BRUNA ZELANTE BARBOSA

COMPROMETIMENTO FUNCIONAL DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS
DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM CÂNCER: ENVOLVIMENTO DAS VIAS DE
SINALIZAÇÃO p38 E ERK1/2 (p44/p42) MAPK.

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

São Paulo
2016

BRUNA ZELANTE BARBOSA

COMPROMETIMENTO FUNCIONAL DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS
DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM CÂNCER: ENVOLVIMENTO DAS VIAS DE
SINALIZAÇÃO p38 E ERK1/2 (p44/p42) MAPK.

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

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto

Versão original

São Paulo
2016

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)

Barbosa, Bruna Zelante
COMPROMETIMENTO FUNCIONAL DE CÉLULAS DENDRÍTICAS
DERIVADAS DE MONÓCITOS DE PACIENTES COM CÂNCER:
ENVOLVIMENTO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO p38 E ERK1/2
(p44/p42) MAPK. / Bruna Zelante Barbosa; orientador
José Alexandre Marzagão Barbuto. -- São Paulo, 2016.
134 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Células dendríticas. 2. Câncer de mama. 3. p38
MAPK. 4. HSP27. I. Barbuto, José Alexandre
Marzagão, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bruna Zelante Barbosa.

Título da Tese: Comprometimento funcional de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com câncer: envolvimento das vias de sinalização p38 e ERK1/2 (p44/p42) MAPK.

Orientador(a): José Alexandre Marzagão Barbuto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

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

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, 17 de dezembro de 2013.

PARECER 1155/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, na reunião realizada no dia 13.12.2013, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Comprometimento funcional de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com câncer: envolvimento das vias de sinalização p38 e ERK (p44/p42) MAPK*" do pesquisador **JOSÉ ALEXANDRE M. BARBUTO** e aluna **BRUNA ZELANTE BARBOSA**.

Cabe aos Pesquisadores executante elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c. 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 **13.12.2014**.

Atenciosamente,

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

PARECER DO COLEGIADO

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comprometimento funcional de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com câncer: envolvimento das vias de sinalização p38 e ERK (p44/p42) MAPK

Pesquisador: Bruna Zelante Barbosa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 23413713.9.0000.5467

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 517.066

Data da Relatoria: 29/01/2014

Apresentação do Projeto:

Comprometimento funcional de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com câncer e o envolvimento das vias de sinalização p38 e ERK (p44/p42) MAPK

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a cinética de ativação da p38 e da ERK durante a diferenciação de Mo-DCs, e as consequências da ativação destas vias em pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama e o papel da HSP27 nas alterações nas células destes pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O trabalho não apresenta risco aos pacientes, pois o material a ser utilizado será uma amostra de sangue periférico.

O benefício é um melhor entendimento sobre os tipos de alterações fenotípicas e funcionais que ocorre nas células dendríticas derivadas de monócitos em pacientes portadores de carcinoma ductal invasivo de mama.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este projeto busca entender o funcionamento das células de defesa do nosso organismo e as possíveis falhas que ocorre nelas e permite o desenvolvimento do câncer, através da investigação

Endereço: Av. Brigadeiro Luiz Antonio, 683

Bairro: Bela Vista

CEP: 01.317-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11.)3248-8087

Fax: (11.)3248-8080

E-mail: dircient@ig.com.br

**CENTRO DE REFERÊNCIA DA
SAÚDE DA MULHER - CRSM**

Continuação do Parecer: 517.056

da cinética de ativação das vias de sinalização ERK(p44/p42MAPK) e p38MAPK em Mo-DCs em pacientes portadoras de carcinoma ductal invasivo de mama, procurando correlacioná-los com os defeitos fenotípicos e funcionais encontrados em suas Mo-DCs. Após será inibir ou ativar as vias de sinalização que estiverem alteradas nas células dos pacientes doentes a fim de tentar obter um padrão de diferenciação semelhante aos dos doadores sadios através de teste em amostra de sangue e consulta de prontuários para coleta de informações referentes ao diagnóstico, para inclusão de pacientes no estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termo de consentimento livre e esclarecido está escrito de forma clara para o entendimento do paciente e voluntário.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O trabalho já foi aprovado pelo CEP IBC, aprovado pelo colegiado de maneira unânime>

SAO PAULO, 29 de Janeiro de 2014

Assinado por:

Roberto Euzébio 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

Ao meu pai Roberto e a minha mãe Maria Teresa
que sempre me incentivaram e me ensinaram
que educação é sempre prioridade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar.

Aos meus pais e irmão, que estão sempre ao meu lado.

Ao Guto, pelo amor, força, paciência e compreensão

Ao meu orientador, José Alexandre Marzagão Barbuto, que me deu uma oportunidade desde a Iniciação Científica e veem me ensinando desde então, por oito anos.

À Professora Lourdes Isaac, minha primeira professora de Imunologia, a quem eu tenho muita admiração.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas, pela formação excelente que recebi na Graduação e Pós-Graduação.

Aos amigos que fiz na Graduação, Renan, Clarissa, Leonardo, Aline, André, Wesley, que fizeram parte importante da minha formação.

À equipe do laboratório de Imunologia de Tumores, pela colaboração, ajuda, boas ideias, incentivo, pelos momentos de descontração e pela amizade.

Aos amigos queridos que fiz no laboratório, Graziela, Isabella, Patrícia, Lilian, Rodrigo, Célia, Ana Carolina, Otavio, Patrícia, Roberto, Mariana, Thiago, Nicole, Cecília, Karen. Vocês fizeram e fazem meu dia a dia muito melhor.

A cada Professor do Programa de Imunologia, por tudo o que aprendi.

À equipe do Departamento de Imunologia, por toda a colaboração na troca de ideias, equipamentos e reagentes.

À Célia e Claudinha, por sempre cuidarem do laboratório e dos alunos.

À Maria Eni, por toda ajuda durante a Pós Graduação.

As minhas queridas amigas, Patty, Li, Bella, Grá, Ana Carol, Mari, Mari Cordoni, Carol Miranda, Tiffany, pela companhia, força e amizade sincera.

Ao meu avô Nivaldo e a minha tia Cris, pelo cuidado e carinho.

Aos pacientes, pela colaboração e fé na ciência.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a elaboração dessa tese.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Muito obrigada a todos!

*"Strive not to be of success,
but rather to be of value."*

(Albert Einstein)

RESUMO

BARBOSA, B. Z. **Comprometimento funcional de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com câncer: envolvimento das vias de sinalização p38 e ERK1/2 (p44/p42) MAPK.** 2016. 134 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

As células dendríticas (DCs) são as principais células apresentadoras de antígeno (APCs), pois possuem uma série de características que as distinguem das demais APCs, como os macrófagos e os linfócitos B. Justamente por isso, intervenções terapêuticas utilizando as DCs têm sido intensamente testadas em pacientes com câncer nos últimos anos e têm demonstrado resultados promissores. Entretanto, a terapia com DCs, ou DCs derivadas de monócitos *in vitro* (Mo-DC), ainda não atingiu todo o seu potencial. DCs e seus precursores, os monócitos, nesses pacientes apresentam diversas alterações funcionais e de maturação. Muito já foi explorado sobre o fenótipo e função dessas células em pacientes com câncer, porém pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que desencadeiam tais alterações. Neste contexto vale destacar as vias de sinalização intracelular ERK 1/2 e p38 MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*), que possuem um papel importante nos processos de diferenciação e maturação, respectivamente, em Mo-DCs. Porém, há dados na literatura que demonstram que a ativação da via p38MAPK durante a diferenciação das Mo-DCs prejudica esse processo e leva à polarização de Mo-DCs tolerogênicas. Em um modelo *in vitro*, observamos que o sobrenadante tumoral (ST) da linhagem de adenocarcinoma de mama, MCF-7, quando presente durante a diferenciação de Mo-DCs de doadores saudáveis leva à diminuição da frequência de células que expressam CD1a e aumento da frequência de células expressando CD14. Além disso, as células expostas ao ST durante a diferenciação produzem, em altas quantidades, as citocinas IL-6, TNF-alfa e IL-10. Em conjunto, esses dados sugerem que o ST prejudica a diferenciação das Mo-DCs. A inibição prévia ao tratamento com o ST da via ERK1/2 levou à correção dos níveis de expressão de CD14, porém não de CD1a, enquanto corrigiu parcialmente a produção das citocinas. Já a inibição da via p38 MAPK foi capaz de corrigir as alterações na expressão de CD1a e CD14, enquanto diminuiu, também parcialmente, a produção das citocinas. Com relação ao mecanismo pelo qual o ST provoca essas alterações, identificamos a proteína de choque térmico HSP27 no ST e investigamos seu efeito na diferenciação das Mo-DCs. A exposição à HSP27 durante a diferenciação de Mo-DCs não levou às alterações observados quando as células foram expostas ao ST. Por fim, investigamos o papel da via p38 MAPK na diferenciação de Mo-DCs de pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama. O tratamento com o inibidor desta via não reverteu a menor expressão de CD86 observada nas Mo-DCs de pacientes, pelo contrário, diminuiu ainda mais a expressão desta molécula e, ainda, levou à diminuição da expressão de HLA-DR. Portanto, os resultados deste trabalho sugerem que a inibição da via p38 MAPK não parece ser uma abordagem interessante na manipulação de Mo-DCs de pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama, uma vez que levou à diminuição da expressão de moléculas importantes durante a apresentação de antígenos.

Palavras chave: Células dendríticas. Câncer de mama. p38 MAPK. HSP27.

ABSTRACT

BARBOSA, B. Z. **Functional commitment of monocyte derived dendritic cells from cancer patients: involvement of p38 and ERK1/2 (p44/p42) MAPK signaling pathways.** 2016. 134 p. PhD thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Dendritic cells (DCs) are the main antigen-presenting cells (APCs) due to several characteristics that distinguish them from the other APCs, like macrophages and B lymphocytes. For this reason, therapeutic interventions with DCs have been intensely tested in cancer patients in recent years and have shown promising results. However, therapy with DCs or monocyte-derived DCs *in vitro* (Mo-DCs) hasn't yet achieved its full potential. It may be due to several phenotype and maturation alterations that cancer patients' DCs or its precursors - monocytes - present. A lot have been explored about the function and phenotype from cancer patients but little is known about the molecular mechanisms that cause such alterations. In this context is worthnote the intracellular signaling pathways p38 and ERK 1/2 mitogen-activated protein kinase (MAPK), which play an important role in the differentiation and maturation processes in Mo-DCs, respectively. However, there are some data in literature that shows that p38 MAPK activation during Mo-DCs differentiation may impair this process and polarize to tolerogenic Mo-DCs. In an *in vitro* model we observed that the presence of a tumoral supernatant (ST) from a breast cancer adenocarcinoma lineage, MCF-7, during Mo-DC's differentiation leads to a decreased frequency of cells expressing CD1a and higher frequency of cells expressing CD14. Besides, those cells produced IL-6, TNF-alpha and IL-10 in higher amounts than control. Together these data suggest that MCF-7's supernatant impair Mo-DCs differentiation. The previous inhibition of ERK 1/2 MAPK corrected CD14 expression levels and partially reverted cytokine's production. On the other hand, p38 MAPK inhibition was able to correct the alterations found in CD1a and CD14 expression and partially reverted cytokine's production. Regarding the mechanism by which ST causes these changes we identified HSP27 protein in ST and investigated its effect on Mo-DCs differentiation. We didn't observed the alterations found with the ST when the cells were exposed to HSP27. Lastly, we investigated the role of p38 MAPK pathway during breast cancer patient's Mo-DC differentiation. The inhibition of p38 MAPK didn't reverted the decreased expression of CD86 found in patients Mo-DCs, on the contrary, decreased even more this molecule expression and, furthermore, decreased the expression of HLA-DR. Therefore, the data presented in this study suggest that p38 MAPK inhibition during breast cancer patient's Mo-DCs differentiation may not be an interesting approach considering the decreased expression of important molecules for antigen presenting.

Keywords: Dendritic cells. Breast cancer. p38 MAPK. HSP27.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cascata resumida de ativação da ERK 1/2 MAPK.....	25
Figura 2 - Cascata resumida de ativação da via p38MAPK.....	27
Figura 3 - Método de compensação automática no <i>software</i> FlowJo com esferas magnéticas.....	37
Figura 4 - Método de análise das amostras.....	38
Figura 5 - Estratégia de análise de linfócitos T reg.....	42
Figura 6 - Estratégia de análise de linfócitos T reg incluindo o marcador CD127.....	43
Figura 7 - Estratégia de análise de Tbet.....	44
Figura 8 - Western Blot para p38 total e fosforilada.....	46
Figura 9 - Western Blot para ERK1/2 total e fosforilada.....	46
Figura 10 - Western Blot para pHSP27 total e fosforilada.....	47
Figura 11 - Histogramas representativos do enriquecimento de monócitos após seleção negativa.....	50
Figura 12 - Fotomicrografia de culturas para diferenciação de Mo-DC.....	52
Figura 13 - Fenotipagem de monócitos, Mo-iDCs e Mo-mDCs.....	53
Figura 14 - Fenotipagem de monócitos, Mo-iDCs e Mo-mDCs - MFI.....	54
Figura 15 - Caracterização fenotípica de Mo-DCs de pacientes e controles.....	55
Figura 16 - Caracterização fenotípica de Mo-Dcs de pacientes e controles - MFI.....	56
Figura 17 - Cinética de ativação da p38 durante a diferenciação de Mo-DCs.....	57
Figura 18 - Cinética de expressão e fosforilação da p38 e ERK1/2 durante a diferenciação de monócitos em DCs.....	59
Figura 19 - Curva de crescimento da MCF-7.....	60
Figura 20 - Fenótipo de Mo-DCs tratadas com os diferentes sobrenadantes tumorais da MCF-7.....	61
Figura 21 - Fenótipo de Mo-DCs tratadas com os diferentes sobrenadantes tumorais da MCF-7.....	62
Figura 22 - Avaliação da potencial toxicidade do inibidor SB203580.....	64
Figura 23 - Viabilidade das Mo-DCs tratadas com SB203580.....	65

Figura 24 - Teste de eficácia do inibidor da p38 MAPK, SB203580.....	66
Figura 25 - Fenótipo de Mo-DCs provenientes de monócitos tratados com SB203580.....	67
Figura 26 - Fenótipo de Mo-DCs provenientes de monócitos tratados com SB203580.....	68
Figura 27 - Avaliação da potencial toxicidade do inibidor U0126.....	69
Figura 28 - Viabilidade das Mo-DCs tratadas com U0126.....	70
Figura 29 - Teste de eficácia do inibidor da ERK 1/2 MAPK, U0126.....	70
Figura 30 - Fenótipo de Mo-DCs diferenciadas na presença do inibidor da via ERK1/2.....	71
Figura 31 - Fenótipo de Mo-DCs diferenciadas na presença do inibidor da via ERK 1/2.....	72
Figura 32 - Delineamento experimental.....	73
Figura 33 - Morfologia das Mo-DCs.....	74
Figura 34 - Ativação da via p38 MAPK nas MO-DCs.....	75
Figura 35 - Efeitos do ST e do inibidor da p38 MAPK no fenótipo de Mo-DCs.....	76
Figura 36 - Efeitos do ST e do inibidor da p38 MAPK no fenótipo de Mo-DCs..	77
Figura 37 - Produção de citocinas durante as primeiras 24 h de diferenciação das Mo-DCs.....	78
Figura 38 - Produção de citocinas durante a diferenciação de Mo-DCs.....	79
Figura 39 - Morfologia das Mo-DCs.....	80
Figura 40 - Ativação da via ERK 1/2 MAPK nas Mo-DCs.....	81
Figura 41 - Efeitos do ST e do inibidor da ERK 1/2 MAPK no fenótipo de Mo-DCs.....	82
Figura 42 - Efeitos do ST e do inibidor da ERK1/2MAPK no fenótipo de Mo-DCs.	83
Figura 43 - Produção de citocinas durante as primeiras 24 h de diferenciação das Mo-DCs.....	84
Figura 44 - Produção de citocinas durante a diferenciação de Mo-DCs.....	85
Figura 45 - Ativação das vias p38 e ERK1/2MAPK nas Mo-DCs.....	86
Figura 46 - Produção de citocinas durante as primeiras 24 h de diferenciação das Mo-DCs.....	87
Figura 47 - Produção de citocinas durante a diferenciação de Mo-DCs.....	88

Figura 48 - Morfologia das Mo-DCs.....	89
Figura 49 - Efeito do ST e dos inibidores da p38 e ERK 1/2 MAPK no fenótipo de Mo-DCs.....	90
Figura 50 - Efeito do ST e dos inibidores da p38 e ERK 1/2 MAPK no fenótipo de Mo-DCs.....	91
Figura 51 - Habilidade linfo-proliferativa das Mo-DCs.....	92
Figura 52 - Proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	93
Figura 53 - Indução de células T reguladoras pelas Mo-DCs.....	94
Figura 54 - Produção de citocinas durante co-cultura de linfócitos T e Mo-DCs tratadas com o p38i e ST, ou ambos.....	95
Figura 55 - Produção de citocinas durante co-cultura de linfócitos T e Mo-DCs tratadas com o ERKi e ST, ou ambos.....	96
Figura 56 - Produção de citocinas durante co-cultura de linfócitos T e Mo-DCs tratadas com o p38i+ERKi e ST, ou ambos.....	97
Figura 57 - Quantificação intracelular de HSP27.....	98
Figura 58 - Quantificação de HSP27 no sobrenadante tumoral da MCF-7.....	100
Figura 59 - Presença de HSP27 no sobrenadante de culturas de Mo-DCs.....	101
Figura 60 - Efeitos da HSP27 e do inibidor da p38 MAPK no fenótipo de Mo-DCs.....	103
Figura 61 - Efeitos da HSP27 e do inibidor da p38 MAPK no fenótipo de Mo-DCs.....	104
Figura 62 - Expressão de CD68 e CD64 pelas Mo-DCs tratadas com ST.....	105
Figura 63 - Delineamento experimental.....	106
Figura 64 - Fenótipo de Mo-DCs de pacientes e controles.....	107
Figura 65 - Fenótipo de Mo-DCs de pacientes e controles - MFI.....	108
Figura 66 - Habilidade alo-estimuladora de Mo-DCs de pacientes e controles.....	109
Figura 67 - Expressão de FOXP3 e Tbet nos linfócitos estimulados por MO-DCs de controles e pacientes.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pacientes incluídos do estudo.....	33
Tabela 2 - Anticorpos utilizados para a fenotipagem das Mo-DCs.....	35
Tabela 3 - Anticorpos utilizados para a fenotipagem dos linfócitos.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula Apresentadora de Antígenos
CD	Cluster of Differentiation
DC	Célula Dendrítica
ERKi	Inibidor da via ERK 1/2 MAPK - U0126
FSC	Forward Scattered
GM-CSF	Fator de Crescimento de Colônia de Granulócito e Macrófago
HSP	Heat Shock Protein
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
LRS	Câmara de leucorredução
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCF-7	Linhagem de células de adenocarcinoma mamário humano
MFI	Mediana de Intensidade de Fluorescência
Mo-DC	Célula dendrítica derivada de Monócito
p38i	inibidor da via p38 MAPK - SB203580
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
R-10	RPML-1610 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SSC	Side Scattered
ST	Sobrenadante tumoral da linhagem MCF-7
Treg	Linfócitos T reguladores

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	18
2 OBJETIVOS	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 CASUÍSTICA.....	33
3.2 DIFERENCIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS DENDRÍTICAS A PARTIR DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO.....	34
3.3 AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE MEMBRANA DE Mo-DCs.....	35
3.4 MÉTODO PARA ANÁLISE FENOTÍPICA.....	36
3.5 SEPARAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD3 ⁺ PARA ENSAIOS DE CO-CULTURA	38
3.6 MARCAÇÃO DOS LINFÓCITOS T PARA OS ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO	39
3.7 ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T.....	39
3.7.1 <i>Deteção intracelular de fatores de transcrição</i>	40
3.7.2 <i>Estratégia de análise de linfócitos T reguladores (T reg)</i>	41
3.7.3 <i>Estratégia de análise de T-bet</i>	43
3.8 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E WESTERN BLOT	44
3.9 PADRONIZAÇÃO DO WESTERN BLOT.....	45
3.11 ENSAIO DE CITOTOXIDADE	47
3.12 DETECÇÃO DE CITOCINAS	48
3.13 ELISA.....	48
4 RESULTADOS.....	49
4.1 GERAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS DENDRÍTICAS A PARTIR DE MONÓCITOS (Mo-DCs)	50
4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE Mo-DCs DE PACIENTES E CONTROLES.	55
4.3 PERFIL DE ATIVAÇÃO DA P38 DURANTE A CULTURA DE DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS EM Mo-DCs PROVENIENTES DE PACIENTES COM CARCINOMA DE MAMA	56
4.4 CINÉTICA DA PRESENÇA E FOSFORILAÇÃO DE P38 E ERK1/2 DURANTE A DIFERENCIAÇÃO DE MONÓCITOS EM DCs	57
4.5 ESTABELECIMENTO DO MODELO <i>IN VITRO</i> PARA O ESTUDO DAS VIAS P38 MAPK E ERK1/2 MAPK EM Mo-DCs NA PRESENÇA DE SOBRENADANTE TUMORAL.....	59
4.5.1 <i>Curva de crescimento da MCF-7 e coleta do sobrenadante tumoral (ST)</i>	59
4.5.2 <i>Caracterização fenotípica de Mo-DCs diferenciadas na presença dos diferentes sobrenadantes tumorais da MCF-7</i>	60
4.5.3 <i>Tratamento com o inibidor da via p38MAPK, SB203580</i>	63
4.5.4 <i>Tratamento com o inibidor da via ERK1/2 MAPK, U0126</i>	68
4.5.5 <i>Efeitos do sobrenadante tumoral e o papel da via p38 MAPK</i>	73
4.5.6 <i>Efeitos do sobrenadante tumoral e o papel da via ERK 1/2 MAPK</i>	79
4.5.7 <i>Efeitos do sobrenadante tumoral e da inibição das vias p38 e ERK 1/2 MAPK</i>	85
4.5.8 <i>Atividade funcional da Mo-DCs</i>	91
4.6 AVALIAÇÃO DO PAPEL DA HSP27	98
4.6.1 <i>Efeito de HSP27 no fenótipo de Mo-DCs</i>	101
4.7 Mo-DCs DE PACIENTES COM CARCINOMA DUCTAL INVASIVO DE MAMA.	105
4.7.1 <i>Caracterização fenotípica de Mo-DCs derivadas de pacientes e o efeito da inibição da via p38 MAPK</i>	105
4.7.2 <i>Avaliação funcional das Mo-DCs de pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama</i>	109
5 DISCUSSÃO	111
6 CONCLUSÕES	123
REFERÊNCIAS.....	126

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O sistema imune é um sistema de reconhecimento, capaz de diferenciar o próprio do não-próprio e manter a homeostase do organismo. A manutenção dessa homeostase não depende somente do reconhecimento do próprio, mas sim do próprio sem "sinais de perigo", como proposto no elegante trabalho de Polly Metzinger em 1994 (MATZINGER, 1994). Assim, quando ocorre alguma perturbação da homeostase, seja por invasão de um patógeno, ou pelo crescimento descontrolado de células próprias (neoplasia), sinais de perigo, ou DAMPs (*DAMP – danger- associated molecular patterns*) - como citocinas pró-inflamatórias, conteúdo intracelular de células em necrose, ou até a presença de moléculas exógenas (*Pathogen-associated molecular patterns* - PAMPS) - ativam receptores que levam certas células do sistema imune a perceber esses desequilíbrios, as células apresentadoras de antígenos (APCs) (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; MATZINGER, 2002). Entre as APCs, existe uma classe de células que, por uma série de motivos que serão apresentados ao longo deste texto, são especializadas na apresentação de antígenos, são as células dendríticas (DCs). As DCs são células chave no sistema imune pois são capazes de iniciar e modular a resposta do sistema no sentido de restaurar a homeostase (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; BANCHEREAU et al., 2000; STEINMAN; BANCHEREAU, 2007).

