ALINE ARRUDA DE OLIVEIRA

EIXO IL-4/STAT-6/SOCS-5 NA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS: EFEITOS DA MELATONINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

SÃO PAULO
2017

ALINE ARRUDA DE OLIVEIRA

EIXO IL-4/STAT-6/SOCS5 NA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS: EFEITOS DA MELATONINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

SÃO PAULO
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Oliveira, Aline Arruda de
Eixo IL-4/STAT-5/SOCS-5 na diferenciação de células dendríticas: efeitos da melatonina / Aline Arruda de Oliveira; orientador José Alexandre Marzagão Barbuto. -- São Paulo, 2017.
129 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Melatonina. 2. Monócitos. 3. Células Dendríticas. 4. Câncer. 5. STAT-6. I. Marzagão Barbuto, José Alexandre, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Aline Arruda de Oliveira

Titulo da Dissertação/Tese: Eixo IL-4/STAT-6/SOCS-5 na diferenciação das células dendríticas: efeitos da melatonina

Orientador: José Alexandre Marzagão Barbuto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@ icb.usp.br

São Paulo, 03 de março de 2015.

PARECER 1215/CEPSH

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Eixo IL-4/STAT-6/SOCS-5 na diferenciação das células dendríticas: efeitos da melatonina*" *do pesquisador* ***José Alexandre M. Barbuto*** e aluna **Aline Arruda de Oliveira.**

Cabe aos pesquisadores elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: **icb.usp.br.**

Aos pesquisadores cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em 0**3.03.2016**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAOLO M.A.ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Eixo IL-4/STAT-6/SOCS-5 na diferenciação das células dendríticas: efeitos da melatonina

Pesquisador: Aline Arruda de Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 41303115.6.0000.5467

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.905.144

Apresentação do Projeto:

o projeto pretende investigar os efeitos da MLT sobre o eixo IL-4/STAT-6/SOCS-5 durante a diferenciação in vitro de DCs a partir de monócitos de doadores saudáveis e compará-los àqueles observados em células de portadores de câncer

Objetivo da Pesquisa:

Investigar os mecanismos através dos quais a melatonina aumenta a sensibilidade de monócitos à IL-4 durante sua diferenciação in vitro em células dendríticas. Especificamente, pretende-se avaliar a participação de STAT6 e de SOCS5 no fenômeno, comparando seus papéis em células provenientes de doadores saudáveis e de pacientes com câncer de mama.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

NA

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa è interessante e nao comporta problemas eticos

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estao adeguados

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7733 **Fax:** (11)3091-8405 **E-mail:** cep@icb.usp.br

Esta tudo conforme

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado do CEP - ICB concorda com o parecer do relator em aprovar o relatório parcial.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_827754_E1.pdf	03/12/2016 10:47:47		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	03/12/2016 10:43:40	Aline Arruda de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEpaciente.pdf	03/12/2016 10:41:53	Aline Arruda de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEsaudavel.pdf	03/12/2016 10:41:39	Aline Arruda de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	folha rosto aline.pdf	29/01/2015 15:14:27		Aceito
Outros	carta -perola.pdf	29/01/2015 15:13:26		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 02 de Fevereiro de 2017

Assinado por:
Camila Squarzoni Dale
(Coordenador)

Endereço: Av. Profº Lineu Prestes, 2415
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7733 **Fax:** (11)3091-8405 **E-mail:** cep@icb.usp.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Eixo IL-4/STAT-6/SOCS-5 na diferenciação das células dendríticas: efeitos da melatonina

Pesquisador: Aline Arruda de Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 41303115.6.3001.0069

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 999.985

Data da Relatoria: 25/03/2015

Apresentação do Projeto:

Estudos anteriores em nosso laboratório verificaram que células dendríticas derivadas de monócitos (Mo-DCs) obtidas de pacientes com câncer apresentam desvios funcionais que favorecem a ativação de linfócitos T reguladores (Treg), possivelmente contribuindo para o escape dos tumores frente à resposta imune. Ademais, verificou-se que a melatonina (MLT), age sobre monócitos, aumentando sua sensibilidade à Interleucina-4 (IL-4) durante sua diferenciação em células dendríticas (DCs) in vitro. Outro estudo do nosso grupo verificou, ainda, que parte do desvio funcional das MoDCs de pacientes com câncer pode ser atribuído à diminuição da sinalização de STAT-6, fator de transcrição que é ativado por IL-4 e regulado pelo fator SOCS-5, cujos níveis, por sua vez, foram encontrados elevados em monócitos dos pacientes. Assim, o presente projeto pretende investigar os efeitos da MLT sobre o eixo IL-4/STAT-6/SOCS-5 durante a diferenciação in vitro de DCs a partir de monócitos de doadores saudáveis e compará-los àqueles observados em células de portadores de câncer. Espera-se com isto, compreender melhor a relação entre estes fatores e,eventualmente, identificar pontos passíveis de intervenção capazes de corrigir os desvios funcionais das DCs nos pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar os mecanismos através dos quais a melatonina aumenta a sensibilidade de monócitos à IL-4 durante sua diferenciação in vitro em células dendríticas. Especificamente, pretende-se avaliar a participação de STAT6 e de SOCS5 no fenômeno, comparando seus papéis em células provenientes de doadores saudáveis e de pacientes com câncer de mama.

Objetivo Secundário:

Avaliar os níveis totais e de ativação de STAT-6 e SOCS-5 em monócitos estimulados com IL-4 e tratados com MLT ou estimulados com IL-4 e GMCSF e tratados com MLT, obtidos de doadores saudáveis e de pacientes com câncer de mama e avaliar os efeitos da MLT sobre a diferenciação em DCs de monócitos de pacientes com câncer, determinando: fenótipo de membrana e função alo-estimuladora (medida pela indução da proliferação de diferentes subpopulações de linfócitos T e pelo padrão de citocinas produzido por essas células).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os sujeitos envolvidos na pesquisa terão risco mínimo, sendo este apresentado apenas na coleta do sangue, a qual pode resultar em hematomas,dor local, e mais raramente, queda de pressão e desmaios.

Benefícios:

Os sujeitos envolvidos na pesquisa não terão benefícios diretos relacionados com o projeto, no entanto, a pesquisa poderá contribuir com a descoberta de novas técnicas para combate de câncer visando cada vez menos efeitos colaterais para o indivíduo tratado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo proposto está de acordo com a resolução 466/12.

Apresenta desenho adequado, riscos e benefícios.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE é de fácil compreensão, apesar de conter alguns termos técnicos.

Recomendações:

Não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente projeto encontra-se em conformidade com a resolução 466/12 , sendo recomendado a aprovação do ponto de vista ético.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

De acordo com o parecer do relator.

SAO PAULO, 26 de Março de 2015

Assinado por:
Roberto Euzebio dos Santos
(Coordenador)

Endereço: Av.Brigadeiro Luiz Antonio, 683
Bairro: Bela Vista **CEP:** 01.317-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11-)3248-8087 **Fax:** (11-)3248-8080 **E-mail:** dircient@ig.com.br

À minha família.
Em especial à minha “vó Eliza” *(in memorian)*, sem o seu amor
eu não seria quem sou, e ao meu “vô Arruda”, o seu orgulho
por mim me faz ir cada vez mais longe.

AGRADECIMENTOS

Ao “professor”, meu orientador Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto, por ter me dado a oportunidade de tê-lo como mestre, orientador, pai, psicólogo, churrasqueiro e todos os inúmeros papéis que acabou fazendo na minha vida nesses últimos anos. Por ter sempre enxergado além do que eu podia ver, pelo incentivo constante, pelo conhecimento ímpar compartilhado, pela paciência até nos meus (muitos) momentos de desespero. À você, professor, minha eterna gratidão e admiração.

Ao grande amigo que o mestrado me deu, Thiago Andrade Patente. Não há palavras que possam expressar o tamanho da minha gratidão por ter você na minha vida. Por toda a ajuda prática e teórica, por todos os sangues coletados, pela companhia durante os (raros) almoços, por todos os momentos de “amor e ódio”. E principalmente, por tudo que pude aprender com você - desde a “origem da palavra sobrancelha” até como ser uma das melhores pessoas que já conheci.

À “mami”, Dra. Patricia Bergami-Santos, por me conhecer tão bem, por todos os conselhos, pela amizade sincera, por ouvir meus desabafos e ter sempre uma palavra de conforto.

À Profa. Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares, por ter aberto as portas da ciência, da imunologia e das células dendríticas para mim.

À minha primeira “família científica”: Régis Keller e Tatiana Bachiega, por toda paciência, apoio e amizade, mesmo quando o convívio diário não se fez mais presente.

Aos meus pais, Lilia e Newton, por todo amor, compreensão e apoio, qualquer que fosse o momento. Por me permitirem seguir o meu caminho sempre me mostrando as ferramentas necessárias. Pela compreensão quando o lazer não era uma opção, pelo constante incentivo e por sempre acreditarem no meu potencial. Pelo esforço para me ver feliz e pelos exemplos de vida que são para mim.

Ao meu irmão Arthur (Gordo), por compartilhar as melhores coisas “bobas” da vida, tornando-a mais leve e divertida. E Por me permitir acompanhar o seu crescimento pessoal e profissional nos últimos tempos.

Aos meus filhos de quatro patas, Cléo, Lico, Neli e Gibson. O amor incondicional de vocês é meu combustível diário.

Aos meus avós, tias e primos que acompanharam minha jornada até aqui, sempre me lembrando do quanto sentem orgulho por mim.

Aos “Monstros”: Rafael Moysés, Felipe Campos e Raíssa Fonseca, pela amizade sincera, happy hours, viagens e momentos incríveis. Vocês foram essenciais para me manter em pé no fim desta etapa.

Às “Glowers”: Amanda Garcia, Ana Cichon, Sarah Fernandes e Maura Pacios, por todas as risadas e planos para o futuro. E à Amanda, um agradecimento especial

por todas as correções, traduções e por aprender um pouquinho sobre as Células Dendríticas.

À Marcela D'Ambrósio (Bun), por continuar sempre presente e me mostrando o verdadeiro valor da amizade.

À Sarah Steiner, por cuidar de mim (física e psicologicamente) e não permitir que eu me esquecesse em tempos difíceis.

Aos irmãos que Botucatu me deu, Thayssa Schley, Maura Pacios, Patricia Lobo e Gabriel Cohen. Por sempre torcerem por mim, me incentivarem e, mesmo longe, compartilharem dos momentos de alegria e tristeza.

Ao Dr. Fábio Laginha pela colaboração quanto ao acesso às pacientes no Hospital Pérola Byington.

Aos enfermeiros Henrique Guedes e Vera, pelo bom-humor constante e disponibilidade na coleta e triagem das pacientes. Sem vocês pouco seria possível.

Às pacientes que, mesmo em um momento de tamanha fragilidade, fizeram muito mais do que participar do estudo. Por todas as palavras de motivação, desejos de "boa sorte", sorrisos e exemplos de força.

À Eni, por toda a competência, disponibilidade e ajuda. Por se preocupar com os alunos como se fossem seus filhos e pelas palavras de incentivo nos momentos de fragilidade.

À Àurea, por todos os cafés feitos com carinho e bom-humor, que foram combustível para a execução deste projeto.

À Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar pelo apoio pessoal e financeiro tão importantes nos momentos difíceis vividos pelo grupo.

Ao laboratório do Prof. Dr. Gustavo Amarante-Mendes por me permitirem passar grande parte do tempo usando reagentes e equipamentos. Em especial à Nathalia Cruz de Victo, por todas as doações de sangue, pela ajuda essencial nos experimentos de Western Blotting, pelos cafés e pela amizade sincera.

Ao laboratório do Prof. Antonio Condino Neto, por todos os empréstimos tão essenciais para este projeto. Em especial à Christiane Lambert, Tábata Takahashi e Renata Harumi por todas as vezes em que cederam um pouco de tempo doando ou coletando sangue para meus experimentos.

À Dra. Karina Carvalho por dividir um pouco do seu amplo conhecimento em relação à citometria de fluxo e por estar sempre à disposição para nos ajudar.

À todos que literalmente deram o sangue pela minha pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia de Tumores do Departamento de Imunologia do ICB-USP, pelos bons momentos de convivência e pelos aprendizados

nos momentos de angústias. Em especial, à Isabella Katz Migliori me ajudar sempre mesmo de longe, à Mariana Pinho por toda bondade e inteligência e à Sarah Fernandes por todas as risadas e boas energias.

À Célia Pizzo e Claudia Cunha (Claudinha), por cuidarem do local que foi como minha casa ao longo de toda essa jornada.

Ao membros das comissões organizadoras do III e IV “Curso de Férias em Imunologia” por todo o aprendizado em meio a discussões e burocracias, por todo o divertimento e comemorações e por compartilharem o sucesso que pudemos conquistar.

À todos os funcionários do ICB IV que de alguma forma contribuíram para a execução deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo essencial apoio financeiro (processo nº 2015/03314-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

E àqueles cujos nomes não foram citados mas que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste estudo, meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTO À AGÊNCIA DE FOMENTO

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo essencial apoio financeiro (processo nº 2015/03314-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, com vigência de 01/06/2015 a 31/01/2017).

Declaro que as opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de minha responsabilidade (autora) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP e da CAPES.

“(...) É meu próprio caminho em direção ao sol. (...)
Devagarzinho, sem pressionar o tempo, chego ao meu destino.
Respiro fundo, abro os braços, canto um hino de sagração ao
mundo – e agradeço – por ter descoberto de repente por onde
se começa um recomeço.”

Flora Figueiredo

RESUMO

OLIVEIRA, A. A. de. **Eixo IL-4/STAT-6/SOCS-5 na diferenciação das células dendríticas: efeitos da melatonina.** 2017. 129 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Resultados anteriores do nosso grupo mostraram que a melatonina (MLT) age em monócitos aumentando sua sensibilidade à IL-4 e, consequentemente, levando estas células a se diferenciarem em células dendríticas - quando *in vitro* e estimulados com IL-4 e GM-CSF – (mo-DCs) com um perfil fenotípico e funcional mais ativado. Outros estudos do nosso grupo mostraram que mo-DCs de pacientes portadoras de câncer apresentam desvios funcionais capazes de comprometer a ativação de linfócitos por este tipo celular. Um outro apontamento de nosso grupo foi para o fato de que, muito provavelmente relacionado a estes desvios, está um comprometimento da via IL-4/STAT-6/SOCS-5, que se mostrou alterada em pacientes com leucemia linfóide crônica. Baseado nestes resultados, o presente trabalho objetivou investigar os efeitos da MLT na diferenciação *in vitro* de mo-DCs de doadoras saudáveis e de pacientes portadoras de câncer de mama, sob a hipótese de que este hormônio poderia agir na via IL-4/STAT-6/SOCS-5 de modo a gerar mo-DCs com fenótipo e função relacionados à maior ativação. Para tanto, monócitos provenientes do sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes foram tratados com MLT (2,5 nM – 2 horas) e induzidos à diferenciação em mo-DCs; no quinto dia as células foram ativadas com LPS (100 ng/ml – 24 horas). As análises, por citometria de fluxo, do fenótipo e das citocinas ao longo da diferenciação de mo-DCs não apontou efeitos consistentes acerca do tratamento com MLT, mas indicou maior expressão de $CD83^{+}$ nos monócitos das pacientes ($p=0,014$) e maior concentração da citocina IL-12p70 no sobrenadante das culturas de mo-DCs destes indivíduos, ao final da diferenciação ($p=0,02$). Para a análise da capacidade linfoestimuladora das mo-DCs foi realizada co-cultura destas células com linfócitos T (LT) alogeneicos (1 DC: 30 LT) por 5 dias. Não houve diferença na indução de proliferação de LT estimulados por mo-DCs de saudáveis nem de pacientes. A MLT mostrou efeito apenas nas co-culturas com células saudáveis aumentando as concentrações de TNF, IFN-γ e IL-2 nos sobrenadantes. Nas co-culturas com células de pacientes sem tratamento, houve maior nível de IL-2 e IL-10, se comparadas com saudáveis. Os monócitos foram também tratados com MLT (2.5 nM) ou IL-4 (50 ng/mL) por 15 minutos, para avaliação da expressão de STAT-6, pSTAT-6 e SOCS-5. Não foi constatado efeito da MLT nesse caso, mas os monócitos de pacientes apresentaram maior expressão de STAT-6, porém menor de pSTAT-6, comparados com saudáveis. Tomados em conjunto, os resultados globais indicam algumas diferenças fenotípicas e funcionais entre monócitos de pacientes e controles, mas não entre suas mo-DCs. Quanto à MLT, os resultados apontam para o fato de que o hormônio gera alterações apenas em células provenientes de indivíduos saudáveis e somente com relação às citocinas encontradas nos sobrenadantes das co-culturas.

Palavras-chave: Melatonina. Monócitos. Células dendríticas. Câncer de mama. STAT-6. SOCS-5.

ABSTRACT

OLIVEIRA, A. A de. **IL-4/STAT-6/SOCS-5 axis in the differentiation of dendritic cells: effects of melatonin.** 2017. 129 p. – Masters thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Previous studies at our lab have shown that melatonin (MLT) acts on monocytes increasing their sensitivity to Interleukin-4 (IL-4) and, consequently, generating dendritic cells (DCs) – when *in vitro* and treated with IL-4 and GM-CSF – (mo-DCs) phenotically and functionally more activated. Other studies from our group have shown that mo-DCs obtained from cancer patients have functional biases capable of compromising the activation of T lymphocytes. Another result from our group pointed to the fact that part of the mo-DCs' functional bias in cancer patients could be attributed to the decrease in STAT-6 signaling, a pathway that is activated by IL-4 and down regulated by SOCS-5, whose levels, in turn, were found elevated in cancer patients' monocytes. Based on these results, the present work aimed to investigate the effects of MLT on the *in vitro* differentiation of healthy donors and breast cancer patients mo-DCs, under the hypothesis that this hormone could act on the IL-4/STAT-6/SOCS-5 axis generating better activated mo-DCs. Peripheral blood monocytes from healthy donors and breast cancer patients were treated with MLT (2,5 nM – 2 hours) and induced to differentiate into mo-DCs; on the fifth day cells were activated with LPS (100 ng/ml – 24 hours). Flow cytometry analysis of phenotype and cytokines in supernatants during mo-DCs differentiation didn't show MLT effects, but indicated higher frequency of $CD83^+$ ($p=0,014$) monocytes among mononuclear cells of the patients, when compared with healthy donors. In addition, higher concentration of IL-12p70 was found in mo-DCs cultures (sixth day - $p=0,02$). The capacity to stimulate allogeneic T lymphocytes was assessed by co-cultures (1DC : 30LT), maintained for 5 days. Results indicate an effect of MLT only in order to increase the TNF, IFN-γ and IL-2 concentrations in supernatants of co-cultures with healthy donors mo-DCs. Patients cells showed differences only when there was no hormone treatment, showing higher levels of IL-10 in the co-culture supernatants, when compared to healthy controls. Monocytes were also treated with MLT (2,5 nM) or IL-4 (50 ng/mL) for 15 minutes to evaluate STAT-6, pSTAT-6 and SOCS-5 expression. Results showed an increase of STAT-6 in patients' monocytes and a lower capacity of these cells to phosphorylate this molecule, even when in presence of IL-4. Together, the results point to some phenotypic and functional differences between patients and healthy donors monocytes, but it was not shown in their mo-DCs. Results also point to the fact that MLT generates changes only in healthy donors cells and those effects were only seen with cytokines found in cultures supernatants.

Keywords: Melatonin. Monocytes. Dendritic cells. Breast Cancer. STAT-6. SOCS-5.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 20

2 OBJETIVOS..... 31

3 METODOLOGIA..... 33

3.1 Casuística..... 34
3.2 Obtenção das amostras de sangue periférico, isolamento de monócitos e diferenciação em mo-DCs..... 35
3.3 Sincronização das culturas ao longo da diferenciação em mo-DCs..... 37
3.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo..... 39
3.5 *Western Blotting*..... 39
3.6 Avaliação da fosforilação de STAT-6 por citometria de fluxo (*Phosflow)*.... 40
3.7 Ensaio de indução de proliferação celular alogeneica..... 41
3.8 Detecção de IL-2 secretada em co-culturas de LT e mo-DC por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) 42
3.9 Detecção da produção de citocinas por citometria de fluxo (*Cytometric Bead Array* – CBA) 42
3.10 Análise da qualidade do sono..... 43
3.11 Análise estatística..... 44

4 RESULTADOS..... 45

4.1 Ensaio de indução de proliferação com LT e mo-DC de doadoras saudáveis..... 46
4.2 Sincronização das culturas de mo-DC por meio da adição de MLT..... 48
4.3 Avaliação da qualidade do sono de doadoras saudáveis e de pacientes.... 51
4.4 Comparação da diferenciação de mo-DC de doadoras saudáveis e de pacientes..... 54
4.4.1 *Diferenciação de mo-DCs*..... 54
4.4.2 *Caracterização do fenótipo de membrana das células de doadoras saudáveis e de pacientes ao longo da diferenciação*..... 56
4.4.3 *Associação do fenótipo das células de pacientes com outros parâmetros*..... 60
4.4.4 *Avaliação das citocinas presentes ao longo da diferenciação de mo-DCs*..... 64
4.5 Avaliação da capacidade linfoestimuladora das mo-DCs de doadoras saudáveis e de pacientes..... 68
4.6 Quantificação de STAT-6, pSTAT-6 e SOCS-5 em monócitos de doadoras saudáveis e de pacientes..... 71

5 DISCUSSÃO..... 74

6 CONCLUSÕES..... 89

REFERÊNCIAS..... 91

ANEXOS..... 105

A – Padronização da concentração da MLT..... 106

B – Padronização de ensaios de *Western Blotting* e *Phosflow* – estratégia de análise e tempo de tratamento..... 108

C – Estratégia de análise das mo-DCs..... 112

D – Estratégia de análise da proliferação de LT..... 114

E – Efeito da MLT na expressão de CD25 em LT..... 115

F – Efeito da sincronização na capacidade linfoestimuladora de mo-DCs..... 116

G – Caracterização fenotípica de mo-DCs ao longo da diferenciação..... 117

H – Expressão de CD25 em LT estimulados por mo-DCs de pacientes e doadoras saudáveis..... 120

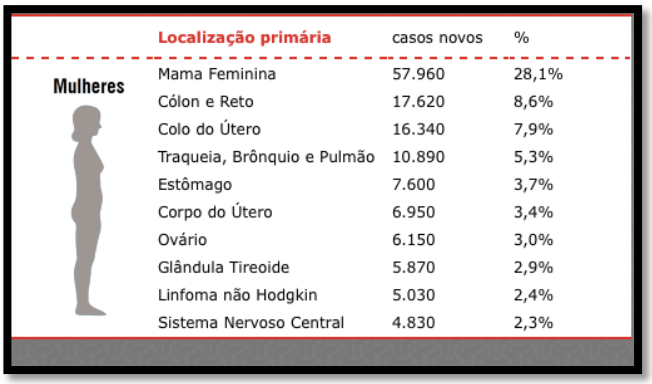
I – Comparação de expressão de pSTAT-6 na população de monócitos e na amostra total..... 121

J – Índice de qualidade de sono de Pittsburgh (PSQI-BR) 123

K – Instruções para o cálculo do Índice de qualidade de sono de Pittsburgh... 127

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças de origem hereditária ou ambiental, caracterizadas pela proliferação descontrolada de células, que também têm a capacidade de invadir tecidos adjacentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2014). Estas células originam tumores primários em seus tecidos de origem e, muito frequentemente, tumores metastáticos em sítios secundários (ROSCIANI; RUBINI; POSSATI, 1988; TARIN; PRICE, 1979). De acordo com a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) espera-se um aumento no número de novos casos de câncer de 14 milhões - no ano de 2012 - para 22 milhões de casos por ano, em 2032. A IARC chama a atenção também para o aumento no número de mortes por câncer que, de 8,2 milhões em 2012, poderá chegar a 13 milhões nessas duas décadas (IARC, 2014). O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) também atualizou a estimativa de ocorrência de novos casos de câncer para o Brasil. De acordo com o INCA, no biênio 2016-2017, cerca de 420 mil casos novos estão ocorrendo, excetuando-se o câncer de pele não melanoma (equivalente a aproximadamente 180 mil casos novos). O Instituto alerta também sobre o fato de que, em mulheres, o câncer de mama continua sendo o mais frequentemente encontrado (25,2%) neste biênio. Diante destes números, fica evidente a relevância de investigações nesta área.



Localização primária	casos novos	%
Mama Feminina	57.960	28,1%
Cólon e Reto	17.620	8,6%
Colo do Útero	16.340	7,9%
Traqueia, Brônquio e 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%
Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 em mulheres, exceto pele não melanoma. Espera-se para o biênio 2016-2017 cerca de 57.960 novos casos de câncer de mama em mulheres, sendo este tipo o mais frequentemente encontrado (28,1%). Fonte: INCA (modificada).

O câncer de mama pode ocorrer devido a diversos fatores e, assim como sua etiologia, este tipo de câncer pode apresentar também características diversas, sendo o tipo mais frequentemente diagnosticado o carcinoma ductal invasivo (BOMBONATI; SGROI, 2011), objeto do presente estudo. O carcinoma ductal invasivo compreende uma grande diversidade de subtipos, com características histopatológicas diversas e de extrema importância para o tratamento e prognóstico

da doença (CORBEN, 2013; TAVASSOLI; DEVILEE, 2003). Estes subtipos são classificados de acordo com a expressão de marcadores biológicos como o receptor de estrógeno (ER; do inglês, *estrogen receptor*) e de progesterona (PR; do inglês, *progesterone receptor*) (MARTíNEZ-ARRIBAS et al., 2006), o fator de crescimento epidérmico humano 2 (Her-2/*neu*; do inglês, *human epidermal growth factor receptor 2*) - ou c-erbB-2 - e o marcador Ki-67, uma proteína nuclear presente em células em proliferação e ausente em células em repouso (GERDES et al., 1983). Assim, os tumores de mama do tipo ductal invasivos podem ser classificados em 5 subtipos: luminal A (ER+ e/ou PR+; Her-2/*neu* -; Ki-67 < 14%), luminal B (ER+ e/ou PR+; Her-2/*neu* -; Ki-67 ≥ 14%), superexpressão de Her-2/*neu* (Her-2/*neu*+) e triplo negativo ou *basal-like* (ER- e PR-; Her-2/*neu* -). No entanto, esta classificação ainda é alvo de discussões e novas pesquisas, sendo possíveis outras classificações (SERRA et al., 2014).

Do ponto de vista imunológico, o câncer, de um modo geral, apresenta-se como uma questão intrigante. Células neoplásicas apresentam inúmeros antígenos próprios, cujo reconhecimento pelo sistema imune deveria ocorrer e dar origem a respostas específicas – o que de fato ocorre (COULIE et al., 1992; GAUGLER et al., 1994). Sendo assim, como uma célula que é reconhecida como alterada pelo sistema imune de um indivíduo imunocompetente, sobrevive, prolifera e invade outros tecidos? Na verdade, isso se deve aos mecanismos de escape dos tumores frente à resposta imune. O microambiente tumoral é rico em citocinas capazes de impedir o desenvolvimento de respostas dirigidas à eliminação das células neoplásicas (IWAMOTO et al., 2003; ZOU, 2005), quer por modificar a função de células ali presentes, como os linfócitos T (LT), macrófagos, células dendríticas (DCs) e monócitos (BALEEIRO et al., 2008; RODRÍGUEZ; CASO, 2013; TREGLIA et al., 2006; TREILLEUX et al., 2004; TORROELLA-KOURI;) quer por impedir o recrutamento e ativação de células efetoras (HARGADON et al., 2016; VICARI; CAUX; TRINCHIERI, 2002; DIAO et al., 2011). E, quer numa, quer noutra destas vias, as DCs tem papel muito relevante .

DCs são consideradas as células apresentadoras de antígenos (APCs) mais eficientes (BANCHEREAU et al., 2000; STEINMAN; WITMER, 1978). Tais células encontram-se, na maioria dos tecidos, em um estado “imaturo” no qual estão aptas a capturar e apresentar as substâncias neles presentes, porém incapazes de induzir respostas efetoras de LT *naïve*, por ainda não expressarem os sinais co-

estimuladores necessários. Apenas com o processo de maturação, que gera diminuição da capacidade endocítica, aumento da expressão de moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC-II) e aumento de moléculas coestimuladoras tais como CD80, CD86 e CD40, é que as DCs, agora denominadas maduras/ativadas tornam-se capazes de ativar os LT e desencadear uma resposta efetora do sistema imune (JONULEIT; KNOP; ENK, 1996; LUFT et al., 2006). A maturação das DCs, ao mesmo tempo, promove sua migração para os órgãos linfóides secundários, dirigindo-as aos sítios T-dependentes dos mesmos, onde a interação com os LT antígeno-específicos terá maior probabilidade de ocorrer (FRIEDL; GUNZER, 2001; HENDERSON; WATKINS; FLYNN, 1997; IMAI; YAMAKAWA; KASAJIMA, 1998). Sendo assim, o processo de maturação das DCs pode ser reconhecido como central para o desencadeamento da resposta imune e, as DCs, como uma das principais, senão a principal, via de conexão entre os mecanismos inatos de imunidade e os adquiridos (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; PARLATO et al., 2001; STEINMAN, 2012).

Além de sua capacidade de ativar LT *naïve* (BANCHEREAU et al., 2000; CHEN et al., 2005a; GILLIET et al., 2003), as DCs apresentam outra atividade característica – sua capacidade de realizar a apresentação cruzada (ALBERT et al., 1998; LIN et al., 2008; STEINMAN et al., 1999; VAN DEN EYNDE, 2006; VAN DER BRUGGEN). Denomina-se apresentação cruzada o fenômeno pelo qual um antígeno capturado do meio extracelular é processado e apresentado no contexto de moléculas de classe I do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC-I). E exatamente isso que difere as DCs das outras APCs, as quais capturam antígenos extracelulares e os apresentam no contexto de moléculas de classe II do MHC. Portanto, as DCs, por meio desta característica diferencial, podem desencadear respostas contra antígenos intracelulares de outros tipos celulares, por exemplo, para a indução de respostas imunes contra células tumorais.

Todavia, não se pode ignorar que as DCs têm, também, outro papel essencial na manutenção do equilíbrio imune no organismo – a indução e manutenção da tolerância imunológica (CASTELLANO et al., 2004; MANOHARAN et al., 2014; STEINMAN; NUSSEZWEIG, 2002; STEINMAN, 2003). Embora chamadas de “imaturas” quando não ativadas pelo desequilíbrio homeostático no tecido, as DCs, neste estado, são muito importantes para apresentar ao sistema imune antígenos presentes nos tecidos sadios, de maneira a evitar que se desencadeiem respostas

destrutivas contra os mesmos (IDOYAGA et al., 2013; STEINMAN; NUSSENZWEIG, 2002; STEINMAN, 2003), mantendo, portanto, a homeostasia tecidual.

Considerando-se este duplo papel das DCs, de desencadear respostas imunes dirigidas à eliminação de determinados antígenos e, em contrapartida, estabelecer e manter o estado de tolerância a outros, torna-se mais fácil compreender sua aparente "deficiência funcional" nas neoplasias, isto é, sua incapacidade de induzir uma resposta dirigida à eliminação do tumor (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; MONOHARAN et al, 2014; STEINMAN, 2003). Sob este ponto de vista, é possível propor que no portador de uma neoplasia ocorra uma readaptação do sistema imune, que passa a aceitar os antígenos e células tumorais como "próprios", e, portanto, não como alvos a serem eliminados. Coerentemente, quando se investiga o estado funcional das DCs encontradas no microambiente tumoral, encontram-se células principalmente em estado imaturo (BALEEIRO et al., 2008; GABRILOVICH et al., 1996; MACKEY et al., 1998), e, portanto, provavelmente agindo no sentido de impedir o estabelecimento de respostas imunes "efetoras" contra as células neoplásicas.

É importante notar que a elucidação dos mecanismos responsáveis pelo desvio funcional das DCs nos pacientes com câncer pode contribuir para compreensão da fisiologia deste tipo celular em diversas outras situações onde fenômenos semelhantes, de "adaptação" ou "desvio" funcional destas células ocorrem (ou se deseja que ocorram, como num transplante, por exemplo). Na verdade, muitos dos mecanismos responsáveis por este desvio parecem ter origem no próprio microambiente tumoral, que é rico em citocinas e outros mediadores capazes de impedir a maturação de DCs, como a interleucina (IL)-10, a IL-6, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF) (GABRILOVICH et al, 1996; MENETRIER-CAUX et al, 1998; SHURIN et al., 2002). Não só citocinas, mas também, as células ali presentes como, por exemplo, os mastócitos, são capazes de modificar a função de DCs, que após contato com estas células, passam a expressar indoleamina 2,3-dioxygenase (IDO) e, então, tornam-se capazes de induzir linfócitos T reguladores (Treg) (RODRIGUEZ et al, 2016). Pode-se dizer então que, a interação com tais DCs leva as células infiltrantes do tumor a apresentarem características capazes de inibir ainda mais a maturação deste tipo celular (BAUER et al., 2014; BIERIE; MOSES, 2010) como em

um mecanismo de feedback positivo que, no caso da resposta anti-tumoral, é deletério ao paciente.

É intrigante que as alterações funcionais de DCs em pacientes com câncer não são exclusivas das células presentes no microambiente tumoral, sendo descritas também em DCs circulantes (DELLA BELLA et al., 2003; MAXEWLL; LÓPEZ, 2005; MCCARTER et al., 2007; PINZON-CHARRY). Ainda mais, até mesmo DCs diferenciadas *in vitro*, a partir de monócitos de pacientes portadores de neoplasias (mo-DCs), apresentam desvios funcionais (DOS SANTOS, 2010; CLAVIJO-SALOMON et al., 2015; RAMOS et al., 2012). Estas células, quando avaliadas funcionalmente, estimulam preferencialmente linfócitos Tregs, capazes de suprimir efetivamente a resposta de outros tipos linfocitários (RAMOS et al., 2012), sugerindo fortemente que a indução deste padrão de resposta possa contribuir para o escape tumoral à resposta imune efetora. Há, ainda, estudos do nosso grupo indicando que o desvio das mo-DCs de pacientes portadores de câncer é reversível. Em um paciente com carcinoma de células renais cromófobo, a função das DCs também se mostrou diminuída, porém, houve recuperação desta após a retirada do tumor (CLAVIJO-SALOMON et al., 2015).

Em outros estudos de nosso laboratório com mo-DCs geradas *in vitro* a partir de células de pacientes com Leucemia Linfóide Crônica (LLC), obtiveram-se células que, mesmo quando estimuladas a maturarem, apresentaram fenótipo alterado, expressando níveis de HLA-DR, CD80, CD86 e CD83 equivalentes ao de DCs imaturas, e mostraram-se incapazes de produzir citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, TNF-α e IL-6 (TONIOLO et al., 2016). Nesse mesmo estudo, encontraram-se evidências de que esta deficiência de maturação das DCs dos pacientes pode ocorrer devido à baixa expressão (ao menos ao nível de mRNA), de diversos dos receptores para citocinas e para padrões moleculares envolvidos no reconhecimento das alterações homeostáticas teciduais que são desencadeantes do processo de maturação (TONIOLO, 2014).

Apesar da grande quantidade de estudos na área, ainda não estão claros os mecanismos moleculares exatos envolvidos na diferenciação e maturação das DCs. O que se sabe é que esses processos são coordenados por diferentes citocinas e fatores de crescimento que se ligam aos seus respectivos receptores nas DCs, e então, se associam a quinases, pertencentes à família Janus quinase (JAKs) (DARNELL, 1998; HEINRICH et al., 2003). A partir da ligação das citocinas aos seus

receptores, as JAKs são ativadas, levando à fosforilação dos resíduos de tirosina dos mesmos. Estes resíduos se tornam alvos para a ligação de moléculas transdutoras de sinais, as STATs ("Transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição" — do inglês *Signal Transducers and Activators of Transcription*), que são, então, fosforiladas e translocadas para o núcleo, onde se ligam às regiões promotoras de seus genes alvos e iniciam sua transcrição (DARNELL, 1998; VILLARINO; KANNO; O'SHEA, 2017).

As vias das STATs, por sua vez, são reguladas por proteínas intracelulares supressoras da sinalização de citocinas, as SOCS (do inglês *Supressor of Cytokine Signaling*), que, muito provavelmente portanto, devem também estar envolvidas na diferenciação e função das DCs (DIMITRIOU et al., 2008; HU et al., 2009; JACKSON et al., 2004) . Nesse sentido, sabe-se que a sinalização desencadeada pelo receptor de IL-4, uma das citocinas essenciais usadas na indução da diferenciação *in vitro* de monócitos em DCs (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994), ocorre via STAT-6 (STOLFI et al., 2011) que, por sua vez, é inibida por SOCS-5 (SEKI et al., 2002) – figura 2.

Vale notar que no estudo realizado por nosso grupo com monócitos de pacientes com LLC, mostrou-se que, após estimulação com IL-4, os níveis de STAT-6 fosforilada eram inferiores aos encontrados nas células de doadores saudáveis, enquanto que os níveis de SOCS-5 mostraram-se elevados nas células destes pacientes (TONIOLO et al., 2016). Concordando com tais achados, foi observado, também por nosso grupo, um aumento a nível de RNA da SOCS-5 em células de pacientes com câncer de mama (TONIOLO, dados não publicados). Diante disto, pode-se sugerir que os desvios de diferenciação e maturação dos monócitos de pacientes com câncer podem depender, ao menos em parte, exatamente destas alterações.

Em face destes dados, mostrando, por um lado, o papel central das DCs na indução de respostas imunes "efetoras", e de outro, o comprometimento funcional destas células no câncer, torna-se claro porque a possibilidade de geração de DCs *in vitro*, deu novo ímpeto à imunoterapia do câncer. Protocolos de imunização contra o câncer utilizando DCs foram rapidamente desenhados e testados (NESTLE et al., 1998), assim que se pôde gerar este tipo celular em quantidades suficientes para uso clínico (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994). Na verdade, os protocolos utilizados nestas abordagens são muito variados (DAVIS et al., 2006; DU et al.,

2006; GARCIA-MARQUEZ et al., 2012; KYTE; GAUDERNACK, 2006; LINDER; SCHIRRMACHER, 2002; PRINS et al., 2013; SUN; WANG; ZHANG, 2006; WAECKERLE-MEN; GANDER; GROETTRUP, 2005), mas a maioria se baseia na geração de células a partir dos monócitos dos próprios pacientes. Como discutido anteriormente, estas células dão origem a DCs que nem sempre são capazes de ativar efetivamente a resposta de LT, o que, sem dúvida, pode comprometer a eficácia terapêutica dessas estratégias. Para contornar este problema, outros protocolos utilizam monócitos provenientes de doadores saudáveis, e, para a imunização dos pacientes, usam-se células híbridas geradas pela fusão das DCs com células tumorais dos pacientes (TREFZER et al, 2005). Esta abordagem tem sido explorada em nosso laboratório (BARBUTO, 2004), gerando resultados promissores (DALL'OGLIO; SROUGI; BARBUTO, 2003), porém ainda aquém do desejado (ANTUNES et al, 2006).

