/ml). O sangue coletado foi transferido para tubos plásticos cônicos contendo 15mL da solução de Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare). Através de uma centrifugação dos tubos a 600xg por 30 minutos à temperatura de 18°C, em centrífuga refrigerada, obteve-se um anel de células mononucleares na interface entre a solução de Ficoll e os outros tipos celulares, depositados no fundo do tubo.

As células mononucleares foram cuidadosamente coletadas e transferidas para um tubo cônico de 50mL (FALCON). Após, uma nova centrifugação foi realizada para remoção do excesso de Ficoll, lavando-se as células por 3 vezes com 30mL de meio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium - Sigma®), a 4°C e à velocidade de 805xg por 10 minutos. Após esses procedimentos, as células foram ressuspensas em 5mL de IMDM contendo 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®).

Através da contagem em câmara de Neubauer, a quantidade de células obtidas foi determinada. Em relação à viabilidade celular, ela foi determinada utilizando-se o teste do azul de tripan, sendo empregues amostras com mais de 95% de viabilidade.

Todos procedimentos descritos nesta seção foram realizados em ambientes devidamente esterilizados. Além disso, em quase todos, utilizou-se de capela de fluxo laminar, com exceção da contagem das células.

3.4. Preparação da Vacina de Células Dendríticas Autólogas

As células mononucleares isoladas foram cultivadas durante 8 dias em estufas com 5% de CO₂ e à 37°C, em garrafas de cultura com meio IMDM completo (7,5ml), contendo 32,5x10⁶ células. 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 IL-4 para obtenção de células dendríticas imaturas e, no 6º dia de cultura, com 3200pg/mL do TNF- α e antígeno tumoral para ativação destas células.

As células tumorais retiradas da biópsia de cada paciente foram lisadas por ciclos de congelamento e para isso foi usado a uma concentração de 100 ug/ml. Posteriormente, foram colocadas em contato com as CDs imaturas e submetidas à eletroporação. Após este processo, as CDs foram conservadas por mais 48 horas em cultura para o processo de maturação.

3.5. Protocolo de vacinação

A infusão foi realizada com aproximadamente 5 a 10 x 10⁶cels/mL de CDs autólogas ativadas com os antígenos tumorais por via subcutânea no antebraço e com intervalo médio de 15 dias entre as aplicações durante as duas primeiras vacinas (Tabela 2).

Tabela 2: Protocolo de Vacinação

	Pré-terapia	Pós-terapia 1	Pós-terapia 2
Dia	0	15	30

3.6. Análise Celular por Citometria de Fluxo

As células totais do sangue periférico de cada paciente, foram coletadas antes de se iniciar a terapia com CDs (análise pré-terapia), e durante a primeira e segunda imunoterapia com CDs (análise pós-terapia) para que se pudesse acompanhar a evolução da terapia em cada paciente (conforme Tabela 2). A cada análise, foram coletados dois tubos de sangue total com anticoagulante EDTA (ácido etileno tetra-acético), equivalente a aproximadamente 10 mL por paciente. O grupo controle foi submetido uma única vez à coleta de sangue periférico em dois tubos de sangue total com anticoagulante EDTA.

Para a obtenção dos leucócitos, o sangue coletado foi transferido para tubos cônicos de 50mL, adicionando-se uma solução de lise (BD Biosciences®- FACSTM *LysingSolution*®) na proporção de 1:20mL. Após a incubação à temperatura ambiente pelo tempo de 20 minutos, o material foi centrifugado por 10 minutos, à temperatura de 4°C, em uma rotação de 805xg. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente desprezado, conservando o precipitado de células. O excesso da solução de lise foi removido por centrifugação lavando-se as células por 3 vezes com 30ml de PBS (Solução salina tamponada com fosfato). Cada uma dessas lavagens foram feitas a 4°C e a velocidade de 805xg por 10 minutos.

No precipitado de células foi adicionado 1mL de PBS, acrescentando-se 0,5µL da proteína transportadora inibitória (BD Golgistop™) para cada 1mL de sangue inicialmente colhidos em EDTA. Após esse processo, o precipitado foi incubado por 20 minutos a 4°C e, posteriormente, as células foram lavadas por centrifugação com 30mL PBS para retirar o excesso de proteína. Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante preservando-se apenas o precipitado e, então, as células foram ressuspensas em 1mL de PBS. Em seguida, a quantidade de células obtidas foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

A suspensão de células foi transferida para tubos de ensaio sendo, primeiramente, realizada a marcação com 0,25µL de anticorpos extracelulares BD® (Tabela 3) e sendo deixado em repouso a 4°C por 30 minutos ao abrigo da luz. Após esse procedimento, foram realizadas duas lavagens com 1mL de PBS para se retirar o excesso de anticorpo extracelular, para então ser colocado 100mL de Citofix BD®, o que permite que poros sejam feitos na membrana das células para ser realizada a marcação com 0,25µL de anticorpos intracelulares BD® (Tabela 3).

Posteriormente, a suspensão de células com os anticorpos, foram deixadas em repouso a 4°C por mais 30 minutos ao abrigo da luz. Feito isso, precedeu-se a mais duas lavagens com a solução de Perm Wash BD® para se retirar o excesso de anticorpo intracelular. Também foi adicionado mais 1mL de PBS para ser realizada a leitura da amostra no Citômetro FACS Calibur™ BD®.

Após a realização da técnica de citometria de fluxo, foram avaliadas as marcações de interesse por % GATE, que indica a quantidade de células com uma determinada molécula na amostra que está sendo estudada. Nessa avaliação, também foi utilizada a média de intensidade de fluorescência (MFI), que indica a média de expressão da molécula de interesse nas células em que elas se mostraram positivas.

Tabela 3: Protocolo de marcação citometria

Tubo	Anticorpo Extracelular	Anticorpo Intracelular
Controle	Mouse IgG1 PE	Mouse IgG1 FITC
1	CD3 PE	-
2	CD4 FITC	IL-12 PE
3	CD4 PE	IFN- γ FITC
4	CD4 FITC	IL-2 PE
5	CD4 PE	TNF- α FITC
6	CD4 FITC	IL-10 PE

3.7. Análise estatística

Os dados foram analisados comparando os resultados de cada paciente entre pré-terapia, pós-terapia 1 e 2, e entre os dois grupos, controle e pré-terapia.

Em relação aos dados pareados para se comparar três grupos, quando paramétricos, utilizou-se o teste de ANOVA de medidas repetidas e quando não paramétricos, o teste utilizado foi o de Friedman. Já em relação aos dados não pareados para se comparar dois grupos, quando paramétricos, utilizou-se o teste Unpaired t; quando não paramétricos, o teste utilizado foi o de Mann Whitney. Foram consideradas as diferenças estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Resultados

4. Resultados

4.1. Identificação da população células de interesse

O grupo de estudo foi composto por 15 mulheres com câncer invasivo, onde se pode observar sete tipos diferentes de neoplasias. Do grupo estudado somente 03 não foram á óbito e 01 apresentava o tumor em fase inicial de estadiamento (Tabela 1).

Através do citômetro FACSCalibur™ BD®, foram realizadas as análises das células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Primeiramente, foi separada a população de linfócitos por tamanho e granulidade e, depois, a população CD3⁺ (Linfócitos T totais). Dessa população foram separadas as células CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺ (Linfócitos T auxiliares IL-12⁺). Desta população foi avaliada a produção das citocinas IL-2 (CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺/IL-2⁺ - Linfócitos T auxiliares IL-12⁺ produtores de IL-2), IFN- γ (CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺/IFN- γ ⁺ - Linfócitos T auxiliares IL-12⁺ produtores de IFN- γ), TNF- α (CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺/TNF- α ⁺ - Linfócitos T auxiliares IL-12⁺ produtores de TNF- α) e IL-10 (CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺/IL-10⁺ - Linfócitos T auxiliares IL-12⁺ produtores de IL-10) (Figura 3 e Tabela 4).

A presença dos tipos celulares e das citocinas de interesse no grupo controle, pré-terapia, pós-terapia 1 e 2, foi realizada através da avaliação da % GATE e MFI em cada marcação realizada.

4.2. Análise das populações de células por citometria de fluxo

4.2.1. Linfócitos T totais

As análises dos linfócitos T totais representada pelo marcador CD3⁺ são demonstradas nos gráficos 1 e 2, em que é possível observar, no gráfico 1, a marcação dessas células nos grupos de pacientes controles e na pré-terapia, sendo que a MFI (Gráfico 1B) se apresentou maior (***) p=0,0005) na pré-terapia (mediana 751,3; mínima 140,1; máxima 1348) em relação ao grupo controle (mediana 253,8; mínima 114,2; máxima 998,6). No gráfico 2 é

demonstrada a marcação de CD3⁺ nas fases da imunoterapia, em que não se observou nenhuma alteração significativa.