A fim de manter a vigilância do tecido, as DCs realizam uma constante endocitose de moléculas presentes no meio extracelular (BANCHEREAU et al., 2000). Uma vez dentro da DC, tais moléculas endocitadas, ou já presentes em seu citosol, são processadas e fragmentos peptídicos delas derivados são apresentados em sua superfície no contexto de moléculas codificadas por genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (ROCK; GOLDBERG, 1999; WATTS, 1997). Classicamente, antígenos já presentes no citosol são complexados a moléculas do MHC de classe I, enquanto antígenos provenientes de endocitose são complexados a moléculas de classe II (PETERS, 1991). Dessa forma, os antígenos podem ser reconhecidos por linfócitos T, os quais darão continuidade à resposta imune específica.

O papel central das DCs na apresentação de antígenos depende de características próprias, que as distinguem das demais APCs (macrófagos e linfócitos B) e as tornam melhor capacitadas na apresentação de antígenos (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; GUERMONPREZ et al., 2002). Sua localização é estratégica para a captura de antígenos, pois se encontram mais concentradas

nos principais pontos de entrada de patógenos no organismo, nas mucosas e na pele (BANCHEREAU et al., 2000; STEINMAN; BANCHEREAU, 2007). Outra característica importante é a regulação da expressão de receptores de quimiocinas, que as permitem permanecer no tecido enquanto imaturas, pela expressão das moléculas CCR1, CCR2, CCR5 e CXCR1 e migrar para órgãos linfóides secundários, uma vez que tenham detectado “sinais de perigo” para o organismo e iniciado seu processo de maturação/ativação (SALLUSTO et al., 1998; SOZZANI et al., 1998). DCs maduras expressam o receptor CCR7 (SALLUSTO et al., 1998; SOZZANI et al., 1998), que responde à quimiocina SLC (*Secondary Lymphoid-Tissue Chemokine*), produzida nas áreas timo-dependentes dos órgãos linfóides secundários, interação essa que permite o "endereçoamento" das DCs maduras ou ativadas ao local de concentração dos linfócitos T (SAEKI et al., 1999).

Uma vez maduras, as DCs são capazes de apresentar antígenos aos linfócitos juntamente com sinais co-estimuladores (transmitidos, entre outras, pelas moléculas B7-1 e B7-2), o que os leva à ativação e expansão clonal (GUERMONPREZ et al., 2002; YOUNG et al., 1992). A supra-regulação das moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) aumenta a habilidade das DCs de induzir proliferação linfocitária (GUERMONPREZ et al., 2002). Contribuem também para tal, a presença de níveis elevados de moléculas de MHC de classe II, a secreção de citocinas como Interleucina (IL) 1, IL-12, Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e, provavelmente, ainda outros fatores não definitivamente estabelecidos, mas que tornam a DC madura a única APC capaz de ativar linfócitos T *naïve* (BANCHEREAU et al., 2000; GUERMONPREZ et al., 2002; INABA, 1997). Outra característica destas células, que lhes confere um potencial único de indução da resposta imune, é sua capacidade de realizar a apresentação cruzada de antígenos, isto é, a apresentação de moléculas endocitadas no contexto de moléculas do MHC de classe I (JOFFRE et al., 2012). Dessa forma, tanto linfócitos T auxiliares (CD4⁺) como citotóxicos (CD8⁺) *naïve* podem ser ativados pelas DCs maduras.

Como já mencionado, as células dendríticas possuem diferentes estados de maturação. Ao encontrarem moléculas potencialmente danosas para o organismo, ou moléculas liberadas no tecido lesado (mediadores inflamatórios, p.ex.) estas células iniciam seu processo de maturação/ativação, deixando de realizar continuamente a endocitose de partículas e tornando-se especializadas na apresentação desses antígenos para linfócitos T (BANCHEREAU et al., 2000). Para

que isso ocorra de maneira eficiente, uma série de alterações na expressão gênica e, consequentemente, alterações fenotípicas ocorrem na DC (GRANUCCI et al., 2001; LE NAOUR et al., 2001; RICHARDS; LE NAOUR; HANASH, 2002). Seu processo de maturação pode ser iniciado após a ligação de diferentes mediadores em receptores celulares que reconhecem PAMPs, ou, mais amplamente, padrões associados ao “perigo”, os DAMPs. (BIANCHI, 2007; MATZINGER, 2002). Estes receptores incluem a família dos *Toll Like Receptors* (TLR), as proteínas *Nucleotide Oligomerisation Domain* (NOD), e receptores para moléculas próprias liberadas nas situações de dano tecidual, como as citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1, Interferon (IFN), *Heat Shock Proteins* (HSP) e outros mediadores inflamatórios (BANCHEREAU et al., 2000; PHILPOTT; GIRARDIN, 2004). Além disso, a própria interação com linfócitos pode contribuir para a maturação das DCs, por exemplo, através da interação entre CD40 e CD40L, RANK e TRANCE (CELLA, 1996; WONG; JOSIEN; CHOI, 1999).

As DCs são um grupo heterogêneo de células. Já foram descritas DCs mielóides (mDCs) como as BDCA-1⁺ e BDCA-3⁺, e as plasmocitóides (pDCs), BDCA-2⁺ e BDCA-4⁺ (DZIOANEK et al., 2000). Além disso, há as células de Langerhans, encontradas na epiderme. As pDCs são dependentes de IL-3 e possuem um papel importante na resposta imune contra vírus, pois são boas produtoras de IFN do tipo 1 (COLLIN; MCGOVERN, 2013; MACDONALD et al., 2002). As mDCs BDCA-1⁺ são as mais abundantes no sangue, nos tecidos e nos órgãos linfóides secundários, possuem expressão ampla de receptores para sinais de perigo e excelente habilidade de estimular linfócitos T *naïve*, contudo tem capacidade inferior às mDCs BDCA-3⁺ em realizar a apresentação cruzada de antígenos (COLLIN; MCGOVERN, 2013). As mDCs BDCA-3⁺ parecem ser especializadas em capturar células mortas ou necróticas e na realização da apresentação cruzada (COLLIN; MCGOVERN, 2013).

Recentemente foi identificado um precursor de células dendríticas BDCA-1⁺ e BDCA-3⁺ presente na medula óssea, sangue periférico e tecidos linfóides periféricos. Esse precursor não dá origem às células dendríticas plasmocitóides, somente às mielóides, representa cerca de 0,001% das células no sangue periférico e sua população aumenta em resposta a Flt3L (BRETON et al., 2015).

A recuperação do sangue periférico das células dendríticas é muito baixa, cerca de 2% das células presentes do sangue são DCs, e dessas, estão presentes

pelo menos 2 subtipos, mDCs e pDCs. Dessa forma, o estudo dessas células era limitado até que, em 1994, Sallusto e Lanzavecchia descreveram um protocolo para diferenciação de DCs a partir de monócitos, as Mo-DCs (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994). A geração de Mo-DCs *in vitro*, a partir de células abundantes no sangue periférico permitiu então seu amplo e profundo estudo e, ainda, seu uso em protocolos de imunoterapia. Além disso, mais tarde surgiram evidências de que monócitos podem também ser progenitores de DC *in vivo* (RANDOLPH et al., 1999).

Tendo em vista o papel chave das DCs no sistema imune, não é de se surpreender que em situações como o câncer, nas quais a ausência de resposta imune contra antígenos tumorais contribui para a “sobrevivência” da neoplasia no organismo, sejam encontradas alterações funcionais nas DCs (GABRILOVICH, 2004). Há dados na literatura (DELLA BELLA et al., 2003; GABRILOVICH; CIERNIK; CARBONE, 1996; GABRILOVICH et al., 1997; HASEBE et al., 2000; ORSINI et al., 2013; SATTHAPORN; ROBINS, 2004) e de nosso laboratório (NEVES et al., 2005; RAMOS et al., 2012) que mostram que DCs de pacientes com câncer apresentam defeitos fenotípicos e funcionais, como menor expressão de moléculas do MHC de classe I e II e de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86). Além das DCs provenientes de pacientes com câncer, os próprios monócitos - que são precursores de DCs tanto *in vitro* (SALLUSTO, 1994; ZHOU; TEDDER, 1996) quanto *in vivo* (RANDOLPH et al., 1999) - também podem apresentar alterações fenotípicas que acabam comprometendo o fenótipo das DCs deles derivadas (NEVES et al., 2005).

No caso do carcinoma ductal invasivo de mama, dados de nosso grupo mostram que Mo-DCs dessas pacientes apresentam menor frequência de expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, das moléculas de MCH de classe II, da integrina CD11c e do receptor de quimiocinas CCR7 (AZEVEDO et al., 2010). Além disso, essas células possuem menor capacidade de induzir proliferação de linfócitos T alogênicos, induzindo elevada secreção de IL-10 (AZEVEDO et al., 2010). Adicionalmente, também foi observado que as células dendríticas derivadas de monócitos dessas pacientes possuem maior habilidade de induzir células T reguladoras (RAMOS et al., 2012). Ainda, dados da literatura revelam que DCs de pacientes portadoras de câncer de mama, além de estarem em menor número no sangue periférico quando comparadas a controles saudáveis, apresentam defeitos

na apresentação de antígenos não relacionados ao tumor, levando a uma menor estimulação de linfócitos T (GABRILOVICH et al., 1997).

A teoria da imunoedição, proposta há alguns anos, propõe que o sistema imune é capaz de responder inicialmente contra o tumor e vai selecionando as células tumorais não imunogênicas conforme responde e elimina as imunogênicas, até um ponto em que o crescimento tumoral entra em fase exponencial devido ao fato de que o sistema imune não pode mais reconhecer, e logo, responder, contra o tumor. Entretanto, mais recentemente, essa teoria passou a considerar o importante papel da imunossupressão provocada pelo tumor no microambiente (KOEDEL et al., 2007; SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011). Em 2012, um elegante trabalho com um modelo de câncer de ovário, mostrou que as DCs presentes no tumor e nos linfonodos drenantes, têm um papel importante na modulação da resposta de células T, que por sua vez controlam o crescimento tumoral. Essa interação é capaz de conter o crescimento tumoral por um longo período. Porém, devido a secreção de fatores supressores pelo tumor no microambiente, as DCs se tornam tolerogênicas com o passar do tempo e passam a não mais estimular de forma eficiente a resposta dos linfócitos T, o que quebra o balanço entre resposta imune e crescimento tumoral e favorece a progressão do tumor. O papel fundamental das DCs na interação do tumor com o sistema imune é ilustrado neste trabalho pelo fato de que a depleção precoce das DCs, durante a evolução inicial da tumorigênese, é favorável à progressão do tumor, enquanto sua depleção em um momento mais tardio é desfavorável para a evolução tumoral (SCARLETT et al., 2012).

A diferenciação de DCs a partir de monócitos envolve a participação de várias vias de sinalização, a começar pelas vias de sinalização dos receptores de GM-CSF e IL-4. Ambos os receptores utilizam as moléculas com função tirosina quinase da família Janus kinase (JAKs) para realizar sua sinalização e consequente ativação das STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) (DARNELL, 1998). A combinação de sinalização desses dois receptores leva a ativação de STAT1, STAT3, STAT5 e STAT6, e a ativação coordenada dessas proteínas durante a diferenciação é fundamental para a correta diferenciação das DCs (ESASHI et al., 2008; JACKSON et al., 2004; LUTZ et al., 2002). Por exemplo, a STAT1 é pouco ativa no início da diferenciação mas é fundamental para a completa diferenciação e maturação das DCs (JACKSON et al., 2004). Já o contrário ocorre com STAT6, que vai se tornando menos ativa conforme os monócitos se diferenciam (JACKSON et al.,

2004). STAT5 é importante para a diferenciação de DCs mielóides, pois reprime a diferenciação de pDCs (ESASHI et al., 2008). Além da via JAK/STAT, a via da ERK1/2 MAPK (*Mitogen Activated Pathway kinase*) também já foi reportada como fundamental durante o processo de diferenciação de Mo-DCs (XIE et al., 2005). Além disso, a expressão de fatores de transcrição como IRF-4 (*Interferon regulatory factor 4*) e PU.1 também têm sido relacionada à diferenciação de monócitos em DCs (LEHTONEN et al., 2005), enquanto MafB1 tem sido relacionado à diferenciação dos monócitos em macrófagos (BAKRI et al., 2005; SEGURA et al., 2013).

O processo de maturação das DCs, embora possa ser desencadeado por sinais distintos de perigo, captados por diferentes receptores, parece depender de um número restrito de vias sinalizadoras, comuns a vários destes receptores. Estas vias incluem as vias: da PI3 (phosphoinositide-3-OH)-quinase, da ERK MAPK (*extracellular signal-regulator kinase*), do NF- κ B (*nuclear factor κ B*) e da p38 MAPK (ARDESHNA et al., 2000; ARRIGHI et al., 2001; RESCIGNO, 1998). Entre estas, a via do NF- κ B tem sido a mais estudada, podendo se lhe atribuir um papel importante no fenômeno (MÄKELÄ et al., 2009; OUAAZ et al., 2002). Contudo, a via da p38 MAPK possui, sabidamente, um papel relevante no processo de maturação das DCs, estando envolvida com o aumento da expressão das moléculas CD80, CD83 e CD86, induzido tanto por lipopolissacarídeo (LPS) quanto por TNF- α (AGRAWAL et al., 2003; ARDESHNA et al., 2000; ARRIGHI et al., 2001; LANGOSCH et al., 2016).

As MAPK são quinases conservadas evolutivamente e controlam diversos processos celulares (GUPTA; NEBREDÁ, 2015). Em células de mamíferos, 14 MAPKs foram descritas até o momento, sendo que a ERK1 e ERK2, *Jun N-terminal kinase 1* (JNK1) e JNK2 e p38 MAPK têm sido extensivamente estudadas no sistema imune (ARTHUR; LEY, 2013). As MAPKs são ativadas por outras quinases, chamadas MAP *kinase kinases* (MKK), através da fosforilação de resíduos de treonina e tirosina. Uma vez ativadas, as MAPKs passam o sinal a frente, fosforilando outras proteínas ou migrando para o núcleo, onde ativam fatores de transcrição (ARTHUR; LEY, 2013; ASHWELL, 2006). Cada uma das diferentes MAPKs tem como alvo distintos grupos de fatores de transcrição.

De maneira geral, enquanto a via da ERK 1/2 transmite sinais mitógenos e tem sido relacionada com proliferação e diferenciação celular, as vias da JNK e da p38MAPK têm sido relacionadas à resposta celular ao estresse e, por isso, são

também mencionadas como SAPKs (*Stress-Activated Protein Kinases*) (KARIN, 1998; WORTZEL; SEGER, 2011).

A cascata da via ERK 1 e 2 começa com a ativação e recrutamento das proteínas Ras próximo à membrana da célula. Em certas circunstâncias, como no sistema reprodutivo e em células transformadas e respostas do sistema imune inato, c-Mos e TPL2, respectivamente, é que iniciam essa cascata. Logo abaixo na cascata, MEK1/2 (MKKs) são fosforiladas e, por sua vez, fosforilam ERK1/2 (Figura 1) (ARTHUR; LEY, 2013; WORTZEL; SEGER, 2011).

A via ERK1/2 é fundamental para os processos de proliferação e sobrevivência celulares (ARTHUR; LEY, 2013; KIM; KIM, 2016; WORTZEL; SEGER, 2011). Em células mielóides, a via ERK1/2 participa da produção de citocinas como TNF- α , IL-1 β e IL-10, porém regula negativamente a produção de IL-12, IFN- β e iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*) (ARTHUR; LEY, 2013). Além disso, como já mencionado, a via ERK1/2 é essencial para a diferenciação de monócitos em DCs (XIE et al., 2005).

Figura 1 - Cascata resumida de ativação da ERK 1/2 MAPK. Mitógenos ou outros estímulos ativam o receptor da célula, o que leva ao recrutamento e ativação de RAF e, em algumas conduções específicas, TPL2 ou c-MOS. Isso leva a fosforilação de MKK1/2, que por sua vez, fosforilam ERK1/2. A ativação (fosforilação) de ERK1/2 leva a mecanismos celulares que promovem a sobrevivência, proliferação e diferenciação celulares.

A família da p38 MAPK é composta por quatro isoformas da p38 - p38 α (MAPK14), p38 β (MAPK11), p38 δ (MAPK13), e p38 γ (MAPK12) (GUPTA; NEBRED, 2015). A isoforma alfa é ubiquitivamente expressa em altos níveis na maioria dos tipos celulares. A p38 α é ativada por MKK3, MKK6 e, em algumas situações por MKK4 e têm como substrato mais de 100 diferentes proteínas (TREMPOLEC; DAVE-COLL; NEBRED, 2013a, 2013b).

Além da resposta ao estresse, como exposição à luz ultravioleta, estresse oxidativo e choque térmico, a p38 MAPK está envolvida em processos como diferenciação, proliferação e sobrevivência de vários tipos de células (GUPTA; NEBRED, 2015; OEZTUERK-WINDER; VENTURA, 2012; TREMPOLEC; DAVE-COLL; NEBRED, 2013a; VENTURA et al., 2007). No contexto do sistema imune, essa via de sinalização também participa da resposta a citocinas, quimiocinas, hormônios e fatores de crescimento (Figura 2). Dessa forma, a via de p38 MAPK parece ser não apenas uma via de resposta ao estresse, mas de resposta a mudanças nas condições ambientais (TREMPOLEC; DAVE-COLL; NEBRED, 2013a). Dada a participação em tão diversos e importantes processos celulares, não é de se estranhar que camundongos *knockout* para a isoforma alfa da p38 MAPK não sejam viáveis (ADAMS et al., 2000; MUDGETT et al., 2000).

Figura 2 - Cascata resumida de ativação da via p38 MAPK. Sinais de estresse ou certas citocinas estimulam receptores celulares que levam à ativação das proteínas MKK3/6. Estas, por sua vez, fosforilam a proteína p38. A proteína p38 então pode fosforilar diversas proteínas, entre elas MAPKAPK-2 (MK2), que fosforila HSP27.

Nas células dendríticas, a ativação da via p38 MAPK durante a maturação das DCs é fundamental, pois desencadeia a produção de citocinas pró-inflamatórias e o aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras, como já mencionado (AGRAWAL et al., 2003; ARDESHNA et al., 2000; ARRIGHI et al., 2001; LANGOSCH et al., 2016). Em 2003 Xie e colegas demonstraram que a adição de LPS nas culturas de monócitos prejudica a diferenciação em células dendríticas por um mecanismo dependente da via p38 MAPK (XIE et al., 2003). Além disso, diversos trabalhos mostraram que o tumor secreta fatores que prejudicam a diferenciação de células dendríticas via ativação da via p38 MAPK, tanto em modelos animais e humanos quanto em pacientes com câncer (CIRONE; DI RENZO; TRIVEDI; et al., 2010; OOSTERHOFF et al., 2012; WANG et al., 2006a, 2006b). Por outro lado, a inibição da via p38 MAPK nas células progenitoras leva, pelo menos em parte, à recuperação do fenótipo e função das Mo-DCs (CIRONE; DI RENZO; TRIVEDI; et al., 2010; OOSTERHOFF et al., 2012; WANG et al., 2006a, 2006b).

Frente ao estresse, a via da p38 MAPK pode ativar (fosforilar) a proteína de choque térmico 27 (HSP27 – *Heat Shock Protein 27*) (Figura 2), cuja expressão é

induzida sob condições estressantes, como calor, estresse oxidativo, tratamento com drogas citotóxicas, e pode ser ativada também por outras vias de sinalização (KOSTENKO; MOENS, 2009).

As HSPs são proteínas conservadas evolutivamente, presentes desde bactérias até células de mamíferos. Sob situação de estresse, as HSPs previnem a agregação de proteínas, realizam o redobramento de proteínas incorretamente dobradas e marcam proteínas danificadas para destruição. Em situações homeostáticas, as HSPs auxiliam no dobramento de proteínas recém sintetizadas, na translocação das proteínas entre organelas e também regulam o ciclo celular (BORGES et al., 2016).

A HSP27 é uma proteína chaperona independente de ATP, cuja expressão é induzida por estrógeno (EHRNSPERGER et al., 1997). A HSP27 está envolvida em processos diversos como a manutenção da arquitetura do citoesqueleto, a migração, a sobrevivência, a proliferação e diferenciação celulares, apesar de não estar, até o momento, muito claro qual o exato papel dessa proteína em cada um destes processos (SCHMITT et al., 2007). A HSP27 pode assumir vários formatos e suas diferentes funções parecem estar atreladas à forma. Quando a HSP27 não está fosforilada forma grandes oligômeros que parecem atuar na proteção celular contra o estresse (AL-MADHOUN et al., 2007; LAVOIE et al., 1995). Porém, quando fosforilada, ocorre a dissociação dos oligômeros, o que favorece a interação da HSP27 com outras proteínas como as proteínas envolvidas na apoptose (AL-MADHOUN et al., 2007; LAVOIE et al., 1995). Além disso, a HSP27 possui também um papel anti-apoptótico por sequestrar o citocromo c (BRUEY et al., 2000), quando liberado pela mitocôndria e também pela interação com Daxx, a qual participa da via de apoptose mediada pelo receptor Fas (CHARETTE et al., 2000).

No sistema imune têm sido atribuído à HSP27 um papel supressor, pois essa proteína desencadeia a produção de IL-10 por monócitos via p38 MAPK (DE et al., 2000). Além disso, a HSP27 foi descrita como marcador circulante de mal prognóstico no câncer de mama (CIOCCA; CALDERWOOD, 2005; DE et al., 2000). Recentemente foi descrito que a HSP27 é capaz de interferir nos mecanismos de diferenciação de monócitos em células dendríticas (LAUDANSKI; DE; MILLER-GRAZIANO, 2007a).