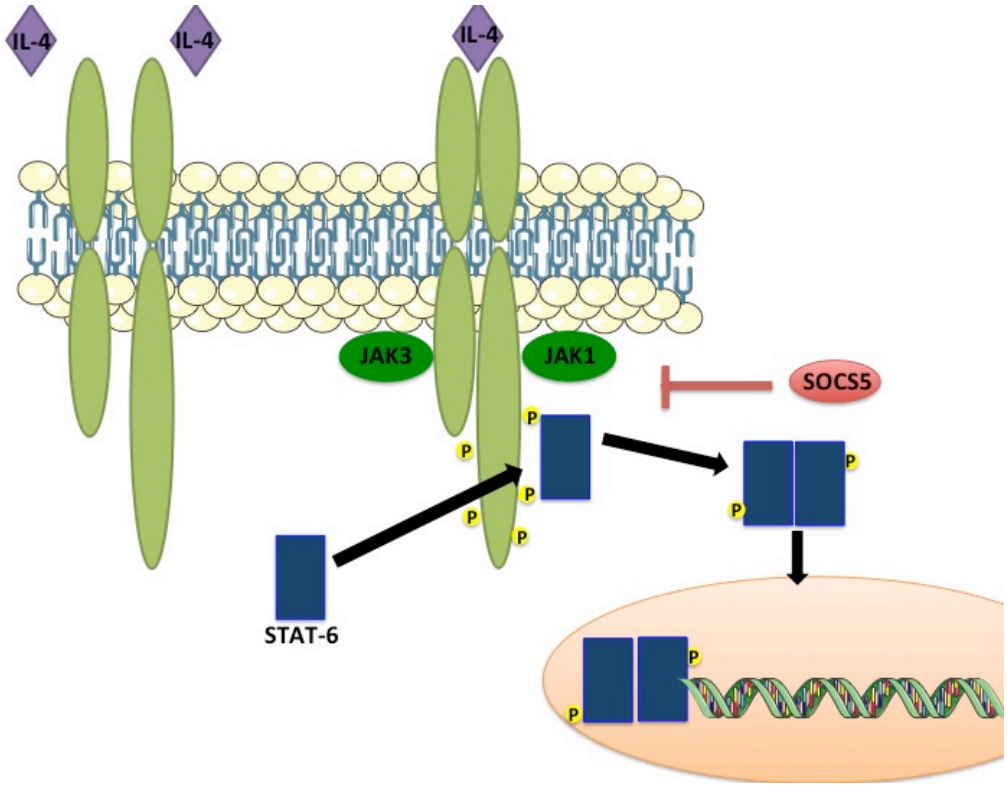


Figura 2 - Esquema de sinalização da via IL-4/STAT-6/SOCS-5. Após o reconhecimento da citocina IL-4 pelo seu receptor, a função da tirosina-quinase das JAKs é ativada. Estas, se auto-fosforilam e fosforilam os resíduos de tirosina no domínio intracelular do receptor. As STATs são recrutadas para o receptor e fosforiladas pelas JAKs. Uma vez fosforiladas, as STATs dimerizam-se e são recrutadas para o núcleo onde se ligam à região promotora de seus genes alvo para iniciar a transcrição gênica.

Visando aprimorar tal estratégia, e considerando dados da literatura que indicam que o hormônio Melatonina (N-acetyl-5 methoxytryptamine - MLT) é capaz de estimular a resposta imune (MAESTRONI; CONTI, 1990), foi testado em nosso

laboratório o uso da MLT em adição às citocinas comumente utilizadas (GM-CSF e IL-4) para a diferenciação *in vitro* de mo-DCs (GONZALEZ, 2014). A MLT é um hormônio produzido majoritariamente pela glândula pineal, sendo responsável por controlar variações rítimicas circadianas das funções biológicas do organismo, além de ter ação antioxidante e de participar de outros circuitos dos sistemas endócrino e reprodutor (CARDINALI; PÉVET, 1998; JAMES et al., 1987; SHOEMAN; BOTHA, 1995). Sua síntese é controlada por proteínas codificadas pelos chamados "clock genes", genes que apresentam expressão rítmica e que são encontrados em quase todas as células nucleadas do corpo humano, regulando praticamente todos os processos biológicos e suas funções de maneira tempo-dependente na manutenção do ritmo circadiano. No sistema imune a expressão destes genes ja foi relatada em células NK (ARJONA; SARKAR, 2005), macrófagos (CURTIS et al., 2015; HAYASHI; SHIMBA; TEZUKA, 2007; KELLER et al., 2009;) e LT (DU et al., 2005;).

Mais especificamente, já foi demonstrado que a MLT, além de participar do controle do ritmo circadiano, tem efeitos significativos no sistema imune, podendo ser sintetizada por células na medula óssea, por linfócitos e por plaquetas (ANYAEGBU et al., 2014; CARRILLO-VICO et al., 2004; CARRILLO-VICO et al., 2005). Ainda nesse sentido, dentre outros efeitos, este hormônio demonstrou ser capaz de provocar aumento da resposta humoral em ratos imunodeprimidos (CAROLEO; DORIA; NISTICO, 1994), de impedir a adesão leucocitária ao endotélio (LOTUFO et al., 2001) e de causar aumento da apresentação de antígenos a LT por macrófagos (PIOLI et al., 1993). Em seres humanos, a MLT mostrou diversos efeitos imunomoduladores, como, por exemplo, a estimulação *in vitro* de secreção de IL-1 e da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em monócitos (MORREY et al., 1994), a diminuição de apoptose induzida por Ca^{++} em neutrófilos (CHEN et al., 2005b) e o aumento do número e da função de células NK circulantes, devido, em parte, ao aumento da produção de citocinas por linfócitos *T helper* (CURRIER; SUN; MILLER, 2000).

Quando estudada no contexto de neoplasias, a MLT se mostrou oncostática para uma grande variedade de células tumorais, incluindo as de mama (HILL; BLASK, 1988; SRINIVASAN et al., 2008), de ovário (PETRANKA et al., 1999), de endométrio (KANISHI et al., 2000), de pele (HU; ROBERTS, 1997) e de próstata (GILAD et al., 1999). Além disso, em modelos experimentais de neoplasias, também se sugere que

a MLT possa ter efeito anti-tumoral (KARBOWNIK; LEWINSKI; REITER, 2001; TAMARKIN et al., 1981).

Todavia, devido a seu pleiotropismo, os mecanismos pelos quais este hormônio age são ainda insuficientemente definidos. Na verdade, principalmente ao se considerar esta característica pleiotrópica, pode-se traçar um certo paralelo entre a MLT e as DCs, de modo a considerar este tipo celular como uma das vias de ação da MLT no sistema imune.

De fato, quando a MLT foi utilizada em nosso laboratório durante a geração *in vitro* de mo-DCs, provenientes de indivíduos saudáveis, este hormônio mostrou-se imunoestimulador por gerar modificações fenotípicas na membrana destas células. Mais especificamente, a MLT provocou o aumento da expressão das moléculas HLA-DR, CD11c, CD80, CD86, CD83 e CD40 nas mo-DCs (GONZALEZ, 2014) e, consequentemente, o aumento da capacidade das DCs de estimular a resposta proliferativa de linfócitos. A modificação do fenótipo das mo-DCs expostas à MLT pode estar relacionada a outro dado apresentado neste mesmo estudo: o aumento dos níveis de expressão do receptor para IL-4 (CD124) em monócitos tratados com o hormônio. Uma vez que a IL-4 é considerada essencial para permitir a completa maturação das DCs geradas *in vitro* (LUTZ et al., 2002), o aumento de seus receptores provavelmente está envolvido nos mecanismos relacionados à imunoestimulação pela MLT. Inclusive, a expressão elevada do receptor de IL-4 em monócitos mostrou-se suficiente para que concentrações bastante diminuídas desta citocina ainda fossem capazes de induzir a diferenciação de mo-DCs passíveis de uma completa maturação (GONZALEZ, 2014).

Por fim, considerando-se que:

- Em indivíduos saudáveis, a MLT pareceu ser capaz de aumentar a sensibilidade de monócitos à IL-4, que tem sua sinalização baseada na via STAT-6;
- Em, ao menos um grupo de pacientes com câncer, foi observado um desvio funcional de mo-DCs, que esteve associado a alterações no eixo IL-4/STAT-6/SOCS-5;

Seria possível propor que o mecanismo pelo qual a MLT torna as mo-DCs mais eficientes em sua capacidade de linfoestimulação dependa de sua interferência no eixo STAT-6/SOCS-5.

Assim, o presente trabalho procurou investigar se a MLT provoca modificações na sinalização via STAT-6/SOCS-5 em monócitos de indivíduos saudáveis e se, em

pacientes com câncer, este hormônio poderia corrigir as eventuais alterações dessa via - “recuperando”, assim, a capacidade das mo-DCs de estimular a resposta linfocitária e, portanto, conduzindo eventualmente a respostas imunes “efetoras” contra as células neoplásicas.

2 OBJETIVOS

Investigar os mecanismos através dos quais a melatonina aumenta a sensibilidade de monócitos à IL-4 durante sua diferenciação *in vitro* em células dendríticas. Pretende-se avaliar a participação de STAT-6 e de SOCS-5 no fenômeno, comparando seus papéis em células provenientes de doadores saudáveis e de pacientes com câncer de mama.

Especificamente pretende-se:

- Avaliar os níveis de STAT-6 e SOCS-5 em monócitos, tratados com MLT e/ou estimulados com IL-4, obtidos de doadores saudáveis e de pacientes com câncer de mama;

- Avaliar os efeitos da MLT sobre a diferenciação de mo-DCs a partir de monócitos de pacientes com câncer e doadores saudáveis, determinando:

a) fenótipo de membrana das células ao longo da diferenciação;

b) produção de citocinas pelas células ao longo da diferenciação;

c) função alo-estimuladora das mo-DCs geradas (medida pela indução da proliferação de diferentes subpopulações de LT e pelo padrão de citocinas produzido por essas células).

3 METODOLOGIA

3.1 Casuística

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Parecer 1.905.144) e pela Comissão de Ética do Centro de Referência da Saúde da Mulher - Hospital Pérola Byington (999.985).

Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram coletadas amostras de sangue de voluntárias sem sintomas clínicos de doença, consideradas saudáveis, e pacientes, recrutadas no Hospital Pérola Byington. Todas as pacientes recrutadas foram diagnosticadas com base em análise anatomopatológica como portadoras de carcinoma ductal invasivo e as amostras de sangue coletadas minutos antes da cirurgia para retirada da mama acometida pelo tumor. As características clínicas das pacientes são apresentadas na Tabela 1. A média de idade das pacientes foi de 54 anos sendo a maioria (64%) portadoras de tumores classificados, com base em análise imunohistoquímica, como luminal B.

Tabela 1 – Características das doadoras incluídas no estudo.

Características	Saudáveis	Pacientes	p-value
N	39	37	
Idade (anos)	30 ± 9	54 ± 10	<0,0001
Horário da coleta de sangue (h:m)	9:53 ±1:10	8:42 ± 0:47	<0,0001
Classificação Molecular (%)			
Luminal A	-	5,5	-
Luminal B	-	64	-
Her-2	-	19	-
Triplo negativo	-	5,5	-
Não informado	-	6	-
C-ERB2 (%)			
0	-	61	-
1+	-	8	-
2+	-	11	-
3+	-	17	-
Não informado	-	3	-
ER+ (%)	-	80	-
PR+ (%)	-	63	-
Ki-67 (%)			
>14	-	89	-
<14	-	5,5	-
Não informado	-	5,5	-

Grau histológico – Nottingham (%)			
1	-	11	-
2	-	61	-
3	-	22	-
Não informado	-	6	-
Grau nuclear			
1	-	0	-
2	-	58	-
3	-	39	-
Não informado	-	3	-
Infiltrado linfocitário (%)			
Ausente	-	17	-
Escasso	-	25	-
Escasso e focal	-	20	-
Moderado	-	8	-
Não informado	-	30	-
Embolisação neoplásica angiolinfática (%)			
Ausente	-	61	-
Presente	-	3	-
Não informado	-	36	-
Reação desmoplásica do estroma (%)			
Ausente	-	3	-
Discreta	-	25	-
Moderada	-	33	-
Intensa	-	3	-
Não informado	-	36	-
Infiltração perineural (%)			
Ausente	-	58	-
Presente	-	11	-
Não informado	-	31	-
Necrose (%)			
Ausente	-	3	-
Presença	-	8	-
Comedonecrose	-	6	-
Não informado	-	83	-

Resultados expressos como média ± DP e porcentagem (%). Estatística feita com teste de Mann-Whitney.

3.2 Obtenção das amostras de sangue periférico, isolamento de monócitos e diferenciação em mo-DCs

As amostras de sangue periférico das doadoras saudáveis e das pacientes foram obtidas por venóclise utilizando tubos a vácuo contendo anticoagulante heparina. Para purificação das células mononucleares (PBMC), as amostras foram colocadas em tubos plásticos cônicos de 50 mL, sobre 12 mL de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) e centrifugados a 900 x g, por 30 minutos, a 18 ºC. A nuvem de células mononucleares formada foi retirada, colocada em um novo tubo contendo RPMI-

1640 e centrifugada a 1200 rotações por minuto (rpm), por 10 minutos, a 18 °C. Essas células foram então lavadas, com RPMI-1640, por mais 2 vezes, a 1100 rpm e 900 rpm, respectivamente, também por 10 minutos. O botão de células formado foi coletado e as células quantificadas. A concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer e a viabilidade determinada pela exclusão do Azul de Trypan.

As PBMCs obtidas foram cultivadas em placa de 24 poços em uma concentração de 2 x 10^6 PBMCs por poço. As células foram mantidas em estufa a 37 °C com saturação de 5% de CO_2, por um período de 2 horas, para aderência ao plástico em meio RPMI-1640 com adição ou não de melatonina (MLT, Sigma-Aldrich St. Louis, Mo, USA) 2,5 nM (salvo quando especificado).

Após as 2 horas, as células não-aderentes (CNAs) foram removidas e as aderentes foram mantidas, por 5 dias, em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (R-10), acrescido de 50 ng/mL de interleucina-4 (IL-4, PeproTech - EUA) e 50 ng/mL de fator de crescimento estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, PeproTech), para diferenciação das mo-DCs.

Para maturação das mo-DCs, no quinto dia de cultura, as células foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS - Sigma) na concentração de 100 ng/mL por 24 horas. Ao término das culturas, para auxiliar no descolamento das mo-DCs da placa, as células foram incubadas com uma solução de PBS + EDTA 2mM, por 15 minutos em estufa. Após esse procedimento, as células foram recuperadas com PBS, quantificadas, e sua viabilidade avaliada. Os sobrenadantes das culturas foram coletados para estudo da produção de citocinas e mantidos a -80 ºC para análises posteriores.

Para os ensaios de Western Blotting e Phosflow, a fim de isolar os monócitos a partir das PBMCs, realizou-se seleção negativa com a utilização de microesferas magnéticas (*Monocyte Isolation Kit II,* Miltenyi Biotec). As células foram ressuspendidas em 30 µL de solução tampão gelada (*autoMACS Rising Solution* - Miltenyi Biotec - com PBS-BSA 0,5%) para cada 10^7 células. Adicionou-se, então, 10 µL para cada 10^7 células de *FcR blocking reagent* e de *Biotin AbHcocktail*, a fim de bloquear a ligação dos anticorpos aos receptores Fc presentes nas células e de marcar as células ($CD3^+$, $CD7^+$, $CD16^+$, $CD19^+$, $CD56^+$, $CD123^+$ e Glicoforina A+) com anticorpos conjugados à biotina, respectivamente. Essa mistura foi

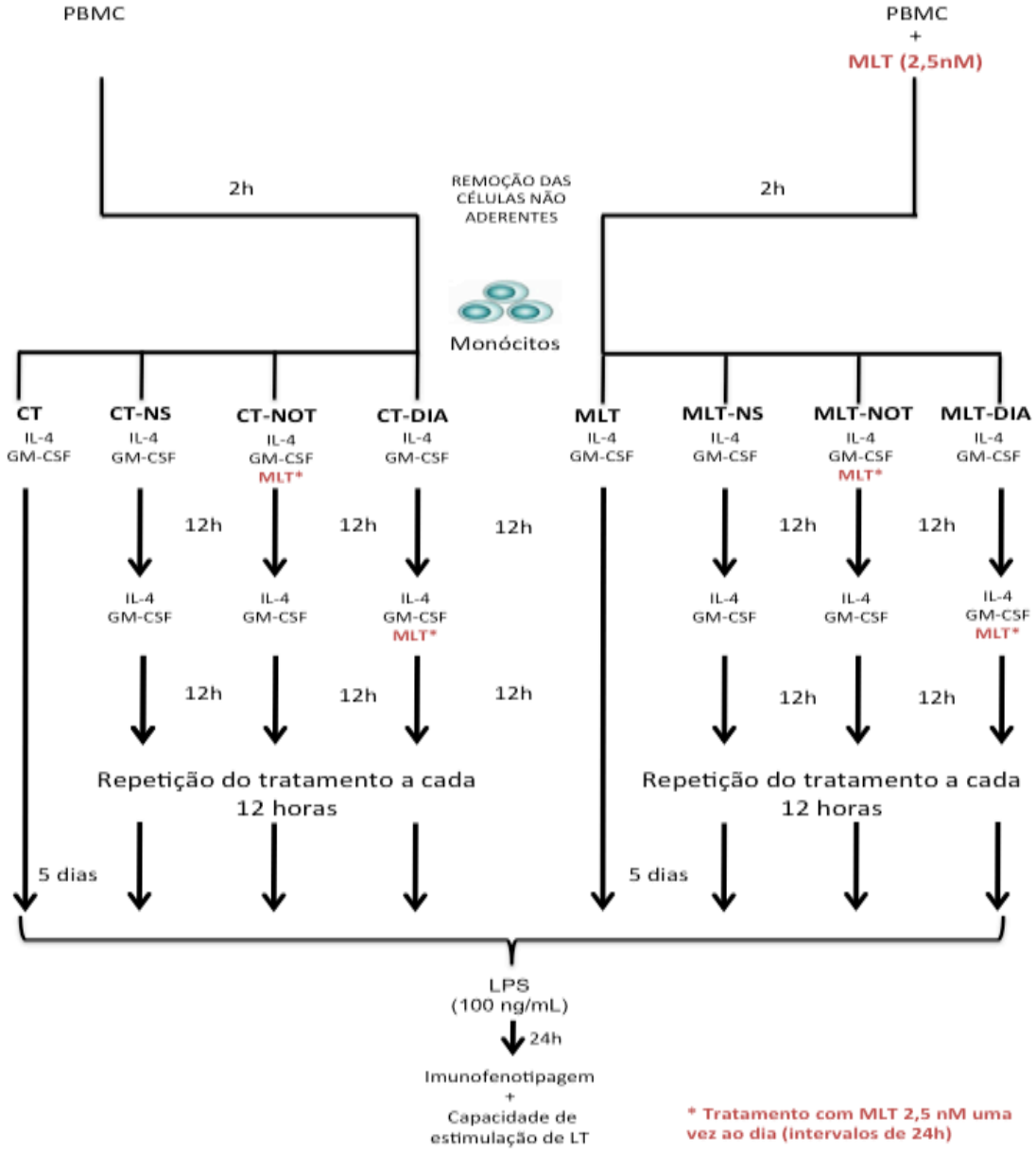
homogeneizada e incubada por 15 minutos a 4 °C. Decorrido este tempo, foram adicionados 30 µL da solução tampão, seguido da adição de 20 µL de *antiBiotin microbeads*, ou seja, anticorpos anti-Biotina conjugados a microesferas magnéticas. Essa mistura foi homogeneizada e incubada por 20 minutos a 4 °C. Após a incubação, foi feita uma lavagem das células por meio de centrifugação a 300 x g a 4 °C por 10 minutos, a fim de retirar anticorpos que não se ligaram. O sobrenadante foi completamente aspirado com pipeta e as células ressuspendidas em 500 µL da solução tampão. A coluna de separação magnética (LS, Miltenyi Biotec) foi acoplada ao separador magnético (*MACSHsorting,* Miltenyi Biotec) e preparada com a adição da solução tampão (3 mL). Após o tampão ter penetrado a coluna, as células foram adicionadas. A coluna foi lavada três vezes, utilizando-se, cada vez, 3 mL de tampão. O efluente, composto da fração monocítica (não marcada), foi centrifugado a 300 x g a 18 °C por 10 minutos, e o pellet obtido ressuspendido em meio RPMI-1640. As células foram quantificadas e avaliadas quanto à viabilidade, e, então, divididas em tubos de 1,5 mL na concentração de 2 x 10^5 em 200 µL de meio e tratadas, ou não, com MLT 2,5 nM ou IL-4 50 ng/mL por 15 minutos, na estufa.

3.3 Sincronização das culturas ao longo da diferenciação em mo-DCs

Sendo a MLT um hormônio envolvido no controle do ritmo circadiano e capaz de regular os chamados “clock genes”, optou-se por usá-la ao longo da diferenciação dos monócitos em mo-DC já que, não havendo flutuações circadianas quando *in vitro,* há grande probabilidade destes genes perderem sua expressão regular ao longo da diferenciação.

Para tanto, os monócitos obtido de doadoras saudáveis (de acordo com o item 3.2), foram tratados com MLT 2,5 nM a cada 12 horas, ao longo de todo o processo de diferenciação em mo-DC de duas maneiras: uma em que a MLT foi adicionada imediatamente após o período de aderência das células à placa, mimetizando uma sincronização que se inicia no período noturno (NOT), ou seja, as primeiras 12 horas de diferenciação ocorrem na presença da MLT. Outra, na qual a MLT foi adicionada apenas após um período incial de 12 horas sem o hormônio, com presença apenas de IL-4 e GM-CSF (50 ng/mL), mimetizando uma sincronização que se inicia durante o dia (DIA), período em que não há presença deste hormônio no organismo – esquema 1.

No quinto dia, todos os grupos foram ativados com LPS 100 ng/mL e, no sexto dia, após 24 horas de ativação, as células foram recuperadas e submetidas à citometria de fluxo para análise da expressão dos marcadores CD11c, CD1a, HLA-DR, CD80, CD86, CD83, CCR-7 e Live/Dead (de acordo com o item 3.4). A capacidade de estimulação alogeneica de LT também foi analisada (de acordo com o item 3.6).



Esquema 1 - Metodologia utilizada para sincronização das DC. CT refere-se ao grupo controle e MLT ao grupo tratado por 2 horas. NS corresponde ao grupo não sincronizado, no qual houve apenas reposição de citocinas ao longo da diferenciação, mas não de MLT. DIA corresponde ao grupo que teve sincronização diurna, ou seja, não houve contato com a MLT nas primeiras 12 horas de diferenciação, e NOT, ao grupo equivalente à sincronização noturna. Todos os grupos receberam LPS no quinto dia de cultura e, no sexto, prosseguiu-se com a imunofenotipagem e o ensaio de proliferação alogeneica.

3.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

As células provenientes de amostras de sangue de doadoras saudáveis e de pacientes foram imunofetipadas ao longo da diferenciação das mo-DCs. Ou seja, o fenótipo das células foi analisado nos dias 0 (PBMC), 1 (após 24 horas da adição das citocinas), 5 e 6 das culturas, por meio da técnica de citometria de fluxo.

Após contagem em câmara de Neubauer, alíquotas de 1 x 10^6 células, no caso do dia 0, ou de 1 a 2 x 10^5 no caso dos dias 1, 5 e 6, foram colocadas em tubos de 5 mL e lavadas com 500 µL de PBS por centrifugação a 300 x g por 10 minutos, a 18 ºC. Ao sedimento obtido, foram adicionados os anticorpos específicos, em concentrações previamente determinadas por experimentos de titulação, para os marcadores de interesse: CD11c, HLA-DR, CD14, CD124 (receptor de IL-4), CD80, CD86, CD83 e LIVE/DEAD (reagente de viabilidade – Invitrogen), salvo quando especificado. As células foram então incubadas por 20 min a 4 ºC. Após esse período, foram acrescentados 500 µL de PBS e o material foi lavado mais uma vez nas condições acima citadas. As células marcadas foram ressuspendidas em 200 µL de paraformaldeído 1% para a fixação das mesmas e a aquisição foi realizada, dentro de no máximo 5 dias, em citômetro de fluxo (FACSCanto II; Becton & Dickinson), sendo os dados obtidos analisados no *software* FlowJo versão vX.0.7 para Macintosh.

3.5 *Western blotting*

A avaliação dos níveis de expressão de proteínas STAT-6 e SOCS-5 foi realizada por *Western blotting*. Para tanto, os monócitos foram isolados negativamente por coluna magnética e tratados de acordo com o item 3.2 e, após período de incubação, 5 x 10^5 células foram centrifugadas por 2 vezes a 2400 rpm por 5 minutos a 4 °C sendo a primeira centrifugação objetivando a retirada do meio de cultura e a segunda a fim de lavar as células com 200 µL de PBS + coquetel de inibidores (fluoreto de fenilmetilsulfonil - PMSF – Sigma-Aldrich, fluoreto de sódio - NaF, ortovanadato - OT e *protease inhibitor cocktail* - PIC – Sigma-Aldrich). Posteriormente, as células foram ressuspendidas em 50 uL de tampão de amostra 1 X (contendo Tris HCl 1M, SDS 10%, glicerol e β-mercaptoetanol) com 10% de inibidores de protease e fosfatase (2% de cada um dos inibidores citados acima) e desnaturadas a 95 ^oC por 5 minutos. Em seguida, foi acrescentado às amostras 2%

de azul de bromofenol e os lisados celulares foram congelados a -20 ^{o}C até o momento da separação por eletroforese. Para tanto, 20 µL dos lisados celulares foram fracionados por eletroforese (*TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solutions* 12%, Biorad, CA, EUA) a 70V por 20 minutos e, na sequência, a 110V por mais 50 minutos e, então, transferidos para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com o kit *Trans-Blot Turbo Transfer System RTA Transfer Kits Quick Start Guide* (Biorad, CA, EUA) e *Trans-Blot® Turbo™ Transfer System* (Biorad, CA, EUA). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas durante 1 hora em BSA 5%. Após esse período, as membranas foram lavadas em tampão de Tris-salino (TTBS: 100 mM Tris-HCl, 137 mM de NaCl e 0,05% de Tween-20, pH 7,8) por 3 vezes de 10 minutos e incubadas overnight com os anticorpos primários (1:1000 STAT-6 Cell Signalling, MA, EUA e 1:700 SOCS-5 Abcam) a 4 ºC. Então, as membranas foram novamente lavadas com TTBS por 3 vezes de 10 minutos e incubadas por 1 hora com anticorpo secundário conjugado a horseradish peroxidase (1:1000 Rabbit e 1:3000 Mouse, Cell Signalling).

A detecção foi realizada com "enhanced chemiluminescence" (ECL) caseiro, (1 mL solução A: 9 mL H_2O, 1 mL Tris/HCl 1 M pH 8,5; 22 µL p-Coumaric acid 90 mM, 50 µL Luminol 250 mM e 3 µL solução B: 450 µL H_2O e 50 µL H_2O_2 30%). A densidade de pixels das bandas foi quantificada por meio do software ImageJ (NIH, USA) a fim de comparar as alterações de expressão proteica. O cálculo da expressão das proteínas foi feito através da normalização de cada banda pela banda referente a β-actina correspondente.

3.6 Avaliação da fosforilação de STAT-6 por citometria de fluxo (*Phosflow*)

Para avaliar o estado de ativação da via IL-4/STAT-6 nas células, 2 x 10^5 monócitos foram separados e tratados de acordo com o item 3.2. Após os 15 minutos de incubação, as células foram centrifugadas a 2400 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o pellet formado ressuspendido em 200 µL de PBS + coquetel de inibidores (fluoreto de fenilmetilsulfonil - PMSF – Sigma-Aldrich, fluoreto de sódio - NaF, ortovanadato - OT e *protease inhibitor cocktail* - PIC – Sigma-Aldrich), transferidos para tubos de 5 mL e submetidos a uma outra centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos. Após marcação das moléculas extracelulares, de acordo com o 3.4, as células foram fixadas com 500 µL de tampão

de fixação (Fixation/Permeabilization Concentrate + Fixation/Permeabilization Diluent, na proporção 1:3, e-bioscience) e incubadas por 30 minutos na geladeira.

Então, as células foram lavadas com 500 µL de Flow Cytometer Stain Buffer (e-bioscience) e centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos, a 4 ºC. O sobrenadante foi então desprezado, o pellet ressuspendido em 1 mL de metanol absoluto gelado e incubado na geladeiro por 30 minutos. Foi realizada mais uma lavagem com 500 µL de Flow Cytometer Stain Buffer (e-bioscience) e centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos, a 4 ºC e com as células já permeabilizadas foi feito o bloqueio de possíveis ligações inespecíficas por meio de adição de 10 µL de *FcR blocking reagent* (Miltenyi Biotec) e 10 µL de soro fetal bovino 2% (em PBS). As células foram incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após bloqueio, foi adicionado 5 µL por amostra do anticorpo Phospho-STAT6 (Tyr641) PE (e-Bioscience) ou 2,5 µL do Isotipo IgG2a (e-Bioscience) e as células foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz. Após marcação intracelular, foi feita uma última lavagem, a fim de retirar possível excesso de anticorpo, com 200 µL de Flow Cytometer Stain Buffer (e-Bioscience). Por fim, as amostras foram ressuspendidas em 200 µL do mesmo tampão e adquiridas em citômetro de fluxo (FACSCanto II; Becton & Dickinson) no mesmo dia. Os dados obtidos foram analisados no *software* FlowJo versão vX.0.7 para Macintosh (TreeStar).

3.7 Ensaio de indução de proliferação celular alogeneica

LT $CD3^+$ foram separados por seleção negativa por meio de esferas magnéticas (Miltenyi Biotec Inc.) a partir do sangue periférico de doadores saudáveis. Após seleção, os linfócitos foram marcados com 2,5 µM de carboxifluoresceína succinimidil ester (*CFSE)* por meio de incubação a 37 ^oC, protegidos da luz, por 10 min. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e os LT (em concentração de 1 x 10^5/poço - placas de 96 poços com fundo em U) foram co-cultivados com mo-DCs alogênicas com 6 dias de cultura, em razão de 30 LT : 1 DC, por um período de 5 dias a 37 ºC com atmosfera contendo 5% de CO_2. Ao final do período de co-cultura, os linfócitos foram marcados com anticorpos fluorescentes anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 e LIVE/DEAD. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 ^oC para posterior avaliação da produção de citocinas. As células

foram adquiridas em citômetro de Fluxo (FACSCanto II; Becton & Dickinson) e a análise foi realizada utilizando-se o *software* FlowJo vX.0.7.

3.8 Detecção de IL-2 secretada em co-culturas de LT e mo-DC por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA)

Para detecção da citocina IL-2 nos sobrenadantes das culturas de LT co-cultivadas com as mo-DCs foi utilizado o kit DuoSets para citocinas (R&D Systems, EUA). Placas de 96 poços Maxisorp (Nunc) foram sensibilizadas com 100 µL/poço do anticorpo de captura (4 µg/mL), diluído em PBS (pH 7,2) e mantidas a temperatura ambiente overnight. Após 3 lavagens com 400 µL/poço de tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20, pH 7,2), as placas foram bloqueadas com 300µL/poço de tampão de bloqueio (PBS contendo 1% BSA, 5% de Sacarose e 0,05% de azida sódica) por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, após 3 lavagens, as amostras e a curva-padrão foram incubadas por um período de 2 horas em temperatura ambiente. As amostras para dosagem foram diluídas 1:2 em tampão de diluição (tampão Tris contendo 0,1% de BSA, 0,05% de Tween 20, pH 7,2; Tris – hidroximetil aminometano). O período de incubação das amostras e da curva padrão foi de 2 horas à temperatura ambiente. Após três lavagens, foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo de detecção (175 ng/mL diluído em tampão de diluição) seguido de nova incubação por 2 horas à temperatura ambiente.

Novamente a placa foi lavada 3 vezes e 50 µL/poço de estreptoavidina diluída em tampão de diluição foram adicionados. Após 20 minutos de incubação no escuro à temperatura ambiente, foram feitas 3 novas lavagens e 50 µL/poço de substrato (peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina, R & D System, EUA) foram adicionados, com incubação de 20 minutos, no escuro, à temperatura ambiente. Por fim, 50 µL/poço de H_2SO_4 (2N) foram adicionados para interromper a reação e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm. O cálculo das concentrações foi feito com auxílio do programa Softmax Pro (Molecular Devices, EUA), por meio da equação de regressão linear com base na curva padrão.

3.9 Detecção da produção de citocinas por citometria de fluxo (*Cytometric Bead Array* – CBA)

As dosagens de citocinas no sobrenadante das culturas de mo-DC e das co-culturas com LT foram realizadas pelo método *Cytometric Bead Array*, utilizando-se os *kits BD CBA Inflammatory* (IL-8, IL-1-β, IL-6, TNF-α, IL-12p70 e IL-10) (BD

Bioscience) e *BD CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine kit* (IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ, TNF-α e IL-17A), respectivamente. Em resumo, os sobrenadantes e os padrões de citocinas do *kit* foram incubados com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após incubação de 3 horas no escuro à temperatura ambiente, foi acrescido 1 mL da solução de lavagem e centrifugado por 5 minutos a 200 x g. O sobrenadante foi desprezado e ressupendido em 300 mL da solução de lavagem. A detecção das citocinas foi realizada em citômetro de fluxo (FACSCanto II). Os resultados foram analisados com auxílio do software BD FCAP Array v3.0.1.

3.10 Análise da qualidade do sono

Tendo em vista que a MLT é sintetizada no organismo no período noturno (no escuro) e que, a exposição prévia das células a este hormônio pode ser bastante variável entre as doadoras, foi aplicada a versão brasileira validada – anexo J - (BERTOLAZI et al., 2011) do questionário "Sleep Quality Assessment (PSQI)" (BUYSSE et al., 1988) no momento da coleta do sangue, com o objetivo de, eventualmente poder correlacionar a qualidade do sono das doadoras envolvidas no estudo com o fenótipo de DCs obtidas e/ou sua resposta à MLT. O PSQI avalia de forma subjetiva a qualidade do sono dos sujeitos da pesquisa durante o mês anterior à aplicação do questionário, podendo distinguir um "sono de qualidade" e um "sono de baixa qualidade". Este é um questionário auto-aplicável que contém 19 questões de auto-avaliação e 5 questões avaliadas por um cônjuge ou companheiro de quarto. Os 19 itens de auto-avaliação são combinados para formarem sete componentes de pontuação, cada um com variação de 0 a 3 pontos. Em todos os casos, a pontuação "0" indica "nenhuma dificuldade", enquanto a pontuação "3" indica "grave dificuldade". As pontuações de cada um dos 7 componentes são somadas para produzir uma pontuação geral que varia de 0 a 21 pontos (sendo "0 pontos" indício de sono de qualidade, sem dificuldade, e "21 pontos" indício de graves dificuldades em todas as áreas relacionadas ao sono). As pontuações foram atribuídas de acordo com as instruções no anexo K.

3.11 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (DP), exceto quando especificado de outra maneira. As variáveis foram avaliadas para verificação de distribuição normal de acordo com o teste de Shapiro Wilk W. As variáveis que falharam no teste de normalidade, foram logaritimizadas e testadas novamente. Em caso de nova falha no teste de normalidade, foi utilizada a alternativa não paramétrica para a análise. As diferenças entre os grupos foram analisadas por teste de ANOVA de dois fatores para medidas repetidas com pós teste de Bonferroni; caso houvesse apenas dois grupos, foram utilizados os testes T de Student ou de Mann-Whitney (análise não paramétrica). As análises estatísticas foram realizadas com os softwares GraphPad Prism v.6 e o JMP (SAS Institute, Cary, NC) .

4 RESULTADOS

4.1 Ensaio de indução de proliferação com LT e mo-DC de doadoras saudáveis

Com base em dados da literatura que apontam que a MLT pode agir em linfócitos no sentido de aumentar sua capacidade proliferativa (KÜHLWEIN; IRWIN, 2001) e após terem sido definidos os padrões a serem utilizados para a diferenciação de mo-DCs, bem como a concentração de MLT a ser utilizada nesses ensaios (anexo A), optou-se por explorar inicialmente o efeito desse hormônio na proliferação de linfócitos alogeneicos a partir da co-cultura com mo-DC. Para tanto, as mo-DCs foram geradas a partir de monócitos tratados (DC + MLT) ou não com MLT (2,5 nM por 2 horas) e co-cultivadas durante 5 dias com LT, também tratados (LT + MLT) - ou não (LT) - da mesma maneira, e marcados com CFSE (item 3.6). É possível verificar a estratégia de análise utilizada para avaliação da proliferação destas células no anexo C enquanto que os resultados deste ensaio encontram-se na figura 3.

Avaliando-se os LT totais (células $CD3^+$), foi possível verificar que as DC + MLT (figura 3A) não geraram alteração na capacidade proliferativa dos LT – verificada pelo índice e pela porcentagem de proliferação. No entanto, quando as DC + MLT foram co-cultivadas com LT + MLT, foi possível observar uma tendência ao aumento da proliferação destes LT. É válido destacar que, embora haja certa tendência de efeito da MLT sobre a proliferação de LT $CD3^+$, o mais sobressalente é o seu efeito em LT $CD8^+$ (figura 5B). Efeito este que, curiosamente, desaparece quando os LT + MLT são co-cultivados com as DC + MLT. Além da avaliação da proliferação, a expressão da molecula $CD25^+$ foi também analisada (anexo E) e, coerentemente, obedeceu a mesma tendência mostrada na figura 3.

O sobrenadante proveniente destas co-culturas foi coletado para análise da concentração da citocina IL-2 por ELISA (item 3.7). Observando a figura 4 é possível especular que a co-cultura de LT (tratados ou não) com DC + MLT aparenta apresentar menor concentração de IL-2 - o que é coerente com os resultados observados na figura 3.

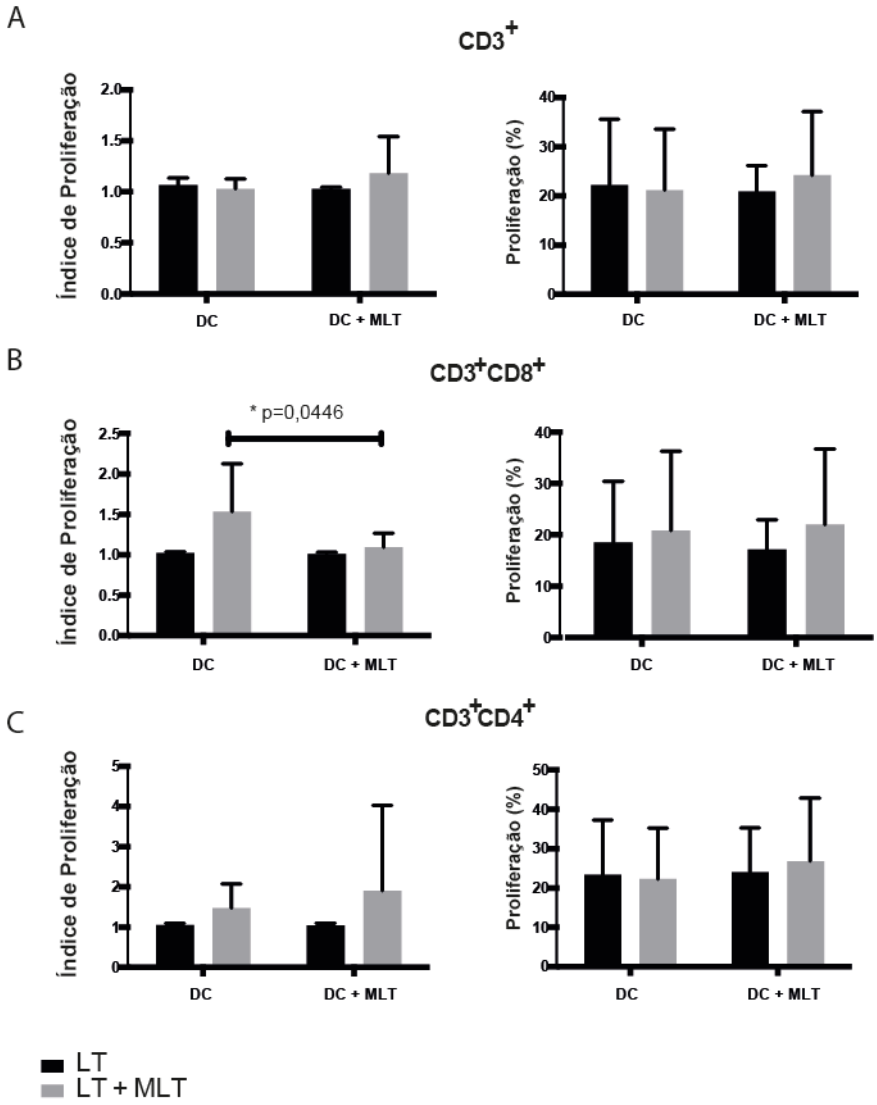


Figura 3 - Efeito da MLT na proliferação de LT e na capacidade linfoestimuladora de DC. Linfócitos $CD3^+$ alogeneicos às DCs foram previamente corados com CFSE e tratados, ou não, com MLT (2,5 nM – 2 horas). Os LT foram então incubados com DCs geradas a partir de monócitos também tratados, ou não, com MLT (2,5 nM - 2 horas), na proporção de 1 DC : 30 LT. Representação gráfica da proliferação de LT $CD3^+$ (A), $CD3^+CD8^+$ (B) e $CD3^+CD4^+$ (C), de 6 experimentos independentes. Esquerda: gráficos do índice de proliferação, calculado pela divisão da MFI do CFSE do grupo não estimulado, pela MFI do CFSE dos demais grupos. Direta: gráficos da porcentagem de proliferação calculada a partir da diluição do CFSE. Barras pretas = LT; Barras cinzas = LT + MLT. Estatística feita com ANOVA de dois fatores, sem medidas repetidas, com pós teste de Bonferroni.