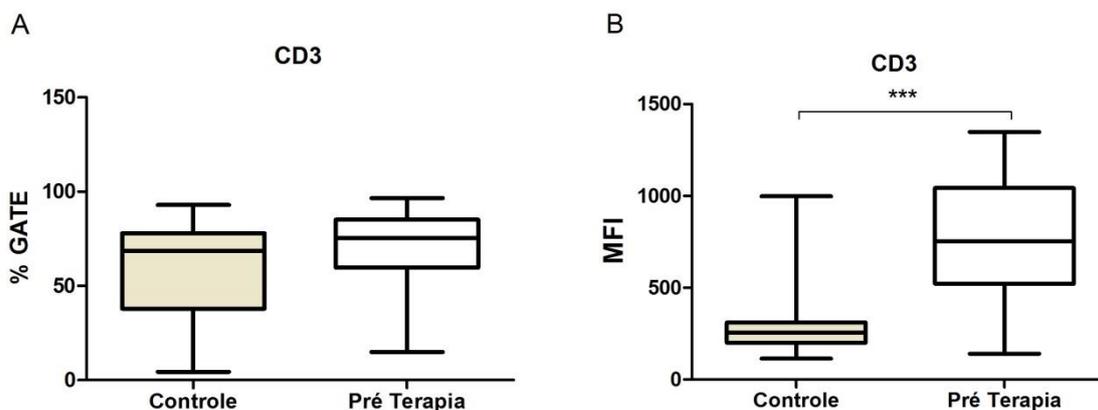


Gráfico 1: Representação da marcação de linfócitos T totais entre os grupos controle e pré-terapia. Marcação de CD3⁺ por (A) %GATE e (B) MFI, *** p=0,0005. Resultados expressos em mediana, min. e max., teste de Mann Whitney.

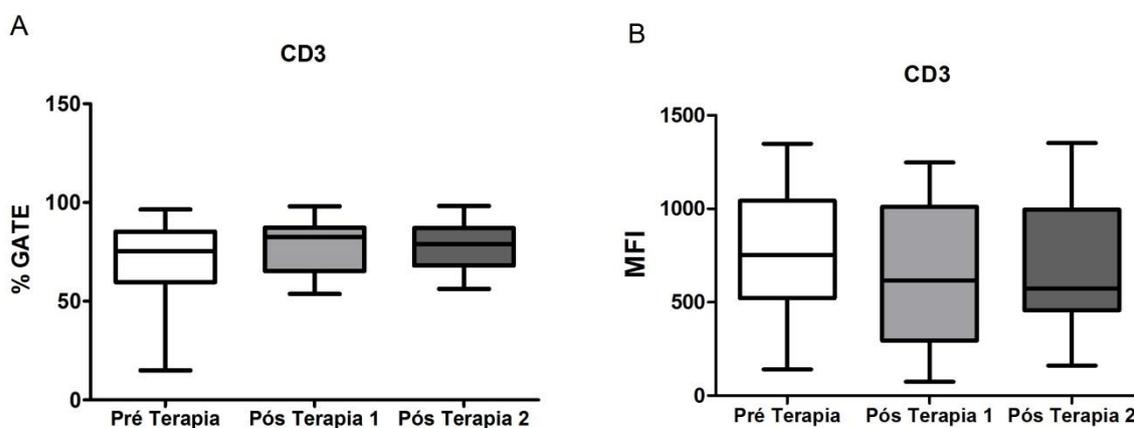


Gráfico 2: Representação da marcação de linfócitos T totais nas fases da imunoterapia. Marcação de CD3⁺ por (A) %GATE e (B) MFI. Resultados expressos em mediana, min. e max., teste de ANOVA medidas repetidas.

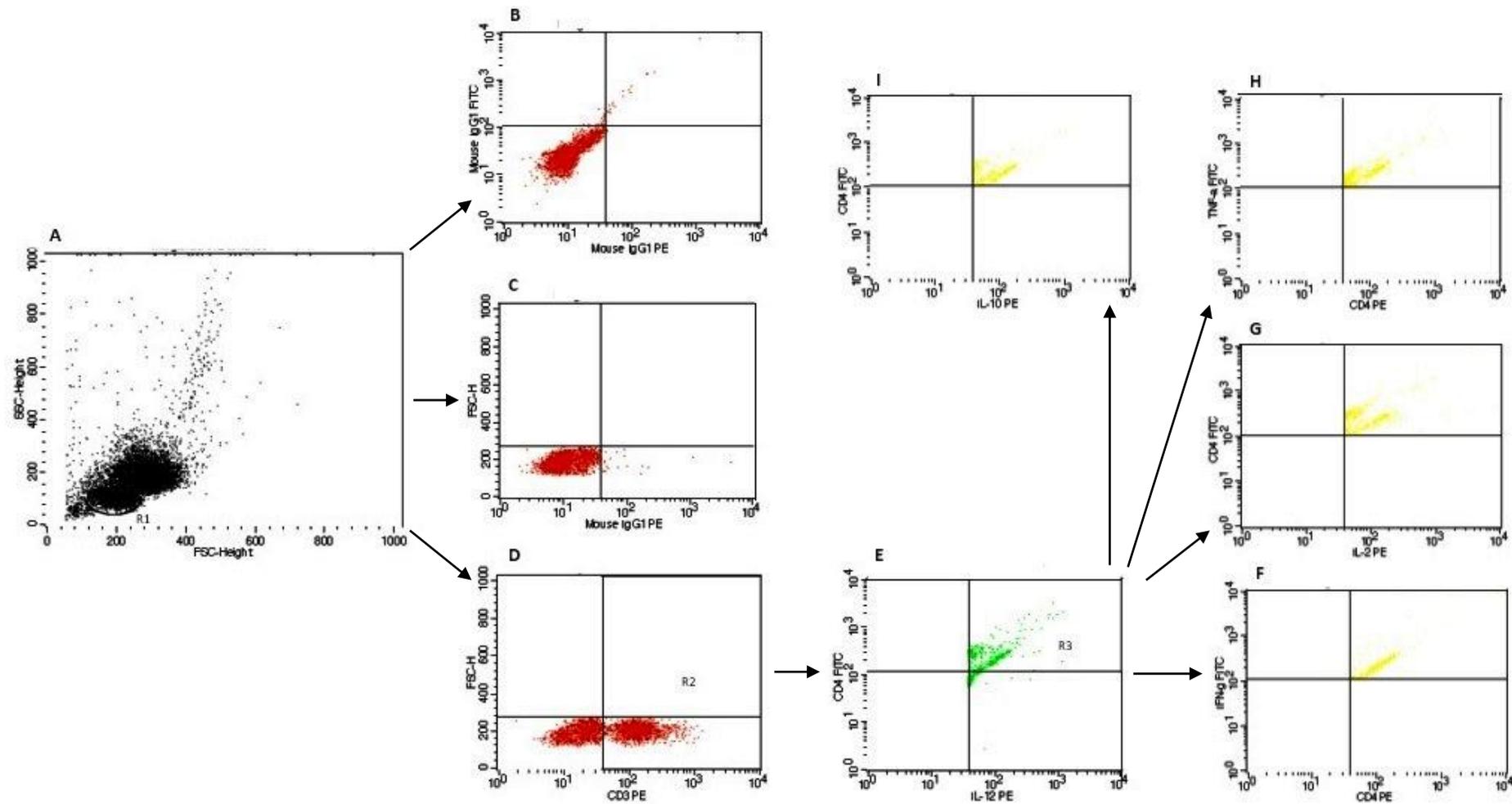


Figura 3: Identificação da população de células de interesse. Gráfico representativo de citometria de fluxo. (A) Gate R1 para identificação de linfócitos. (B e C) Controles isotipos. (D) Gate R2 para a identificação de células CD3⁺. (E) Gate R3 para a identificação de células CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺. (F, G, H e I) Células CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺/IFN- γ ⁺, CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺/IL-2⁺, CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺/TNF- α ⁺ e CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺/IL-10⁺, respectivamente.

Tabela 4: Distribuição por %GATE e MFI das marcações avaliadas por citometria de fluxo dos pacientes tratados com vacina de CDs.

