

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JÉSSICA FERREIRA VIEIRA

**ANÁLISE DA SÍNTESE DE IL-12 EM LINFÓCITOS T CD4+ E CORRELAÇÃO  
COM FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM PACIENTES COM CÂNCER  
AVANÇADO**

UBERABA-MG  
2017

JÉSSICA FERREIRA VIEIRA

**ANÁLISE DA SÍNTESE DE IL-12 EM LINFÓCITOS T CD4+ E CORRELAÇÃO  
COM FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM PACIENTES COM CÂNCER  
AVANÇADO**

Dissertação apresentada ao Curso 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 em Ciências da Saúde.

Orientação: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Antoniazi Michelin  
Coorientação: Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta

UBERABA-MG  
2017

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

V715a Vieira, Jéssica Ferreira  
Análise da síntese de IL-12 em linfócitos T CD4+ e correlação com f  
fatores de transcrição em pacientes com câncer avançado / Jéssica Ferreira  
Vieira. – 2017.  
65 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal  
do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin

Coorientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta

1. Neoplasias. 2. Interleucina-12. 3. Linfócitos T Auxiliares-Indutores. 4.  
Linfócitos T CD4-Positivos. I. Michelin, Márcia Antoniazi. II. Universidade  
Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616-006.6

JÉSSICA FERREIRA VIEIRA

**ANÁLISE DA SÍNTESE DE IL-12 EM LINFÓCITOS T CD4+ E CORRELAÇÃO  
COM FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM PACIENTES COM CÂNCER  
AVANÇADO**

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 da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Antoniazi Michelin e coorientação do Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta.

BANCA EXAMINADORA

Uberaba, 19 de junho de 2017.

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Antoniazi Michelin

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Prof. Dr. Vicente de Paula Antunes Teixeira

UBERABA-MG

2017

Dedico este trabalho a tudo e todas as pessoas, que de forma direta ou indireta contribuíram para minha formação acadêmica, pessoal e espiritual; aos que passaram pela minha jornada, até o momento, independente das suas contribuições, positivas ou nem tanto, mas que auxiliaram no meu amadurecimento e acrescentaram algo a minha vida e ao meu modo de ser.

## AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que cruzaram meu caminho. Acredito que nada na nossa jornada aconteça ao acaso. Assim, quando encontramos com outras pessoas, a troca de vivências, um simples olhar, um gesto, auxilia a construir as histórias; e mesmo sem querer, isso acaba sendo permanente na essência e construção de cada um.

À Deus, energia vital que sempre me auxilia quando a ela recorro, me instruindo à resiliência, sabedoria e fé na vida.

Agradecer de forma especial e respeitosa a todas as pacientes e seus familiares, que apesar do sofrimento, das dificuldades e adversidades ocasionadas pelo câncer, voluntariamente aceitaram participar do nosso projeto, acreditando sempre que o melhor sempre está por vir. Sou imensamente grata a vocês.

Aos meus pais, César Eustáquio e Val Ferreira, pelo apoio incondicional a mim assistido em todos os momentos da minha jornada, nas mais diversas situações. Ao meu irmão César Júnior: exemplo de leveza e alegria.

Aos meus tios Vando Antônio, Divina Ferreira e Dalva Ferreira, pelo encorajamento, fé e palavras de apoio sempre. Aos meus avós Lázara Francisca e José Miguel Ferreira, Maria Oliveira e Sinval Marques, que mesmo com pouco acesso aos “métodos tradicionais” de educação, sempre foram exemplos de sabedoria e inteligência.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Márcia Antoniazi Michelin, pelo voto de confiança a mim dado, pelo apoio, sugestões, puxões de orelha, palavras amigas/encorajadoras e principalmente pela compreensão em momentos e “extraprofissionais”. Minha sincera gratidão, sempre!

Ao meu coorientador Prof. Dr Eddie Fernando Cândido Murta pelos esclarecimentos e orientações, que quando solicitadas, eram atendidas com cordialidade e rapidez.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, por contribuírem para o meu desenvolvimento intelectual, compartilhando seus conhecimento e vivências.

Às funcionárias da Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia, Andreia, Fátima, Simone e Ângela; a Andreia da Disciplina de Imunologia; Nilva, Nair, Daniela e Doris da Citologia, no Ambulatório Maria da Glória; Tuânia e André da Secretaria da Pós-Graduação em Ciências da Saúde; Ângela, Maria e Eva, responsáveis pela organização e limpeza do IPON; Marcos e Fátima, porteiros do IPON; que de forma direta e indireta participaram da confecção deste trabalho.

À Dra. Rosekeila Simões Nomelini pela triagem das pacientes e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos, que mesmo distantes, se fazem presentes: Thamires Manfrim, Fernanda Velasco e Gilberto Coelho.

Aos meus companheiros, agregados durante essa jornada, pelas palavras positivas, incentivos, amizade que ultrapassou as paredes do laboratório, se tornando amizades para a vida: Cláudio José da Silva (que também auxiliou bastante nas coletas das pacientes), Polyana Barbosa Silva, Tauana Christina Dias e Angela Maria Moed Lopes.

Carolina Guissoni Campos, que auxiliou em parte das coletas deste trabalho, sempre dedicada, atenciosa, carinhosa e com uma palavra de apoio à cada paciente que tivemos contato.

Aos meus colegas do IPON, pela convivência diária, auxílio, troca de conhecimento, risadas; todos vocês foram importantes nessa caminhada: Millena Prata Jammal, Andjara T. C. Soares, Leticia Montes Stark, André Adriano R. Aleixo, Eduardo Arthur R. Alves, Mara Rosa, Saulo Fernando, Chamberttan Desidério, Larissa M. Pereira, Fabiano Mundim.

E aqueles que por diferentes motivos trilharam novos caminhos na vida, mas que são importantes por serem exemplos a serem seguidos e/ou por boas memórias que deixaram: Renata Moreira Araújo, Douglas R. Abdalla, Thiago M. Bianco, Luan Andrade, Raphael G. Lopes e Lázaro Novaes.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, à

Fundação de Amparo e Pesquisa de Uberaba, pelos recursos financeiros destinados ao desenvolvimento deste projeto.

E por fim, agradecer ao Rodrigo, que não está mais aqui entre nós, não tendo a oportunidade de ver essa etapa ser encerrada. Mas que em parte, diria a metade dessa etapa, foi papel chave e fundamental na minha jornada. Foi um bom companheiro, sempre com palavras encorajadoras, um senso de humor interessante e leve, com palavras animadoras nos momentos de desânimo. Que você esteja bem, em um bom lugar!



*“Tenha paciência. Tudo aquilo que você deseja, se for verdadeiro, e o mais importante: se for para ser seu, acontecerá. ”*

*(William Shakespeare)*

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando, semeando, no fim terás o que colher. ”*

*(Cora Coralina)*

## RESUMO

No contexto tumoral, o sistema imunológico desempenha papéis que podem prevenir o desenvolvimento ou a progressão tumoral. Assim, a produção de citocinas, principalmente por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, representa um fenômeno crucial na resposta imune, uma vez que variações nesta regulação podem resultar em uma resposta inadequada. Anteriormente, esse grupo de pesquisa demonstrou que linfócitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes com estádios avançados de câncer expressavam interleucina-12, o mesmo se aplicando a camundongos induzidos a câncer de mama com DMBA (7, 12 – Dimetilbenzantraceno). Então, o objetivo do presente estudo foi avaliar a síntese de IL-12 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes com câncer, correlacionando com a expressão dos fatores de transcrição *T-bet*, *GATA-3*, *ROR $\gamma$ t* e *FoxP3*, utilizando citometria de fluxo e abordagens moleculares. As células T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> foram isoladas a partir do sangue periférico obtido de pacientes com câncer, utilizando técnica de citometria de fluxo com princípio de *cell sorting* (triagem de células) e submetidas a análise do perfil transcricional. Os resultados demonstram uma porcentagem significativamente maior de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> no sangue periférico de pacientes com câncer ( $p < 0,0001$ ). E estas expressam o fator de transcrição *ROR $\gamma$ t*, podendo ainda algumas coexpressarem o fator *T-bet*. Ainda foi observado que algum fator (s) sérico (s) presente no soro dos pacientes com câncer são capazes ainda de induzir a diferenciação de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup>, sendo notável o aumento na porcentagem destas células em culturas estimuladas com o soro ( $p = 0,0020$ ). Entretanto novas investigações são necessárias, para compreender esse fenótipo de linfócito.

**Palavras chave:** linfócitos T auxiliares, interleucina 12, *ROR $\gamma$ t*, *T-bet*, resposta antitumoral

## ABSTRACT

In the tumor context, the immune system plays roles that can prevent development or progression of tumor. Thus, the production of cytokines by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes represents a crucial phenomenon in the immune response, because the variations in this regulation may result in an inadequate response. Previously, our research group demonstrated that CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from advanced cancer patients expressed interleukin-12 and the same was applied to mice induced breast cancer with DMBA (7,12-Dimethylbenzanthracene). The aim of the present study was to evaluate the synthesis of IL-12 in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from the peripheral blood of cancer patients, correlating with the expression of *T-bet*, *GATA-3*, *ROR $\gamma$ t* and *FoxP3* transcription factors. The CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> T cells were isolated from the peripheral blood obtained from cancer patients, using flow cytometry technique with cell sorting principle and submitted to transcriptional profile analysis. The results demonstrate a significantly higher percentage of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> T lymphocytes in the peripheral blood of cancer patients ( $p < 0.0001$ ). In addition, these express the transcription factor *ROR $\gamma$ t*, and some may coexpress the *T-bet* factor. It has been observed that some serum factor (s) present in the serum of cancer patients are still capable of inducing the differentiation of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> T lymphocytes, being remarkable the increase in the percentage of these cells in stimulated cultures with serum ( $p = 0.0020$ ). However new investigations are needed to understand this lymphocyte phenotype.

**Key words:** peripheral helper T lymphocytes, interleukin-12, *ROR $\gamma$ t*, *T-bet*, antitumor response

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Número estimado de casos de prevalência (5 anos), em ambos os sexos, em todo o mundo, para os 10 principais tipos de câncer, no ano de 2012	18
<b>Figura 2</b>	Delineamento experimental	32
<b>Figura 3</b>	Porcentagem de células T CD4 <sup>+</sup> IL-12 <sup>+</sup> nas amostras de controle saudáveis <i>versus</i> pacientes com câncer avançado	39
<b>Figura 4</b>	Perfil de células T CD4 <sup>+</sup> IL-12 <sup>+</sup>	40
<b>Figura 5</b>	Expressão gênica dos fatores de transcrição <i>T-bet</i> , <i>FoxP3</i> , <i>GATA-3</i> e <i>ROR<math>\gamma</math>t</i>	41
<b>Figura 6</b>	Coexpressão de CD4 e IL-12 em culturas de amostras de sangue periférico de doadores saudáveis não incubadas (controle negativo), incubadas com soro de controles saudáveis (controle positivo) e com soro de pacientes com câncer avançado e ou/recidivado (estimulado), participantes desse estudo	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil em 2016 – sexo masculino	19
<b>Tabela 2</b>	Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil em 2016 – sexo feminino	19
<b>Tabela 3</b>	Marcações extracelulares e intracelulares para células do sangue periférico	33
<b>Tabela 4</b>	Reagentes da primeira etapa do RT-PCR	35
<b>Tabela 5</b>	Reagentes da segunda etapa do RT-PCR	35
<b>Tabela 6</b>	Protocolo para reação qPCR	36
<b>Tabela 7</b>	Sequências e concentrações dos iniciadores	36
<b>Tabela 8</b>	Condições realizações qPCR	37
<b>Tabela 9</b>	Temperaturas de anelamento de cada gene alvo (iniciadores)	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau <i>Celsius</i>
µL	Microlitro
APC	<i>Allophycocyanin</i>
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
cDNA	DNA complementar
CDs	Células Dendríticas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CSC	<i>Cancer Stem Cells</i> (Células estaminais do câncer)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
Fas	Receptor de Morte Programada
FasL	Ligante do Receptor de Morte Programada
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
FITC	<i>Fluorescein Conjugate</i>
FUNEPU	Fundação de Amparo e Pesquisa de Uberaba
g/L	Gramas por litro
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos
IFN	Interferon
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva
IPON	Instituto de Pesquisa em Oncologia
mg	miligramas
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Completo de Histocompatibilidade Principal)
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical

NK	células <i>Natural Killer</i> (Assassinas naturais)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PerCp	<i>Peridinin Chlorophyll protein complex</i>
PerCP.Cy 5.5	<i>Peridinin Chlorophyll protein complex</i>
Pg/mL	pictogramas por mililitro
RNA	Ácido Ribonucleico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SNC	Sistema Nervoso Central
TCR	Receptor de célula T
TGF	Fator de Crescimento Transformador
Th	linfócitos T <i>helper</i> (T auxiliares)
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Treg	linfócitos T regulatórios
UFTM	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
UI	Unidades Internacionais
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)
xg	Força Centrífuga Relativa

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	17
<b>1.1 Câncer</b>	17
<b>1.2 Resposta imunológica aos tumores</b>	21
<b>1.3 Fatores de transcrição <i>T-bet</i>, <i>GATA-3</i>, <i>ROR<math>\gamma</math>t</i>, <i>FoxP3</i> e o câncer</b>	25
<b>1.4 Linfócitos T CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup></b>	26
<b>2 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA</b>	29
<b>3 OBJETIVOS</b>	30
<b>3.1 Objetivos específicos</b>	30
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	31
<b>4.1 Caracterização da amostra e delineamento experimental</b>	31
<b>4.2 Análise presença linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> por citometria de fluxo</b>	32
<b>4.3 Isolamento de RNA</b>	34
<b>4.4 Transcrição reversa de RNA para DNA complementar (cDNA)</b>	34
<b>4.5 qPCR (<i>quantitative PCR</i>)</b>	35
<b>4.6 Ensaio <i>in vitro</i></b>	37
<b>4.7 Análise dos resultados</b>	38
<b>5 RESULTADOS</b>	39
<b>5.1 Linfócitos T auxiliares de pacientes com câncer avançado expressam IL-12 intracelularmente</b>	39
<b>5.2 Linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> de pacientes com câncer avançado expressam <i>ROR<math>\gamma</math>t</i></b>	40
<b>5.3 Fatores séricos presentes no soro dos pacientes com câncer avançado são capazes de induzir a diferenciação de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup></b>	41
<b>6 DISCUSSÃO</b>	43
<b>7 CONCLUSÃO</b>	49
<b>REFERÊNCIAS</b>	50
<b>APÊNDICE A</b>	57
<b>APÊNDICE B</b>	58
<b>APÊNDICE C</b>	59
<b>ANEXO 1 – Termo de esclarecimento</b>	60
<b>ANEXO 2 – Cópia aceite CEP_UFTM</b>	62
<b>ANEXO 3 – Caracterização amostra</b>	63





# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

As neoplasias são transformações anormais de células que podem ocorrer de forma induzida ou espontânea. Geralmente entende-se que neoplasia é uma lesão composta por proliferação celular anormal, instável, autônoma, que leva a perda ou redução da diferenciação devido a alterações em genes e proteínas (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2015; LOEB; HARRIS, 2008).