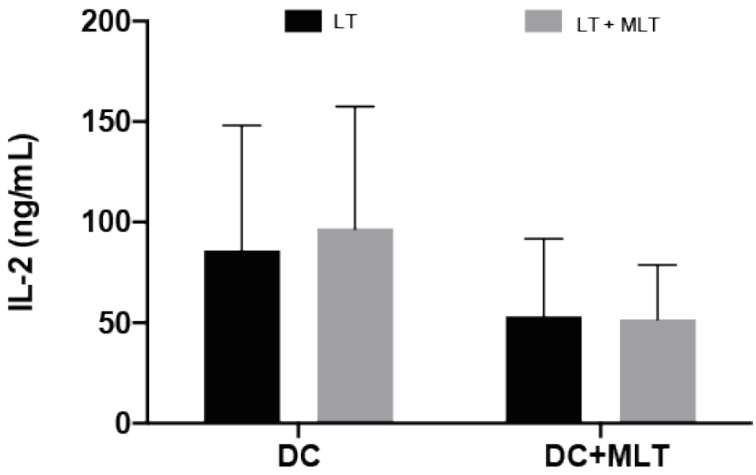


Figura 4 - Presença de IL-2 no sobrenadante de co-culturas de LT e mo-DCs. LT $CD3^+$ alogeneicos às DCs foram previamente tratados, ou não, por 2 horas com MLT 2,5 nM. Os LT foram incubados com DCs geradas por 6 dias a partir de monócitos também tratados, ou não, com MLT 2,5 nM (2 horas), na proporção de 1 DC : 30 LT. Após 5 dias de co-cultura, os sobrenadantes foram coletados, congelados e, posteriormente, foi realizada a dosagem de IL-2 por ELISA. O gráfico mostra a média das concentrações de IL-2 presente nos sobrenadantes. n=2.

4.2 Sincronização das culturas de mo-DC por meio da adição de MLT

Sabe-se que a MLT tem papel essencial na regulação dos chamados "clock genes", genes que regulam um amplo espectro de programas genéticos responsáveis por controlar diversos processos fisiológicos em diferentes células (ABRUZZI et al., 2011; BOOTHROYD et al., 2007). Sabe-se também que, *in vivo*, as células do organismo são sincronizadas pelo Sistema Nervoso Central (SCN) mas, *in vitro*, por não sofrerem os sinais de regulação que ocorrem no organismo, o processo de ciclagem circadiana destas células se torna descoordenado, como observado por Keller et al. (2009) e Nagoshi et al. (2004), tanto em linhagens celulares quanto em cultura de células primárias. Nesse sentido, optou-se pela adição da MLT como um regulador do ritmo circadiano das culturas. Ou seja, além do tratamento de PBMC por 2 horas com o hormônio, como já utilizado nos experimentos anteriores, adicionou-se MLT nas culturas de maneira a mimetizar os períodos de "claro e escuro" (item 3.3) ao longo de 24 horas - nos quais há produção ou degradação da MLT, respectivamente.

A figura 5 mostra os efeitos da sincronização das culturas de mo-DCs sobre o fenótipo destas células ao final do sexto dia. A estratégia de análise utilizada para avaliação do fenótipo destas células está apresentada no anexo C. É possível observar que a manipulação das culturas a cada 12 horas gera uma redução da MFI

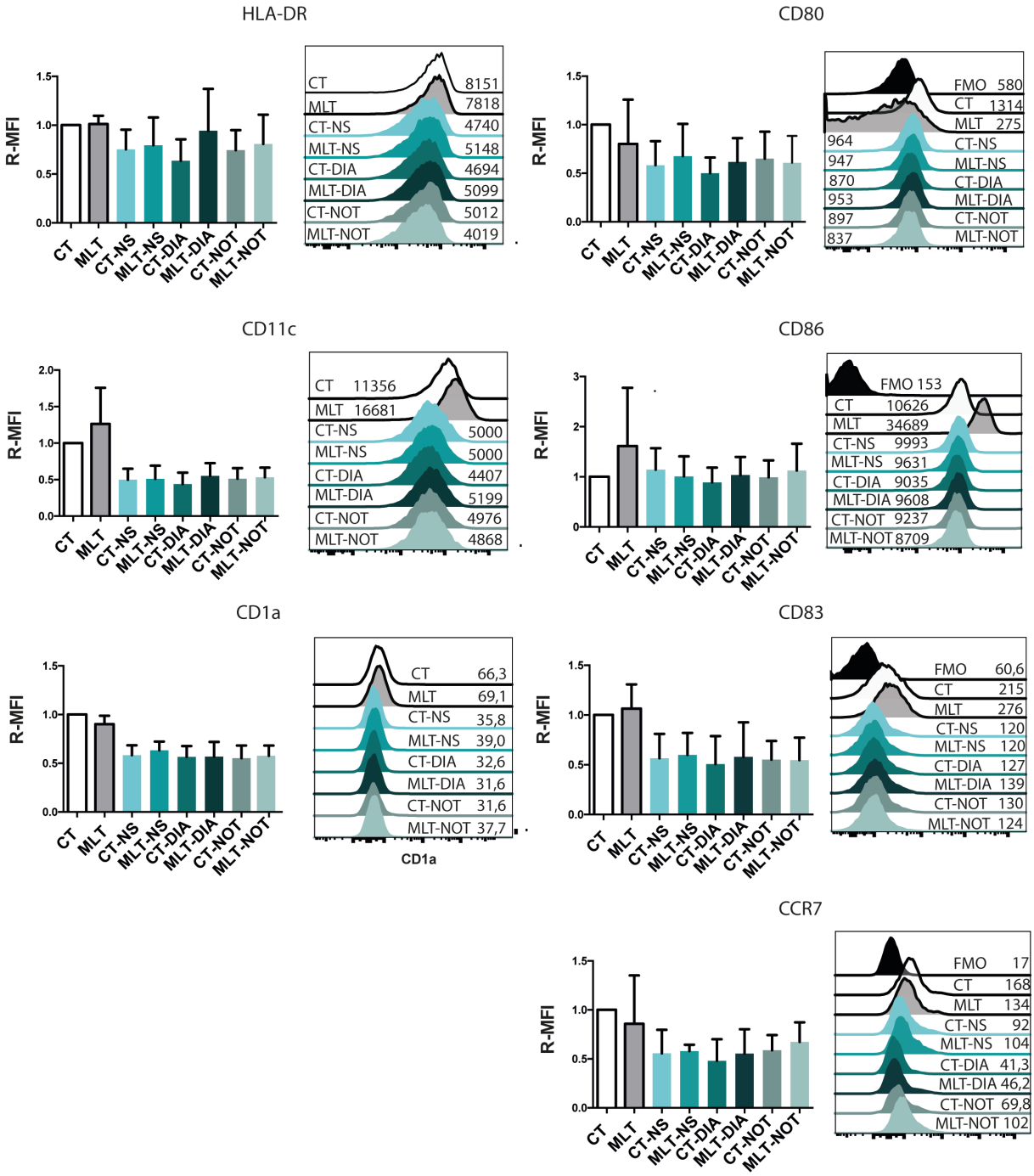


Figura 5 - Fenótipo das mo-DCs sincronizadas. PBMCs de doadores saudáveis foram plaqueadas por 2 horas na presença ou não de MLT (2,5 nM) e, junto à adição de citocinas capazes de induzir a diferenciação em DCs, as células aderentes foram submetidas à sincronização dos "clock genes" pela adição de MLT (2,5 nM). Os gráficos mostram a MFI relativa ao grupo controle (CT) de cada um dos marcadores analisados. Os histogramas representam a MFI de cada marcador, sendo "DIA" grupo sincronizado de maneira a mimetizar a sincronização diurna e "NOT", a sincronização noturna. NS refere-se ao grupo não sincronizado. Histogramas representativos de um experimento independente. Gráficos referentes aos valores de 4 experimentos independentes.

em praticamente todos os marcadores analisados. Também pode-se notar que, apesar de gerar aparente aumento na MFI da molécula HLA-DR, a sincronização, principalmente nos grupos que sofreram sincronização diurna (DIA), prejudica ainda mais a expressão de moléculas coestimuladoras CD80, CD86 e CD83 e também de

CCR7, quando comparadas aos grupos não sincronizados. Ainda em relação aos grupos “DIA”, vale destacar que o grupo MLT-DIA apresenta uma queda menor na expressão das moléculas coestimulatórias, se comparado ao grupo CT-DIA.

É importante salientar que a variação entre experimentos foi grande, tendo sido observados efeitos muito diferentes gerados pela MLT - o que fica evidente na figura 6, a qual apresenta a expressão da molécula CD80 nos diferentes grupos, em dois experimentos independentes.

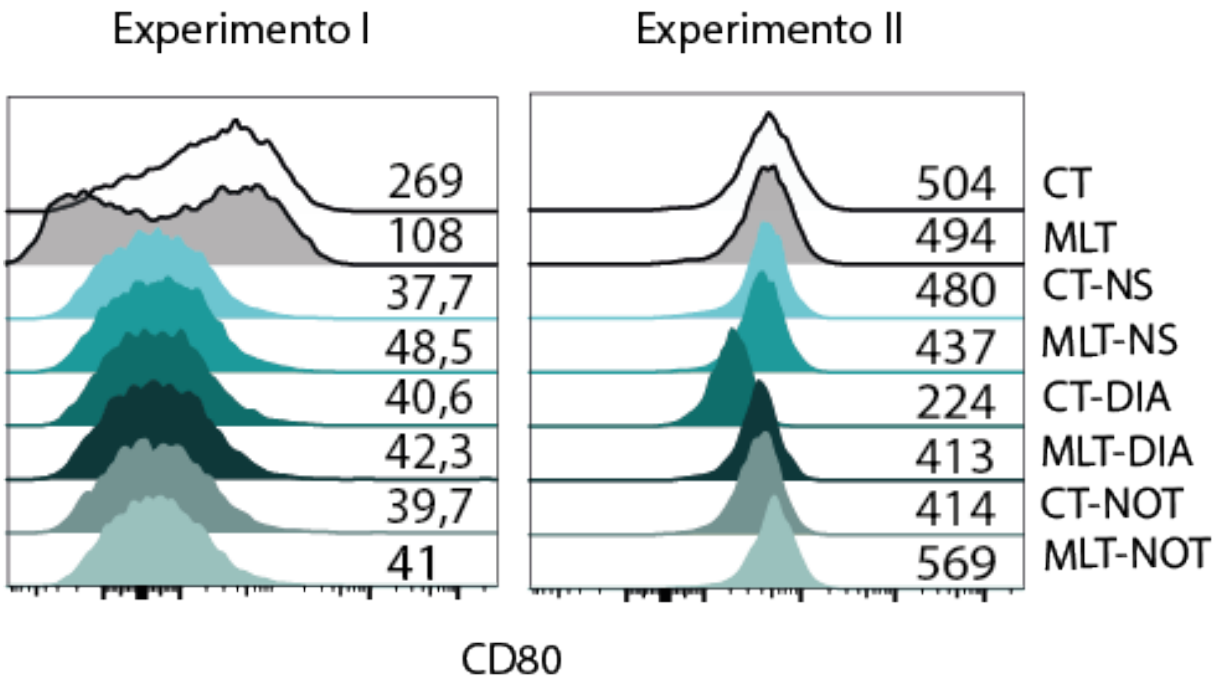


Figura 6 - Comparação da MFI de CD80 em dois experimentos independentes. Histogramas representativos da MFI de CD80 em dois experimentos independentes utilizando células de dois doadores diferentes. CT = grupo controle; DIA = grupo com sincronização diurna; NOT = grupo com sincronização noturna e NS = grupo não sincronizado.

Quanto à capacidade linfoestimuladora das mo-DCs geradas, na figura 7 é possível observar uma pequena tendência ao aumento da proliferação de LT $CD4^+$ bem como da expressão de $CD25^+$ nestas células nos grupos estimulados com MLT-NS, CT-DIA, CD-NOT e MLT-NOT, quando comparados com o controle (CT-NS). Ao contrário, os grupos estimulados com MLT e MLT-DIA tendem a apresentar redução de ambos os parâmetros. A figura 32 (anexo F) apresenta dot-plots representativos dos efeitos da sincronização na capacidade linfoestimuladora das DCs

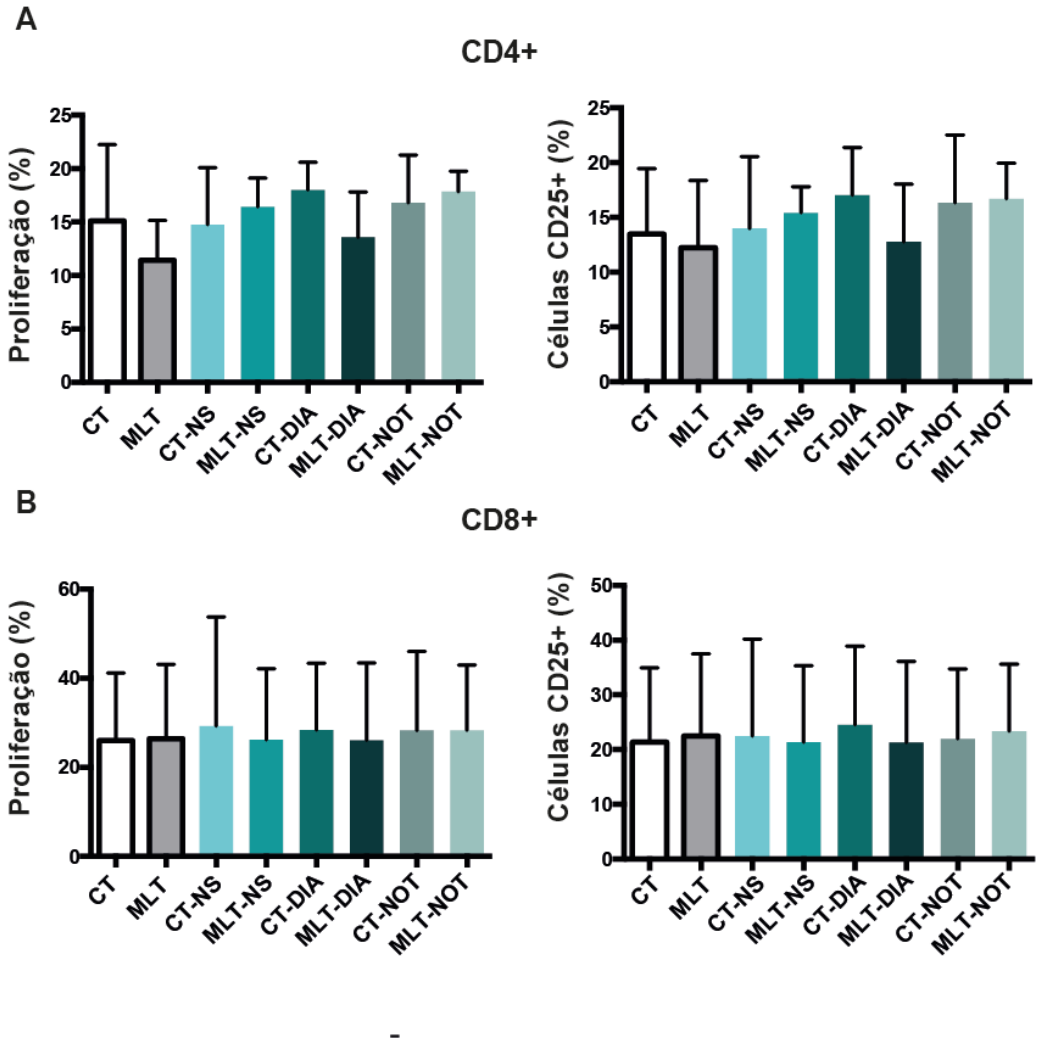


Figura 7 - Capacidade de linfoestimulação de mo-DCs submetidas à sincronização. Mo-DCs submetidas à sincronização por meio da adição de MLT ao longo de sua diferenciaçãp. Ao final de 6 dias de cultura, as células foram co-cultivadas por 5 dias com LT, corados com CFSE, na proporção de 1 DC : 30 LT. Gráficos mostrando a porcentagem de proliferação, calculada pela diluição do CFSE, e a porcentagem de células $CD25^+$, nas subpopulações $CD4^+$ (A) e $CD8^+$ (B). CT = grupo controle; DIA = grupo com sincronização diurna; NOT = grupo com sincronização noturna e NS = grupo não sincronizado. n=3

4.3 Avaliação da qualidade do sono de doadoras saudáveis e de pacientes

Sabe-se que a MLT é um hormônio produzido pela glândula pineal nos períodos escuros (revisto por ARENDT; SKENE, 2005) e que, a depender da qualidade do sono (principalmente da exposição à luminosidade durante a noite), os níveis de produção deste hormônio podem ser prejudicados (NAVARA; NELSON, 2007; REDBURN; MITCHELL, 1989). Nesse sentido, apesar de não terem sidoencontradas diferenças nos experimentos de sincronização das culturas de mo-DCs, acreditou-se que possíveis variações nos resultados obtidos ao longo do estudo – geradas pelo tratamento com a MLT, ou não -, poderiam ser devido a

diferenças na qualidade do sono, observada nas culturas de mo-DCs. Assim, optou-se por avaliar de maneira subjetiva a qualidade do sono destes indivíduos. Foi aplicado, então, tanto às doadoras saudáveis quanto às pacientes, no momento da

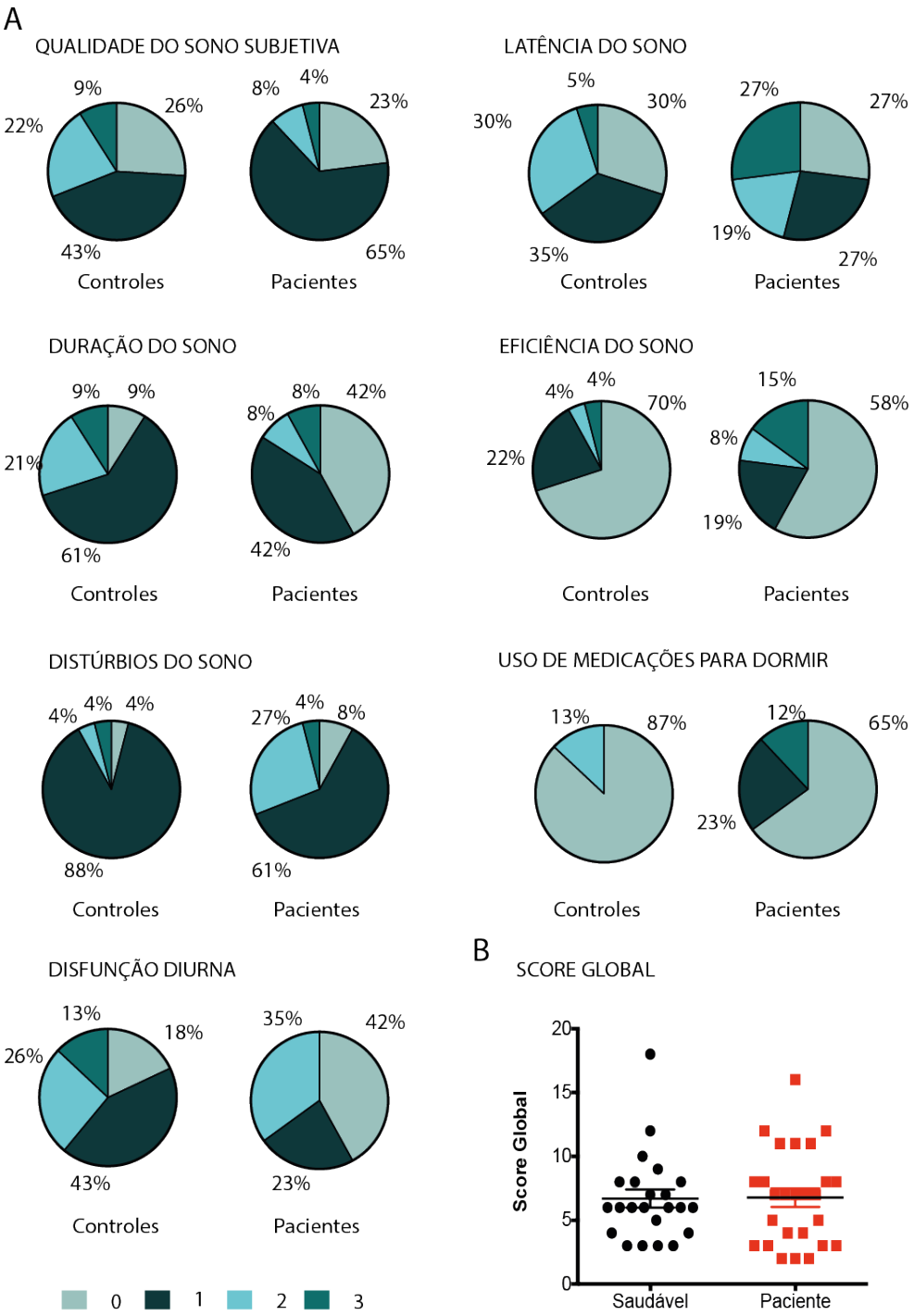


Figura 8 - Avaliação subjetiva da qualidade do sono de doadoras saudáveis e pacientes. No momento da coleta do sangue foi aplicado às doadoras um questionário (PSQI) referente à qualidade de sono das mesmas no mês anterior ao momento de sua aplicação. (A) Os gráficos correspondem à porcentagem de pessoas que obtiveram cada uma das pontuações (de 0 a 3, sendo 0 indicativo de "nenhuma dificuldade" e 3 de "grave dificuldade") nos diversos componentes. (B) Gráfico referente ao score global obtido por meio da soma dos sete componentes. n=23/26

coleta do sangue, o questionário "Sleep Quality Assessment (PSQI)". Este questionário fornece informações sobre a qualidade do sono no mês anterior à sua aplicação através de pontuações ("scores") que variam de 0 a 3 para 7 componentes diferentes: componente 1 = qualidade do sono subjetiva, componente 2 = latência do sono, componente 3 = duração do sono, componente 4 = eficiência do sono, componente 5 = distúrbios do sono, componente 6 = uso de medicações para dormir e componente 7 = disfunção diurna. Além disso, o questionário fornece também um *score* geral (soma dos 7 *scores)* que indica um sono de qualidade ou graves dificuldades em todas as áreas relacionadas ao sono.

A figura 8 mostra a porcentagem de indivíduos que apresentaram cada um dos *scores* (de 0 a 3) para os 7 componentes avaliados pelo PSQI. Vale ressaltar que, uma vez aplicado o questionário, nenhuma pergunta deixou de ser respondida. Pode-se notar que, em relação à latência do sono, as pacientes parecem ter maiores problemas já que, 27% apresentou *score* 3, indicando "grande dificuldade" para o componente avaliado, enquanto que apenas 5% das doadoras saudáveis obtiveram tal pontuação. É também interessante o fato de que, em relação à duração do sono, apenas 9% das doadoras saudáveis apresentaram *score* 0, indicativo de "nenhuma dificuldade", ou seja, a maioria das doadoras saudáveis relataram apresentar pelo menos alguma dificuldade em relação à duração do sono (61% para *score* 1 e 21% para 2). Já as pacientes parecem conseguir dormir por um período mais longo, tendo relatado, em sua maioria, pouca ou nenhuma dificuldade em relação a este componente (42% para *score* 0 e 42% para 1). Aparentemente, tanto pacientes quanto saudáveis apresentam problemas consideráveis em relação ao componente "distúrbios do sono" – (88% para saudáveis e 61% para pacientes).

Apesar das aparentes diferenças entre pacientes e controles quanto aos diversos componentes avaliados, quando analisada a qualidade do sono de maneira geral ("*score* global"), através da soma das pontuações dos sete componentes, não houve diferença entre os dois grupos (figura 8 B).

4.4 Comparação da diferenciação de mo-DC de doadoras saudáveis e de pacientes

4.4.1 Diferenciação de mo-DCs

Tendo definido todos os padrões a serem utilizados para diferenciação de DCs a partir de monócitos tratados com MLT, deu-se início à coleta de amostras de sangue periférico de pacientes. As amostras de sangue foram processadas, sempre que possível, pareadas a amostras de doadoras saudáveis. As DCs foram diferenciadas de acordo com a metodologia descrita no item 3.2 e a imunofenotipagem das células ao longo da diferenciação foi executada de acordo com o item 3.4.

Como esperado, ao longo da diferenciação, as células perderam a expressão de CD14 (45,1 ± 38,5% vs 8,7±16,6%, quando comparados os dias 0 e 6; e 33,3 ± 14,8% vs 8,7 ± 16,6%, quando comparados os dias 1 e 6; $p<0,0001$), molécula caracteristicamente expressa em monócitos. Ao mesmo tempo, estas células tiveram a expressão de CD11c (141,1 ± 64,2 vs 851,6 ± 528,5, comparados os dias 0 e 6; 317,1 ± 277,9 vs 851,6 ± 528,5 comparados os dias 1 e 6; $p<0,0001$) e HLA-DR (795,4 ± 352,4 vs 5867,7 ± 2641,8 quando comparados os dias 0 e 6; 1556,4 ± 1023,8 vs 5867,7 ± 2641,8 quando comparados os dias 1 e 6; $p<0,0001$) aumentadas (figura 9).

A figura 10 mostra a expressão das moléculas coestimuladoras ao longo da diferenciação. Observa-se aumento significativo na porcentagem das moléculas CD80 (2,76 ± 2,42 vs 12,57 ± 17,99; $p<0,0001$), CD86 (2,76 ± 1,06 vs 30,1 ± 18,37; $p<0,0001$) e CD83 (1,27 ± 0,44 vs 7,93 ± 3,242; $p<0,001$) principalmente entre os dias 0 e 6. Vale destacar também a diferença de expressão das moléculas CD80 (2,55 ± 1,16 vs 12,57 ± 17,99; $p<0,0001$) e CD83 (3,74 ± 2,27 vs 7,94 ± 3,24; $p< 0,001$) do dia 5, quando as células são ativadas com LPS (100 ng/mL), para o dia 6, quando apresentam um estado maduro.

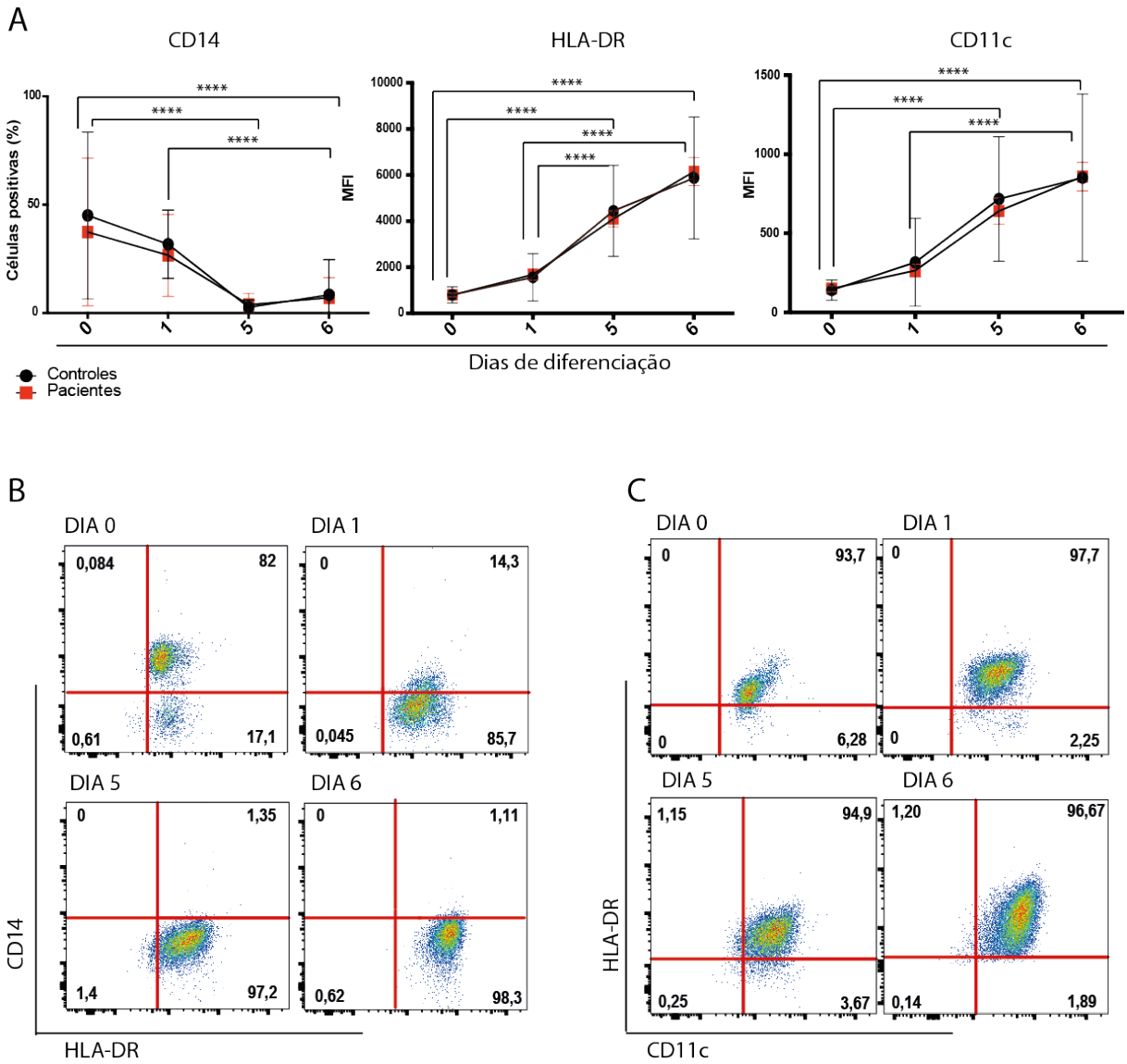


Figura 9 - Diferenciação de monócitos em DCs. PBMCs foram separadas por gradiente de densidade e plaqueadas para aderência à placa (2 horas). Então, as células não aderentes foram retiradas e às aderentes foi acrescentado IL-4 e GM-CSF (50 ng/ml). As células foram cultivadas por 6 dias. (A) Gráficos da expressão de CD14, HLA-DR e CD11c ao longo da diferenciação. Observa-se perda de CD14 e aumento da MFI de HLA-DR e CD11c no decorrer dos dias. (B e C) Figuras representativas da marcação de CD14 e HLA-DR (B) e CD11c e HLA-DR (C) nas células com 0, 1, 5 e 6 dias de diferenciação. Estatística feita por teste de ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo considerado significativo quando $p \leq 0,05$. n= 16/18 **** $p<0,0001$.

.

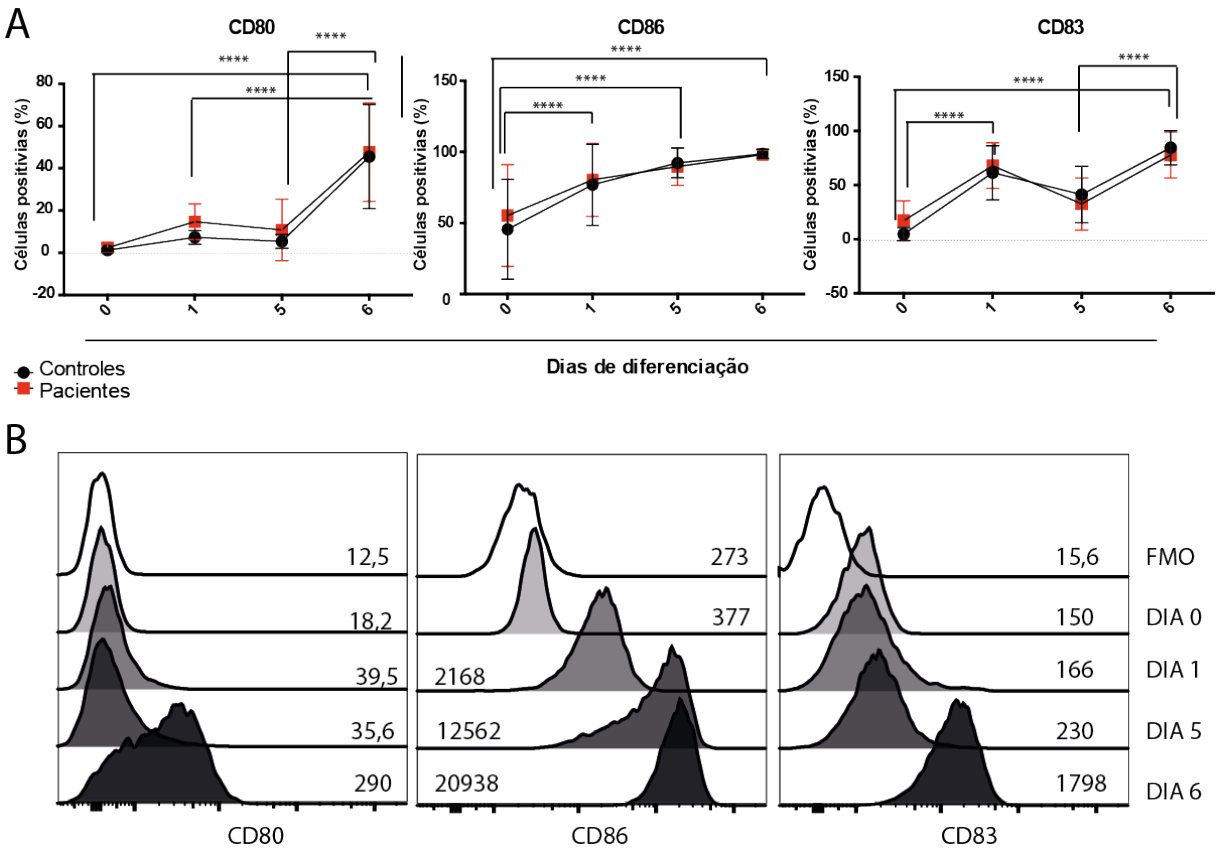


Figura 10 - Expressão de moléculas coestimuladoras ao longo da diferenciação de mo-DCs. PBMCs foram separadas por gradiente de densidade e plaqueadas para aderência (2 horas). Então, as células não aderentes foram retiradas e às aderentes foi acrescentado IL-4 e GM-CSF (50 ng/ml). Ao quinto dia, as células foram ativadas com LPS (100 ng/mL) e, após 24 horas, tiveram seu fenótipo avaliado por citometria de fluxo. (A) Gráficos da expressão de CD80, CD86 e CD83 ao longo da diferenciação de mo-DCs. Observa-se aumento na expressão de todas as moléculas entre os dias 0 e 6. (B) Histogramas representativos da MFI de CD80, CD86 e CD83 ao longo da diferenciação. Estatística feita por teste de ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo considerado significativo quando p≤0,05. n= 16/18 **** p<0,0001.

4.4.2 Caracterização do fenótipo de membrana das células de doadoras saudáveis e de pacientes ao longo da diferenciação

As mo-DCs de doadoras saudáveis e de pacientes portadoras de câncer de mama foram avaliadas, ao longo da diferenciação, quanto à expressão de algumas moléculas extracelulares. A figura 11 apresenta a porcentagem de expressão de diferentes moléculas na superfície das células do dia 0 ao dia 6 da diferenciação, bem como o efeito da MLT sobre estas células. É importante destacar que a MLT não provocou diferença na expressão de nenhuma das moléculas avaliadas. Analisando o padrão de distribuição dos gráficos, é possível sugerir que, ainda que discretas, há diferenças entre pacientes e controles. Nesse sentido, pode-se observar na figura 11 que, em relação à expressão de CD14, as doadoras saudáveis parecem apresentar uma heterogeneidade maior quando *ex vivo* (dia 0), se comparadas ao grupo de pacientes. Já quanto à molécula CD83, o que ocorre é o

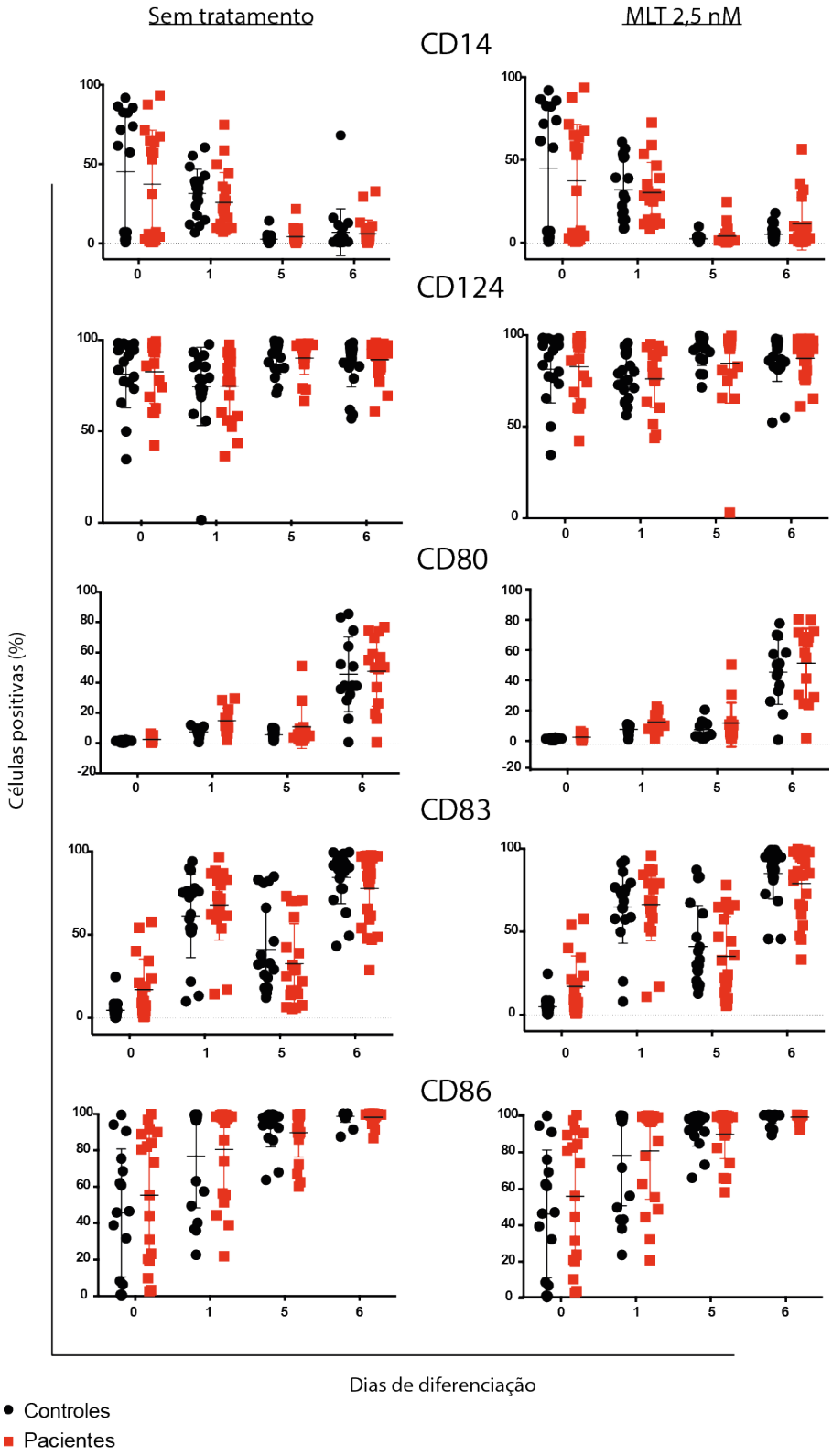


Figura 11 - Caracterização fenotípica de mo-DCs ao longo da diferenciação. Após separação a partir do sangue periférico, parte das PBMCs de doadoras saudáveis e pacientes foram marcadas com anticorpos monoclonais para análise do fenótipo dos monócitos por citometria de fluxo (dia 0). O restante foi plaqueado e tratado, ou não, com MLT (2 horas), e às células que aderiram à placa foram adicionados GM-CSF e IL-4 (50 ng/mL). As células foram estimuladas no quinto dia com LPS (100 ng/mL) por 24 horas, tendo o fenótipo avaliado nos dias 1, 5 e 6 por citometria de fluxo. Gráficos da expressão de CD14, CD124, CD80, CD83 e CD86 ao longo da diferenciação de mo-DC de pacientes e controles. n= 16/23.

contrário, sendo o grupo de pacientes, mais heterogêneo do que de controles. No entanto, no caso de CD83, o que parece ocorrer ao final da diferenciação é uma maior concentração de pacientes expressando menor porcentagem desta molécula, se comparados ao grupo controle. Além disso, ainda sobre o dia 0, parece haver um grupo de pacientes em que a expressão de CD14 é baixa, sendo estes os mesmos indivíduos que apresentam alta expressão CD83 neste mesmo momento da diferenciação.