A: %GATE

Marcação	Controle	Pré Terapia	Pós Terapia 1	Pós Terapia 2
	Mediana (Min.-Max.)	Mediana (Min.-Max.)	Mediana (Min.-Max.)	Mediana (Min.-Max.)
CD3	68,58(4,440-92,92)	75,34 (14,96-96,50)	82,48 (53,69-98,03)	78,93 (56,28-98,29)
CD3/CD4/IL-12	0,9800 (0,1400-16,67)	33,33 (1,040-95,78) ^A	19,91 (1,190-99,86)	16,78 (0,0-98,22) ^B
CD3/CD4/IL-12/IFN- γ	100,0 (64,36-100,0)	97,74 (25,58-100,0)	91,67 (45,95-100,0)	95,00 (23,56-100,0)
CD3/CD4/IL-12/IL-2	100,0 (50,00-100,0)	93,33 (14,55-100,0)	93,71 (40,47-100,0)	99,10 (28,12-100,0)
CD3/CD4/IL-12/TNF- α	100,0 (0,0-100,0)	84,29 (25,64-100,0)	95,37 (42,45-100,0)	98,69 (0,0-100,0)
CD3/CD4/IL-12/IL-10	100,0 (0,0-100,0)	96,11 (16,75-100,0)	97,37 (45,04-100,0)	98,29 (0,0-100,0)

B: MFI

Marcação	Controle	Pré Terapia	Pós Terapia 1	Pós Terapia 2
	Mediana (Min.-Max.)	Mediana (Min.-Max.)	Mediana (Min.-Max.)	Mediana (Min.-Max.)
CD3	253,8 (114,2-998,6)	751,3 (140,1-1348) ^C	615,0 (74,43-1248)	573,1 (160,6-1352)
CD3/CD4/IL-12	991,1 (220,3-2240)	221,1 (37,07-1014) ^D	227,9 (37,72-1312)	230,2 (0,0-866,0)
CD3/CD4/IL-12/IFN- γ	3571 (379,6-8337)	822,5 (83,48-7891) ^E	852,7 (83,84-1917)	802,6 (72,17-6878)
CD3/CD4/IL-12/IL-2	1731 (299,0-9910)	501,9 (39,57-1395) ^F	564,4 (42,32-2827)	496,7 (32,33-3368)
CD3/CD4/IL-12/TNF- α	1202 (0,0-9647)	477,8 (74,50-3786)	790,5 (73,37-1550)	518,8 (0,0-3912)
CD3/CD4/IL-12/IL-10	693,5 (0,0-9910)	502,4 (37,10-2027)	583,2 (40,01-3095)	398,6 (0,0-1227)

Min.: Mínimo. Max.: Máximo. MFI: Média de intensidade de fluorescência. CDs: Células dendríticas. ^A:***p<0,0001 ; ^B:*p=0,0312; ^C:***p=0,0005; ^D:***p=0,0002; ^E:**p=0,0093; ^F:***p=0,0010.

4.2.2. Linfócitos T auxiliares IL-12

As análises dos linfócitos T auxiliares IL-12⁺ representada pelo marcador CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺ é demonstrada nos gráficos 3 e 4, em que é possível observar no gráfico 3 a marcação dessas células nos grupos de pacientes controles e na pré-terapia. No gráfico 3A observa-se que a %GATE se apresentou maior (**p<0.0001) no grupo pré-terapia (mediana 33,33; mínima 1,040; máxima 95,78) em relação ao grupo controle (mediana 0,9800; mínima 0,1400; máxima 16,67). Já em relação ao MFI (Gráfico 3B) é possível observar que se apresentou menor (**p=0,0002) no grupo pré-terapia (mediana 221,1; mínima 37,07; máxima 1014) em relação ao controle (mediana 991,1; mínima 220,3; máxima 2240).

Durante as fases da imunoterapia foi observado uma diminuição significativa (*p=0,0312) na %GATE da pós-terapia 2 (mediana 16,78; mínima 0,0; máxima 98,22) em relação à pré-terapia (mediana 33,33; mínima 1,040; máxima 95,78) (Gráfico 4A).

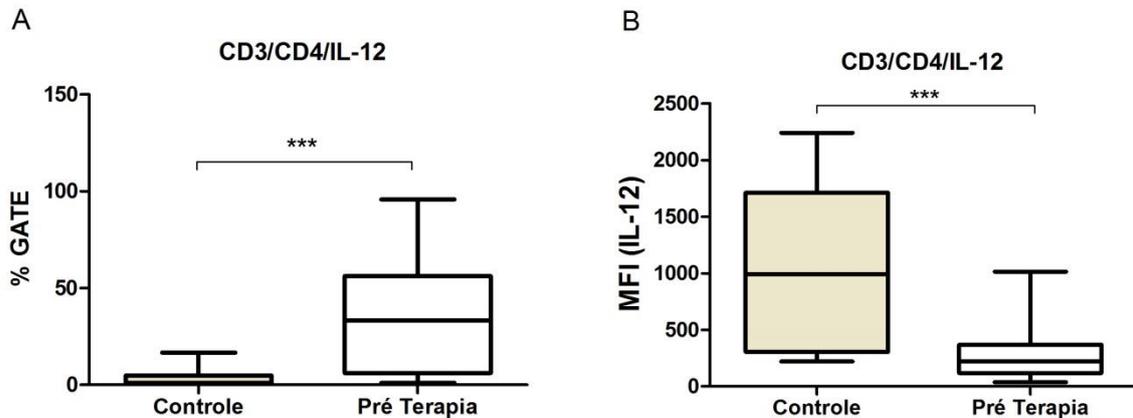


Gráfico 3: Representação da marcação de linfócitos T auxiliares IL-12⁺ entre os grupos controle e pré-terapia. Marcação de CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺ por (A) %GATE, **p<0.0001 e (B) MFI, **p=0,0002. Resultados expressos em mediana, min. e max., teste de Mann Whitney.

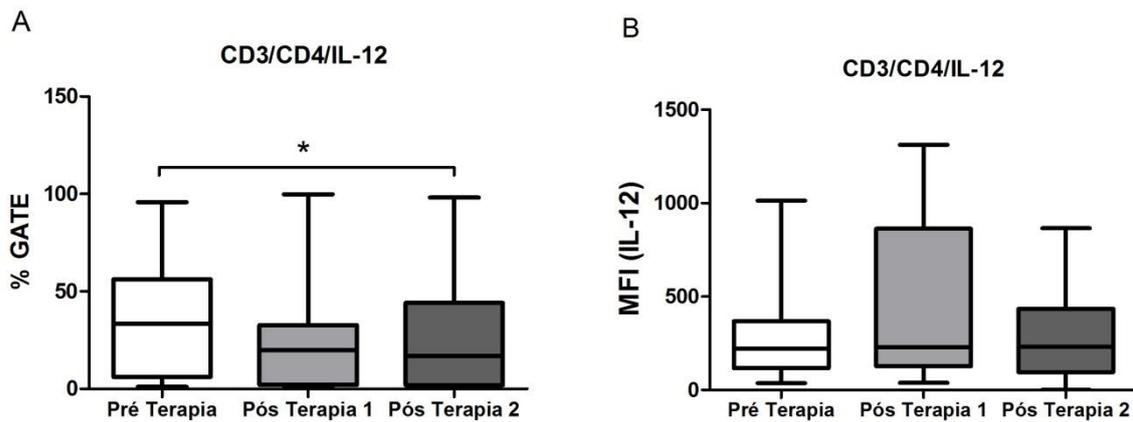


Gráfico 4: Representação da marcação de linfócitos T auxiliares IL-12⁺ nas fases da imunoterapia. Marcação de CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺ por (A) %GATE, *p=0,0312 e (B) MFI. Resultados expressos em mediana, min. e max., teste de Friedman.

4.2.3. Linfócitos T auxiliares IL-12 produtores de IFN- γ

As análises dos linfócitos auxiliares IL-12⁺ produtores de IFN- γ representada pelo marcador CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺/IFN- γ ⁺ são demonstradas nos gráficos 5 e 6. No gráfico 5B, observa-se que a MFI se apresentou menor (**p=0,0093) no grupo pré-terapia (mediana 822,5; mínima 83,48; máxima 7891) em relação ao grupo controle (mediana 3571; mínima 379,6; máxima 8337). Durante as fases da imunoterapia não foram observadas alterações significativas (Gráfico 6).

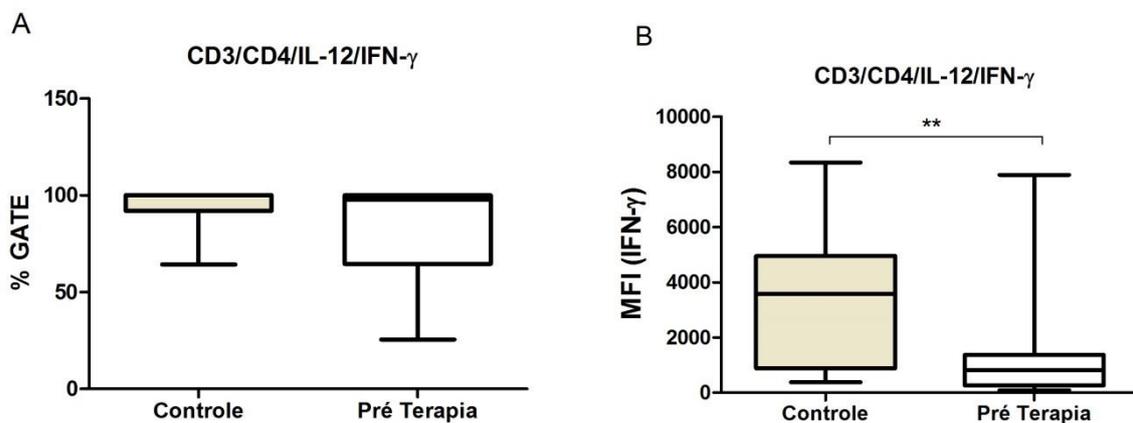


Gráfico 5: Representação da marcação de linfócitos T auxiliares IL-12⁺ produtores de IFN- γ entre os grupos controle e pré-terapia. Marcação de CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺/IFN- γ ⁺ por (A) %GATE e (B) MFI, **p=0,0093. Resultados expressos em mediana, min. e max., teste de Mann Whitney.

