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**

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.

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	%
Mulheres	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 efectoras (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 efectoras 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 saudáveis, 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; MAXEWELL; 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 cromóforo, 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 *Suppressor 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'OGGIO; 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 rítmicas 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 já 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.

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 $\alpha\text{v}\beta 5$ 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- α 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-fluorouracil 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'OGGIO, 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 efficacy of the first-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.
- HANSEN, 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 carcinogenic 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: 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. **Neuropsychopharmacology**, 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 sanguíneos: 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. Effects 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.