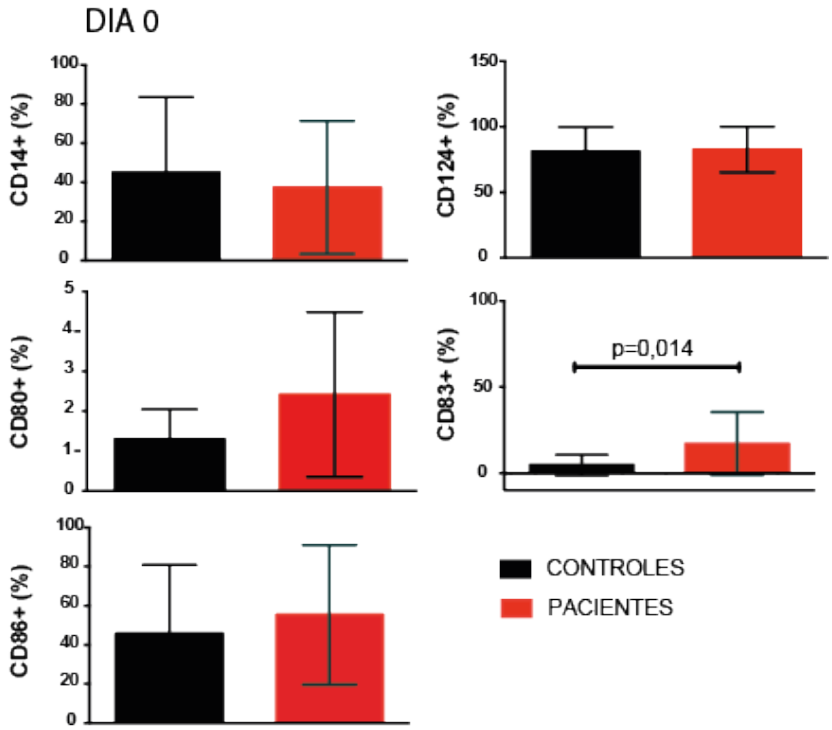


Figura 12 - Fenótipo dos monócitos, dentre as PBMCs, de controles e pacientes. PBMCs de pacientes e doadoras saudáveis foram separadas por gradiente de densidade e marcadas com anticorpos monoclonais para imunofetipagem por citometria de fluxo. Os gráficos apresentam a porcentagem de CD14, CD80, CD83 e CD86 em monócitos presentes entre as PBMCs de ambos os grupos (controles e pacientes). Estatística feita por teste T de Student não pareado, sendo considerado significativo $p \leq 0,05$. n= 16/18

Coerentemente, analisando-se a expressão de CD86, as pacientes parecem apresentar um perfil *ex vivo* mais ativado do que os controles, apresentando uma maior concentração de indivíduos expressando altos níveis desta molécula no dia 0. No entanto, ao longo da diferenciação parece ocorrer uma aproximação destes valores entre pacientes e saudáveis.

Também no dia 0, é possível encontrar uma diferença estatística na expressão da molécula CD83 (4,7 ± 6 vs 17 ± 18,3; p=0,014). O que parece ocorrer é que os monócitos circulantes, dentre as PBMCs das pacientes, apresentam maior

expressão desta molécula quando comparados com as mesmas células de indivíduos saudáveis (figura 12 e anexo G - figura 34).

É destacável também o fato de que as moléculas CD80 e CD86 apresentam uma distribuição complementar, sendo os gráficos praticamente espelhos. A figura 13, na qual a soma da porcentagem destas duas moléculas é expressa, permite uma visualização melhor deste fenômeno. Assim, parece ocorrer uma regulação recíproca entre estas duas moléculas co-estimuladoras, que não foi afetada na presença da MLT.

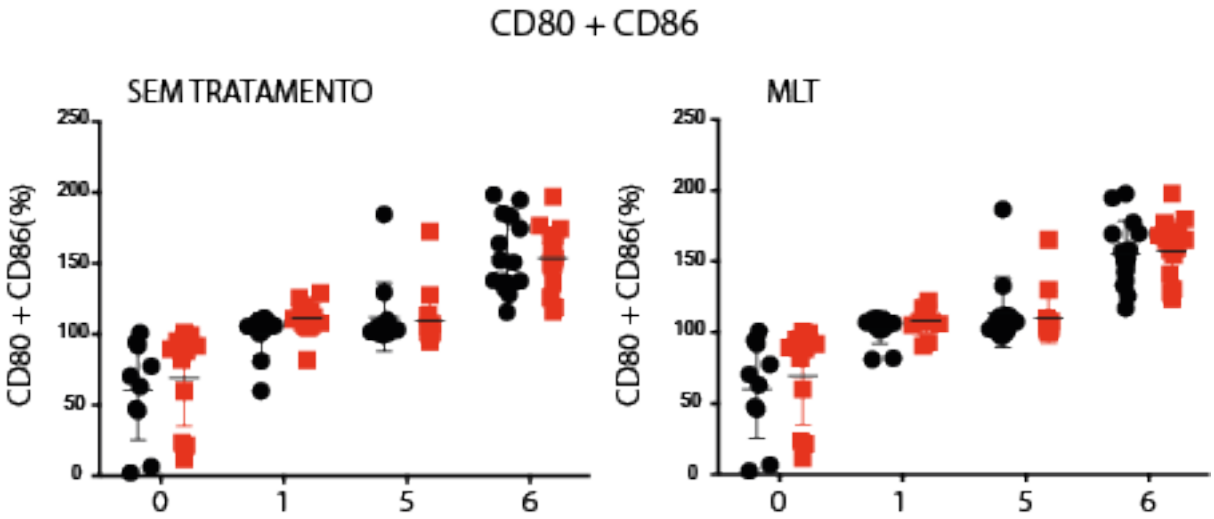


Figura 13 - Expressão das moléculas CD80 e CD86, em conjunto, ao longo da diferenciação. Os gráficos apresentam a soma das porcentagens de CD80 e CD86 de doadoras saudáveis (preto) e pacientes (vermelho) ao longo da diferenciação. n= 16/23

Observando o fenótipo das células no primeiro dia de diferenciação, vale destacar uma possível normalização na expressão de CD14, tanto em pacientes quanto controles, direcionando para a hipótese de que a exposição às citocinas (GM-CSF e IL-4) poderia normalizar os níveis de expressão desta molécula (figura 11).

Apesar de ser indiscutível que a MLT não apresentou efeitos significativos na diferenciação das mo-DCs, sob a ótica dos padrões de distribuição apresentados nos gráficos, é notável que, ainda que discretamente, a MLT parece diminuir a variação entre as pacientes quanto à expressão de algumas moléculas, em determinados momentos da diferenciação. Por exemplo, parece haver maior homogeneidade na expressão de CD14 e CD80 no primeiro dia da diferenciação, de e CD86, no dia 6, em pacientes (figura 11).

Apesar disso, a MLT não gera tendências apenas de forma a aumentar a homogeneidade das amostras. Um “efeito” que aparenta ser contrário ao citado

anteriormente, pode ser observado quanto à expressão de CD124 no dia 5 e CD83 nos dias 5 e 6, tendo a MLT aumentado levemente a variação destas moléculas entre as pacientes (padrão observado também para a MFI – anexo G, figura 33).

4.4.3 Associação do fenótipo das células de pacientes com outros parâmetros

A partir das informações obtidas pela imunofenotipagem das células das pacientes e pela aplicação do questionário PSQI, foi realizada uma série de análises incluindo outras informações, principalmente sobre o tumor, obtidas através do prontuário das pacientes. De forma a procurar relações existentes entre toda a gama de informações obtidas acerca das pacientes, o fenótipo dos monócitos (dia 0) e mo-DCs das pacientes foi analisado em conjunto com todas as informações contidas na tabela 1, bem como com todas informações advindas da aplicação do questionário. É importante esclarecer que apenas as informações que apresentaram algum tipo de relação julgada enriquecedora para o estudo, foram aqui apresentadas.

Quanto ao tipo de tumor das pacientes incluídas no estudo, apesar de todas serem portadoras de carcinoma ductal invasivo, este tipo de tumor mamário é subclassificado em subtipos, com características histopatológicas diversas e que podem, portanto, estar associadas com a variação fenotípica encontrada em monócitos e mo-DCs destas pacientes. Estes subtipos são: luminal A, luminal B, superexpressão de Her-2 e triplo negativo ou *basal-like*. Apesar do tamanho da amostra não ser suficiente para uma análise estatística acerca da relação entre a expressão de moléculas na membrana e os subtipos dos tumores, é possível buscar padrões de expressão destas moléculas. A figura 14 mostra a expressão das moléculas CD14, CD124, CD80, CD86 e CD83 em monócitos (A), logo após o isolamento das PBMCs do sangue periférico (dia 0), e em mo-DCs maduras (B) - no sexto dia de diferenciação -, por células de pacientes com os diferentes tipos de tumores. É importante salientar que não foi possível analisar a expressão das moléculas nos monócitos (dia 0) dos indivíduos que apresentavam tumores classificados como triplo negativos. Isso ocorreu pois não houve células suficientes para a realização do ensaio ao longo de toda a diferenciação, sendo possível apenas realizar a imunofenotipagem destas ao final do período. Vale ressaltar também que, não há dados quanto ao efeito da MLT no dia 0 (figura 14 A), pois as células foram fenotipadas logo após o isolamento das PBMCs, ou seja, sem que fossem plaqueadas nem recebessem o tratamento com o hormônio.

Neste tipo de análise, chama a atenção, quanto à expressão de CD14, o fato de que pacientes portadoras de tumores com superexpressão de Her-2 parecem apresentar células com menor porcentagem desta molécula (figura 14 A), com exceção de um indivíduo, quando comparadas aos outros tipos de tumores. Ao final da diferenciação (Figura 14 B), quando não houve contato com a MLT, todos os representantes deste tipo de tumor apresentaram baixa expressão de CD14, porém, quando tratadas com MLT, as células que expressavam altos níveis desta molécula pareceram não ser capazes de se diferenciar completamente em DCs, mantendo sua expressão elevada.

O tratamento com a MLT parece também apresentar efeitos – ainda muito discretos – sobre as células das pacientes portadoras de tumores triplo negativos. Na figura 14 B é possível observar que, apesar da amostra ser muito pequena, a expressão de CD124 e CD83 parece ser alterada, ao menos ao final da diferenciação, por ação do hormônio. O que parece ocorrer é uma redução na expressão da molécula CD124 nas mo-DCs geradas sob efeito da MLT, enquanto que, nessas mesmas células, há uma tendência ao aumento da expressão de CD83.

Além do subtipo dos tumores, outro detalhe que pode ser relacionado com o fenótipo das células foi o infiltrado linfocitário presente no tumor. Esta informação foi obtida através do exame anatomopatológico, realizado no hospital em que as amostras de sangue foram obtidas.

É possível observar na figura 15 que as pacientes que apresentavam tumores com infiltrados linfocitários classificados como “escasso e focal”, possuem mo-DCs com expressão reduzida da molécula CD124, independente do tratamento com a MLT. No entanto, é importante notar que as diferenças estatísticas encontradas entre os diferentes tipos de infiltrados tornam-se mais consistentes quando as células tiveram contato com a MLT.

Outra análise que se mostrou relevante quanto ao fenótipo das células de pacientes foi a relação das características fenotípicas com as informações obtidas através da aplicação do questionário PSQI. Nesse sentido, foram feitas análises relacionando a expressão dos marcadores CD124, CD83 e CD86, nos dias 0 e 6 da diferenciação, com os scores de cada um dos componentes do questionário, bem como com o score global. Dentre todas as análises (dados não apresentados) encontrou-se uma relação entre a expressão, em porcentagem, da molécula CD83

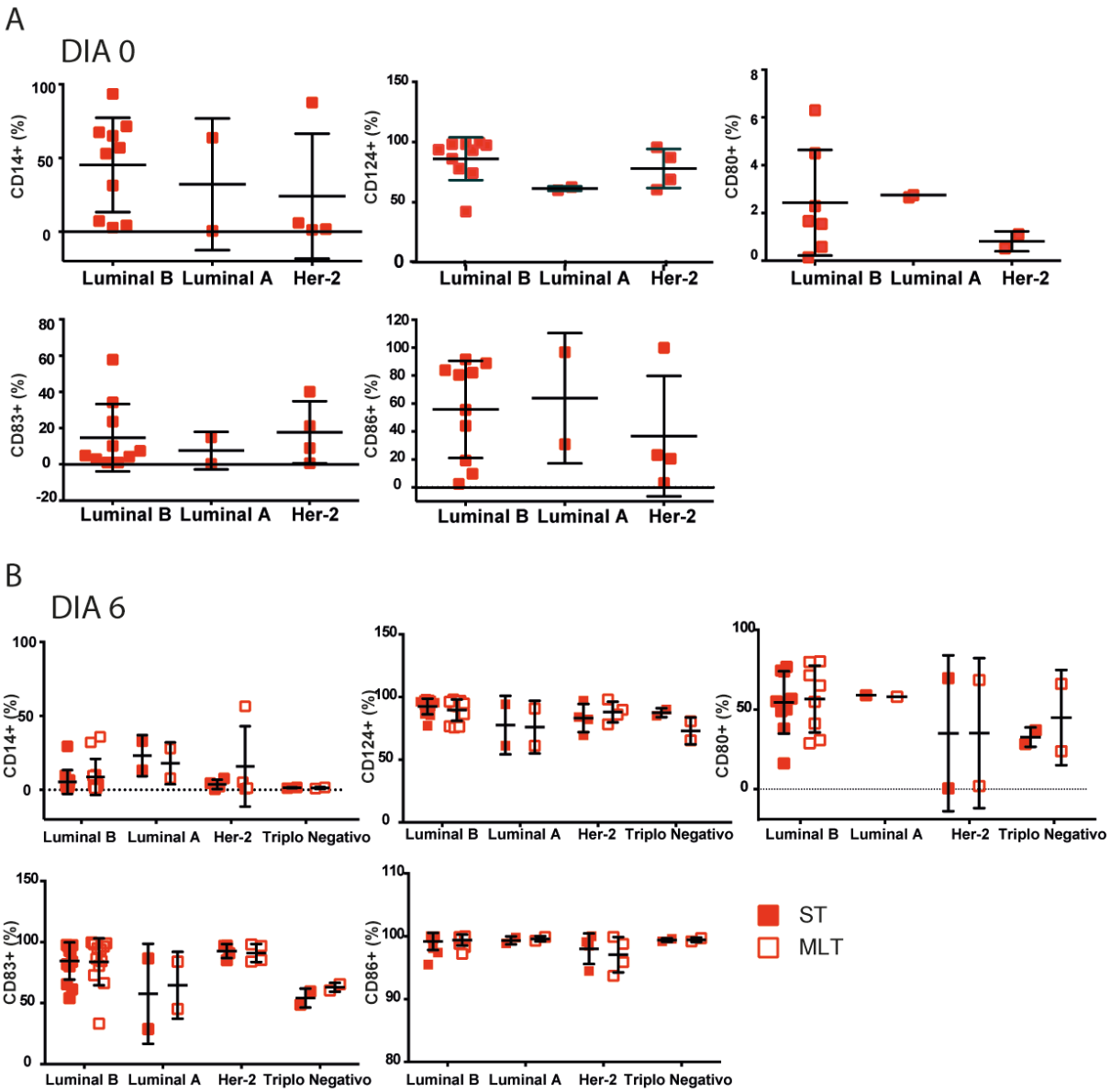


Figura 14 - Expressão dos diferentes marcadores em monócitos e mo-DCs de pacientes, de acordo com o tipos de tumores. (A) Gráficos representando a expressão de CD14, CD124, CD80, CD83 e CD86 nos monócitos de pacientes (dia 0), de acordo com o tipo de tumor (determinado por análise imunohistoquímca). (B) Gráficos representando a expressão de CD14, CD124, CD80, CD83 e CD86 ao final da diferenciação, a partir de monócitos tratados ou não com MLT, de DCs de pacientes (dia 6), de acordo com o tipo de tumor (determinado por análise imunohistoquímca). n= 16/21

nas mo-DCs de pacientes com a eficiência do sono destes indivíduos. Mais uma vez é necessário atentar para o fato de que, devido ao reduzido número de amostras, torna-se difícil a obtenção de dados estatisticamente confiáveis. Ainda assim, pode-se notar na figura 16 que a maioria das pacientes que expressaram altos níveis de CD83 em mo-DCs, obteve score 0 no que se refere à eficiência do sono, não apresentando, portanto, dificuldades nesta área. Há ainda uma diferença significativa entre a expressão de CD83 entre as mo-DCs sem tratamento (ST) de pacientes que obtiveram score 1 e 3 - ou seja, entre as pacientes que relataram

pouca dificuldade quanto à eficiência do sono e as que apresentam grandes problemas quanto a esse componente. Aparentemente, as pacientes que conseguem um sono reparador (eficiente) têm DCs menos ativadas (ao menos em relação a expressão de CD83) em relação às que não conseguem descansar durante o período em que estão dormindo.

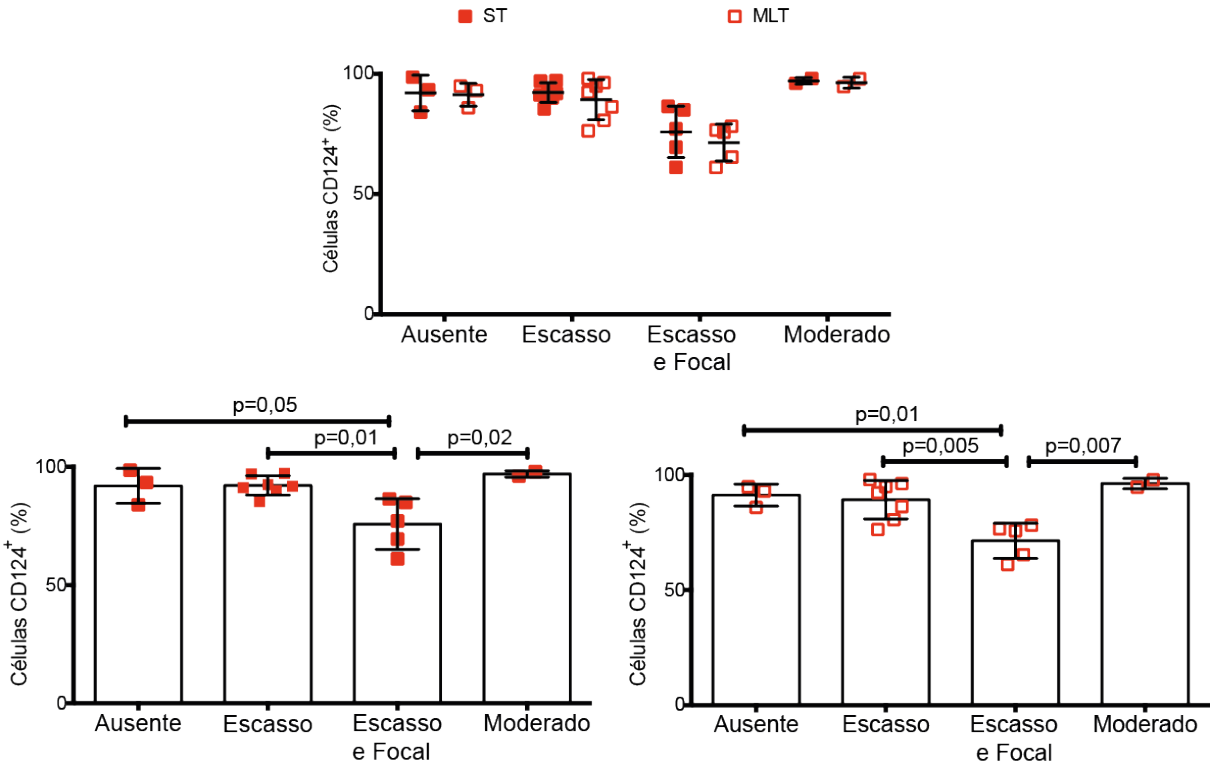


Figura 15 - Expressão de CD124 em mo-DCs de pacientes em relação à presença de infiltrado linfocitário no tumor. Mo-DCs foram diferenciadas a partir de monócitos provenientes do sangue periférico e tratados (MLT), ou não (ST), com MLT (2,5 nM – 2 horas). Após 5 dias de diferenciação, as células foram ativadas com LPS (100 ng/mL) por 24 horas. Ao final da cultura, as mo-DCs foram avaliadas quanto ao fenótipo por citometria de fluxo. O gráfico na parte superior da figura apresenta a expressão de CD124 em mo-DCs ST (quadrados preenchidos) e MLT (quadrados vazios). Os gráficos na parte inferior representam separadamente (ST – esquerda e MLT – direita). Estatística feita com teste de Kruskal-Wallis seguido de pós teste de Tukey sendo considerado significativo quando $p \leq 0,05$. n=17

Apesar desta diferença ter sido constatada apenas nas culturas ST, um outro detalhe que a chama atenção é o padrão de expressão desta mesma molécula nas células que receberam MLT (quadrados vazio, figura 16) dentre as pacientes com score 1 quanto à eficiência do sono. O que parece ocorrer é uma tendência ao aumento da expressão de CD83, que mostra-se quase que equivalente ao que se tem nas pacientes que obtiveram score 0 para este componente.

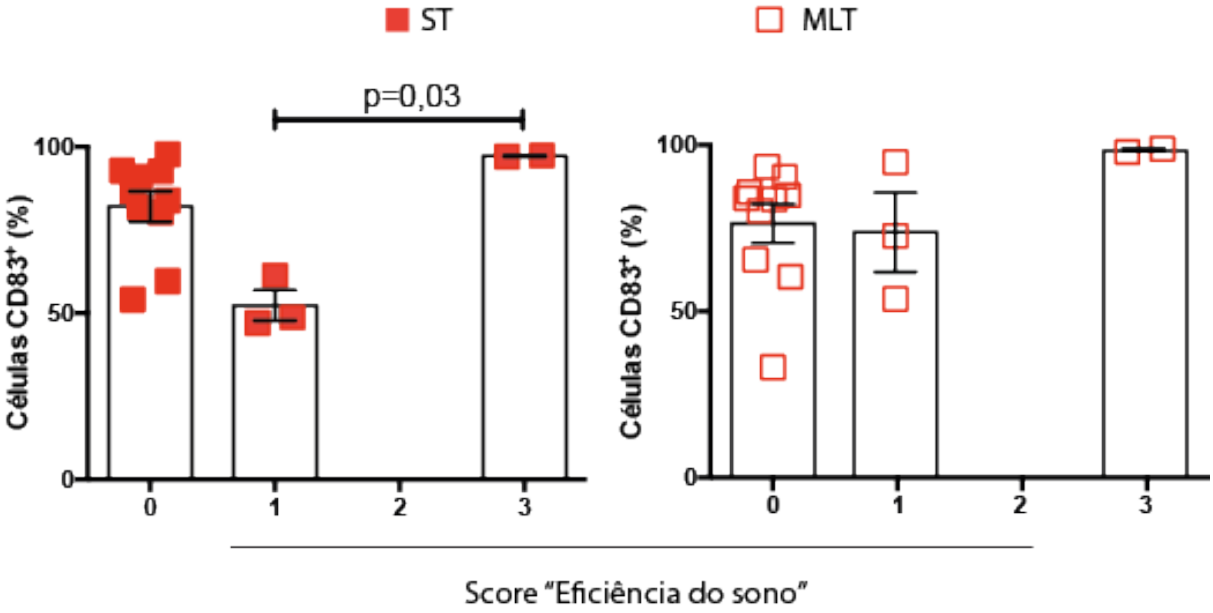


Figura 16. Relação da expressão de CD83 em mo-DCs e a eficiência do sono de pacientes. Monócitos provenientes do sangue periférico de pacientes foram tratados (MLT), ou não (ST), com MLT (2,5 nM – 2 horas) e induzidas à diferenciação em DCs. No quinto dia, as células receberam estímulo de LPS (100 ng/mL) e, após 24 horas, tiveram seu fenótipo avaliado por citometria de fluxo. No momento da coleta do sangue foi aplicado o questionário PSQI para avaliação subjetiva da qualidade do sono das pacientes. Os gráficos apresentam a expressão da molécula CD83 de acordo com o score obtido em dos componentes avaliados pelo questionário (eficiência do sono). Sendo score 0 indicativo de "nenhuma dificuldade" na área avaliada e 3, de "grande dificuldade". Estatística feita por teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Tukey, sendo considerado significativo $p \leq 0,05$. n=15.

4.4.4 Avaliação do perfil de citocinas presentes ao longo da diferenciação de mo-DCs

Ao longo da diferenciação dos monócitos em DCs, além da análise do fenótipo, foi realizada também a coleta dos sobrenadantes destas culturas (mantidos congelados a -80 °C até o momento da análise) - nos mesmos dias em que foi realizada a marcação extracelular das células (dias 1, 5 e 6) - para posterior análise das citocinas presentes. Observando-se a figura 17, é possível verificar, pelos gráficos de dispersão, que a variação entre doadores - observada na análise de fenótipo das células - se manteve também na análise das citocinas. A figura mostra também que, com exceção da citocina IL-12p70 no dia 6 (14,33 ± 28,3 vs 18,23 ± 23,54 para ST e 13,17 ± 23,5 vs 32,5 ± 42 para MLT; p=0,04), as diferenças no perfil de citocinas entre culturas de pacientes e controles são sutis. Apesar disso, observando-se ainda pela ótica de padrões de distribuição nos gráficos, vale destacar que há uma tendência nos pacientes - quando houve tratamento com MLT - a apresentarem valores menores de TNF no sexto dia se comparados com o grupo

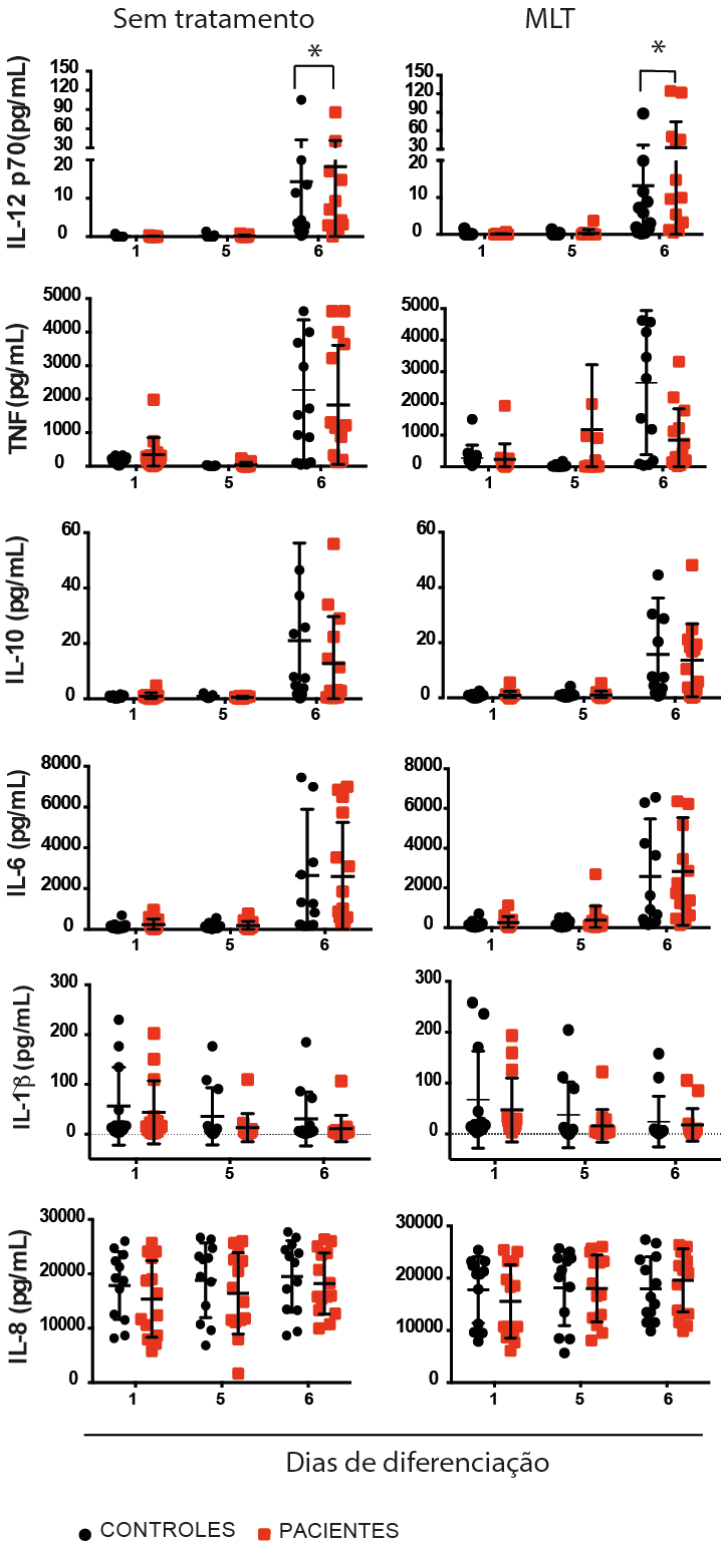


Figura 17 - Perfil de citocinas presentes no sobrenadante das culturas de mo-DC de doadores saudáveis e de pacientes ao longo da diferenciação. Monócitos de doadoras saudáveis ou pacientes foram tratados ou não com MLT (2,5 nM) e submetidos à diferenciação em DCs por 5 dias, quando receberam estímulo com LPS (100 ng/mL - 24 horas). Os sobrenadantes foram coletados no primeiro, quinto e sexto dias de diferenciação e avaliados quanto à presença das citocinas IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1β e IL-8 por meio da técnica de CBA. Teste ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo considerado significativo quando p≤0,05. n= 13/14 * p=0,02.

de doadoras saudáveis tratado com MLT. Na realidade, se comparados os gráficos das colunas da direita e da esquerda (figura 17), pode-se dizer que este efeito é, mais uma vez, reflexo da ação da MLT no sentido de reduzir a heterogeneidade apresentada nos sobrenadantes do grupo sem tratamento, diminuindo, assim, a concentração média desta citocina. Esta mesma tendência, de maneira menos evidente, parece ocorrer, no sexto dia de cultura, em todas as outras citocinas dosadas, inclusive em doadores saudáveis.

Vale ressaltar ainda que, devido aos baixos níveis de IL-12p70 produzidos nos primeiro e quinto dias, a maioria dos sobrenadantes analisados apresentaram valores indetectáveis pelo protocolo utilizado. O contrário ocorreu com a citocina IL-8 que, estando presente em altas concentrações ao longo de toda a diferenciação, acabou ultrapassando o limite máximo de detecção do kit.

A fim de facilitar a visualização dos dados obtidos, a figura 18 traz os mesmos valores apresentados nos gráficos da figura 17, porém divididos de forma a tornar mais evidentes alguns efeitos. Pode-se observar que, com exceção da IL-1β, todas as citocinas apresentaram níveis mais elevados após ativação das células com LPS (dia 6) quando comparados ao níveis iniciais (dia 1). No entanto, para algumas citocinas como, por exemplo, IL-12p70 (em pacientes) e TNF (em saudáveis), este efeito mostrou-se estatisticamente significativo apenas nos grupos tratados com MLT (0,06 ± 0,2 vs 32,5 ± 42; p=0,0002 para IL-12p70; e 409,7 ± 562,1 vs 1457,8 ± 1677, 4; p= 0,01 para TNF) , indicando, mais uma vez, que este hormônio age sobre a biologia das células, ainda que de maneira discreta.

Sobre a IL-1β, única citocina a apresentar redução significativa em sua concentração entre os dias 1 e 5, é notável também que este efeito só apresentou valor estatístico em doadoras saudáveis, quando houve tratamento com MLT (67,5 ± 95,5 vs 37,44 ± 64,6; p= 0,01) enquanto que, em pacientes, ocorreu também nas sem tratamento (43,9 ± 63,2 vs 13,07 ± 28,3 para sem tratamento e 47,3 ± 62,8 vs 16 ± 32; para tratadas com MLT; p= 0,01).

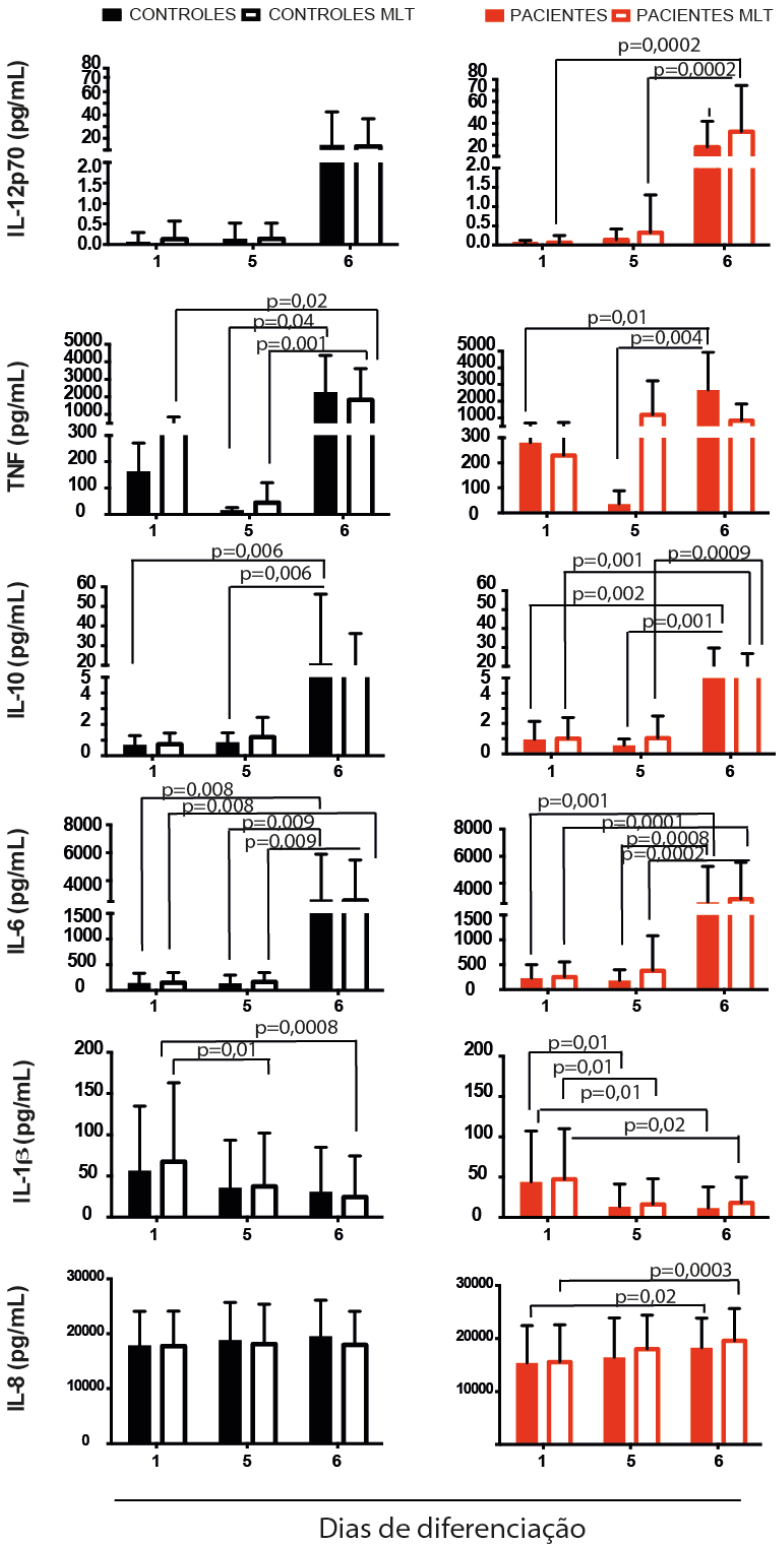


Figura 18 - Efeito da MLT no perfil de citocinas presentes nos sobrenadantes das culturas de mo-DC de doadoras saudáveis e de pacientes ao longo da diferenciação. Monócitos provenientes do sangue periférico de doadoras saudáveis ou pacientes foram tratados ou não com MLT (2,5 nM) e submetidos à diferenciação em DCs por 5 dias, quando receberam estímulo com LPS (100 ng/mL) por 24 horas. O sobrenadante das culturas celulares foram coletados no primeiro, quinto e sexto dias de diferenciação e avaliados quanto à presença das citocinas IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1β e IL-8 por meio da técnica de CBA. Estatística realizada por teste ANOVA de duas vias para medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo considerado significativo quando $p \leq 0,05$. n= 13/14.

4.5 Avaliação da capacidade linfoestimuladora das mo-DC de doadoras saudáveis e de pacientes

Após 6 dias de diferenciação, as mo-DCs geradas foram co-cultivadas com LT alogeneicos provenientes de doadores saudáveis, para avaliação de sua capacidade linfoestimuladora (item 3.7).

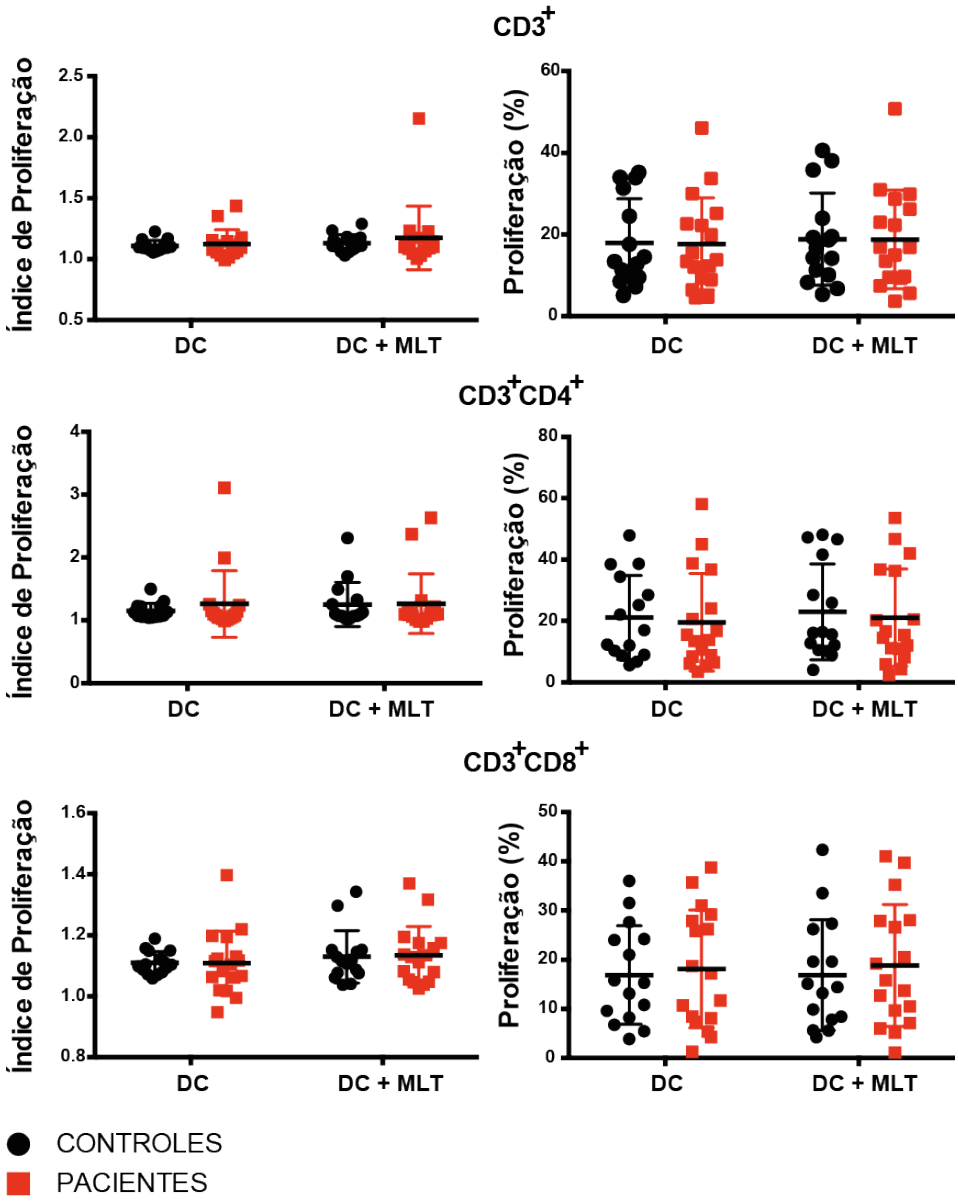


Figura 19 - Comparação da capacidade linfoestimuladora de mo-DCs de doadoras saudáveis e de pacientes. Linfócitos T $CD3^+$, alogeneicos e provenientes de doadores saudáveis, foram selecionados por coluna de separação imunomagnética, previamente corados com CFSE e co-cultivados com DC ou DC + MLT de pacientes ou doadoras saudáveis, por 5 dias na proporção de 1 DC : 30 LT. Gráficos do índice de proliferação (calculado pela divisão da MFI do CFSE do grupo não estimulado, pela MFI dos que receberam DCs) e da porcentagem de proliferação (calculada pela diluição do CFSE) dos linfócitos $CD3^+$ totais e dos subgrupos $CD4^+$ e $CD8^+$. n=15/17.

A figura 19 mostra a indução da proliferação de linfócitos T alogeneicos pelos grupos DC e DC + MLT de doadoras saudáveis e de pacientes (vermelho). De fato, além de não alterar fenotipicamente as mo-DCs, a MLT parece também não alterar sua função como estimuladora de LT.

Também não foi possível verificar diferenças funcionais entre as células das pacientes e das doadoras saudáveis, nem tampouco na expressão de CD25 nos LT estimulados por elas (anexo H).

mo-DCs, quando estas foram co-cultivadas com LT alogeneicos, verificou-se nos sobrenadantes das co-culturas com mo-DCs de doadoras saudáveis, que a MLT aumentou significativamente as concentrações de TNF e de IFN-γ (3,5 ± 5,6 vs 15,06 ± 12,2; p=0,01 e 468,6 ± 862,5 vs 1930,04 ± 2335,64; p=0,04; respectivamente).

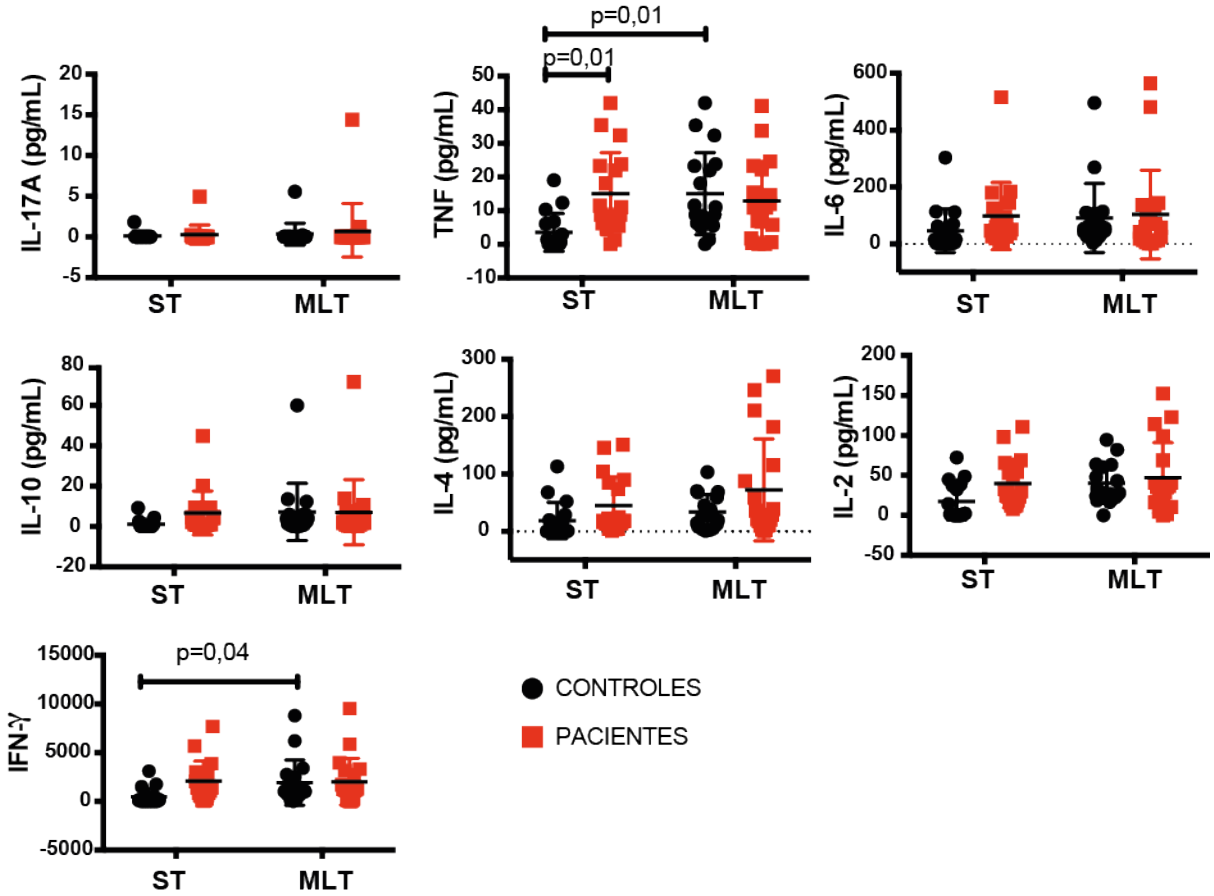


Figura 20 - Perfil de citocinas nos sobrenadantes de co-culturas de mo-DCs com LT. Após 5 dias de co-cultura de mo-DCs e LT (1:30), os sobrenadantes foram coletados e congelados a -80 °C até serem utilizados para dosagem das citocinas por meio de citometria de fluxo (CBA). Gráficos representando a concentração de IL-17A, TNF, IL-6, IL-10, IL-4, IL-2 e INF-γ nas co-culturas de DCs derivadas de monócitos sem tratamento (ST) ou tratados com MLT, provenientes de pacientes e doadoras saudáveis. Estatística feita com teste ANOVA de duas vias sem medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Tukey, sendo considerado significativo quando p≤0,05. n= 17/19.

Ainda sobre as citocinas, como mostrado na figura 21, se utilizada uma análise separando os valores obtidos nas co-culturas com mo-DCs que tiveram contato com MLT dos obtidos nas co-culturas com mo-DCs sem tratamento, além das diferenças observadas para as citocinas TNF e IFN-γ continuarem presentes, pode-se observar uma diferença significativa para IL-2 e IL-10 (17,34 ± 23,3 vs 39,9 ± 30,3; p=0,02 e 1,04 ± 2,4 vs 6,7 ± 10,8; p=0,04, respectivamente). Aparentemente, estas citocinas estão aumentadas nas co-culturas de mo-DCs de pacientes quando diferenciadas sem tratamento com MLT. No entanto, esta diferença desaparece quando as células foram geradas na presença da MLT.

Em uma outra análise, comparando-se separadamente pacientes e controles (figura 22), é possível observar de maneira mais clara os possíveis efeitos da MLT em saudáveis e pacientes. Pode-se, portanto, observar que as concentrações de TNF, IL-2 e IFN-γ são significativamente maiores quando LT são co-cultivados com mo-DCs que sofreram ação do hormônio. Porém, essa diferença não existe nas co-culturas com células de pacientes. Vale destacar que apenas as citocinas que apresentaram diferenças significativas foram apresentadas nas figuras 21 e 22.

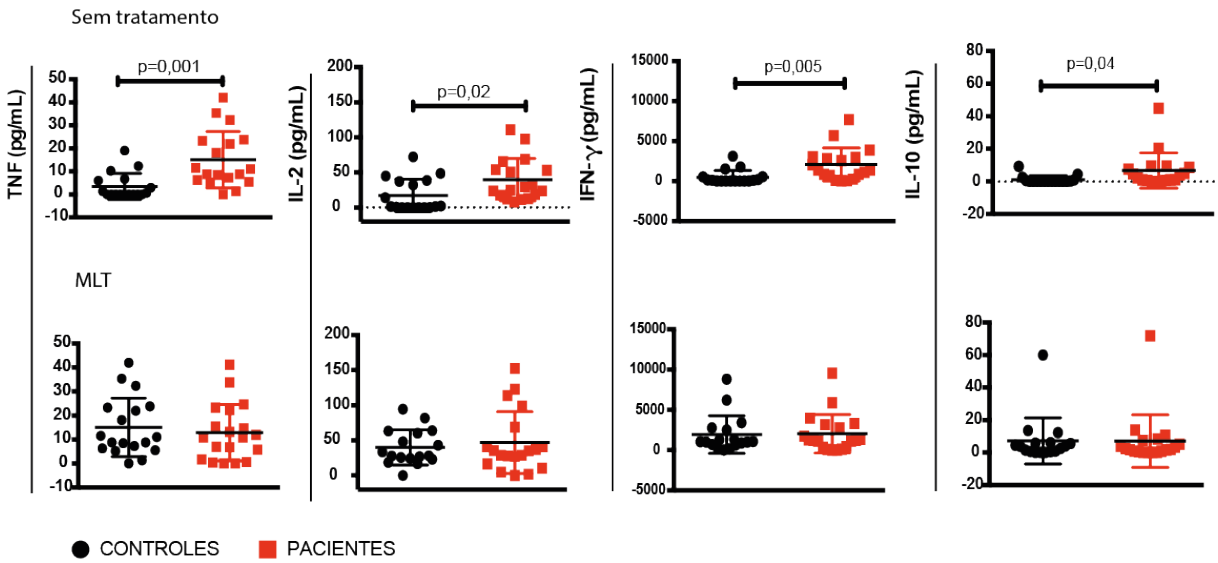


Figura 21 - Comparação entre as concentrações de citocinas presentes em co-culturas de pacientes e controles. Os gráficos representam a análise das concentrações de citocinas nos sobrenadantes de co-culturas de mo-DCs com LT alogeneicos, comparando-se pacientes e controles. Estatística feita com teste T de Student, não pareado, sendo considerado significativo quando p≤0,05. n= 17/18.

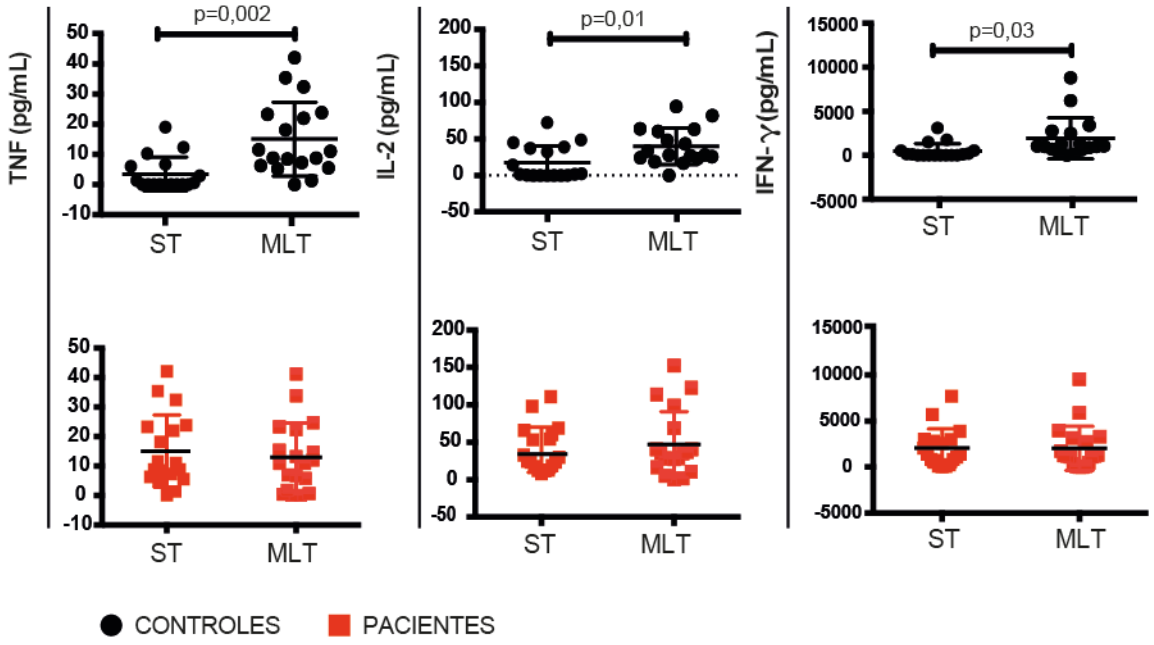


Figura 22 - Efeito da MLT sobre a concentração de citocinas em controles e pacientes. Os gráficos representam os valores obtidos na análise das concentrações de citocinas nos sobrenadantes de co-culturas de mo-DCs com LT alogeneicos, comparando-se, separadamente, controles e pacientes. Estatística feita com teste T de Student pareado, sendo considerado significativo quando p≤0,05. n= 17/18.

4.6 Quantificação de STAT-6, pSTAT-6 e SOCS-5 em monócitos de doadoras saudáveis e de pacientes

Para avaliação da expressão das moléculas SOCS-5, STAT-6 e STAT-6 fosforilada (pSTAT-6), os monócitos provenientes do sangue periférico de doadoras saudáveis e de pacientes foram isolados negativamente por coluna magnética, tratados com IL-4 ou MLT e incubados por 15 minutos (período definido após padronização – anexo B). Após o período de incubação foram realizados os protocolos de Western Blotting, para análise da expressão de SOCS-5 e STAT-6, e "Phosflow", para análise da expressão de pSTAT-6. Em alguns experimentos, nos quais as doadoras apresentavam maior quantidade de monócitos após o isolamento, um grupo foi separado para análise das proteínas nas células *ex-vivo,* no que foi denominado "tempo zero" (T0) e outro, tratado concomitantemente com IL-4 e MLT.

A figura 23 compara a expressão das moléculas em questão. É possível observar que, de maneira incoerente com os relatos da literatura (TONIOLO et al., 2016; SEKI et al, 2002) a expressão de SOCS-5 não se mostra diminuída conforme aumenta STAT-6 (figura 23 A e B). O que é possível observar, é que esta proteína tende a estar aumentada nas células das pacientes quando *ex vivo* – T0 (figura 23 A). Além disso, chama a atenção o fato de a capacidade de fosforilação da STAT-6 estar

reduzida em pacientes, já que este grupo parece apresentar quantidades muito semelhantes da proteína total (STAT-6) - figura 23 B -, enquanto que apresentam quantidades reduzidas da proteína fosforilada (pSTAT-6), mesmo quando sob o estímulo da IL-4, tanto quando comparadas com os grupos sem tratamento (ST) (figura 23 C, gráfico superior) (1,0 ± 0,00 vs 3,6 ± 1,9; $p<0,0001$ para comparação entre ST e IL-4 nos controles; 1,0 ± 0,00 vs 2,5 ± 1,2; $p=0,002$; para comparação entre ST e IL-4 em pacientes), quanto quando comparados controles e pacientes (figura 23 C, gráfico inferior) (53,23 ±37,8% vs 27,6 ±26,3%; $p=0,04$).

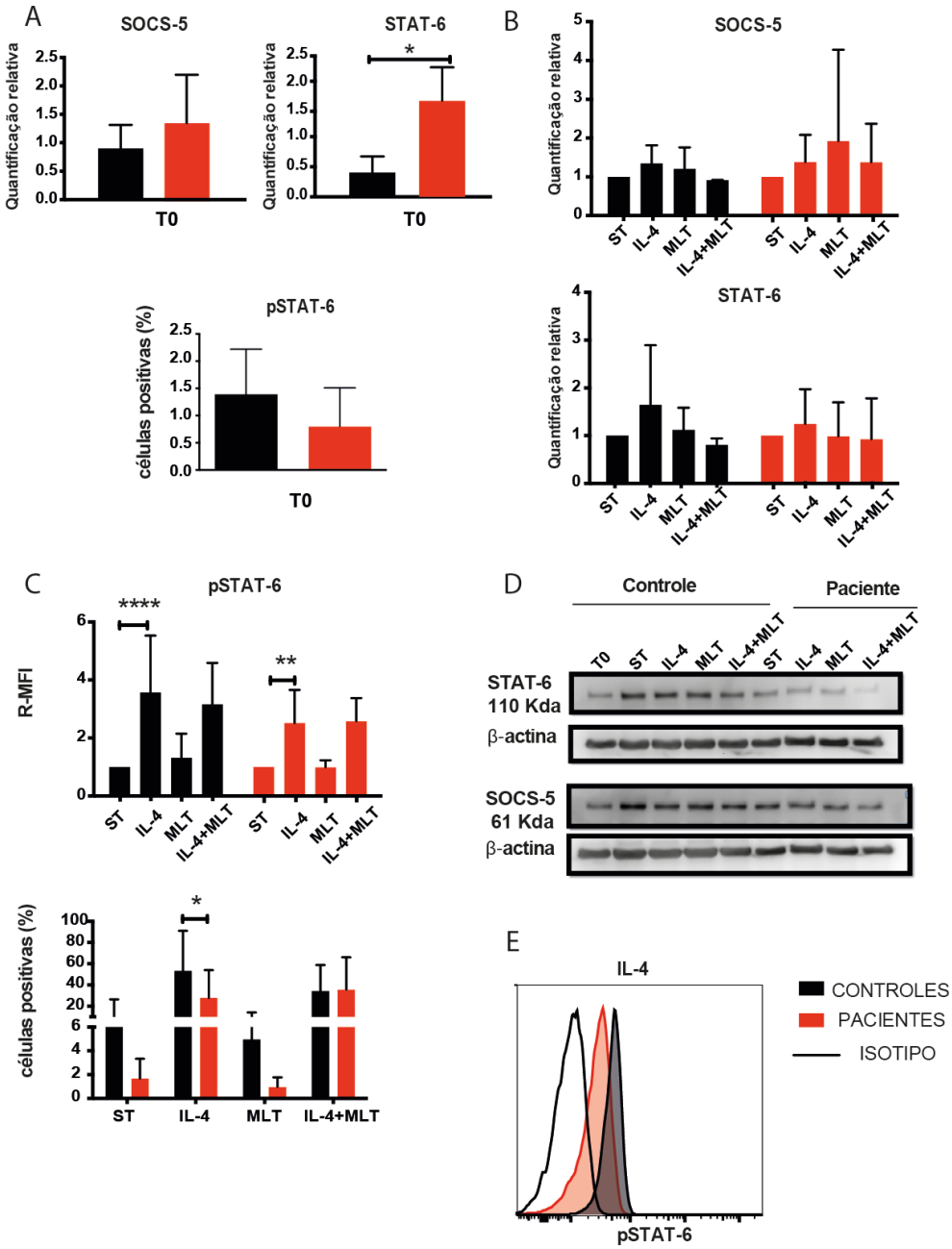


Figura 23 - Expressão de SOCS-5, STAT-6 e pSTAT-6 em monócitos de doadoras saudáveis e pacientes. Monócitos de doadoras saudáveis e de pacientes foram e submetidos, ou não (T0), à incubação (15 minutos) com IL-4 (50 ng/mL), MLT (2,5 nM) ou ambos (IL-4 + MLT). As células foram lisadas para avaliação de SOCS-5 e STAT-6 (*Western Blotting*) ou permeabilizadas e marcadas com anticorpo anti-pSTAT-6 (*Phosflow*). (A) Gráficos referentes à quantificação, relativa ao grupo ST, das bandas de SOCS-5 e STAT-6 (em cima), e porcentagem de células positivas para pSTAT-6 (em baixo), em T0. Quantificação relativa ao grupo sem tratamento (ST) de cada doador. (B) Gráficos referentes à quantificação, relativa ao grupos ST, das bandas equivalentes à SOCS-5 e à STAT-6, em monócitos tratados por 15 minutos. (C) Gráficos referentes à MFI (em cima) e à porcentagem (em baixo) de monócitos (duplo positivos para CD11c e HLA-DR) que expressam pSTAT-6. (D) Imagem representativa das bandas equivalentes à STAT-6 e SOCS-5 (*Western Blotting*). (E) Histogramas representativos de pSTAT-6 em monócitos, tratados com IL-4, de uma doadora saudável e uma paciente. Estatística realizada com teste T de Student (A), e teste ANOVA de duas vias sem medidas repetidas seguido por pós-teste de Tukey (C), sendo considerados significativos quando $p \leq 0,05$. n=3 para T0 e IL-4 + MLT; n=7/11 para ST, IL-4 e MLT. * $p<0,04$; **$p=0,002$; **** $p<0,0001$.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho baseou-se em resultados anteriores do nosso grupo que mostraram que a MLT age em monócitos aumentando sua sensibilidade à IL-4 e, consequentemente, levando estas células a se diferenciarem em DCs - quando *in vitro* e estimuladas com IL-4 e GM-CSF - com um perfil fenotípico e funcional mais ativado. Outros estudos do nosso grupo mostraram que mo-DCs de pacientes portadoras de câncer apresentam desvios funcionais capazes de comprometer a ativação de linfócitos por este tipo celular (BALEEIRO et al., 2008; CLAVIJO-SALOMON et al., 2014; RAMOS et al., 2012). Além disso, um outro apontamento de nosso grupo foi para o fato de que, muito provavelmente relacionado a estes desvios, está um comprometimento da via IL-4/STAT-6/SOCS-5, que se mostrou alterada em pacientes com leucemia linfóide crônica (TONIOLO et al., 2016). Assim, elaborou-se a hipótese de que a MLT agiria em monócitos, por meio da interferência no eixo IL-4/STAT-6/SOCS-5, originando mo-DCs com fenótipo relacionado à maior capacidade linfoestimuladora e, possivelmente, sendo capaz de, se não reverter, ao menos amenizar os desvios funcionais destas células em pacientes com câncer.

De um modo geral, os resultados obtidos neste estudo não puderam confirmar esta hipótese porque, na amostra analisada, não foi possível observar uma alteração fenotípica consistente em relação à ativação das células das pacientes, nem, tampouco, se pode visualizar um efeito claro da MLT sobre o fenótipo e função das mo-DCs.

Pode-se observar, já nos experimentos de padronização (com relação à escolha da concentração de MLT a ser utilizada no tratamento dos monócitos), que ao contrário do que se esperava e de maneira independente da concentração utilizada, o efeito fenotípico ao longo da diferenciação de monócitos em DCs, ao menos em doadores saudáveis, foi muito discreto. Nesse caso, foi possível apontar somente uma tendência da MLT a agir nas células, no primeiro dia de sua diferenciação, no sentido de aumentar a expressão do receptor de IL-4 (CD124). No entanto, ao final da diferenciação (no sexto dia de cultura) observou-se um aumento – ainda assim discreto - na expressão da molécula co-estimuladora CD86. Esta última observação, concordando com os relatos anteriores do grupo, permitiu a especulação de que o efeito mais relevante do hormônio poderia ser visualizado durante a diferenciação de células que já apresentavam um defeito originalmente, ou seja, os monócitos das pacientes. Ainda, apesar das observações citadas anteriormente, também não foram

observadas alterações significantes na função das mo-DCs quanto à indução da proliferação de LT alogeneicos.

Muito provavelmente, os resultados obtidos nos estudos anteriores do grupo quanto ao efeito da MLT no fenótipo de mo-DCs de doadores saudáveis, não puderam ser reproduzidos devido a diferenças nas metodologias utilizadas. Ainda que utilizado um procolo muito semelhante no que se refere à concentração do hormônio e tempo de tratamento, diferenças importantes como, por exemplo, a forma de obtenção das amostras de sangue, podem ser destacadas. No presente estudo, foram utilizadas amostras retiradas por venóclise, enquanto que, nos anteriores, utilizou-se de células obtidas a partir de câmaras de leucorredução. Sabe-se, por experiências do grupo, que as células provenientes destas câmaras já se encontram em estados mais ativados, ao menos fenotipicamente, quando comparadas às células provenientes de venóclise. No caso, o método selecionado para obtenção das amostras de sangue foi escolhido já que a pretenção do uso de amostras de pacientes portadoras de câncer tornou o uso da câmara de leucorredução inviável, visto que as pacientes não são aptas à doação de plaquetas.

Curiosamente, quando iniciados os experimentos com células provenientes de pacientes, além de não haver efeito da MLT, o defeito esperado com relação à maturação e função destas células também não se fez presente, quando comparadas às mo-DCs de doadoras saudáveis, de maneira geral. No entanto, quando analisadas individualmente, algumas pacientes apresentaram células incapazes de elevar a expressão de moléculas co-estimuladoras após o estímulo com LPS. Nesse sentido, foram também comparados os níveis de expressão das moléculas de membrana nas mo-DCs das pacientes, com a classificação imunohistoquímica de seus tumores. Devido ao baixo número de amostras, não foi possível estabelecer nenhuma relação clara entre estes fatores. No entanto, o que fica claro é que, mesmo que as pacientes sejam subdivididas de acordo com algumas características dos respectivos tumores, as variações quanto à expressão das moléculas analisadas continuam sendo verificadas. A realidade é que, apesar de todas as pacientes apresentarem tumores classificados como ductal invasivo, cada tumor surge a partir de mutações genéticas e epigenéticas em sua própria via neoplásica, apresentando, portanto, características próprias que os tornam únicos em diferentes sentidos.

Evidentemente, os avanços proporcionados pelas pesquisas em relação às maneiras de se dividir os tumores e de agrupá-los de acordo com características semelhantes (CURTIS et al., 2012; SORLIE et al., 2001; VAN DE VIJVER et al., 2002), vêm trazendo cada vez mais benefícios, principalmente quanto à facilidade do diagnóstico, prognóstico e escolha do melhor tratamento. No entanto, está cada vez mais claro que inúmeras características podem influenciar a biologia de um mesmo tipo de câncer. Alguns estudos sugerem que esta heterogeneidade pode ser verificada tanto entre indivíduos, quanto dentro de um mesmo tipo de tumor (VOGELSTEIN et al., 2013; ZARDAVAS et al., 2015). Inclusive, em relação à heterogeneidade entre tumores, o "Atlas Genômico do Câncer" (NATURE, 2012) enfatiza tal característica, sugerindo que pesquisas genômicas na área possam auxiliar na busca por melhores tratamentos. Portanto, não há como se afirmar que um tumor seja idêntico ao outro, ainda que classificados da mesma maneira. Também, pode-se dizer que os tumores não são apenas células neoplásicas, e sim componentes de toda uma matriz extracelular com muitas células presentes que, juntas, formam estruturas complexas - como um órgão - podendo interagir com todo o organismo de maneira sistêmica (EGEBLAD; NAKASONE; WERB, 2010; MCALLISTER; WEINBERG, 2014). Nesse sentido é possível admitir que cada indivíduo acometido por tumores malignos apresenta uma doença única que, apesar de designada "câncer" e de apresentar características que permitem certo grau de classificação, possui características próprias, provavelmente pouco parecidas com outros tumores, e capazes de alterar de diversas maneiras o sistema imune. Assim, enquanto determinadas alterações são encontradas na maioria das pacientes, outras, como as que se buscou neste estudo, podem ser mais difíceis de se detectar, talvez por serem mais sutis e dependentes de um número maior de fatores e, portanto, mais dificilmente congruentes entre os pacientes.

Assim, cabe evidenciar a grande variação observada em todos os resultados obtidos ao longo deste estudo, tanto entre os indivíduos avaliados – sejam saudáveis ou portadoras de câncer - quanto entre os experimentos. A realidade é que a heterogeneidade das DCs entre indivíduos é um fenômeno comumente observado em culturas de células humanas. Inclusive, a depender do meio de cultura em que foram diferenciadas estas células e dos estímulos a elas fornecidos, estas células tendem a apresentar resultados bastante diferentes. Apesar dos ensaios aqui propostos terem sido realizados sob as mesmas condições quanto aos

pontos citados, sabe-se que, ainda assim, as culturas podem diferir entre si, devido a fatores nem sempre controláveis em laboratório (NEVES, 2003). Outro ponto que pode justificar essas variações em mo-DCs é a grande heterogeneidade das prórias células dendríticas, já que nenhum modelo completo de vias de desenvolvimento foi estabelecido para estas células (KAH-WAI et al., 2006). Somado a todos estes fatores, tem-se ainda a já mencionada variação natural existente entre os doadores, tanto genética quanto ambiental, tendo sido relatado que inúmero fatores como alimentação (DEL CORNÒ et al., 2016), idade (SRIDHARAN et al., 2011), e níveis de estresse (TOMIYOSHI et al., 2009) podem influenciar resultados obtidos em pesquisas com DCs, inclusive em modelos utilizando camundongos isogênicos.

Além de não ter sido possível confirmar a hipótese inicialmente proposta neste projeto, com relação tanto aos efeitos da MLT sobre o fenótipo das mo-DCs, quanto aos defeitos funcionais nas células das pacientes, também não foi possível afirmar que a MLT surtiu efeito sobre os monócitos no sentido de alterar a via de sinalização IL-4/STAT-6/SOCS-5.

Com relação a este ponto, o tratamento dos monócitos com o hormônio, ao menos pelo protocolo utilizado no presente estudo, não gerou alterações significativas na expressão de nenhuma das proteínas avaliadas (SOCS-5, STAT-6 e pSTAT-6), concordando com os resultados apresentados quanto ao fenótipo e função das mo-DCs geradas sob o efeito da MLT. Independente do resultado do tratamento com a MLT, como esperado, os monócitos das pacientes apresentaram menores níveis de pSTAT-6, mesmo quando sob ação da IL-4, concordando com os dados de nosso grupo (TONIOLO et al., 2016). Ainda, foi possível constatar uma diferença na expressão de SOCS-5 e STAT-6 nos monócitos recém-isolados (*ex vivo),* entre pacientes e saudáveis. Apesar da restrita quantidade de pacientes analisadas quanto a esse quesito, é possível afimar que há uma tendência dos monócitos de pacientes apresentarem maior quantidade de SOCS-5 e menor de pSTAT-6, além de uma quantidade significativamente maior de STAT-6. Nesse sentido, os resultados se fazem coerentes já que a SOCS-5 é responsável pela inibição da fosforilação da STAT-6 (SEKI et al., 2002; YOSHIMURA; NAKA; KUBO, 2007). Ou seja, apesar de apresentarem níveis totais de STAT-6 mais elevados, os monócitos das pacientes apresentam também maior quantidade da proteína reguladora da ativação deste fator, a SOCS-5, impedindo, assim, que haja grandes quantidades da molécula fosforilada. No entanto, considerando-se estes resultados,

era de se esperar que essa deficiência na via da STAT-6 viesse a interferir na maturação das DCs deles derivadas (JACKSON et al., 2004; LUTZ et al., 2002; ROJAS-CANALES et al., 2012), o que não se encontrou no presente estudo.

A respeito do aparente defeito nos monócitos das pacientes, que não se reflete nas DCs deles derivadas, é possível especular que, apesar de haver uma deficiência – ao menos a nível da sinalização via STAT-6 – nos monócitos das pacientes, por alguma razão estas não são transferidas, ou são neutralizadas, quando do cultivo destas células em laboratório. Ainda, é possível que a diferenciação das mo-DCs esteja sendo alcançada de forma satisfatória, mesmo com a baixa ativação de STAT-6. Nesse sentido, Jackson et al. (2004) mostrou que, além da ativação da STAT-6 estar intimamente relacionada com a maturação das DCs, a STAT-1 também parece ter importante papel regulador na diferenciação e maturação de DCs derivadas da medula óssea de camundongos. Assim, verifica-se a necessidade de que sejam conduzidos estudos objetivando avaliar o envolvimento de outras STATs no comprometimento de mo-DCs com processos de maturação.

A despeito da hipótese em que se baseou este estudo quanto aos efeitos da MLT, não se pode derrubá-la por completo. Ainda que discretos e, muitas vezes, baseados apenas em padrões observados, existem alguns pontos nos quais o tratamento com a MLT pareceu surtir algum efeito.

A MLT vem sendo utilizada em ensaios clínicos há alguns anos em conjunto com terapias convencionais para tratamento de câncer. Nesse sentido, estudos têm relatado redução de efeitos colaterais causados por quimio e radioterapia, tendo a MLT diminuído a toxicidade dos tratamentos e aumentado sua eficácia (DI BELLA et al., 2013; BARNI et al, 1995; LISSONI et al., 2003; RASMUSSEN et al., 2015). A maioria dos estudos *in vitro* e *in vivo* sobre os efeitos da MLT no sistema imune são focados em um ou outro tipo celular e, nesse sentido, optou-se no presente estudo por, inicialmente, avaliar a interação de DCs - geradas a partir de monócitos tratados com a MLT -, com LT alogeneicos também tratados com o hormônio. Pode-se observar, portanto, que o tratamento dos LT parece elevar a sensibilidade deste tipo celular, principalmente dos $CD8^+$, à estimulação alogeneica por mo-DCs, elevando sua capacidade de proliferação – resultados estes que concordam com dados anteriores da literatura (ARIAS et al., 2003; KÜHLWEIN; IRWIN, 2001; YOO et al., 2016). No entanto, a capacidade linfoestimuladora das mo-DCs não se mostrou elevada quando estas foram diferenciadas sob ação da MLT. Mais do que isso,

quando ambos os tipos celulares receberam o tratamento com o hormônio, a tendência observada anteriormente quanto ao aumento da proliferação em LT $CD8^+$, desapareceu. Nesse caso, no entanto, houve ainda uma leve tendência ao aumento da proliferação de LT $CD4^+$, o que pode sugerir uma possibilidade de haver certa preferência de mo-DCs, geradas sob ação da MLT, em estimular este subtipo de LT. Além disso, sendo a IL-2 uma citocina responsável por promover a ativação e expansão de LT, de maneira a concordar com estes achados iniciais, a concentração desta citocina no sobrenadante das co-culturas de DCs com LT + MLT tende a ser maior, apesar de não haver diferença estatística significante.

De acordo com Maestroni e Conti (1990), de fato, linfócitos $CD4^+$ sofrem estimulação – *in vitro* – pela ação da MLT. Também, há dados a respeito da presença de sítios de ligação com alta afinidade para a MLT em LT CD4 e sobre a MLT poder se ligar 10 vezes mais em linfócitos T do que em B, além de aparentar "preferir" células T $CD4^+$ a $CD8^+$ (GONZALEZ-HABA et al., 1995). No entanto, até onde se pode ver, não há relatos sobre qualquer preferência de APCs, sob a ação da MLT, por ativar LT CD4. O que poderia, talvez, explicar os resultados aqui sugeridos seria um possível efeito da MLT em diminuir a capacidade das DCs de efetuarem apresentação cruzada, estimulando preferencialmente, assim, os linfócitos CD4. Também, há possibilidade dos monócitos, quando tratados com MLT, tenderem a gerar algum subtipo de DC com menor capacidade de apresentar antígenos aos LT CD8, tendo como base o fato de que alguns subtipos de DCs são menos especializados em realizar apresentação cruzada (BACHEM et al., 2010).

Ainda em relação a mo-DCs geradas sob efeito da MLT, no ensaio de sincronização utilizado neste estudo, apesar de resultados inconclusivos, é possível observar uma tendência "protetora" da MLT quando utilizada como tratamento prévio à sincronização das culturas. Independente da sincronização, as culturas que receberam tratamento com o hormônio durante duas horas e foram então manipuladas a cada 12 horas, apresentaram uma tendência menor à redução das moléculas coestimulatórias - o que corrobora a hipótese de que a MLT pode agir em monócitos influenciando a biologia das DCs por eles geradas.

Quanto à capacidade de estimular LT, as DCs provenientes do protocolo de sincronização mostraram-se também levemente mais eficientes quanto à estimular as células $CD4^+$, observada pela porcentagem de proliferação e aumento da expressão de $CD25^+$ neste tipo celular, concordando também com os achados

anteriores e da literatura (GONZALEZ-HABA et al., 1995; KIM; PYO; KIM, 2000; MEDRANO-CAMPILLO et al., 2015). No entanto, ao se analisar a capacidade de ativação de LT das DCs geradas apenas sob o tratamento de 2 horas com a MLT nos ensaios de sincronização (grupo MLT) e também nos ensaios de linfoestimulação com mo-DCs de pacientes, diferente do encontrado anteriormente, a tendência ao aumento da estimulação de LT CD4 não foi verificada. Provavelmente, esta incoerência poderia ser explicada pelo "n" reduzido utilizado nos primeiros ensaios.

Ainda sobre o ensaio de sincronização aqui utilizado, especula-se que a sincronização das culturas possa não ter sido obtida devido ao protocolo utilizado. A tentativa de sincronização das culturas foi baseada em dados já bem descritos na literatura que indicam que, assim como todo o organismo, o sistema imune também sofre oscilações circadianas havendo relatos de oscilações rítmicas em praticamente todas as células que o compõe (ANDO et al., 2015; BAUMANN et al., 2013; BORN et al., 1997; HAUS; SMOLENSKY, 1999; OISHI et al., 2006; KELLER et al., 2009; MAZZOCCOLI et al., 2011; NGUYEN et al., 2013). Ao mesmo tempo, há evidências de que células mantidas em cultura por um longo período, por não estarem mais expostas aos sinais de regulação do sistema nervoso central, passam a apresentar oscilações não-rítmicas (revisto por REPPERT; WEAVER, 2002). Nesse sentido, sendo a MLT um regulador natural do rítmo circadiano no organismo, optou-se pela adição deste hormônio como um regulador das oscilações das culturas de mo-DCs. Diante da aparente "falha" da sincronização pela MLT, pode-se especular que, talvez, outros protocolos propostos pela literatura tivessem surtido efeito, como aquele que propõe a adição de uma alta concentração de soro ao meio de cultura por algumas horas (HANSSEN et al., 2016; HUANG, 2009), ou o tratamento com a MLT precedido pela sincronização com soro (XIANG et al., 2012).

No entanto, é visível nos resultados obtidos pelo ensaio de sincronização realizado no presente estudo, que a manipulação das culturas a cada 12 horas prejudicou a expressão de todos os marcadores avaliados. Comparado-se as células manipuladas com as mo-DCs diferenciadas da maneira convencional - mesmo quando tratadas por 2 horas com MLT - percebe-se uma redução nítida na expressão das moléculas de membrana. Este fato, provavelmente é indício de que a manipulação das células afeta sua diferenciação e provoca diminuição da expressão de moléculas co-estimuladoras pelas DCs (observação que é coerente com a

observação de nosso grupo em diversos outros estudos). Portanto, ainda que outros protocolos de sincronização fossem testados, seria bastante improvável que surtissem efeitos no que se refere ao aumento da capacidade estimuladora das DCs.

Se a MLT não teve efeito sobre as DCs de indivíduos saudáveis, ainda se poderia esperar que o tivesse sobre células de pacientes, caso a hipótese aqui testada estivesse correta. Entretanto, mesmo quando utilizada para tratar células de pacientes, a MLT não gerou efeitos indiscutivelmente significativos. No entanto, a hipótese de que a MLT seria capaz de agir em monócitos e, consequente, em mo-DCs, não pode ser completamente negada. Nesse sentido, se observados os padrões de expressão dos diversos marcadores é possível perceber uma tendência da MLT a gerar homogeneidade das células de pacientes, tanto no que se refere à expressão de moléculas de membrana, quanto em relação às concentrações de citocinas encontradas nos sobrenadantes.

Considerando-se que os tumores das pacientes tendem a ser bastante heterogêneos e que esta heterogeneidade poderia se refletir no comportamento das células estudadas, a homogenização fenotípica obtida pela MLT parece sugerir que, nestas condições, o hormônio age, de fato, como um sincronizador destas células. Fenômeno semelhante pode ser observado em relação às citocinas avaliadas: aparentemente, a MLT também age como normalizadora dos valores de TNF e IL-12p70 encontrados para pacientes. Aqui, contradizendo a “ausência” de diferenças entre pacientes e doadoras saudáveis, as células das pacientes foram mais responsivas à MLT. Esta observação poderia estar relacionada aos níveis de MLT encontrados em pacientes, que a literatura descreve como menores em pacientes portadoras de câncer (BARTSCH et al., 1981; BLASK; SAUER; DAUCHY, 2002; SCHERNHAMMER; HANKINSON, 2005; TAMARKIN et al., 1982). Por outro lado, prosseguindo-se a especulação anterior quanto à variedade de fatores modificando o fenótipo das células, o fato de a MLT ter “normalizado” o mesmo pode sugerir que, de fato, o hormônio tenha um efeito não “ativador”, mas “regulador” sobre as DCs das pacientes.

No mesmo sentido, vale ressaltar que, quando se comparou o efeito da MLT sobre as DCs e se considerou o subtipo tumoral, notou-se que os tumores com superexpressão de Her-2 e os triplo-negativos, apresentaram uma responsividade ainda maior à MLT. É intrigante notar que tumores de mama com superexpressão de

Her-2 apresentam níveis mais altos de receptores de membrana da MLT (MT1), em comparação aos outros subtipos (JABLONSKA et al., 2013).