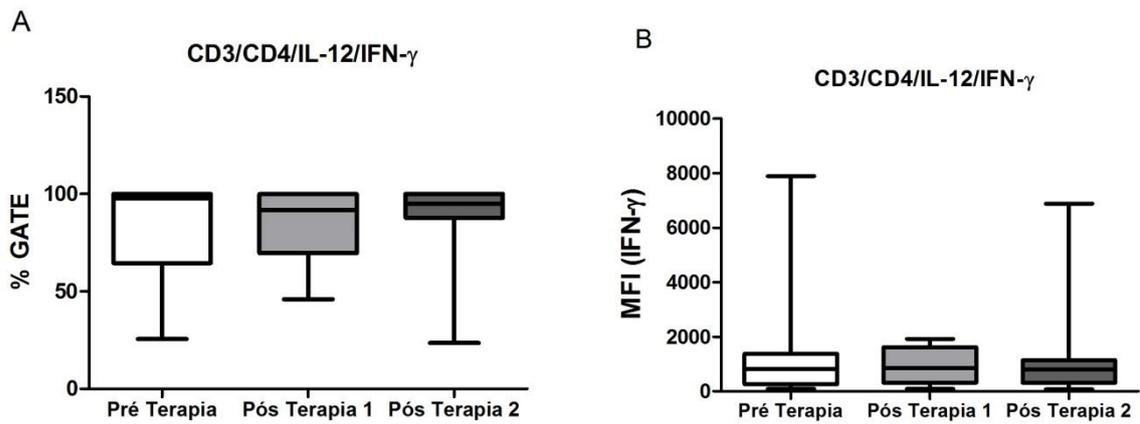


Gráfico 6: Representação da marcação de linfócitos T auxiliares IL-12⁺ produtores de IFN-γ nas fases da imunoterapia. Marcação de CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺/IFN-γ⁺ por (A) %GATE e (B) MFI. Resultados expressos em mediana, min. e max., teste de Friedman.

4.2.4. Linfócitos T auxiliares IL-12⁺ produtores de IL-2

As análises dos linfócitos auxiliares IL-12⁺ produtores de IL-2 representada pelo marcador CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺/IL-2⁺ são demonstradas nos gráficos 7 e 8. É possível observar, no gráfico 7, a marcação dessas células nos grupos controle e pré-terapia, sendo que a MFI (Gráfico 7B) se apresentou menor (**p=0,0010) no grupo pré-terapia (mediana 501,9; mínima 39,57; máxima 1395) em relação ao grupo controle (mediana 1731; mínima 299,0; máxima 9910). Durante as fases da imunoterapia não foi observada nenhuma alteração significativa desta marcação (Gráfico 8).

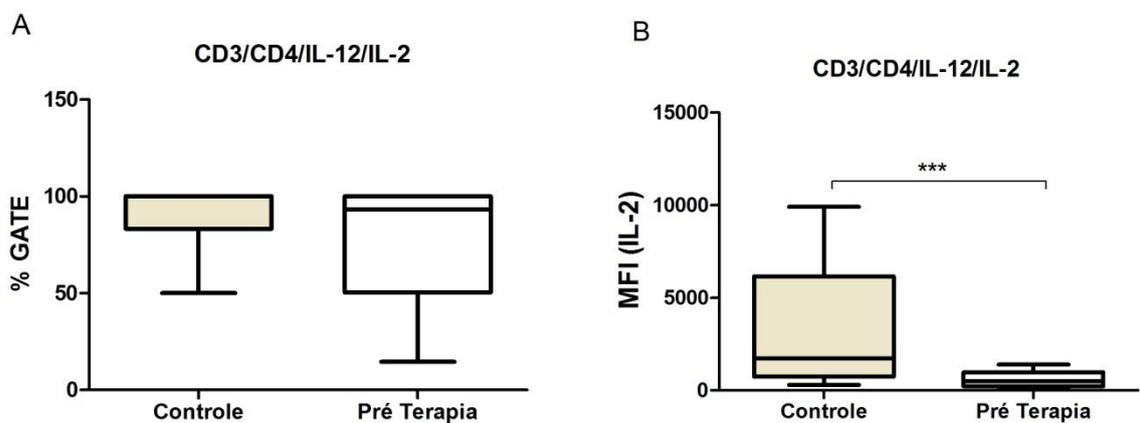


Gráfico 7: Representação da marcação de linfócitos T auxiliares IL-12⁺ produtores de IL-2 entre os grupos controle e pré-terapia. Marcação de CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺/IL-2⁺ por (A) %GATE e (B) MFI, ***p=0,0010. Resultados expressos em mediana, min. e max., teste de Mann Whitney.

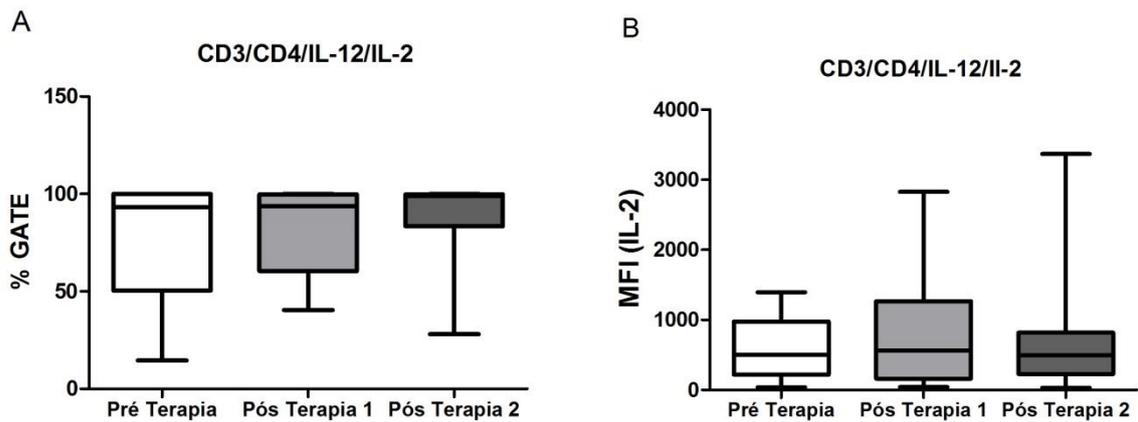


Gráfico 8: Representação da marcação de linfócitos T auxiliares $IL-12^+$ produtores de $IL-2$ nas fases da imunoterapia. Marcação de $CD3^+/CD4^+/IL-12^+/IL-2^+$ por (A) %GATE e (B) MFI. Resultados expressos em mediana, min. e max., teste de Friedman.

4.2.5. Linfócitos T auxiliares $IL-12^+$ produtores de $TNF-\alpha$

As análises dos linfócitos auxiliares $IL-12^+$ com produção de $TNF-\alpha$ representada pelo marcador $CD3^+/CD4^+/IL-12^+/TNF-\alpha^+$ são demonstradas nos gráficos 9 e 10, em que é possível observar que não tiveram alterações significativas na marcação dessas citocinas nos grupos controles e na pré-terapia (Gráfico 9) e durante as fases da imunoterapia (Gráfico 10).

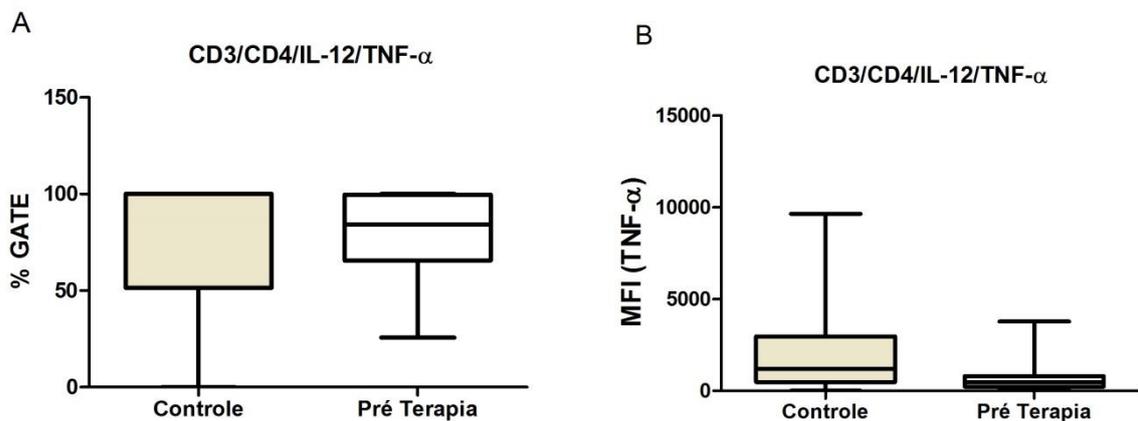


Gráfico 9: Representação da marcação de linfócitos T auxiliares $IL-12^+$ produtores de $TNF-\alpha$ entre os grupos controle e pré-terapia. Marcação de $CD3^+/CD4^+/IL-12^+/TNF-\alpha^+$ por (A) %GATE e (B) MFI. Resultados expressos em mediana, min. e max., teste de Mann Whitney.