Dados de nosso laboratório revelaram que Mo-DCs de pacientes portadoras de carcinoma ductal invasivo de mama apresentam, além de defeitos fenotípicos e

funcionais já citados, uma elevada expressão de HSP27. Como já mencionado, a via da p38 MAPK é uma das responsáveis pela ativação da HSP27 (Figura 02) e a ativação precoce da p38 MAPK durante a diferenciação de monócitos em DCs prejudica esse processo e pode levar a DC a se tornar uma APC tolerogênica (XIE et al., 2003).

Muito já se foi explorado sobre os defeitos em DCs e Mo-DCs de pacientes com câncer, mas pouco se sabe sobre as vias de sinalização responsáveis por tais alterações. Levando em consideração o papel chave das DCs no sistema imune e o uso potencial de Mo-DCs em protocolos de imunoterapia do câncer, o intuito desse trabalho foi investigar o possível papel das vias p38 MAPK e ERK1/2 MAPK nas alterações provocadas pelo tumor, já que ambas as vias possuem papel importante na diferenciação dessas células.

2 OBJETIVOS

Este projeto procurou investigar o possível papel das vias de sinalização ERK (p44/p42 MAPK) e p38 MAPK nas alterações causadas pelo sobrenadante tumoral da linhagem de células MCF-7 em Mo-DCs de controles saudáveis. Pretendemos também investigar se a via p38 MAPK possuía algum papel nas alterações fenotípicas e funcionais encontradas em Mo-DCs de pacientes portadoras de carcinoma ductal invasivo de mama.

Especificamente, pretendeu-se realizar:

- A avaliação fenotípica das Mo-DCs de pacientes e controles, e de Mo-DCs diferenciadas na presença do sobrenadante tumoral, determinando-se, por citometria de fluxo, a expressão de CD14 (marcador de monócitos), CD1a (molécula apresentadora de lipídeos e glicolipídeos), CD11c (marcador de DCs mielóides) CD40 (molécula co-estimuladora), CD80 (B7-1, molécula co-estimuladora), CD86 (B7-2, molécula co-estimuladora), CD83 (marcador de DCs ativadas/maduras), PD-L1 (molécula supressora de ativação) e HLA-DR (molécula do MHC de classe II);
- A determinação do papel das vias p38 e ERK1/2 MAPK durante a diferenciação de Mo-DCs de doadores saudáveis expostas ao sobrenadante tumoral e de pacientes com câncer de mama, utilizando os inibidores específicos dessas vias de sinalização;

Ainda, para avaliação funcional das DCs pretendeu-se realizar:

- A avaliação de sua atividade aloestimuladora, com a determinação do perfil de linfócitos ativados determinando-se:
 - A expressão de fatores de transcrição T-bet e FOXP-3 nos linfócitos estimulados pelas Mo-DCs.
 - O perfil de citocinas presentes nas co-culturas entre linfócitos T e Mo-DCs (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foram coletadas amostras de sangue periférico, necessárias para a diferenciação das Mo-DCs, de pacientes portadoras de carcinoma ductal invasivo de mama, tratadas no Hospital Pérola Byington e de doadoras saudáveis, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Este trabalho foi submetido à avaliação pela Comissão de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e à Comissão de Ética do Hospital Pérola Byington e aprovado por ambas.

A tabela 1 correlaciona os pacientes incluídos no estudo. Como controle, foi utilizado material de doadores saudáveis entre 25 e 58 anos de idade.

Tabela 1 - Pacientes incluídos do estudo.

Paciente	Idade	Diagnóstico
1	60 anos	Carcinoma ductal infiltrativo com características ductais
2	68 anos	Carcinoma ductal invasivo
3	49 anos	Carcinoma ductal in situ
4	63 anos	Carcinoma ductal invasivo
5	51 anos	Carcinoma ductal invasivo
6	62 anos	Carcinoma ductal invasivo
7	28 anos	Carcinoma ductal invasivo
8	61 anos	Carcinoma ductal invasivo
9	70 anos	Carcinoma ductal invasivo
10	44 anos	Carcinoma ductal invasivo
11	51 anos	Carcinoma ductal invasivo
12	57 anos	Carcinoma ductal invasivo
13	61 anos	Carcinoma ductal invasivo
14	47 anos	Carcinoma ductal invasivo
15	48 anos	Carcinoma ductal invasivo
16	47 anos	Carcinoma ductal invasivo
17	40 anos	Carcinoma mamário invasivo (sic)

3.2 Diferenciação *in vitro* de células dendríticas a partir de monócitos do sangue periférico

Para a purificação de células mononucleares, 12 mL Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) foram acrescentados em tubos plásticos de 50 mL e depois 30 mL de sangue periférico foram colocados gentilmente acima do Ficoll-Paque Plus, tomando o cuidado de não misturá-los. O material foi centrifugado a 900 g por 30 min, a 18 °C; o *brake* da centrífuga foi zerado. A camada de células mononucleares formada foi retirada, colocada em outro tubo juntamente com RPMI 1640 (Life Technologies™, Carlsbad, CA, EUA) e centrifugada a 1200 rpm por 10 min. As células foram lavadas por mais 2 vezes, a 1100 rpm e 900 rpm, respectivamente, para eliminação das plaquetas. O sedimento foi coletado, as células foram quantificadas, ressuspensas em meio RPMI-1640 e submetidas ao processo de separação por esferas magnéticas. As células CD14⁺ foram separadas a partir das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) por seleção negativa em coluna imunomagnética, utilizando o *kit Monocyte Isolation Kit II human* (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante. Brevemente, as PBMC foram centrifugadas a 300 g por 10 min à 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e as células foram ressuspensas em 30 µL (para cada 1 x 10⁷ de células) de tampão apropriado [PBS suplementado com 0,5% de albumina sérica bovina (BVA; Sigma-Aldrich), pH 7,2 e 2 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA; Sigma-Aldrich), temperatura entre 4-8 °C]. Logo após, 10 µL do reagente bloqueador de FcR e 10 µL do coquetel de anticorpos biotinilados (anti-CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 e glicoforina A) foram adicionados. Após uma leve agitação, as células foram incubadas por 10 min à 4 °C. Em seguida, 30 µL de tampão e 20 µL de microesferas anti-biotina foram adicionados, misturados e incubados por mais 15 min à 4 °C. Decorrido o tempo, as células foram lavadas com 2 mL de tampão para cada 1 x 10⁷ de células e centrifugadas a 300 g por 10 min. Logo após, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 500 µL de tampão e aplicadas na coluna imunomagnética, obtendo-se o concentrado de células CD14⁺.

Após a separação, as células CD14⁺ foram colocadas em placas de 24 poços na concentração de 1 x 10⁶/mL para diferenciação em DCs, em meio AIM-V (Gibco by Life Technologies™, Carlsbad, CA, EUA), acrescido de 50 ng/mL de Fator

Estimulador de Colônias de Granulócito e Macrófago (GM-CSF; PeproTech, EUA) e 50 ng/mL de Interleucina 4 (IL-4; PeproTech, EUA) .

Para determinados experimentos, as Mo-DCs foram estimuladas para maturação com lipopolissacarídeo (LPS; Sigma-Aldrich), no quinto dia de cultura, na concentração final de 100 ng/mL e deixadas em cultura por mais 24 h para maturação.

Para os ensaios com o sobrenadante tumoral foram utilizadas câmaras de leucorredução, pela alta quantidade de células mononucleares do sangue periférico que essas câmaras contém. Os procedimentos de separação de PBMC e seleção de células CD14⁺ foram idênticos aos descritos acima.

3.3 Avaliação do fenótipo de membrana de Mo-DCs

Para determinar o fenótipo de membrana das células de pacientes e controles, ou de doadores saudáveis cultivadas na presença de sobrenadante tumoral, essas células foram marcadas com anticorpos monoclonais comerciais para as seguintes moléculas: CD1a, CD14, CD11c, CD40, CD80, CD86, CD83, PD-L1, HLA-DR, CD64. Além disso, foi utilizado o corante violeta LIVE/DEAD[®] (Invitrogen) para a análise de viabilidade celular. Os detalhes dos anticorpos utilizados constam na Tabela 2.

Tabela 2 - Anticorpos utilizados para a fenotipagem das Mo-DCs.

Especificidade	Clone	Isotipo	Origem	Fluorocromo
BDCA-1	AD5-8E7	IgG2a	Camundongo	PE
CD1a	HI149	IgG1,k	Camundongo	FITC
CD14	M5E2	IgG2a, k	Camundongo	FITC
CD14	M5E2	IgG2a, k	Camundongo	PE
CD11c	B-ly6	IgG1, k	Camundongo	PE-Cy7
CD40	5C3	IgG1, k	Camundongo	APC-H7
CD64	10.1	IgG1, k	Camundongo	PE-Cy7
CD68	Y1/82A	IgG2b, k	Camundongo	PE
Isotipo controle	27-35	IgG1b, k	Camundongo	PE
CD80	L307.4	IgG1, k	Camundongo	APC-H7
CD83	HB15e	IgG1, k	Camundongo	APC
CD86	2331 (FUN1)	IgG1, k	Camundongo	APC
CD163	GHI/61	IgG1, k	Camundongo	Alexa Fluor 647
PD-L1 (CD274)	MIH1	IgG1, k	Camundongo	PE
HLA-DR	G46-6	IgG2a, k	Camundongo	V500
Pp38	36/p38	IgG1, k	Camundongo	PE-Cy7

(pT180/pY182)				
Isotipo controle	MOPC-21	IgG1, k	Camundongo	PE-Cy7
HSP27	G3.1	IgG1	Camundongo	PE
Isotipo controle	MOPC-21	IgG1	Camundongo	PE

Após a contagem em câmara de Neubauer, alíquotas de $1-2 \times 10^5$ células, obtidas das culturas, foram colocadas em tubos cônicos de 1,5 mL e lavadas, por centrifugação, a 13000 rpm, a 4 °C por 10 s, com 300 µL de tampão para citometria PBS-BSA (PBS suplementado com 0,5% de soroalbumina bovina e 0,02% de azida sódica). Ao sedimento obtido foram adicionados os anticorpos específicos para os marcadores de interesse. As células foram incubadas ao abrigo da luz por 20 min a 4 °C. Após esse período, foram acrescentados 200 µL de PBS-BSA e o material lavado duas vezes nas mesmas condições. As células marcadas foram ressuspensas com 300 µL de PBS-BSA 0,5% contendo 2% de formaldeído para a fixação das mesmas. A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo (BD FACSCanto II) com o *software* FACSDiva (BD Biosciences) e os dados obtidos foram analisados com a utilização do *software* FlowJo 8.7 (Tree Stars Inc).

3.4 Método para análise fenotípica

Para análise fenotípica das células dendríticas procedeu-se conforme descrito a seguir. Esferas magnéticas marcadas com os anticorpos monoclonais foram utilizadas para ajustar a voltagem dos *lasers* no citômetro. A seguir, foi realizada a compensação no *software* de análise FlowJo, realizando-se a delimitação do *gate* que inclui as esferas (Figura 3A), e posteriormente, a delimitação dos picos negativo e positivo para cada fluorocromo (Figura 3B).

Figura 3 - Método de compensação automática no software FlowJo com esferas magnéticas. A: Gráfico em pontos coloridos demonstrando o *gate* de análise das esferas magnéticas. B: Histograma exemplificando o método para compensação automática para o fluorocromo PerCP. O gráfico demonstra a delimitação do pico de esferas positivas para este fluorocromo e o pico negativo.

Em gráfico de FSC A (FSC – *forward scatter area*) por FSC H (H= Altura) foi feito um *gate* na população com característica linear para seleção de *singlets* (Figura 4A), com o intuito de eliminar células agrupadas da análise (*doublets*). Dentro deste *gate*, em gráfico de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC – *side scatter*), delimitou-se o *gate* R1 na população que possuía estes parâmetros característicos de DCs (Figura 4B). Dentro de R1 foi feito um *gate* nas células vivas (Figura 4C), ou seja, aquelas com menor expressão do corante de viabilidade LIVE/DEAD® (Invitrogen). Dentro do *gate* de células vivas delimitou-se então o *gate* de células positivas a partir do tubo não marcado para cada fluorocromo (Figura 4D).

Figura 4 - Método de análise das amostras. A: Em gráfico de FCS-A por FCS-H foi feito o *gate* na população de *singlets* (A), e dentro deste *gate*, em gráfico de SSC-A por FCS-A, foi delimitado o *gate* R1 (B) na população com tamanho e granulosidade característicos das células de interesse. Dentro de R1 delimitou-se o *gate* de células vivas, com menor expressão do corante LIVE/DEAD® (Invitrogen) (C). Dentro do *gate* de células vivas delimitou-se então o *gate* de células positivas para cada marcador, como por exemplo para HLA-DR (D).

3.5 Separação de linfócitos T CD3⁺ para ensaios de co-cultura

Nos experimentos de co-cultura, linfócitos provenientes de doadores saudáveis foram descongelados, lavados em meio de cultura RPMI 1640 e deixados por 24h em cultura em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; LifeTechnologies™, Carlsbad, EUA), 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco by Life Technologies™, Carlsbad, CA, EUA) (R-10). A população de células CD3⁺ foi enriquecida através de sua conjugação com *beads* magnéticas (MACS - Miltenyi Biotec) anti-CD3 e seleção magnética por coluna imunomagnética, de acordo com as instruções do fabricante.

3.6 Marcação dos linfócitos T para os ensaios de proliferação

Os linfócitos T CD3⁺ separados foram contados e centrifugados a 1200 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 1 mL de PBS-BSA 0,5% pré aquecido. Foi adicionado 2 µL de CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) (LifeTechnologies™, Carlsbad, EUA) 5 mM para cada 1 x 10⁷ de células. As células foram incubadas a 37 °C ao abrigo da luz por 10 min. Após este tempo, foram adicionados cerca de 10 mL de meio R-10 e as células foram levadas à incubação em banho de gelo por 5 min. Após o período de incubação, prosseguiu-se com centrifugação de 800 g por 7 min a 4 °C seguida de duas lavagens com meio R-10. O sobrenadante foi dispensado e as células foram quantificadas para os ensaios posteriores.

Para marcar os linfócitos com o reagente Cell Trace violeta (CTV - Invitrogen™), utilizado em alguns experimentos, as células foram incubadas no escuro com 2,5 µM do corante em PBS em constante agitação, à temperatura ambiente e por 20 min. Após esse período, as células foram incubadas por 5 min com R-10 e centrifugadas a 300 g por 10 min. Logo após, o sobrenadante foi retirado e as células novamente incubadas por 5 min com R-10 e centrifugadas a 300 g por 10 min. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em meio de cultura R-10 para posterior ensaio de proliferação.

3.7 Ensaios de Proliferação de linfócitos T

Na avaliação da capacidade estimuladora das células dendríticas geradas *in vitro*, Mo-DCs foram co-cultivadas com linfócitos T CD3⁺ alogenícos previamente corados, na proporção 1 DC: 10 linfócitos T, em um volume final de 250 µL/poço em meio R-10, cultivadas em placa de 96 poços em fundo “U”. As células foram mantidas por cinco dias em estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂ e a 37 °C. Após os cinco dias de co-cultura, os linfócitos foram marcados com anticorpos de superfície e a diluição do CFSE ou CTV foi avaliada por citometria de fluxo (FACS Canto II – BD - Biosciences). Os dados obtidos foram analisados usando-se o *software* FlowJo versão 8.7 (Three Star). Os anticorpos utilizados para fenotipagem dos linfócitos encontram-se listados na tabela 3.

Tabela 3 - Anticorpos utilizados para a fenotipagem dos linfócitos.

Especificidade	Clone	Isotipo	Origem	Fluorocromo
CD3	HIT3a	IgG2a, k	Camundongo	FITC
CD4	RPA-T4	IgG1, k	Camundongo	FITC
CD4	M-T477	IgG2a, k	Camundongo	PE
CD8	SK1	IgG1, k	Camundongo	PERCP
CD25	2A3	IgG1, k	Camundongo	APC
CD127	HIL-7R-M21	IgG1, k	Camundongo	BV510
T-bet	04-46	IgG1, k	Camundongo	PerCP-Cy5.5
Isotipo controle	X40	IgG1, k	Camundongo	PerCP-Cy5.5
FOXP3	259D/C7	IgG1	Camundongo	PE
Isotipo controle	MOPC-21	IgG1, k	Camundongo	PE

3.7.1 Detecção intracelular de fatores de transcrição

Neste ensaio, usou-se o *kit* para marcação intracitoplasmática da eBioscience (*Human Regulatory T Cell Staining Kit*). Inicialmente, 1×10^6 células foram suspensas em 100 μ L de PBS 1 x com 2% de SFB. Fez-se a marcação de superfície com os anticorpos de superfície anti-CD4, anti-CD25 e, em alguns casos, anti-CD127, incubando-se por 30 min a 4 °C no escuro. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, as células foram fixadas com uma solução de Fixação/Permeabilização 1 x fornecida pelo *kit*, incubando-se 30 min no escuro, à temperatura ambiente (T.A.). Após este período, adicionou-se 200 μ L tampão de permeabilização e as células foram incubadas por 30 min a T.A. Depois desse período, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 10 s. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se mais 200 μ L de tampão de Permeabilização 1 x às células e centrifugou-se a suspensão por 10 s a 13000 rpm. Após a segunda centrifugação, descartou-se o sobrenadante, agitou-se vigorosamente e adicionaram-se 2 μ L dos anticorpos para os fatores de transcrição, incubando-se por 30 min no escuro, a T.A. Após esta etapa, lavaram-se as células 1 vez com 200 μ L de tampão de Permeabilização. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 200 μ L de tampão FACS (PBS 1X BSA 0,05%). Fez-se, então, a aquisição em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton & Dickinson) e os dados obtidos foram analisados no *software* FlowJo 8.7.6 (Tree Stars Inc.).

3.7.2 Estratégia de análise de linfócitos T reguladores (T reg)

Para análise da presença do fator de transcrição FOXP3 nos linfócitos co-cultivados com as Mo-DCs provenientes dos diferentes tratamentos procedemos da maneira descrita a seguir. Um *gate* inicial foi realizado no gráfico de tamanho (FCS) por granulosidade (SSC), delimitando a população de interesse na análise (Figura 5A). A partir desse *gate* delimitou-se a população CD4⁺ (Figura 5B), e dentro desta, a população CD4⁺/CD25⁺ (Figura 3C). Dentro da população CD4⁺/CD25⁺, delimitou-se o *gate* FOXP3⁺ (Figura 5D) a partir do tubo FMO (*Fluorescence Minus One*) (Figura 5E).

Para os experimentos com Mo-DCs de pacientes, adicionamos no painel a molécula CD127 e selecionamos a população CD127^{low} dentro da população CD25⁺. Dentro da população CD25⁺CD127^{low} selecionamos a população CD4⁺FOXP3⁺ (Figura 6).

Figura 5 - Estratégia de análise de linfócitos T reg. As células de interesse foram delimitadas pelo gate em FCS e SSC (A) e, dentro deste, as células CD4⁺ foram selecionadas (B). Dentro da população CD4⁺, as células CD4⁺/CD25⁺ foram delimitadas e dentro desta população o FOXP3 foi analisado, com base em seu FMO (D e E).

Figura 6 - Estratégia de análise de linfócitos T reg incluindo o marcador CD127. As células de interesse foram delimitadas pelo *gate* em FCS e SSC (A) e, dentro deste, as células CD4⁺ foram selecionadas (B). Dentro da população CD4⁺, as células CD127^{low} foram selecionadas e dentro desta população, as células CD25⁺FOXP3⁺ foram delimitadas (D e E).

3.7.3 Estratégia de análise de T-bet

Para análise da presença do fator de transcrição Tbet nos linfócitos co-cultivados com as Mo-DCs provenientes dos diferentes tratamentos procedemos da maneira descrita a seguir. Um *gate* inicial foi realizado no gráfico de tamanho (FCS) por granulosidade (SSC), delimitando a população de interesse na análise (Figura 7A). A partir desse *gate* delimitou-se a população CD25⁺ (Figura 7B), e dentro desta, delimitou-se a população CD4⁺Tbet⁺ (Figura 7D) a partir do tubo FMO (*Fluorescence Minus One*) (Figura 7E).

Figura 7 - Estratégia de análise de Tbet. As células de interesse foram delimitadas pelo *gate* em FCS e SSC (A) e, dentro deste, as células CD25⁺ foram selecionadas (B). Dentro da população CD25⁺, a população CD4⁺/Tbet⁺ foi delimitada (C), com base em seu FMO (D).

3.8 Extração de proteínas e Western blot

As proteínas das Mo-DCs foram extraídas de 10^5 - 10^6 células através de lise das células com o tampão RIPA (*Radio Immune Precipitation Assay buffer*: NaCl 150mM, NP-40 1%, desoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1%, Tris 50mM pH 8.0) acrescido de inibidores de proteases (PMSF e *Protease Inhibitor Cocktail* – Sigma Aldrich) e fosfatases (Fluoreto de Sódio e Ortovanadato de Sódio), além de EDTA (Sigma Aldrich) e EGTA (Sigma Aldrich). As células foram retiradas da placa, lavadas uma vez com PBS acrescido dos inibidores, EDTA e EGTA e ressuspensas no tampão RIPA. A seguir, foram incubadas no gelo por 5 min, sendo que a cada 1 min eram agitadas no vortex. Após os 5 min, os tubos foram centrifugados por 2 min, a 12000 rpm, a 4 °C e o sobrenadante foi guardado em freezer menos 80 °C. Alíquotas de cada amostra foram submetidas à quantificação de proteínas através do kit *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific).

As amostras foram fervidas em tampão de amostra 1 x, por 5 min, e 10 µg de proteínas foram aplicadas em um gel 10% SDS-PAGE. Após a corrida, o gel e a

membrana de nitrocelulose (*Transblot* 0,45 μm – BioRad) foram equilibrados em tampão de transferência por 15 min. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, via semi-úmida, por eletroforese (10 V/25 min) em tampão de transferência (Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,04%, metanol 20%).

Os sítios inespecíficos da membrana de nitrocelulose foram bloqueados com 5% m/v de BSA em TBST (Trizma HCl, NaCl, Tween 1%, pH 7,6) a 4 °C por 1 h, sob agitação. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBST e incubada com o anticorpo primário *overnight*, à 4 °C, sob agitação. Em seguida a membrana foi novamente lavada, 3 vezes de 15 min com TBST e incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, por 1 h à temperatura ambiente. Após três lavagens com TBST as membranas foram reveladas com o sistema quimioluminescente (*kit* West Pico – Thermo Scientific) e o sinal visualizado no transluminador D:Box (Syngene).

3.9 Padronização do Western Blot

A fim de avaliarmos a atividade das vias de sinalização p38 e ERK1/2 MAPK, partimos para a padronização da técnica de *Western Blot*. Para as padronizações utilizamos linhagens de monócitos, THP-1 e KG-1, devido à grande quantidade de proteínas necessária para os experimentos de padronização.

Para padronização dos anticorpos estimulamos as células com exposição à luz ultravioleta por 30 min a fim de estimular a fosforilação das vias da p38 e ERK1/2 MAPK.