Também nas pacientes foram encontradas “sugestões” de efeito da MLT em relação às moléculas CD124 e CD83. Nas células das pacientes com tumores do tipo triplo-negativo, o hormônio agiu no sentido de reduzir a expressão de CD124 e de aumentar a expressão de CD83, no sexto dia da diferenciação – evidências estas que são compatíveis com a hipótese de maior responsividade por células de pacientes portadoras de tumores mais agressivos.

Ainda quanto à expressão da molécula CD124 nas pacientes, pode-se notar uma relação entre esta e o infiltrado linfocitário nos tumores. Foi observado que as pacientes que apresentavam infiltrado linfocitário caracterizado (pelo laudo do exame anatomopatológico) como “escasso e focal”, apresentavam níveis mais baixos de expressão da molécula CD124 ao final da diferenciação das mo-DCs. Esta diferença mostrou-se ainda mais forte (estastísticamente) quando estas células foram geradas sob ação da MLT. Mais uma vez, corroborando a ideia de que a MLT age de maneira a reduzir a heterogeneidade das culturas.

No entanto, esta característica “normalizadora” da MLT não se evidencia apenas em culturas de pacientes – apesar de serem mais frequentes nesses casos. Foi possível perceber que, ao longo da diferenciação de mo-DCs a partir de células de doadoras saudáveis, um aumento significativo de TNF nos sobrenadantes – se comparados dia 1 com dia 6, ou seja, o início e o final da cultura - só se evidencia quando as células foram tratadas com MLT. O mesmo pode ser observado com relação à diminuição significativa de IL-1β.

Ainda nas células advindas das doadoras saudáveis, foi possível verificar um efeito claro da MLT quanto às concentrações de TNF, IFN-γ e IL-2 nas co-culturas de mo-DCs e LT, de modo a elevá-las, o que não se verifica nas pacientes. É possível que a falta de ação da MLT sobre as co-culturas de pacientes quanto a estes fatores, seja devida ao fato destas já apresentarem níveis estatísticamente mais elevados de TNF, IFN-γ, IL-2 sem o tratamento, enquanto em doadoras saudáveis, é a MLT que leva à produção significativa destas citocinas, o que é coerente com dados da literatura (COLOMBO et al., 1992; GARCÍA-MAURIÑO et al., 1997; LISSONI, 2000; SANTELLO et al., 2008).

Tomados em conjunto, pode-se afirmar que os dados apresentados quanto aos possíveis efeitos gerados nas células pelo tratamento com a MLT, indicam que o

hormônio pode apresentar efeito, se não como um potencializador da resposta imune, ao menos como um sincronizador de culturas *in vitro* de maneira a reduzir as variações comumente encontradas quando utilizados seres humanos e DCs como sujeitos e objetos dos estudos. De fato, já foi relatado, por exemplo, que a MLT é capaz de ressincronizar um padrão rítmico de expressão gênica, corrigindo defeitos na expressão de padrões de vários genes responsáveis pelo desenvolvimento de câncer (JUNG-HYNES et al., 2010), mas não foram encontrados relatos direcionados especificamente ao controle de variação da expressão de moléculas de membrana em células do sistema imune.

Ainda, é possível especular que a MLT seria capaz de agir na diferenciação das mo-DCs de indivíduos saudáveis no sentido de induzir um perfil Th1 nos linfócitos por elas ativados, o que concorda com um relato antigo da literatura (GARCÍA-MAURIÑO et al., 1999). Também pode-se dizer que, em pacientes, este efeito não seria observado pelo fato de as mo-DCs já se evidenciarem neste estado de ativação.

Nesta mesma linha, o que também não deve ser ignorado, apesar de não terem sido verificados defeitos na maturação das mo-DCs de pacientes, são as diferenças entre pacientes e saudáveis, evidenciadas neste estudo.

Partindo da ideia inicial de que pacientes com câncer apresentariam um fenótipo de APCs menos ativadas e, consequentemente um déficit em sua capacidade de induzir proliferação de LT, o esperado seria um perfil de citocinas imunossupressoras nos sobrenadantes – tanto das co-culturas quanto das culturas de mo-DCs. Teoricamente, o esperado para pacientes seria uma disfunção na produção de IL-12, que poderia resultar em diminuição da produção de IFN-γ pelos LT. No entanto, o que se observou foi que as mo-DCs das pacientes não apresentam defeitos na expressão de moléculas co-estimuladoras e nem disfunções quanto às citocinas encontradas nos sobrenadantes.

Uma hipótese que pode ser aqui levantada é a de que, pelo fato das culturas de mo-DCs terem sido realizadas por meio do plaqueamento de PBMCs e posterior retirada das células não aderentes, possivelmente podem ter restado linfócitos nas culturas que, nos momentos iniciais da diferenciação, possam ter produzido citocinas e ou fatores de transcrição capazes de alterar os monócitos no sentido de gerarem DCs que apresentassem um estado de ativação adequado para estimulação de LT. Quanto a isso, há estudos que mostram que linfócitos do sangue

periférico de pacientes portadoras de câncer de mama produzem altos níveis de TNF e IFN-γ (RUBBERT et al., 1991). Outro estudo, ainda, apontou que pacientes com câncer de mama, por possuirem maior concentração de TNF circulante, poderiam apresentar neutrófilos mais responsíveis contra o tumor (COMEN et al, 2016). Assim, especula-se o fato de que poderia haver citocinas advindas dos possíveis linfócitos contaminantes nas culturas de mo-DCs, como por exemplo TNF ou IFN-γ, agindo nos monócitos de pacientes de modo a corrigir qualquer possível defeito por eles apresentados.

No entanto, também foi constatado pelo presente estudo que os monócitos circulantes dentre as PBMCs das pacientes, apresentam uma maior expressão da molécula CD83. Ainda que não haja diferença estatística, estas células parecem apresentar, também, uma maior expressão de CD80 e CD86, aparentando um estado mais ativado em relação às células de doadoras saudáveis. Desta maneira, sendo já bem estabelecida a associação da inflamação com câncer (COHEN, 2015; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; MANTOVANI et al., 2008; VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012), na realidade o que pode estar acontecendo é uma ativação dos monócitos circulantes que acabem por gerar mo-DCs com fenótipo e função “normais”.

Ainda, além de verificados altos níveis de IL-12p70 ao final da diferenciação das mo-DCs - gerando uma ideia de ativação voltada para o perfil Th1 (TRINCHIERI et al., 1992) - foi também constatada uma diferença na concentração desta citocina entre pacientes e saudáveis. Aparentemente, no sobrenadante de mo-DCs de pacientes, estavam presentes maiores concentrações desta citocinas, quando comparados às culturas com células de doadoras saudáveis. Ainda, esta concentração mais alta pode estar relacionada com os níveis, também mais elevados, de IFN-γ nas co-culturas com LT. Sabe-se que a primeira citocina mencionada é essencial para a produção de IFN-γ, que por sua vez também tem efeito sobre a expressão de moléculas de MHC em DCs maduras (BANCHEREAU et al., 2000).

Nesse sentido, os níveis elevados de IL-10 observados nas co-culturas com mo-DCs de pacientes, poderiam concordar com os padrões esperados, já que a presença desta citocina pode ser considerada um mecanismo de escape comum associado ao crescimento tumoral (GILBOA, 1999; VILLUNGER; STRASSER, 1999). No entanto, ao observar o padrão desta citocina no gráfico de dispersão, o

que parece ocorrer é que este aumento na concentração média de IL-10 foi gerado por apenas algumas culturas que apresentaram um perfil mais imunossupressor, enquanto que a maioria, na realidade, parece apresentar níveis baixos desta citocina e muito semelhantes aos encontrados nas culturas de doadoras saudáveis.

Outra hipótese que pode ser relacionada com a maior concentração de IL-10 no sobrenadante de algumas co-culturas de pacientes, é a de que o perfil que pode estar sendo gerado nos LT estimulados por estas mo-DCs seria de linfócitos Tr1. Esta é uma subpopulação de linfócitos Treg que secreta altas concentrações de IL-10 e, ao mesmo tempo, não apresenta altos níveis de CD25 nem do fator de transcrição Foxp3 (LEVINGS et al., 2005; RONCAROLO et al., 2014; ZENG et al., 2015). Assim, pode-se supor, também, que as mo-DCs de algumas pacientes poderiam estar induzindo a polarização dos linfócitos para um perfil de Tr1 e, por apresentarem expressão reduzida de CD25, estes linfócitos não estariam consumindo a IL-2 produzida, justificando sua maior concentração.

Em suma, os dados fornecidos por este estudo não permitem confirmar nem derrubar nenhuma das hipóteses quanto às citocinas encontradas nos sobrenadantes das culturas. Assim, é cabível que outros estudos sejam realizados nesse sentido, a fim de esclarecer o perfil que as mo-DCs provenientes de pacientes com câncer de mama são capazes de gerar, levando-se em conta a grande variação que pode ser encontrada nestes casos.

Justamente em relação às já citadas variações aqui observadas, levantou-se a hipótese de que as diversas variações encontradas nos ensaios realizados com os monócitos e DCs neste estudo, poderiam estar relacionadas à qualidade do sono das doadoras, já que, além de a exposição à luminosidade em períodos noturnos bloquear a produção da MLT no organismo (ZEITZER et al., 2000), há relatos de que ao longo do sono noturno ocorrem importantes alterações no sistema imune, tais como aumento da produção de IL-2 e IFN-γ por LT e monócitos (LANGE et al., 2006LISSONI et al., 1998; PETROVSKY; MCNAIR; HARRISON, 1998). Para complementar a pesquisa acerca de mo-DCs em doadores saudáveis e em pacientes portadoras de carcinoma mamário, optou-se pela aplicação de um questionário para avaliação subjetiva da qualidade do sono no mês anterior à aplicação do mesmo. O questionário utilizado (PSQI) avalia 7 componentes dentre os quais estão a latência, duração, eficiência e distúrbios do sono, que podem ser mais intimamente relacionados com a produção de MLT durante a noite. A análise

dos questionários aponta para um problema maior entre as pacientes quanto à latencia do sono. Este fato pode ter relação direta com o diagnóstico da doença, proximidade da data da cirurgia para retirada do tumor e, até, efeitos colaterais causados pelos tratamentos. Outro ponto relatado pelas pacientes foi o aumento da ingestão de água e, consequentemente, da vontade de urinar, quando estas haviam passado por tratamentos com quimioterápicos - o que fazia com que tivessem que acordar diversas vezes durante a noite. Todos estes fatores podem estar envolvidos com um maior nível de estresse e interrupções no sono ao longo da noite.

Nesse sentido, alguns estudos apontam para o fato de que há íntima relação entre a qualidade do sono e a incidência de tumores malignos. Por exemplo, um estudo relacionou a curta duração do sono por pessoas que trabalham em turnos noturnos com o aumento dos riscos de câncer, devido a geração de modificações epigenéticas que afetam a expressão de genes relacionados ao câncer e participam da regulação da divisão celular e do reparo do DNA (VON RUESTEN et al., 2012). Além disso, há relatos da influência da exposição à luz em períodos noturnos na diminuição da produção de MLT (HAUS; SMOLENSKY, 2013; LEWY et al., 1980; NAVARA; NELSON, 2007; ZEITZER et al., 2000) e no aumento do risco de câncer de mama (DAVIS; MIRICK; STEVENS, 2001). Também, em 2007, a IARC categorizou turnos de trabalho que envolvem interrupção do rítmo circadiano como provável fator carcinogênico para humanos.

Em contrapartida à menor latência do sono, de acordo com as análises dos questionários, as pacientes parecem dormir por um período maior de tempo, informação subentendida pela apresentação de scores entre 0 e 1, indicativo de pouca ou nenhuma dificuldade, pela maioria das pacientes. Especulações acerca deste ponto podem direcionar para o fato de que boa parte das pacientes incluídas no estudo não estavam trabalhando no momento da aplicação do quesitonário, podendo, assim, dormir por mais tempo do que as doadoras saudáveis que, em sua maioria, eram funcionárias ou alunas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Além disso, frequentemente as pacientes recebem orientação dos médicos para fazerem repouso durante o período de tratamento (no caso das que passaram por tratamento com quimioterapia antes da retirada do tumor). Assim, era comum o relato pelas pacientes de que procuravam dormir mais cedo e acordar mais tarde para descansarem, por orientação médica.

Observando estes resultados, não é de se estranhar o fato de que não houve diferença entre o score global, obtido pela soma dos scores de todos os componentes do questionário, entre pacientes e saudáveis. O que ocorre é que alguns componentes são mais problemáticos para um grupo do que para o outro, e vice-versa, fazendo com que as diferenças se neutralizem no score global.

Em resumo, o dados obtidos pelo presente estudo, abrem inúmeros caminhos acerca de efeitos da MLT sobre as células do sistema imune. Ainda, o estudo chama a atenção para as muitas variações que podem influenciar estudos com seres humanos e, principalmente, com pacientes portadores de uma doença com características tão diversas. Nesse sentido, fica bastante claro que muito ainda precisa ser pesquisado com relação à MLT e seu envolvimento no sistema imune, no câncer, e também, em relação à biologia das DCs.

6 CONCLUSÕES

- O tratamento de monócitos, tanto de doadoras saudáveis quanto de pacientes portadoras de carcinoma mamário, com MLT por 15 minutos não gerou alterações nos níveis de STAT-6, pSTAT-6 e SOCS-5;

- Monócitos de pacientes portadoras de carcinoma mamário, sob estímulo da IL-4, apresentaram menor quantidade de pSTAT-6 se comparados com as mesmas células de doadoras saudáveis;

- A MLT não alterou o fenótipo das células, tanto de pacientes quanto de doadoras saudáveis, ao longo da diferenciação de mo-DCs;

- A MLT não foi capaz de gerar alterações nas concentrações de citocinas presentes nos sobrenadantes ao longo da diferenciação de mo-DCs, tanto de doadoras saudáveis quanto de pacientes;

- A MLT não alterou a função de mo-DCs quanto à capacidade de proliferação de LT alogeneicos;

- A MLT foi capaz de promover o aumento das concentrações de TNF, IL-2 e IFN-γ no sobrenadante de co-culturas de mo-DCs de doadoras saudáveis com LT alogeneicos, mas não teve efeito significativo nesse sentido quando utilizadas mo-DCs de pacientes.

REFERÊNCIAS

ABRUZZI, K. C. et al. Drosophila CLOCK target gene characterization: implications for circadian tissue-specific gene expression. **Genes & develop.**; v. 25, n. 22, p. 2374-2386, 2011.

ALBERT, M. L. et al. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via αvβ5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. **J Exp Med**; v. 188, n. 7, p. 1359-1368, 1998.

ANDO, N. et al. Allergen-specific basophil reactivity exhibits daily variations in seasonal allergic rhinitis. **Allergy;** v. 70, p. 319-322, 2015.

ANDREWS, A. et al. IL-4 receptor α is an important modulator of IL-4 and IL-13 receptor binding: implications for the development of therapeutic targets. **J. Immunol.**; v. 176, n. 12, p. 7456-7461, 2006.

ANTUNES, A. A. et al. Pure sarcomatous recurrence of clear cell renal carcinoma following radical nephrectomy and dendritic cell vaccination. **Med. J.**; v. 124, n. 3, p. 161-162, 2006.

ANYAEGBU, C. C. et al. Chemotherapy enhances cross-presentation of nuclear tumor antigens. **PLoS One**; v. 9, n. 9, p. e:107894, 2014.

ARENDT, J.; SKENE, D. J. Melatonin as a chronobiotic. **Sleep Med. Rev.**; v. 9, n. 1, p. 25-39, 2005.

ARJONA, A.; SARKAR, D. K. Circadian oscillations of clock genes, cytolytic factors, and cytokines in rat NK cells. **J. Immunol.;** v. 174, n. 12, p. 7618-7624, 2005.

BACHEM, A. et al. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+ CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. **J. Exp. Med.;** v. 207, n. 6, p. 1273-1281, 2010.

BALEEIRO, R. B. et al. High frequency of immature dendritic cells and altered in situ production of interleukin-4 and tumor necrosis factor-alpha in lung cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**; v. 57, n. 9, p. 1335-1345, 2008.

BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**; v. 18, n. 1, p. 767-811, 2000.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-252, 1998.

BARBUTO, J. A. M. et al. Dendritic cell–tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. **Cancer Immunol. Immunother.;** v. 53, n. 12, p. 1111-1118, 2004.

BARNI, S. et al. A randomized low-dose subcutaneous interleukin-2 plus melatonin versus supportive care alone in metastatic colorectal cancer patients progressing under 5- uorouracil and folates. **Oncology**, v. 52, p. 243-245, 1995.

BARTSCH, C. et al. Urinary melatonin levels in human breast cancer patients. **J. Neural Transm.**, v. 52, n. 4, p. 281-294, 1981.

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BAUMANN, A. et al. The circa- dian clock is functional in eosinophils and mast cells. **Immunology**, v. 140, p. 465-474, 2013.

BLASK, D. E.; SAUER, L. A.; DAUCHY, R. T. Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. **Cur. Top. Med. Chem.**; v. 2, n. 2, p. 113-132, 2002.

BOOTHROYD, C. E. et al. Integration of light and temperature in the regulation of circadian gene expression in Drosophila. **PLoS Genet.**; v. 3, n. 4, p. e54, 2007.

BORN, J. et al. Effects of sleep and circadian rhythm on human circulating immune cells. **J. Immunol.**; v.158, p. 4454–4464, 1997.

BAUER, C. A. et al. Dynamic Treg interactions with intratumoral APCs promote local CTL dysfunction. **J. Clin. Invest**.; v. 124, n. 6, p. 2425–2440, 2014.

BERTOLAZI, A. N. et al. Validation of the Brazilian Portuguese version of the Pittsburgh Sleep Quality Index. **Sleep Med.**; v.12, p. 70-75, 2011.

BIERIE, B.; MOSES, H. L. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. **Cytokine Growth Factor Rev.**; v. 21, n. 1, p. 49-59, 2010.

BOMBONATI, A.; SGROI, D. C. The molecular pathology of breast cancer progression. **J. Pathol.**; v. 223, p. 307:317, 2011.

BUYSSE, D. J. et al. The Pittsburgh Sleep Quality Index: A new instrument for psychiatric practice and reasearch. **Psychiatric Res.**; v. 28, p. 193-213, 1988.

CARDINALI, D. P.; PÉVET, P. Basic aspects of mlatonin action. **Sleep Med. Rev.**; v. 2, n.3, p. 175-190, 1998.

CARILLO-VICO, A. et al. Human lymphocyte-synthesized melatonin is involved in the regulation of the interleukin-2/interleukin-2 receptor system. **J. Clin. Endocrinol. Metab**.; v.90, p. 992–1000, 2005.

CAROLEO, M.; DORIA, G.; NISTICO, G. Melatonin Restores Immunodepression in Aged and Cyclophosphamide-Treated Mice. **Ann. NY Acad. of Sci.**; v. 719, n. 1, p. 343-352, 1994.

CARRILLO-VICO, A. et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological. **Faseb J**.; v. 18, n. 3, p. 537-539, 2004.

CASTELLANO, G. et al. Dendritic cells and complement: at the cross road of innate and adaptive immunity. **Molecular Immunol.**; v. 41, n. 2, p. 133-140, 2004.

CHEN, H. et al. MyD88 expression is required for efficient cross-presentation of viral antigens. **J. Virol.**; v. 79, n. 5, p. 2964-2972, 2005a.

CHEN, H. M. et al. Delayed neutrophil apoptosis attenuated by melatonin in human acute pancreatitis. **Pancreas**, v. 31, n. 4, p. 360-364, 2005b.

CLAVIJO-SALOMON, M. A. et al. Monocyte-derived dendritic cells reflect the immune functional status of a chromophobe renal cell carcinoma patient: Could it be

a general phenomenon? **Cancer Immunol. Immunother.**; v. 64, n. 2, p. 161-171, 2015.

COHEN, E. N. et al. Inflammation mediated metastasis: immune induced epithelial-to-mesenchymal transition in inflammatory breast cancer cells. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0132710, 2015.

COLOMBO, L.; CHEN J.; LOPEZ, C.; WATSON, R. Melatonin induced increase in gamma-interferon production by murine splenocytes. **Immunol. Lett**.; v. 33, p. 123–126, 1992.

COMEN, E. et al. TNF is a key cytokine mediating neutrophil cytotoxic activity in breast cancer patients. **NPJ Breast Cancer**, v. 20, n. 2, p. 16009, 2016.

CORBEN, A. D. Pathology of invasive breast disease. **Surgical Clinic. of North Am.**; v. 93, n. 2, p. 363-392, 2013.

COULIE, P. G. et al. Precursor frequency analysis of human cytolytic T lymphocytes directed against autologous melanoma cells. **Int. J. Cancer**; v. 50, n. 2, p. 289-297, 1992.

CURRIER, N.; SUN, L.-Y.; MILLER, S. Exogenous melatonin: quantitative enhancement in vivo of cells mediating non-specific immunity. **J. Neuroimmunol.**; v. 104, n. 2, p. 101-108, 2000.

CURTIS, A. M. et al. Circadian control of innate immunity in macrophages by miR-155 targeting Bmal1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**; v. 112, n. 23, p. 7231-7236, 2015.

CURTIS, C. et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 346-352, 2012.

DALL'OGLIO, M.; SROUGI, M.; BARBUTO, J. A. Complete response of metastatic renal cancer with dendritic cell vaccine. **Int. Braz. J. Urol.;** v. 29, n.6, p. 517-519, 2003.

DARNELL, J. E. Studies of IFN-induced transcriptional activation uncover the Jak-Stat pathway. **J. Interferon Cytokine Res.**; v. 18, n. 8, p. 549-554, 1998.

DAVIS, I. D. et al. Blood dendritic cells generated with Flt3 ligand and CD40 ligand prime CD8+ T cells efficiently in cancer patients. **J. Immunother.**; v. 29, n. 5, p. 499-511, 2006.

DAVIS, S.; MIRICK, D. K.; STEVENS, R. G. Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.;** v. 93, n. 20, p. 1557-1562, 2001.

DEL CORNÒ, M. et al. Regulation of dendritic cell function by dietary polyphenols. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**; v. 56, n. 5, p. 737-747, 2016.

DELLA BELLA, S. et al. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. **Br. J. Cancer**; v. 89, n. 8, p. 1463-1472, 2003.

DI BELLA, G. et al. Evaluation of the safety and e cacy of the rst-line treatment with somatostatin combined with melatonin, retinoids, vitamin D3, and low doses of

cyclophosphamide in 20 cases of breast cancer: A preliminary report. **Neuroendocrinol. Lett.**; v. 34, p. 660-668, 2013.

DIAO, Y. et al. Doxorubicin-loaded PEG-PCL copolymer micelles enhance cytotoxicity and intracellular accumulation of doxorubicin in adriamycin-resistant tumor cells. **Int. J. Nanomedicine**; v. 6, p. 1955-1962, 2011.

DIMITRIOU, I. D. et al. Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins. **Immunol. Rev.**; v. 224, n. 1, p. 265-283, 2008.

DIMITROV, S. et al. Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. **Blood**, v. 113, n. 21, p. 5134-5143, 2009.

AZEVEDO-SANTOS, A. P S. **Efeito do microambiente tumoral sobre as características funcionais e fenotípicas de células dendríticas geradas in vitro a partir de monócitos do sangue periférico de voluntárias saudáveis e de pacientes com câncer de mama**. 2010. 115 p. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DU, Y. C. et al. Fusion of CpG-ODN-stimulating dendritic cells with Lewis lung cancer cells can enhance anti-tumor immune responses. **Tissue Antig.**; v. 67, n. 5, p. 368-376, 2006

DU, Y. et al. Circadian expression of clock and screening of clock-controlled genes in peripheral lymphocytes of rat. **Biochem. Biophys. Res. Commun.;** v. 336, n. 4, p. 1069-1073, 2005.

EGEBLAD, M.; NAKASONE, E. S.; WERB, Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. **Developmental cell**.; v. 18, n. 6, p. 884-901, 2010.

FRIEDL, P.; GUNZER, M. Interaction of T cells with APCs: the serial encounter model. **Trends in immunol.;** v. 22, n. 4, p. 187-191, 2001.

GABRILOVICH, D. I. et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. **Nat. Med.**; v. 2, n. 10, p. 1096-1103, 1996.

GARCIA-MARQUEZ, M. A. et al. Results of a Phase II clinical trial with Id-protein-loaded dendritic cell vaccine in multiple myeloma: encouraging or discouraging? **J. Immunother.**; v. 4, n. 10, p. 991-994, 2012.

GARCÍA-MAURIÑO, S. et al. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. **Life Sci.;** v. 65, n. 20, p. 2143-2150, 1999.

GARCÍA-MAURIÑO, S.; GONZALEZ-HABA, G. et al. Melatonin enhances IL-2, IL-6, and IFN-gamma production by human circulating CD4+ cells: a possible nuclear receptor-mediated mechanism involving T helper type 1 lymphocytes and monocytes. **J. Immunol**.; v.159, p. 574–581, 1997.

GAUGLER, B. et al. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. **J. Exp. Med.;** v. 179, n. 3, p. 921-930, 1994.

GERDES, J.et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int. J. Cancer**; v. 31, p. 13-20, 1983.

GILAD, E. et al. Melatonin receptors in PC3 human prostate tumor cells. **J. Pineal Res**.; v. 26, n. 4, p. 211-220, 1999.

GILBOA, E. How tumors escape immune destruction and what we can do about it. **Cancer Immunol. Immunother.;** v. 48, n. 7, p. 382-385, 1999.

GILLIET, M. et al. Human dendritic cells activated by TSLP and CD40L induce proallergic cytotoxic T. **J. Exp. Med.**; v. 197, n. 8, p. 1059-1063, 2003.

GONZALEZ-HABA, M. G. et al. High-affinity binding of melatonin by human circulating T lymphocytes (CD4+). **FASEB J.**; v. 9, n. 13, p. 1331-1335, 1995.

GONZALEZ, R. P. **Diferenciação de células mononucleares do sangue periférico humano em células dendríticas: vias de sinalização e efeitos da melatonina sobre o fenótipo e função de células geradas in vitro.** 2014. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 883-899, 2010.

HANSSEN, J. et al. Synchronized human skeletal myotubes of lean, obese and type 2 diabetic patients maintain circadian oscillation of clock genes. **Sci. Rep.**; v. 6, 2016.

HARGADON, K. M. et al. Melanoma-derived factors alter the maturation and activation of differentiated tissue-resident dendritic cells. **Immunol. Cell. Biol.;** v. 94, n. 1, p. 24-24, 2016.

HAUS, E. L.; SMOLENSKY, M. H. Biologic rhythms in the immune system. **Chronobiol. Int.**; v.16, p. 581–622, 1999.

HAUS, E. L.; SMOLENSKY, M. H. Shift work and cancer risk: potential mechanisms roles os circadian disruption, light at night, and sleep deprivation. **Sleep Med. Reviews**; v. 17, p. 273-284, 2013.

HAYASHI, M.; SHIMBA, S.; TEZUKA, M. Characterization of the molecular clock in mouse peritoneal macrophages. **Biol. Pharm. Bull.;** v. 30, n. 4, p. 621-626, 2007.

HEINRICH, P. C. et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochem. J.**; v. 374, n. Pt 1, p. 1-20, 2003.

HENDERSON, R. A.; WATKINS, S. C.; FLYNN, J. L. Activation of human dendritic cells following infection with Mycobacterium tuberculosis. **J. Immunol.**; v. 159, n. 2, p. 635-643, 1997.

HILL, S. M.; BLASK, D. E. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. **Cancer Res.**; v. 48, n. 21, p. 6121-6126, 1988.

HU, D. N.; ROBERTS, J. E. Melatonin inhibits growth of cultured human uveal melanoma cells. **Melanoma Res.**; v. 7, n. 1, p. 27-31, 1997.

HU, J. et al. SOCS2 influences LPS induced human monocyte-derived dendritic cell maturation. **PloS one**, v. 4, n. 9, 2009.

HUANG, T. et al. Induction of circadian rhythm in cultured human mesenchymal stem cells by serum shock and cAMP analogs in vitro. **Chronobiol. Int.;** v. 26, n. 2, p. 242-257, 2009.

IARC **Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2007) Painting, fire-fighting, and shiftwork**. Lyon (France); IARC. IARC monographs on the evaluation of carcino- genic risks to humans; vol. 98.

IARC. World cancer report 2014. **International Agency for Research on Cancer - WHO Press**, 2014. 630 pages.

IDOYAGA, J. et al. Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. **J. Clin. Invest.**; v. 123, n. 2, p. 844, 2013.

IMAI, Y.; YAMAKAWA, M.; KASAJIMA, T. The lymphocyte-dendritic cell system. **Histol. Histopathol**.; v. 13, n. 2, p. 469-510, 1998.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2016. **Ministério da Saúde, Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2016.** Disponível em: http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf. Acesso em: Acesso em: 31, ago, 2016.

IWAMOTO, M. et al. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. **Int. J. Cancer**; v. 104, n. 1, p. 92-97, 2003.

JABLONSKA, K. et al. Expression of melatonin receptor MT1 in cells of human invasive ductal breast carcinoma. **J. Pineal Res.;** v. 54, n. 3, p. 334-345, 2013.

JACKSON, S. H. et al. Dendritic cell maturation requires STAT1 and is under feedback regulation by suppressors of cytokine signaling. **J. Immunol.**; v. 172, n. 4, p. 2307-2315, 2004.

JAMES, S. P. et al. The effect of melatonin on normal sleep. **Neuropsychopharmology**, v. 1, n. 1, p. 41-44, 1987.

JONULEIT, H.; KNOP, J.; ENK, A. H. Cytokines and their effects on maturation, differentiation and migration of dendritic cells. **Arch. Dermatol. Res.**; v. 289, n. 1, p. 1-8, 1996.

JUNG‐HYNES, B. et al. Melatonin resynchronizes dysregulated circadian rhythm circuitry in human prostate cancer cells. **J. Pineal Res.;** v. 49, n. 1, p. 60-68, 2010.

KAH-WAI, L. et al. Dendritic cells heterogeneity and its role in cancer immunity. **J. Cancer Res. and Therapeutics**; v. 2, n. 2, p. 35, 2006.

KANISHI, Y. et al. Differential growth inhibitory effect of melatonin on two endometrial cancer cell lines. **J. Pineal Res.**; v. 28, n. 4, p. 227-233, 2000.

KARBOWNIK, M.; LEWINSKI, A.; REITER, R. J. Anticarcinogenic actions of melatonin which involve antioxidative processes: comparison with other antioxidants. Int **J. Biochem. Cell. Biol.**; v. 33, n. 8, p. 735-753, 2001.

KELLER, M. et al. A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. **Proceed. Natl. Acad. Sci**.; v. 106, p. 21407–21412, 2009.

KIM, Y.; PYO, M.; KIM, J. Influence of melatonin on immunotoxicity of lead. **Int. J. Immunopharmacol.;** v. 22, n. 10, p. 821-832, 2000.

KÜHLWEIN, E.; IRWIN, M. Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine expression. **J. Neuroimmunol.;** v. 117, n. 1, p. 51-57, 2001.

KYTE, J. A.; GAUDERNACK, G. Immuno-gene therapy of cancer with tumour-mRNA transfected dendritic cells. **Cancer Immunol. Immunother.;** v. 55, n. 11, p. 1432-1442, 2006.

LANGE, T. et al. Shift of monocyte function toward cellular immunity during sleep. **Arch. Intern. Med.;** v. 166, n. 16, p. 1695-1700, 2006.

LEVINGS, M. K. et al. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+ CD4+ Tr cells. **Blood,** v. 105, n. 3, p. 1162-1169, 2005.

LEWY, A. J. et al. Light suppresses melatonin secretion in humans. **Science**, v. 210, n. 4475, p. 1267-1269, 1980.

LIN, M. L. et al. The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets. **Immunol. Cell. Biol.**; v. 86, n. 4, p. 353-362, 2008.

LINDER, M.; SCHIRRMACHER, V. Tumour cell–dendritic cell fusion for cancer immunotherapy: comparison of therapeutic efficiency of polyethylene-glycol versus electro-fusion protocols. **Eur. J. Clin. Invest.;** v. 32, n. 3, p. 207-217, 2002.

LISSONI, P. et al. Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans. **Nat. Immun.;** v. 16, n. 1, p. 1-5, 1998.

LISSONI, P. et al. Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: A randomized trial. **J. Pineal Res.**; v. 35, p.12-15, 2003.

LISSONI, P. Modulation of anticancer cytokines IL-2 and IL-12 by melatonin and the other pineal indoles 5-Methoxytryptamine and 5-Methoxytryptophol in the treatment of human neoplasms. **Ann. NY Acad. Sci.;** v. 917, n. 1, p. 560-567, 2000.

LOTUFO, C. et al. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. **Eur. J. Pharmacol.**; v. 430, n. 2, p. 351-357, 2001.

LUFT, T. et al. Adaptive functional differentiation of dendritic cells: integrating the network of extra-and intracellular signals. **Blood**, v. 107, n. 12, p. 4763-4769, 2006.

LUTZ, M. B. et al. Differential functions of IL-4 receptor types I and II for dendritic cell maturation and IL-12 production and their dependency on GM-CSF. **J. Immunol.**; v. 169, n. 7, p. 3574-3580, 2002.

MACKEY, M. F. et al. Cutting edge: dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. **J. Immunol.;** v. 161, n. 5, p. 2094-2098, 1998.

MAESTRONI, G. J. M.; CONTI, A. The pineal neurohormone melatonin stimulates activated CD4+, Thy-1+ cells to release opioid agonist (s) with immunoenhancing and anti-stress properties. **J. Neuroimmunol.;** v. 28, n. 2, p. 167-176, 1990.

MANOHARAN, I. et al. TLR2-Dependent Activation of β-Catenin Pathway in Dendritic Cells Induces Regulatory Responses and Attenuates Autoimmune Inflammation. **J. Immunol.**; v. 193, n. 8, p. 4203-4213, 2014.

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 436-2008.

MARTÍNEZ-ARRIBAS, F. et al. Proliferation measurement in breast cancer by two different methods. **Anticancer Res.**; v. 26, p. 199-202, 2006.

MAZZOCCOLI, G. et al. A timetable of 24-hour patterns for human lymphocyte subpopulations. **J. Biol. Regulators Homeostatic Agents**; v. 25, p. 387-395, 2011.

MCALLISTER, S. S.; WEINBERG, R. A. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. **Nature Cell Biol.;** v. 16, n. 8, p. 717, 2014.

MCCARTER, M. D. et al. Immunosuppressive dendritic and regulatory T cells are upregulated in melanoma patients. **Ann. Surg. Oncol.;** v. 14, n. 10, p. 2854-2860, 2007.

MEDRANO-CAMPILLO, P. et al. Evaluation of the immunomodulatory effect of melatonin on the T-cell response in peripheral blood from systemic lupus erythematosus patients. **J. Pineal Res.;** v. 58, n. 2, p. 219-226, 2015.

MENETRIER-CAUX, C. et al. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34+ progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. **Blood**, v. 92, n. 12, p. 4778-4791, 1998.

MORREY, K. M. et al. Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. **J. Immunol.**; v. 153, n. 6, p. 2671-2680, 1994.

NAGOSHI, E. et al. Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. **Cell**, v. 119, n. 5, p. 693-705, 2004.

NAVARA, K. J.; NELSON, R. J. The dar side of light at night: physiological, epidemiological, and ecological consequences. **J. Pineal Res.**; v. 43, n. 3, p. 215-224, 2007.

NESTLE, F. O. et al. Vaccination of melanoma patients with peptide-or tumorlysate-pulsed dendritic cells. **Nat. Medicine**; v. 4, n. 3, p. 328-332, 1998.

NEVES, A. R. **Estudo de diferenciação in vitro de células dendríticas derivadas de monócitos sanguineos: análise dos efeitos de diferentes condições de cultura no fenótipo imunoestimulador das células**. 2003. 95 f. Dissertação

(Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NGUYEN, K. D. et al. Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. **Science**, v. 341, p. 1483-1488, 2013.

OISHI, K. et al. Clock mutation affects circadian regulation of circulating blood cells. **J. Circadian Rhythms**; v. 4, p. 13-13, 2006.

PARLATO, S. et al. Expression of CCR-7, MIP-3beta, and Th-1 chemokines in type I IFN-induced. **Blood**; v. 98, n. 10, p. 3022-3029, 2001.

PETRANKA, J. et al. The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line. **J. Pineal Res.**; v. 26, n. 3, p. 129-136, 1999.

PETROVSKY, N.; MCNAIR, P.; HARRISON, L. C. Diurnal rhythms of pro-inflammatory cytokines: regulation by plasma cortisol and therapeutic implications. **Cytokine**, v. 10, n. 4, p. 307-312, 1998.

PINZON-CHARRY, A.; MAXWELL, T.; LÓPEZ, J. A. Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. **Immunol. Cell Biol.;** v. 83, n. 5, p. 451, 2005.

PIOLI, C. et al. Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. **Int. J. Immunopharm.;** v. 15, n. 4, p. 463-468, 1993.

PRINS, R. M. et al. Comparison of glioma-associated antigen peptide-loaded versus autologous tumor lysate-loaded dendritic cell vaccination in malignant glioma patients. **J. Immunother. (Hagerstown, Md.: 1997)**; v. 36, n. 2, p. 152, 2013.

RAMOS, R. N. et al. Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. **J. Leukoc. Biol.**; v. 92, n. 3, p. 673-682, 2012.

RASMUSSEN, C. L. et al. E ects of melatonin on physical fatigue and other symptoms in patients with advanced cancer receiving palliative care: A double-blind placebo-controlled crossover trial. **Cancer,** v. 121, p. 3727-3736, 2015.

REDBURN, D. A.; MITCHELL, C. K. Darkness stimulates rapid synthesis and release of melatonin in rat retina. **Visual Neurosci.**; v. 3, n. 5, p. 391-403, 1989.

REPPERT, S. M.; WEAVER, D. R. Coordination of circadian timing in mammals. **Nature**, v. 418, n. 6901, p. 935, 2002.

RODRIGUES, C. P. et al. Tolerogenic IDO+ dendritic cells are induced by PD-1-expressing mast cells. **Front. Immunol.;** v. 7, 2016.

ROJAS-CANALES, D. et al. Early exposure of interferon-γ inhibits signal transducer and activator of transcription-6 signalling and nuclear factor κB activation in a short-term monocyte-derived dendritic cell culture promoting 'FAST'regulatory dendritic cells. **Clin. Exp. Immunol.;** v. 167, n. 3, p. 447-458, 2012.

RONCAROLO, M. G. et al. Tr1 cells and the counter-regulation of immunity: natural mechanisms and therapeutic applications. Interleukin-10 in Health and Disease. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.;** v. 380, p. 39-68, 2014.

RUBBERT, A. et al. Functional characterization of tumor-infiltrating lymphocytes, lymph-node lymphocytes and peripheral-blood lymphocytes from patients with breast cancer. **Int. J. Cancer**.; v. 49, n. 1, p. 25-31, 1991.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **J. Exp. Med**.; v. 179, n. 4, p. 1109-1118, 1994.

SANTELLO, F, H. et al. Melatonin enhances pro‐inflammatory cytokine levels and protects against Chagas disease. **J. Pineal Res.;** v. 45, n. 1, p. 79-85, 2008.

SCHERNHAMMER, E. S.; HANKINSON, S. E. Urinary melatonin levels and breast cancer risk. **J. Natl. Cancer Inst.;** v. 97, n. 14, p. 1084-1087, 2005.

SEKI, Y. I. et al. Expression of the suppressor of cytokine signaling-5 (SOCS5) negatively regulates IL-4-dependent STAT6 activation and Th2 differentiation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.;** v. 99, n. 20, p. 13003-13008, 2002.

SERRA, K. P. et al. Nova classificação dos carcinomas da mama: procurando o luminal A. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 36, p. 575:580, 2014.

SHOEMAN, S. J.; BOTHA, M. A. The effect of melatonin treatment on reproductive efficiency in an accelerated lambing system. **J S Afr Vet Assoc**, v. 66, n. 4, p. 230-234,1995

SHURIN, M. R. et al. Inhibition of CD40 expression and CD40-mediated dendritic cell function by tumor-derived IL-10. Int. **J. Cancer**, v. 101, n. 1, p. 61-68, 2002.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**; v. 98, n. 19, p. 10869-10874, 2001.

SRIDHARAN, A. et al. Age-associated impaired plasmacytoid dendritic cell functions lead to decreased CD4 and CD8 T cell immunity. **Age**, v. 33, n. 3, p. 363-376, 2011.

SRINIVASAN, V. et al. Melatonin, environmental light, and breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**; v. 108, n. 3, p. 339-350, 2008.