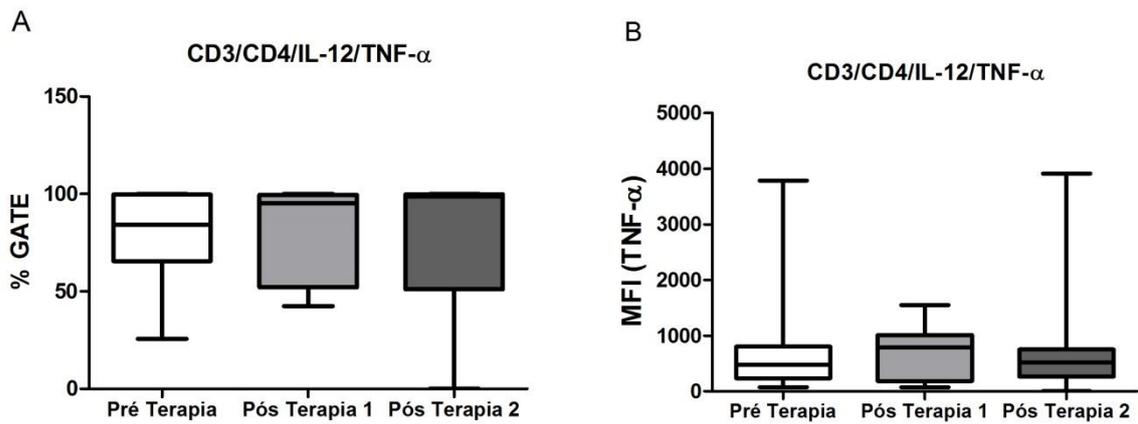


Gráfico 10: Representação da marcação de linfócitos T auxiliares IL-12⁺ produtores de TNF- α nas fases da imunoterapia. Marcação de CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺/TNF- α ⁺ por (A) %GATE e (B) MFI. Resultados expressos em mediana, min. e max., teste de Friedman.

4.2.6. Linfócitos T auxiliares IL-12⁺ produtores de IL-10

As análises dos linfócitos auxiliares IL-12⁺ produtores de IL-10 representada pelo marcador CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺/IL-10⁺ são demonstradas nos gráficos 11 e 12, em que não se observam alterações significativas na marcação desta citocina nos grupos controle e na pré-terapia (gráfico 11) e durante as fases da imunoterapia (gráfico 12).

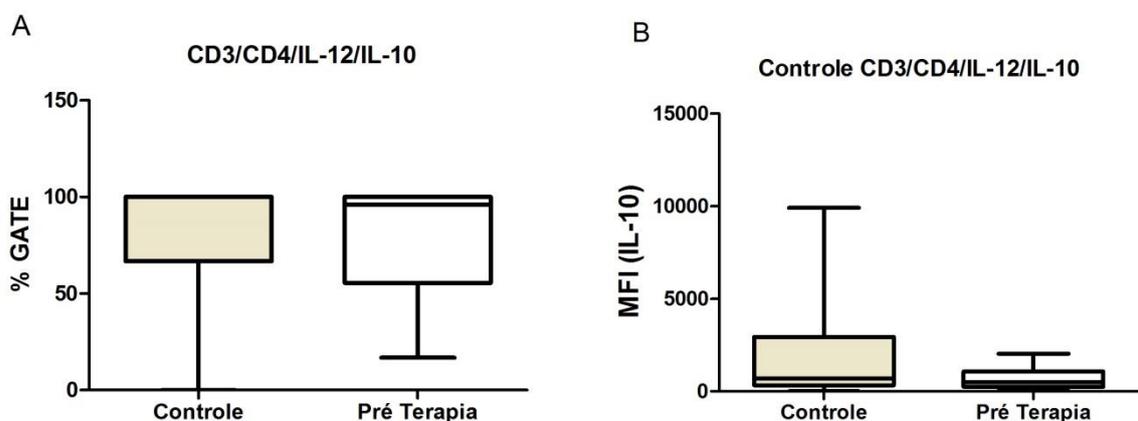


Gráfico 11: Representação da marcação de linfócitos T auxiliares IL-12⁺ produtores de IL-10 entre os grupos controle e pré-terapia. Marcação de CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺/IL-10⁺ por (A) %GATE e (B) MFI. Resultados expressos em mediana, min. e max., teste de Mann-Whitney.

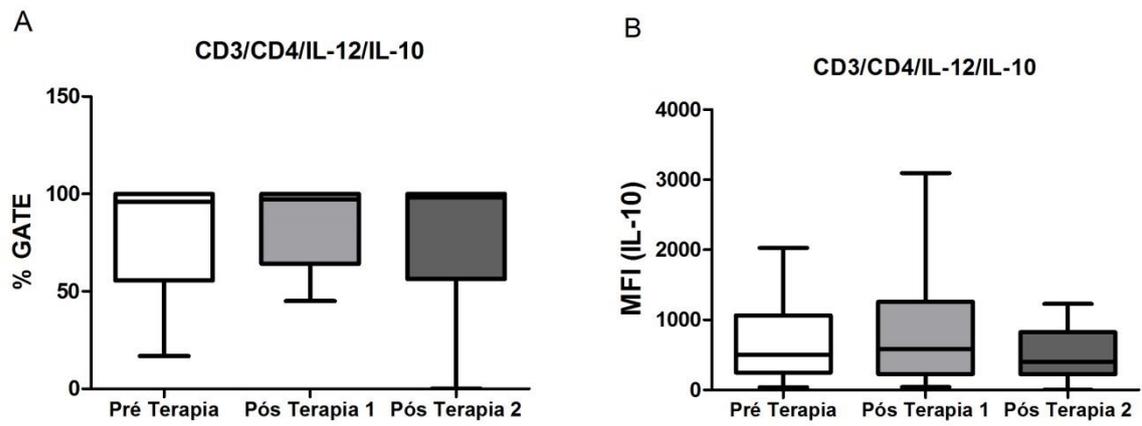


Gráfico 12: Representação da marcação de linfócitos T auxiliares IL-12⁺ com produção de IL-10 nas fases da imunoterapia. Marcação de CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺/IL-10⁺ por (A) %GATE e (B) MFI. Resultados expressos em mediana, min. e max. Para %GATE teste de Friedman. Para MFI ANOVA medidas repetidas.

Discussão

5. Discussão

O grupo estudado apresenta uma variedade de tipos de tumor que se apresentam em diferentes idades e estadiamento, sendo assim pode-se avaliar uma diferença na resposta imunológica, inclusive do novo subtipo Th12, devido a uma senescência normal do organismo (GRUVER, HUDSON, SEMPOWSKI, 2007) e às características específicas que cada tumor apresenta (HANAHAN, WEINBER, 2011).

A identificação correta de um tipo celular de interesse em um estudo é de extrema importância para se obter um resultado fidedigno e nesta pesquisa conseguimos fazer a marcação para a realização de citometria de fluxo para linfócitos T auxiliares IL-12⁺ e as respectivas citocinas de interesse IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-10, conforme a literatura e diversas pesquisas desenvolvidas (VAHEDI, *et al.*, 2013; WONG, *et al.* 2016).

Atualmente, sabe-se que o linfócito T auxiliar do subtipo Th1 responde principalmente a patógenos intracelulares e em doenças que causam danos associados a infecções crônicas. A diferenciação desse subtipo celular é induzida por IL-18 e, principalmente, IL-12 e IFN- γ . Além disso, a IL-2 é capaz de potencializar a ativação do subtipo Th1 (ATHIE-MORALES, *et al.* 2004).

A ativação das citocinas associadas a esse perfil induzem a produção dos FT T-bet, STAT1 e STAT2, que, por sua vez, induzem a produção de mais IFN- γ que amplifica a ativação do subtipo Th1, realizando suas funções efetoras (ativação de macrófagos, produção de IgG e aumento da expressão de MHC de classe I e II), e inibindo ao mesmo tempo a ativação dos subtipos Th2 e Th17 (BRUNO, *et al.*, 2014; KENNEDY, CELIS, 2008; SWAIN, MCKINSTRY, STRUTT, 2012; YAMANE, PAUL, 2013).

Estudos demonstram que a geração de uma resposta eficiente Th1 parece ser a ideal na ação antitumoral, pois ela auxilia na ativação de linfócitos T CD8⁺ e ativam citocinas do seu perfil que são de combate tumoral (IFN- γ , IL-12, TNF- α) (WHITESIDE, 2013). Além disso, são capazes de inibir, ao mesmo tempo, a geração de resposta Th2 e a secreção de citocinas produzidas por esse perfil que auxiliam no crescimento tumoral (IL-4, IL-10, TGF- β) (WHITESIDE, 2013) que, conseqüentemente, inibem o desenvolvimento da resposta Th1.