As alterações que podem induzir a formação de neoplasias podem ser intrínsecas e extrínsecas. No primeiro caso seriam por mutações genéticas ou erros aleatórios no processo de replicação do DNA. No segundo, por danos e/ou instabilidade genética, como por exemplo, induzida por exposição à radiação (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

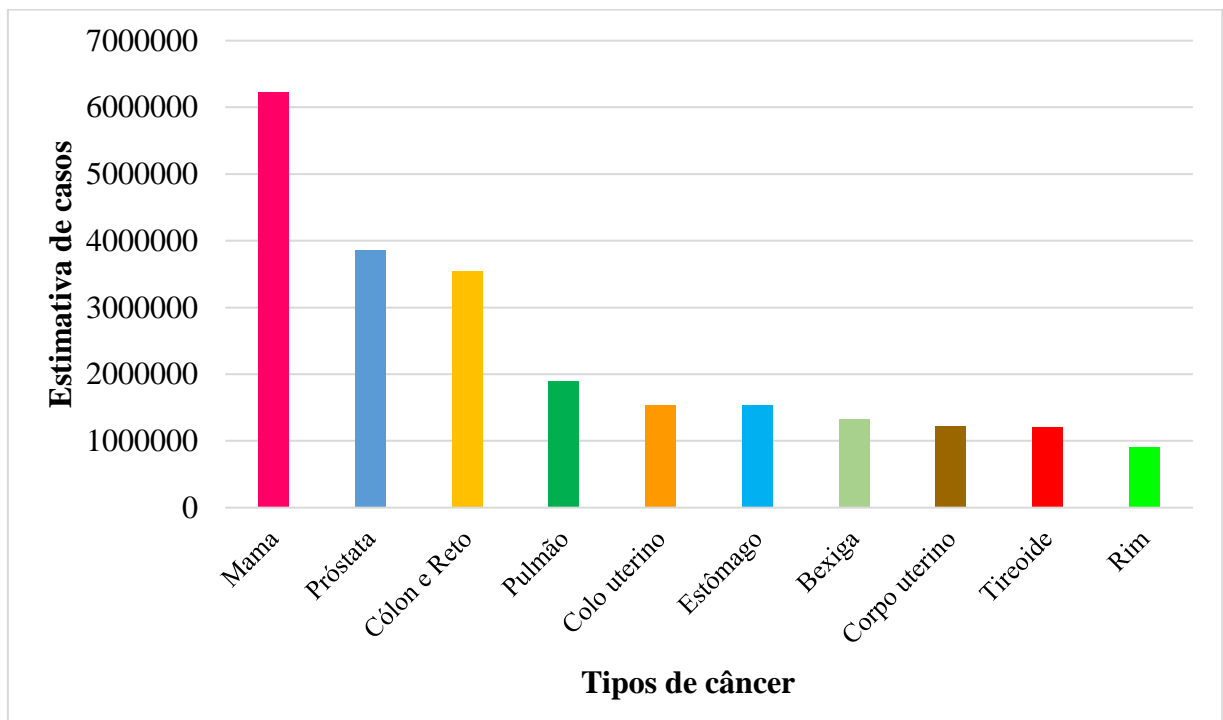
Assim, as formas induzidas de neoplasias podem ser estimuladas por agentes carcinogênicos físicos, químicos e biológicos. Dentre os físicos, pode-se mencionar a energia radiante (radiação UV e raio-X, que geram danos diretos a estrutura do DNA) e energia térmica, gerada pelas exposições constantes ao calor; os agentes químicos, como os corantes e o fumo; e os agentes biológicos, como vírus e bactérias. As formas espontâneas podem ser geradas por quebra da integridade funcional da atividade celular (ciclo celular), como consequência de alterações moleculares, fenotípicas e de estímulos diversos, podendo ainda serem herdadas geneticamente (TLSTY; COUSSENS, 2006; ARRUDA *et al.*, 2008; LOEB; HARRIS, 2008).

Alguns autores descrevem que apenas uma mutação dificilmente induz a uma quebra da integridade funcional do processamento do ciclo celular. Para a formação da massa tumoral são necessárias de duas a seis alterações genéticas progressivas para interferir nos mecanismos de proliferação, diferenciação e morte celular. E são essas alterações que levam as células a possuírem características fenotípicas de uma neoplasia, com uma homeostasia tecidual distorcida e com complexo mecanismo fisiológico (INOUE; AMAR; CERVANTES, 2005; ONUCHIC, CHAMMAS, 2010). Porém é interessante mencionar que apesar de os termos tumor, neoplasia e câncer serem utilizados como sinônimos, eles podem abranger significados bem distintos.

Neoplasia vem das palavras gregas *neo*, de novo e *plasis*, de crescimento, enquanto que câncer vem do grego *karkínos*, que quer dizer caranguejo (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2015). Enquanto neoplasia refere-se a uma transformação das células que geram uma proliferação anormal, o câncer é um nome dado a um conjunto de mais de 100 tipos de doenças

que possuem em comum o crescimento anormal e desordenado, associado a um potencial invasivo (INCA, 2016), sendo que os fatores que promovem o câncer podem agir em conjunto e/ou em uma sequência de eventos. O termo tumor caracteriza o aumento de um tecido, por exemplo, devido ao crescimento (número) de células, oriundos do fenômeno da neoplasia (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2015). Considerando que fenômeno é um fato ou evento que pode ser descrito e explicado pela ciência em conceitos, logo nem todo tumor é câncer, assim como nem toda neoplasia é câncer.

Nos últimos anos, o câncer vem sendo considerado um problema de saúde pública, tanto pela ausência de tratamentos eficazes que proporcionem sua cura, quanto aos seus altos índices de mortalidade e a magnitude que essa doença alcança a cada ano. De acordo com a *World Health Organization* (WHO, 2013), em 2012 cerca de 8,2 milhões de pessoas ao redor do mundo morreram de câncer. Na figura 1 é possível visualizar estimativas para as 10 principais prevalências de tipos de câncer em todo o mundo, no ano de 2012. Calcula-se que em 2030 a carga global de novos casos de câncer será de 21,4 milhões e de 13,2 milhões de mortes, em decorrência principalmente ao crescimento e envelhecimento da população (GLOBOCAN, 2012).



**Figura 1:** número estimado de casos de prevalência (5 anos), em ambos os sexos, em todo o mundo, para os 10 principais tipos de câncer, no ano de 2012. Adaptado de GLOBOCAN, 2012.

No Brasil, país onde a população passa por uma mudança no perfil demográfico, principalmente devido aos novos estilos de vida associados aos recentes processos de urbanização, ao crescimento industrial e aos avanços na ciência e tecnologia, houve uma alteração do perfil de morbimortalidade da população. Segundo as estimativas, no biênio 2016-2017, ocorrerão cerca de 600 mil novos casos de câncer no país (Tabelas 1 e 2) (INCA, 2016).

**Tabela 1: distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil em 2016 – sexo masculino**

<b>Localização Primária</b>	<b>Casos Novos</b>	<b>%</b>
Próstata	61.200	28,6
Traqueia, brônquio, pulmão	17.300	8,1
Cólon e reto	16.660	7,8
Estômago	12.920	6,0
Cavidade oral	11.140	5,2
Esôfago	7.950	3,7
Bexiga	7.200	3,4
Laringe	6.360	3,0
Leucemias	5.540	2,6
SNC*	5.440	2,5

Adaptado de INCA, 2015 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto não-melanoma. \*Sistema Nervoso Central

**Tabela 2: distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil em 2016 – sexo feminino**

<b>Localização Primária</b>	<b>Casos Novos</b>	<b>%</b>
Mama	57.960	28,1
Cólon e reto	17.620	8,6
Colo uterino	16.340	7,9
Traqueia, brônquio, pulmão	10.890	5,3
Estômago	7.600	3,7
Corpo do útero	6.950	3,4
Ovário	6.150	3,0
Glândula Tireoide	5.870	2,9

Linfoma não-Hodgkin	5.030	2,4
SNC*	4.830	2,3

Adaptado de INCA, 2015 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto não-melanoma. \*Sistema Nervoso Central

Todavia, os mecanismos de desenvolvimento do câncer não são totalmente compreendidos. Os fundamentos das teorias da carcinogênese consideram, em linhas gerais, duas etapas para o seu limiar: transformação do material genético, seguida por uma divisão celular alterada, com transmissão do material genético modificado para as próximas linhagens (SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004).

*Weinberg*, em 1996, descreveu que o câncer seria uma permutação de uma célula normal para uma modificada, com crescimento progressivo e lenta taxa da mortalidade, com capacidade de sofrerem metástases. Assim sendo, quando presentes em uma massa tumoral, estas células transferem-se do sítio de origem, difundindo-se pela circulação e formam sítios de células neoplásicas em outros locais do organismo. As massas tumorais de origem metastática podem comprometer a função dos órgãos, resultando em morte (WEINBERG, 1996). Mas além de capacidade metastática, as células cancerígenas ainda apresentam capacidade de invasão local e de se sustentarem com alterações no microambiente tumoral (ONUCCI; CHAMMAS, 2010).

Sendo o câncer uma doença de cunho genético, as caracterizações dos genes envolvidos nas transformações das proteínas envolvidas nas atividades do ciclo celular são essenciais na compreensão da fisiopatologia do câncer. Esses genes são importantes parâmetros da presença de células tumorais, sendo caracterizados em proto-oncogenes (genes promotores do crescimento celular) e genes supressores (JOHUNG; GOODWIN; DIMAIO, 2007; ARRUDA *et al.*, 2008; GUEMBAROVSKI; CÓLUS, 2009).

Os proto-oncogenes são genes que, em atividade normal, controlam as atividades de diferenciação e divisão mitótica das células. Mas quando alterados geram crescimento celular anormal, sendo então denominados de oncogenes (SILVA; SERAKIDES; CASSALI, 2004). Os genes supressores são genes que, dentro do padrão da normalidade, previnem a expansão descontrolada de células. Quando mutados se tornam responsáveis pela alteração das proteínas constituintes do ciclo celular (ALMEIDA *et al.*, 2007; GUEMBAROVSKI; CÓLUS, 2009).

Dentre algumas proteínas codificadas por esses genes, pode-se citar a pRb que, juntamente com a p53, monitora a integridade dos cromossomos e promove o seguimento

adequado do ciclo celular. Outros exemplos são os genes de codificação para as ciclinas, proteínas chaves na regulação do ciclo celular, que estimulam as células para a divisão celular (PELUZIO *et al.*, 2006). Destacam-se ainda, os genes BRCA1 e 2, envolvidos com alguns casos de câncer de mama e de ovário; o gene APC, associado ao câncer colorretal; o WT1, ligado com o tumor de *Wilms*; o p16<sup>ink4</sup> do melanoma familiar; os NF1 e 2, envolvidos com a neurofibromatose, entre outros (HUSSAIN; HARRIS, 2000; SHIH *et al.*, 2000).

Logo, neste cenário, considera-se papel fundamental os mecanismos de defesa desempenhados pelo sistema imune contra as neoplasias, devido a sua habilidade de reconhecer os fatores “estranhos” ao organismo. No caso da célula neoplásica, não seria propriamente um fator estranho, mas uma alteração ocorrida em um fator próprio do hospedeiro. E o mais intrigante é a capacidade do câncer em exercer influências sobre o sistema imune, que provocam, por exemplo, a imunossupressão (TRICHOPOULOS; LI; HUNTER, 1996). Entretanto, muitos destes aspectos de como os mecanismos se processam para o estabelecimento do câncer ainda não são conhecidos em sua integridade.

## 1.2 Resposta imunológica aos tumores

O sistema imunológico tem se ajustado e evoluído na tentativa de identificar, neutralizar e/ou eliminar patógenos que gerem algum dano ao hospedeiro. Assim, ele desempenha um papel relevante na prevenção do desenvolvimento e progressão tumoral. As interações estabelecidas entre células tumorais e mecanismos do sistema imunológico são complexas e reagem de maneiras distintas em cada indivíduo, podendo inibir o crescimento tumoral, levando à atenuação “espontânea” ou dar subsídios que promovam a progressão tumoral e a angiogênese (DOUGAN; DRANOFF, 2009).

Em 1909 foi proposto por *Paul Ehrlich* a teoria da vigilância imunológica que predizia que o sistema imune é o responsável pelo monitoramento e controle das células tumorais, uma vez que as células imunes são capazes de identificar e eliminar clones de células mutadas antes mesmo que elas originem tumores. Esse conceito ficou conhecido como *immunosurveillance* e sua existência foi confirmada em 1957 pelos pesquisadores *Sir MacFarlane Burnet* e *Lewis Thomas* (BURNET, 1970; SCHAROVSKY, 2006).

Considera-se que os mecanismos de eliminação tumoral envolvam a imunidade inata e a adquirida, gerando um sistema integrado de defesa no hospedeiro, no qual diversas células e componentes moleculares agem de forma recíproca. Deste modo, a imunidade inata atua como linha de defesa inicial contra as células tumorais, atuando principalmente com mecanismos que

incluem as células *natural killer* (NK), as células dendríticas (CDs) e os macrófagos. Ao passo que a imunidade adaptativa atua principalmente com os linfócitos T (T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>), tipos celulares que apresentam maior especificidade contra os antígenos tumorais (LEHRNBECHER *et al.*, 2008; LOOSE; VAN DE WIELE, 2009).

Resumidamente, o controle tumoral na imunidade inata é realizado pelas células NK, CDs e macrófagos, tipos celulares responsáveis pela fagocitose e eliminação das células tumorais e por moléculas solúveis, como o interferon (IFN), as interleucinas (IL), o fator de necrose tumoral (TNF) e demais citocinas (SHI; EVANS; ROCK, 2003; CRUVINEL *et al.*, 2010).

Os macrófagos são tipos celulares capazes de impedir a progressão do câncer ou favorecer o seu crescimento, de acordo com o seu perfil de diferenciação. Quando diferenciados em macrófagos tipo 1 (M1), liberam enzimas tóxicas (enzimas lisossomais), espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, sendo estas as substâncias que promovem a destruição das células tumorais. São ainda os maiores produtores de TNF- $\alpha$  e de outras citocinas estimuladoras dos demais mecanismos imunológicos, como a IL-2, IL-12 e IL-18. Entretanto, quando diferenciados em macrófagos tipo 2 (M2), podem atuar em favor do crescimento tumoral, devido ao seu poder de secretar o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de transformação do crescimento do tipo beta (TGF- $\beta$ ), ambos promovedores da angiogênese tumoral (COUSSENS; WERB, 2002).

As células NK iniciam o processo de destruição das células tumorais através da liberação de seus grânulos de perforinas e granzimas, acarretando em lise destas. São ativadas por citocinas como a IL-12 e o IFN- $\gamma$ . A IL-12 produzida, por exemplo, pelos macrófagos e demais células apresentadoras de antígenos (APCs) colaboram na ativação das NKs. Mas elas dependem ainda do equilíbrio entre seus receptores de ativação e de inibição. Esse equilíbrio é proveniente das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), em que, comumente, as células normais não são alvos das células NK por possuírem sinais inibitórios provenientes do MHC I, enquanto que nas células tumorais estes sinais são interrompidos devido a alterações na expressão do mesmo (TORREZINI; ATHANÁZIO, 2008; CRUVINEL *et al.*, 2010).

A produção de IFNs do tipo I ativa as APCs, em especial as CDs, as células iniciadoras das respostas imunes adquiridas. Mas outras citocinas são brevemente produzidas em resposta aos sinais emitidos pelo reconhecimento antigênico e podem alterar significativamente a atividade das CDs, por induzir a diferenciação, ativação, migração e a maturação destas células. Entre as citocinas pode-se mencionar o fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago

(GM-CSF), IFN- $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-12 e TNF- $\alpha$  (KAPLAN *et al.*, 1998; LANGENKAMP *et al.*, 2000; SERAFINI *et al.*, 2004).

Diferente dos mecanismos da imunidade inata, na imunidade adquirida há um maior direcionamento e especificidade das respostas contra o antígeno alvo. Durante a resposta imunológica inata, o ambiente é organizado para propiciar a atuação de uma resposta mais específica, em que as interações entre as APCs maduras e as citocinas produzidas gerem uma resposta mais eficiente (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006). As principais células que agem nesta etapa da resposta imunológica são os linfócitos T, que reconhecem os antígenos de uma célula tumoral pelo receptor de célula T (TCR) (IGNEY; KRAMMER, 2002).

Estudos tem apontado que a resposta através dos linfócitos T é o principal mecanismo de defesa contra as células tumorais. As células T CD8<sup>+</sup> podem eliminar as células tumorais por citotoxicidade direta, mediando a eliminação das células alvo pela produção de IFN- $\gamma$ , perforinas e granzimas, além da indução de apoptose pela ligação entre os receptores Fas e FasL (receptores de morte celular programada) (DOUGAN; DRANOFF, 2009). Através da secreção de citocinas (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e IFN tipo I) as células T CD4<sup>+</sup> do subgrupo Th1 podem participar da ativação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, auxiliando estes nas suas funções citotóxicas (HUNG *et al.*, 1998; STEINMAN; BANCHEREAU, 2007).

Os antígenos tumorais a serem reconhecidos pelo TCR são apresentados via MHC, expresso na superfície das CDs. O MHC I e II apresentam os antígenos para os linfócitos, respectivamente aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, resultando na diferenciação destes em formas efectoras. O reconhecimento antigênico via MHC é considerado o primeiro sinal no processo de ativação; a interação entre as moléculas coestimulatórias expressas nas superfícies das CDs e dos linfócitos T são o segundo sinal; e um possível terceiro sinal é fornecido pela secreção das citocinas (DOUGAN; DRANOFF, 2009; BOUDREAU *et al.*, 2011).

De acordo com o estímulo de ativação das CDs, as células T CD4<sup>+</sup> podem se diferenciar em subpopulações, as Th1, Th2, Th17 e T regulatórias (Treg). Os linfócitos Th1 são caracterizados pela síntese de IL-2 e IFN- $\gamma$ , sendo sua principal função a regulação de outros tipos de células, como, por exemplo, os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, NK e macrófagos, células primordiais no combate às células tumorais (RADFORD; TULLET; LAHOUD, 2014).

Os linfócitos Th2 são capazes de estimular as respostas imunes humorais e suprimirem o desenvolvimento de células do fenótipo Th1. No câncer, em específico, as respostas mediadas por células Th2 podem favorecer a carcinogênese, principalmente por inibir a resposta antitumoral e desencadear respostas que promovem o desenvolvimento do tumor (Xie *et al.*, 2015). Este perfil de célula ainda pode ativar macrófagos M2, contribuindo assim para o



aumento da agressividade das células tumorais, induzindo os macrófagos M2 a adquirirem o fenótipo de células tronco do câncer, as *Cancer Stem Cells* (CSC) (DING *et al.*, 2012).

No câncer, os mecanismos de respostas gerados por Treg atuam como um componente pró-tumoral, pois as atividades imunossupressoras destas células impedem que o sistema imune reconheça e inicie respostas contra o tumor (WANG *et al.*, 2015).

As Treg são associadas aos processos de inibição dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, NK e macrófagos, favorecendo o crescimento tumoral. Estão vinculadas às situações de imunossupressão, podendo as Tregs serem divididas em naturais e adaptativas (nTregs e aTregs), de acordo com as vias de desenvolvimento e com seus mecanismos de supressão distintos (WING; FEHERVARI; SAKAGUCHI, 2006), mediante a produção de citocinas como o TGF- $\beta$  (Treg) e IL-4 e IL-10 pelos linfócitos Th2 (SEGURA *et al.*, 2013).

Já os linfócitos Th17 ainda não possuem um papel bem descrito na imunidade antitumoral. A literatura pontua apenas que estes estão associados à promoção de respostas imunes contra microrganismos extracelulares, através da produção de IL-17, promovendo o recrutamento de monócitos e neutrófilos, além de estarem associados ao desenvolvimento de algumas doenças autoimunes (SEGURA *et al.*, 2013).

Considerando a resposta da imunidade adaptativa humoral, a participação dos linfócitos B na resposta antitumoral ocorre através da produção de anticorpos específicos para os tumores. Os anticorpos se ligam aos antígenos, favorecendo o reconhecimento e fagocitose, com consequente destruição pelas células NK. Ativam, ainda, o sistema complemento, que culmina em lise das células tumorais (ONUCHIC; CHAMMAS, 2010).

Desta forma, o sistema imune apresenta um papel muito importante diante da atividade tumoral, auxiliando para que não ocorra o crescimento do tumor. Entretanto, as células tumorais “elaboram” um ambiente imunossupressor que afeta a resposta imunológica local. Em pacientes com estadiamentos tumorais mais avançados, autores têm demonstrado que o mau funcionamento se apresenta maior nos diversos mecanismos da resposta imunológica (GARCIA PAZ *et al.*, 2014).

Assim, em algumas condições, os tumores podem anular as funções de CDs, por exemplo, na tentativa de evasão da resposta imunológica, revertendo os mecanismos de ataque ao seu favor. A natureza certa deste tipo de interação ainda não está elucidada em sua completude. Por isso alguns estudos buscaram e buscam identificar os mecanismos de escape associados ao crescimento tumoral, tanto os que envolvem as células tumorais quanto os que envolvem os antígenos associados ao tumor e, ainda, o próprio sistema imunológico do hospedeiro (ROTH *et al.*, 2001; SOMBROEK *et al.*, 2002; GABRILOVICH, 2004).

### 1.3 Fatores de transcrição *T-bet*, *GATA-3*, *ROR $\gamma$ t*, *FoxP3* e o câncer

Dentre as propriedades das células T CD4<sup>+</sup> virgens, talvez a mais característica e uma das mais intrigante seja a sua predisposição, de acordo com o estímulo recebido, de se diferenciar em subtipos de células. Estes subtipos agem de formas diferentes contra os agentes patogênicos (ZHU; PAUL, 2008).

Desta forma, elas são capazes de desempenhar diversos papéis nas atividades imunes. Pode ser através da sua capacidade de auxiliar as células B em seus processos de produção de anticorpos, na indução da atividade de macrófagos para desenvolver sua atividade de forma aumentada, no recrutamento de neutrófilos, eosinófilos e basófilos aos locais de infecção e inflamação, ou através da produção de citocinas, que orquestram as mais diversas respostas imunes (ZHU; PAUL, 2008).

Em 1986, *Mosmann* e colaboradores reconheceram os fenótipos Th1 e Th2 como clones de células T CD4<sup>+</sup>, mostrando a distinção destes subgrupos através das citocinas produzidas e secretadas durante o estímulo dado por uma APC. Assim, foi definido em Th1, o subgrupo que secreta IL-2 e IFN- $\gamma$ , induzindo a imunidade celular e função tumoricida de macrófagos induzindo a liberação de substâncias tóxicas, e Th2, o subgrupo que libera IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, relacionados com a imunidade humoral (MOSMANN *et al.*, 1986; MOSMANN; COFFMAN, 1989; MIOSSEC; KORN; KUCHROO, 2009). Posteriormente foram descritas as Treg e Th17.

Mais recentemente, a distinção entre os subtipos baseia-se na descrição de fatores de transcrição em cada uma destas subpopulações. Os fatores de transcrição são classes de proteínas encarregadas dos processos de regulação da expressão de determinados genes. E essa transcrição é realizada pela ação da RNA polimerase. Ou seja, elas se ligam a uma região do material genético agindo sobre a expressão ou a inibição do gene em questão (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Desta forma, o *T-bet* é considerado o principal fator de transcrição acionado na diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> no perfil Th1, que passam a sintetizá-lo após a estimulação por IFN- $\gamma$ . Quando ativado ele promove a síntese de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  e a inibição do perfil Th2, regulando a atividade do fator de transcrição *GATA-3* negativamente. Vale ressaltar que além do *T-bet*, a expressão intracelular de STAT1 e STAT4 participam da diferenciação de Th1 (HWANG *et al.*, 2005; MIOSSEC; KORN; KUCHROO, 2009; RODRIGUES-GALAN *et al.*, 2009; LAZAREVIC; GLIMCHER; LORD, 2013).

As citocinas secretadas pelas células Th1 tem se mostrado capazes de inibir a angiogênese, as metástases e o crescimento tumoral, sendo por isso denominada por alguns autores como perfil de resposta ideal antitumoral. As citocinas secretadas pelo perfil Th1 ainda são capazes de ativar os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, como já mencionado (TRINCHIERI, 2003; RODRIGUES-GALAN *et al.*, 2009).

O fator de transcrição *GATA-3* é expresso em células T CD4<sup>+</sup> quando estimuladas por IL-4, diferenciando-as no perfil Th2. Além do *GATA-3*, o fator STAT6 também propicia a diferenciação de Th2. Esse fenótipo é capaz de secretar as citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que são características desse perfil de resposta e são capazes de promover a ativação alternativa de outras células, como por exemplo em macrófagos do tipo M2 (MIOSSEC; KORN; KUCHROO, 2009; ABBAS; LITCHTMAN; PILLAI, 2015). O *GATA-3* além de induzir a diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> em Th2, ainda é capaz de inibir o fator de transcrição *T-bet*, característico do perfil de células Th1 (ZHU *et al.*, 2012).

O fator de transcrição *ROR $\gamma$ t* está presente nos mecanismos de diferenciação dos linfócitos do subtipo Th17. Estas células são conhecidas por apresentarem um perfil pró-inflamatório, secretando as citocinas IL-17A, IL-17F, IL-23, IL-21, IL-22 e TNF- $\alpha$ , responsáveis pela ativação de células do sistema imune inato (KORN *et al.*, 2009). O mRNA de *ROR $\gamma$ t* demonstra-se ainda superexpresso em resposta ao estímulo de IL-23 (CUA; KASTELEIN, 2006; ZHENG, 2013).

O fator de transcrição *FoxP3* é crucial para o desenvolvimento de células Treg (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) (RICCIARDELI *et al.*, 2008). Esta população celular expressa altos níveis do receptor CTLA-4 e secreta citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e a citocina imunossupressora TGF- $\beta$  (CUA; KASTELEIN, 2006).

Hoje, além destes subtipos mencionados, são conhecidas outras populações, como Th22 e Th9, mas que necessitam de mais estudos para a caracterização dos seus fatores de transcrição (ELYAMAN *et al.*, 2009; JOSEFOWICZ; RUDENSKY, 2009; LI; ROSTAMI, 2010).

#### **1.4 Linfócitos T CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup>**

A IL-12, descoberta em 1989, é uma proteína heterodimérica composta por duas cadeias ligadas por dissulfeto glicosídico. Produzida principalmente por macrófagos ativados e CDs em resposta a agentes patogênicos, desempenha um importante papel na regulação de respostas imunológicas inatas e determinação do tipo e duração das respostas imunológicas adquiridas. É um fator chave para a indução da ativação de células T dependente e independente de

macrófagos, NK, geração de Th1 (sendo um importante regulador da imunidade adaptativa mediada por esse subgrupo – ação antitumoral, antimetastática e antiangiogênica) e T CD8<sup>+</sup>, aumentando sua atividade citotóxica, indução opsônica e resistência a infecções intracelulares (TRINCHIERI, 1995; TATSUMI *et al.*, 2003).

Sendo a IL-12 uma citocina heterodimérica, ela possui as cadeias p40 e p35 codificadas em cromossomos diferentes. A expressão coordenada dos dois genes constituintes é crucial para respostas imunes adequadas em tempo, localização e magnitude. Juntas, as cadeias p40 e p35 formam a IL-12 biologicamente ativa (p70). A expressão altamente coordenada de p40 e p35 é essencial para a iniciação de uma resposta imune eficaz (SNIJDERS *et al.*, 1996).

Trabalhos que buscaram traçar um perfil imunológico associado com a progressão tumoral, demonstraram que a relação progressão-regressão tumoral está diretamente associada com o padrão de células ativadas e das citocinas e demais moléculas que polarizam as respostas das células efetoras. Peghini e colaboradores (2012) demonstraram a necessidade de um mecanismo de supressão da imunidade celular para que ocorra a progressão tumoral. Então, quando se considera o perfil Th1 como antitumoral é possível depreender que o fenótipo efetor Th1 diferenciado de T CD4<sup>+</sup>, proporciona essa atividade de regressão tumoral.

Considerando que o perfil de células Th1, juntamente com as células T CD8<sup>+</sup> são os ideais no desenrolar dos mecanismos antitumorais, a IL-12, nesse contexto, se apresenta como um importante regulador na imunidade adaptativa mediada por células. Importante por proporcionar mecanismo de imunidade contra as neoplasias através da potencialização das células T CD8<sup>+</sup> e na diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> em células Th1 (PEGHINI *et al.*, 2012).

Entretanto, as evidências demonstram a capacidade da IL-12, secretada principalmente por macrófagos e CDs, em estimular essas respostas, mas não o oposto. Ou seja, as evidências são escassas em relação à capacidade dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> em sintetizar IL-12. Estudos de Rodrigues e colaboradores (2011), sobre o papel dos linfócitos T na imunoterapia com CDs autólogas, demonstraram que linfócitos T CD4<sup>+</sup> possuíam uma tendência para aumento da produção de IL-12 na fase inicial do tratamento. Este achado inédito constatou que ocorre uma ligeira estimulação na expressão de IL-12 por células T CD4<sup>+</sup> após a terapia com CDs (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Michelin e colaboradores (2013) também descreveram que pacientes com câncer expressam IL-12 nestes tipos celulares (T CD4<sup>+</sup>), o que não é observado em pacientes controles saudáveis. A literatura sugere que IL-12 pode ser secretada por APCs, com efeitos significativos na regressão tumoral. A imunoterapia com CDs em diferentes tipos tumorais leva ao aumento sistêmico da síntese de IL-12. Além disso, foi demonstrado que a produção de IL-12 no local

do tumor induz a rejeição de células neoplásicas por linfócitos T CD8<sup>+</sup> em associação com a infiltração de macrófagos (COLOMBO; TRINCHIERI, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2011; MICHELIN *et al.*, 2013).

Os efeitos da IL-12 também foram observados sobre a ação em T CD4<sup>+</sup> e NK na produção de IFN- $\gamma$ , em termos de atuação como sinal para a diferenciação de T CD8<sup>+</sup> e na sua capacidade de atuar como um fator na reativação e sobrevivência de T CD4<sup>+</sup> de memória. Isso é interessante para a repolarização das T CD4<sup>+</sup> nas atividades antitumorais, considerando a conversão do subgrupo Th2 em Th1 (CAVALLO *et al.*, 1997; COLOMBO; TRINCHIERI, 2002; KERKAR *et al.*, 2010).

## 2 HIPÓTESE E JUSTIFICATIVA

Sendo o câncer uma doença bastante desafiadora para as diferentes áreas das ciências da saúde e uma importante questão de saúde pública, faz-se necessário compreender os diferentes mecanismos de resposta das células imunes frente às células tumorais. Essa busca se deve a própria fisiopatologia do câncer, que se desenrola a partir de mecanismos de supressão e falhas das respostas imunes, uma vez que no microambiente tumoral, muitos mecanismos imunológicos envolvidos na manutenção da homeostasia, apresentam um papel imunossupressor durante as respostas antitumorais.

Nesse contexto, a IL-12 é considerada uma molécula chave de ativação de respostas imunes eficazes, secretada principalmente por células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas). Assim, nosso trabalho se fundamenta na hipótese de que pacientes com câncer avançado possuem no sangue periférico células T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-12 e que o soro desses pacientes possui elementos capazes de induzir a diferenciação desse fenótipo. Entretanto, a real função dessa citocina ainda não foi identificada, assim como se algum dos fatores de transcrição chaves dos subtipos já descritos de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, *T-bet*, *GATA-3*, *RORγt* e *FoxP3*, podem ser correlacionados com esse fenótipo esse indício de plasticidade.

Portanto, este trabalho justifica-se em buscar a compreensão dos mecanismos que envolvem a ativação de células imunes nas respostas imunes contra o câncer e como este pode, em algum nível, alterar as funções imunes a seu favor.

### 3 OBJETIVOS

Avaliar a produção de IL-12 em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, correlacionando com os fatores de transcrição descritos até o momento para a distinção dos subtipos de linfócitos T auxiliares. Além do mais, avaliaremos se a presença de fatores séricos presentes no soro das pacientes com câncer poderia contribuir para o surgimento destes clones celulares.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Avaliar e comparar a produção de IL-12 em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, por citometria de fluxo, de pacientes com câncer avançado e controles saudáveis;
- Quantificar por qPCR os fatores de transcrição *RORγt*, *T-bet*, *GATA-3* e *FoxP3* em linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> isolados de pacientes com câncer avançado;
- Incubar o soro destes pacientes (pacientes com câncer avançado) com células de doadores saudáveis para verificar se possíveis fatores séricos são capazes de induzir a diferenciação de linfócitos auxiliares em linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup>.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Caracterização da amostra e delineamento experimental

Foram selecionadas pacientes com câncer avançado na Clínica de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas da UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba-MG e amostras de controles saudáveis, sem histórico de neoplasia e/ou doença infectocontagiosa, em bom estado geral de saúde (últimos 60 dias) oriundos do IPON – Instituto de Pesquisa em Oncologia e comunidade da UFTM. Foram coletadas amostras de sangue periférico para realização das análises. Todos os sujeitos envolvidos foram informados a respeito das intenções da pesquisa, confirmando a adesão por meio de termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

O projeto prevendo a terapia com células dendríticas para pacientes com câncer avançado se encontra aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM, protocolo número 683-2006 (Anexo 2) e financiado pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Vale ressaltar que o projeto em questão visa não apenas avaliar as condições dos pacientes que recebem o tratamento pela vacina de células dendríticas, mas ainda aspectos gerais de pacientes com câncer, visando melhor análise e compreensão dos mecanismos que envolvem as respostas imunes, para possível desenvolvimento de alvos imunoterápicos.

Sendo assim, foram estudadas 50 pacientes com diagnóstico de câncer avançado e/ou recidivado, das quais 35 foram incluídas nesse estudo, com faixa etária de 26 anos a 83 anos (média de 55 anos), com diferentes sítios primários de tumores (Anexo 3). Estas tiveram amostras coletadas para a realização de citometria de fluxo com princípio *cell sorting*. Este princípio separa em específico as células de interesse para o estudo, neste caso as células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup>.

Além disso, 23 indivíduos, incluídos no grupo controle saudável (Anexo 4), faixa etária de 23 anos a 70 anos (média de 41,6 anos), também tiveram amostras coletadas para a realização da análise por citometria de fluxo, para comparação com as amostras das pacientes com câncer, e 11 sujeitos, tiveram amostras coletadas para realização de ensaio *in vitro* (Anexo 5). O delineamento experimental pode ser visualizado na figura 2.

Os critérios de inclusão das pacientes na pesquisa foram:

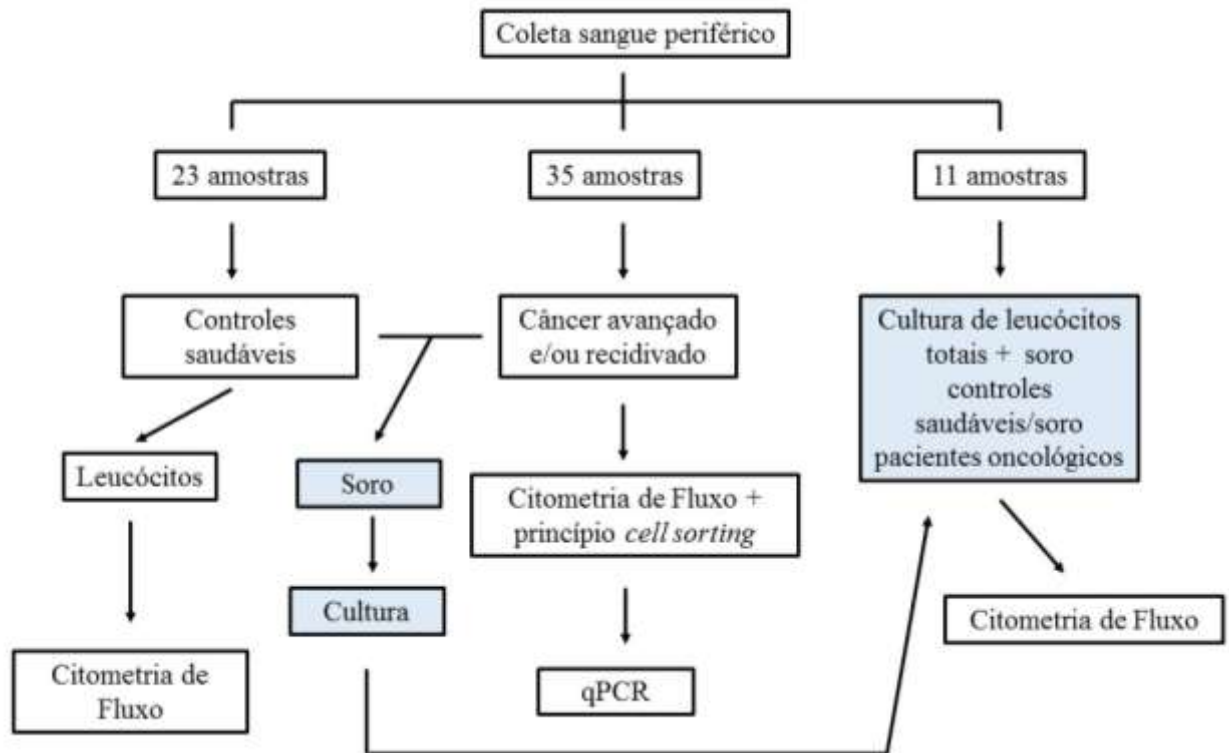
- Pacientes do sexo feminino com qualquer idade;



- Pacientes com recidiva e/ou com tumores em fase avançada.

Os critérios de exclusão dos sujeitos na pesquisa foram:

- Pacientes imunodeprimidos e/ou submetidos a procedimento cirúrgico, tratamento quimioterápico, radioterápico ou imunoterápico nos últimos 60 dias.



**Figura 2: Delineamento experimental.** Representação esquemática do desenho experimental.

#### 4.2 Análise da presença linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> por citometria de fluxo

As amostras de sangue periférico foram coletadas dos controles saudáveis e pacientes oncológicos, para análise da presença de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> por meio da técnica de citometria de fluxo. As 35 amostras oriundas de pacientes oncológicos, que tiveram análise por citometria de fluxo sofreram ainda a separação das células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> por princípio de *cell sorting*. As amostras foram analisadas em citômetro FACS Aria III<sup>TM</sup> BD com princípio de “sorter” (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). A técnica de citometria de fluxo foi realizada de acordo com o protocolo de citometria sugerido no kit *Fixation/Permeabilization BD Cytotfix/Citoperm<sup>TM</sup>*, com utilização de anticorpos *BD Pharmigen<sup>TM</sup>* e adaptada de acordo com parâmetros do laboratório IPON.

Logo após a coleta, foi realizada a lise de hemácias utilizando solução de lise *BD FACS™ LysingSolution*, na concentração de 1 mL de sangue para 10 mL de solução de lise. A mistura da solução de lise com o sangue foi mantida sob incubação por 20 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida foi submetida à centrifugação, a 4°C, 805xg, por 10 minutos, seguindo com duas lavagens das células em 20 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), uma vez concentrado (1x).

O excesso de solução foi desprezado cuidadosamente após centrifugação a 4°C, 805xg, por 10 minutos, conservando o precipitado de células em 1 mL de PBS. As células foram então ressuspensas e a elas adicionado 2,5 µL de *BD GolgiStop™*, seguido com incubação a 4°C por 20 minutos. Terminada a incubação, foi adicionado 20 mL de PBS 1x e submetido a nova centrifugação, utilizando os mesmos parâmetros mencionados anteriormente.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, mantendo 2 mL de PBS e as células ressuspensas. Em seguida, a quantidade de 10<sup>6</sup> células, contadas em câmara de Neubauer, foram separadas em tubos de ensaio, e marcadas com quantidade apropriada de anticorpos *BD Pharmigen™* de marcação de membrana (Tabela 3), incubando-as por 30 minutos, a 4°C e ao abrigo da luz. Após a incubação, as amostras foram submetidas a mais duas lavagens com 1 mL de PBS 1x.

Em seguida, as células foram permeabilizadas adicionando 1000 µL por tubo da solução de *Fixation/Permeabilization BD* (BD Cytotfix™) e incubadas por 20 min, a 4°C. Então, as células foram lavadas duas vezes com 1 mL do tampão *Perm/wash™* 1x (500 µL em cada tubo/lavagem). As células foram então ressuspensas e adicionado o anticorpo intracelular (Tabela 3), incubando a 4°C, por 30 min. Em seguida lavou-se duas vezes (500 µL/tubo) com tampão *Perm/wash™*. Após a última lavagem ressuspendeu-se as amostras em 500 µL em PBS para ser realizada a análise.

**Tabela 3: Marcações extracelulares e intracelulares para células do sangue periférico**

<b>Tubos</b>	<b>Marcação extracelular</b>	<b>Marcação intracelular</b>
1	Controle permeabilizado	Sem marcação
2	CD3 FITC CD4 PerCP.Cy 5.5 ou APC	IL-12 PE
3	Mouse IgG2a FITC Mouse IgG1k PerCP.Cy 5.5	Mouse IgG1 PE

### 4.3 Isolamento de RNA

O isolamento de RNA foi realizado nas 35 amostras de sangue periférico das pacientes com diagnóstico de câncer, que foram previamente separadas de uma amostra heterogênea pelo princípio de *cell sorting* (citômetro FACSAria III<sup>TM</sup> BD com princípio de “sorter”), como mencionado anteriormente.

Após a separação, para cada  $5 \times 10^6$  células, foram adicionados 1,0 mL de TRIzol® (Thermo Fisher Scientific®). Em seguida as amostras foram homogeneizadas e mantidas por 5 min, a 15-30°C. Em seguida, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de TRIzol®. Agitou-se as amostras vigorosamente por 15s, incubando as mesmas à temperatura ambiente por 3 min. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 12.000xg, por 15 min, a 4°C.

Finalizada a centrifugação, a mistura apresentou três fases, uma inferior, uma mediana e uma superior, sendo a fase inferior de coloração avermelhada, correspondendo ao fenol-clorofórmio, rica em DNA; a interfase, de coloração mais clara, rica em proteína; e a fase superior, aquosa, rica em RNA. Esta última foi transferida para um tubo limpo, e as demais fases, fenólica e a interfase, foram armazenadas para subseqüentes extrações de DNA e proteína.

Isolada a fase aquosa, rica em RNA, foi adicionado álcool isopropílico, na proporção de 0,5 mL de álcool para cada 1 mL de TRIzol®, incubando a temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 10 min, a 4°C por 10.000xg.

Então o sobrenadante foi removido, seguido de adição de álcool 75%. A amostra foi homogeneizada e centrifugada por 5 min, a 4°C e 7.000xg. Após a centrifugação, removeu-se o sobrenadante com cuidado e colocou-se o tubo para secar. Por fim, adicionou-se 20 µL de água livre de RNase.

### 4.4 Transcrição reversa de RNA para DNA complementar (cDNA)

O RNA extraído das amostras foi submetido à síntese de DNA complementar (cDNA) de acordo com protocolo do *kit Reverse Transcriptase* (Invitrogen®), adaptado a estas amostras pelo laboratório IPON, realizada em termociclador com gradiente Veriti® 96-well, Applied Biosystems<sup>TM</sup> (Thermo Fisher Scientific). A reação ocorre em duas etapas, sendo a solução inicial para primeira etapa da transcrição reversa, com volume final de 23 µL (Tabela 4).

**Tabela 4: Reagentes da primeira etapa do RT-PCR\***

Reagente	Volume para 1 amostra
OligodT	1 µL
Dntp	2 µL
RNA	20 µL
Volume parcial	23 µL

\* Protocolo proposto pelo fabricante (*kit Reverse Transcriptase Invitrogen®*), com adaptações feitas pelo IPON.

Essa primeira parte da solução para transcrição reversa, contendo o RNA, foi desnaturada a 65°C por 5 minutos, seguida de incubação em gelo por 1 min. Após, foi adicionado ao tubo 6,0 µL de uma solução (Tabela 5) contendo a enzima (SuperscriptIIIrt® *First-Standard Synthesis* para RT-PCR), responsável pela transformação do RNA em cDNA.

**Tabela 5: Reagentes da segunda etapa do RT-PCR\***

Reagente	Volume para 1 amostra
Tampão kit 5x	8 µL
DTT 0,1M	2 µL
Enzima SuperscriptIIIrt®	2 µL
Água DEPC	26 µL
Volume final	61µL

\* Protocolo proposto pelo fabricante (*kit Reverse Transcriptase Invitrogen®*), com adaptações feitas pelo IPON.

As amostras foram então incubadas por 5 minutos a 25°C, seguida de nova incubação por 60 minutos a 50°C. A reação foi inativada a 70°C por 15 minutos. Em seguida, a concentração de cDNA das amostras foi dosada utilizando Quibit® Fluorometer 2.0 (Invitrogen®)

#### 4.5 qPCR (*quantitative* PCR)

O protocolo de realização do qPCR foi realizado de acordo com instruções do fabricante *GoTaq qPCR Master Mix* (Promega®) (Tabela 6). Os iniciadores específicos, com suas sequências e concentrações, encontram-se na tabela 7. A análise da expressão dos genes dos

fatores de transcrição *ROR $\gamma$ t*, *T-bet*, *GATA-3* e *FoxP3*, foi realizada no 7900HT Fast Real-Time PCR (Life Technologies®) e os resultados analisados pelo software SDS 2.4, Inc.

**Tabela 6: Protocolo para reação qPCR\***

Reagentes	Volumes
Água livre de RNase	8,25 $\mu$ L
SYBR MasterMix 4x	12,5 $\mu$ L
Dyereference	0,25 $\mu$ L
Iniciador F	1 $\mu$ L
Iniciador R	1 $\mu$ L
cDNA	2 $\mu$ L
Volume final	25 $\mu$ L

\* Protocolo proposto pelo fabricante (*GoTaq qPCR Master Mix*Promega®).

**Tabela 7: sequências e concentrações dos iniciadores**

Gene	Iniciador	Concentração
B-actina	(F): GTGGGGCGCCCCAGGCACCA (R): CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC	10 $\mu$ M
<i>T-bet</i> *	(F): CGGCTGCATATCGTTGAGGT (R): GTCCCCATTGGCATTCCCTC	10 $\mu$ M
<i>GATA-3</i> *	(F): TCATTAAGCCCAAGCGAAGG (R): GTCCCCATTGGCATTCCCTC	10 $\mu$ M
<i>ROR<math>\gamma</math>t</i> *	(F): GCAGCGCTCCAACATCTTCT (R): ACGTACTGAATGGCCTCGGT	10 $\mu$ M
<i>FoxP3</i> *	(F): CACCTGGCTGGGAAAATGG (R): GGAGCCCTTGTCGGATGA	10 $\mu$ M

R – reverse; F – forward; \* LIN *et al.*, 2015.

As condições de realização do qPCR estão dispostas na tabela 8. A especificidade de cada reação foi confirmada por análise das curvas de dissociação ao final de cada corrida. O cálculo da expressão gênica foi feito usando o  $\Delta$ Ct:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene controle endógeno (\beta\text{-actina})}}$$

**Tabela 8: Condições realizações qPCR\***

Fase	Ciclos	Programação
Ativação da enzima <i>TaqDNA polimerase</i>	1	95°C por 2 min
Desnaturação		95°C por 20 seg
Anelamento	45	60°C** por 1 min
Extensão		
Curva de dissociação	1	60°C

\* Condições propostas pelo fabricante (*GoTaq qPCR Master Mix* Promega®). \*\*As temperaturas específicas para cada iniciador estão especificadas na tabela 9.

**Tabela 9: Temperaturas de anelamento de cada gene alvo (iniciadores)**

Gene	Temperatura de anelamento
B-actina	60°C
T-bet	58°C
GATA-3	57,5°C
ROR $\gamma$ t	61°C
FoxP3	58 °C

#### 4.6 Ensaio *in vitro*

Para o ensaio *in vitro* foram selecionados 11 voluntários saudáveis, conforme mencionado no item “sujeitos da pesquisa”. Os voluntários tiveram ciência dos objetivos da pesquisa, que foi confirmado e consentido mediante termo consentimento livre e esclarecido de participação no estudo. Dos mesmos foram coletados 10 mL de sangue periférico, em tubos descartáveis, esterilizados, contendo heparina (100UI/mL).

O sangue foi disposto em tubo plástico cônico contendo 15 mL de solução *Ficoll-Paque™ Plus* (GE Healthcare®). Então, os tubos foram centrifugados a 600xg, por 30 min, a 18°C. Ao término da centrifugação, os leucócitos foram removidos e transferidos a outro tubo cônico. O excesso de solução de Ficoll® foi removido por centrifugação com 2 lavagens em solução RPMI incompleto (Sigma-Aldrich®), a 805xg, 4°C, por 10 min.

Ao término da segunda lavagem as células foram ressuspensas em 5 mL de meio RPMI completo (Sigma-Aldrich®), contendo 0,24% de HEPES, 10% de SBF, 1% de L-glutamina, 1% de gentamicina/estreptomicina, 0,1% de 2-mercaptoetanol, 0,22% de bicarbonato e piruvato de sódio a 0,1%. As células foram então contadas e incubadas em garrafas de cultura ( $32,5 \times 10^6$  células em um volume de 7,5 mL), em meio RPMI completo, sendo mantidas em estufas a 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C.

Após 4h de incubação, parte das garrafas foram estimuladas com soro de controles saudáveis e outra parte com soro dos pacientes oncológicos em fase avançada (300 µL) e cultivadas por 48h, para investigar a existência de possíveis estímulos que induzem a diferenciação de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup>, através da técnica de citometria de fluxo. Os dados foram comparadas entre garrafas estimuladas (controle positivo e estímulo) e não estimuladas com o soro (controle negativo).

#### **4.7 Análise dos resultados**

Os resultados foram analisados, utilizando o *software* GraphPad Prism Versão 5.0 (GraphPad Software, Inc.). Quando os dados apresentaram distribuição normal, foi utilizado teste ANOVA de medidas repetidas - pós-teste *Bonferroni*, com resultados expressos em média ± desvio padrão, e quando apresentaram distribuição não Gaussiana, foi utilizado teste não paramétrico (*Mann-Whitney*), com os valores expressos em medianas e valores mínimo e máximo. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando o valor de p (probabilidade) foi menor que 0,05.

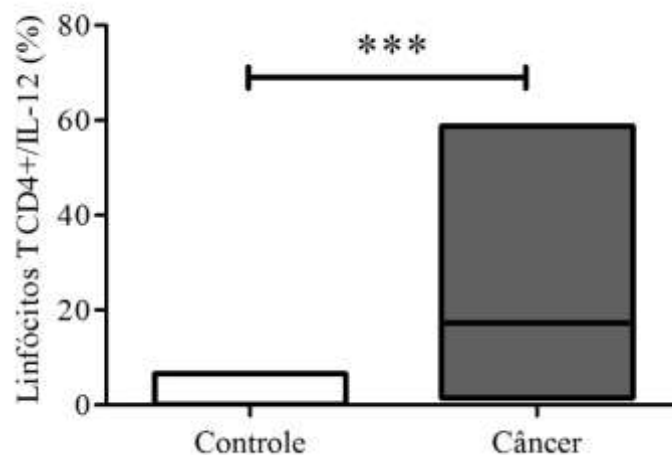
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Linfócitos T auxiliares de pacientes com câncer avançado expressam IL-12 intracelularmente

No presente estudo, buscamos avaliar a presença de células T  $CD3^+CD4^+IL-12^+$  em pacientes com câncer avançado comparando a porcentagem destas com os controles saudáveis.

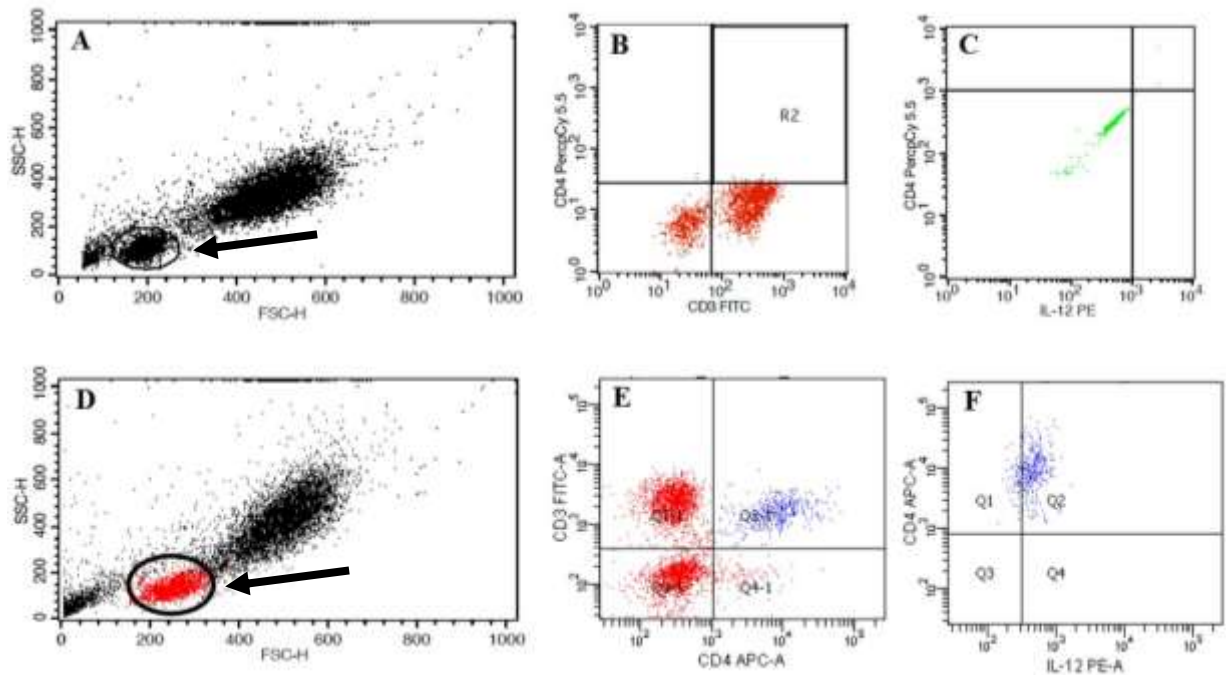
Assim, na figura 3 estão representados os resultados obtidos na análise da porcentagem de células T  $CD3^+CD4^+IL-12^+$ . Pode-se observar aumento significativo na porcentagem de células T  $CD3^+CD4^+IL-12^+$  em pacientes com câncer avançado, denominado de grupo câncer, 17,30% (1,5-58,80), em relação ao grupo controle (controles saudáveis) 0,100% (0-6,6), em que  $p < 0,0001$ .

A figura 4 exemplifica o perfil característico do fenótipo de estudo, observado pela técnica de citometria de fluxo, através de uma análise de “dotplot” das características de tamanho e granulosidade das células. A área delineada por R2 e Q2, usualmente denominado de “gate” é definida como a população de estudo. Foram utilizadas marcações de isotipos, para confirmação da especificidade de ligação do anticorpo de interesse, eliminando assim, ligações inespecíficas.



**Figura 3: Porcentagem de células T  $CD4^+IL-12^+$  nas amostras de controle saudáveis versus pacientes com câncer avançado.** Representação do percentual de células T  $CD3^+CD4^+IL-12^+$  em amostras de sangue periférico de controles saudáveis (n=23) e pacientes com câncer avançado e/ou recidivado (n=35). Resultados representados em mediana e min-max (linhas horizontais). Teste estatístico utilizado *Mann-Whitney*. \*\*\*  $p < 0,0001$ .



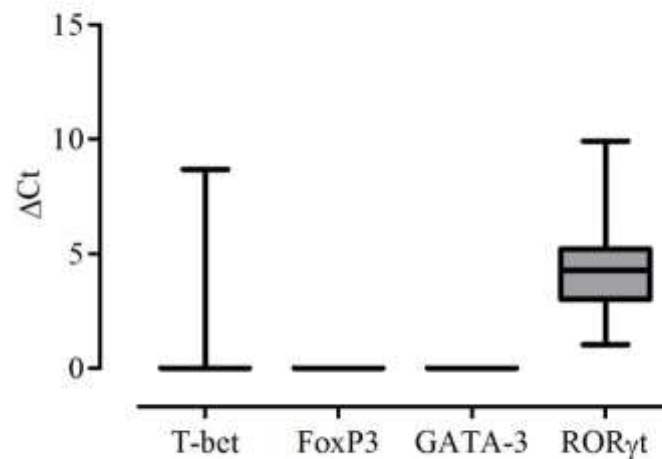


**Figura 4: Perfil de células T CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup>.** Representação da identificação do perfil de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> por citometria de fluxo de um paciente com câncer e um controle saudável. (A, D) Disposição dos leucócitos totais obtidos de amostras de sangue periférico a serem analisadas, demonstrando no eixo das abscissas a granulosidade (SSC) e no eixo das ordenadas o tamanho (FSC), de controle saudável (A) e paciente com câncer (D). As populações a serem avaliadas estão indicadas pelas setas. (B, E) Dupla marcação para CD3<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> de controle saudável (B) e paciente com câncer (E), demonstrada no quadrante superior direito. (C, F) Dupla marcação para CD4<sup>+</sup> e IL-12<sup>+</sup> de controle saudável (C) e paciente com câncer (F), demonstrada no quadrante superior direito. A população de células delineadas pela área denominada de R2 e Q2 (“gate”), representa os fenótipos a serem considerados em nosso estudo.

## 5.2 Linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> de pacientes com câncer avançado expressam ROR $\gamma$ t

As células T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> identificadas pela citometria de fluxo nos pacientes com câncer foram separadas por *sorting* e submetidas a qPCR para  $\beta$ -actina (ACTB), utilizada como controle endógeno (“housekeeping”). Os controles endógenos da expressão gênica são genes constantes, habitualmente utilizados para correção da expressão gênica. Além do gene  $\beta$ -actina, as amostras ainda foram submetidas a qPCR para os fatores de transcrição *T-bet*, *GATA-3*, *FoxP3* e *ROR $\gamma$ t*.

Todas as amostras analisadas expressaram o controle endógeno  $\beta$ -actina e o fator de transcrição *ROR $\gamma$ t* ( $\Delta$ Ct mínimo 1,033,  $\Delta$ Ct máximo 9,928, mediana  $\Delta$ Ct 4,280). Apenas 3 amostras, das 35, expressaram o fator *T-bet*. Nenhuma amostra apresentou expressão gênica para os fatores de transcrição *GATA-3* e *FoxP3* (Figura 5). Os apêndices A, B e C mostram a representação da expressão gênica para  $\beta$ -actina, *ROR $\gamma$ t* e *T-bet*, através das curvas de amplificação e curva de dissociação.

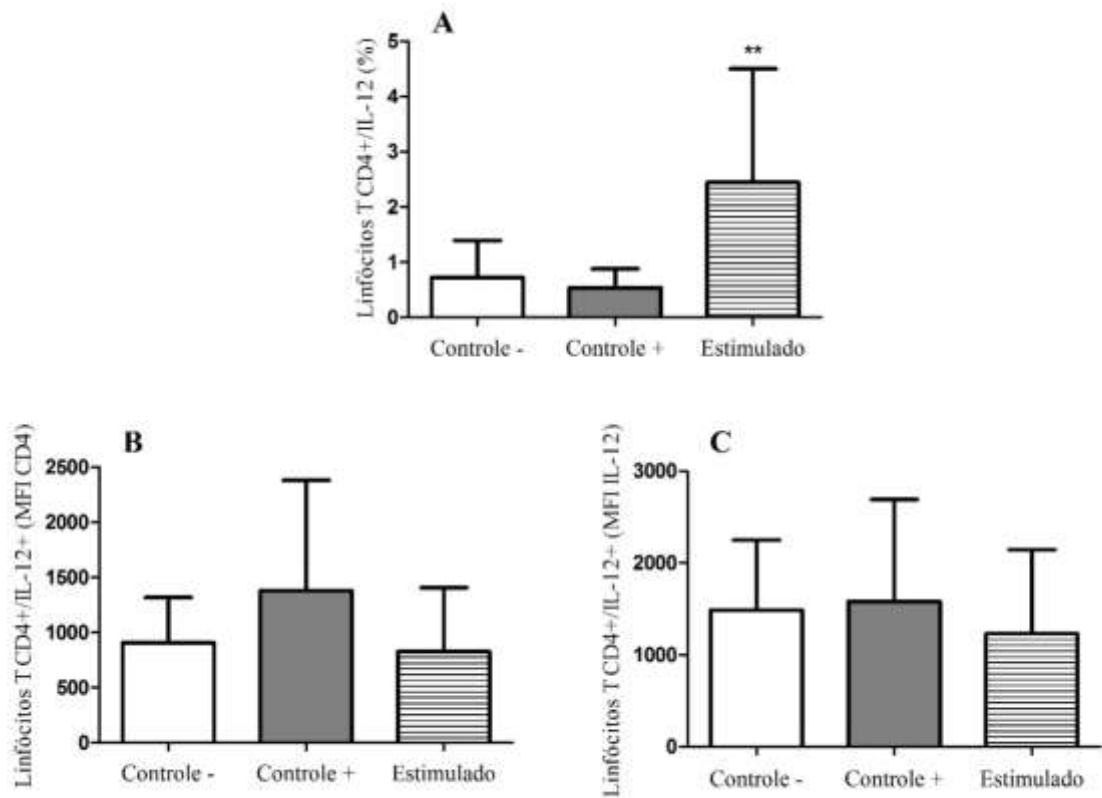


**Figura 5: Expressão gênica dos fatores de transcrição *T-bet*, *FoxP3*, *GATA-3* e *RORγt*.** Representação gráfica dos níveis de expressão gênica dos fatores de transcrição *T-bet*, *FoxP3*, *GATA-3* e *RORγt* nas amostras de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> separadas por *sorting*, oriundas de sangue periférico dos pacientes com câncer. Ct: *Cycle Threshold* (Ciclo limiar ou de início);  $\Delta Ct = Ct_{\text{gene alvo}} - Ct_{\text{gene controle endógeno}}$ .

### 5.3 Fatores séricos presentes no soro dos pacientes com câncer avançado são capazes de induzir a diferenciação de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup>

Para avaliar a existência de algum fator sérico capaz de induzir a diferenciação de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup>, realizamos ensaios *in vitro* com células de doadores saudáveis e soro dos pacientes com câncer avançado participantes desse estudo. Assim, as culturas foram subdivididas em controle negativo, aquelas não estimuladas, controle positivo, aquelas estimuladas com soro de pacientes saudáveis e em grupo estimulado, estimuladas com soro dos pacientes com câncer avançado. Posteriormente as células foram avaliadas por citometria de fluxo para os marcadores CD3, CD4 e IL-12 (Figura 6).