STEINMAN, R. M. et al. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. **Human Immunol.**; v. 60, n. 7, p. 562-567, 1999.

STEINMAN, R. M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. **Annu. Rev. Immunol.**; v. 30, p. 1-22, 2012.

STEINMAN, R. M.; NUSSENZWEIG, M. C. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.;** v. 99, n. 1, p. 351-358, 2002.

STEINMAN, R. M.; WITMER, M. D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**; v. 75, n. 10, p. 5132-5136, 1978.

STEINMAN, R. The control of immunity and tolerance by dendritic cells. **Pathol. Biol.;** v. 51, n. 2, p. 59-60, 2003.

STOLFI, C. et al. Interleukin-25 fails to activate STAT6 and induce alternatively activated macrophages. **Immunol.**; v. 132, n. 1, p. 66-77, 2011.

SUN, K.; WANG, L.; ZHANG, Y. Dendritic cell as therapeutic vaccines against tumors and its role in therapy for hepatocellular carcinoma. **Cell. Mol. Immunol**.; v. 3, n. 3, p. 197-203, 2006.

TAMARKIN, L. et al. Decreased nocturnal plasma melatonin peak in patients with estrogen receptor positive breast cancer. **Science**, v. 216, n. 4549, p. 1003-1005, 1982.

TAMARKIN, L. et al. Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary tumors in the rat. **Cancer Res**.; v. 41, p. 4432-4436, 1981.

TARIN, D.; PRICE, J. E. Metastatic colonization potential of primary tumour cells in mice. **Br. J. Cancer**; v. 39, n. 6, p. 740-754, 1979.

TAVASSOLI, F. A.; DEVILEE, P. (Ed.); WORLD HEALTH ORGANIZATION CLASSIFICATION OF TUMOURS. **Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs**. Lyon: IARC Press, 2003. 432 p.

The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, p. 61–70, 2012.

TOMIYOSHI, M. Y. et al. Cohabitation with a B16F10 melanoma: bearer cage mate influences behavior and dendritic cell phenotype in mice. **Brain Behav. Immun**.; v. 23, p. 558:567, 2009.

TONIOLO, P. A. et al. Deregulation of SOCS5 suppresses dendritic cell function in chronic lymphocytic leukemia. **Oncotarget**; v. 7, n. 29, p. 46301, 2016.

TONIOLO, P. A. **STAT e SOCS na modulação funcional de células dendríticas derivadas de doadores saudáveis e pacientes com câncer**. 2014. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

TORROELLA-KOURI, M.; RODRÍGUEZ, D.; CASO, R. Alterations in macrophages and monocytes from tumor-bearing mice: evidence of local and systemic immune impairment. **Immunol. Res.;** v. 57, n. 1-3, p. 86-98, 2013.

TREFZER, U. et al. Tumour-dendritic hybrid cell vaccination for the treatment of patients with malignant melanoma: immunological effects and clinical results. **Vaccine**, v. 23, n.17-18, p. 2367-2373, 2005.

TREGLIA, M. et al. Phagocytosis and production of H2O2 by human peripheral blood mononuclear cells from patients with obstructive jaundice. **Pancreatology,** v. 6, n. 4, p. 273-278, 2006.

TREILLEUX, I. et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. **Clin. Cancer Res.**; v. 10, n. 22, p. 7466-7474, 2004.

TRINCHIERI, G. et al. Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukin-12 is a key regulator of immune response and inflammation. **Prog. Growth Factor Res.;** v. 4, n. 4, p. 355-368, 1992.

VAN DE VIJVER, M. J. et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N. Engl. J. Med.;** v. 347, n. 25, p. 1999-2009, 2002.

VAN DER BRUGGEN, P.; VAN DEN EYNDE, B. J. Processing and presentation of tumor antigens and vaccination strategies. **Curr. Opin. Immunol.**; v. 18, n. 1, p. 98-104, 2006.

VENDRAMINI-COSTA, D.; CARVALHO, J. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. **Curr. Pharm. Des.;** v. 18, n. 26, p. 3831-3852, 2012.

VICARI, A. P.; CAUX, C.; TRINCHIERI, G.. Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. **Sem. Cancer Biol.;** Academic Press, 2002. p. 33-42.

VILLARINO, A. V.; KANNO, Y.; O'SHEA, J. J. Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. **Nature Immunol.**; v. 18, n. 4, p. 374-384, 2017.

VILLUNGER, A.; STRASSER, A. The great escape: Is immune evasion required for tumor progression?. **Nature Med.;** v. 5, n. 8, p. 874-875, 1999.

VOGELSTEIN, B. et al. Cancer genome landscapes. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1546-1558, 2013.

VON RUESTEN, A. et al. Association of sleep duration with chronic diseases in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study. **PloS one**, v. 7, n. 1, p. e30972, 2012.

WAECKERLE-MEN, Y.; GANDER, B.; GROETTRUP, M. Delivery of tumor antigens to dendritic cells using biodegradable microspheres. **Methods Mol. Med.**; v. 109; p. 35-46, 2005.

WHO. **World Health Organization** - Cancer Topic. http://www.who.int, 2014. Disponível em: < http://www.who.int/about/copyright/en/ >. Acesso em: November, 6.

XIANG, S. et al. Oscillation of clock and clock controlled genes induced by serum shock in human breast epithelial and breast cancer cells: regulation by melatonin. **Breast Cancer (Auckl);** v. 6, p. 137–150, 2012.

YOO, Y. et al. Pharmacological advantages of melatonin in immunosenescence by improving activity of T lymphocytes. **J. Biomed. Res.;** v. 30, n. 4, p. 314-321, 2016.

YOSHIMURA, A.; NAKA, T.; KUBO, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. **Nature Rev. Immunol.;** v. 7, n. 6, p. 454-465, 2007.

ZARDAVAS, D. et al. Clinical management of breast cancer heterogeneity. **Nature Rev. Clin. Oncol.;** v. 12, n. 7, p. 381-394, 2015.

ZEITZER, J. M. et al. Sensitivity of the human circadian pacemaker to nocturnal light: melatonin phase resetting and suppression. **J. Physiol.;** v. 526, n. 3, p. 695-702, 2000.

ZENG, H. et al. Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. **Cell. Mol. Immunol.;** v. 12, n. 5, p. 566-571, 2015.

ZOU, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. **Nat. Rev. Cancer**; v. 5, n. 4, p. 263-274, 2005.

ANEXOS

A - Padronização da concentração da MLT

A concentração da MLT a ser utilizada nos experimentos com pacientes e o período de tratamento com o hormônio foram previamente determinados por meio de ensaios de padronização. Para tanto, PBMC isolados do sangue periférico de doadores saudáveis foram pelo período de 2 horas com diferentes concentrações de MLT (0,625 nM; 1,25 nM; 2,5 nM; 5 nM e 10 nM). Após este período, retirou-se as CNAs juntamente com o sobrenadante e então adicionou-se IL-4 50 ng/mL e GM-CSF 50 ng/mL. O fenótipo das células em diferenciação foi analisado através de citometria de fluxo de acordo com o item 3.4. Assim, verificou-se que, nas primeiras 24 horas de diferenciação, as células não tratadas com o hormônio tenderam a apresentar diminuição na expressão do receptor da citocina IL-4 (CD124), porém, quando tratadas com a MLT (em diversas concentrações) esta queda se mostrou reduzida (figura 24 A). Além disso, quando tratadas com MLT 2,5 nM, outra alteração fenotípica pareceu ocorrer pois, no sexto dia de cultura, as células tenderam a apresentar um aumento na MFI das moléculas CD80 e CD86 (figura 24 B e C), o que poderia indicar um potencial efeito desta concentração de MLT no sentido de potencializar a capacidade linfoestimuladora das células, uma vez que estas são moléculas coestimuladoras intimamente envolvidas na ativação de linfócitos. O período de tratamento com a MLT foi escolhido com base em estudos prévios do grupo que mostraram aumento da expressão das moléculas HLA-DR, CD11c, CD80, CD86, CD83 e CD40 nas mo-DC geradas desta maneira (GONZALEZ, 2014). Foi também testada a adição do hormônio às culturas antes da adição das citocinas comumente utilizadas para a diferenciação em mo-DC, concomitante às citocinas, bem como após a adição das citocinas. No entanto, não foram observados resultados que justificassem a alteração da metodologia inicialmente proposta (dados não mostrados). Ainda nesse sentido, foram realizados experimentos em que testou-se o tratamento com a MLT por diversos períodos (2 horas, 4 horas, 6 horas e 24 horas) antecedendo a adição de IL-4 e GM-CSF e, em seguida, avaliou-se o fenótipo destas células. Nestes ensaios, foi possível verificar aumento na MFI da molécula CD124 apenas no tratamento pelo período mais curto (2 horas) – figura 25. Com base nestes dados optou-se por utilizar a dose de 2,5 nM em todos os experimentos.

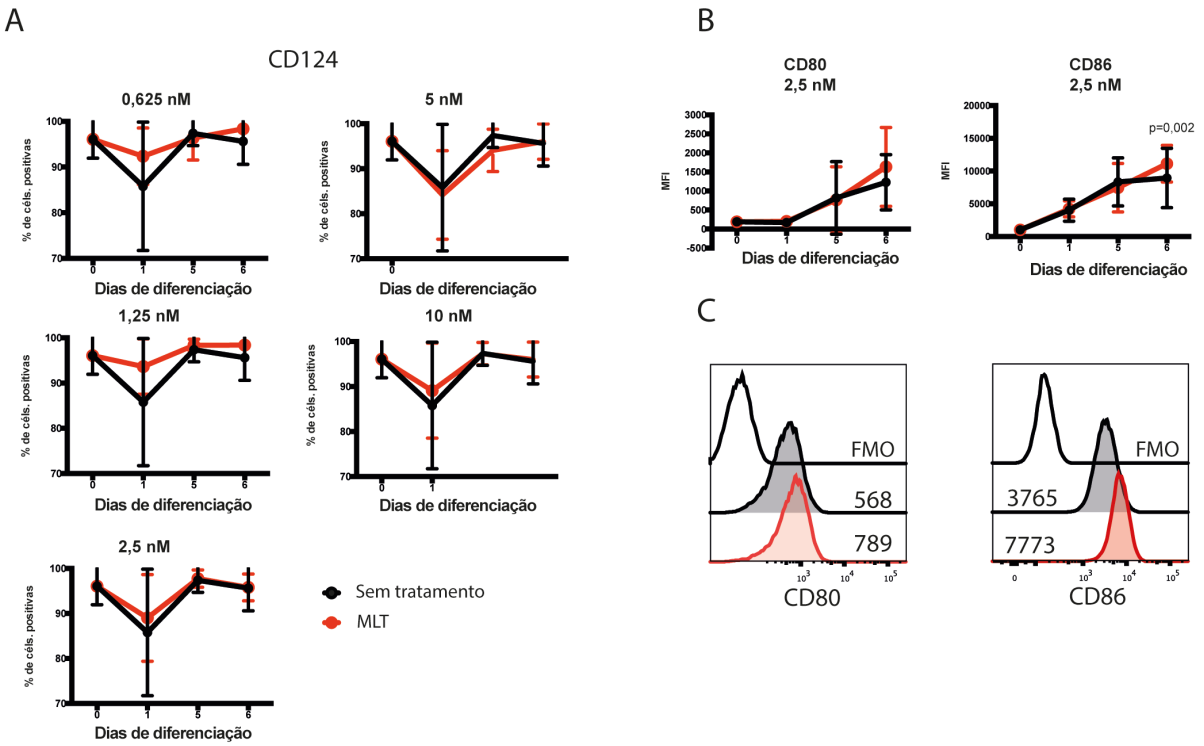


Figura 24 – Padronização da concentração de MLT a ser utilizada na diferenciação de DCs. PBMCs foram tratadas com diferentes concentrações de MLT (0,625 nM; 1,25 nM; 2,5 nM; 5 nM e 10 nM) durante 2 horas e, após retirada das CNAs, as células aderentes foram induzidas à diferenciação em DCs pela adição de IL-4 e GM-CSF. O fenótipo foi avaliado por citometria de fluxo nos dias 0, 1, 5 e 6 da diferenciação. (A) Gráficos do efeito de diversas concentrações de MLT na expressão de CD124 ao longo da diferenciação em DC. (B) Gráficos do efeito do tratamento com MLT (2,5 nM) na expressão de CD80 e CD86 ao longo da diferenciação em DC. (C) Histogramas representativos do efeito da MLT 2,5 nM na MFI das moléculas CD80 e CD86 no sexto dia de diferenciação. Estatística feita com ANOVA para medidas repetidas de dois fatores com pós teste de Tukey; n=4.

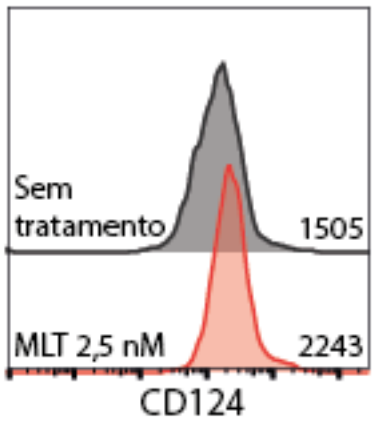


Figura 25 – Histograma representativo do efeito da MLT, na concentração 2,5 nM, na MFI de monócitos de doadores saudáveis. PBMCs foram tratados durante 2 horas com MLT (2,5 nM) e então o fenótipo de membrana dos monócitos foi avaliado por citometria de fluxo.

B - Padronização de ensaios de *Western Blotting* e *Phosflow* – estratégia de análise e tempo de tratamento

Para análise da expressão de pSTAT-6 por citometria de fluxo, adotou-se uma estratégia de análise (figura 26) em que foram inicialmente excluídos os eventos duplos seguido da exclusão dos debris celulares por meio de um gate baseado nos parâmetros tamanho (FSC) por complexidade (SSC). Foram então excluídas as células que estavam mortas antes da permeabilização, por meio da seleção da população negativa para o reagente de viabilidade (LIVE/DEAD). Em seguida, foi selecionada a população duplo positiva para os marcadores CD11c e HLA-DR, na qual foi analisada a expressão de pSTAT-6. Vale ressaltar que, para a seleção de monócitos, tentou-se inicialmente utilizar o marcador CD14, porém, nenhum dos reagente disponíveis resistiu ao protocolo de permeabilização celular utilizado.

De acordo com a literatura, um período bastante utilizado para estímulo da fosforilação da STAT-6 por meio de adição de IL-4 é de 15 minutos (ANDREWS et al., 2002; TONIOLO et al., 2016). No entanto, não foram encontrados relatos de tratamento com MLT a fim de induzir a fosforilação desta proteína. Sendo assim, num primeiro momento foi realizado um experimento em que os monócitos isolados do sangue periférico de doadores saudáveis foram tratados por 15, 30, 60 e 120 minutos com o hormônio - ou com IL-4 - , a fim de se determinar o melhor período para visualização de uma possível modulação de STAT-6, por meio da técnica de Western Blotting (item 3.5), e na fosforilação da STAT-6 (pSTAT-6) por meio de citometria de fluxo (item 3.6). Neste experimento, pode-se confirmar que os tempos de tratamento por 1 e 2 horas foram longos demais para que a modulação das proteínas pudesse ser observada (fig 27 A-C) bem como a fosforilação da STAT-6 (figura 27 D). Sendo assim, seguiu-se realizando os tratamentos por 15 e 30 minutos. Porém, notou-se certa variação no tempo em que a MLT é capaz de modular tais proteínas de acordo com os doadores (figura 28). Assim, a ideia inicial foi de manter os dois tempos de tratamento, no entanto, devido à quantidade limitada de monócitos obtidos das amostras de sangue de pacientes, não foi possível seguir com esta ideia. Desta maneira, selecionou-se o tempo mais curto de tratamento.

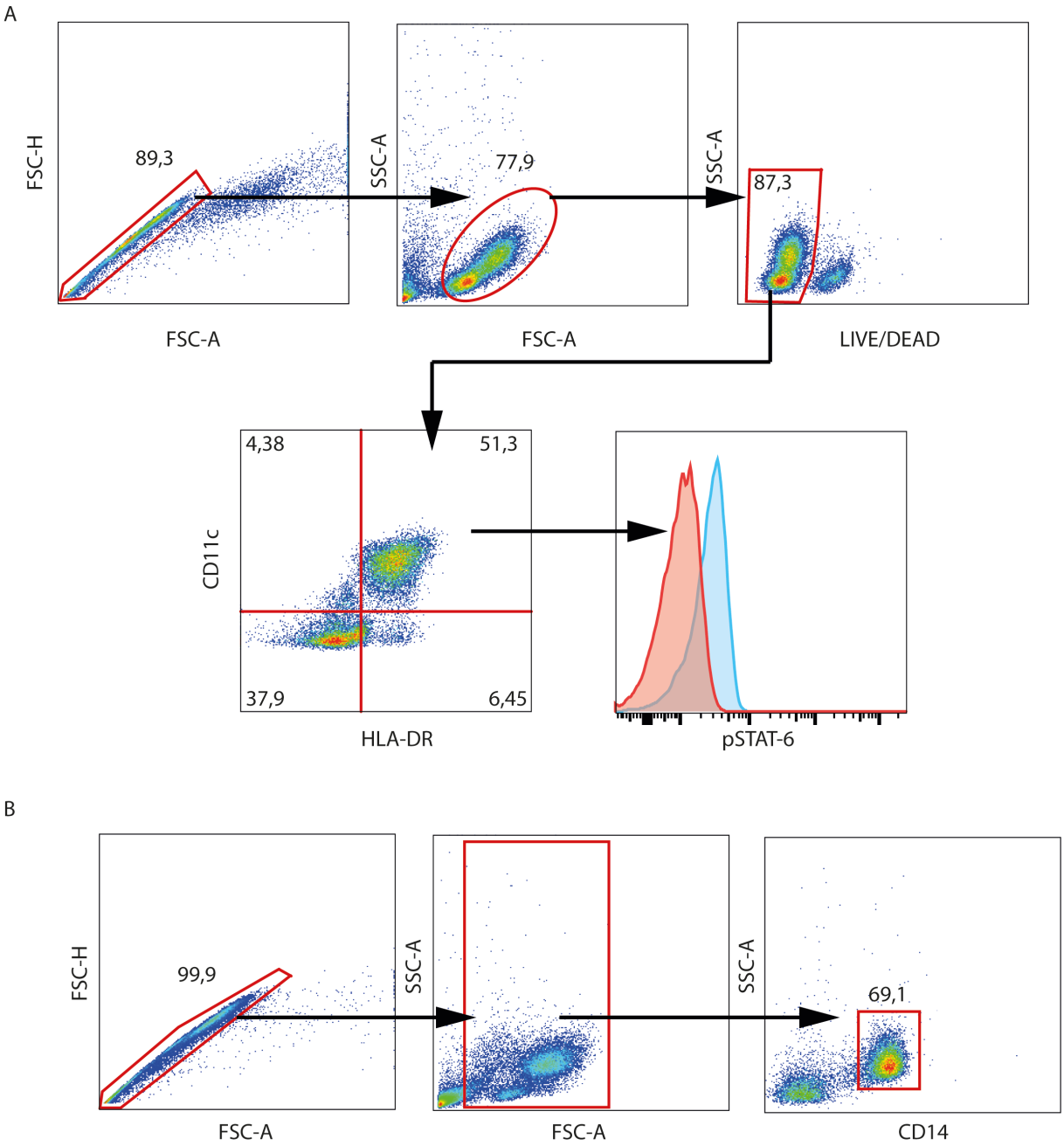


Figura 26. Estratégias de análise da fosforilação de STAT-6 em monócitos e da pureza dos monócitos isolados. (A) Estratégia de análise da expressão de pSTAT-6 em monócitos de doadoras saudáveis e de pacientes. (B) Estratégia de análise da pureza de monócitos após isolamento por coluna magnética, através da marcação com anti-CD14, sem que as células passassem pelo processo de permeabilização, para que não fosse perdida a marcação da molécula de interesse.

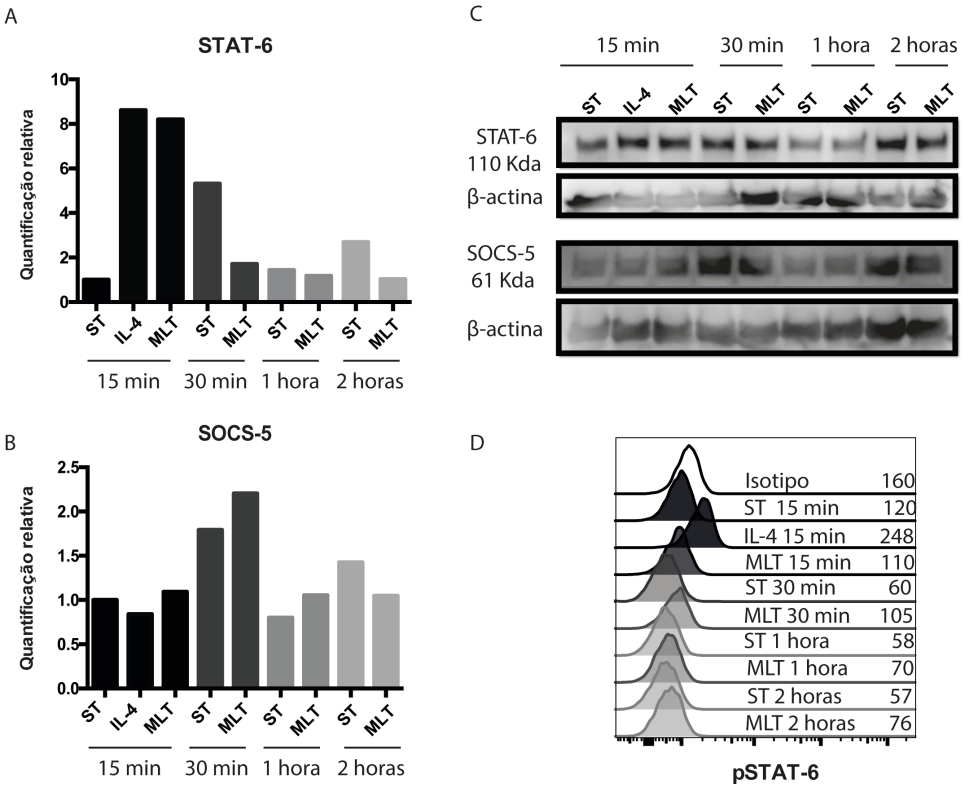


Figura 27 - Padronização do tempo de tratamento de monócitos com MLT. Monócitos de doadores saudáveis foram isolados por separação negativa em colunas magnéticas e incubados por diferentes períodos com MLT (2,5 nM). Parte das células foi lisada para a quantificação das proteínas STAT-6 e SOCS-5 por Western Blotting e com a outra parte, foi realizado ensaio de Phosflow para quantificação da pSTAT-6. (A) Gráficos referentes às quantidades de STAT-6 (A) e SOCS-5 (B) em monócitos - quantificação relativa à banda da β-actina. (C) Bandas referentes à STAT-6, SOCS-5 e β-actina, resultantes da técnica de Western Blotting. (D) Histogramas representativos da MFI de pSTAT-6 nos diferentes tempos de tratamento. Valores referentes à um experimento independente.

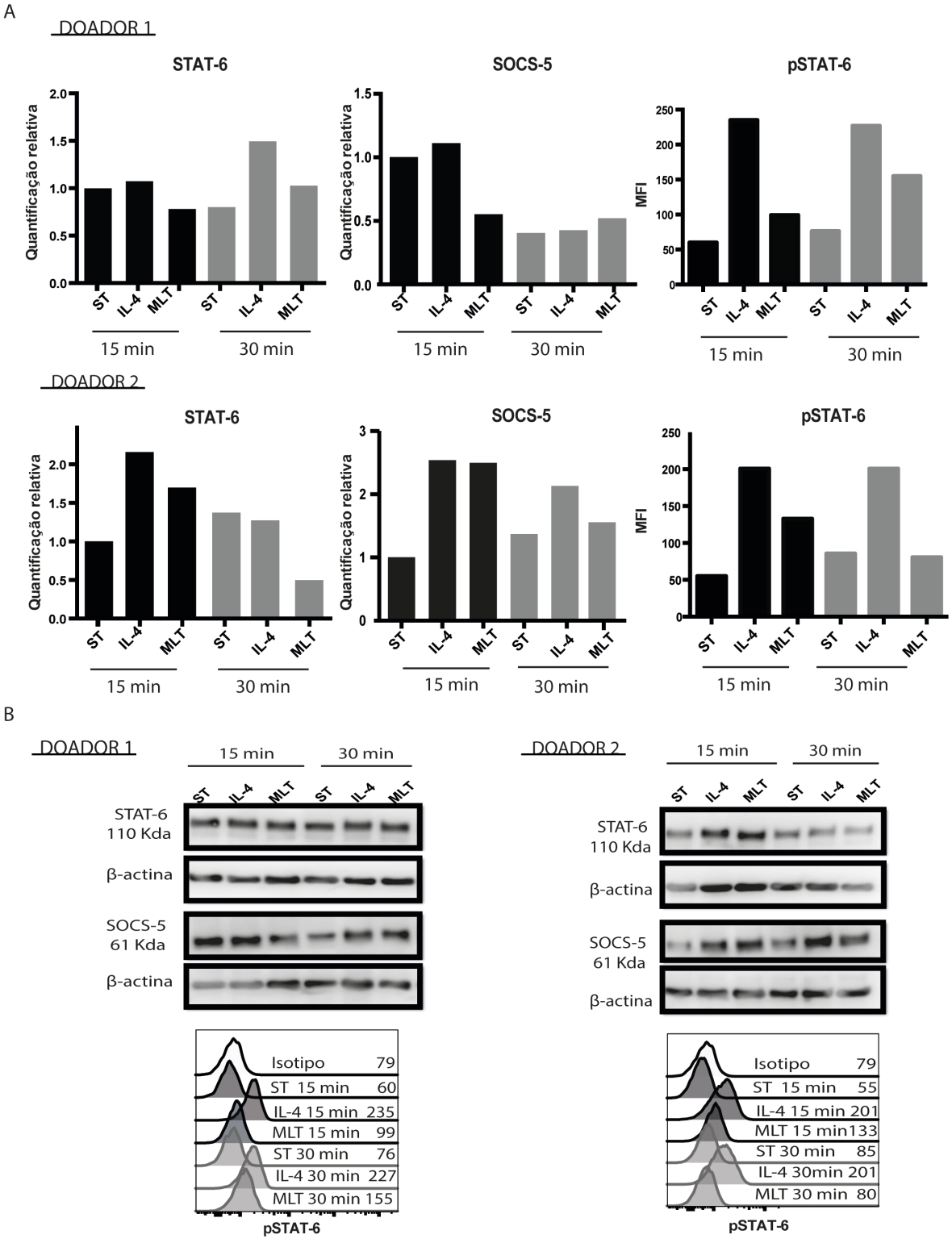


Figura 28 - Comparação da expressão de SOCS-5, STAT-6 e pSTAT-6 em dois doadores. Monócitos de doadores saudáveis foram isolados por separação negativa e incubados por 15 ou 30 minutos com MLT (2,5 nM) ou IL-4 (50 ng/mL). (A) Gráficos representando a quantidade, relativa ao valor do grupo sem tratamento (ST) no período de 15 minutos, de STAT-6 e SOCS-5; e MFI de pSTAT-6, em monócitos de dois doadores saudáveis distintos (B) Figuras representativas das bandas equivalentes às proteínas STAT-6 e SOCS-5 nos diferentes tempos, tratamentos e doadores; e histogramas da MFI de pSTAT-6, em monócitos de dois doadores saudáveis distintos.

C - Estratégia de análise das mo-DCs

A Figura 29 apresenta a estratégia de análise utilizada para avaliação do fenótipo das células ao longo da diferenciação. Para a análise dos monócitos presentes nas PBMC (dia 0 da diferenciação), os *doublets*, ou seja, os eventos duplos, foram eliminados a partir da análise da relação de área do tamanho (FSC-A) com a altura (FSC-H) e, então, foi delimitada uma região em tamanho por granulosidade (SSC – side scatter), na população detentora dos parâmetros característicos das células de interesse. Em seguida foram selecionadas as células viáveis, com base na ausência de fluorescência do corante de viabilidade e, posteriormente, selecionou-se a população $CD14^+$ seguida da seleção da população de células duplo-positivas para os marcadores CD11c e HLA-DR. Para análise das células no primeiro dia de diferenciação, seguiu-se com a mesma estratégia de análise, porém, não houve seleção das células $CD14^+$, visto que neste momento algumas células em diferenciação já perderam a expressão deste marcador (figura 29 A). Para análise das DCs, nos dias 5 e 6 da diferenciação, não foi feita a exclusão de *doublets* devido ao tamanho muito variável desta população. Desta maneira, seguiu-se com a análise da expressão dos marcadores dentro da população detentora dos parâmetros característicos das DC, com posterior exclusão das células mortas e seguida da seleção das células duplo positiva para CD11c e HLA-DR (figura 29 B).

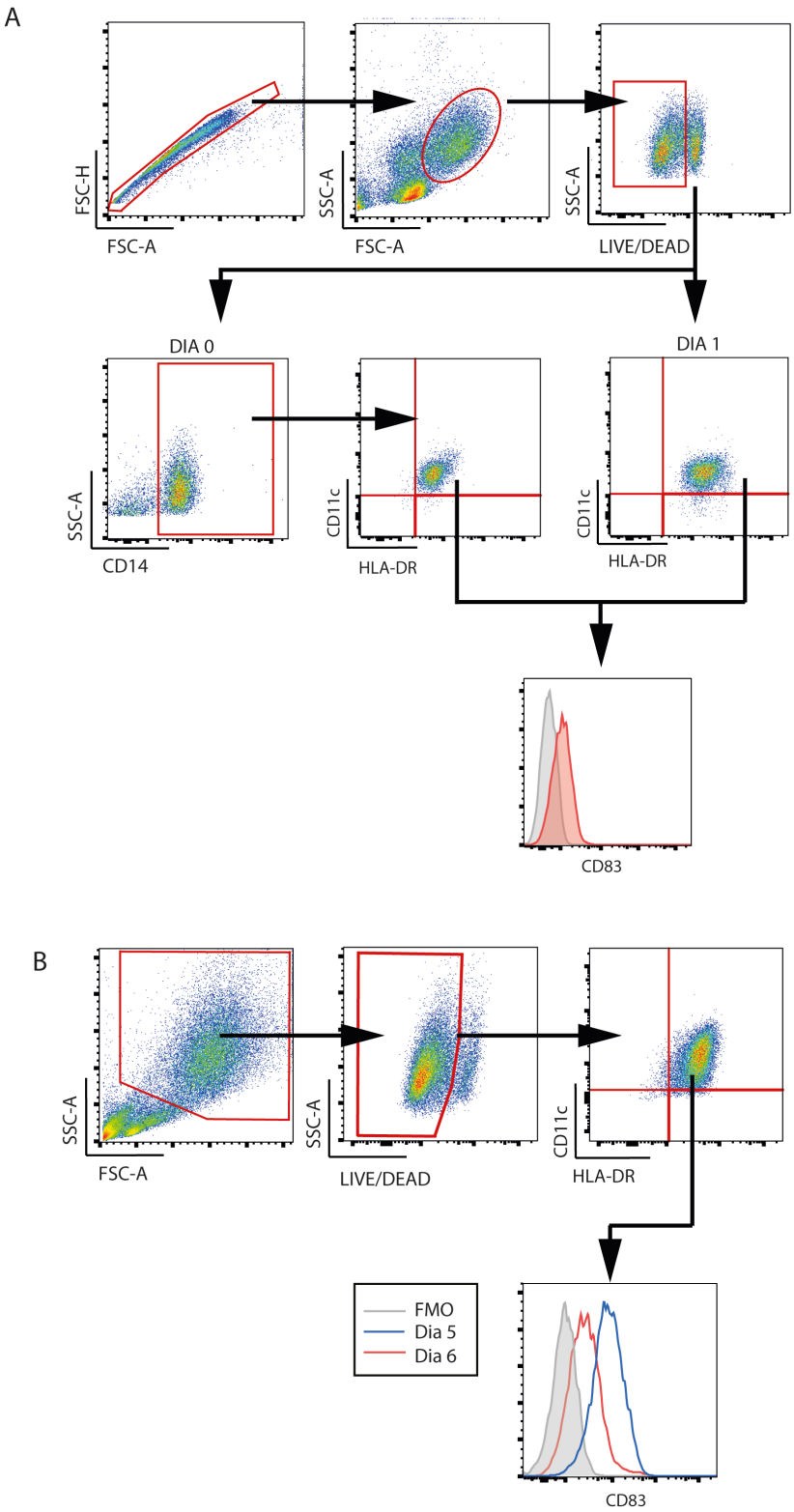


FIGURA 29 - Representação da estratégia de análise empregada para fenotipagem dos monócitos ao longo de sua diferenciação em células dendríticas. Esrtratégia utilizada para análise dos marcadores CD124, CD80, CD86 e CD83. (A) Estratégia utilizada para análise das células nos dias 0 e 1 da diferenciação (B) Estratégia utilizada para análise das células nos dias 5 e 6 da diferenciação de monócitos em DCs. Quando necessário, a estratégia de "fluorescence minus one" (FMO) foi utilizada para determinação da positividade do marcador.

D - Estratégia de análise da proliferação de LT

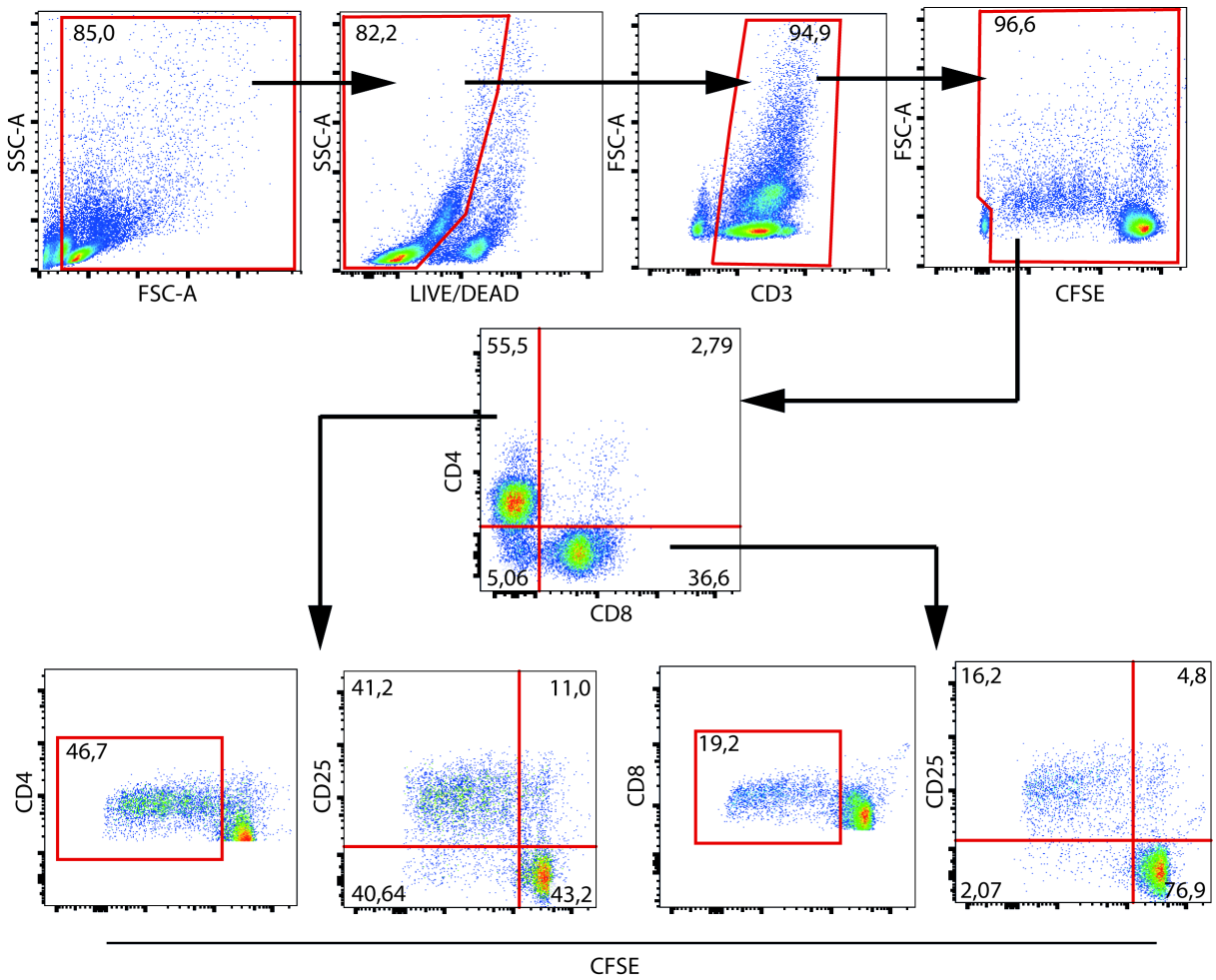


Figura 30 – Representação da estratégia de análise utilizada nos experimentos de linfoestimulação. Linfócitos T $CD3^+$ foram separados por coluna de separação imunomagnéticas e corados com CFSE; em seguida foram co-cultivados com mo-DCs em porporção de 1 DC : 30 LT por 5 dias. A estratégia se baseou inicialmente na seleção da população correspondente aos linfócitos com base no tamanho e granulosidade (FSC X SSC); então foram selecionados os linfócitos vivos a partir da ausência de marcação para o corante de viabilidade LIVE/DEAD e as células $CD3^+$. Como as mo-DCs foram geradas por aderência, foram excluídas as células $CD3^+CFSE^{lo}$ e com tamanho pequeno (com base nos parâmetros FSC x CFSE), excluindo assim eventuais linfócitos advindos da cultura de mo-DCs. Em seguida, os subtipos de linfócitos foram separados de acordo com a expressão dos marcadores CD4 e CD8. Cada subpopulação de linfócitos foi analisada quanto a diluição do CFSE, para avaliação da porcentagem de proliferação, e quanto à expressão de CD25.

E - Efeito da MLT na expressão de CD25 em LT

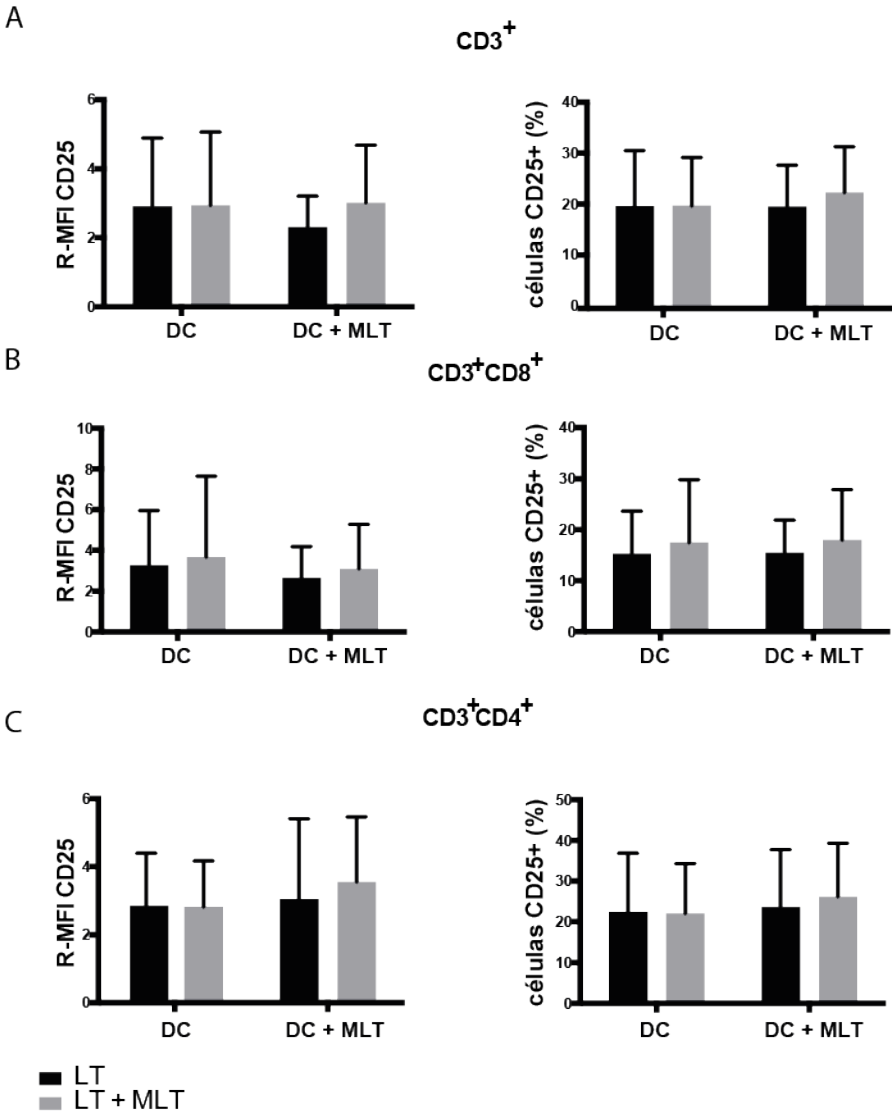


Figura 31 - Efeito da MLT na expressão de CD25 em LT. Linfócitos $CD3^+$ alogeneicos às DC foram previamente corados com CFSE e tratados, ou não, por 2 horas com MLT (2,5 nM). Os LT foram então incubados com DC geradas a partir de monócitos também tratados, ou não, com MLT (2 horas), na proporção de 1 DC : 30 LT. Representação da expressão de CD25 em LT $CD3^+$ (A), $CD3^+CD8^+$ (B) e $CD3^+CD4^+$ (C), de 6 experimentos independentes. Direita: gráficos da MFI de CD25 relativa ao grupo não estimulado. Esquerda: gráficos da porcentagem de expressão de CD25. Barras pretas = LT; Barras cinzas = LT + MLT.