O Treg é um subtipo de T CD4⁺ que possui a função de imunossupressão da resposta imune, realizando autotolerância imunológica, prevenção de doenças autoimunes e de

respostas exacerbadas contra patógenos, através da ação da IL-10, do fator de crescimento tumoral β (TGF- β), sendo o FOXP3⁺ o FT responsável por tal função. Frente a essas características, a Treg, pode induzir o crescimento tumoral quando ativada antes da eliminação do tumor, devido a uma imunossupressão (ABDALLA, MURTA, MICHELIN, 2013; KENNEDY, CELIS, 2008).

Estudos também demonstram que as células Treg atuam a favor da progressão tumoral devido à supressão da resposta imune ao inibir a função efetora de células NK, linfócitos T citotóxicos e CDs (BEYER, SCHULTZE, 2006; VAN DER VEEKEN, ARVEY, RUDENSKY, 2013).

A CD é caracterizada como APC mais eficaz, pois ela é a única capaz de ativar linfócitos T auxiliares virgens. Além da função de APC, as CDs podem realizar a apresentação cruzada, apresentando o antígeno em questão ao mesmo tempo para linfócitos T CD8⁺ (atividade antiviral) (KENNEDY, CELIS, 2008; MA, 2016). Sendo assim, através da apresentação dos antígenos tumorais para os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, as CDs estão altamente ligadas à resposta imune contra os antígenos tumorais (ALVAREZ, VOLLMANN, VON ANDRIAN, *et al.*, 2008; BRUNO, *et al.*, 2014; DEN HAAN, ARENS, VAN ZELM, 2014; WALLEY, SEN, TISCH, 2005).

Não obstante, estudos com a vacina de CDs demonstram que ela é capaz de ativar linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e inibir a ativação de T reg (RODRIGUES, *et al.* 2011). Além disso, induz o aumento de macrófagos, de células NK, de linfócitos B e reduz TGF- β , o que permite constatar que as vacinas com CDs são capazes de estabilizar o desenvolvimento tumoral (MATIAS, *et al.* 2013).

Para poder avaliar a marcação de linfócitos T auxiliares IL-12⁺ inicialmente foi separado a população de linfócitos T totais, em que é possível observar que na presença do câncer há aumento significativo da expressão de CD3⁺.

Sabe-se que na resposta do organismo frente a uma patologia, como o câncer, há um aumento da produção de células imunológicas com o intuito de aumentar a defesa contra a patologia em questão (WHITESIDE, 2013). Com base nisso, podemos inferir que a expressão do CD3⁺ apresentou-se aumentada em pacientes com câncer devido a essa ativação potencializada do sistema imunológico, podendo induzir dessa forma a ativação tanto de

linfócitos T citotóxicos (CD8+), quanto de T auxiliares (CD4+) contra o antígeno tumoral (BIRNBAUM *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2017).

No decorrer das aplicações da vacina é possível observar que da pré-terapia para a pós-terapia 1 há um discreto aumento na quantidade dessa marcação; da pós-terapia 1 para a pós-terapia 2 há uma discreta diminuição da quantidade dessa marcação, porém não significativa.

Esse resultado, sobre a síntese de CD3⁺ nas fases da imunoterapia, vai de encontro com o estudo de RODRIGUES, *et al.* (2011), que verificaram que pacientes que realizavam a imunoterapia com CDs tiveram um aumento da síntese de CD3⁺ na primeira imunoterapia e depois uma diminuição no decorrer das outras imunoterapias, até manter uma produção estável em níveis elevados de CD3⁺.

Na avaliação de linfócitos T auxiliares IL-12⁺ foi possível observar que na presença do câncer há uma quantidade maior significativa dessas células, porém as mesmas apresentavam uma expressão diminuída em relação ao grupo controle.

Os resultados sobre os linfócitos T CD4⁺/IL-12⁺ vão de encontro aos de Michelin, *et al.* (2013; 2015), sendo que nos dois estudos foi observado uma maior marcação destas células em pacientes com câncer, em que no primeiro estudo foi identificada essa população pelo método de citometria de fluxo, e no segundo estudo pelo método de citometria de fluxo com visualização por imunofluorescência e por reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa (RT-PCR), sendo observada a presença da IL-12 intracelular mais próxima ao núcleo. Ainda não se sabe exatamente qual o papel desse tipo celular em pacientes com esse perfil.

No decorrer das duas primeiras aplicações da vacina, foi possível observar uma diminuição significativa da quantidade total e um discreto aumento não significativo da expressão de linfócitos T CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺. O estudo de Rodrigues, *et al.* (2011), demonstrou que na primeira imunoterapia com CDs há uma diminuição da quantidade de linfócitos T CD4⁺/IL-12⁺. No entanto, após essa diminuição, ocorre uma discreta alternância dessa porcentagem, até diminuir o nível a quase zero, o que corrobora os resultados que se obteve com este estudo.

Embora isso pareça demonstrar uma regularidade em função dos estudos levantados e este que ora se discute, é importante, ainda, que se realizem outras pesquisas, para que se

possa avaliar o comportamento desse tipo celular no decorrer de mais imunoterapias com CDs.

Uma análise comparativa com a literatura sobre a média de intensidade de fluorescência de linfócitos T auxiliares com produção de IL-12 em pacientes com câncer não foi possível ser realizada, pois nos levantamentos a que se procedeu, não se encontrou dados a ser comparados suficientemente. Uma explicação de a média apresentar-se mais alta no controle pode ser devido a uma autofluorescência causada por elementos próprios das células, como produtos do metabolismo celular (BARTOLOMÉ, ABRAMOV, 2015; BONUCCELLI, *et al.* 2017).

Uma segunda hipótese que podemos levantar em relação à menor expressão de linfócitos T com produção de IL-12 em pacientes com câncer, diz respeito ao fato de essas células poderem estar sendo ativadas de uma forma “ineficaz”, apresentando uma porcentagem alta de células (%GATE), mas ao mesmo tempo com expressão baixa (MFI). No decorrer da aplicação das vacinas, é possível observar que há uma inversão dessa marcação, o que permite constatar que a quantidade diminui e a expressão aumenta, traçando, dessa forma, um perfil mais próximo ao de pessoas saudáveis.

Tomando essa hipótese como mirante de partida, é importante que novas pesquisas se debrucem sobre a questão, a fim de desenvolverem outras técnicas laboratoriais mais específicas que avaliem a efetividade celular.

Em relação à citocina IL-12, diversos estudos demonstram que a mesma quando ativada de forma efetiva auxilia no combate tumoral, como na inibição do crescimento tumoral e da metástase, prolongamento da sobrevivência e até mesmo na regressão tumoral (DENIES, *et al.* 2014; PAN, *et al.* 2012; XU, *et al.* 2011). Além disso, o estudo de Zitvogel e Kroemer (2014) demonstrou que CDs são capazes de produzir IL-12, auxiliando, dessa forma, na imunovigilância contra tumores.

A IL-12 também vem sendo estudada como um alvo imunoterápico devido as suas funções auxiliadoras no combate tumoral. Exemplo disso são os estudos em humanos e em modelos experimentais, que demonstram ser um tratamento altamente eficaz quando utilizada em dosagens corretas (KLINKE, 2015; VO, 2014; YUZHALLIN, KUTIKHIN, 2012). Além disso, o estudo de Katiyar (2007) indica que a IL-12 pode ser utilizada até mesmo como alvo para prevenção e tratamento da fotocarcinogênese.

Pesquisas relacionadas ao novo subtipo de linfócito T auxiliar IL-12 já foram desenvolvidas para avaliar se existe a presença desse tipo de células em pacientes com câncer, como citado anteriormente. No presente estudo, no entanto, além de avaliar a presença desse tipo celular, sua quantidade e expressão, também se investigou a relação desse novo tipo celular com a produção de outras citocinas, como o IFN- γ , IL-2, TNF- α e IL-10, o que permite fortemente afirmar que os dados assumidos nesta pesquisa são pioneiros para a área.

A citocina IFN- γ apresentou a sua expressão diminuída em pacientes com câncer. O estudo de Rodrigues, *et al.* (2011) demonstra que nas fases iniciais da imunoterapia com CDs há um aumento da produção de linfócitos T CD4⁺/IFN- γ ⁺, sem relacionar com produção de IL-12. Igualmente, o estudo de Matias, *et al.* (2013) demonstrou que pacientes que realizavam imunoterapia com CDs apresentaram um aumento no nível sérico de IFN- γ .

Atualmente, sabe-se que há uma forte influência da citocina IL-12 para ativar os linfócitos T CD4⁺ do subtipo Th1 a produzirem a sua principal citocina, que é o IFN- γ (BERNINK, MJÖSBERG, SPITS, 2013; VAHEDI, *et al.* 2011; WONG, *et al.* 2016), apresentando um papel importante no combate tumoral (BRANDACHER, MARGREITER, FUCHS, 2007).

O estudo de Ngiow, Teng e Smyth (2013) assume que diversas pesquisas têm demonstrando que a citocina IL-12 pode agir sobre o combate tumoral (início, crescimento e metástase), independentemente do da produção de IFN- γ . Na esteira das afirmações de Ngiow, Teng e Smyth(2013) e Trinchieri (2003), apresenta dados para refutar a ideia de que a IL-12 não é específica para ativar apenas o subtipo Th1 e conseqüentemente a produção de IFN- γ .