Observamos aumento significativo da porcentagem de células T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> no grupo estimulado (média  $2,448 \pm 2,060$ ) em relação ao controle negativo (média  $0,7283 \pm 0,6691$ ) e ao controle positivo (média  $0,5400 \pm 0,3406$ ), em que  $p=0,0020$ . Estes resultados sugerem a presença de possíveis fatores séricos contidos no sangue dos pacientes com câncer capazes de induzirem a diferenciação de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup>. Na análise da intensidade média de fluorescência (MFI) dos marcadores CD4 ( $p=0,3034$ ) e IL-12 ( $p=0,7056$ ) não foram encontradas alterações significativas, como pode ser observado nas figuras 6B e 6C.



**Figura 6: Coexpressão de CD4 e IL-12 em culturas de amostras de sangue periférico de doadores saudáveis não incubadas (controle negativo), incubadas com soro de controles saudáveis (controle positivo) e com soro de pacientes com câncer avançado e ou/recidivado (estimulado), participantes desse estudo.** (A) representação da porcentagem de linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> nas amostras; \*\*p=0,0020. (B) MFI de CD4 em linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> nas amostras; p=0,3034. (C) MFI de IL-12 em linfócitos T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> nas amostras; p=0,7056. Resultados representados em média  $\pm$  desvio padrão. Teste estatístico utilizado ANOVA de medidas repetidas, com pós-teste *Bonferroni*. Controle -: Controle negativo, sem nenhuma estimulação; Controle +: Controle positivo, com estimulação de soro de pacientes saudáveis; Estimulado: cultura estimulada com soro de pacientes oncológicos; MFI: Intensidade Média de Fluorescência.

## 6 DISCUSSÃO

Em nosso estudo foi possível observar que a porcentagem de linfócitos T CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> foi significativamente maior em pacientes com câncer avançado e/ou recidivado, quando comparado aos indivíduos saudáveis.

Entretanto, ainda não foi possível encontrar informações na literatura sobre a expressão de IL-12 em linfócitos T CD4<sup>+</sup>, seja em condições *in vivo* e *in vitro*, que vão de encontro aos nossos dados.

As principais evidências que norteiam a IL-12 são que esta pode ser secretada por APCs, como CDs e macrófagos, atuando na estimulação da diferenciação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> no perfil Th1, além de manter a estimulação em direção a esse fenótipo, inibindo o fenótipo Th2. Nessa ativação, a IL-12 atua de forma indireta na produção de IFN- $\gamma$  (citocina chave na atividade antitumoral) (WESA, 2007).

Mas a IL-12 não atua somente sobre a diferenciação de T CD4<sup>+</sup> em Th1. Evidências também têm pontuado a IL-12 como uma citocina necessária para geração de um sinal de diferenciação e potencialização da atividade de células T CD8<sup>+</sup> na atividade antitumoral (WESA, 2007).

E não é de agora que pesquisadores descrevem a atuação da IL-12 em mecanismos de respostas antitumorais. Nesta linha, alguns trabalhos demonstraram a atividade antitumoral e antimetastática de IL-12 em modelos animais para melanoma, carcinoma de mama, carcinoma renal, através do uso de células modificadas para a liberação de IL-12 intratumoral (CAVALLO *et al.*, 1997; COLOMBO, 2002). *Kerkar* e colaboradores (2010) demonstraram ainda que linfócitos T citotóxicos, previamente modificados para a produção de IL-12 se mostraram capazes de infiltrar nos tumores e reduzir o tamanho dos mesmos (KERKAR *et al.*, 2010).

Na imunidade antitumoral, a IL-12 se mostra como importante mediador dos mecanismos imunes. Trabalho de *Rodrigues* e colaboradores, em que pacientes com câncer avançado foram submetidos ao tratamento imunoterápico com vacina de células dendríticas, demonstrou um aumento dos níveis de IL-12 durante o tratamento (RODRIGUES *et al.*, 2011). A mesma situação pode ser observada em pacientes com NIC II e NIC III tratados com interferon, em trabalho de *Misson* e colaboradores (MISSON *et al.*, 2011).

Entretanto, apesar de parte das respostas imunes antitumorais serem mediadas por IL-12, devido a sua capacidade de fazer uma “ponte” entre a imunidade inata e adaptativa, o seu uso como imunoterápico é bastante restrito, por gerar significativa citotoxicidade (JONES *et al.*,

2012; LASEK; ZAGOZDZON; JAKOBISIAK, 2014). Por isso trabalhos buscam abordar novos paradigmas com imunoterapias que envolvem o gene da IL-12 e vetores.

Um deles, por exemplo, utiliza o gene da IL-12 mediado por adenovírus oncolítico em modelo de câncer de próstata, que inclui ensaios toxicológicos. Nesse trabalho, o potencial biológico da IL-12, tanto em camundongos quanto em humanos se apresentou semelhante, em que foi observado aumento da expressão de IL-12, assim como de IFN- $\gamma$ , mediador primordial da atividade antitumoral (FREYTAG; ZHANG; SIDDIQUI, 2015). Outro, sugere uma abordagem com o uso de plasmídeos para a construção de IL-12 ligada à membrana, também como forma de reduzir a citotoxicidade sistêmica gerada por essa citocina e potencializar as respostas mediadas por células T CD8<sup>+</sup> (PAN *et al.*, 2008).

Todavia, não há evidências na literatura indicando a possibilidade de linfócitos T CD4<sup>+</sup> produzir IL-12 de forma espontânea. Em outros resultados obtidos pelo IPON, observou-se que linfócitos T CD4<sup>+</sup> de sangue periférico de pacientes com câncer produziam mRNA de IL-12 (verificado por RT-PCR), estando esta citocina presente no citoplasma das células (MICHELIN *et al.*, 2015).

Desta forma não seriam as T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> um exemplo da plasticidade que as células do sistema imune apresentam frente ao câncer, numa alternativa de manipular as respostas antitumorais? Ou a IL-12 produzida por esta célula não teria uma função diferente da que conhecemos? E se por ventura a IL-12 e IL-23, que possuem cadeias semelhantes, não possuíssem, talvez, mais membros que utilizam as mesmas cadeias e ainda não foram identificados? Pois o compartilhamento de cadeias provavelmente apresenta um impacto dos mecanismos das respostas imunológicas, que ainda não é conhecido. Não seria um mecanismo pleiotrópico das citocinas frente aos diferentes impactos fisiológicos gerados pelo câncer?

Em trabalho anterior desenvolvido pelo grupo, observou-se que a presença da IL-12 intracitoplasmática, quando analisada por microscopia de fluorescência para CD3 FITC, CD4 APC e IL-12 PE, a IL-12 parecia estar associada ao núcleo, sugerindo que a mesma poderia ter um efeito intracelular (MICHELIN *et al.*, 2015).

Outra observação em nosso trabalho, é que as células positivas para CD4 e IL-12, separadas por *sorting*, após análise por citometria, ao serem verificadas quanto a expressão dos fatores de transcrição, expressou apenas o fator *ROR $\gamma$ t*, exceto em três amostras que expressaram ainda o fator *T-bet*.

Como mencionado, quando ativadas por APCs, as células T virgens sofrem expansão clonal e diferenciação funcional em células efetoras capazes de secretar citocinas e direcionar respostas distintas. O ambiente de citocinas durante a ativação/diferenciação de T virgens é que

determinam a sua forma efetora, por meio de transdutores de transcrição específicos (DONG, 2006). Então, o que se observa é que a diferenciação funcional das células T não é regulada apenas pelas citocinas do ambiente, mas também por uma rede de programas intrínsecos.

O fator *ROR $\gamma$ t* está relacionado ao desenvolvimento das linhagens de células T CD4<sup>+</sup> denominadas de Th17. Logo, fatores e circunstâncias que mostram levar à indução da expressão de *ROR $\gamma$ t* em linfócitos, articulam citocinas e redes de fatores de transcrição que delimitam uma direção ao desenvolvimento desse fenótipo. Contudo, os mecanismos aos quais levam a essa diferenciação e a essa expressão ainda não são bem definidos (STEINMAN, 2007).

Dados descritos até o momento, mostram que a diferenciação de Th17 é iniciada por TGF- $\beta$  e IL-6 em camundongos, possivelmente através da regulação da remodelação da cromatina da IL-17, reforçada pela IL-23 (YANG *et al.*, 2007). Quando diferenciadas, as células Th17 produzem IL-17, IL-17F e IL-22, os quais habitualmente regulam a resposta inflamatória (ZHENG *et al.*, 2007).

Nessa vertente, diversos estudos vêm demonstrando que fatores tanto positivos quanto negativos são capazes de regular a expressão de *ROR $\gamma$ t*: citocinas como IL-6, IL-23, IL-21, IL-12, IL-27 e TGF- $\beta$ ; outros fatores de transcrição como STAT1, STAT2, STAT4, IRF4, *C-Rel*, *Runx1*, USF, T-bet, *Eomes*, entre outros (YANG *et al.*, 2007; BRUSTLE *et al.*, 2007; ZHANG; MENG; STROBER, 2008; RATAJEWSKI *et al.*, 2012).

Mesmo assim, não existem evidências do fator *ROR $\gamma$ t* e das já descritas Th17, que são tipos celulares reconhecidos por expressar esse fator, em participar de processos de produção de IL-12. Pelo contrário: a IL-12 tende a regular de forma negativa a expressão de *ROR $\gamma$ t*. Por isso, as células T CD4<sup>+</sup> virgens diferenciadas sob condições de polarização para células Th17, expressam baixos níveis de componente do receptor de IL-12 (IL-12R $\beta$ 2), após a reestimulação na presença de IL-12 e ausência de TGF- $\beta$  (LEXBERG *et al.*, 2008).

*Mukasa* e colaboradores demonstraram que células Th17, quando reestimuladas com IL-12 apresentavam um declínio substancial na expressão de *ROR $\gamma$ t*. E mais, quando estas células eram provenientes de camundongos deficientes para os fatores STAT4 e Tbx21 e eram reestimuladas com IL-12, também apresentaram diminuição na expressão de *ROR $\gamma$ t*. Assim, pontuaram que STAT4 e Tbet desempenhavam um papel na supressão deste fator em Th17, quando induzida por IL-12 (MUKASA *et al.*, 2010).

Apesar de *ROR $\gamma$ t* ser descrito como o fator específico para Th17, foi demonstrado que a sua isoforma específica se trata de um fator expresso em Th17 regulado por STAT3 (IVANOV *et al.*, 2006). O trabalho de Yang e colaboradores demonstrou que células Th17 também expressam outro fator nuclear, o *ROR $\alpha$* , que é induzido por TGF- $\beta$  e IL-6 de uma

maneira dependente de STAT3, expresso seletivamente em Th17. A super expressão de *ROR $\alpha$*  promove a expressão de IL-17 e IL-17F, mas não de IL-22 e sua deficiência prejudica seletivamente a expressão de IL-17, mas não de IL-17F. Assim eles demonstraram que parece ser o *ROR $\alpha$*  importante para a expressão de citocinas de células Th17, o que não é apenas determinado por reguladores mestres, mas também por outros fatores de transcrição específicos de linhagens que sintetizam a expressão gênica específica (YANG *et al.*, 2008).

Uma homologia a esse mecanismo é o observado em Th1, em que *hlx* interage com T-bet para gerar a resposta de Th1 (MULLEN *et al.*, 2002). Logo, é pontuado que a geração de Th17 é controlada pelos fatores de transcrição *ROR $\gamma$ t*, *ROR $\alpha$* , AHR e IRF4 (IVANOV *et al.*, 2006; CIOFANI *et al.*, 2012).

Entretanto, mesmo que vários trabalhos demonstrem a plasticidade das células T auxiliares, e também no que tange especificamente às Th17 e seu fator de transcrição chave *ROR $\gamma$ t*, não há dados que correlacionem estes com a síntese de IL-12. Pelo contrário, os dados demonstram que esta citocina inibe a atividade deste fator e a diferenciação deste fenótipo de células. Isso torna nossos resultados mais intrigantes. Vale ressaltar que o câncer altera sistemicamente o hospedeiro, desencadeando mecanismos que ainda não são pontuados pela literatura.

Quando analisamos as células Th17 especificamente no contexto da imunidade tumoral, estas possuem um papel de natureza controversa, pois elas podem promover ou suprimir o crescimento tumoral dependendo da malignidade e do ambiente que o tumor proporciona ao hospedeiro. Os trabalhos caracterizam estas células com uma atividade dinâmica na modulação da inflamação e do câncer, estabelecendo relações questionáveis entre a inflamação e o câncer, em que a inflamação interage no tecido tumoral regulando as células imunes, ora dissipando a imunidade antitumoral e contribuindo para a sobrevivência das células tumorais (intensificando o crescimento tumoral e as metástases), ora iniciando, aumentando e mantendo a imunidade antitumoral (revisado por BAILEY *et al.*, 2014).

Ainda quanto a plasticidade das células Th17, Lee e colaboradores demonstraram que estas podem se converter em células Th1, ganhando assim a capacidade de secretar IFN- $\gamma$  e perdendo a capacidade de secretar IL-17 (LEE *et al.*, 2009). Afinal, quando se considera essa plasticidade, discriminar e determinar sua função no hospedeiro portador de câncer se torna algo mais complexo, considerando ainda mais a instabilidade e plasticidade dos mecanismos imunes e citocinas observadas nesse tipo de paciente.

Quando Th17 são convertidas em Th1, é possível distinguir essas células? A distinção das células Th17 e as células Th17 convertidas em Th1 é realizada pelo marcador CD161.

Assim, juntamente com o CD161, os precursores Th17 expressam IL-23R. Quando expostos a IL-1 $\beta$  e IL-23, os precursores diferenciam-se em células Th17 maduras com capacidade de produzir IL-17A. Mas quando estas células Th17 encontram-se com IL-12, convertem-se em um fenótipo Th17/Th1 que coexpressam *ROR $\gamma$ t*, *T-bet*, *CXCR3*, *CCR6*, *CD161* e *IL-23R*. A presença contínua de IL-12 (ou sinais comparáveis) converte as Th17/Th1 em um fenótipo Th1 (semelhante a Th1). Entretanto esse mecanismo ainda não está descrito em sua totalidade (COSMI *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2014).

Logo, estas células “ex-Th17” são denominadas de Th1 não clássicas e expressam CD161. Em contrapartida, as Th1 clássicas não se originam de precursores de Th17 e não expressam CD161. Ainda em relação a essas células é descrito que os fatores de transcrição Runx 1 e 3, associados ao *T-bet* são talvez cruciais para a geração de IFN- $\gamma$  oriundo de Th17 (COSMI *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2014). Em nosso estudo observamos que apenas 3 das 35 amostras T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> coexpressavam *ROR $\gamma$ t* e *T-bet*, o que não nos permite ainda associar nossos dados com estas informações.

Além do mais, quando estimulamos culturas de leucócitos totais de doadores saudáveis com o soro dos pacientes oncológicos, foi notória a diferenciação destas no fenótipo de nosso estudo. O mesmo não era verificado com as culturas de pacientes saudáveis que eram estimuladas com soro de controles saudáveis. Esses dados indicam a presença de algum fator sérico no soro dos pacientes oncológicos capazes de propiciar a diferenciação do fenótipo T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IL-12<sup>+</sup> *in vitro*. Fator que necessita de maiores análises na tentativa de sua identificação.

Trabalho de *Kuka* e colaboradores demonstrou que células TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> de baço de camundongos e de sangue periférico humano (expressando CD11c e MHC II) expressavam IL-12 quando estimuladas com ativadores policlonais (KUKA; MUNITIC; ASHWELL, 2012). Assim como em nosso estudo essas células também passaram a expressar IL-12. Entretanto, vale considerar que nossas culturas foram realizadas com leucócitos totais e não apenas linfócitos, o que pode indicar que algum outro mecanismo possa ter propiciado a geração desse fenótipo.

Estas constatações nos levam a questionar se nossos dados demonstram uma forma que o sistema imune busca de se adaptar para reduzir a atividade tumoral. Entretanto mais estudos sobre a síntese de IL-12 por células T CD4<sup>+</sup> são necessários, para traçar os meios que estas expressam essa citocina, quais as vias de sinalização que induzem a esta produção e se esta condição está presente apenas no câncer. São necessárias mais análises em amostras de seres



humanos e também em animais, pacientes com câncer em vários estádios e diferentes tipos de câncer.

Outra questão que devemos considerar é a possibilidade da partilha da subunidade p40 entre a IL-12 e a IL-23. A IL-12 e IL-23 são citocinas pertencentes à mesma família, que incluem ainda a IL-27 e IL-35. Tratam-se de citocinas heterodiméricas, que ao contrário das citocinas típicas, são secretadas isoladamente (OPPMANN *et al.*, 2000; VIGNALI; KUCHROO, 2011).

Consistem em uma cadeia  $\alpha$  p19, p28 ou p35, com estrutura em feixe de 4 hélices e uma cadeia  $\beta$  p40 ou Ebi3, que partilham homologia com cadeias de receptores de citocinas solúveis como IL-6R $\alpha$ . Desta forma, a cadeia p40 se emparelha com p35 ou p19 para formar IL-12 ou IL-23, respectivamente, ao passo que Ebi3 pode se emparelhar com p28 ou p35 para formar IL-27 ou IL-35, respectivamente. Assim, em essência, a IL-12 e a IL-23 representam citocinas constitutivamente associadas a uma subunidade de receptor solúvel, que são segregadas como complexos binários (OPPMANN *et al.*, 2000; KASTELEIN; HUNTER; CUA, 2007; JONES; VIGNALI, 2011).

Lupardur e Garcia (2008) demonstraram em análise comparativa dos complexos que formam a IL-12 e a IL-23, que eles possuem semelhanças na rede de interações na constituição da arginina central. Mesmo assim eles propuseram que apesar de p19 e p35 possuírem determinada homologia, representada através de uma sequência limitada, elas mantinham direcionamentos de respostas imunes distintos (LUPARDUR; GARCIA, 2008).

Porém, ainda são vários os questionamentos a cerca desse assunto. Por isso, a continuação das análises se fazem necessárias. Análises estas que devem abranger outros processos patológicos, para propiciar melhor compreensão da função da IL-12 em linfócitos T auxiliares e determinar em que condições a IL-12 é produzida por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, além de compreender se ela é realmente secretada por essas células, ou possui alguma outra função ainda não descrita.

## 7 CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que há quantidade significativamente maior de linfócitos T  $CD3^+CD4^+IL-12^+$  no sangue periférico de pacientes com câncer avançado e/ou recidivado, e que estas células expressam o fator de transcrição *ROR $\gamma$ t*. Algumas amostras ainda coexpressaram o fator *T-bet*. Além disso, demonstramos que há possíveis fatores no soro dos pacientes oncológicos capazes de induzir a diferenciação de células T  $CD3^+CD4^+IL-12^+$ .

Entretanto, são necessárias novas investigações em outros processos patológicos, como em doenças agudas e crônicas para determinar as reais condições em que a IL-12 é produzida, compreender a sua função ao ser produzida por linfócitos T  $CD4^+$  e identificar quais seriam os possíveis fatores séricos capazes de modular a plasticidade desse fenótipo celular.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2015.
- ALMEIDA, J. R. C. et al. Marcadores tumorais: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 305-316, 2007.
- ARRUDA, J. T. et al. Proteína p53 e o câncer: Controvérsias e esperanças. **Estudos**, v. 35, p.123-141, 2008.
- BAILEY, S. R. et al. Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 276, 2014.
- BOUDREAU, J. E. et al. Engineering dendritic cells to enhance cancer immunotherapy. **Molecular Therapy**, v. 19, n. 5, p. 841-853, 2011.
- BRUSTLE, A. et al. The development of inflammatory TH-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. **Nature immunology**, v. 8, n. 9, p. 958-966, 2007.
- BURNET, F. M. The concept of immunological surveillance. **Progress in Experimental Tumor Research**, v.13, p 1-27. 1970.
- CAVALLO, F. et al. Antitumor efficacy of adenocarcinoma cells engineered to produce interleukin 12 (IL-12) or other cytokines compared with exogenous IL-12. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 14, p. 1049-1058, 1997.
- CIOFANI, M. et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification. **Cell**, v. 151, n. 2, p. 289-303, 2012.
- COLOMBO, M. P.; TRINCHIERI, G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. **Cytokine e growth factor reviews**, v. 13, n. 2, p. 155-168, 2002.
- COSMI, L. et al. Human interleukin 17–producing cells originate from a CD161+ CD4+ T cell precursor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 8, p. 1903-1916, 2008.
- COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.
- CRUVINEL, W. M. et al. Immune system - Part I: fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-447, 2010.
- CUA, D. J.; KASTELEIN, R. A. TGF- $\beta$ , a 'double agent' in the immune pathology war. **Nature immunology**, v. 7, n. 6, p. 557-559, 2006.
- 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, 2006.

DING, J. et al. Tumor Associated Macrophage × Cancer Cell Hybrids 781 May Acquire Cancer Stem Cell Properties in Breast Cancer. **PLoS ONE**, 782 v. 7, n. 7, p. e41942, 2012.

DONG, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 5, p. 337-348, 2008.

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

ELYAMAN, W. et al. IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 31, p. 12885-12890, 2009.

FREYTAG, S. O.; ZHANG, Y.; SIDDIQUI, F. Preclinical toxicology of oncolytic adenovirus-mediated cytotoxic and interleukin-12 gene therapy for prostate cancer. **Molecular Therapy-Oncolytics**, v. 2, p. 15006, 2015.

GABRILOVICH, D. Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic-cell defects. **Nature Reviews Immunology**. v. 4, n. 12, p. 941-952, 2004.

GARCIA PAZ, F. G. et al. The relationship between the antitumor effector of the IL-12 gene therapy and the expression of Th1 cytokines in an HPV-16 positive murine tumor model. **Mediators of inflammation**, v. 2014, p.1-9, 2014.

GUEMBAROVSKI, R. L.; CÓLUS, I. M. S. Câncer: uma doença genética. **Revista SBG**, v. 3, n. 1, p. 4-7, 2009.

HUNG, K. et al. The central role of CD4+ T cells in the antitumor immune response. **The Journal of experimental medicine**, v. 188, n. 12, p. 2357-2368, 1998.

HUSSAIN, S. P.; HARRIS, C. C. Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 462, n. 2, p. 311-322, 2000.

HWANG, E. et al. T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. **Science**, v. 307, n. 5708, p. 430-433, 2005.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. **Journal of leukocyte biology**, v. 71, n. 6, p. 907-920, 2002.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Ministério da Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR>>. Acesso em 23/12/2016.

INOUE, D.P; AMAR, A; CERVANTES, O. Markers in larynx cancer. **Revista brasileira de cirurgia de cabeça e pescoço**, v. 34, n. 1, p. 7-14, 2005.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER et al. GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. 2012.

IVANOV, I. I. et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121-1133, 2006.

JOHUNG, K.; GOODWIN, E. C.; DIMAIO, D. Human papillomavirus E7 repression in cervical carcinoma cells initiates a transcriptional cascade driven by the retinoblastoma family, resulting in senescence. **Journal of virology**, v. 81, n. 5, p. 2102-2116, 2007.

JONES, L. L. et al. Distinct subunit pairing criteria within the heterodimeric IL-12 cytokine family. **Molecular immunology**, v. 51, n. 2, p. 234-244, 2012.

JONES, L. L.; VIGNALI, D. A. A. Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily. **Immunologic research**, v. 51, n. 1, p. 5-14, 2011.

JOSEFOWICZ, S. Z.; RUDENSKY, A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 616-625, 2009.

KAPLAN, D. et al. Demonstration of an interferon gamma -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. **The Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 13, p. 7556-7561, 1998.

KASTELEIN, R. A.; HUNTER, C. A.; CUA, D. J. Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p. 221-242, 2007.

KERKAR, S. P. et al. Tumor-specific CD8+ T cells expressing interleukin-12 eradicate established cancers in lymphodepleted hosts. **Cancer research**, v. 70, n. 17, p. 6725-6734, 2010.

KIDD, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. **Alternative Medicine Review**, v. 8, n. 3, p. 223-246, 2003.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 485-517, 2009.

KUKA, M.; MUNITIC, I.; ASHWELL, J. D. Identification and characterization of polyclonal  $\alpha\beta$  T cells with dendritic cell properties. **Nature communications**, v. 3, p. 1223, 2012.

KUMAR, V.; ASTER, J. C.; ABBAS, A. **Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. Elsevier Brasil, 2015.

LANGENKAMP, A. et al. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. **Nature immunology**, v. 1, n. 4, p. 311-316, 2000.

LASEK, W.; ZAGOŹDŹON, R.; JAKOBISIAK, M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy?. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 63, n. 5, p. 419-435, 2014.

LAZAREVIC, V.; GLIMCHER, L. H.; LORD, G. M. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 11, p. 777-789, 2013.

LEE, Y. K. et al. Late development alplasticity in the T helper 17 lineage. **Immunity**, v. 30, n. 1, p. 92-107, 2009.

LEHRNBECHER, T. et al. Changes in host defense induced by malignancies and antineoplastic treatment: implication for immunotherapeutic strategies. **The Lancet Oncology**. v. 9, n. 3, p. 269-278, 2008.

LI, H.; ROSTAMI, A. IL-9: basic biology, signaling pathways in CD4+ T cells and implications for autoimmunity. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 198-209, 2010.

LIN, Z. et al. The Expression Levels of Transcription Factors T-bet, GATA-3, ROR $\gamma$ t and FOXP3 in Peripheral Blood Lymphocyte (PBL) of Patients with Liver Cancer and their Significance. **International Journal of Medical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 7, 2015.

LOEB, L. A.; HARRIS, C. C. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. **Cancer research**, v. 68, n. 17, p. 6863-6872, 2008.

LOOSE, D.; VAN DE WIELE, C. The immune system and cancer. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, v. 24, n. 3, p. 369-376, 2009.

LUPARDUS, P. J.; GARCIA, K. C. The structure of interleukin-23 reveals the molecular basis of p40 subunit sharing with interleukin-12. **Journal of molecular biology**, v. 382, n. 4, p. 931-941, 2008.

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

MICHELIN, M. A. et al. Peripheral helper lymphocytes produce interleukin 12 in cancer patients. **Clinical Medicine Insights Oncology**, v. 7, p. 75, 2013.

MIOSSEC, P.; KORN, T.; KUCHROO, V. K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 9, p. 888-898, 2009.

MISSON, D. R. et al. Cytokine serum levels in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade II–III treated with intralesional interferon- $\alpha$  2b. **Tumori**, v. 97, n. 5, p. 578-84, 2011.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **The Journal of Immunology**, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual review of immunology**, v. 7, n. 1, p. 145-173, 1989.

MUKASA, R. et al. Epigenetic instability of cytokine and transcription factor gene loci underlies plasticity of the T helper 17 cell lineage. **Immunity**, v. 32, n. 5, p. 616-627, 2010.

MULLEN, A. C. et al. Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable TH1 gene induction. **Nature immunology**, v. 3, n. 7, p. 652-658, 2002.

ONUCHIC, A. C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Revista Médica**, v. 89, n. 1, p. 21-31, 2010.

OPPMANN, B. et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity**, v. 13, n. 5, p. 715-725, 2000.

PAN, M. et al. Mutation of the IFNAR-1 receptor binding site of human IFN- $\alpha$ 2 generates type I IFN competitive antagonists. **Biochemistry**. v. 47(46), p. 12018-12027, 2008.

PEGHINI, B. C. et al. Local cytokine profiles of patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia. **Human immunology**, v. 73, n. 9, p. 920-926, 2012.

PELUZIO, M. C.G. et al. The suppressor proteins in malignant neoplasia - Knowing their role. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 21, n. 3, p 233-238, 2006.

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.

RATAJEWSKI, M. et al. Upstream stimulating factors regulate the expression. Of ROR $\gamma$ T in human lymphocytes. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 6, p. 3034-3042, 2012.

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, 2011.

RODRIGUEZ-GALAN, M. et al. Coexpression of IL-18 strongly attenuates IL-12-induced systemic toxicity through a rapid induction of IL-10 without affecting its antitumor capacity. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 1, p. 740-748, 2009.

ROTH, W. et al. Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis. **Cancer Research**. v. 61, p. 2759–2765, 2001.

SCHAROVSKY, O. G. et al. From immune surveillance to tumor-immune escape: the story of an enemy with multiple strategies of resistance and counterattack. **Immunologia**, v. 25, n. 2, p. 101-14, 2006.

SEGURA, E. et al. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. **Immunity**, v. 38, n. 2, p. 336–48, 21 fev. 2013.

SERAFINI, P. et al. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. **Cancer research**, v. 64, n. 17, p. 6337-6343, 2004.

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.

SHIH, H. A. et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families with multiple primary cancers. **Clinicalcancerresearch**, v. 6, n. 11, p. 4259-4264, 2000.

SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Revista Ciências Rural, Santa Maria**, v. 2, n. 34, p.625-633, 2004.

SNIJDERS, A. et al. Regulation of bioactive IL-12 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes determined by the expression of the p35 subunit. **The Journal of Immunology**, v. 156, n. 3, p. 1207-1212, 1996.

SOMBROEK, C. C. et al. Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 9, 4333-4343, 2002.

STEINMAN, L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nature medicine**, v. 13, n. 1, p. 139-145, 2007.

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

TATSUMI, T. et al. Intratumoral delivery of dendritic cells engineered to secrete both interleukin (IL)-12 and IL-18 effectively treats local and distant disease in association with broadly reactive Tc1-type immunity. **Cancer research**, v. 63, n. 19, p. 6378-6386, 2003.

TLSTY, T. D.; COUSSENS, L. M. Tumor stroma and regulation of cancer development. **AnnualReviewPathologyMechanismsofDisease**, v. 1, p. 119-150, 2006.

TORRENZINI, T.; ATHANAZIO, D. A. Imunovigilância e imunoeedição de neoplasias: implicações clínicas e potencial terapêutico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54, n. 1, p. 63-77, 2008.

TRICHOPOULOS, D.; LI, F. P.; HUNTER, D. J. What causes cancer? **Scientific American**, v. 275, n. 3, p. 80-84, 1996.

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

VIGNALI, D. A. A; KUCHROO, V. K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. **Nature immunology**, v. 13, n. 8, p. 722-728, 2012.

WANG, Y. et al. The transcription factors T-bet and Runx are required for the ontogeny of pathogenic interferon- $\gamma$ -producing T helper 17 cells. **Immunity**, v. 40, n. 3, p. 355-366, 2014.

WANG, X. et al. Changes of Th17/Treg cell and related cytokines in pancreatic cancer patients. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 5, p. 5702, 2015.

WEINBERG, R. A. How cancer arises: an explosion of research in uncovering the long-hidden molecular underpinnings of cancer and suggesting new therapies. **Scientific American**, v. 275, n. 3, p. 62-71, 1996.



WESA A. et al. Polarized type-1 cells (DC1) producing high levels of IL-12 family members rescue patient Th1-type anti-melanoma CD4<sup>+</sup> T cell responses in vitro. **Journal of Immunotherapy**, v. 30, n. 1, p. 75–82, 2007.