F - Efeito da sincronização na capacidade linfoestimuladora de mo-DCs

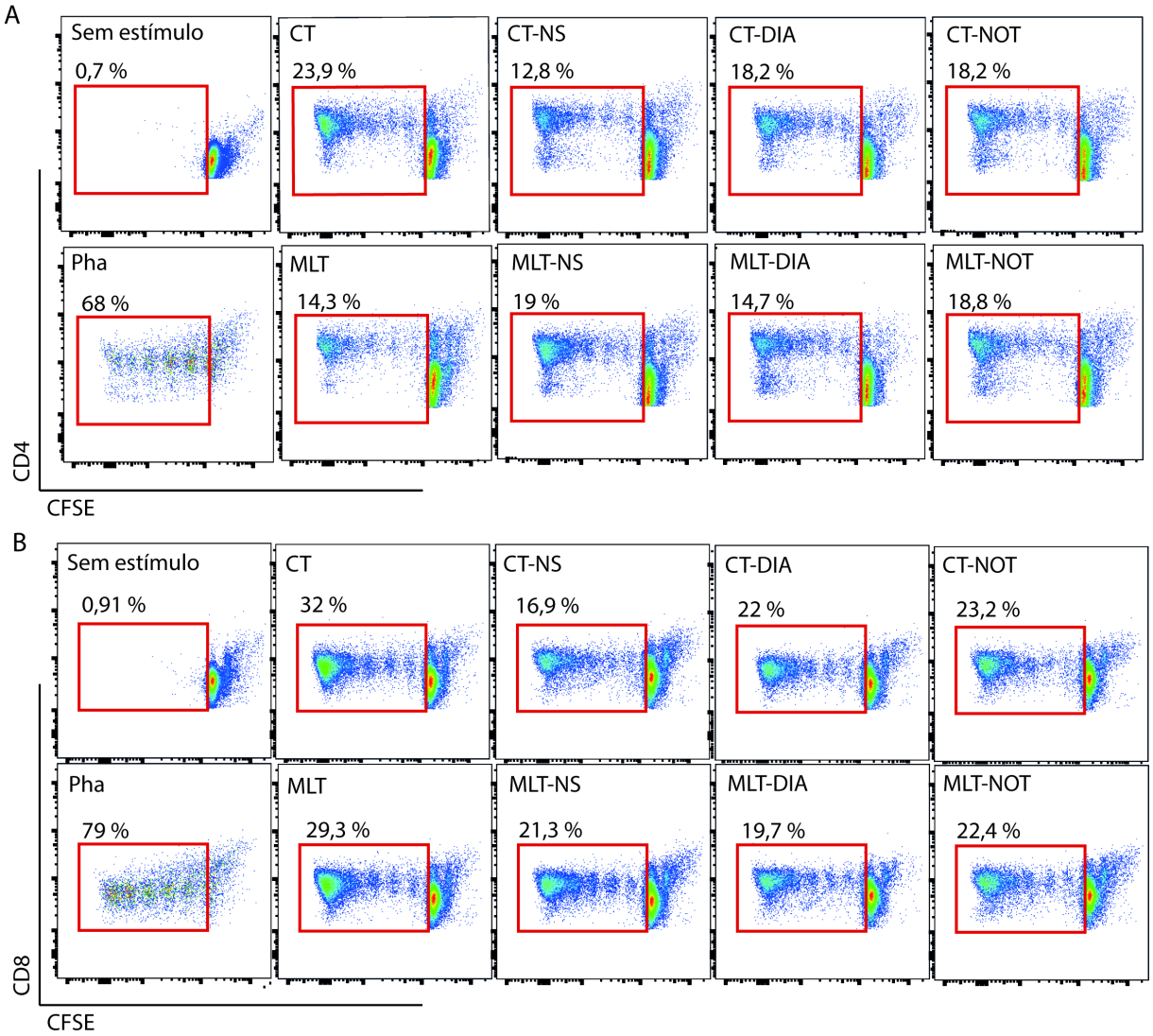


Figura 32 - Efeito da sincronização na capacidade linfoestimuladora de mo-DCs. Mo-Dcs submetidas à sincronização por meio da adição de MLT ao longo de sua diferenciação foram co-cultivadas por 5 dias com LT, corados com CFSE, na proporção de 1 DC : 30 LT. Dot-plots representativos da proliferação de células $CD3^+CD4^+$ (A) e $CD3^+CD8^+$ (B) quando co-cultivados com mo-DCs sincronizadas. CT = grupo controle; DIA = grupo com sincronização diurna; NOT = grupo com sincronização noturna e NS = grupo não sincronizado. n=3

G - Caracterização fenotípica de mo-DCs ao longo da diferenciação

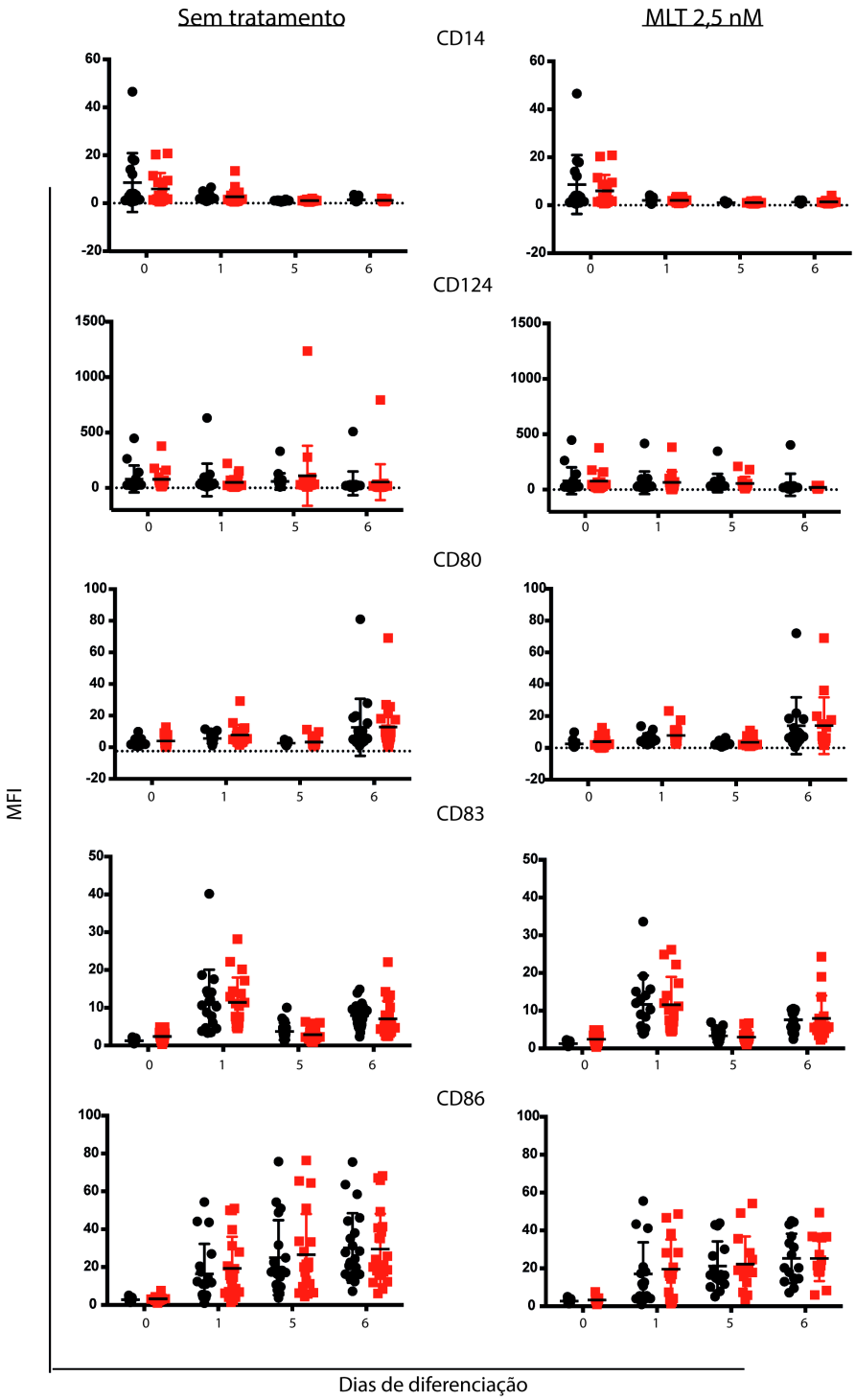


Figura 33 - Caracterização fenotípica (MFI) de mo-DCs ao longo da diferenciação. PBMCs foram separadas por gradiente de densidade, plaqueadas para aderência (2 horas) sob tratamento ou não com MLT (2,5 nM). Então, as células não aderentes foram retiradas e às aderentes foi acrescentado IL-4 e GM-CSF (50 ng/mL). As células foram cultivadas por 6 dias, sendo estimuladas no quinto dia com LPS (100 ng/mL). Gráficos da MFI de CD14, CD124, CD80, CD83 e CD86 ao longo da diferenciação de mo-DC de pacientes e controles. n= 16/23.

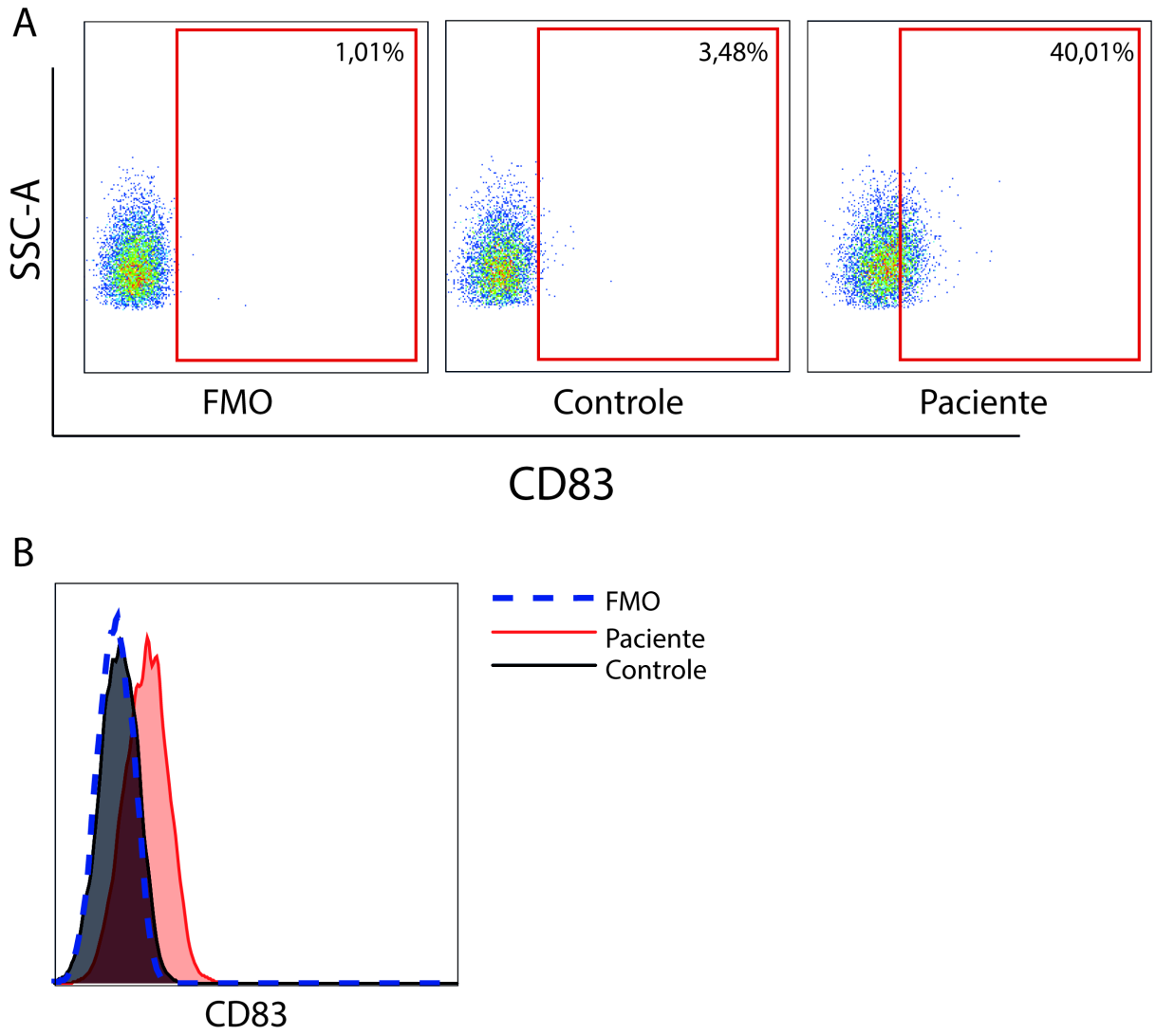


Figura 34 - Comparação da expressão de CD83 em monócitos de paciente e controle. PBMCs de pacientes e doadoras saudáveis foram separadas por gradiente de densidade e marcadas com anticorpos monoclonais para imunofetipagem por citometria de fluxo. (A) Dot-plots representativos da expressão de CD83 em monócitos presentes nas PBMCS (dia 0) de uma doadora saudável (controle) e uma paciente. A definição da população positiva foi feita com base no FMO. (B) Histogramas representativos da expressão de CD83 em monócitos presentes nas PBMCS (dia 0) de uma doadora saudável (controle) e uma paciente.

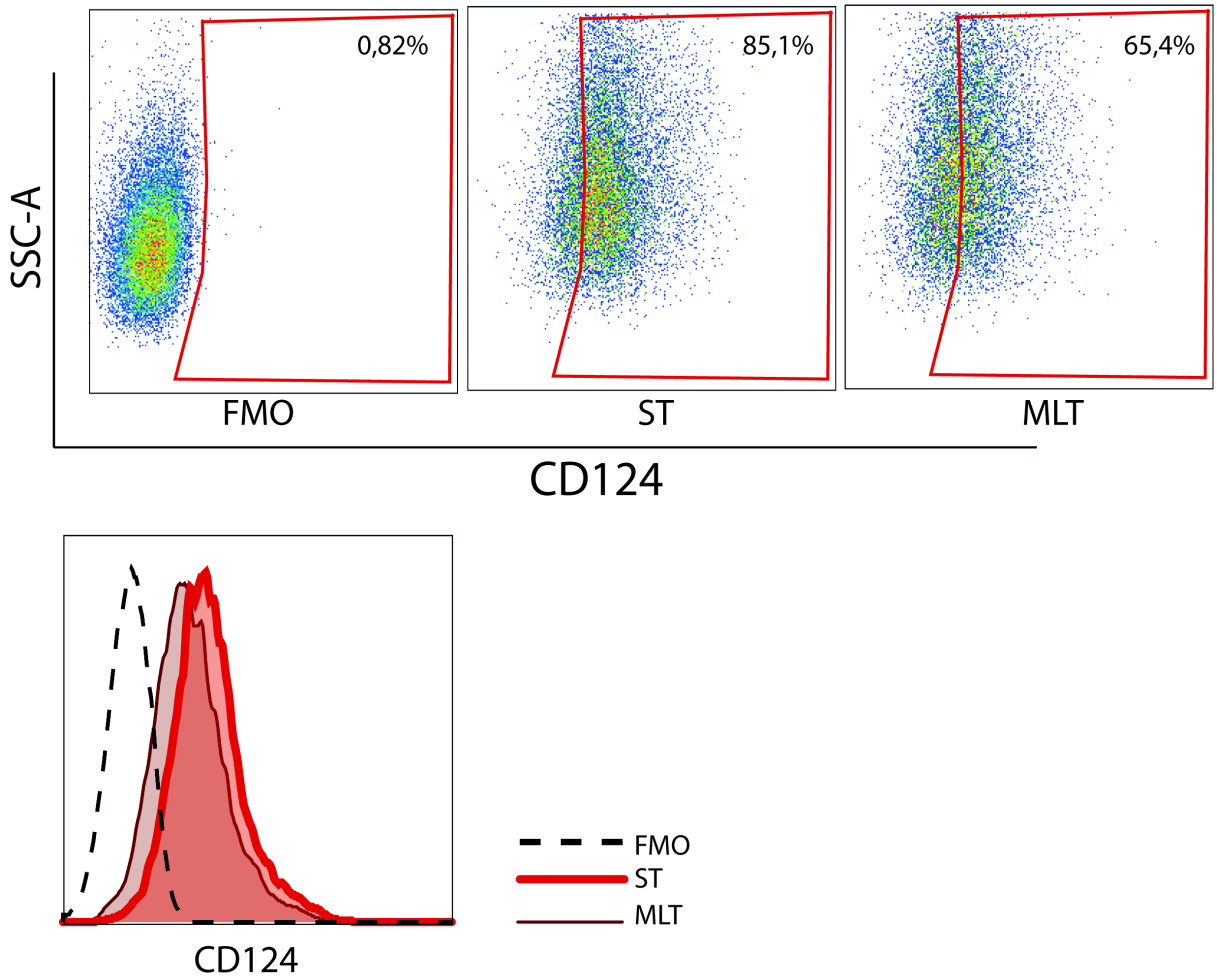


Figura 35 - Efeito da MLT na expressão de CD124 em paciente com tumor triplo negativo. Dot-plots e histogramas representando a expressão de CD124 no sexto dia de diferenciação de mo-DC a partir de monócitos de uma paciente portadora de carcinoma mamária classificado por análise imunohistoquímica como triplo negativo. ST = mo-DC sem tratamento; MLT = mo-DC tratada diferenciada sob ação da MLT.

H - Expressão de CD25 em LT estimulados por mo-DCs de pacientes e doadoras saudáveis

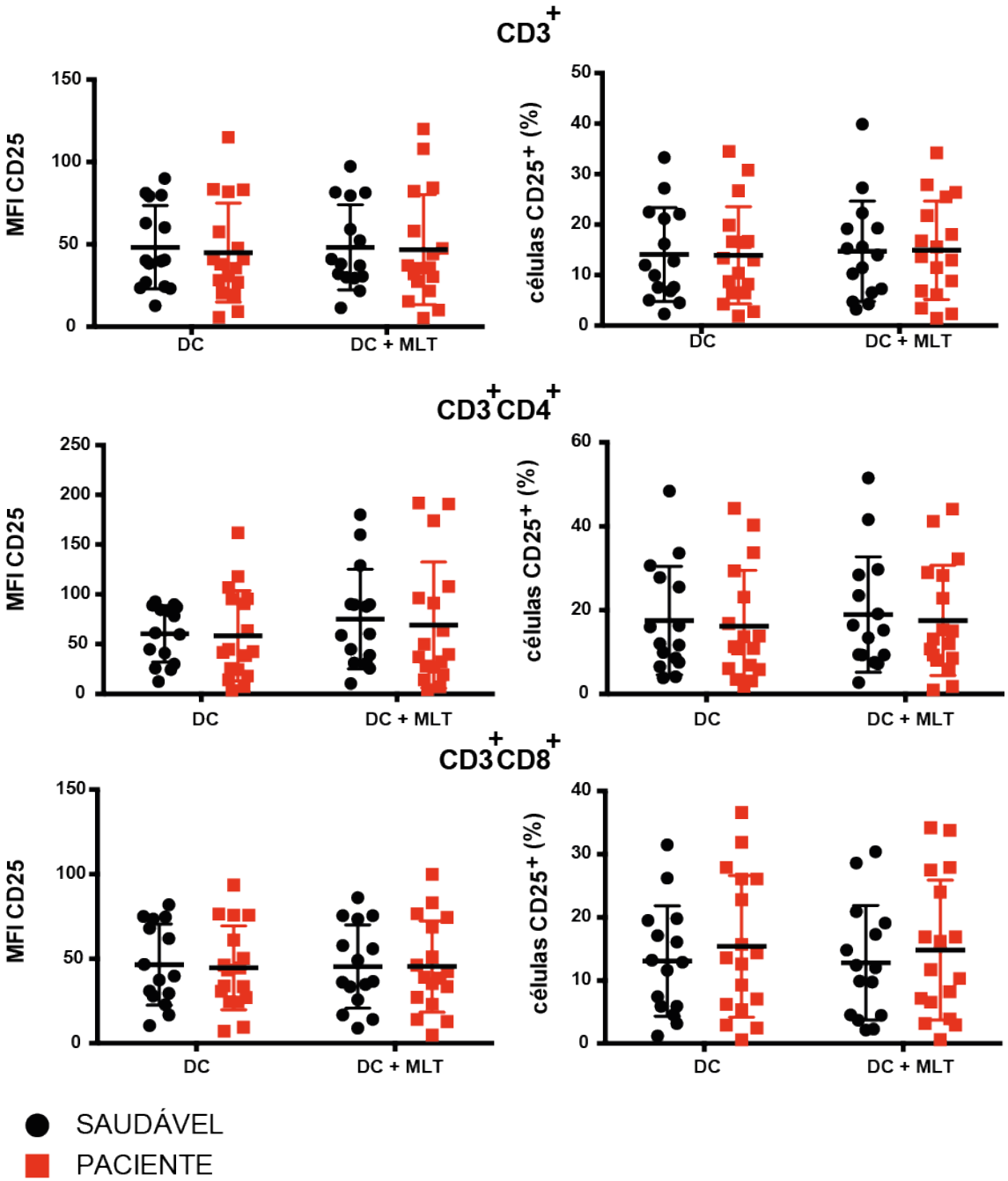


Figura 36 - Expressão de CD25 em LT estimulados por mo-DCs de pacientes e doadoras saudáveis. Linfócitos T $CD3^+$ foram selecionados por coluna de separação imunomagnética, previamente corados com CFSE e co-cultivados com DC ou DC + MLT de pacientes ou doadoras saudáveis, por 5 dias, na proporção de 1 DC : 30 LT. Gráficos referentes à MFI e % de expressão da molécula CD25 em linfócitos $CD3^+$ totais e nos subtipos $CD4^+$ e $CD8^+$. n=15/17.

I - Comparação da expressão de pSTAT-6 na população de monócitos e na amostra total

A pureza das amostras de monócitos variou entre 50 e 70% de células $CD14^+$ (dados não apresentados), no entanto, não encontrou-se alternativa viável para elevar este número. Felizmente, analisando-se as células totais nas amostras (estratégia de análise representada na figura 37) em que realizou-se o protocolo de Phosflow, os efeitos encontrados na população duplo positiva para CD11c e HLA-DR (item 4.6) se mantiveram em sua maioria, o que permitiu extrapolar que as análises por *Western Blotting* possivelmente não foram afetadas pela contaminação de outros tipos celulares (figura 38).

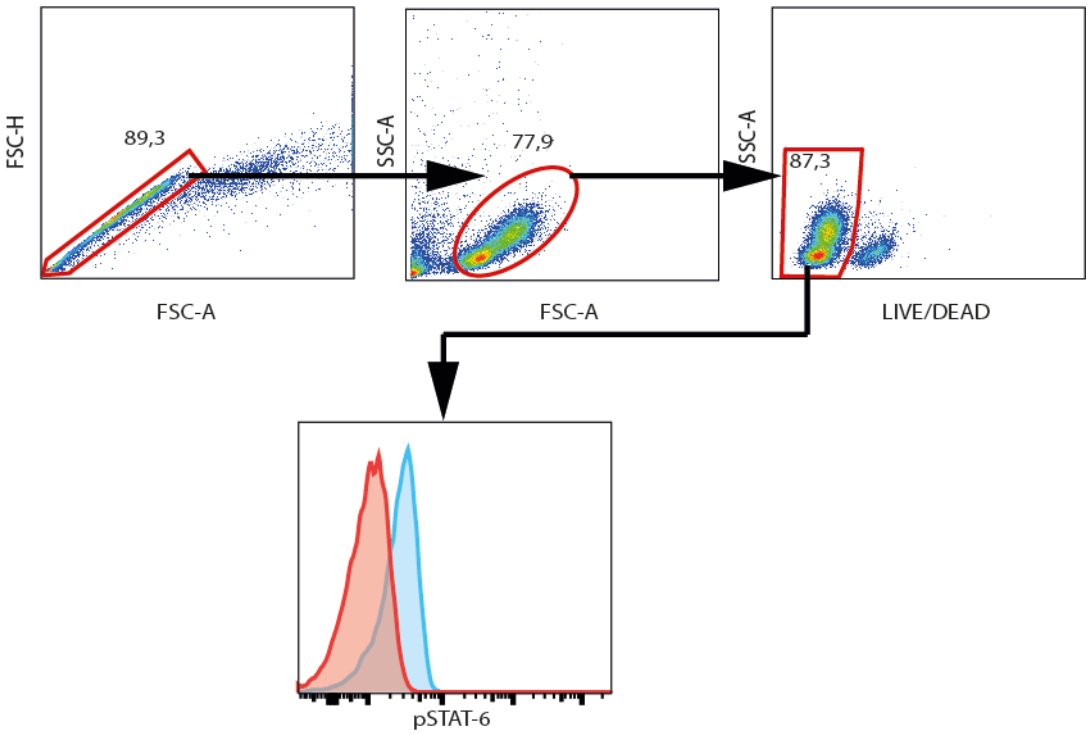


Figura 37 - Estratégia de análise da expressão de pSTAT-6 nas células vivas. Para comparação da expressão de pSTAT-6 na amostra total (sem restrição à população duplo positiva para CD11c e HLA-DR) utilizou-se a seleção dos eventos únicos, a partir da análise da relação de FSC-A com FSC-H e, então, foram selecionadas as células de acordo com tamanho e granulosidade compatíveis (SSC X FSC); em seguida foram selecionadas as células viáveis (ausência de fluorescência do corante de viabilidade LIVE/DEAD) na qual foi analisada pSTAT-6 com base no controle isotípico

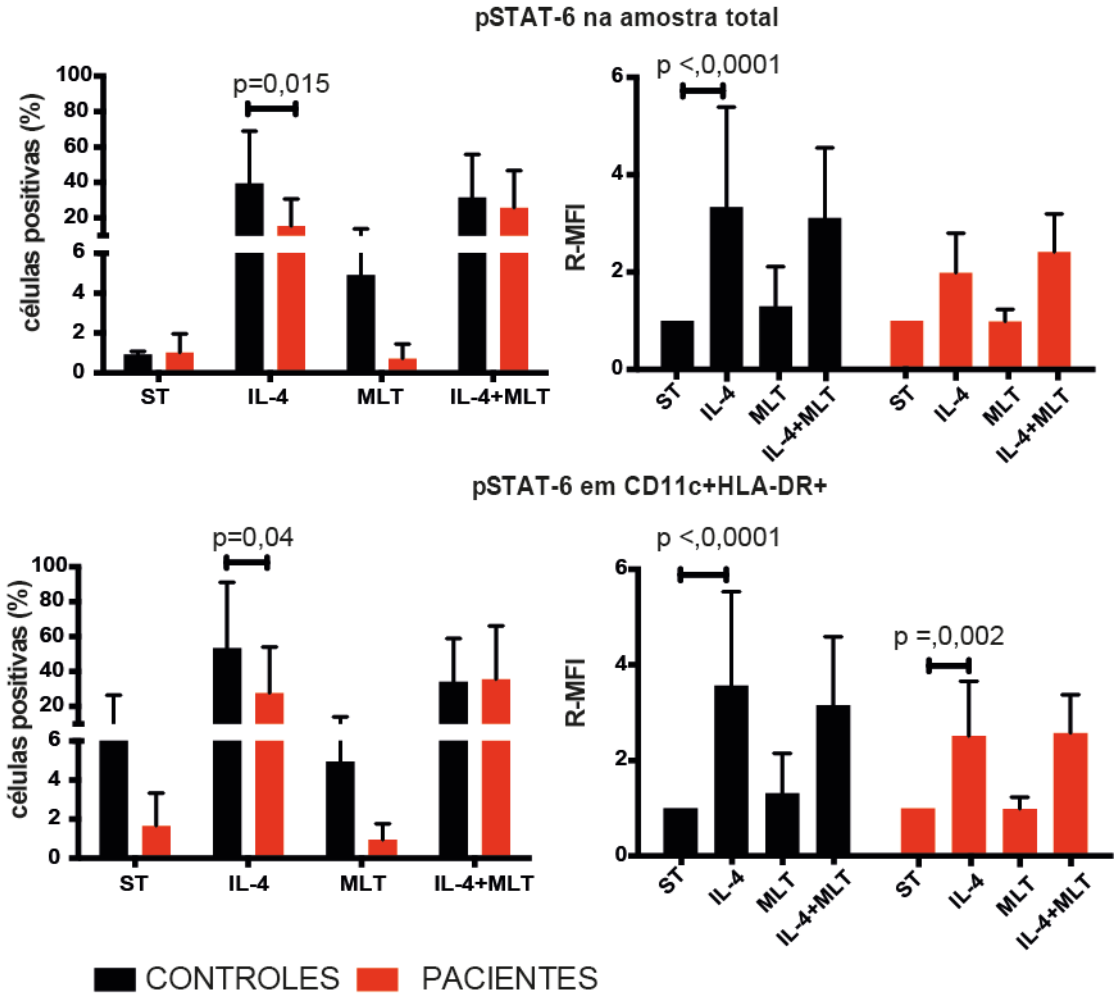


Figura 38 - Comparação da expressão de pSTAT-6 em população CD11c^{+}HLA-DR^{+} e na amostra como um todo. Gráficos referentes à expressão de pSTAT-6, em % e em MFI relativo ao grupo sem tratamento (ST) nas células totais presentes nas amostras (acima) e nas células duplo positivas para CD11c e HLA-DR (abaixo).

J - Índice de qualidade de sono de Pittsburgh (PSQI-BR)

Nome:_____ Idade:_____
Data:_____

Instruções:
As seguintes perguntas são relativas aos seus hábitos de sono durante **o último mês somente**. Suas respostas devem indicar a lembrança mais exata da maioria dos dias e noites do último mês. Por favor, responda a todas as perguntas.

1. Durante o último mês, quando você geralmente foi para a cama à noite? Hora usual de deitar _____

2. Durante o último mês, quanto tempo (em minutos) você geralmente levou para dormir à noite? Número de minutos _____

3. Durante o último mês, quando você geralmente levantou de manhã? Hora usual de levantar _____

4. Durante o último mês, quantas horas de sono você teve por noite? Horas de sono por noite _____

Para cada uma das questões restantes, marque a melhor (uma) resposta. Por favor, responda a todas as questões.

5. Durante o último mês, com que freqüência você teve dificuldade de dormir porque você...

a- Não conseguiu adormecer em até 30 minutos
( ) Nenhuma no último mês
( )Menos de 1 vez/semana
( ) 1 ou 2 vezes/semana
( ) 3 ou mais vezes/ semana

b- Acordou no meio da noite ou de manhã cedo
( ) Nenhuma no último mês
( )Menos de 1 vez/semana
( ) 1 ou 2 vezes/semana
( ) 3 ou mais vezes/ semana

c- Precisou levantar para ir ao banheiro
( ) Nenhuma no último mês
( )Menos de 1 vez/semana
( ) 1 ou 2 vezes/semana
( ) 3 ou mais vezes/ semana

d- Não conseguiu respirar confortavelmente
( ) Nenhuma no último mês
( )Menos de 1 vez/semana
( ) 1 ou 2 vezes/semana
( ) 3 ou mais vezes/ semana

e- Tossiu ou roncou forte
( ) Nenhuma no último mês
( )Menos de 1 vez/semana
( ) 1 ou 2 vezes/semana
( ) 3 ou mais vezes/ semana

f- Sentiu muito frio
( ) Nenhuma no último mês
( )Menos de 1 vez/semana
( ) 1 ou 2 vezes/semana
( ) 3 ou mais vezes/ semana

g-Sentiu muito calor
( ) Nenhuma no último mês
( )Menos de 1 vez/semana
( ) 1 ou 2 vezes/semana
( ) 3 ou mais vezes/ semana

h-Teve dor
( )Nenhuma no último mês
( )Menos de 1 vez/semana
( ) 1 ou 2 vezes/semana
( ) 3 ou mais vezes/ semana

i-Outra(s) razão(ões), por favor descreva _____

Com que freqüência, durante o último mês, você teve dificuldade para dormir devido a essa razão?
( ) Nenhuma no último mês
( )Menos de 1 vez/semana
( ) 1 ou 2 vezes/semana
( ) 3 ou mais vezes/ semana

6-Durante o último mês, como você classificaria a qualidade do seu sono de uma maneira geral?

( )Muito boa
( ) Boa
( )Ruim
( )Muito ruim

7-Durante o último mês, com que freqüência você tomou medicamento (prescrito ou ‘‘por conta própria’’) para lhe ajudar a dormir?

( ) Nenhuma no último mês
( )Menos de 1 vez/semana
( ) 1 ou 2 vezes/semana
( ) 3 ou mais vezes/ semana

8-No último mês, com que freqüência você teve dificuldade de ficar acordado enquanto dirigia, comia ou participava de uma atividade social (festa, reunião de amigos, trabalho, estudo)?

( ) Nenhuma no último mês
( )Menos de 1 vez/semana
( ) 1 ou 2 vezes/semana
( ) 3 ou mais vezes/ semana

9-Durante o último mês, quão problemático foi para você manter o entusiasmo (ânimo) para fazer as coisas (suas atividades habituais)?

( )Nenhuma dificuldade
( )Um problema leve
( )Um problema razoável
( )Um grande problema

10-Você tem um(a) parceiro [esposo(a)] ou colega de quarto?

( )Não
( )Parceiro ou colega, mas em outro quarto
( )Parceiro no mesmo quarto, mas não na mesma cama
( ) Parceiro na mesma cama

Se você tem um parceiro ou colega de quarto, pergunte a ele/ela com que freqüência, no último mês, você teve ...

a-Ronco forte
( ) Nenhuma no último mês
( )Menos de 1 vez/semana
( ) 1 ou 2 vezes/semana
( ) 3 ou mais vezes/ semana

b-Longas paradas na respiração enquanto dormia
( ) Nenhuma no último mês
( )Menos de 1 vez/semana
( ) 1 ou 2 vezes/semana
( ) 3 ou mais vezes/ semana

c-Contrações ou puxões nas pernas enquanto você dormia
( ) Nenhuma no último mês
( )Menos de 1 vez/semana
( ) 1 ou 2 vezes/semana
( ) 3 ou mais vezes/ semana

d-Episódios de desorientação ou confusão durante o sono
( ) Nenhuma no último mês
( )Menos de 1 vez/semana
( ) 1 ou 2 vezes/semana
( ) 3 ou mais vezes/ semana

e-Outras alterações (inquietações) enquanto você dorme; por favor, descreva

_____ _____

( ) Nenhuma no último mês
( )Menos de 1 vez/semana
( ) 1 ou 2 vezes/semana
( ) 3 ou mais vezes/ semana

K - Instruções para o cálculo do Índice de qualidade de sono de Pittsburgh

O índice de qualidade de sono de Pittsburgh (PSQI) contém 19 questões de auto-avaliação e 5 questões avaliadas por um cônjuge ou companheiro de quarto. Somente as questões de auto-avaliação são incluídas no cálculo. Os 19 itens de auto-avaliação são combinados para formarem sete componentes de pontuação, cada um com variação de 0 a 3 pontos. Em todos os casos, a pontuação "0" indica "nenhuma dificuldade", enquanto uma pontuação "3" indica "grave dificuldade". As pontuações de cada um dos 7 componentes são somadas para produzir uma pontuação geral, variando de 0 a 21 pontos (sendo "0 pontos" indício de nenhuma dificuldade e "21 pontos" indício de graves dificuldades em todas as áreas).

Componente 1: Qualidade do sono subjetiva

Examinar a questão 6 e assinalar a pontuação correspondente:

Resposta	Pontuação componente 1
Muito boa	0
Boa	1
Ruim	2
Muito Ruim	3

Pontuação componente 1:___

Componente 2: Latência do sono

1. Examinar a questão 2 e assinalar a pontuação correspondente:

Resposta	Pontuação componente 1
≤ 15 minutos	0
16 – 30 minutos	1
31-60 minutos	2
> 60 minutos	3

Pontuação questão 2:_____

2. Examinar a questão 5(a) e assinalar a pontuação correspondente:

Resposta	Pontuação componente 1
Nenhuma no último mês	0
Menos de 1 vez/semana	1
1 ou 2 vezes/semana	2
3 ou mais vezes/semana	3

Pontuação questão 5(a):____

3. Somar pontuação das questões 2 e 5(a): _____

4. Assinalar a pontuação do componente 2 de acordo com:

Soma do 2 e 5(a)	Pontuação componente 2
0	0
1-2	1
3-4	2
5-6	3

Pontuação componente 2:___

Componente 3: Duração do sono

Examinar a questão 4 e assinalar a pontuação correspondente:

Resposta	Pontuação componente 3
> 7 horas	0
6-7 horas	1
5-6 horas	2
< 5 horas	3

Pontuação componente 3:___

Componente 4: Eficiência habitual do sono

1. Escrever o número de horas de sono (questão 4):
2. Calcular o número de horas passadas na cama a partir da fórmula:

hora de levantar (questão 3) – hora de deitar (questão 1) = número de horas gastas na cama

3. Calcular a eficiência habitual do sono a partir da fórmula:

(número de horas de sono/número de horas gastas na cama) x 100 = eficiência do sono (%)

4. Assinalar a pontuação do componente quatro de acordo com:

Eficiência habitual do sono %	Pontuação componente 4
>85%	0
75-84%	1
65-74%	2
<65%	3

Pontuação componente 4:___

Componente 5: Distúrbios do sono

1. Examinar as questões 5(b) a 5(i) e assinalar as pontuações para cada questão:

Resposta	Pontuação
Nenhuma no último mês	0
Menos de 1 vez/semana	1
1 ou 2 vezes/semana	2
3 ou mais vezes/semana	3

Pontuação 5(b):
5(c):
5(d):
5(e):
5(f):
5(g):
5(h):
5(i):

2. Somar as pontuações para as questões 5(b) a 5(i):
3. Assinalar a pontuação do componente 5 de acordo com:

Soma de 5(b)-5(i)	Pontuação componente 5
0	0
1-9	1
10-18	2
19-27	3

Pontuação componente 5:___

Componente 6: Uso de medicações para dormir

Examinar a questão 7 e assinalar a pontuação correspondente:

Resposta	Pontuação componente 6
Nenhuma no último mês	0
Menos de 1 vez/semana	1
1 ou 2 vezes/semana	2
3 ou mais vezes/semana	3

Pontuação componente 6:___

Componente 7: Disfunção diurna

1. Examinar a questão 8 e assinalar a pontuação correspondente:

Resposta	Pontuação
Nenhuma no último mês	0
Menos de 1 vez/semana	1
1 ou 2 vezes/semana	2
3 ou mais vezes/semana	3

2. Anotar a pontuação da questão 8:
3. Examinar a questão 9 e assinalar a pontuação correspondente:

Resposta	Pontuação
Nenhuma dificuldade	0
Um problema leve	1
Um problema razoável	2
Um grande problema	3

4. Somar as pontuações das questões 8 e 9:
5. Assinalar a pontuação do componente 7 de acordo com:

Soma questão 8 e 9	Pontuação componente 7
0	0
1-2	1
3-4	2
5-6	3

Pontuação componente 7:___

PONTUAÇÃO GERAL (soma das pontuações dos 7 componentes):