Com base nesses dados, podemos levantar a hipótese de que as células T CD3⁺/CD4⁺/IL-12⁺/IFN- γ ⁺ avaliadas em nosso estudo, que se apresentou com sua expressão diminuída em pacientes com câncer, pode ser um subtipo celular de linfócitos T diferente do Th1, conforme a hipótese de Michelin, *et al.* (2013 e 2015), que tentam demonstrar a possível existência de um novo subtipo de linfócito Th12.

A citocina IL-2 apresentou a sua expressão diminuída em pacientes com câncer. A proliferação e regulação dos linfócitos T é influenciada positivamente pela IL-2 (SMIGIEL, *et al.* 2014; VISAN, 2014) e pacientes com câncer se apresentam em um estado imunossupressor (SCHREIBER, OLD, SMYTH, 2011).

Em relação a essas afirmações, podemos levantar a hipótese de que a IL-2 apresenta uma diminuição da sua expressão em pacientes com câncer devido a essa imunossupressão, influenciando conseqüentemente em uma baixa diferenciação de células T.

É possível observar, também, um discreto aumento na quantidade e expressão de IL-2 durante as fases da imunoterapia, porém não significativo. O estudo de Rodrigues, *et al.* (2011) avaliou a presença de linfócitos T CD4⁺ totais com produção de IL-2⁺ em pacientes que realizavam imunoterapia com CDs. Nesse estudo, os autores verificaram que os pacientes apresentaram, no início do tratamento, um aumento da produção dessa citocina. No entanto, Rodrigues, *et al.* não a relacionaram com a produção de IL-12.

O TNF- α é uma citocina com diversas funções, podendo apresentar ações promotoras ou supressoras de tumores dependendo dos estímulos recebidos pelas células. Quando produzido no microambiente tumoral por indução das próprias células tumorais o TNF- α induz proliferação e metástase, porém essa citocina também pode influenciar na destruição das células tumorais quando sua produção é induzida por células imunológicas, como por linfócitos T citotóxicos e células NK (SETHI, SUNG, AGGARWAL, 2008; HUNDSBERGER, H. *et al.* 2007).

Rodrigues, *et al.* (2011) demonstraram um aumento da produção de TNF- α por linfócitos T CD4⁺ no início da imunoterapia com CDs, sem relacionar com a produção de IL-12. Assim podemos inferir que a citocina TNF- α avaliada em nosso estudo, não está sendo produzida pelos linfócitos T auxiliares produtores de IL-12.

Em relação aos dados referentes à análise da citocina IL-10, é possível também observar que não tiveram alterações significativas em pacientes com câncer e durante as duas primeiras imunoterapias com CDs. Estudos demonstram que essa citocina está relacionada a alguns subtipos celulares de linfócitos T auxiliares (CHANG, H. *et al.* 2007; SARAIVA, O'GARRA, 2010; TRINCHIERI, 2007).

A IL-10 é uma citocina com propriedades anti-inflamatórias, sendo conhecida como uma citocina do perfil de linfócito T auxiliar Th2, apresentando um papel imunorregulador, igualmente quando é produzida por linfócitos T reg (SARAIVA, O'GARRA, 2010). Porém, outros estudos demonstram que essa citocina pode ser produzida também pelo perfil de linfócito T auxiliar Th1 (CHANG, H. *et al.* 2007), induzindo uma diminuição dos efeitos colaterais imunológicos (TRINCHIERI, 2007).

Ainda em relação a IL-10, salienta-se o estudo de Rodrigues, *et al.* (2011), que demonstrou um aumento na produção dela por linfócitos T CD4⁺ em pacientes que realizavam a imunoterapia com CDs. No entanto, nesse estudo, os autores não demonstraram por qual subtipo ela estava sendo produzida devido a atividade pleiotrópica dessa citocina.

Estudos sobre os linfócitos T CD4⁺/IL-12⁺ são recentes e ainda não há relatos na literatura relacionando esse tipo celular com as citocinas analisadas neste estudo. Assim sendo, podemos levantar a hipótese de que outras citocinas podem estar sendo produzidas pelos linfócitos T CD4⁺/IL-12⁺ em pacientes com câncer e durante o tratamento com imunoterapia de CDs, o que possivelmente seria um objeto interessante de ser investigado em outras pesquisas sobre o assunto.

De todo modo, para poder relacionar de forma mais concreta a produção de citocinas com os linfócitos T CD4⁺/IL-12⁺ é necessário avaliar a presença dos marcadores de interesse por outras técnicas, principalmente as de biologia molecular, tanto em modelos humanos como em modelos experimentais, em outros protocolos de imunoterapias e até mesmo em outros problemas de saúde.

Sendo assim, observa-se a necessidade de que mais estudos relacionados a esse novo tipo celular de linfócitos T auxiliar IL-12⁺ sejam realizados, para entender melhor quando ocorre a sua produção e sobre quais citocinas ela pode exercer sua influência.

Conclusão

6. Conclusão

O presente estudo concluiu, que pacientes com câncer invasivo apresentam níveis aumentados de linfócitos T auxiliares IL-12⁺ e que após as duas primeiras imunoterapias com CDs houve diminuição deste tipo celular, levando o paciente com câncer a um perfil de linfócitos T auxiliares com produção de IL-12 mais próximos ao de uma pessoa não portadora de câncer.

As células T auxiliares com produção de IL-12 não apresentaram uma alteração das citocinas IFN- γ , IL-2, TNF- α e IL-10 em pacientes com câncer e durante as duas primeiras imunoterapias com CDs.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Editora Ltda, 7^o ed., Rio de Janeiro, 2012
- ABDALLA, D. R.; MURTA, E. F. C.; MICHELIN, M. A. The influence of physical activity on the profile of immune response cells and cytokine synthesis in mice with experimental breast tumors induced by 7, 12-dimethylbenzanthracene. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 22, n. 3, p. 251-258, 2013.
- ALEIXO, A. R.; MICHELIN, M. A.; MURTA; E. F. C. Immunotherapy with dendritic cells as a câncer treatment: perspectives and therapeutic potential. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, Uberaba, v. 7, p. 226-232. 2013
- _____. Cell Vaccine and Cancer Treatment: New Patents. **Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery**, v. 8, n. 1, p. 26-29, 2014.
- ALVAREZ, D.; VOLLMANN, E. H.; VON ANDRIAN, U. H. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. **Immunity**, v. 29, n. 3, p. 325-342, 2008.
- ANGUILLE, S. *et al.* Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. **The lancet oncology**, v. 15, n. 7, p. e257-e267, 2014.
- ATHIE-MORALES, V. *etal.* Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 1, p. 61-69, 2004.
- BARTOLOMÉ, F.; ABRAMOV, A. Y. Measurement of mitochondrial NADH and FAD autofluorescence in live cells. **Mitochondrial Medicine: Volume I, Probing Mitochondrial Function**, p. 263-270, 2015.
- BERNINK, J.; MJÖSBERG, J.; SPITS, H. Th1-and Th2-like subsets of innate lymphoid cells. **Immunological reviews**, v. 252, n. 1, p. 133-138, 2013.
- BEYER, M.; SCHULTZE, J. L. Regulatory T cells in cancer. **Blood**, v. 108, n. 3, p. 804-811, 2006.
- BIRNBAUM, M. E. *et al.* Molecular architecture of the $\alpha\beta$ T cell receptor-CD3 complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 49, p. 17576-17581, 2014.
- BRANDACHER, G.; MARGREITER, R.; FUCHS, D. Interferons, immunity and cancer immunoediting leading to impaired immune function in cancer patients. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 1, 2007.
- BRUNO, A. *et al.* Orchestration of angiogenesis by immune cells. **Frontiers in oncology**, v. 4, p. 131, 2014.
- BRUSSEL, I.V.; BERNEMAN, Z.N.; COOLS, N. Optimizing dendritic cell-based immunotherapy: tackling the complexity of different arms of the immune system. **Mediat.Inflamm.** v. 2012, p. 1-14, 2012.
- BONUCCELLI, G. *et al.* NADH autofluorescence, a new metabolic biomarker for cancer stem cells: Identification of Vitamin C and CAPE as natural products targeting "stemness". **Oncotarget**, 2017.

CHAMMAS, R.*et al.* Imunologia clinica das neoplasias. **Imunologia Clinica na Prática Médica**, p. 447-460, 2009.

CHANG, H.*et al.* Expression of IL-10 in Th memory lymphocytes is conditional on IL-12 or IL-4, unless the IL-10 gene is imprinted by GATA-3. **European journal of immunology**, v. 37, n. 3, p. 807-817, 2007.

CS6ACUPUNTURA. **A acupuntura no tratamento do câncer**. Disponível em: <www.cs6acupuntura.wordpress.com/2013/10/08/a-acupuntura-no-tratamento-do-cancer/>. Acesso em 15 abr. 2017.

DEN HAAN, J. M. M.; ARENS, R.; VAN ZELM, M. C. The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. **Immunology letters**, v. 162, n. 2, p. 103-112, 2014.