Na figura 8 notamos que não houve alteração da p38 total com o tratamento com a UV, porém houve aumento da forma Pp38, como esperado (BODE; DONG, 2013). Dessa forma, nos asseguramos que o anticorpo para Pp38 não está marcando a forma não fosforilada da p38, de maneira inespecífica.

Figura 8 - Western Blot para p38 total e fosforilada. Células da linhagem KG-1 foram ou não expostas à luz ultravioleta por 30 min e, em seguida, lisadas para extração de proteínas. A membrana contendo o lisado proteico foi submetida à marcação para as formas total e fosforilada da p38. Houve aumento da fosforilação da p38 após o tratamento com a luz UV.

Já para ERK1/2 (Figura 9) observamos uma discreta alteração tanto da forma total quanto da fosforilada (pERK1/2) em decorrência do tratamento com a UV.

Figura 9 - Western Blot para ERK1/2 total e fosforilada. Células da linhagem KG-1 foram ou não expostas à luz ultravioleta por 30 min e, em seguida, lisadas para extração de proteínas. A membrana contendo o lisado proteico foi submetida à marcação para as formas total e fosforilada da ERK1/2.

Como a HSP27 é alvo de fosforilação da cascata da p38MAPK, seria esperado encontrar aumento de fosforilação no grupo exposto à luz UV, o que observamos na Figura 10.

Figura 10 - Western Blot para pHSP27 total e fosforilada. Células da linhagem THP-1 foram ou não expostas à luz ultravioleta por 30 min e, em seguida, lisadas para extração de proteínas. A membrana contendo o lisado proteico foi submetida à marcação para as formas total e fosforilada da pHSP27.

3.11 Ensaio de citotoxicidade

A potencial citotoxicidade dos inibidores SB203580 e U0126 foi avaliada pela inibição da redução do MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide] a cristais de formazan. As Mo-DCs foram retiradas da placa, contadas, ressuspensas em R-10 e colocadas em uma placa de 96 poços, com fundo chato, na presença de diferentes concentrações de DMSO e das drogas SB203580 e U0126. A placa foi levada para estufa de CO₂ à 37 °C, por aproximadamente 1 h. Após este período, foram adicionados 10 µL de MTT (5 mg/mL), por poço e a placa foi deixada por 3 h na estufa. Após este período, foram adicionados 100 µL /poço de SDS-HCl 0,01 N (10% SDS e 90% HCl 0,01 N), para solubilizar os cristais de formazan. A placa foi mantida sob temperatura ambiente e ao abrigo da luz *overnight*. Após este período, a densidade óptica (DO) foi determinada em espectrofotômetro, com filtro de comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de citotoxicidade, segundo a fórmula: $100 - [(DO \text{ da amostra} / DO \text{ controle}) \times 100]$. A DO controle é a média dos poços onde as células foram incubadas, apenas na presença de meio de cultura, ou seja, sem tratamento.

3.12 Detecção de citocinas

Os sobrenadantes das culturas, tanto de diferenciação das Mo-DCs, quanto das culturas de linfoproliferação alogênica, foram guardados em freezer -80 °C para posterior análise das citocinas.

A análise da presença das citocinas IL-6, IL-10, e TNF-alfa foi realizado para as culturas de Mo-DCs e das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN-gama e TNF-alfa para as culturas de linfoproliferação.

A avaliação da presença das citocinas foi realizada por *Cytometric Beads Array* (CBA – *BD Biosciences*), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, o sobrenadante das culturas foi incubado por 3 h, à temperatura ambiente, com *beads* recobertas com anticorpos específicos para cada uma das citocinas e um anticorpo de detecção marcado com um fluorocromo. Em seguida, foi adicionado 1 mL de tampão fornecido pelo fabricante à suspensão e os tubos foram centrifugados por 5 min, 1500 rpm, 18 °C. As *beads* foram ressuspensas em tampão de lavagem e adquiridas no citômetro de fluxo. As aquisições foram realizadas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II, com o *software* FACSDiva (*BD Biosciences*) e os dados obtidos foram analisados com a utilização do *software* FCAP Array v.1.0.1 (*BD Biosciences*).

3.13 ELISA

A HSP27 presente no sobrenadante das culturas de Mo-DCs e da MCF-7 foi detectada por ensaio imunoenzimático, com o kit *HSP27 (human) EIA kit* (*Enzo Life Sciences*), como descrito pelo fabricante. A densidade óptica da reação imunoenzimática foi determinada em espectrofotômetro na absorvância de 450 nm (VersaMax 3.13, *Molecular Devices*). O cálculo das concentrações foi feito com auxílio do *software* Excel através da equação de regressão linear com base na curva padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Geração *in vitro* de células dendríticas a partir de monócitos (Mo-DCs)

O primeiro passo para execução deste estudo foi a padronização da geração *in vitro* de células dendríticas a partir de monócitos. Para isso, PBMC foram separadas por centrifugação em gradiente de densidade com Ficoll e, posteriormente, os monócitos foram selecionados negativamente por esferas magnéticas, através de coluna imunomagnética.

A Figura 11 mostra o enriquecimento da população de células CD14⁺ após a seleção negativa, ou seja, notamos que entre as PBMC os monócitos representavam cerca de 15% e, após a separação, passaram a representar cerca de 83% da população.

Figura 11 - Histogramas representativos do enriquecimento de monócitos após seleção negativa. Após o processo de seleção negativa com as esferas magnéticas e a coluna imunomagnética, as células CD14⁺ passaram de aproximadamente 15% entre a população de PMBC, para cerca de 83% entre as células resultantes do procedimento. As células não marcadas estão representadas em cinza e as marcadas em vermelho.

Após a separação, 1×10^6 monócitos foram plaqueados e estimulados com GM-CSF e IL-4 para diferenciação em células dendríticas.

Observamos que as células CD14⁺ possuem morfologia característica de monócitos (Figura 12a) e que no quinto dia de cultura possuem morfologia e fenótipo característicos de Mo-DCs imaturas (Mo-iDCs), as quais se encontram aderidas à placa (Figura 12b). Notamos que após os cinco dias de cultura, as Mo-iDCs

perderam a expressão de CD14 e passaram a expressar mais CD11c e HLA-DR (MFI), o que indica o sucesso na diferenciação das Mo-DCs (Figuras 13 e 14). Com relação a função, notamos que as Mo-iDCs apresentam em sua superfície as moléculas típicas de co-estimulação linfocitária, CD80 e CD86 (Figuras 13 e 14) além de PD-L1 (Programmed cell Death Ligand - 1). Esta molécula faz parte da interação com os linfócitos e possui função supressora na ativação linfocitária (BROWN et al., 2003).

Após a ativação dessas células com LPS, observamos, ao sexto dia, células com morfologia e fenótipo característicos de DCs maduras (Mo-mDCs) (Figura 12c). A expressão das moléculas CD80 e CD86 aumenta em relação à Mo-iDC, assim como de PD-L1 (Figuras 13 e 14).

Figura 12 - Fotomicrografia de culturas para diferenciação de Mo-DCs. Em A: monócitos, B: DCs imaturas (Mo-iDCs) e C: DCs maduras (Mo-mDCs). Aumento de 200X.

Figura 13 - Fenotipagem de monócitos, Mo-iDCs e Mo-mDCs – Frequência de células positivas. Os monócitos foram colocados em cultura para diferenciação em Mo-DCs e, no quinto dia, estimuladas com LPS para maturação por 24h. Monócitos, Mo-iDCs e Mo-mDCs foram então marcadas para as moléculas CD14, CD11c, HLA-DR, CD80, CD86 e PD-L1 e submetidos à citometria de fluxo. Os gráficos representam a frequência de células positivas para cada marcador. n=3

Figura 14 - Fenotipagem de monócitos, Mo-iDCs e Mo-mDCs - MFI. Monócitos foram estimulados com GM-CSF e IL-4 para diferenciação em Mo-DCs. No quinto dia, as células foram estimuladas com LPS, por 24h, para maturação. Monócitos, Mo-iDCs e Mo-mDCs foram então marcadas para as moléculas CD14, CD11c, HLA-DR, CD80, CD86 e PD-L1 e submetidas à citometria de fluxo. Os gráficos representam a intensidade mediana de fluorescência (MFI) relativa para cada marcador. O MFI relativo representa o MFI total da população positiva para determinado marcador dividido pelo MFI do tubo sem marcação. n=3.

4.2 Caracterização fenotípica de Mo-DCs de pacientes e controles.

Monócitos de pacientes e controles foram submetidos à diferenciação em Mo-DCs e nos dias zero, 3, 5 (Mo-iDC) e 6 (Mo-mDC) da cultura as células foram retiradas da placa e marcadas com anticorpos monoclonais para fenotipagem. Não observamos diferenças no fenótipo das células entre pacientes e controles, porém podemos notar uma tendência de diminuição na expressão de CD86 pelas células de pacientes, tanto em frequência quanto em MFI (Figuras 15 e 16).

Figura 15 - Caracterização fenotípica de Mo-DCs de pacientes e controles. Frequência de células positivas para cada marcador durante a diferenciação de Mo-DCs. Monócitos de pacientes e controles foram submetidos a diferenciação em Mo-DCs e nos dias zero, 3, 5 (Mo-iDC) e 6 (Mo-mDC) da cultura foram retirados da placa para fenotipagem. Análise estatística: Teste T não pareado. n=6 pacientes e 4 controles.

Figura 16 - Caracterização fenotípica de Mo-DCs de pacientes e controles - MFI. Intensidade Mediana Relativa de Fluorescência (MRI) para cada marcador durante a diferenciação das Mo-DCs. Monócitos de pacientes e controles foram submetidos a diferenciação em Mo-DCs e nos dias zero, 3, 5 (Mo-iDC) e 6 (Mo-mDC) da cultura foram retirados da placa para fenotipagem. Análise estatística: Teste T não pareado. n=6 pacientes e 4 controles. MRI significa o MFI do tubo marcado dividido pelo MFI do tubo não marcado.

4.3 Perfil de ativação da p38 durante a cultura de diferenciação de monócitos em Mo-DCs provenientes de pacientes com carcinoma de mama

A fim de investigarmos o perfil de ativação da p38 em Mo-DCs derivadas de monócitos de pacientes com carcinoma de mama, avaliamos a fosforilação dessa proteína nos dias zero, 1, 3, 5 (Mo-iDC) e 6 (Mo-mDC) da cultura de diferenciação.

Como podemos notar na figura 17, há uma frequência significativamente maior de Mo-iDCs com a p38 fosforilada nos pacientes, em relação aos controles sadios. Já para a intensidade de fosforilação (MFI), encontramos um dado interessante. A p38 parece estar mais fosforilada durante toda a diferenciação nas células dos pacientes, apesar de que a significância estatística só ter sido observada no quinto dia da diferenciação, ou seja, nas Mo-iDCs (Figura 17).

Figura 17 - Cinética de ativação da p38 durante a diferenciação de Mo-DCs. Monócitos de pacientes e de controles saudáveis foram submetidos à diferenciação em DCs. Nos dias 0, 3, 5 (Mo-iDC) e 6 (Mo-mDC) da cultura as células foram retiradas da placa e caracterizadas quanto a presença de Pp38 em seu citosol por citometria de fluxo. Análise estatística: teste t não pareado entre controles e pacientes. * = $p \leq 0,05$. $n=5$ controles e 6 pacientes.

Dado que observamos que de fato há indícios de maior fosforilação da via p38 MAPK durante a diferenciação de Mo-DCs de pacientes com câncer de mama e os indícios na literatura de que a ativação dessa via é prejudicial ao processo de diferenciação de Mo-DCs (XIE et al., 2003), resolvemos investigar o papel da p38 MAPK em um modelo *in vitro*. Fizemos essa opção devido ao baixo número de células recuperado de pacientes. Além disso, um modelo *in vitro* possibilitaria avaliarmos uma outra via de sinalização, a via da ERK1/2 MAPK, reportada como essencial para a diferenciação das Mo-DCs (XIE et al., 2005).

Portanto, para melhor entendermos o papel dessas vias de sinalização decidimos interferir com sua sinalização, utilizando inibidores específicos da p38 e da ERK1/2 MAPK durante a diferenciação de Mo-DCs, expostas ou não ao sobrenadante de uma linhagem de células tumorais de mama, a MCF-7.

4.4 Cinética da presença e fosforilação de p38 e ERK1/2 durante a diferenciação de monócitos em DCs

A fim de confirmarmos a participação das vias p38 e ERK1/2 MAPK durante a diferenciação de Mo-DCs, realizamos um experimento de cinética para avaliar tanto a presença quanto a fosforilação dessas proteínas em situação de homeostase.

Para tanto, monócitos foram selecionados negativamente com *beads* magnéticas e estimulados com GM-CSF e IL-4 para a diferenciação em Mo-DCs. Nos tempos zero, 5, 15, 30 e 60 min após o estímulo, e nos dias 1, 3 e 5 (Mo-iDC)

Figura 18 - Cinética de expressão e fosforilação da p38 e ERK1/2 durante a diferenciação de monócitos em DCs. Monócitos foram selecionados negativamente com *beads* magnéticas e estimulados com GM-CSF e IL-4 para diferenciação em DCs. Nos tempos zero, 5', 15', 30' e 60' e nos dias 1, 3 e 5 da diferenciação as células foram lisadas para extração das proteínas. Em seguida, o western blot foi realizado com 10 µg de proteínas por membrana.

4.5 Estabelecimento do modelo *in vitro* para o estudo das vias p38 MAPK e ERK1/2 MAPK em Mo-DCs na presença de sobrenadante tumoral

A fim de melhor entendermos o papel dessas vias de sinalização intracelulares durante a diferenciação de Mo-DCs na presença de sobrenadante tumoral desenvolvemos um modelo *in vitro*. Para tanto, monócitos de doadores saudáveis foram expostos ao sobrenadante de uma linhagem de células de adenocarcinoma de mama, MCF-7.

4.5.1 Curva de crescimento da MCF-7 e coleta do sobrenadante tumoral (ST)

O primeiro passo foi caracterizar o ritmo de crescimento das células tumorais. As células da linhagem tumoral de mama, MCF-7, foram plaqueadas e de dois em dois dias retiradas da placa para contagem; o sobrenadante dos dias 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 foi coletado. O meio não foi trocado para que os fatores ficassem concentrados. O gráfico da figura 19 representa os dados obtidos. Podemos notar que as células se multiplicaram até o dia 8 e depois começaram a morrer.

Figura 19 - Curva de crescimento da MCF-7. Células da linhagem tumoral de mama MCF-7 foram plaqueadas e a cada 2 dias retiradas da garrafa para contagem. O sobrenadante foi congelado para posterior uso nos experimentos.

4.5.2 Caracterização fenotípica de Mo-DCs diferenciadas na presença dos diferentes sobrenadantes tumorais da MCF-7

A fim de determinarmos o sobrenadante de qual dia de crescimento da MCF-7 utilizaríamos nos experimentos subsequentes, analisamos o fenótipo das Mo-iDCs diferenciadas na presença de cada um deles. Assim, monócitos de doadores saudáveis foram plaqueados e estimulados para diferenciação em Mo-DCs na presença de 20% do sobrenadante tumoral da linhagem MCF-7, coletado nos dias 2, 4, 6, 8, 10 e 12 de cultura dessas células.

Em geral, notamos que as células expostas ao sobrenadante tumoral apresentam uma tendência de diminuição da expressão de CD1a e de aumento de CD14, tanto em porcentagem de células positivas quanto em MFI (Figuras 20 e 21). Notamos também uma tendência de maior frequência de células expressando PD-L1 e CD80. É interessante notar que essas alterações já ocorrem com o sobrenadante de 2 dias da MCF-7. Já outras alterações, nós só observamos com os sobrenadantes dos dias 10 e 12 da MCF-7, como aumento na porcentagem de células expressando CD83 e CD86 (MFI também) e diminuição para HLA-DR e CD40 (Figuras 20 e 21).

Figura 20 - Fenótipo de Mo-DCs tratadas com os diferentes sobrenadantes tumorais da MCF-7. Monócitos foram purificados e estimulados para diferenciação em Mo-DCs na presença de 20% dos sobrenadantes coletados nos dias 2, 4, 6, 8, 10 e 12 da cultura da MCF-7. Os gráficos em barras representam a porcentagem de células positivas para cada marcador. Teste Estatístico: *one-way* ANOVA com pós teste de Dunnett. $n=3$

Figura 21 - Fenótipo de Mo-DCs tratadas com os diferentes sobrenadantes tumorais da MCF-7. Monócitos foram purificados e estimulados para diferenciação em Mo-DCs na presença de 20% dos sobrenadantes coletados nos dias 2, 4, 6, 8, 10 e 12 da cultura da MCF-7. Os gráficos em barras representam o MFI das células positivas para cada marcador. MRI representa a Mediana Relativa de Fluorescência, proveniente da divisão do MFI das células marcadas pelo MFI das células não marcadas. Teste estatístico: one-way ANOVA com pós teste de Dunnett. n=3

Decidimos utilizar o sobrenadante de 8 dias da MCF-7 pois contém os fatores liberados pelas células tumorais durante toda a fase de crescimento exponencial. A partir do dia 10 as células já começaram a morrer e isso poderia interferir com os resultados. A partir de agora todos os resultados que serão mostrados são de experimentos que utilizamos o sobrenadante de 8 dias da MCF-7.

4.5.3 Tratamento com o inibidor da via p38MAPK, SB203580

A fim de avaliarmos o papel da via da p38MAPK durante a diferenciação de Mo-DCs em condições homeostáticas e na presença do sobrenadante tumoral, usamos o inibidor farmacológico específico da p38 MAPK SB203580 (Cell Signaling Technology®). Este inibidor age bloqueando o sítio catalítico da p38 MAPK (CUENDA et al., 1995; KUMAR et al., 1999), ou seja, a p38 é fosforilada porém não age fosforilando a próxima proteína da cascata, a MAPKAPK-2 (MKK2), que, por sua vez, fosforila a HSP27 (Figura 2).

No intuito de determinarmos a potencial citotoxicidade do inibidor, realizamos um teste de MTT em Mo-DCs diferenciadas na presença de diferentes concentrações de SB203580 e da quantidade equivalente de DMSO (Dimetilsulfóxido) que cada concentração contém. Monócitos foram tratados com 1 μ M, 5 μ M ou 10 μ M do inibidor por 1 h, antes do estímulo com GM-CSF e IL-4. No quinto dia as Mo-DCs foram submetidas ao ensaio de MTT. Observamos que não houve diminuição do metabolismo das Mo-DCs tratadas com nenhuma das doses do inibidor, bem como de DMSO (Figura 22). Ao invés disso, observamos um ligeiro aumento da atividade metabólica das Mo-DCs tratadas com SB203580, uma vez que houve aumento da formação do cristal de formazan pelas células tratadas com o inibidor, de maneira dose dependente (Figura 22). De acordo com esses dados consideramos que o uso do SB203580 não foi citotóxico em nenhuma das concentrações testadas.

Figura 22 - Avaliação da potencial toxicidade do inibidor SB203580. Monócitos foram tratados com 1, 5 ou 10 μ M de SB203580 por 1 h e então estimulados com GM-CSF e IL-4. No quinto dia as Mo-DCs foram retiradas da placa e incubadas com o MTT por 3 h. Ao final das 3 h, as células foram lisadas e a densidade óptica (DO) foi determinada em espectrofotômetro, a 540 nm. Os resultados foram determinados em porcentagem de citotoxicidade, segundo a fórmula: $[(DO \text{ amostra} \times 100) / DO \text{ controle}]$. Controle representa Mo-iDCs sem tratamento, LPS MO-iDCs pré-ativadas por 1 h com LPS para controle positivo de metabolismo ativo, e DMSO 1/1 Mo-iDCs tratadas por 1 h com DMSO na concentração 1/1 para controle positivo de citotoxicidade. $n=3$. Teste estatístico: *one-way* ANOVA com pós teste de Dunnett.

Como o MTT é um teste indireto de citotoxicidade, pois, na realidade avalia o metabolismo celular, usamos a marcação com o corante LIVE/DEAD[®] (Invitrogen), o qual só é permeável a células não viáveis, para verificar a citotoxicidade das células tratadas com o inibidor. Como podemos observar na figura 23 o tratamento com o SB203580 não induziu a morte das células.

Dessa forma, após o ensaio de MTT e o ensaio de viabilidade com o reagente LIVE/DEAD[®] (Invitrogen), concluímos que nenhuma das três doses do inibidor SB203580 (1 μ M, 5 μ M e 10 μ M) foram citotóxicas para as Mo-DCs.

Figura 23 - Viabilidade das Mo-DCs tratadas com SB203580. Monócitos de doadores saudáveis foram purificados, tratados com 1 μ M, 5 μ M ou 10 μ M do inibidor da via da p38 MAPK, SB203580, e estimulados com GM-CSF e IL-4. No quinto dia, as Mo-DCs foram marcadas com o corante de viabilidade LIVE/DEAD® (Invitrogen). n=6. Teste estatístico: *one-way* ANOVA com pós teste de Dunnett.

As três doses do inibidor, 1, 5 e 10 μ M foram testadas quanto a inibição da via p38 MAPK através do estímulo com LPS, um sabido ativador da via. Para este ensaio foram utilizadas células da linhagem THP-1. Para tanto, células THP-1 foram ou não tratadas com 1 μ M, 5 μ M ou 10 μ M de SB203580 por 1 h e então estimuladas com 100 ng/mL de LPS. Após 30 min as células foram lisadas e a inibição da via da p38 MAPK foi avaliada através da fosforilação da proteína MAPKAPK2 (MKK2), a qual é fosforilada pela p38. Como podemos notar na figura 24, as três doses do inibidor foram eficazes em bloquear a fosforilação de MAPKAPK2, a proteína alvo na cascata de sinalização da p38.

Figura 24 - Teste de eficácia do inibidor da p38 MAPK, SB203580. Células da linhagem THP-1 foram tratadas por 1 h com 1, 5 ou 10 μ M de SB203580 e então estimuladas com LPS. Após 30 min as células foram lisadas e as proteínas extraídas. As proteínas foram submetidas ao ensaio de Western Blot e as membranas coradas com anticorpos específicos para a fosfo-MAPKAPK2 (pMAPKAPK2) e fosfo-p38 (Pp38). As membranas foram então submetidas ao processo de *stripping* e coradas novamente com anticorpos para a β -actina. S.E.: sem estímulo (LPS), S.I.: sem inibidor.

Além disso, testamos as três doses do inibidor durante a diferenciação de Mo-DCs a fim de avaliarmos seu efeito no fenótipo dessas células. Monócitos foram tratados com 1 μ M, 5 μ M ou 10 μ M de SB203580 e após 1 h estimulados com GM-CSF e IL-4. No quinto dia, as Mo-DCs foram fenotipadas. De acordo com as figuras 25 e 26, observamos que a dose de 1 μ M levou a uma tendência de diminuição na frequência de células positivas para CD1a, PDL-1, CD83 e CD86 e a de 10 μ M levou a uma tendência de diminuição na frequência de CD1a e PDL-1. A dose de 5 μ M parece não ter alterado a frequência de células positivas para os marcadores testados. Com relação ao MFI, observamos diminuição de CD86 com 1 μ M e de CD1a com 10 μ M (Figura 26). É interessante notar que a dose de 5 μ M parece não ter alterado fenotipicamente as Mo-DCs, enquanto as doses de 1 μ M e 10 μ M levaram a algumas alterações.

Analizando todos esses resultados resolvemos utilizar a maior dose testada, de 10 μM . Essa dose é frequentemente utilizada na literatura e não alterou a viabilidade das células (ARRIGHI et al., 2001; XIE et al., 2003).

Figura 25 - Fenótipo de Mo-DCs provenientes de monócitos tratados com SB203580. Monócitos foram tratados com 1, 5 ou 10 μM de SB203580 por 1 h e estimulados com GM-CSF e IL-4. No quinto dia, as Mo-DCs foram fenotipadas. Os gráficos em barras representam porcentagem de células positivas para cada marcador. n=2.

Figura 26 - Fenótipo de Mo-DCs provenientes de monócitos tratados com SB203580.

Monócitos foram tratados com 1, 5 ou 10 μM de SB203580 por 1 h e estimulados com GM-CSF e IL-4. No quinto dia, as Mo-DCs foram fenotipadas. Os gráficos em barras representam o MFI das células positivas para cada marcador. MRI representa a Mediana Relativa de Fluorescência, proveniente da divisão do MFI das células marcadas pelo MFI das células não marcadas. n=2.

4.5.4 Tratamento com o inibidor da via ERK1/2 MAPK, U0126

Realizamos também a caracterização da diferenciação de Mo-DCs provenientes de monócitos tratados com o inibidor da via ERK1/2, o U0126. Este inibidor age bloqueando as proteínas MKK 1 e MKK 2, as quais estão acima da ERK 1 e ERK 2 na cascata da ERK1/2 MAPK, o que significa que bloqueando MKK 1 e 2, impedimos a fosforilação de ERK 1 e 2 (Figura 1) (FAVATA et al., 1998).

O tratamento com o inibidor U0126 foi realizado em três doses, 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M, nos monócitos, por 1 h. Após esse período as citocinas GM-CSF e IL-4 foram adicionadas. No quinto dia de cultura avaliamos a citotoxicidade do tratamento com o inibidor através de ensaio de MTT e marcação com o corante de viabilidade LIVE/DEAD® (Invitrogen) e o fenótipo das Mo-DCs.

O ensaio de MTT indicou que o tratamento com U0126 levou a diminuição da atividade metabólica nas doses de 5 μ M e 10 μ M (Figura 27). Por outro lado, o ensaio de viabilidade, através da marcação das células com o corante LIVE/DEAD® (Invitrogen), não indicou aumento de células mortas (Figura 28). Como o MTT avalia o metabolismo das células, o inibidor da via da ERK1/2 pode ter prejudicado o processo de diferenciação das Mo-DCs e levado a diminuição da atividade metabólica dessas células, porém não levou à morte celular.

Figura 27 - Avaliação da potencial toxicidade do inibidor U0126. Monócitos foram tratados com 1, 5 ou 10 μ M de U026 por 1 h e então estimulados com GM-CSF e IL-4. No quinto dia as Mo-DCs foram retiradas da placa e incubadas com o MTT por 3 h. Ao final das 3 h, as células foram lisadas e a densidade óptica (DO) foi determinada em espectrofotômetro, a 540 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de citotoxicidade, segundo a fórmula: $[(DO \text{ amostra} \times 100) / DO \text{ controle}]$. Controle representa Mo-iDCs sem tratamento, LPS MO-iDCs pré-ativadas por 1 h com LPS para controle positivo de metabolismo ativo, e DMSO 1/1 Mo-iDCs tratadas por 1 h com DMSO na concentração 1/1, para controle positivo de citotoxicidade. $n=3$. Teste estatístico: *one-way* ANOVA com pós teste de Dunnett.

Figura 28 - Viabilidade das Mo-DCs tratadas com U0126. Monócitos de doadores saudáveis foram purificados, tratados com 1 μ M, 5 μ M ou 10 μ M do inibidor da via da ERK1/2 MAPK, U0126, e estimulados com GM-CSF e IL-4. No quinto dia, as Mo-iDCs foram marcadas com o corante de viabilidade LIVE/DEAD® (Invitrogen). n=6. Teste estatístico: *one-way* ANOVA com pós teste de Dunnett.

As três concentrações do inibidor também foram testadas quanto à efetividade de bloqueio da fosforilação das proteínas ERK 1/2. Para isso, células da linhagem THP-1 foram plaqueadas em meio de cultura livre de soro, tratadas com 1, 5 ou 10 μ M de U0126 por 1 h e então estimuladas com SFB por 30 min. As três doses levaram a inibição da fosforilação da ERK1/2 (Figura 29), porém somente as doses de 5 μ M e 10 μ M inibiram por completo a fosforilação.

Figura 29 - Teste de eficácia do inibidor da ERK 1/2 MAPK, U0126. Células da linhagem THP-1 foram plaqueadas em meio de cultura AIM-V sem SFB e tratadas por 1 h com 1, 5 ou 10 μ M de U0126. Após esse período, as células foram estimuladas com 20% de SFB. Após 30 min as células foram lisadas e as proteínas extraídas. As proteínas foram submetidas ao ensaio de Western Blot e as membranas coradas com anticorpos específicos para a fosfo-ERK 1/2 (pERK 1/2) e ERK 1/2 totais. S.E.: sem estímulo (SFB), S.I.: sem inibidor.

Quanto ao fenótipo de membrana, observamos que houve uma tendência de diminuição na porcentagem de células expressando CD86 e PD-L1 em todas as doses, e para CD11c, CD80, CD40 e CD83 parece haver uma tendência de diminuição na frequência de células de maneira dose dependente (Figura 30). Para o MFI, notamos tendência de diminuição para HLA-DR, CD11c, CD1a e CD86 (Figura 31). Para de CD80 e CD40 parece haver também uma tendência de queda na expressão, de maneira dose dependente (Figura 31).

Figura 30 - Fenótipo de Mo-DCs diferenciadas na presença do inibidor da via ERK1/2.

Monócitos foram tratados por 1 h com 1, 5 ou 10 µM de UO126, inibidor da via ERK1/2 MAPK e então estimulados para diferenciação em Mo-DCs. No quinto dia, as Mo-iDCs foram fenotipadas. Os gráficos em barras representam a porcentagem de células positivas para cada marcador. n=2

Figura 31 - Fenótipo de Mo-DCs diferenciadas na presença do inibidor da via ERK 1/2.

Monócitos foram tratados por 1 h com 1, 5 ou 10 μ M de UO126, inibidor da via ERK 1/2 MAPK e então estimulados para diferenciação em Mo-DCs. No quinto dia, as Mo-iDCs foram fenotipadas. Os gráficos em barras representam o MFI da população positiva para cada marcador. MRI representa a Mediana Relativa de Fluorescência, proveniente da divisão do MFI das células marcadas pelo MFI das células não marcadas. n=2

Analisando todos esses resultados em conjunto decidimos utilizar a dose de 5 μ M nos futuros experimentos, pois essa dose foi a mais baixa em que houve inibição total da fosforilação da via da ERK1/2. Além disso, não foi citotóxica.

4.5.5 Efeitos do sobrenadante tumoral e o papel da via p38 MAPK

Uma vez que estabelecemos as condições do modelo *in vitro*, a saber - sobrenadante tumoral da MCF-7 cultivada por 8 dias e 10 μ M do inibidor da p38MAPK, SB203580 - partimos para os experimentos a fim de avaliar quais os possíveis efeitos dos fatores secretados pelas células da linhagem tumoral MCF-7 e, ainda, se a via da p38 MAPK possui algum papel em tais alterações.

Para tanto, monócitos foram purificados de câmaras de leucorredução e plaqueados. Após 1 h de aderência, foram tratados por mais 1 h com 10 μ M de SB203580, e, em seguida, o sobrenadante tumoral (ST) foi adicionado na proporção de 20%. Após 1 h, as células foram tratadas com GM-CSF e IL-4 para a diferenciação em Mo-DCs (Figura 32).

Figura 32 - Delineamento experimental. Monócitos foram purificados e plaqueados. Após 1 h o inibidor da via p38MAPK foi adicionado na concentração de 10 μ M e depois de 1 h 20% de ST ou R-10, como controle, foram adicionados. Após 1 h, GM-CSF e IL-4 foram adicionados para a diferenciação em Mo-DCs. No quinto dia, as células foram analisadas.

Quanto à morfologia, observamos que as células tratadas com o ST (Figura 33 C) apresentam tanto forma arredondada, como o controle (Figura 33 A) - típico de Mo-DCs imaturas diferenciadas em meio suplementado com soro fetal bovino - e células alongadas. Já a células tratadas com o inibidor da p38MAPK, SB203580 (p38i) (Figura 33 B) são arredondadas como o controle, porém menores e parecem estar menos aderidas. E, por fim, as células tratadas com o p38i e, posteriormente, com o ST (Figura 33 D), apresentam forma arredondada e pequena e formam alguns grumos, o que é típico de Mo-DCs ativadas, contudo, esse grupo não apresenta células alongadas.

Figura 33 - Morfologia das Mo-DCs. As fotomicrografias acima mostram a morfologia das Mo-DCs geradas a partir do tratamento com o p38i (B), com o ST (C) e ambos em D (ST+p38i). Em A temos as Mo-DCs controle. Aumento de 10 x.

A fim de investigarmos o efeito do sobrenadante tumoral nas vias de sinalização realizamos ensaios de *Western blot*. Como o p38i, SB203580, age bloqueando o sítio que atua na fosforilação de outras proteínas pela p38 analisamos também a fosforilação da HSP27, que está *downstream* na via da p38 MAPK.

Com relação a ativação das vias de sinalização, observamos uma tendência de maior relação proteína fosforilada/proteína total tanto para a p38 e HSP27, quanto para a ERK1/2 em comparação ao controle, ou seja, a exposição ao ST levou a Mo-DCs com as vias p38 e ERK1/2 MAPK mais ativadas (Figura 34).

Por outro lado, a inibição da via p38 MAPK no início da cultura parece ter levado à diminuição da fosforilação tanto de p38 quanto de HSP27, mas mais expressivamente para a HSP27. Observamos também que o tratamento com o p38i não alterou a relação pERK/ERK (p38i), assim como não diminuiu o aumento da sua fosforilação provocado pelo ST (p38i+ST) (Figura 34).

Figura 34 - Ativação da via p38 MAPK nas Mo-DCs. Monócitos foram tratados com 10 μ M de SB203580 e após 1 h com 20% de ST. As células foram então estimuladas para diferenciação em Mo-DCs. No quinto dia as proteínas foram extraídas e submetidas a ensaio de *Western Blot*. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de dois experimentos independentes.

Com relação ao fenótipo, notamos que houve diminuição estatisticamente significativa da frequência de células positivas para CD1a quando as células foram tratadas com o ST, a qual foi revertida com o tratamento com o p38i (Figura 35). Além disso, observamos também que para o CD14 há um aumento tanto na porcentagem de células positivas quanto no MFI, quando as células foram expostas ao ST e, mais uma vez, esse aumento foi revertido pelo tratamento prévio com o p38i (ST+p38i) (Figuras 35 e 36).

Para os demais marcadores observamos algumas alterações, como diminuição da frequência de células positivas para CD83 e CD86 quando as células são tratadas com o p38i, independente de terem sido expostas ao ST (Figura 35). Contudo, nenhuma dessas alterações foi significativa estatisticamente.

Figura 35 - Efeitos do ST e do inibidor da p38 MAPK no fenótipo de Mo-DCs. Monócitos foram tratados com SB203580 (p38i) por 1 h e então o ST foi adicionado. Após 1 h as células foram estimuladas com GM-CSF e IL-4. No quinto dia, as Mo-DCs foram fenotipadas. Os gráficos em barra representam a frequência de células positivas para cada molécula. Teste estatístico: *one-way* ANOVA com pós teste de Dunnett. n=4. *= $p<0,05$; **= $p<0,01$.

Figura 36 - Efeitos do ST e do inibidor da p38 MAPK no fenótipo de Mo-DCs. Monócitos foram tratados com SB203580 (p38i) por 1 h e então o ST foi adicionado. Após 1 h as células foram estimuladas com GM-CSF e IL-4. No quinto dia, as Mo-DCs foram fenotipadas. Os gráficos em barra representam o MFI das células positivas para cada molécula. MRI representa a Mediana Relativa de Fluorescência, proveniente da divisão do MFI das células marcadas pelo MFI das células não marcadas. Teste estatístico: *one-way* ANOVA com pós teste de Dunnett. n=4.

Além do fenótipo, também verificamos a presença de citocinas capazes de alterar a diferenciação de Mo-DCs (AVILA-MORENO et al., 2006; DULUC et al., 2007). Analisamos as citocinas IL-6, IL-10 e TNF-alfa com 24 h (24 h) de cultura e ao final da diferenciação das Mo-DCs, no quinto dia.

Observamos que logo com 24 h as células tratadas com o ST produziram IL-6, IL-10 e TNF-alfa, ao passo que as células não tratadas (controle e p38i) não produzem essas citocinas, ou produzem em níveis muito mais baixos, durante as primeiras 24 h da diferenciação (Figura 37). As células que foram previamente

tratadas com o p38i e expostas ao ST (ST+p38i) produziram menos IL-6 e IL-10 do que as tratadas apenas com o ST, e para o TNF-alfa a produção foi semelhante a do controle (Figura 37). No quinto dia, o sobrenadante das Mo-DCs apresentou o mesmo perfil (Figura 38) do que com 24 h, porém com menor quantidade das citocinas. É importante ressaltar que o ST também foi quantificado e continha 4,16 pg/mL de IL-6, ou seja, quantidade muito menor do que a encontrada nas culturas. Interleucina 10 e TNF-alfa não foram detectadas no sobrenadante tumoral.

Figura 37 - Produção de citocinas durante as primeiras 24 h de diferenciação das Mo-DCs. Monócitos foram tratados por 1 h com 10 μ M de SB203580 (p38i) e então o ST foi adicionado. Após 1 h as células foram estimuladas para diferenciação em Mo-DCs. Vinte e quatro h depois o sobrenadante foi coletado e as citocinas quantificadas por Cytometric Bead Array (BD Biosciences). N.D.= não detectado. A linha tracejada representa o ponto máximo da curva padrão. n=2.

Figura 38 - Produção de citocinas durante a diferenciação de Mo-DCs. Monócitos foram tratados por 1 h com 10 μ M de SB203580 (p38i) e então o ST foi adicionado. Após 1 h as células foram estimuladas para diferenciação em Mo-DCs. No quinto dia o sobrenadante foi coletado e as citocinas quantificadas por Cytometric Bead Array (BD Biosciences). N.D.= não detectado. A linha tracejada representa o ponto máximo da curva padrão. n=3. Teste estatístico: *one-way* Anova com pós teste de Dunnett. *= $p<0,05$; **= $p<0,01$; ***= $p<0,001$.

4.5.6 Efeitos do sobrenadante tumoral e o papel da via ERK 1/2 MAPK

Avaliamos também as alterações que o sobrenadante da linhagem de células tumorais de mama MCF-7 poderiam ter sobre a diferenciação de Mo-DCs e o possível papel da via ERK 1/2 MAPK. Para tanto, utilizamos o mesmo modelo experimental do que para a via p38MAPK, detalhado no esquema da figura 32, porém, adicionamos 5 μ M de U0126 (ERKi), ao invés do p38i.

Com relação à morfologia, observamos mais uma vez que as Mo-DCs controle são arredondadas e bem aderidas (Figura 39 A). O tratamento com o ERKi

levou a células pequenas, arredondadas e pouco aderidas (Figura 39 B). Mais uma vez, notamos que as células tratadas com o ST apresentam forma tanto arredondado quanto alongado (Figura 39 C), conforme observado na figura 40 C. O tratamento dos monócitos com o ERKi antes da adição do ST parece não ter alterado a morfologia das células, pois a cultura é semelhante ao grupo tratado somente com o ST (Figura 39 D), porém, notamos que esse grupo parece apresentar menos células.

Figura 39 - Morfologia das Mo-DCs. As fotomicrografias acima mostram a morfologia das Mo-DCs geradas a partir do tratamento com o ERKi (B), com o ST (C) e ambos em D (ST+ERKi). Em A temos as Mo-DCs controle. Aumento de 10 x.

Com relação à ativação da via ERK1/2 pelo ST, observamos que a exposição aos fatores do sobrenadante tumoral parece ter levado ao aumento da ativação da via e que a utilização do ERKi, no dia zero, levou a uma aparente diminuição no grupo tratado com o ST (ERKi+ST), quando comparado ao grupo tratado somente com o ST (Figura 40). Notamos que o tratamento com o ERKi também induz uma discreta diminuição na relação Pp38/p38 e pHSP27/HSP27 (ST+ERKi) nas células que foram expostas ao ST quando comparadas às células não previamente tratadas com o inibidor e expostas ao ST.

Figura 40 - Ativação da via ERK 1/2 MAPK nas Mo-DCs. Monócitos foram tratados com 5 μ M de U0126 e após 1 h com 20% de ST. As células foram então estimuladas para diferenciação em Mo-DCs. No quinto dia as proteínas foram extraídas e submetidas a ensaio de *Western Blot*. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de dois experimentos independentes.

Quanto ao fenótipo, observamos mais uma vez que o ST induziu uma diminuição significativa na queda do CD14 nas Mo-DCs, e o uso prévio do ERKi corrigiu essa diminuição (Figura 41). Por outro lado, a queda na frequência de células expressando CD1a provocada pelo ST foi apenas parcialmente corrigida pelo tratamento prévio com o ERKi (ST+ERKi).

Além disso, há uma tendência de aumento do MFI de CD80 nas Mo-DCs tratadas com o ST (ST), que aparentemente é corrigida pelo tratamento com o ERKi (ST+ERKi) (Figura 42), porém não houve significância estatística desse achado.

Figura 41 - Efeitos do ST e do inibidor da ERK 1/2 MAPK no fenótipo de Mo-DCs.

Monócitos foram tratados com U0126 (ERKi) por 1 h e então o ST foi adicionado. Após 1 h as células foram estimuladas com GM-CSF e IL-4. No quinto dia, as Mo-DCs foram fenotipadas. Os gráficos em barra representam a frequência de células positivas para cada molécula. Teste estatístico: *one-way* ANOVA com pós teste de Dunnett. n=4. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001.

Figura 42 - Efeitos do ST e do inibidor da ERK1/2MAPK no fenótipo de Mo-DCs. Monócitos foram tratados com U0126 (ERKi) por 1 h e então o ST foi adicionado. Após 1 h as células foram estimuladas com GM-CSF e IL-4. No quinto dia, as Mo-DCs foram fenotipadas. Os gráficos em barra representam o MFI das células positivas para cada molécula. MRI representa a Mediana Relativa de Fluorescência, proveniente da divisão do MFI das células marcadas pelo MFI das células não marcadas. Teste estatístico: *one-way* ANOVA com pós teste de Dunnett. $n=4$.

Quanto ao perfil de citocinas produzido durante a cultura de diferenciação, observamos que no início da diferenciação, com 24 h de cultura, o tratamento com o ERKi levou à redução de IL-6 e TNF-alfa no grupo exposto ao ST (ST+ERKi), porém para IL-10 não houve diminuição (Figura 43).

Ao final da diferenciação, no quinto dia, o sobrenadante das Mo-iDCs apresentou o mesmo perfil de citocinas, porém em menores quantidades (Figura 44).

Notamos que no quinto dia a IL-10 estava significativa mais baixa no grupo pré-tratado com ERKi (ST+ERKi) em relação ao tratado com o ST (Figura 44).

Figura 43 - Produção de citocinas durante as primeiras 24 h de diferenciação das Mo-DCs. Monócitos foram tratados por 1 h com 5 μ M de U0126 (ERKi) e então o ST foi adicionado. Após 1 h as células foram estimuladas para diferenciação em Mo-DCs. Vinte e quatro h depois o sobrenadante foi coletado e as citocinas quantificadas por Cytometric Bead Array (BD Biosciences). N.D.= não detectado. A linha tracejada representa o ponto máximo da curva padrão. n=2.

Figura 44 - Produção de citocinas durante a diferenciação de Mo-DCs. Monócitos foram tratados por 1 h com 5 μ M de U0126 (ERKi) e então o ST foi adicionado. Após 1 h as células foram estimuladas para diferenciação em Mo-DCs. No quinto dia o sobrenadante foi coletado e as citocinas quantificadas por Cytometric Bead Array (BD Biosciences). N.D.= não detectado. A linha tracejada representa o ponto máximo da curva padrão. n=3. Teste estatístico: *one-way* Anova com pós teste de Dunnett. *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001.

4.5.7 Efeitos do sobrenadante tumoral e da inibição das vias p38 e ERK 1/2 MAPK

Uma vez que observamos redução parcial na produção das citocinas durante a diferenciação tanto pela inibição da via p38 MAPK quanto pela ERK 1/2 MAPK, decidimos avaliar se a inibição de ambas as vias seria capaz de abolir a produção das citocinas e reverter as alterações fenotípicas na Mo-DCs provocadas pelo ST. Realizamos então experimentos em que tanto a via p38 MAPK quanto a ERK1/2 MAPK foram inibidas. Para isso, monócitos foram purificados, plaqueados e, após 1 h de aderência, 10 μ M de SB203580 (p38i) e 5 μ M de U0126 (ERKi) foram

adicionados. Após 1 h, 20% de ST ou de R-10, como controle, foram adicionados e, 1 h depois as células foram estimuladas para diferenciação em Mo-DCs.

Quando tratamos as células com ambos os inibidores, p38i e ERKi, observamos um padrão de ativação de p38 e ERK 1/2 semelhante à inibição da via p38 MAPK somente (Figura 45). Ou seja, uso de p38i e ERKi levou à diminuição na relação Pp38/p38 nas células tratadas com o ST (ST+p38i+ERKi), em comparação ao grupo ST, enquanto a ativação da via ERK1/2 MAPK provocada pelos fatores tumorais parece não ter sido alterada e, por ultimo, observamos diminuição da fosforilação da HSP27 nas células tratadas com o ST (ST+p38i+ERKi) a níveis semelhantes ao controle (Figura 45).

Figura 45 - Ativação das vias p38 e ERK1/2MAPK nas Mo-DCs. Monócitos foram tratados com 10 μ M de SB203580 e 5 μ M de U0126 e após 1 h com 20% de ST. As células foram então estimuladas para diferenciação em Mo-DCs. No quinto dia as proteínas foram extraídas e submetidas a ensaio de *Western Blot*. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de dois experimentos independentes.

O uso dos dois inibidores aboliu a produção das citocinas provocada pela exposição ao ST, tanto com 24 h de cultura como ao final da diferenciação (Figuras 46 e 47).

Figura 46 - Produção de citocinas durante as primeiras 24 h de diferenciação das Mo-DCs. Monócitos foram tratados por 1 h com 10 μ M de SB203580 (p38i) e 5 μ M de U0126 (ERKi) e então o ST foi adicionado. Após 1 h as células foram estimuladas para diferenciação em Mo-DCs. 24 h depois o sobrenadante foi coletado e as citocinas quantificadas por Cytometric Bead Array (BD Biosciences). N.D.= não detectado. A linha tracejada representa o ponto máximo da curva padrão. n=2

Figura 47 - Produção de citocinas durante a diferenciação de Mo-DCs. Monócitos foram tratados por 1 h com 10 μ M de SB203580 (p38i) e 5 μ M de U0126 (ERKi) e então o ST foi adicionado. Após 1 h as células foram estimuladas para diferenciação em Mo-DCs. No quinto dia o sobrenadante foi coletado e as citocinas quantificadas por Cytometric Bead Array (BD Biosciences). N.D.= não detectado. A linha tracejada representa o ponto máximo da curva padrão. n=3. Teste estatístico: *one-way* Anova com pós teste de Dunnett. *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001.

Contudo, a morfologia das células em que ambas as vias de sinalização foram inibidas é de células redondas e pequenas, semelhantes a monócitos e não a Mo-DCs (Figura 48 B). Além disso, no grupo de células que recebeu o ST após os dois inibidores (p38i+ERKi) encontramos células arredondadas, não aderidas e alguns grumos (Figura 48 D), mas não encontramos células alongadas como no grupo tratado somente com o ST (Figura 48 C).

Figura 48 - Morfologia das Mo-DCs. As fotomicrografias acima mostram a morfologia das Mo-DCs geradas a partir do tratamento com p38i e ERKi (B), com o ST (C) e com p38i+ERKi e ST (D). Em A temos as Mo-DCs controle. Aumento de 10 x.

Quanto ao fenótipo, observamos que nos grupos tratados com os dois inibidores (p38i+ERKi e ST+p38i+ERKi) houve diminuição da expressão, tanto em frequência, quanto em MFI, das moléculas de co-estímulo CD40, CD80 e CD86, assim como de PDL-1. Para CD83 notamos a diminuição somente na frequência de células positivas. Além disso, o tratamento com os dois inibidores causou diminuição estatisticamente significativa na porcentagem de células expressando CD1a (Figura 49), enquanto houve aumento também significativo na frequência expressão de CD14 (Figuras 49 e 50).

Figura 49 - Efeito do ST e dos inibidores da p38 e ERK 1/2 MAPK no fenótipo de Mo-DCs. Monócitos foram tratados com SB203580 (p38i) e U0126 (ERKi) por 1 h e então o ST foi adicionado. Após 1 h as células foram estimuladas com GM-CSF e IL-4. No quinto dia, as Mo-DCs foram fenotipadas. Os gráficos em barra representam a frequência de células positivas para cada molécula. Teste estatístico: *one-way* ANOVA com pós teste de Dunnett. n=4. *=p<0,05; **p<0,01; ***=p<0,001.

Figura 50 - Efeito do ST e dos inibidores da p38 e ERK 1/2 MAPK no fenótipo de Mo-DCs. Monócitos foram tratados com SB203580 (p38i) e U0126 (ERKi) por 1 h e então o ST foi adicionado. Após 1 h as células foram estimuladas com GM-CSF e IL-4. No quinto dia, as Mo-DCs foram fenotipadas. Os gráficos em barra representam o MFI das células positivas para cada molécula. MRI representa a Mediana Relativa de Fluorescência, proveniente da divisão do MFI das células marcadas pelo MFI das células não marcadas. Teste estatístico: *one-way* ANOVA com pós teste de Dunnett. $n=4$. $*=p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$.

4.5.8 Atividade funcional da Mo-DCs

A fim de avaliarmos as Mo-DCs expostas aos diferentes tratamento de maneira funcional, realizamos ensaios para avaliar sua habilidade de estimular linfócitos T alogenícos.

Apesar das alterações fenotípicas, não encontramos diferença na habilidade das Mo-DCs provenientes dos diferentes tratamentos em induzir proliferação de linfócitos T alogenícos (Figura 51) ou na porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ que proliferaram (Figura 52).

Proliferação de linfócitos T

Figura 51 - Habilidade info-proliferativa das Mo-DCs. Linfócitos alogênicos foram corados com CFSE e co-cultivados com as Mo-DCs por seis dias. No sexto dia, as células foram retiradas da placa a diluição do CFSE avaliada por citometria de fluxo. Ly: linfócitos mantidos em cultura na ausência de Mo-DCs; Pha: linfócitos estimulados com fitohemaglutinina (Pha), na ausência de Mo-DCs. Análise estatística: one-way ANOVA com pós teste de Dunnett. n=3.

Proliferação de linfócitos T alogênicos

Figura 52 - Proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Linfócitos T alogênicos foram co-cultivados com Mo-DCs por seis dias. No sexto dia, as células foram retiradas da placa e marcadas com anticorpos para CD4 e CD8. As células foram então avaliadas por citometria de fluxo. Análise estatística: *one-way* ANOVA com pós teste de Dunnett. n=3.

Além disso, avaliamos a habilidade das Mo-DCs em induzir células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) durante as co-culturas. Também não observamos diferenças entre os diferentes grupos de Mo-DCs (Figura 53).

Figura 53 - Indução de células T reguladoras pelas Mo-DCs. Linfócitos alogênicos foram co-cultivados com Mo-DCs por seis dias. No sexto dia, as células foram retiradas da placa e marcadas para FOXP3. As células foram então avaliadas por citometria de fluxo. A análise da expressão do FOXP3 foi realizada dentro do *gate* de células CD4⁺ e CD25⁺. Análise estatística: *one-way* ANOVA com pós teste de Dunnett. n=3.

Avaliamos também a presença das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-gama, TNF-alfa e IL-17 no sobrenadante das co-culturas de Mo-DCs e linfócitos T. Nas co-culturas com Mo-DCs expostas ao ST há uma tendência de menores quantidades de IL-2 e IL-4, porém maiores quantidades de IL-6, IL-10, TNF-alfa e IFN-gama (Figuras 54, 55 e 56). Interleucina 17 não foi detectada nos sobrenadantes das co-culturas.

O tratamento com o p38i nas Mo-DCs que foram expostas ao ST (p38i+ST) não parece ter alterado o perfil de citocinas em comparação às co-culturas de Mo-DCs que foram expostas ao ST sem o tratamento prévio com o p38i (Figura 54).

Figura 54 - Produção de citocinas durante co-cultura de linfócitos T e Mo-DCs tratadas com o p38i e ST, ou ambos. Linfócitos T alógenos foram cultivados com Mo-DCs provenientes dos diferentes tratamentos por seis dias. No sexto dia o sobrenadante foi congelado e posteriormente analisado quanto a presença das citocinas por CBA (BD Biosciences). Ly: linfócitos T mantidos em cultura na ausência de Mo-DCs; Pha: linfócitos T estimulados com fitohemaglutinina desde o primeiro dia da cultura, na ausência de Mo-DCs. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de dois experimentos independentes.

Observamos também que nas co-culturas com Mo-DCs que receberam o tratamento com o ERKi além do ST (ERKi+ST) há uma tendência de maiores quantidades de IL-2 e IL-4 do que no grupo tratado somente com o ST, mas não

parece ter havido alteração nas quantidades de IL-6, IL-10, TNF-alfa e IFN-gama (Figura 55).

Figura 55 - Produção de citocinas durante co-cultura de linfócitos T e Mo-DCs tratadas com o ERKi e ST, ou ambos. Linfócitos T alogênicos foram cultivados com Mo-DCs provenientes dos diferentes tratamentos por seis dias. No sexto dia o sobrenadante foi congelado e posteriormente analisado quanto a presença das citocinas por CBA (BD Biosciences). Ly: linfócitos T mantidos em cultura na ausência de Mo-DCs; Pha: linfócitos T estimulados com fitohemaglutinina desde o primeiro dia da cultura, na ausência de Mo-DCs. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de dois experimentos independentes.

Já para o tratamento com os dois inibidores e o ST (p38i+ERKi+ST), observamos um aumento parcial de IL-4 quando comparamos ao ST (Figura 56) e,

ainda, que o tratamento com p38i e ERKi, independente da adição do ST, leva a um aparente aumento de TNF-alfa (Figura 56).

Figura 56 - Produção de citocinas durante co-cultura de linfócitos T e Mo-DCs tratadas com o p38i+ERKi e ST, ou ambos. Linfócitos T alogênicos foram cultivados com Mo-DCs provenientes dos diferentes tratamentos por seis dias. No sexto dia o sobrenadante foi congelado e posteriormente analisado quanto a presença das citocinas por CBA (BD Biosciences). Ly: linfócitos T mantidos em cultura na ausência de Mo-DCs; Pha: linfócitos T estimulados com fitohemaglutinina desde o primeiro dia da cultura, na ausência de Mo-DCs. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de dois experimentos independentes.

4.6 Avaliação do papel da HSP27

Levando em consideração que a HSP27 faz parte da via p38 MAPK e possui um papel imunossupressor resolvemos investigar sua produção pelas Mo-DCs expostas ao ST e aos diferentes tratamentos.

O achado que incentivou a investigação da via p38 MAPK neste estudo foi um dado de nosso laboratório mostrando que Mo-DCs de pacientes com câncer de mama expressam mais RNA mensageiro da HSP27 do que Mo-DCs de doadores saudáveis. Já que a HSP27 faz parte da via p38 MAPK, como já mencionado, e a ativação precoce desta via durante a diferenciação de Mo-DCs pode atrapalhar este processo, resolvemos investigar a expressão e fosforilação da HSP27 nas Mo-DCs de pacientes com câncer de mama e controles sadios, já que havíamos encontrado uma maior ativação da via p38 MAPK durante a diferenciação de Mo-DCs das pacientes (Figura 17).

Surpreendentemente, apesar de termos encontrado maiores quantidades de RNA mensageiro para HSP27 nas células das pacientes, isso não se refletiu em maior quantidade de proteína, nem total, nem fosforilada (Figura 57).

Figura 57 - Quantificação intracelular de HSP27. Monócitos de pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama e doadores saudáveis (controles) foram estimulados com GM-CSF e IL-4 por cinco dias para diferenciação em Mo-DCs. No quinto dia, as Mo-DCs imaturas (Mo-iDC) foram estimuladas com LPS para maturação (Mo-mDC). 24 h depois, MO-iDCs e Mo-mDCs foram avaliadas quanto a expressão intracelular de HSP27, por citometria de fluxo. n=4 controles e 6 pacientes. Os gráficos em barras representam a porcentagem de células positivas e o MFI para a HSP27 total (acima) e fosforilada (abaixo). Análise estatística: Teste T não pareado.

Sendo assim, especulamos que a HSP27 poderia estar sendo secretada e agindo nas Mo-DCs de maneira autócrina ou parácrina, prejudicando a sua diferenciação. De fato, o trabalho que descreve o papel prejudicial da HSP27 na diferenciação de Mo-DCs adiciona HSP27 exógena na cultura durante a diferenciação (LAUDANSKI; DE; MILLER-GRAZIANO, 2007b).

Para tanto, decidimos avaliar a presença de HSP27 no sobrenadante das Mo-DCs diferenciadas na presença do ST e dos diferentes tratamentos com os inibidores da ERK e da p38 MAPK. Para nossa surpresa, encontramos HPS27 no próprio ST (Figura 58).

Figura 58 - Quantificação de HSP27 no sobrenadante tumoral da MCF-7. O sobrenadante coletado durante o crescimento das células da linhagem tumoral de mama MCF-7 foi submetido ao ensaio de ELISA pra quantificação de HSP27. Controle refere-se ao meio R-10 utilizado com controle nos experimentos.

Com relação ao sobrenadante das culturas de Mo-DCs, de fato há maior quantidade de HSP27 no sobrenadante das Mo-DCs tratadas com o ST nas primeiras 24 h da cultura de diferenciação (Figura 58). Já no quinto dia, ao final da diferenciação, encontramos bastante variação entre os grupos de Mo-DCs (Figura 59).

Figura 59 - Presença de HSP27 no sobrenadante de culturas de Mo-DCs. Monócitos foram tratados ou não (Controle) com 10 μ M de SB203580 (p38i), 5 μ M de U0126 (ERKi) ou ambos (p38i+ERKi). Após 1 h, 20% de ST foi adicionado (ST) ou não. 1 h depois as células foram estimuladas com GM-CSF e IL-4 para diferenciação em Mo-DCs. O sobrenadante foi coletado 24 h e ao final da diferenciação, no quinto dia e submetido a ensaio de ELISA para quantificação de HSP27. n=2 para 24h e 3 para o quinto dia (Mo-DC). Análise estatística para o grupo de cinco dias: *one-way* ANOVA com pós teste de Dunnett.

4.6.1 Efeito de HSP27 no fenótipo de Mo-DCs

A fim de investigarmos o papel da HSP27 nos efeitos que observamos com o ST, já descritos anteriormente, tratamos os monócitos com a proteína recombinante HSP27 total (Enzo Life Sciences) na concentração que encontramos no ST (30 ng/mL), uma concentração intermediária de 100 μ g/mL e em uma concentração maior, de 1 μ g/mL. Além disso, em um dos grupos pré-tratamos as células com o p38i no intuito de avaliarmos o papel da via p38MAPK nas possíveis alterações causadas pela HSP27.

Em linha com o observado com o ST, notamos que a exposição à HSP27 leva a uma tendência de aumento na frequência de células expressando de CD14, que parece ser dose dependente (Figura 60). Porém, ao contrário do observado com o ST, a inibição prévia da via p38 MAPK não parece ter corrigido esse aumento, exceto para a maior concentração de HSP27 (Figura 60). Com relação ao CD1a, o tratamento com HSP27 não levou a sua diminuição (Figura 60 e 61).

Havíamos notado anteriormente, nos experimentos com o ST, que a inibição da via p38 MAPK, independente da exposição ao ST, levava a uma tendência de diminuição na frequência de células positivas para CD86 e CD83 (Figura 35). Confirmamos esses achados nestes experimentos (Figura 60). É interessante notar que há uma tendência de aumento na porcentagem de células positivas para CD83 nos grupos tratados com HSP27, porém, essa elevação não ocorre na vigência da inibição da via p38 MAPK.

Além disso, devido à diminuição de CD1a, aumento de CD14 e ausência de diferença na indução de células T reguladoras pelas Mo-DCs expostas aos fatores tumorais, decidimos investigar se o ST poderia levar a diferenciação de células macrófagos-*like* ao invés de Mo-DCs. De fato, dados preliminares mostraram que as células tratadas com o ST apresentavam marcadores típicos de macrófagos, como CD68 e CD64 (Figura 62).

A exposição à HSP27 não levou ao aumento da expressão de CD64 ou CD163, um outro marcador típico de macrófagos, nem levou à diminuição da expressão de BDCA-1, um marcador típico de células dendríticas (Figuras 60 e 61). Porém, notamos que a inibição da via p38 MAPK, independente da presença de HSP27, levou ao aumento significativo da expressão de CD64 (Figuras 60 e 61).

Figura 60 - Efeitos da HSP27 e do inibidor da p38 MAPK no fenótipo de Mo-DCs.

Monócitos foram tratados ou não com 10 μ M de SB203580 (p38i) por 1 h e então a proteína HSP27 foi adicionada na concentrações de 30 ng/mL, 100 ng/mL ou 1 μ g/mL. Após 1 h as células foram estimuladas com GM-CSF e IL-4 para diferenciação de DCs. No quinto dia, as Mo-DCs foram fenotipadas. Os gráficos em barra representam a frequência de células positivas para cada molécula. Teste estatístico: *one-way* ANOVA com pós teste de Dunnet. n=5. *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$.

Figura 61 - Efeitos da HSP27 e do inibidor da p38 MAPK no fenótipo de Mo-DCs.

Monócitos foram tratados ou não com 10 μ M de SB203580 (p38i) por 1 h e então a proteína HSP27 foi adicionada na concentrações de 30 ng/mL, 100 ng/mL ou 1 μ g/mL. Após 1 h as células foram estimuladas com GM-CSF e IL-4 para diferenciação de DCs. No quinto dia, as Mo-DCs foram fenotipadas. Os gráficos em barra representam o MFI das células positivas para cada molécula. MRI representa a Mediana Relativa de Fluorescência, proveniente da divisão do MFI das células marcadas pelo MFI das células não marcadas. Teste estatístico: *one-way* ANOVA com pós teste de Dunnet. n=3. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

Figura 62 - Expressão de CD68 e CD64 pelas Mo-DCs tratadas com ST. Monócitos foram tratados (ST) ou não (Controle) com 20% de ST e estimulados com GM-CSF e IL-4 para diferenciação em Mo-DCs. Cinco dias depois as células foram avaliadas quanto a expressão de CD64 em A e CD68 em B. Gráficos em *contour* de um doador em A e histograma representativo de dois experimentos independentes em B.

4.7 Mo-DCs de pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama.

4.7.1 Caracterização fenotípica de Mo-DCs derivadas de pacientes e o efeito da inibição da via p38 MAPK

Uma vez que avaliamos no modelo *in vitro* a participação da via p38 MAPK em alterações fenotípicas na Mo-DCs geradas pela exposição ao sobrenadante tumoral, partimos para a avaliação do papel dessa via de sinalização em possíveis alterações fenotípicas descritas em Mo-DCs de pacientes com câncer de mama.

Realizamos o protocolo de diferenciação de monócitos em células dendríticas com uma diferença dos demais experimentos: os monócitos não foram isolados com *beads* magnéticas e sim por aderência. As células mononucleares do sangue periférico foram isoladas pelo gradiente de Ficoll e plaqueadas, após 1 h e meia as células não aderentes (CNAs) foram retiradas e as aderentes, em sua grande maioria monócitos, foram utilizados nos experimentos. Optamos por realizar os

experimentos dessa maneira porque as CNAs foram utilizadas em outro projeto de pesquisa do nosso grupo. O delineamento experimental encontra-se ilustrado na figura 63. Uma outra diferença foi a dose do SB203580 (p38i) utilizada. Decidimos alterar a dose de 10 μ M para 5 μ M, pois observando novamente nossos resultados de padronização do uso do p38i observamos que essa dose parece ter levado a menores alterações no fenótipo das Mo-DCs e foi efetiva em inibir a fosforilação do membro *downstream* da via p38 MAPK, a proteína MAPKAPK2.

Figura 63 - Delineamento experimental. Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram isoladas por gradiente de Ficoll e plaqueadas na concentração de 3×10^6 por mL em placas de 24 poços. 1 h e meia depois os poços foram lavados duas vezes para retirada das células não aderentes. Os monócitos, que ficaram aderidos na placa, foram tratados ou não com p38i por 1 h. Após esse período todos os grupos receberam GM-CSF e IL-4. No quinto dia as células foram avaliadas quanto seu fenótipo.

Entre pacientes e controles encontramos uma diminuição significativa de CD86 (Figuras 64 e 65), alteração essa já descrita em outros trabalhos, inclusive por nosso grupo (RAMOS et al., 2012). O tratamento com o p38i levou à diminuição da expressão de CD86 tanto em paciente quanto em controles. Além disso, a inibição da via p38 MAPK levou à diminuição da expressão de HLA-DR (Figuras 64 e 65).

Por outro lado, o tratamento com o inibidor da via p38 MAPK levou ao aumento da expressão de CD1a, BDCA-1 e CD80 (Figuras 64 e 65).

Surpreendentemente encontramos uma tendência de maior expressão de PD-L1 nas células dos controles sadios e o tratamento com o p38i levou à diminuição significativa da expressão dessa molécula (Figuras 64 e 65).

Figura 64 - Fenótipo de Mo-DCs de pacientes e controles. Células mononucleares do sangue periférico foram plaqueadas e 1 h e meia depois as células não aderentes foram retiradas por lavagem. As células aderentes, monócitos em sua grande maioria, foram tratados ou não com SB203580 (p38i) por 1 h. Após esse período as células foram estimuladas para diferenciação em Mo-DCs com GM-CSF e IL-4. No quinto dia as células foram avaliadas quanto seu fenótipo de membrana. n= 10 pacientes e 5 controles. Teste estatístico: teste t não pareado entre controle e paciente e teste T pareado entre controle sem estímulo e controle tratado e entre paciente sem estímulo e paciente tratado. *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001.

Figura 65 - Fenótipo de Mo-DCs de pacientes e controles - MFI. Células mononucleares do sangue periférico foram plaqueadas e 1 h e meia depois as células não aderentes foram retiradas por lavagem. As células aderentes, monócitos em sua grande maioria, foram tratados ou não com SB203580 (p38i) por 1 h. Após esse período as células foram estimuladas para diferenciação em Mo-DCs com GM-CSF e IL-4. No quinto dia as células foram avaliadas quanto seu fenótipo de membrana. Os gráficos representam a Mediana de Intensidade de Fluorescência (MFI) total dividida pela MFI do tubo sem marcação. n= 10 pacientes e 5 controles. Teste estatístico: teste t não pareado entre controle e paciente e teste T pareado entre controle sem estímulo e controle tratado e entre paciente sem estímulo e paciente tratado. *= $p<0,05$; **= $p<0,01$; ***= $p<0,001$.

4.7.2 Avaliação funcional das Mo-DCs de pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama

A fim de avaliarmos a habilidade estimuladora das Mo-DCs de pacientes e controles tratadas ou não com o p38i de induzir a proliferação de linfócitos T alogenícos realizamos ensaios de co-cultura. Ao final, avaliamos a diluição do reagente Cell Trace (Molecular Probes™) como indicativo de proliferação e a marcação dos fatores de transcrição FOXP3 e Tbet, ambos por citometria de fluxo.

Não observamos diferenças na porcentagem de linfócitos que proliferaram na presença de Mo-DCs de pacientes e controles ou tratadas ou não com o p38i (Figura 66).

Figura 66 - Habilidade alo-estimuladora de Mo-DCs de pacientes e controles. Linfócitos T alogenícos foram separados por *beads* magnéticas, corados com Cell Trace Violet (CTV) e co-cultivados com Mo-DCs de pacientes e controles, tratadas ou não o p38i, por cinco dias. Ao final, os linfócitos foram adquiridos em citômetro de fluxo e a diluição do CTV avaliada. n= 3 controles e 8 pacientes. Teste estatístico: teste T não pareado entre pacientes e controles e Teste T pareado entre Controle sem estímulo e Controle tratado e entre Paciente sem estímulo e Paciente tratado.

Para melhor avaliarmos a presença de células T reguladoras, incluímos no painel de marcação a molécula CD127 (LIU et al., 2006). Apesar de parecer haver uma tendência de maior porcentagem de células FOXP3⁺ nos linfócitos estimulados com Mo-DCs de pacientes, conforme já descrito (RAMOS et al., 2012), não observamos diferenças entre as células co-cultivadas com Mo-DCs tratadas ou não com o p38i. (Figura 67 A).

Com relação à expressão do fator de transcrição associado à resposta Th1, Tbet (SZABO et al., 2000), observamos que parece haver uma tendência de diminuição da frequência de $CD4^+Tbet^+$ quando os linfócitos são estimulados pelo grupo de Mo-DCs tratado com o p38i (Figura 67 B), tanto para controles quanto para pacientes.

Figura 67 - Expressão de FOXP3 e Tbet nos linfócitos estimulados por MO-DCs de controles e pacientes. Linfócitos T allogenéicos foram separados por *beads* magnéticas e co-cultivados com Mo-DCs de pacientes e controles, tratadas ou não o p38i, por cinco dias. Ao final, os linfócitos foram corados com anticorpos anti-FOXP3 ou anti-Tbet adquiridos em citômetro de fluxo. Para FOXP3 n= 4 controles e 8 pacientes; para Tbet n= 2 controles e 4 pacientes. Teste estatístico: teste T não pareado entre pacientes e controles e Teste T pareado entre Controle sem estímulo e Controle tratado e entre Paciente sem estímulo e Paciente tratado.

5 DISCUSSÃO

No microambiente tumoral uma série de fatores imunossupressores são secretados e podem subverter a resposta imune de maneira a manter a tolerância ao tumor, o que, pelo menos em alguns tipos de tumores, favorece a progressão tumoral (CAMUS et al., 2009; SCARLETT et al., 2012; WANG et al., 2006a, 2006b). Nesse contexto, as células dendríticas, cujo papel na iniciação e modulação da resposta imune é essencial, sofrem alterações fenotípicas e funcionais que prejudicam a resposta imune contra o tumor (DELLA BELLA et al., 2003; GABRILOVICH; CIERNIK; CARBONE, 1996; GABRILOVICH et al., 1997; HASEBE et al., 2000; NEVES et al., 2005; ORSINI et al., 2013; RAMOS et al., 2012).

Muito se sabe sobre as alterações presentes nas DCs, porém os mecanismos moleculares que levam a essas alterações ainda são pouco explorados. Logo no início do projeto, observamos uma fosforilação significativamente maior de p38 nas DCs imaturas de pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama em comparação aos controles, além de uma tendência de maior fosforilação da p38 durante toda a diferenciação dessas células. Considerando que a ativação dessa via é prejudicial à diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos (XIE et al., 2003, 2005), estabelecemos um modelo *in vitro* no qual células de doadores saudáveis foram expostas ao sobrenadante de células da linhagem de adenocarcinoma de mama MCF-7 durante a diferenciação, no intuito de investigarmos o papel da via p38 MAPK. Além disso, considerando o importante papel da via ERK 1/2 no processo de diferenciação (XIE et al., 2005), e o maior número de células disponíveis no modelo *in vitro* em comparação às células de pacientes, foi possível estudar também a participação dessa via.

Em primeiro lugar, diferenciamos as células dendríticas a partir de monócitos purificados através de seleção negativa em coluna imunomagnética. A seleção negativa é menos eficiente em selecionar uma população extremamente pura, quando comparada à seleção positiva (MAO et al., 2005), porém a seleção negativa tem a vantagem de não ativar o monócito pela ligação ao CD14, que é o receptor de LPS, juntamente ao *Toll Like Receptor* (TLR) – 4 (GRAZIANI-BOWERING; GRAHAM; FILION, 1997).

A seguir caracterizamos o uso do sobrenadante tumoral da linhagem de adenocarcinoma de mama, MCF-7. Optamos por essa linhagem porque a ideia inicial era comparar os resultados obtidos com o sobrenadante da linhagem de células epiteliais mamárias MCF-10. Fizemos inúmeras tentativas de cultivar as células da linhagem MCF-10 em meio sem todos os nutrientes que ela necessita (DEBNATH; MUTHUSWAMY; BRUGGE, 2003), a saber - insulina, EGF (*Epidermal Growth Factor*), hidrocortisona e toxina colérica - porém todos falharam. O problema do uso desses fatores, principalmente a toxina colérica, é que eles por si só interfeririam na diferenciação das Mo-DCs. Decidimos então pelo uso do meio R-10 (RPMI 1640 com 10% de SFB) como controle, que foi o meio em que as células da linhagem MCF-7 foram cultivadas.

Confirmarmos a presença e o status de fosforilação das proteínas p38, e ERK 1 e 2 durante a diferenciação dos monócitos em células dendríticas. Apesar de termos realizado mais de um experimento de cinética para extração das proteínas necessárias para essa análise, somente um experimento foi bem sucedido. Com apenas um experimento não é possível tirar nenhuma conclusão à respeito da cinética de ativação dessas vias, porém foi possível confirmar sua participação no processo de diferenciação. Além disso, nossos dados parecem estar de acordo com dados da literatura que mostram que, enquanto a via p38 MAPK é sub-regulada durante a diferenciação, a via ERK 1/2 MAPK é supra-regulada (XIE et al., 2005).

Padronizamos o uso dos inibidores da via p38MAPK (p38i), SB203580, e ERK1/2 MAPK, U0126 (ERKi). O uso do p38i levou à diminuição da expressão de CD1a e aumento de CD14. Esses dados não estão de acordo com dados da literatura em que a inibição da via p38 MAPK não alterou a expressão de CD1a nas Mo-DCs (OOSTERHOFF et al., 2012; XIE et al., 2005). Curiosamente, no nosso trabalho tanto a dose de 1 μ M quanto de 10 μ M do inibidor SB203580, utilizadas nos trabalhos de Xie e colegas (XIE et al., 2005) e Oosterhoff e colegas (OOSTERHOFF et al., 2012), respectivamente, levaram à diminuição de CD1a. Uma possível explicação para isso pode ser a maneira como os monócitos foram isolados. Como já mencionado, optamos pela seleção negativa dos monócitos justamente pelo

fato de a seleção positiva, via CD14, ter o potencial de ativar as células, inclusive via p38 MAPK (ARTHUR; LEY, 2013). Dessa forma, nos trabalhos acima mencionados (OOSTERHOFF et al., 2012; XIE et al., 2005) os monócitos, que foram selecionados positivamente, podem ter partido de uma ativação basal mais elevada da via p38 MAPK e o uso do p38i corrigiu essa ativação, que seria prejudicial à diferenciação das Mo-DCs, e favoreceu a "correta" diferenciação das células. Já no nosso trabalho, como partimos de um basal "mais baixo" de ativação, a inibição da via p38 MAPK foi mais intensa e pode ter prejudicado a diferenciação das células.

Recentemente, um outro estudo com células de camundongos demonstrou que a inibição da via p38 MAPK nas células progenitoras da medula óssea é favorável para a diferenciação de Mo-DCs, por levar a células com elevada expressão de moléculas co-estimuladoras e de apresentação de antígenos, além um alto potencial de reverter a anergia provocada por células T reguladoras em ensaios de co-cultura com linfócitos T efetores (LU et al., 2014). No nosso trabalho, a utilização do p38i não levou à diferenciação de Mo-DCs com expressão mais elevada das moléculas de co-estimulação CD40, CD80, CD86 ou de MHC de classe II. Inclusive, observamos uma diminuição significativa na frequência de células expressando CD86, quando tratadas com o p38i.

Por outro lado, ao analisarmos o uso do ERKi, U0126, observamos que o MFI de HLA-DR e CD11c, moléculas cujo aumento da expressão é característico de DCs, foi mais baixo que o controle. E, apesar de a frequência de células positivas para CD1a ter aumentado, seu MFI diminuiu, o que indica que a expressão dessa molécula por célula está menor nos grupos tratados. Além disso, a frequência de células positivas para CD86 e PD-L1, também características de DCs, foi mais baixa em relação ao controle devido ao tratamento com o ERKi, nas três doses testadas. Dessa forma, analisando de maneira geral o fenótipo, nossos dados estão de acordo com os dados da literatura, de que a via ERK 1/2 MAPK é necessária para a diferenciação das Mo-DCs (XIE et al., 2005).

As células expostas ao ST da MCF-7 durante a diferenciação neste trabalho apresentaram diminuição significativa na expressão de CD1a, molécula típica de células dendríticas, e queda significativamente menor na

expressão de CD14, molécula típica de monócitos. Esses dados sugerem que o ST das células da linhagem MCF-7 prejudica a diferenciação dos monócitos em células dendríticas. Essas alterações foram corrigidas pela inibição prévia da via p38 MAPK e parcialmente corrigidas pela inibição da via ERK 1/2. Esses resultados estão em linha com os resultado de Oosterhoff e colegas, que demonstraram que a exposição a diversos tipos de sobrenadantes tumorais prejudica a diferenciação de Mo-DCs. Curiosamente, neste trabalho, o sobrenadante de uma outra linhagem de células de adenocarcinoma de mama, MDA-MB-231, levou a exatamente as mesma alterações encontradas neste trabalho - diminuição de CD1a e aumento de CD14, que também foram corrigidas pela inibição da via p38 MAPK (OOSTERHOFF et al., 2012).

Quando analisamos a produção de citocinas, observamos que a exposição ao ST levou as células em diferenciação a produzirem as citocinas IL-6, e TNF-alfa e IL-10. Interleucina 6 e IL-10 são sabidamente prejudiciais à diferenciação de Mo-DCs (AVILA-MORENO et al., 2006; DULUC et al., 2007) e IL-6 pode, inclusive, direcionar a diferenciação dos monócitos para macrófagos (DULUC et al., 2007). A produção de IL-10 é induzida pela via p38 MAPK (DE et al., 2000) e a via ERK1/2 MAPK, em conjunto com a via p38 MAPK, pode induzir a produção de TNF-alfa, que por sua vez pode levar a produção de IL-10 (DE et al., 2000). De fato, observamos um aumento na fosforilação tanto da p38 quanto da ERK1/2 quando as células foram expostas ao ST.

Como esperado, a inibição da p38 MAPK e da ERK1/2 MAPK levou à diminuição da produção dessas citocinas, porém parcial. Nos questionamos então se a inibição de ambas as vias não poderia abolir completamente a produção das citocinas e corrigir a diferenciação das células. Realmente, o uso dos dois inibidores (p38i e ERKi) levou a produção das citocinas a níveis muito parecidos com os do controle quando as células foram expostas ao ST. Porém, o fenótipo das células não foi corrigido e, morfologicamente, as células pareciam mais com monócitos do que com DCs. De fato, as vias p38 e ERK1/2 MAPK fazem parte da sinalização que induz a produção das citocinas IL-10, IL-6 e TNF-alfa (DE et al., 2000), as quais sabidamente prejudicam a diferenciação das células (JARNICKI et al., 2008), e sua

inibição é capaz de abolir a produção dessas citocinas. Porém, certo nível de ativação dessas vias também é necessário para o processo de diferenciação e, em sua ausência, ele não ocorre corretamente. Talvez o bloqueio dos receptores das citocinas seja uma melhor abordagem para a recuperação das Mo-DCs expostas ao ST, apesar de que esta abordagem já foi testada e não obteve sucesso completo em outros trabalhos (AVILA-MORENO et al., 2006; DULUC et al., 2007).

Não encontramos alterações nas moléculas de co-estimulação ou de apresentação de antígenos nas células expostas ao sobrenadante tumoral. Nossos resultados estão de acordo com um outro estudo no qual a exposição ao sobrenadante de linhagens de células de câncer de pulmão durante a diferenciação de Mo-DCs não alterou a expressão de CD40, CD80, CD86, CD83 ou HLA-DR, porém, houve diminuição de CD1a e aumento dos marcadores de monócitos/macrófagos CD14, CD16, CD32 e CD163 (AVILA-MORENO et al., 2006). De fato, em nosso estudo, resultados preliminares mostraram duas populações nas culturas tratadas com o ST, sendo que enquanto a frequência de células positivas para CD1a (marcador de DC) caiu, houve aumento da expressão de CD64 (marcador de macrófagos). Além disso, encontramos também maior expressão de CD68 nas células tratadas com o ST.

Dados de nosso grupo demonstraram que o sobrenadante coletado de tumores de mama frescos direcionam os monócitos a se diferenciarem em macrófagos do tipo M2 (RAMOS et al., em preparação), os quais são anti-inflamatórios. Porém, nesses experimentos não foi adicionado GM-CSF e IL-4 às culturas, ao contrário dos nossos.

Nesta linha de raciocínio, ao invés de induzir uma população de DCs tolerogências ou regulatórias, o ST das células da linhagem MCF-7 em nosso estudo estaria então induzindo uma população de células macrófago-like. Isso explicaria nossos resultados de linfo-proliferação, já que não encontramos diferença no número de células que proliferam nos diferentes grupos e, além disso, não houve maior indução de células T reguladoras ($CD4^+/CD25^+/FOXP3^+$) no grupo tratado com o ST. De fato, o ST usado neste trabalho não mimetizou as alterações frequentemente encontradas na Mo-DCs de pacientes, como menor expressão de moléculas de co-estimulação e

de apresentação de antígenos (AZEVEDO, 2010; RAMOS et al., 2012). E, apesar de termos identificado IL-10 na cultura de células diferenciadas na presença do ST, houve também a produção de TNF-alfa. A produção de IL-10 pode, inclusive, ter sido induzida pelas altas quantidades de TNF-alfa.

Diversos fenótipos diferentes têm sido atribuídos às células dendríticas regulatórias/tolerogênicas, em alguns trabalhos essas DCs expressam altos níveis das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, de MHC de classe II e produzem IL-10, enquanto em outros apresentam baixa expressão dessas moléculas. Há ainda relatos de que essas DCs reguladoras expressam altos níveis de moléculas co-estimuladoras, porém apresentam também alta expressão de moléculas inibidoras, como PD-L1 (SHURIN; OUELLETTE; SHURIN, 2012). Apesar de todas as discrepâncias, todas essas DCs foram capazes de polarizar ou induzir células T reguladoras ou de suprimir respostas efetoras em modelos de doenças autoimunes (SHURIN; OUELLETTE; SHURIN, 2012). No nosso caso, além de não haver fenótipo imunossupressor nas Mo-DCs tratadas com o ST, essas células não foram diferentes das Mo-DCs controle na habilidade de induzir proliferação de linfócitos T alogenícos ou na indução de células T reguladoras FOXP3⁺. Além disso, apesar de termos observado IL-10 nas co-culturas com Mo-DCs previamente expostas ao ST, observamos também que houve a produção de IFN-gama.

O papel das vias p38 MAPK e ERK 1/2 na diferenciação de Mo-DCs têm sido bastante estudado nos últimos anos e suas relações com diferentes perfis de resposta imune têm sido relatadas. Wang e colegas demonstraram que a inibição da via p38 MAPK ou a ativação da via ERK 1/2 em conjunto com a neutralização de IL-6 nas células progenitoras é capaz de corrigir os defeitos e restaurar a função de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com Mieloma Múltiplo (WANG et al., 2006b). Ainda, em um modelo murino de melanoma, foi demonstrado que a inibição da via p38 MAPK em DCs esplênicas foi capaz de reverter o perfil tolerogênico dessas células (ZHAO et al., 2009). Além disso, em 2014 foi demonstrado que a inibição da via p38 MAPK em monócitos é capaz de gerar Mo-DCs com capacidade de superar o efeito imunossupressor de linfócitos T reguladores e induzir a proliferação de linfócitos efetores via OX40L (LU et al., 2014).

Enquanto a ativação da via p38 MAPK em DCs têm sido relacionada a respostas de linfócitos T reguladores (JARNICKI et al., 2008; LU et al., 2014; ZHAO et al., 2009), com relação à indução de linfócitos Th17 há dados controversos na literatura (CANNON et al., 2013; HUANG et al., 2012). Em 2013, Cannon e colegas demonstraram que a inibição da via p38 MAPK nos monócitos leva a diferenciação de Mo-DCs capazes de direcionar uma resposta perfil Th17 contra células de tumor de ovário. Considerando o papel da via ERK1/2 MAPK na polarização de linfócitos Th17 (BRERETON et al., 2009) e que a inibição da via p38 MAPK leva ao aumento da fosforilação de ERK1/2 (XIE et al., 2003, 2005), indiretamente, a inibição da via p38 MAPK poderia direcionar para uma resposta Th17. No entanto, o resultado deste trabalho deve ser avaliado com cautela, pois não apenas houve a inibição da via p38 MAPK, mas também a adição de IL-15 durante a diferenciação das células (CANNON et al., 2013). Por outro lado, Huang e colegas demonstraram que a via p38 MAPK em DCs é responsável pela polarização de linfócitos Th17, o que está relacionado com a progressão da inflamação autoimune em um modelo murino de esclerose múltipla (HUANG et al., 2012).

No presente trabalho não observamos fenótipo ou função mais imunogênicos das Mo-DCs quando os monócitos foram tratados com o inibidor da via p38 MAPK, porém, a inibição desta via foi capaz de reverter o fenótipo causado pela exposição ao sobrenadante tumoral. Fato é que o sobrenadante tumoral utilizado neste estudo não levou à diferenciação de Mo-DCs tolerogênicas ou reguladoras, ao invés disso, parece ter prejudicado a diferenciação, levando a células com fenótipo de macrófagos ou de células macrófago-*like*. Porém, mais experimentos precisariam ser realizados para confirmar essa hipótese.

A fim de investigarmos as causas que poderiam levar às alterações encontradas no fenótipo das Mo-DCs expostas ao ST, partimos de um dado inicial de nosso grupo em que encontramos maior expressão de RNA mensageiro para HSP27 nas Mo-DCs de pacientes com câncer de mama. Contudo, não encontramos diferença na quantidade de HSP27 total ou fosforilada nas células de pacientes e controles. Supomos então que as células em diferenciação poderiam estar secretando HSP27 e esta agindo de maneira parácrina ou autócrina e prejudicando a diferenciação. De fato,

macrófagos estimulados com estrógeno secretam HSP27 (RAYNER et al., 2008). Para nossa surpresa, encontramos HSP27 em altas quantidades no ST. A HSP27 regula negativamente a sinalização da apoptose impedindo a liberação do citocromo c ou Smac pela mitocôndria, o que confere resistência à dexametasona em células de mieloma múltiplo (BRUEY et al., 2000; CHAUHAN et al., 2003; PAUL; MANERO; GONIN, 2002). Além disso, em modelos de transplante, o aumento da expressão de HSPs protege as células contra injúria e diminui a liberação de DAMPs, o que é favorável para a adaptação do enxerto pois o protege da resposta imune (BORGES et al., 2016). Dessa forma, o aumento da expressão de HSP27 pode ser um mecanismo de escape tumoral. A HSP27 pode ter sido passivamente liberada das células tumorais conforme elas morriam, inclusive, se compararmos a curva de crescimento das células MCF-7 e a quantificação de HSP27 no sobrenadante tumoral, observamos que a maior quantidade dessa proteína é encontrada justamente nos dias em que as células começam a morrer (dias 10 e 12). Por outro lado, sabe-se que outra HSP, a HSP70, é ativamente secretada por diferentes mecanismos (BORGES et al., 2016), o que abre caminho para especularmos que a HSP27 pode também ter sido ativamente secretada pelas células tumorais, o que pode ser mais um mecanismo de evasão tumoral.

Uma vez no meio extracelular, a HSP27 pode ativar as Mo-DCs. Há indícios na literatura de a HSP27 sinaliza via receptores do tipo Toll (Toll like receptors - TLR) 2 ou 4 (LAUDANSKI; DE; MILLER-GRAZIANO, 2007a) e leva à ativação da via p38 MAPK (DE et al., 2000). Inclusive, o tratamento de monócitos estimulados para diferenciação de Mo-DCs com HSP27 induz exatamente o mesmo fenótipo que observamos neste trabalho, com diminuição de CD1a e aumento de CD14 (LAUDANSKI; DE; MILLER-GRAZIANO, 2007a). Ainda, em um outro trabalho a HSP27 presente no microambiente tumoral levou a diferenciação de monócitos em macrófagos tolerogênicos, o que pode estar relacionado com a progressão tumoral no câncer de mama (BANERJEE; LIN; SKINNER, 2011). Coincidentemente, HSP27 está aumentada no soro de pacientes com câncer de mama (FANELLI et al., 1998; RUI et al., 2003) e é um fator de mal prognóstico (KIM; KIM, 2011).

No nosso trabalho, no entanto, não observamos alterações significativas no fenótipo das Mo-DCs geradas na presença de diferentes quantidades de HSP27. Investigamos moléculas associadas ao fenótipo de macrófagos, porém CD64 não foi modulado pela HSP27 e, apesar de notarmos uma tendência de aumento na frequência de células positivas para CD163, esse achado não foi significativo. O CD163 é um receptor do tipo *scavenger* e sua expressão mais alta faz sentido visto que a HSP27 pode funcionar como o um sinal de perigo (DAMP) para a célula (BORGES et al., 2016).

Além disso, o tratamento das células com a HSP27 não levou às alterações na expressão de CD1a e CD14 que encontramos quando as células foram expostas ao ST, dessa forma, com os dados obtidos, não podemos atribuir essas alterações a HSP27.

A seguir, modificamos a dose do p38i e avaliamos se, assim como nas Mo-DCs de pacientes com Mieloma Múltiplo (WANG et al., 2006a, 2006b), a inibição da via p38 MAPK seria capaz de recuperar o fenótipo e função, frequentemente alterados, nas Mo-DCs de pacientes com câncer de mama.

O tratamento com o p38i alterou o fenótipo das Mo-DCs de pacientes, diminuindo a expressão de CD86 e HLA-DR, moléculas importantes para a estimulação de linfócitos T. Por outro lado, levou ao aumento de CD80. Apesar dessas alterações fenotípicas, não houve diferença nem na porcentagem de linfócitos T alogenícos que proliferaram nem na frequência de linfócitos T reguladores ou Th1. Fato é que as Mo-DCs de pacientes neste estudo não induziram mais linfócitos T reguladores do que as Mo-DCs de controles sadios, como previamente demonstrado nestes pacientes (RAMOS et al., 2012). Porém, notamos uma tendência de maior frequência na população FOXP3⁺ que poderia tonar-se significativa com o aumento da casuística.

Surpreendentemente, nestes experimentos, o tratamento com o p38i levou ao aumento significativo da expressão de CD1a tanto em pacientes quanto em controles. Para estes experimentos modificamos a dose do p38i justamente para não levar a diminuição de CD1a, como havíamos observado durante a padronização, porém, não esperávamos que fosse haver o aumento de sua expressão. O protocolo de coleta e diferenciação das Mo-

DCs teve que ser modificado dos experimentos anteriores, e esses fatores podem ter alterado o *status* basal de ativação da via p38 MAPK nos monócitos que foram tratados com o inibidor e posteriormente estimulados para a diferenciação. Como já discutido anteriormente, o nível basal de fosforilação da via pode ser um fator determinante no resultado de sua inibição ao final da diferenciação das Mo-DCs.

Como já comentado, em alguns trabalhos a sinalização da via p38 MAPK em DCs tem sido associada a respostas Th17, enquanto em outros essa mesma sinalização, nesta mesma célula, tem sido relacionada a respostas com um perfil tolerogênico. A via p38 MAPK é amplamente utilizada por diferentes tipos de células, para responder a diferentes tipos de estímulos e, além disso, a p38 pode ativar mais de 100 tipos diferentes de proteínas (TREMPOLEC; DAVE-COLL; NEBRED, 2013a, 2013b). Nossos resultados e os da literatura, aparentemente divergentes, só ilustram isso. A sinalização via p38 MAPK nas células dendríticas é complexa, e seu desfecho deve depender de vários fatores, como do tipo de receptor que acionou a via, do tônus de ativação, do *status* de diferenciação da célula, do tipo de DC (mielóide, plasmocitóide, Mo-DC) e, muito provavelmente, das proteínas disponíveis para fosforilação abaixo da p38 na cascata, o que vai depender do conjunto de sinais que a célula está recebendo no seu microambiente. Além disso, a integração das diferentes vias de sinalização, ativadas pelos diferentes estímulos do microambiente, é que vai definir, muito provavelmente, o caminho que a resposta imune vai seguir.

Portando, a manipulação de vias de sinalização em abordagens de imunoterapia com células dendríticas deve levar em consideração tanto a complexidade desta célula quanto de sua sinalização.

Neste trabalho observamos que a exposição ao sobrenadante tumoral da linhagem de células MCF-7 durante a diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos de doadores saudáveis é prejudicial. A inibição prévia da via ERK1/2 MAPK foi capaz de reverter a alteração na frequência de células expressando de CD14 e reverteu parcialmente a produção aumentada de IL-6, IL-10 e TNF-alfa. Já a inibição prévia da via p38 MAPK corrigiu a alteração na frequência de células expressando CD1a e CD14 e reverteu parcialmente a produção das citocinas. As alterações encontradas

em Mo-DCs de pacientes com câncer de mama não foram em moléculas características do tipo celular, como CD14 e CD1a, mas sim em CD86, que é uma molécula importante para a indução da resposta de linfócitos T durante a apresentação de antígenos. Neste contexto, a inibição prévia da via p38 MAPK levou à diminuição ainda maior na expressão de CD86 e, ainda, levou à diminuição de HLA-DR. Além disso, apesar de não termos observado diferença estatística na indução de linfócitos T reg pelas Mo-Dcs de pacientes em comparação aos controles, notamos que há uma tendência de maior frequência de células FOXP3⁺ no grupo estimulado pelas MO-DCs de pacientes, o qual não foi alterada pelo tratamento prévio com o p38i. Dessa forma, com os dados obtidos neste estudo não é possível sugerir que a inibição da via p38 MAPK durante a diferenciação *in vitro* de Mo-DCs de pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama seja uma abordagem interessante.

6 CONCLUSÕES

Para Mo-DCs diferenciadas a partir de monócitos coletados de LRS, selecionados negativamente através de coluna imunomagnética e tratados ou não com 10 μ M de SB203580, concluímos:

- A exposição ao sobrenadante da linhagem de células de adenocarcinoma de mama MCF-7 (ST) durante a diferenciação leva à diminuição da frequência de células expressando CD1a e aumento de células expressando CD14;
- A inibição da via p38 MAPK eleva a porcentagem de células expressando CD1a enquanto diminui a de CD14 em Mo-DCs expostas ao ST.
- A inibição da via ERK 1/2 MAPK diminui apenas a frequência de células expressando CD14;
- O tratamento com o ST induz as células em diferenciação a produzirem IL-6, IL-10 e TNF-alfa, citocinas que prejudicam o processo de diferenciação de Mo-DCs.
- A inibição das vias p38 MAPK e ERK1/2 MAPK corrigiu parcialmente a produção dessas citocinas, enquanto que a inibição de ambas leva a sua produção a níveis semelhantes ao controle; contudo, o fenótipo não é corrigido;
- As Mo-DCs expostas ao ST durante a diferenciação induziram a proliferação de linfócitos alogenícos e linfócitos T reg nas mesmas proporções que Mo-DCs controle;
- Há HSP27 no sobrenadante das células tumorais de mama da linhagem MCF-7 utilizado neste estudo;
- A exposição a HSP27 durante a diferenciação das Mo-DCs não mimetizou as alterações encontradas quando as células foram expostas ao ST;

Para Mo-DCs provenientes de monócitos coletados de pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama por aférese, selecionados por aderência e tratados ou não com 5 μ M de SB203580, concluímos:

- Mo-DCs de pacientes apresentaram menor expressão de CD86 do que Mo-DCs de controles saudáveis;

- Há uma maior fosforilação da proteína p38 nas Mo-DCs de pacientes em comparação a controles sadios;
- A inibição da via p38 MAPK durante a diferenciação diminuiu ainda mais a expressão de CD86 nas Mo-DCs de pacientes, além de ter levado à diminuição da expressão de HLA-DR. Por outro lado, levou ao aumento de CD1a, CD80 e BDCA-1 (somente frequência).

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

ADAMS, R. H. et al. Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. **Mol. Cell**, v. 6, n. 1, p. 109–116, 2000.

AGRAWAL, S. et al. Cutting Edge: Different Toll-Like Receptor Agonists Instruct Dendritic Cells to Induce Distinct Th Responses via Differential Modulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase-Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Fos. **J. Immunol.**, v. 171, n. 10, p. 4984–4989, 2003.

AL-MADHOUN, A. S. et al. The interaction and cellular localization of HSP27 and ERbeta are modulated by 17beta-estradiol and HSP27 phosphorylation. **Mol. cell. endocrinol.**, v. 270, n. 1-2, p. 33–42, 30 Mai. 2007.

ARDESHNA, K. M. et al. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. **Blood**, v. 96, n. 3, p. 1039–1046, 1 Ago. 2000.

ARRIGHI, J.-F. et al. A Critical Role for p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in the Maturation of Human Blood-Derived Dendritic Cells Induced by Lipopolysaccharide, TNF-, and Contact Sensitizers. **J. Immunol.**, v. 166, n. 6, p. 3837–3845, 15 Mar. 2001.

ARTHUR, J. S.; LEY, S. C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. **Nat Rev Immunol.**, v. 13, n. 9, p. 679–692, 2013.

ASHWELL, J. D. The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. **Nat. rev. Immunol.**, v. 6, n. 7, p. 532–540, Jul. 2006.

AVILA-MORENO, F. et al. Lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma cell lines use different mediators to induce comparable phenotypic and functional changes in human monocyte-derived dendritic cells. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 55, n. 5, p. 598–611, Mai. 2006.

AZEVEDO, A. P. **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 f. Tese (Doutorado em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2010.

BAKRI, Y. et al. Balance of MafB and PU . 1 specifies alternative macrophage or dendritic cell fate. **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2707–2716, 2005.

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

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245–252, 19 Mar. 1998.

BANERJEE, S.; LIN, C. L.; SKINNER, K. A. Heat Shock Protein 27 Differentiates Tolerogenic Macrophages That May Support Human Breast Cancer Progression. **Cancer Res.**, v. 71, n. 2, p. 318–327, 2011.

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

- BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **J. Leuk. Biol.**, v. 81, n. 1, p. 1–5, Jan. 2007.
- BODE, A. M.; DONG, Z. Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in UV-Induced Signal Transduction. **Sci STKE**, v. 2003, p. (RE2) January 2003, 2013.
- BORGES, T. J. et al. Modulation of Alloimmunity by Heat Shock Proteins. **Front. Immunol.**, v. 7, n. 303, August, 2016.
- BRERETON, C. et al. Inhibition of ERK MAPK suppresses IL-23-and IL-1-driven IL-17 production and attenuates autoimmune disease. **J. Immunol.** v. 183, p. 1715-1723, 2009.
- BRETTON, G. et al. Circulating precursors of human CD1c+ and CD141+ dendritic cells. **J Exper. Med.**, v. 212, n. 3, p. 401–413, 2015.
- BROWN, J. A. et al. Blockade of Programmed Death-1 Ligands on Dendritic Cells Enhances T Cell Activation and Cytokine Production. **J. Immunol.**, v. 170, n. 3, p. 1257-1266, 2003.
- BRUEY, J. M. et al. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. **Nat. Cell Biol.**, v. 2, n. 9, p. 645–652, Set. 2000.
- CAMUS, M. et al. Coordination of intratumoral immune reaction and human colorectal cancer recurrence. **Cancer Res.**, v. 69, n. 6, p. 2685–2693, 15 Mar. 2009.
- CANNON, M. J. et al. Modulation of p38 MAPK signaling enhances dendritic cell activation of human CD4+ Th17 responses to ovarian tumor antigen. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 62, n. 5, p. 839–849, Mai. 2013.
- CELLA, M. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. **J. Exp. Med.**, v. 184, n. 2, p. 747–752, 1 Ago. 1996.
- CHARETTE, S. J. et al. Inhibition of Daxx-Mediated Apoptosis by Heat Shock Protein 27 Inhibition of Daxx-Mediated Apoptosis by Heat Shock Protein 27. **Mol. Cell Biol.**, v. 20, n.20, p. 7602-7612, 2000.
- CHAUHAN, D. et al. Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. **Blood**, v. 102, n. 9, p. 3379–3386, 2003.
- CIOCCA, D. R.; CALDERWOOD, S. K. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. **Cell stress & chaperones**, v. 10, n. 2, p. 86–103, Jan. 2005.
- CIRONE M, DI RENZO L, TRIVEDI P, LUCANIA G, BORGIA G, FRATI L, F. A. Dendritic cell differentiation blocked by primary effusion lymphoma-released factors is partially restored by inhibition of P38 MAPK. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.**, v. 23, n. 4, p. 1079–1086, 2010.
- COLLIN, M.; MCGOVERN, N. Human dendritic cell subsets. **Immunology**, v. 140, n. 1, p.22-30, 2013.
- CUENDA, A. et al. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. **FEBS Letters**, v. 364, n. 2, p. 229–233, Mai. 1995.

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, Ago. 1998.

DE, A. K. et al. Exaggerated Human Monocyte IL-10 Concomitant to Minimal TNF-alpha Induction by Heat-Shock Protein 27 (Hsp27) Suggests Hsp27 Is Primarily an Antiinflammatory Stimulus. **J. Immunol.**, v. 165, n. 7, p. 3951–3958, 1 Out. 2000.

DEBNATH, J.; MUTHUSWAMY, S. K.; BRUGGE, J. S. Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. **Methods**, v. 30, n. 3, p. 256–268, Jul. 2003.

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, 20 Out. 2003.

DULUC, D. et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4319–4330, 2007.

DZIOŃEK, A. et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: Three Markers for Distinct Subsets of Dendritic Cells in Human Peripheral Blood. **J. Immunol.**, v. 165, n. 11, p. 6037–6046, 1 Dez. 2000.

EHRNSPERGER, M. et al. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. **EMBO J.**, v. 16, n. 2, p. 221–229, 15 Jan. 1997.

ESASHI, E. et al. The signal transducer STAT5 inhibits plasmacytoid dendritic cell development by suppressing transcription factor IRF8. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 509–520, Abr. 2008.

FANELLI, M. A. et al. Serological detection of heat shock protein hsp27 in normal and breast cancer patients. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 7, n. 9, p. 791–795, Set. 1998.

FAVATA, M. F. et al. Identification of a Novel Inhibitor of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 29, p. 18623–18632, 17 Jul. 1998.

GABRILOVICH, D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 12, p. 941–952, Dez. 2004.

GABRILOVICH, D. I. et al. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 3, n. 3, p. 483–490, Mar. 1997.

GABRILOVICH, D. I.; CIERNIK, I. F.; CARBONE, D. P. Dendritic cells in antitumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts. **Cel. Immunol.**, v. 170, n. 1, p. 101–110, 25 Mai. 1996.

GRANUCCI, F. et al. Transcriptional reprogramming of dendritic cells by differentiation stimuli. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, n. 9, p. 2539–2546, Set. 2001.

GRAZIANI-BOWERING, G. M.; GRAHAM, J. M.; FILION, L. G. A quick, easy

and inexpensive method for the isolation of human peripheral blood monocytes. **J. Immunol. Methods**, v. 207, n. 2, p. 157–168, 24 Set. 1997.

GUERMONPREZ, P. et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 621–667, Jan. 2002.

GUPTA, J.; NEBREDA, A. R. Roles of p38 mitogen-activated protein kinase in mouse models of inflammatory diseases and cancer. **FEBS J.**, v. 282, n. 10, p. 1841–1857, 2015.

HASEBE, H. et al. Dysfunctional regulation of the development of monocyte-derived dendritic cells in cancer patients. **Biomed. Pharmacother.**, v. 54, n. 0753-3322 (Print), p. 291–298, 2000.

HUANG, G. et al. Signaling via the kinase p38 α programs dendritic cells to drive TH17 differentiation and autoimmune inflammation. **Nat. Immunol.**, v. 13, n. 2, p. 152–161, 2012.

INABA, K. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. **J. Exp. Med.**, v. 186, n. 5, p. 665–672, 1997.

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, 5 Fev. 2004.

JARNICKI, A. G. et al. Attenuating Regulatory T Cell Induction by TLR Agonists through Inhibition of p38 MAPK Signaling in Dendritic Cells Enhances Their Efficacy as Vaccine Adjuvants and Cancer Immunotherapeutics. **J. Immunol.**, v. 180, n. 6, p. 3797–3806, 5 Mar. 2008.

JOFFRE, O. P. et al. Cross-presentation by dendritic cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 12, n. 8, p. 557–569, 2012.

KARIN, M. Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades as Regulators of Stress Responses. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 851, p. 139–146, 1998.

KIM, J. H.; KIM, N. Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. **Chonnan Med. J.**, v. 52, n. 1, p. 12–17, Jan. 2016.

KIM, L. S.; KIM, J. H. Heat shock protein as molecular targets for breast cancer therapeutics. **J. Breast Cancer**, v. 14, n. 3, p. 167–174, Set. 2011.

KOEBEL, C. M. et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. **Nature**, v. 450, n. 7171, p. 903–907, 2007.

KOSTENKO, S.; MOENS, U. Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 66, n.20, p.3289-3307, 2009.

KUMAR, S. et al. Pyridinylimidazole Compound SB 203580 Inhibits the Activity but Not the Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. **Bioch. Biophysic. Res. Commun.**, v. 263, n. 3, p. 825–831, Out. 1999.

LANGOSCH, S. et al. Immunobiology Impact of p38 mitogen-activated protein kinase inhibition on immunostimulatory properties of human 6-sulfo LacNAc dendritic cells. **Immunobiology**, v. 221, n. 2, p. 166–174, 2016.

LAUDANSKI, K.; DE, A.; MILLER-GRAZIANO, C. Exogenous heat shock

protein 27 uniquely blocks differentiation of monocytes to dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, n.10, p.2812-2824, 2007a.

LAUDANSKI, K.; DE, A.; MILLER-GRAZIANO, C. Exogenous heat shock protein 27 uniquely blocks differentiation of monocytes to dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, n. 10, p. 2812–2824, Out. 2007b.

LAVOIE, J. et al. Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. **Mol. Cell. Biol.**, v. 15, n. 1, p. 505–516, 1 Jan. 1995.

LE NAOUR, F. et al. Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics. **J. Biol. Chemistry**, v. 276, n. 21, p. 17920–17931, 25 Mai. 2001.

LEHTONEN, A. et al. Differential Expression of IFN Regulatory Factor 4 Gene in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells and Macrophages. **J. Immunol.**, v. 175, n. 10, p. 6570–6579, 4 Nov. 2005.

LIU, W. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. **J. Exp. Med.**, v. 203, n. 7, p. 1701–1711, 2006.

LU, Y. et al. p38 MAPK-inhibited dendritic cells induce superior antitumour immune responses and overcome regulatory T-cell-mediated immunosuppression. **Nat. Commun.**, v. 5, p. 4229, 2014.

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.

MACDONALD, K. P. A. et al. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*, v. 100, n. 13, p. 4512–4520, 2002.

MÄKELÄ, S. M. et al. Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. **J. Leuk. Biol.**, v. 85, n. 4, p. 664–672, Abr. 2009.

MAO, T. K. et al. Altered monocyte responses to defined TLR ligands in patients with primary biliary cirrhosis. **Hepatology**, v. 42, n. 4, p. 802–808, Out. 2005.

MATZINGER, P. Tolerance, danger, and the extended family. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 12, n. 1, p. 991–1045, Abr. 1994.

MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of self. **Science**, v. 296, n. 5566, p. 301–305, 12 Abr. 2002.

MUDGETT, J. S. et al. Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 97, n. 19, p. 10454–10459, 2000.

NEVES, A. R. et al. Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell – autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed

lymphocyte reactions. **Cancer Immunol. Immunother.** v. 54, n. 1, p. 61-66, 2005.

OEZTUERK-WINDER, F.; VENTURA, J.-J. The many faces of p38 mitogen-activated protein kinase in progenitor/stem cell differentiation. **Biochem. J.** v. 445, n. 1, p. 1–10, 2012.

OOSTERHOFF, D. et al. Tumor-mediated inhibition of human dendritic cell differentiation and function is consistently counteracted by combined p38 MAPK and STAT3 inhibition. **Oncoimmunology**, v. 1, n. 5, p. 649–658, 1 Ago. 2012.

ORSINI, G. et al. Defective generation and maturation of dendritic cells from monocytes in colorectal cancer patients during the course of disease. **Intern. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 11, p. 22022–22041, 2013.

OUAAZ, F. et al. Dendritic Cell Development and Survival Require Distinct NF- κ B Subunits. **Immunity**, v. 16, n. 2, p. 257–270, Fev. 2002.

PAUL, C.; MANERO, F.; GONIN, S. Hsp27 as a negative regulator of cytochrome C release. **Mol. Cell. Biol.**, v. 22, n. 3, p. 816–834, 2002.

PHILPOTT, D. J.; GIRARDIN, S. E. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. **Molecul. Immunol.**, v. 41, n. 11, p. 1099–1108, Nov. 2004.

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

RANDOLPH, G. J. et al. Differentiation of Phagocytic Monocytes into Lymph Node Dendritic Cells In Vivo. **Immunity**, v. 11, n. 6, p. 753–761, 1 Dez. 1999.

RAYNER, K. et al. Extracellular release of the atheroprotective heat shock protein 27 is mediated by estrogen and competitively inhibits acLDL binding to scavenger receptor-A. **Circul. Res.**, v. 103, n. 2, p. 133–141, 18 Jul. 2008.

RESCIGNO, M. Dendritic Cell Survival and Maturation Are Regulated by Different Signaling Pathways. **J. Exp. Med.**, p. 2175–2180, 1998.

RICHARDS J, LE NAOUR F, HANASH S, B. L. Integrated Genomic and Proteomic Analysis of Signaling Pathways in Dendritic Cell Differentiation and Maturation. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 100, p. 91–100, Dez. 2002.

ROCK, K. L.; GOLDBERG, A. L. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 739–779, Jan. 1999.

RUI, Z. et al. Use of serological proteomic methods to find biomarkers associated with breast cancer. **Proteomics**, v. 3, n. 4, p. 433–439, Abr. 2003.

SAEKI, H. et al. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. **J. Immunol.**, v. 167, n. 5, p. 2472–2475, 1 Mar. 1999.

SALLUSTO, F. 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, 1 Abr. 1994.

SALLUSTO, F. et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, n. 9, p. 2760–2769, Set. 1998.

SATTHAPORN, S.; ROBINS, A. Dendritic cells are dysfunctional in patients with operable breast cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 53, n. 6, p. 510–518, 2004.

SCARLETT, U. K. et al. Ovarian cancer progression is controlled by phenotypic changes in dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 209, n. 3, p. 495–506, 2012.

SCHMITT, E. et al. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. **J. Leuk. Biol.**, v. 81, n. 1, p. 15–27, Jan. 2007.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565–1570, 25 Mar. 2011.

SEGURA, E. et al. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. **Immunity**, v. 38, n. 2, p. 336–348, 21 Feb. 2013.

SHURIN, G. V.; OUELLETTE, C. E.; SHURIN, M. R. Regulatory dendritic cells in the tumor immunoenvironment. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 61, n. 2, p. 223–230, Feb. 2012.

SOZZANI, S. et al. Cutting Edge: Differential Regulation of Chemokine Receptors During Dendritic Cell Maturation: A Model for Their Trafficking Properties. **J. Immunol.** v. 161, n. 3, p.1083–1086, 1998.

STEINMAN, R. M.; BANCHEREAU, J. Taking dendritic cells into medicine. **Nature**, v. 449, n. 7161, p. 419–426, 2007.

SZABO, S. J. et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. **Cell**, v. 100, n. 6, p. 655–669, 2000.

TREMPOLEC, N.; DAVE-COLL, N.; NEBREDA, A. R. SnapShot: P38 mapk signaling. **Cell**, v. 152, n. 3, p. 656–656.e1, 2013a.

TREMPOLEC, N.; DAVE-COLL, N.; NEBREDA, A. R. SnapShot: P38 MAPK substrates. **Cell**, v. 152, n. 4, p. 924–924.e1, 2013b.

VENTURA, J. J. et al. p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. **Nat. Genet.**, v. 39, n. 6, p. 750–758, 2007.

WANG, S. et al. Tumor evasion of the immune system : inhibiting p38 MAPK signaling restores the function of dendritic cells in multiple myeloma. **Blood**, v. 107, n. 6, p. 2432–2439, 2006a.

WANG, S. et al. Optimizing immunotherapy in multiple myeloma : restoring the function of patients ' monocyte-derived dendritic cells by inhibiting p38 or activating MEK / ERK MAPK and neutralizing interleukin-6 in progenitor cells. **Blood**, v. 108, n. 13, p. 4071–4077, 2006b.

WATTS, C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation

- on MHC molecules. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 821–850, Jan. 1997.
- WONG, B.; JOSIEN, R.; CHOI, Y. TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. **J. Leukoc. Biol.**, v. 65, n. 6, p. 715–724, 1 Jun. 1999.
- WORTZEL, I.; SEGER, R. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. **Genes Cancer**, v. 2, n. 3, p. 195–209, 2011.
- XIE, J. et al. Novel and detrimental effects of lipopolysaccharide on in vitro generation of immature dendritic cells: involvement of mitogen-activated protein kinase p38. **J. Immunol.**, v. 171, n. 9, p. 4792–4800, 1 Nov. 2003.
- XIE, J. et al. Critical roles of Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling and inactivation of p38 MAP kinase in the differentiation and survival of monocyte-derived immature dendritic cells. **Exp. Hematol.**, v. 33, n. 5, p. 564–572, Mai. 2005.
- YOUNG, J. W. et al. The B7/BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4+ T lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro. **J. Clin. Invest.**, v. 90, n. 1, p. 229–237, Jul. 1992.
- ZHAO, F. et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase drives dendritic cells to become tolerogenic in ret transgenic mice spontaneously developing melanoma. **Clin. Cancer Res.**, v. 15, n. 13, p. 4382–4390, 1 Jul. 2009.
- ZHOU, L. J.; TEDDER, T. F. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 93, n. 6, p. 2588–2592, 19 Mar. 1996.