WING, K.; FEHERVARI, Z.; SAKAGUCHI, S. Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. **International immunology**, v. 18, n. 7, p. 991-1000, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2008**. Geneva , 2008. Cap.1, p. 21 (1:112).

YANG, X. O. et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 13, p. 9358-9363, 2007.

YANG, X. O. et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$ . **Immunity**, v. 28, n. 1, p. 29-39, 2008.

ZHANG, F.; MENG, G.; STROBER, W. Interactions among the transcription factors Runx1, ROR $\gamma$ t and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17–producing T cells. **Nature immunology**, v. 9, n. 11, p. 1297-1306, 2008.

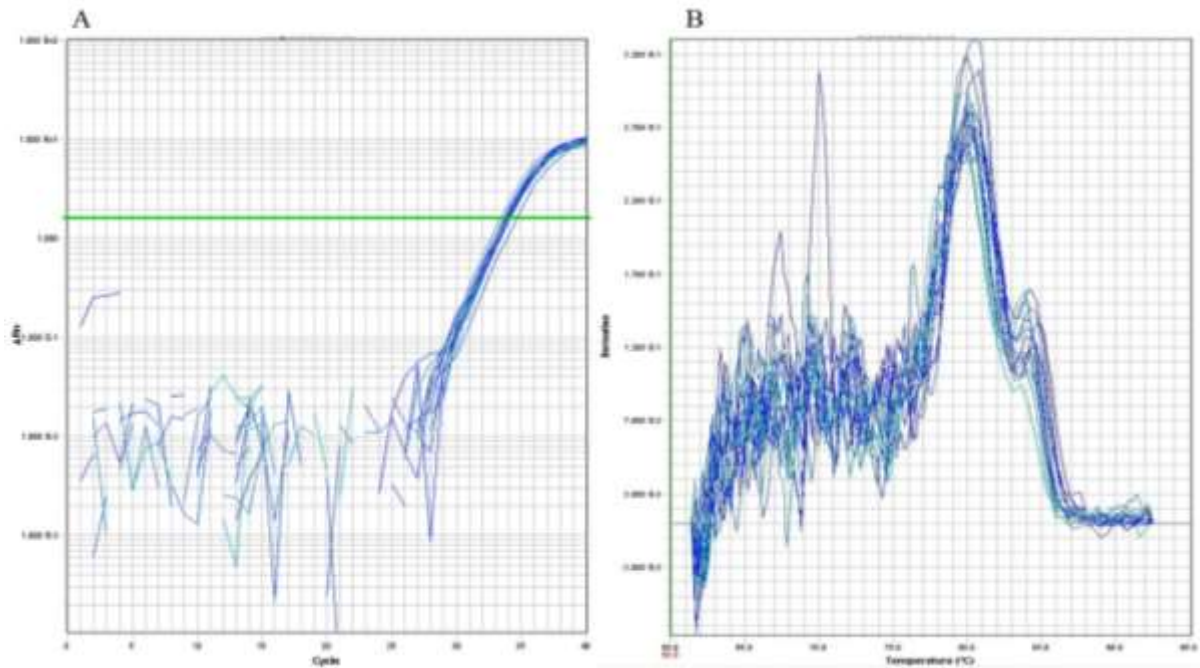
ZHENG, S. Regulatory T cells vs Th17: differentiation of Th17 versus Treg, are the mutually exclusive. **American Journal of Clinical and Experimental Immunology**, v. 2, n. 1, p. 94-106, 2013.

ZHENG, Y. et al. Interleukin-22, a TH17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. **Nature**, v. 445, n. 7128, p. 648-651, 2007.

ZHU, J. et al. The transcription factor T-bet is induced by multiple pathways and prevents an endogenous Th2 cell program during Th1 cell responses. **Immunity**, v. 37, n. 4, p. 660-673, 2012.

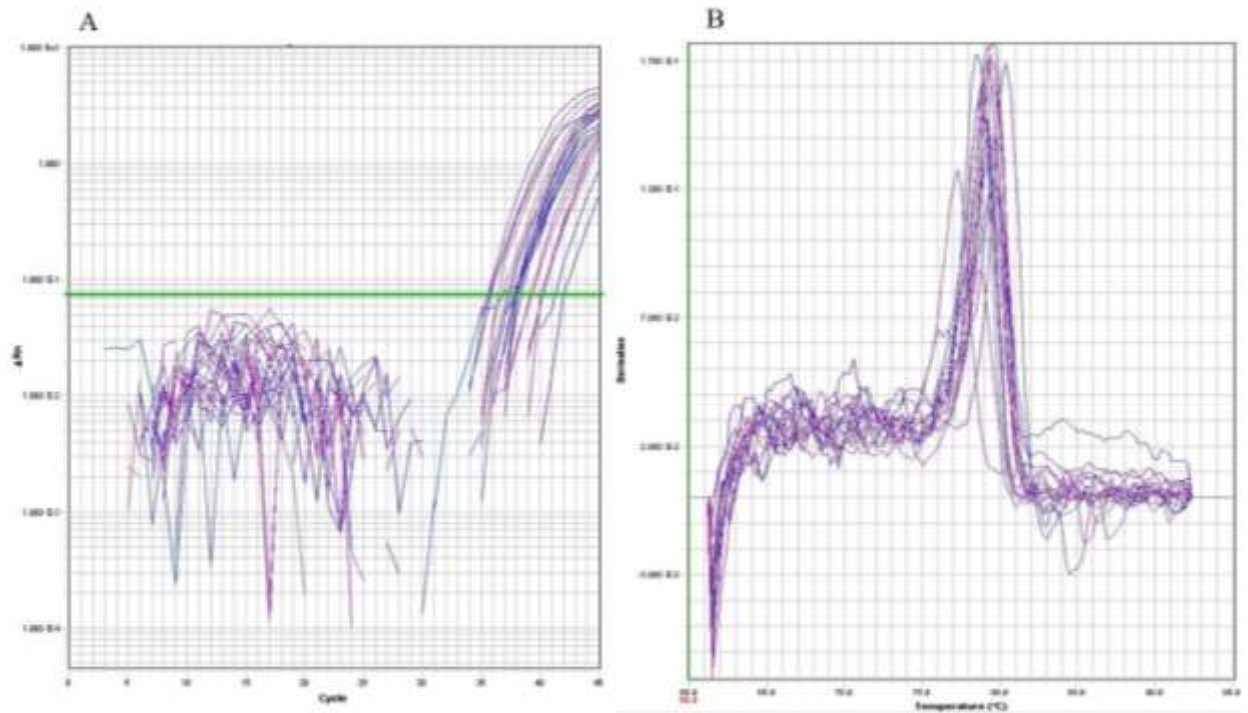
ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1557-1569, 2008.

## APÊNDICE A



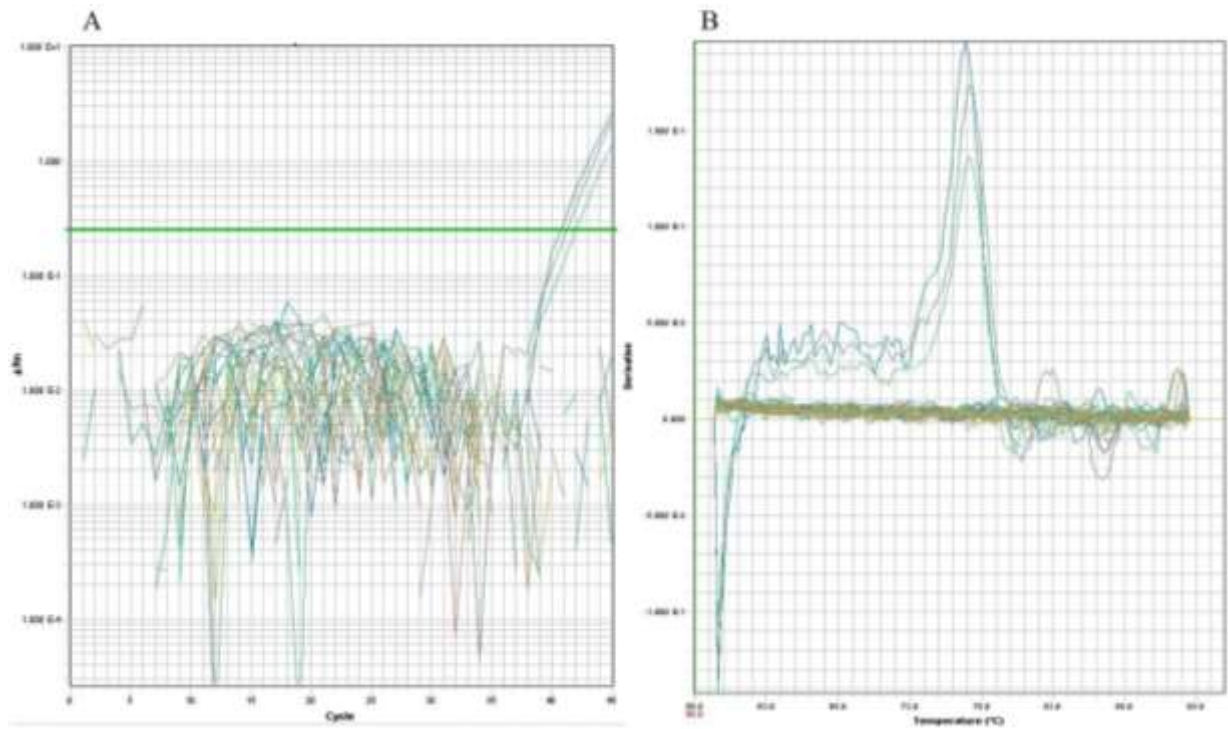
Representação da expressão gênica do controle endógeno  $\beta$ -actina (ACTB) nas amostras obtidas por *sorting* dos pacientes oncológicos. (A) Representação da curva de amplificação da  $\beta$ -actina. (B) Representação da curva de dissociação da  $\beta$ -actina.  $\Delta Rn$ : fluorescência; *Derivate*: derivativa; *Temperature* ( $^{\circ}C$ ): temperatura em graus *Celsius*; *Cycle*: número de ciclos.

## APÊNDICE B



Representação da expressão gênica do fator de transcrição *RORγt* nas amostras obtidas por *sorting* dos pacientes oncológicos. (A) Representação da curva de amplificação de *RORγt*. (B) Representação da curva de dissociação de *RORγt*.  $\Delta Rn$ : fluorescência; *Derivate*: derivativa; *Temperature* ( $^{\circ}C$ ): temperatura em graus *Celsius*; *Cycle*: número de ciclos.

## APÊNDICE C



Representação da expressão gênica do fator de transcrição *T-bet* nas amostras obtidas por *sorting* dos pacientes oncológicos. (A) Representação da curva de amplificação de *T-bet*. (B) Representação da curva de dissociação de *T-bet*.  $\Delta Rn$ : fluorescência; *Derivate*: derivativa; *Temperature* (°C): temperatura em graus *Celsius*; *Cycle*: número de ciclos.

## **ANEXO 1 – Termo de esclarecimento**

### TERMO DE ESCLARECIMENTO

- Está sendo convidado a participar do projeto “IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS NO TRATAMENTO DE NEOPLASIA”. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. O objetivo deste estudo é:
- Estudar possíveis alterações imunológicas e patológicas dos tumores.
- Avaliar o tratamento imunoterápico. Sintomas como dor muscular e aumento de temperatura podem ocorrer. Estas alterações podem ser tratadas e os pesquisadores orientarão sobre a medicação.
- E caso você participe, será necessário coletar material para o estudo que estamos propondo, e que normalmente já é coletado para os seus exames de rotina, e que não lhe trazem nenhum desconforto ou risco de vida.

Você poderá ter 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.

Telefone de contato dos pesquisadores: 3318.5326 (GO), 3318.5595 (IPON)

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

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.

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

\_\_\_\_\_  
 Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

\_\_\_\_\_  
 Documento de identidade

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

Telefone de contato dos pesquisadores: 3318.5326

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

## ANEXO 2 - Cópia 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 Obstetrícia  
 Instituto de Pesquisa em Oncologia - IPON  
 Coordenador do Projeto

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

### ANEXO 3 – Caracterização da amostra

Caracterização da amostra				
Amostra	Sujeito	Sítio primário	Fase no momento da coleta*	Idade
P8	CFSS	Vulva	Avançado	66
P9	VMCL	Endométrio	Recidiva metastática	67
P10	ERS	Colo uterino	Avançado	49
P11	MTIJ	Mama	Avançado	71
P12	SFLL	Endométrio	Recidiva metastática	79
P13	MAB	Ovário	Avançado	57
P14	JDMR	Mama	Avançado	54
P15	ACN	Endométrio	Avançado	38
P16	MJCP	Colo uterino	Avançado	39
P17	MRS	Colo uterino	Recidiva metastática	50
P18	TBFM	Endométrio	Avançado	53
P19	MCA	Ovário	Recidiva metastática	62
P20	AAM	Mama	Avançado	30
P21	MMS	Mama	Avançado	57
P23	NLSB	Mama	Avançado	44
P24	MAO	Mama	Avançado	66
P25	MID	Ovário	Recidiva metastática	62
P26	AJFC	Colo uterino	Recidiva metastática	53
P27	OTS	Colo uterino	Recidiva local	58
P28	MJLS	Ovário	Recidiva metastática	60
P29	HMP	Mama	Recidiva metastática	55
P30	RS	Mama	Recidiva local	0
P31	AT	Colo uterino	Avançado	26



<b>P32</b>	IAG	Ovário	Avançado	50
<b>P33</b>	HAF	Colo uterino	Recidiva metastática	71
<b>P34</b>	MFB	Mama	Recidiva local	77
<b>P35</b>	MALS	Colo uterino	Recidiva local	83
<b>P36</b>	DOA	Endométrio	Recidiva local	71
<b>P37</b>	RBMP	Mama	Recidiva metastática	41
<b>P38</b>	RTM	Colo uterino	Avançado	47
<b>P39</b>	TAR	Endométrio	Recidiva metastática	52
<b>P41</b>	SFS	Vulva	Recidiva metastática	83
<b>P42</b>	ZPC	Vulva	Avançado	72
<b>P43</b>	MCS	Mama	Recidiva local	0
<b>P46</b>	MJD	Mama	Recidiva local	72

\*Todos os pacientes participantes desse estudo tinham diagnóstico de câncer avançado, ou seja, estadiamentos avançados. Então o termo **avançado** foi utilizado para as pacientes com diagnóstico inicial com estadiamento avançado no momento da coleta; o termo **recidiva metastática** foi utilizado para pacientes com tinham prévio diagnóstico de câncer e que apresentaram recidiva com metástase no momento da coleta; e o termo **recidiva local** para as pacientes com prévio diagnóstico de câncer e que apresentaram recidiva local.

**ANEXO 4 – Dados controles**

<b>Amostra</b>	<b>Sujeito</b>	<b>Idade</b>
<b>C1</b>	PBS	29
<b>C2</b>	JFV	25
<b>C3</b>	NR	23
<b>C4</b>	CEMJ	49
<b>C5</b>	MPJ	38
<b>C6</b>	MAM	48
<b>C7</b>	ATCS	33
<b>C8</b>	LMOB	31
<b>C9</b>	MR	37
<b>C10</b>	DFE	52
<b>C11</b>	LFF	70
<b>C12</b>	VFFV	49
<b>C13</b>	JOL	33
<b>C14</b>	LMP	24
<b>C15</b>	ERB	50
<b>C16</b>	AMSA	33
<b>C17</b>	ECS	48
<b>C18</b>	AMML	28
<b>C19</b>	CGC	30
<b>C20</b>	EBO	65
<b>C21</b>	CAD	60
<b>C22</b>	DHGC	51
<b>C23</b>	MASA	51