DENIES, S.*et al.* Combination of interleukin-12 gene therapy, metronomic cyclophosphamide and DNA cancer vaccination directs all arms of the immune system towards tumor eradication. **Journal of Controlled Release**, v. 187, p. 175-182, 2014.

DOUGAN, M.; DRANOFF, G. Immune Therapy for cancer. **Annual Review Immunology**, v.27, p.83-117, 2009.

FIGDOR, C. G. *et al.* Dendritic cell immunotherapy mapping the way. **Nature Medicine**, v.10, n. 5. p.475-489, mai. 2004

FUJITA, H. The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. **Journal of dermatological science**, v. 72, n. 1, p. 3-8, 2013.

INCA: Instituto nacional de câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br>>. Acesso em 05dez. 2016.

GLOBOCAN: International Agency for Research on Cancer and World Health Organization. **Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**.Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx>.Acesso em 05 dez. 2016.

GUTCHER, I.; BECHER, B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 5, p. 1119-1127, 2007.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HEISER, A. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL response against metastatic prostate tumors. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 3, p. 403-417, fev. 2002.

HUNDSBERGER, H.*et al.* TNF: a moonlighting protein at the interface between cancer and infection. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 13, p. 5374-5386, 2007.

KAH-WAI, L.*et al.* Dendritic cells heterogeneity and its role in cancer immunity. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 2, n. 2, p. 35, 2006.

KATIYAR, S. K. Interleukin-12 and photocarcinogenesis. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 224, n. 3, p. 220-227, 2007.

KENNEDY, R.; CELIS, E. Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. **Immunological reviews**, v. 222, n. 1, p. 129-144, 2008.

KLINKE, D. J. Enhancing the discovery and development of immunotherapies for cancer using quantitative and systems pharmacology: Interleukin-12 as a case study. **Journal for immunotherapy of cancer**, v. 3, n. 1, p. 1, 2015.

LESTERHUIS, W. J.; HAANEN, J. B. A. G.; PUNT, C. J. A. Cancer immunotherapy-revisited. **Nature reviews Drug discovery**, v. 10, n. 8, p. 591-600, 2011.

MA, W.*et al.* Long-Peptide Cross-Presentation by Human Dendritic Cells Occurs in Vacuoles by Peptide Exchange on Nascent MHC Class I Molecules. **The Journal of Immunology**, v. 196, n. 4, p. 1711-1720, 2016.

MATIAS, B. F. *et al.* Influence of immunotherapy with autologous dendritic cells on innate and adaptive immune response in cancer. **Clin.Med. Insights Oncol.**Uberaba, v. 7, p. 165-172, 2013.

MICHELIN, M. A. *et al.* Interleukin-12 in patients with cancer is synthesized by peripheral helper T lymphocytes. **Oncologyletters**, v. 10, n. 3, p. 1523-1526, 2015.

_____.Peripheral helper lymphocytes produce interleukin 12 in cancer patients. **Clinical Medicine Insights.Oncology**, v. 7, p. 75, 2013.

NGIOW, S. F.; TENG, M. W.; A balance of interleukin-12 and -23 in cancer.**Trends Immunol**, v.11, p.548-55, 2013.

OBEID, E.*et al.*The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). **International journal of oncology**, v. 43, n. 1, p. 5-12, 2013.

OBENAU, M.*et al.* Identification of human T-cell receptors with optimal affinity to cancer antigens using antigen-negative humanized mice. **Naturebiotechnology**, v. 33, n. 4, p. 402-407, 2015.

OLIVEIRA, T. M.; MURTA, E. F. C.; MICHELIN, M. A. **Avaliação clínica e de citocinas séricas de pacientes submetidos á imunoterapia com células dendríticas em neoplasias pré-invasivas e invasivas.**Uberaba, 2011. Disponível em <http://www.uftm.edu.br/pgcs/images/PGCS/DissertacoesTesesDefendidas/Mestrado/Anos_anteriores/2011/Tese_TaniaMaOliveiraME.pdf>. Acesso em 25 nov. 2016

PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Cancerimmunotherapy via dendriticcells. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 265-277, 2012.

PAN, W.*et al.* Cancer immunotherapy using a membrane-bound interleukin-12 with B7-1 transmembrane and cytoplasmic domains. **Molecular Therapy**, 2012.

PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**.Editora LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 7° ed, Philadelphia, 2013.

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, 2011.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A.The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 170-181, 2010.

SETHI, G.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. TNF: a master switch for inflammation to cancer. **Front Biosci**, v. 13, n. 2, p. 5094-107, 2008.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565-1570, 2011.

SMIGIEL, K. S. *et al.* CCR7 provides localized access to IL-2 and defines homeostatically distinct regulatory T cell subsets. **The Journal of experimental medicine**, v. 211, n. 1, p. 121-136, 2014.

SOUTO, G. R., MESQUITA, R. A., COSTA, F. O. **Relação entre Citocinas, Quimiocinas e Maturação das Células Dendríticas, em Indivíduos Fumantes e Não-Fumantes, com Periodontite Crônica.** Belo Horizonte, 2014. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUOS9JVGNG/tese_douorado_giovanna_ribeiro_souto._2010_2014.pdf?sequence=1>. Acesso em 18 nov. 2016.

SWAIN, S. L.; MCKINSTRY, K. K.; STRUTT, T. M. Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 2, p. 136-148, 2012.

TAN, M. P. *et al.* Human leucocyte antigen class I-redireted anti-tumour CD4+ T cells require a higher T cell receptor binding affinity for optimal activity than CD8+ T cells. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 187, n. 1, p. 124-137, 2017.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 2, p. 133-146, 2003.

_____. 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.

UENO, H. *et al.* Harnessing human dendritic cell subsets for medicine. **Immunological reviews**, v. 234, n. 1, p. 199-212, 2010.

VAHEDI, G. *et al.* Helper T-cell identity and evolution of differential transcriptomes and epigenomes. **Immunological reviews**, v. 252, n. 1, p. 24-40, 2013.

VAN DER VEEKEN, J.; ARVEY, A.; RUDENSKY, A. Transcriptional control of regulatory T-cell differentiation. In: **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 215-222. 2013.

VEGRAN, F. *et al.* [Th9 cells: a new population of helper T cells]. **Medecine sciences: M/S**, v. 32, n. 4, p. 387-393, 2016.

VERDIJK, P. *et al.* Maximizing dendritic cell migration in cancer immunotherapy. **Expert opinion on biological therapy**, v. 8, n. 7, p. 865-874, 2008.

VISAN, I. Specificity control. **Nature immunology**, v. 15, n. 7, p. 601-601, 2014.

VO, J. L. N. *et al.* Neoadjuvant immunotherapy with chitosan and interleukin-12 to control breast cancer metastasis. **OncoImmunology**, v. 3, n. 12, p. e968001, 2014.

XU, Y. *et al.* Co-expression of interleukin 12 enhances antitumor effects of a novel chimeric promoter-mediated suicide gene therapy in an immunocompetent mouse model. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 412, n. 4, p. 763-768, 2011.

WALLET, M. A.; SEN, P.; TISCH, R. Immunoregulation of dendritic cells. **Clinical Medicine & Research**, v. 3, n. 3, p. 166-175, 2005.

WHITESIDE, T. L. Immune responses to cancer: are they potential biomarkers of prognosis?. **Frontiers in oncology**, v. 3, p. 107, 2013.

WONG, M. T.*et al.* A high-dimensional atlas of human T cell diversity reveals tissue-specific trafficking and cytokine signatures. **Immunity**, v. 45, n. 2, p. 442-456, 2016.

YAMANE, H.; PAUL, W. E. Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4+ T cells toward distinct T-helper cell subsets. **Immunological reviews**, v. 252, n. 1, p. 12-23, 2013.

YUZHALIN, A.E.; KUTIKHIN, A. G. Interleukin-12: clinical usage and molecular markers of cancer susceptibility. **Growth Factors**, v. 30, n. 3, p. 176-191, 2012.

ZHOU, J. Advances and prospects in cancer immunotherapy. **New Journal of Science**, v. 2014, 2014.

ZHONG, H.; SHURIN, M. R.; HAN, B. Optimizing dendritic cell based immunotherapy for cancer. **Expert Rev Vaccines**6: 333-345, 2007

ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. CD103+ dendritic cells producing interleukin-12 in anticancer immunosurveillance. **Cancer cell**, v. 26, n. 5, p. 591-593, 2014.

APÊNDICE A – 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 a utilidade do 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.

Uberaba,/...../.....

Assinatura do voluntário/Responsável legal

Documento de identidade

Assinatura do pesquisador responsável
Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

Telefone de contato dos pesquisadores:

Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON): (34)3318-5595

Em caso de dúvida em relação a esse documento, você pode entrar em contato com o Comitê Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelo telefone 3318-5854.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



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

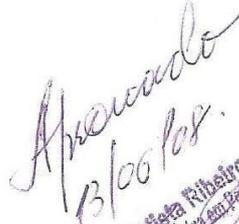
Ao Sr. João Batista Ribeiro
Coordenador do CEP-UFTM

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


13/06/08
João Batista Ribeiro
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM