CRISTIANO JACOB DE MORAES

EFEITOS DE TIMOSINA ALFA 1 E INIBIÇÃO DE STAT-3 SOBRE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS DERIVADAS DE MONÓCITOS

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

São Paulo
2013

CRISTIANO JACOB DE MORAES

EFEITOS DE TIMOSINA ALFA 1 E INIBIÇÃO DE STAT-3 SOBRE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS DERIVADAS DE MONÓCITOS

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Moraes, Cristiano Jacob de.
Efeitos de timosina alfa 1 e inibição de STAT-3 sobre células dendríticas humanas derivadas de monócitos / Cristiano Jacob de Moraes. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia de tumores.

Versão do título para o inglês: Effects of tymosin alpha 1 and inhibition of STAT-3 in monocyte-derived dendritic cells.

1. Timosina alfa 1 2. STAT-3 3. Inibição 4. JSI-124
5. Células dendríticas I. Barbuto, Prof. Dr. Jose Alexandre Marzagão
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0188/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Cristiano Jacob de Moraes.

Título da Dissertação: Efeitos de timosina alfa 1 e inibição de STAT-3 sobre células dendríticas humanas derivadas de monócitos.

Orientador(a): Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

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

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

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

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

São Paulo, 03 de novembro de 2011.

PARECER 1024/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas com Seres Humanos* do ICB, na sessão realizada no dia 19.10.2011, **APROVOU** o projeto intitulado: *"Inibição de STAT3 por timosina alfa-1: estratégia eficaz para recuperação funcional de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com câncer?"* sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. JOSÉ ALEXANDRE M.BARBUTO e o aluno CRISTIANO JACOB DE MORAES.

Cabe os pesquisadores executantes elaborarem 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.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **19.10.2012.**

Atenciosamente,

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

À minha família pelo apoio e a minha noiva por estar sempre ao meu lado, dando-me suporte.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Professor Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto, por ter aberto as portas de seu laboratório, dando assim a oportunidade de conhecer de perto o mundo da ciência. Por nossas discussões, que me ensinaram muito mais do que técnicas de laboratório, mostram-me o real poder do conhecimento.

À minha banca de qualificação, Profª Dra. Ana Paula Lepique, Dra. Telma Oshiro e Dra Jaqueline Jacysyn pelos preciosos conselhos e ajuda sem os quais não conseguiria concluir o trabalho.

A Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, pesquisadora do Departamento de Farmacologia e Toxicologia (DFT) pertencente ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade de Campinas (Unicamp) por ter, gentilmente, cedido a linhagem celular OVCAR-3, sem a qual não poderia ter concluído o trabalho.

Aos amigos e companheiros de “guerra” do laboratório de imunologia de tumores, Ana Carol, “Betânia”, Bruna, Cecíla, Karen, Kleber, Lucila, Maria, Mariana, Patrícia Toniolo, Isabella, Grá, Rodrigo (mestre), Roberta, Roberto, Célia e Claudinha, pelas horas de trabalho e principalmente pelo tempo de boas risadas.

Aos amigos de departamento e do extinto cursão, Narciso, Cris, Leandro, Lu, Otavio, Marina, Nicole, Carlinha e Vinicius.

Aos professores pela ajuda e pelas conversas de corredor que muito me auxiliaram.

Aos meus amigos “extra campo” Patrícia Bergami, Rodrigo e Evelyn, Robeto e Rosely, Narciso e Milene, Cris e Lendro pelo apoio nos momentos mais difíceis da minha vida. Pelas conversas, pelos conselhos e principalmente pela amizade.

À família por nunca deixar de acreditar no meu potencial.

À minha noiva, amiga e companheira, Nathalia Cruz de Victo, por ter entrado na minha e tê-la deixado mais alegre. Por estar ao meu lado, participando de todos os momentos da minha vida, sejam eles bons ou ruins, sempre me ajudando. Pelos fins de semana perdidos, por conta de experimentos. Enfim, por ser a mulher da minha vida. Te amo.

Aos funcionários do departamento, desde a portaria, com Miltão e Otacílo, passando pelas secretarias, com Jô, Amanda, João e Eni, que foi minha mãezona

no departamento cuidando de mim com muito carinho. Não poderia esquecer da Andrea do serviço de citometria. Peço desculpas por tê-la atormentado tanto por causa do citômetro. Ao Paulo da histologia. Ao Israel e Rogério pela força com os galões de nitrogênio. A grande Áurea pelo cafezinho nosso de cada dia e principalmente pelo seu bom humor que nos alegra logo pela manhã.

Agradeço as agências de fomento CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro durante os anos de pesquisa.

A todos vocês o meu muito obrigado.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”. (Marcel Proust)

RESUMO

de Moraes CJ. Efeitos de timosina alfa 1 e inibição de STAT-3 sobre células dendríticas humanas derivadas de monócitos. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

As células dendríticas (DCs) são células fundamentais no desencadeamento da resposta imune, o que não poderia ser diferente nos casos de tumor em que a participação das DCs é crucial para a montagem de uma resposta antitumoral. No entanto, no microambiente tumoral parece haver condições que impedem esta função imunoestimuladora das DCs. Este comprometimento funcional das DCs parece ser fruto da hiperativação do fator de transcrição STAT-3. O presente estudo visou avaliar, *in vitro*, a capacidade do hormîno tímico, timosina α 1 (Tα1), em interferir na ativação de STAT-3. Para isso, monócitos e mo-DCs (DCs derivadas de monócitos) foram tratados ou não com Tα1 e comparados com um controle utilizando o inibidor de STAT-3, JSI-124. As células foram então avaliadas quanto a expressão de moléculas de superfície (CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c), e as mo-DCs foram avaliadas também quanto à sua capacidade de estimular de linfócitos T $CD3^+$ alogeneicos. Os resultados mostraram que Tα1 não modulou fenotipicamente as células como o controle JSI-124, indicando que o hormônio tímico não interfere no processo de ativação do fator de transcrição STAT-3. Os efeitos de Tα1 só foram observados nas mo-DCs, as quais apresentaram tendência de aumento na expressão de HLA-DR, CD86 e PD-L1. Funcionalmente, estas células apresentam o mesmo perfil de indução de proliferação de linfócitos alogeneicos. Notou-se também que o hormônio tímico não foi capaz de reverter fenotípicamente mo-DCs cultivadas em meio contendo sobrenadante tumoral proveniente de células de carcinoma de ovário, OVCAR-3, pelo contrário, parece ter potencializado o efeito desse sobrenadante. Esta observação mostra que esses resultados não reproduzem aqueles encontrados nas mo-DCs de pacientes com câncer também tratadas também com este hormônio. Por outro lado, obtivemos resultados surpreendentes com o inibidor de STAT-3, JSI-124, utilizado como controle. O tratamento com JSI-124 levou a alterações fenotípicas tanto em monócitos, promovendo a queda da maioria dos marcadores de membrana estudados, como nas mo-DCs fazendo com que estas células exibissem um perfil próximo ao infamatório, com aumento da expressão de HLA-DR e CD86, concomitante queda de PD-L1 e maior capacidade aloestimuladora. Além disso, mostramos que o fator de transcrição STAT-3 parece estar envolvido na expressão das leucointergrinas (CD11a, CD11b e CD11c) uma vez que a inibição de tal fator proporcionou queda da expressão dessas moléculas em níveis proteico e gênico.

Palavras-chave: Timosina alfa 1. STAT-3. Inibição JSI-124. Células dendríticas.

ABSTRACT

de Moraes CJ. Effects of thymosin alpha 1 and inhibition of STAT-3 in human monocyte-derived dendritic cells. [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Dendritic cells (DCs) are cells essential in triggering the immune response, which could not be different in tumor cases in which the participation of DCs is critical for antitumor response. However, there appears to be in the tumor microenvironment conditions that prevent the DCs' immunostimulatory function. This functional impairment of DCs appears to be the result of hyperactivation of the transcription factor STAT - 3. The present study evaluated, *in vitro,* the ability of thymic hormone, thymosin α 1 (Tα1), in interfering with the activation of STAT - 3. For this, monocytes and monocytes-derived DCs (mo -DCs) were treated or not with Tα1 and compared with a control by using a STAT -3 inhibitor, JSI -124. The cells were then evaluated for the expression of surface molecules (CD14 , HLA- DR, CD80 , CD86 , PD- L1 and CD11c) and, besides, DCs were evaluated for their ability to stimulate T $CD3^+$ allogeneic lymphocytes. The results showed that Tα1 phenotypically did not modulate cells as control JSI -124 did it, indicating that the thymic hormone does not interfere in the transcription factor STAT – 3 activation process. The effects of Tα1 were only observed in mo-DCs, which showed an increase tendency in the HLA - DR, CD86 and PD- L1 expression. Functionally, the treated cells exhibited the same profile to inducing allogeneic lymphocytes proliferation as non-treated cells. It was also noted that the thymic hormone was not able to phenotypically revert mo -DCs cultured in medium containing supernatant from ovarian carcinoma tumor cells, OVCAR -3. However, it seems to have potentiated the effect of supernatant. This observation shows that these results do not replicate those found in cancer patients´ mo-DCs also treated with this hormone. Furthermore, surprising results were obtained with the STAT -3 inhibitor, JSI -124, used as a control. Treatment with JSI-124 led to phenotypic changes in both monocytes, promoting the decrease of most membrane markers studied, such as mo-DCs in making these cells to exhibit a profile close to inflammatory, with increased expression of HLA-DR and CD86, with concomitant decrease of PD- L1 and greater alostimulatory capacity. Moreover, we showed that the transcription factor STAT -3 appears to be involved in the leucointergrinas (CD11a , CD11b , and CD11c) expression, since inhibition of this factor downregulated the expression of these molecules in both gene and protein levels.

Keywords: Thymosin alpha 1. STAT-3. Inhibition. JSI-124. Dendritic cells.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC – *Antigen Presenting Cell*

CFSE – *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*

CR – Receptore para complemento

DC – Célula dendrítica

EGF – *Epidermal growth factor*

GM-CSF – *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

IFN – *Interferons*

IL – Interleucina

JSI-124 – Cucurbitacina I

MAPK – *Mitogen Activated Protein Kinases*

mo-DCs – DCs derivadas *in vitro* de monócitos

MTT – *3-(4,5-dimethyl-thyazol-2-yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide*

NF-kB – *Nuclear Factor*-kB

PD-1 – Receptor de morte programada-1

PD-L1- Ligante para receptor de morte programada-1

STAT – *Signal Transducer and Activator of Transcription*

TGF-β – *Transforming Growth Factor β*

TLR – *Toll Like Receptors*

TNF-α – *Tumor Necrosis Factor-* α

Tα1 – Timosina alfa-1

VEGF – *Vascular Endotelial Growth Factor*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Avaliação fenotípica de mo-DCs tratadas ou não com Tα1 em termos de frequência e intensidade mediana de fluorescência..... 25

Figura 2 – Estratégia de análise da população de monócitos..... 31

Figura 3 – Estratégia de análise da população de mo-DCs..... 32

Figura 4 – Imagem da linhagem de adenocarcinoma de ovário OVCAR-3..... 35

Figura 5 – Frequência de monócitos expressando as moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c após tratamento com diferentes concentrações de Tα1..... 39

Figura 6 – Intensidade mediana de fluorescência relativa das moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c em monócitos tratados com diferentes concentrações de Tα1..... 40

Figura 7 – Frequência de mo-DCs expressando as moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c após tratamento com diferentes concentrações de Tα1..... 41

Figura 8 – Intensidade mediana de fluorescência relativa das moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c em mo-DCs tratados com diferentes concentrações de Tα1..... 42

Figura 9 – Diluição de CFSE em linfócitos T $CD3^+$ alogenêicos estimulados com mo-DCs tratadas ou não com Tα1..... 43

Figura 10 – Crescimento da linhagem celular OVCAR-3 no decorrer do tempo..... 44

Figura 11 – Efeito da Tα1 sobre a frequência de mo-DCs expressando as moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c após cultura na presença de sobrenadante tumoral..... 45

Figura 12 – Efeito da Tα1 sobre a intensidade mediana de fluorescência das moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c marcadores expressas por mo-DCs após cultura na presença de sobrenadante tumoral..... 46

Figura 13 – Diluição de CFSE em linfócitos alogenêicos estimulados com mo-DCs na presença de sobrenadante tumoral e tratadas ou não com Tα1..... 47

Figura 14 – Estrutura química do inibidor de STAT3, JSI-124..... 48

Figura 15 – Citotoxicidade do DMSO para monócitos e células dendríticas..... 49

Figura 16 – Frequência de monócitos expressando as moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c após tratamento com diferentes concentrações de JSI-124..... 51

Figura 17 – Intensidade mediana de fluorescência relativa das moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c em monócitos tratados com diferentes concentrações de JSI-124..... 52

Figura 18 – Frequência de mo-DCs expressando as moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c após tratamento com JSI-124..... 53

Figura 19 – Intensidade mediana de fluorescência relativa das moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c em mo-DCs tratados com diferentes concentrações de JSI-124..... 55

Figura 20 – Expressão de CD80 e CD86 por mo-DCs antes e após o tratamento com JSI-124 em diferentes concentrações..... 56

Figura 21 – Análise da expressão individual de PD-L1 em mo-DCs..... 57

Figura 22 – Viabilidade de mo-DCs e monócitos tratados com JSI-124..... 58

Figura 23 – Imagens de mo-DCs antes e após tratamento com 0,5µM de JSI-124..... 60

Figura 24 – Histograma referente à medida de fosforilação de STAT3..... 62

Figura 25 – Diluição de CFSE em linfócitos alogenêicos estimulados com mo-DCs e tratadas ou não com JSI-124..... 63

Figura 26 – Efeito do JSI-124 sobre a expressão de CD11a e CD11b por Mo-DCs..... 64

Figura 27 – Expressão de CD18 por mo-DCs tratadas com JSI-124..... 65

Figura 28 – Expressão relativa dos genes *itgal*, *itgam* e *itgax* em mo-iDCs tratadas ou não com JSI-124..... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Marcadores utilizados na fenotipagem monócitos e mo-DCs..... 30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 OBJETIVO..... 26

3 MATERIAIS E MÉTODOS..... 27

3.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico..... 27

3.2 Obtenção de monócitos..... 27

3.3 Diferenciação das células mononucleadas em células dendríticas e ativação das células diferenciadas..... 27

3.4 Tratamento com timosina alfa 1..... 28

3.5 Tratamento com cucurbitacina I (JSI-124)..... 28

3.6 Ensaio de redução do MTT..... 28

3.7 Análise fenotípica das células..... 29

3.8 Estratégia de análise..... 30

3.9 Separação de células T CD3^{+} para co-cultura..... 32

3.10 Marcação dos linfócitos T com *carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE)..... 33

3.11 Avaliação da atividade estimuladora das DCs e da proliferação celular de linfócitos T..... 33

3.12 Imunoflorescência..... 33

3.13 Linhagens celulares..... 34

3.14 Curva de crescimento e coleta de sobrenadante..... 34

3.15 Cultura de Mo-DCs em meio condicionado..... 35

3.16 Marcação intracelular de p-STAT3..... 35

3.17 Extração de RNA..... 36

3.18 Síntese de Cdna..... 36

3.19 PCR quantitativo (qRT-PCR)..... 37

3.20 Cálculo para expressão relativa..... 37

3.21 Análise estatística..... 37

4 RESULTADOS..... 38

4.1 Efeito da timosina Alfa–1 (Tα1) sobre fenótipo de células mononucleares aderentes (monócitos) e de mo-DCs..... 38

4.2 Avaliação da capacidade aloestimuladora de mo-DCs tratadas ou não com Tα1..... 42

4.3 Ação da Tα1 no fenótipo e na função de mo-DCs diferenciadas na presença de sobrenadante tumoral..... 43

4.3.1 Cinética de crescimento linhagem celular OVCAR-3..... 43

4.3.2 Análise de marcadores de superfície em mo-DCs diferenciadas na presença de sobrenadante, tratadas ou não com Tα1..... 44

4.3.3 Avaliação da capacidade aloestimuladora de mo-DCs diferenciadas na presença de sobrenadante tumoral e tratadas ou não com Tα1..... 47

4.4 Efeito da Cucurbitacina I (JSI-124) sobre fenótipo de células mononucleares aderentes (Monócitos) e Mo-DCs..... 47

4.4.1 Determinação da concentração de DMSO..... 47

4.4.2 Análise fenotípica de monócitos e mo-DCs após tratamento com JSI-124.. 49

4.5 Análise do nível fosforilação de STAT-3 em mo-iDCs tratadas ou não com JSI-124..... 61

4.6 Avaliação da capacidade aloestimuladora de mo-DCS tratadas ou não com JSI-124..... 62

4.7 Efeito do JSI-124 sobre a expressão de CD18, CD11a e CD11b por Mo-DCs..... 63

4.8 Avaliação da expressão gênica de CD11a, CD11b e CD11c..... 65

5 DISCUSSÃO..... 67

6 CONCLUSÃO..... 73

REFERÊNCIAS..... 74

ANEXO – Termo de consentimento..... 82

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, 2011), em 2008, o número de novos casos de câncer atingiu a marca de aproximadamente 13 milhões e o número de mortes chegou a 7,6 milhões em todo o mundo. O câncer é uma doença decorrente do acúmulo de alterações genéticas que levam ao surgimento de características fenotípicas que proporcionam crescimento desordenado e descontrolado das células. Como exemplos dessas características podem ser citadas a capacidade de resistir a morte celular, a indução da angiogênese e a capacidade replicativa ilimitada (Revisto por Hanahan, Weinberg, 2011).

Interferir em alguma das alterações mencionadas acima parece ser uma estratégia plausível para eliminar as células neoplásicas, ou ao menos controlar o avanço do tumor. Neste aspecto, as terapias, chamadas “convencionais”, que têm como alvo o ciclo celular, vêm sendo empregadas. Como exemplo, tem-se a cisplatina, fármaco que se liga ao DNA causando danos que culminam na morte celular (Siddik et al., 2003) e o paclitaxel, o qual se liga à subunidade β da tubulina, interferindo na formação dos fusos mitóticos, levando a interrupção do ciclo celular (Panchagnula et al., 1998).

No entanto, muitos tipos de tumores mostram-se resistentes a este tipo de terapia (revisto por Yardley, 2013), comprometendo, assim, a eficácia do tratamento. A resistência aos quimioterápicos clássicos ocorre de diferentes formas, como a existência de bombas de efluxo na membrana das células tumorais (Smyth et al., 1998), as quais expulsam o fármaco da célula, ou a alteração de vias de sinalização responsáveis pelo balanço entre sobrevivência e morte celular (Friesen et al., 1997).

Por esta razão, novas terapias vêm sendo desenvolvidas, que procuram explorar outros mecanismos de controle das neoplasias. Entre estas, aquelas que recrutam mecanismos efetores do próprio organismo, como os do sistema imune, têm ganho cada vez mais relevância. Entre estas estratégias, uma forma que já atingiu a aplicação clínica de rotina é o uso de anticorpos monoclonais dirigidos contra alvos específicos expressos pelas células tumorais (Revisto por Sliwkowski, Mellman, 2013). Sabe-se que a célula transformada, em virtude do acúmulo de mutações, é capaz de expressar proteínas que a célula normal não expressa, ou não o faz na mesma quantidade. Isso pode ser ilustrado pelo membro da família de

receptores para *Epidermal growth factor* (EGF), a proteína HER-2/neu, a qual é expressa em células epiteliais, mas superexpressa em 20-40% dos carcinomas primários de mama (Baxevanis et al., 2006) e para a qual desenvolveu-se o anticorpo monoclonal trastuzumabe, utilizado na prática clínica (Mendelsohn, Baselga, 2000).

Entretanto, observa-se que, mesmo tais terapias dirigidas a alvos moleculares pré-definidos, com o passar do tempo, podem tornar-se ineficazes. Com o avanço da tecnologia, foi possível mostrar que o tumor não é constituído de um único padrão celular, mas sim formado por diferentes clones, constituindo assim um ambiente heterogêneo (Gerlinger et al., 2012). A falha da terapia dirigida pode ser fruto da evolução e expansão de clones resistentes – por não expressarem o alvo escolhido - cuja existência precedia o início do tratamento (Diaz Jr et al., 2012; Guix et al., 2008).

Por esta razão, vem ganhando destaque uma estratégia terapêutica interessante, que é a imunoterapia ativa contra o câncer. Desde a década de 50, com a hipótese de vigilância imunológica postulada por Burnet (Burnet, 1957) aceita-se a importância de um sistema imune competente para o controle das neoplasias. Da mesma forma, atribui-se o crescimento dos tumores a mecanismos de escape dos mesmos frente ao sistema imune, que os tornem não ou pouco imunogênicos (Diaz-Monteiro et al., 2009). Sendo assim, a vacinação contra o câncer baseia-se na ideia de que a exposição do sistema imune do paciente aos antígenos tumorais apresentados em um contexto imunogênico ative a imunidade específica antitumoral (Pardoll, 2000), e com isso, se consiga mais uma forma de controle/combate contra o tumor. Com base nisto, diferentes tipos de vacina vêm sendo testados. Embora estratégias diferentes venham sendo testadas, como por exemplo, aquelas que usam mRNA de antígenos tumorais (Granstein et al., 2000), peptídeos derivados de tais antígenos (Perez et al., 2010), vírus modificados de maneira a expressar antígenos tumorais (Smith et al., 2009), etc, uma abordagem que chama a atenção é a que explora o potencial imunogênico das células dendríticas (DCs).

O uso de DCs na confecção de vacinas antitumorais é conveniente em virtude das características funcionais deste tipo celular. Desde sua descoberta por Steinman na década de 70 (Steinman, Cohn, 1973), as DCs são alvo de inúmeros estudos, na tentativa de melhor caracterizá-las. Uma das estratégias que permitiu muitos destes estudos foi a possibilidade de geração *in vitro* deste tipo celular a partir da

manipulação de precursores, quer sejam monócitos $CD14^+$ do sangue periférico, tratados com *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) e Interleucina-4 (IL-4) (Sallusto, Lanzavechia, 1994), quer seja células precursoras hematopoiéticas $CD34^+$, estimuladas com *c-kit* (Szabolcs, Moore, Young, 1995).

Funcionalmente, as DCs são consideradas as principais células apresentadoras de antígenos (APCs – do inglês, "*Antigen Presenting Cells*") (Steinman, 2012). Contribui para isto sua ampla capacidade de internalização de antígenos, a qual pode ocorrer via fagocitose (Inaba et al., 1993), pinocitose ou macropinocitose (Sallusto et al., 1995), assim como sua distribuição, pois estas células, como verdadeiras sentinelas móveis, encontram-se distribuídas em diversos tecidos, onde capturam, processam e, uma vez migrando para os órgãos linfóides, apresentam os antígenos aos linfócitos T (Ingulli et al., 1997), induzindo ou modulando a resposta imune (revisto por Banchereau, Steinman, 1998). Elas são caracterizadas por sua morfologia e pela expressão de um conjunto de marcadores de membrana. Dentre as moléculas encontradas nas DCs podem ser citadas MHC de classe II, CD80, CD86 (revisto por Banchereau, Steinman, 1998) e a leucointegrina CD11c, a qual em humanos, é compartilhada com outros tipos celulares como monócitos e macrófagos (Ammon et al., 2000), por isso a caracterização de DCs humanas depende da análise conjunta de um *pool* de moléculas.

Embora a história natural destas células ainda seja motivo de debates na literatura (Naik et al., 2007), acredita-se que seus precursores estão distribuídos pelos tecidos não-linfoides, onde se desenvolvem atingindo o estágio de células dendríticas "imaturas" (Strunk et al., 1997). As DCs imaturas iniciam o processo de maturação após a ligação de diferentes mediadores em receptores celulares que reconhecem padrões moleculares associados ao "perigo" (DAMP – *danger-associated molecular patterns*) (revisto por Bianchi, 2007). 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, *Tumor Necrosis Factor-* α (TNF-α), IL-1 beta, *Interferons* (IFN) e outros mediadores inflamatórios (revisto por Philpott, Giradin, 2004). Após ativação, as DCs, agora maduras ou em processo de maturação, migram para os órgãos linfoides secundários (Saeki et al., 1999). Nesse estágio, as DCs apresentam pouca capacidade de capturar antígenos, no entanto

mostram-se muito eficazes na estimulação de linfócitos T, dando início à resposta imune (Cella et al., 1997). Este aumento da função imunoestimuladora está associado a mudanças nos níveis de expressão de moléculas co-estimuladoras, como as moléculas CD80, CD86 cujos níveis de expressão estão aumentados nas DCs maduras (Young et al., 1992) e as que estas células secretam, com capacidade de influenciar a ativação dos linfócitos, como a IL-12 (Cella et al., 1996).

A ativação dos linfócitos pelas DCs ocorre se a apresentação de antígeno acontecer no contexto apropriado. Via de regra, antígenos de origem exógena são apresentados a linfócitos T $CD4^+$ em um contexto de moléculas do MHC classe II e antígenos endógenos são apresentados a linfócitos T $CD8^+$ em um contexto de moléculas do MHC classe I. No entanto, as DCs são capazes de realizar a chamada apresentação cruzada, isto é, elas possuem uma maquinaria intracelular que as permite processar antígenos, como os de células infectadas por vírus ou de células tumorais fagocitadas e apresentá-los também no contexto de MHC de classe I (Segura et al., 2013).

Como visto, as DCs são células fundamentais no desencadeamento da resposta imune, o que não poderia ser diferente nos casos de tumor. Contra estes também, as DCs desempenham papel importante na indução da resposta, internalizando antígenos tumorais e estimulando resposta de linfócitos T tumor-específicos (Almand, et al., 2000). Entretanto, como se pode depreender do desenvolvimento de tumores em indivíduos imunocompetentes, no microambiente tumoral parece haver condições que impedem esta função imunoestimuladora das DCs, o que já foi frequentemente descrito (Della-Bella et al., 2003; Mami et al., 2008), inclusive por nosso laboratório (Baleeiro et al., 2008). Vale notar que não são apenas as DCs do microambiente tumoral que apresentam anormalidades (provavelmente derivadas de produtos secretados localmente pelas células tumorais ou por sua interação com as células tumorais), pois nosso laboratório tem demonstrado que defeitos semelhantes podem ser encontrados também em DCs derivadas *in vitro* de monócitos (mo-DCs) dos pacientes (Ferreira et al., 2010; Ramos et al., 2010).

Uma vez que se tem dados que mostram a deficiência funcional de DCs nos pacientes com câncer, o uso destas células, geradas *in vitro*, e, potencialmente com função preservada, torna-se uma estratégia interessante para indução de uma resposta imune anti-tumoral ativa nos pacientes. Trabalhos realizados por nosso

grupo evidenciaram que a vacina híbrida composta de células dendríticas alogenêicas e células tumorais foi capaz de gerar respostas clínicas satisfatórias (Barbuto et al., 2004, Barbuto et al., 2007), mesmo em pacientes em estado avançado da doença (Bergami-Santos et al., 2009).

Essas observações, assim como outras, reforçam a noção de que o desenvolvimento dos tumores num indivíduo previamente sadios depende, entre outros fatores, de padrões de resposta “inadequados” do sistema imune frente aos mesmos (Grulich et al., 2007). Sabe-se, na verdade, que além das alterações das DCs, os tumores se desenvolvem graças a sua capacidade de escapar da resposta imune, por vários mecanismos imunossupressores (Yu et al., 2013). No que se concerne as DCs, é possível que um processo anormal de diferenciação seja o fator que mais contribui para que a resposta imune antitumoral seja “defeituosa”, pois, uma vez que a célula se diferencie de maneira inadequada, o processo de maturação, e sua subsequente interação com os linfócitos T estarão, provavelmente comprometidos (Gabrilovich et al., 1996). Como possível consequência desta maturação afetada, o padrão de resposta dos linfócitos T ao tumor se modificaria e, de fato, foi mostrado que no ambiente tumoral há maior concentração de células T reguladoras (Ichihara et al., 2003). É relevante notar, porém, que não são as DCs as únicas células com papel na apresentação antigênica que se mostram afetadas nas neoplasias, onde, por exemplo, se encontra um grupo especial de macrófagos, os quais expressam a molécula de co-estímulo negativo B7-H4 (Kryczek, 2006, 2007).

Retornando às DCs, uma questão importante a ser elucidada é a causa de suas alterações nos indivíduos acometidos por um tumor. Há indícios de que o microambiente tumoral contribui para a geração das anormalidades nas DCs por meio de fatores solúveis ali produzidos. IL-10, IL-6, *Transforming Growth Factor β* (TGF-β) e *Vascular Endotelial Growth Factor* (VEGF) são exemplos de mediadores solúveis que são secretados em diferentes tipos de tumor e que levam à alterações das DCs, contribuindo para um ambiente de imunossupressão e facilitando o processo de evasão por parte do tumor (revisto por Bennaceur, 2009).

Entretanto, não são apenas os sinais extracelulares que determinam a função de uma célula num determinado microambiente, mas também sua maneira de “interpretar” tais sinais, isto é, sua maquinaria de recepção e transdução dos sinais extracelulares. Neste ponto, e considerando o que se sabe sobre o microambiente tumoral, vale citar uma família de moléculas com vários papéis na biologia tumoral:

as proteínas pertencentes à família STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). As moléculas da família STAT compõem vias de sinalização, que estão envolvidas em diversos processos celulares, como proliferação e diferenciação celular, sobrevivência e apoptose (revisto por Rawlings et al., 2004) e ocupam, também, papel relevante no surgimento e desenvolvimento das neoplasias (Zhang et al., 2002).

Dentre as STATs que se sabem alteradas no microambiente tumoral, chama a atenção a molécula STAT-3. Esta, superativada nas células tumorais, parece promover o crescimento tumoral (Ma et al., 2004) e, bloqueando a apoptose, conferir às células tumorais, quimio-resistência (revisto por Aggarwal et al., 2009). Também, através da indução de expressão de metaloproteinases (Xie et al., 2004, 2006), a STAT-3 parece estar envolvida na geração de metástases em modelo animal de melanoma. Por outro lado, mostrou-se que STAT-3 favorece a angiogênese no microambiente tumoral, aumentando os níveis de expressão de VEGF (Niu et al., 2002). Nas DCs esta molécula, cuja ativação pode ocorrer em resposta a IL-10, IL-6 ou VEGF, fatores secretados pelo tumores, a STAT-3 leva a um processo anormal de diferenciação, gerando células com perfil imaturo (Nefedova et al., 2004) e, portanto, incapazes de dar origem a uma resposta imune antitumoral eficaz.

Além dos produtos de secreção, os tumores podem afetar seu microambiente pelo contato célula-célula. Foi evidenciado que alguns tumores como o de mama (Ghebeh, 2007) e de pulmão (Konishi et al., 2004) expressam uma molécula chamada PD-L1/B7-H1, a qual parece estar associada a um mau prognóstico da doença (Hamanishi et al., 2007; Thompson et al., 2006), o que é coerente com a observação de que está molécula tem atividade imunossupressora, contribuindo, portanto, para o processo de evasão tumoral do sistema imune (Ansari et al., 2003; revisto por Dong, Chen, 2003). PD-L1, juntamente com PD-L2, faz parte da família B7, funcionando como ligante para o receptor de morte programada-1 (PD-1) existente nos linfócitos. A interação PD-1/PD-L1(B7-H1) deflagra um sinal intracelular que inibe, por diversos mecanismos, as respostas de linfócitos T (Parry et al., 2005).

Diversos tecidos normais expressam a molécula PD-L1 e, alguns, como placenta, coração, pulmão e fígado a expressam em altos níveis. Em contrapartida, são encontrados baixos níveis em linfonodos, timo e baço (revisto por Okasaki, Honjo, 2007). Além dos tecidos citados, B7-H1 também é encontrada em linfócitos

B, macrófagos e DCs (Yamazaki et al., 2002), onde participa do processo de imunomodulação, induzindo e mantendo o estado de anergia de linfócitos T (Selenko-Gebauer, 2003).

Da mesma forma, considerando os papéis conhecidos da STAT-3 na biologia tumoral, esta molécula é um alvo interessante de modulação (tanto no que concerne a célula tumoral diretamente – área em que se concentram as investigações, quanto em sua função nas DCs – área ainda pouco explorada). Como citado, uma das formas conhecidas pelas quais o microambiente tumoral diminui a eficácia funcional das DCs é pela secreção local de citocinas imunossupressoras como a IL-10. Não surpreendentemente, foi observado que, ao se bloquear o receptor de IL-10 e fornecer estímulos com oligonucleotídeos (CpG), a resposta antitumoral das DCs foi mais eficaz (Vicari, 2002).

Ora, ambas estas citocinas ativam, na DC, STAT-3, que por sua vez é responsável pela deficiência funcional destas células, que por sua vez, parece estar associada ao aumento da expressão de PD-L1 como observou Wölfle e colaboradores (2011). Num elegante estudo, estes pesquisadores sugerem que células dendríticas em estado precoce de diferenciação apresentam um perfil mais tolerogênico, que seria decorrente da expressão da molécula PD-L1. O estudo ainda sugere a possibilidade de haver uma forte relação entre essa alta expressão e a ativação do fator de transcrição STAT-3 (Wölfle, et al., 2011).

Assim, STAT-3, por ser capaz de levar à liberação de fatores solúveis como IL-10 e VEGF, capazes, por sua vez de induzir nas DCSa expressão de moléculas inibitórias como PD-L1, torna-se um alvo potencial de investigação e de intervenção para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas para o câncer. Estudos em modelo murino, evidenciaram a inibição de STAT-3 foi capaz, não só de restabelecer o processo de diferenciação, como também permitir a posterior ativação das DCs após estímulos convencionais (Nefedova et al., 2005a). Em modelo animal de tumor, a inibição de STAT-3 desencadeou uma resposta imune antitumoral mais completa e eficaz (Nefedova et al., 2005b).

Outra abordagem possível na imunoterapia é a busca de substâncias capazes de levar a uma ativação das DCs em portadores de neoplasias, sem se buscar, especificamente, modular uma via específica. Dentre esta, uma que mostrou, em determinados modelos, capacidade de modulação funcional das DCs foi o hormônio tímico denominado timosina alfa-1 (Tα1). Este é um peptídeo composto de 28

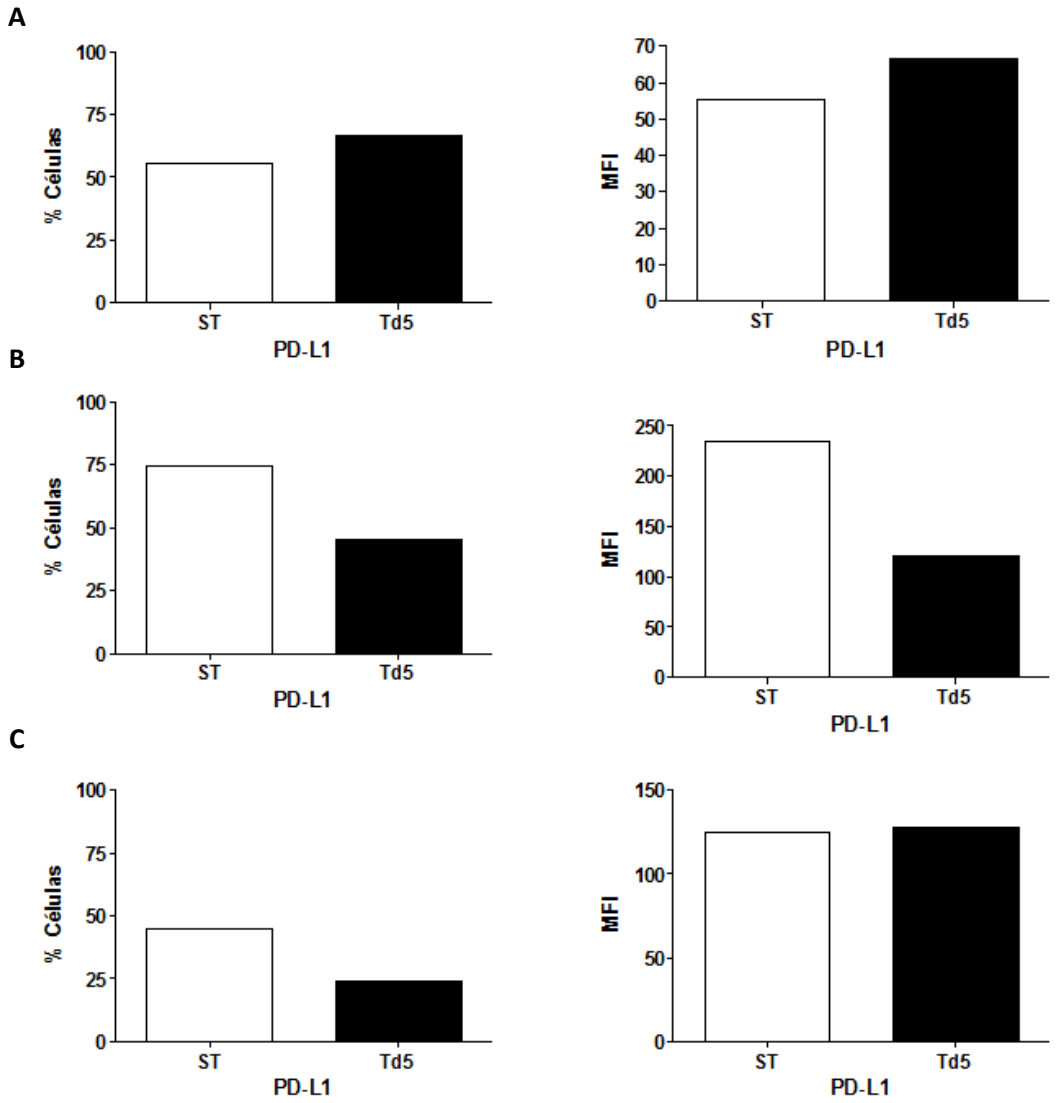
aminoácidos, derivado da protimosina alfa, isolado e sequenciado em 1977 por Goldstein e colaboradores (Goldstein et al., 1997). Considerado um composto biologicamente ativo, em virtude de seus efeitos em pacientes com doenças hepáticas, este peptídeo vem sendo utilizado em protocolos clínicos para tratamento de hepatite B e C (Revisto por Li et al., 2010). Além disso, a Tα1 também parece possuir potencial como agente antitumoral. Tal observação é decorrente do fato deste hormônio ser capaz de interferir no processo de proliferação e de crescimento de alguns tipos de câncer (Moody et al., 1993, 2002).

Entretanto, o que chama atenção para este hormônio tímico é sua propriedade imunomoduladora intrínseca. Esta propriedade despertou o interesse de avaliar o seu potencial imunomodulador em DCs. Neste aspecto, foram obtidos resultados, no mínimo, interessantes, pois dados da literatura mostram que Tα1 aparentemente foi capaz de modular tanto o processo de diferenciação e como o de ativação das DCs, levando ao aumento de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86), de CD40 e de moléculas do MHC de classe II. Tal modulação proporcionou aumento da capacidade imunoestimuladora das células tratadas com este hormônio (Huang et al., 2004; Romani et al., 2004; Yao et al., 2007).

Todavia, o mecanismo pelo qual Tα1 atua ainda é pouco esclarecido. Ao que consta na literatura, este hormônio aciona a via dos TLRs (Romani et al., 2006); há também descrição de que a ativação de macrófagos via Tα1 culmina na ativação de do *Nuclear Factor* – kB (NF-kB) e das *Mitogen Activated Protein Kinases (*MAPK): JNK e p-38 (Peng, 2007; Zhang et al., 2005).

Ensaios preliminares realizados por nosso grupo, mostraram que Tα1, fazendo jus a sua propriedade imunomoduladora, fez com que células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com câncer de mama tivessem seu perfil de expressão de moléculas de superfície alterado, afetando a expressão da molécula inibitória PD-L1 em ao menos dois dos três doadores testados (Figura 1).

Figura 1 – Avaliação fenotípica de mo-DCs tratadas ou não com Tα1 em termos de frequência e intensidade mediana de fluorescência.



Mo-DCs obtidas da diferenciação de monócitos de TRE pacientes com câncer de mama (A, B e C) foram tratados com Tα1 na concentração de 20,0µg/mL no 5º dia de cultura e incubados por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água. Após o período de cultura, as células foram marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. ST: Não tratado. Para cada condição foram analisados 10.000 eventos.

.

Diante destas observações, e da associação da ativação da STAT-3 com o aumento da expressão de PD-L1 em DCs, propusemo-nos a investigar a seguinte hipótese: a Tα1 interfere na ativação do fator de transcrição STAT-3 em mo-DCs e, por isto, tem o efeito imunoestimulador descrito.

2 OBJETIVO

O presente estudo visou investigar a capacidade potencial da timosina alfa-1 de interferir no processo de ativação do fator de transcrição STAT-3 em células dendríticas derivadas de monócitos.

Os objetivos primários do trabalho foram:

- Análise fenotípica de monócitos e mo-DCs de doadores saudáveis tratados ou não com timosina alfa-1, ou, como controle, com inibidor de STAT-3.

- Avaliação da capacidade aloestimuladora de mo-DCs de doadores saudáveis tratadas ou não com timosina alfa-1 ou, como controle, inibidor de STAT-3.

- Avaliação fenotípico-funcional de mo-DCs diferenciadas na presença de sobrenadante tumoral e tratadas com timosina alfa-1.

No decorrer do trabalho foram obtidos resultados surpreendentes com o inibidor de STAT-3, os quais levaram à formulação dos seguintes objetivos secundários:

- Avaliação da expressão de leucointegrinas em mo-DCs tratadas ou não com inibidor de STAT-3.

- Análise da expressão gênica de leucointegrinas em mo-DCs tratadas ou não com inibidor de STAT-3.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico

Para a obtenção de células mononucleares, cerca de 30 mL de sangue periférico foram coletados em tubo contendo heparina e transferidos para tubos plásticos cônicos de 50 mL, aos quais foram acrescentados, no fundo do tubo, 12 mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). O material foi centrifugado a 900 g por 30 minutos, a 18ºC. A camada de células mononucleares formada foi retirada, colocada em outro tubo juntamente com RPMI 1640 (Gibco, São Paulo, SP, Brasil) e centrifugada a 600g por 10 min. As células foram lavadas por mais 2 vezes a 300 g e 200 g, respectivamente, para eliminação das plaquetas. Após a última centrifugação, o sedimento celular foi coletado, as células quantificadas, ressuspendidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (R10) acrescido de antibiótico/antimicótico (100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 25 µg/ml anfotericina) e utilizadas para os ensaios de fenotipagem e co-cultura com linfócitos.

3.2 Obtenção de monócitos

As células mononucleares obtidas foram colocadas em placas de 24 poços na concentração de $3x10^6$ células/poço e mantidas a 37ºC com atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água por 2 horas. Após esse período, as células não-aderentes foram retiradas e congeladas a -80 ºC em meio criogênico (90% de SFB e 10% de DMSO) e as aderentes cultivadas em meio R-10.

3.3 Diferenciação das células mononucleadas em células dendríticas e ativação das células diferenciadas

As células mononucleares obtidas foram colocadas em placas de 24 poços na concentração de $3x10^6$ células/poço e mantidas a 37ºC com atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água em período *over-night*. Após esse período, as células não-aderentes foram retiradas e congeladas a -80 ºC em meio criogênico e as aderentes cultivadas por 5 dias em meio R-10 acrescido de 50 ng/mL de IL-4

(Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) e 50 ng/mL de GM-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA). Para a obtenção de células dendríticas maduras, foram adicionados 50 ng/mL de TNF-α (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) no quinto dia de cultura como estímulo de maturação. Após o período de cultura, as placas foram incubadas em gelo durante 10 minutos, para facilitar a retirada e coleta das células aderentes. Estas foram lavadas em meio RPMI e testadas quanto a sua viabilidade utilizando Azul de Trypan (0,4%).

3.4 Tratamento com timosina alfa 1

Monócitos e Mo-DCs foram plaqueados em uma concentração de $3x10^4$ células/poço em placa de 96 poços fundo em U. Estas células foram tratadas com o hormônio tímico, timosina alfa 1 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, Estados Unido) nas concentrações 200 ng/mL, 2 µg/mL e 20 µg/mL e ajustadas para um volume final de 300 µL. As células foram incubadas a 37ºC com atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água por 24 horas.

3.5 Tratamento com cucurbitacina I (JSI-124)

A cucurbitacina I é um eficiente e já bem estabelecido inibidor da ativação do fator de transcrição STAT-3 (Nefedova et al., 2005).

Monócitos e Mo-DCs foram plaqueados em uma concentração de $3x10^4$ células/poço em placa de 96 poços fundo em U. Estas células foram tratadas com o inibidor JSI-124 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, Estados Unido) diluída em DMSO nas concentrações 0,5 µM, 1,0 µM e 2,0 µM e ajustadas para um volume final de 300 µL. As células foram incubadas a 37ºC com atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água por 24 horas.

3.6 Ensaio de redução do MTT

A citotoxicidade do DMSO foi avaliada pela inibição da redução do MTT [3-(4,5-dimethyl-thyazol-2-yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide] a cristais de formazan, redução esta que é característica de células vivas. Os monócitos, as células dendríticas imaturas e as células dendríticas maduras foram retirados da placa de

cultura com meio RPMI gelado, ressuspendidos em R-10, contadas e ajustadas a uma concentração de $1x10^5$ células/poço em uma placa de 96 poços, com fundo em "U", na presença de diferentes concentrações de DMSO (0, 0,5%, 1,0%, 2,0% 5,0%, 10,0%). A placa foi incubada a 37ºC com atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água por 20 horas. Após este período, a placa foi submetida à centrifugação a 300g, por 10 minutos, à temperatura de 18°C. O meio, com a droga, foi retirado e 100 µL de R-10 foi reposto. Foram, então, adicionados 10 µL de MTT (5mg/mL), por poço. A placa foi incubada a 37ºC com atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água por 3 horas. Após este período, foram adicionados 100 µL /poço de SDS-HCl 0,01N (10% SDS e 90% HCl 0,01N), para solubilizar os cristais de formazan. A placa foi incubada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz *overnight.* Após este período, a densidade óptica (DO) foi determinada em espectrofotômetro (Versa MAX), com filtro de comprimento de onda de 550 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de citotoxicidade, segundo a fórmula: 100 – [(DO da amostra/DO controle) x 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.

3.7 Análise fenotípica das células

3×10^4 células monócitos ou mo-DCs diferenciados conforme itens anteriores foram coletados e transferidos para microtubos de 1,5 mL. As amostras foram centrifugadas/lavadas 3 vezes a 13000 rpm por 10 segundos em 200 µL de tampão para citometria (PBS suplementado com 0,5% soroalbumina bovina – BSA - e acrescido de 0,02% de azida sódica). O sobrenadante for descartado e ao sedimento obtido foram adicionados anticorpos específicos (Tabela 1) de cada marcação e após adição dos anticorpos as amostras foram incubadas por 20 minutos a 4ºC, ao abrigo da luz. Ao término da incubação, foram adicionadas à amostra 200 µL de PBS-BSA 0,5%, e foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 segundos. O sobrenadante foi dispensado, e o processo de lavagem repetido por duas vezes. Ao final da lavagem, o sobrenadante foi dispensado e a amostra ressuspendida em 200µL de PBS-BSA 0,5% formaldeído 2%. A leitura das células foi realizada em citômetro de fluxo FACS Canto II (BD - Biosciences), adquirindo 20.000 eventos totais por amostra. E para análise dos resultados foi utilizado o software Flow Jo versão 7.6.5 (Tree Star).

Tabela 1 – Marcadores utilizados na fenotipagem monócitos e mo-DCs.

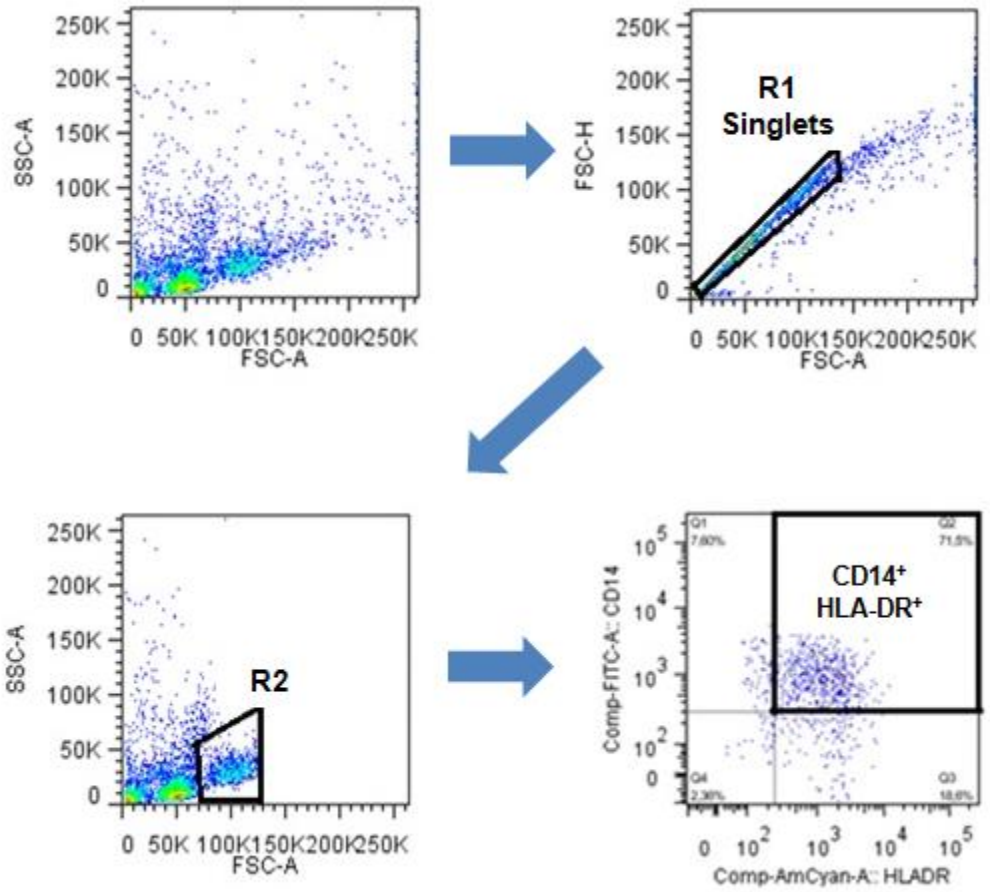
Marcador	Fluorocromo	Isotipo	Clone
CD14	FITC	IgG2a,k	MSE2
PD-L1 (CD274)	PE	IgG1,k	MIH1
CD80	APC-H7	IgG1,k	L307.4
CD86	PerCP-Cy5.5	IgG1,k	FUN-1
CD86	PE-Cy5	IgG1,k	FUN-1
CD11c	Horizon V450	IgG1,k	B-Ly6
HLA-DR	Horizon V500	IgG2a,k	G46-6
CD18	PE	IgG1,k	6.7
CD11a	PE	IgG1,k	HI111
CD11b	PE-Cy5	IgG1,k	ICRF44

Anticorpos foram adquiridos da empresa BD (Biosciences, San Jose, CA, USA).

3.8 Estratégia de análise

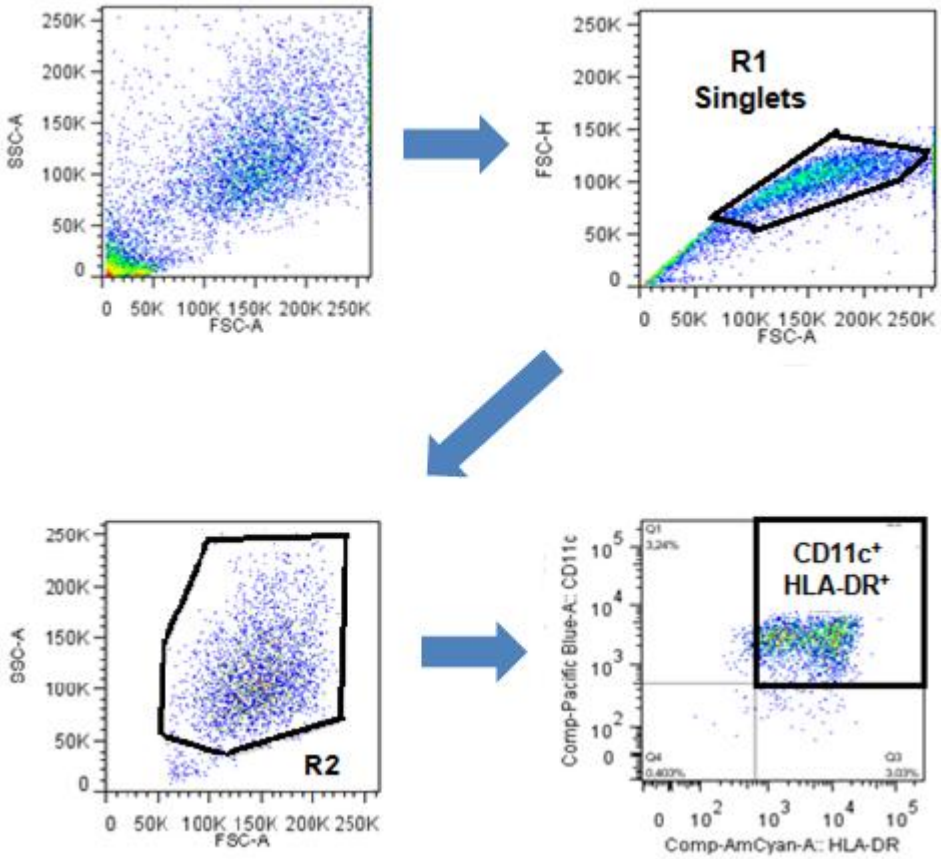
Após marcação, todas as amostras submetidas à citometria de fluxo foram analisadas segundo estratégia demonstrada nas figuras 2 e 3. Partindo-se do gráfico de tamanho *versus* granulosidade (FSC x SSC) foi feito o gráfico FSC-A x FSC-H, o qual permite a análise dos chamados *singlets*, localizados no *gate* R1. Sendo assim, a análise prosseguiu dentro do gate R2, o qual condiz com as características, morfo-estruturais de cada população a ser estudada. Para a análise de monócito (figura 2), a partir do *gate* R2 foi selecionada a população $CD14^{+}HLA\text{-}DR^{+}$. Já para a análise de mo-DCs (figura 3), a partir de R2 selecionou-se a população $CD11c^{+}HLA\text{-}DR^{+}$

Figura 2 – Estratégia de análise da população de monócitos.



Monócitos obtidos do sangue periférico, foram tratados com diferentes concentrações de Tα1 ou JSI-124 e incubados por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água. Após o período de cultura, as células foram marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. Para cada condição foram analisadas 10.000 células em R2.

Figura 3 – Estratégia de análise da população de mo-DCs.



Mo-DCs obtidas da diferenciação de monócitos, foram tratados com diferentes concentrações de Tα1 ou JSI-124 no 5º dia de cultura e incubados por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água. Após o período de cultura, as células foram marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. NT: Não tratado. n = 3. Para cada condição foram analisadas 10.000. NT: Não tratado. n = 3. Foram analisadas 10.000 células. RFI = MFI amostra/MFI não marcado.

3.8 Separação de células T CD3$^+$ para co-cultura

Nos experimentos de co-cultura, linfócitos provenientes de doadores saudáveis foram descongelados, contabilizados e lavados em PBS-BSA-EDTA (0,5% de BSA e 3mM de EDTA), e então enriquecidos com *beads* magnéticas (Miltenyi Biotec) anti-CD3 (separação da população total de linfócitos T) posteriormente magneticamente selecionadas por *MACS®-sorting* de acordo com as instruções do fabricante. Para análise da pureza das células isoladas, foi realizada citometria de fluxo após cada procedimento de separação celular considerando-se aceitável a pureza ≥ 95%.

3.10 Marcação dos linfócitos T com *carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE)

Os linfócitos T 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 a cada 1 x 10^{7} células com adição de 2µL de CFSE 5mM. As células foram incubadas a 37°C ao abrigo da luz por 10 minutos. 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 minutos. 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.

3.11 Avaliação da atividade estimuladora das DCs e da proliferação celular de linfócitos T

Na avaliação da capacidade estimuladora das células dendríticas geradas *in vitro*, DCs provenientes de indivíduos sadios foram co-cultivadas com linfócitos T CD3+ alogeneicos previamente corados por CFSE, na proporção 1 DC: 10 linfócitos T, em um volume final de 300 µL/poço (meio R10 suplementado com (100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 25 µg/ml anfotericina), cultivadas em placa de 96 poços em fundo “U”. As células foram mantidas por cinco dias em estufa com atmosfera contendo 5% de CO_2 e a 37ºC. Após os cinco dias de co-cultura, os linfócitos foram marcados com anticorpos de superfície anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e a diluição do CFSE foi avaliada por citometria de fluxo (FACS Canto II – BD - Biosciences). Os dados obtidos foram analisados usando-se o *software* FlowJo versão 7.6.5 (Three Star).

3.12 Imunoflorescência

Mo-DCs tratadas ou não com o inibidor JSI-124 (0,5µM) foram transferidas para uma placa de 24 poços contendo lamínulas previamente tratadas com poli-L-lisina a 0,5%. As células foram, então, fixadas com paraformaldeído 4% em PBS 1x por 20 minutos. Passado este tempo, as células foram lavadas com PBS 1x e submetidas a dois bloqueios sucessivos de 1 hora com PBS-BSA 1% e PBS-Glicina

1%. Feito isso, as células foram incubadas com anticorpo anti-CD11c conjugado com PE por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo, as lamínulas foram lavadas com PBS 1x, PBS-Tween 0,1% e água MilliQ. As lamínulas devidamente lavadas foram colocadas sobre lâminas contendo uma gota de Prolong^R, o qual apresenta em sua composição o corante DAPI que cora os núcleos das células.

3.13 Linhagens celulares

Células de adenocarcinoma de ovário da linhagem OVCAR-3 (Figura 2) foram cultivadas em meio RPMI suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (R-20) acrescido de antibiótico/antimicótico (100U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 25 µg/ml anfotericina). Estas células foram mantidas em estufa à 37ºC com 0,5% de CO_2.

Estas células foram gentilmente doadas pela Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz, pesquisadora do Departamento de Farmacologia e Toxicologia (DFT) pertencente ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade de Campinas (Unicamp).

Para os experimentos de detecção de p-STAT3 foram utilizadas como controle positivo a linhagem celular HeLa, derivada de carcinoma de colo de útero e que foram gentilmente doadas pela Profª Drª Ana Paula Lepique do departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo.

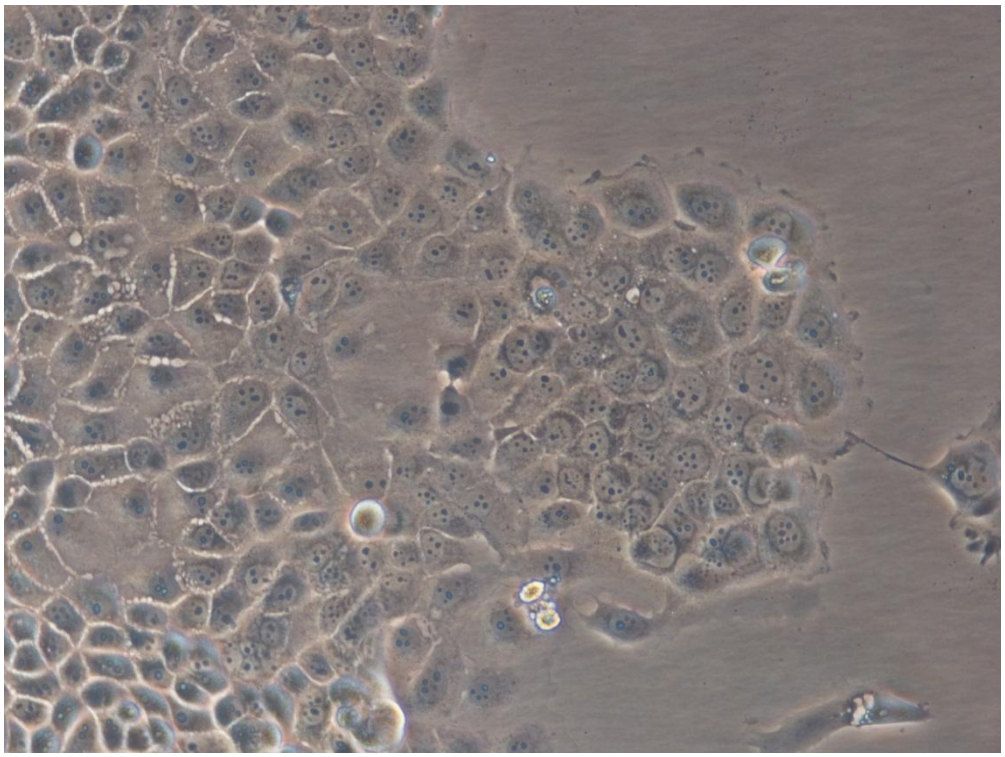
As células forma mantidas em cultura em meio R-10 na estufa de CO_2 a 37ºC até atingirem cerca de 90% de confluência. Então, foram deixadas em privação de nutrientes por cerca de 24h em meio RPMI. Após este período, elas foram tripsinizadas e contadas. Cerca de 1 x 10^6 células foram incubadas por 15 minutos com IFN-alfa (2000 U/mL) e depois submetidas ao protocolo de marcação descrito acima.

3.14 Curva de crescimento e coleta de sobrenadante

As células da linhagem OVCAR-3 foram cultivadas conforme citado acima, em placas de petri (Cell Star – Greiner Bio-One) por um período de 9 dias, partindo-se de uma quantidade de 1 x 10^5 células por placa. A cada dia de cultura, as células

eram tripsinizadas e contadas. Ao mesmo tempo, de outra cultura em paralelo, o sobrenadante correspondente a cada dia foi coletado e congelado em freezer -80ºC.

Figura 4 – Imagem da linhagem de adenocarcinoma de ovário OVCAR-3.



Células da linhagem OVCAR-3 ($1x10^5$ células) foram cultivadas em meio R20, durante 10 dias em placas de Petri e mantidas a 37ºC em estufa com atmosfera com 5% de CO_2 e saturadas de água. As imagens foram obtidas no momento em que a cultura atingisse 90% de confluência Imagem obtida em microscópio de luz invertido (Aumento 200x).

3.15 Cultura de Mo-DCs em meio condicionado

Monócitos obtidos segundo descrito acima, foram diferenciados em Mo-DCs na presença de sobrenadante tumoral. Foram utilizados os sobrenadantes correspondentes aos dias 1, 4, 6 e 8 da cultura de OVCAR-3 e a concentração utilizada foi de 20%. As Mo-DCs obtidas foram então fenotipadas.

3.16 Marcação intracelular de p-STAT3

Mo-iDCs tratadas ou não com JSI-124 foram submetidas à fixação com paraformaldeído 1% por 10 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas com PBS e em seguida foram permeabilizadas com metanol gelado 90%. Essas células foram marcadas com anticorpo primário anti-p-STAT3 (Tyr 705) (Cell

Signaling, Danver, MA, USA) e incubadas por 20 minutos a 4ºC. Após lavagem com PBS, essas células foram submetidas à marcação com anticorpo secundário anti rabbit conjugado ao fluorocroomo Alexa Fluor 647 (Cell Signaling, Danver, MA, USA) durante 20 minutos no gelo. Após lavagem com PBS as células foram ressuspendidas em tampão PBS-BSA 0,5% com formaldeído 2% e em seguida levadas para leitura no citômetro de fluxo.

3.17 Extração de RNA

Para extração de RNA, aproximadamente $1x10^6$ células foram coletadas e transferidas para um tubo de 1,5 mL e centrifugadas a 300g por 5 minutos a 4 ^oC. O sobrenadante foi descartado e adicionado 500 µL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, foram adicionados 100 µL de clorofórmio seguida de uma nova incubação de 2 minutos. Foi realizada uma nova centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 ^oC e o sobrenadante (parte aquosa) foi coletado e transferido para um novo tubo, em seguida foram adicionados 250 µL de isopropanol e as amostras foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi removido cuidadosamente. Em seguida, as amostras foram lavadas adicionando 500 µL de etanol 75% gelado e centrifugadas a 7.600g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado (esse procedimento foi realizado duas vezes). O precipitado foi ressuspendido em 30 µL de água livre de RNAse e DNAse. Foi realizada medida de absorbância das amostras em espectrofotômetro (Nanodrop 2000) em um comprimento de onda de 260/280 nm.

3.18 Síntese de cDNA

Um a três microgramas de RNA foram diluídos em 12 µL de água livre de RNAse e DNAse e colocados em tubos de 600 µL. Foi adicionado a essa solução 1 µL de oligo dT (500 µg/mL) e 1 µL de dNTPs (10 mM) e as amostras foram aquecidas a 75°C por 5 minutos seguido de um rápido resfriamento em gelo. Acrescentou-se em cada amostra 6 µL do MIX Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contendo: 4 µL de Tampão 5x; 1 µL de DTT 0,1 M e 1 µL Superscript R/T

III 200U/µL. As amostras foram incubadas a 50 °C por uma hora e a enzima foi inativada incubando-se a 70 °C por 15 minutos.

3.19 PCR quantitativo (qRT-PCR)

Os PCRs quantitativos foram realizados através da tecnologia TaqMan (Applied Biosystems). Para a reação foi necessário a preparação de um MIX contendo: 1 µL de primer/sonda 20x; 10 µL master mix 2x; de 1 a 100 ng de cDNA (com um volume final de até 4 µL) e q.s.p 20 µL de água livre de RNAse e DNAse. Após a preparação das amostras foi realizada a reação de PCR em um termociclador Stratagene 3000, com o seguinte ciclo: 2min/50°C, 10min/95°C e 40x (15 segundos/95°C + 1 min/60°C).

Os primers utilizados foram: *gapdh, β-actina, hprt-1, itgal, itgam, itgax* e *itgb2* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

3.20 Cálculo para expressão relativa

Para o cálculo da expressão relativa foi usado o método de Livak, que consiste em subtrair o Ct (*threshold cicle*) do gene de interesse pelo Ct do gene *housekeeping* no caso HPRT1, obtendo-se o ΔCt. Em seguida subtrai-se o ΔCt pelo ΔCt do gene cuja expressão relativa será considerada 1, obtendo-se então o $\Delta\Delta$Ct. Por fim, calcula-se o $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que representa quantas vezes o gene está aumentado ou diminuído.

3.21 Análise estatística

Foram empregados dois métodos de análise estatística, a Análise de Variância (ANOVA) com pós teste de Tukey para comparação entre diferentes grupos e teste T de Student para comparação entre dois grupos. Foi considerado estatisticamente significante $p<0,05$. Utilizou-se para as análises o software Graphpad Prism version 4.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da timosina Alfa–1 (Tα1) sobre fenótipo de células mononucleares aderentes (monócitos) e de mo-DCs

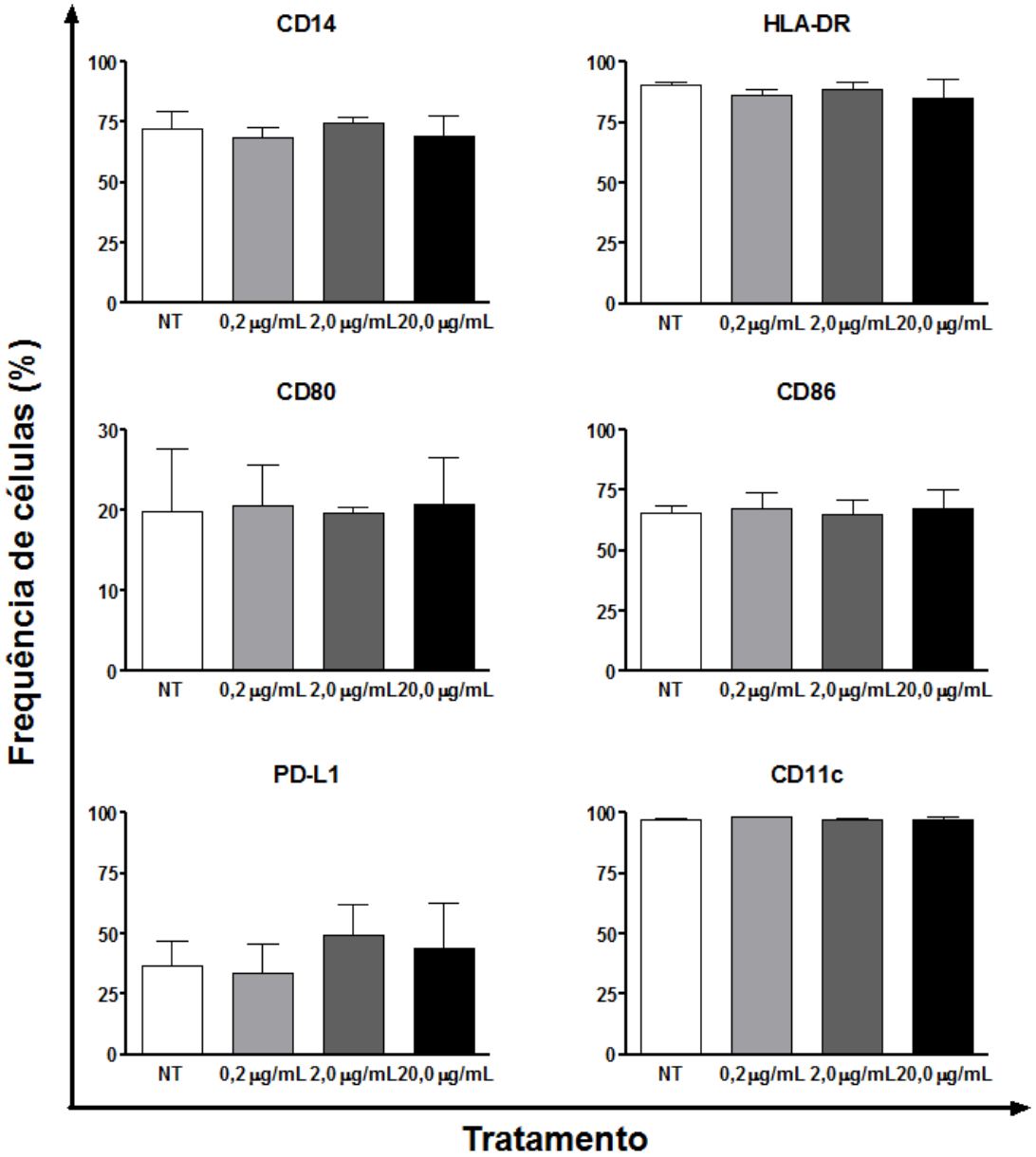
Embora o foco do trabalho esteja na investigação do potencial efeito da Tα1 sobre mo-DCs, sua ação frente a monócitos também é importante, uma vez que mo-DCs são provenientes de um processo de diferenciação a partir de monócitos.

A análise fenotípica desses dois tipos celulares foi realizada após tratamento com doses distintas de Tα1 (0,2 µg/mL, 2 µg/mL e 20 µg/mL), comparando esses grupos ao grupo não tratado. Após marcação com anticorpos anti-CD14, anti-CD274 (PD-L1), anti-CD11c, anti-CD80, anti-86 e HLA-DR, todas as amostras foram submetidas à citometria de fluxo e analisadas conforme estratégia de análise demonstrada em materiais e métodos (item 3.8)

Uma vez determinada a estratégia de análise, a avaliação dos marcadores de superfície mostrou que o tratamento com as diferentes doses de Tα1, por um período de 24h, não afetou significativamente as populações estudadas (Figuras 5, 6, 7 e 8).

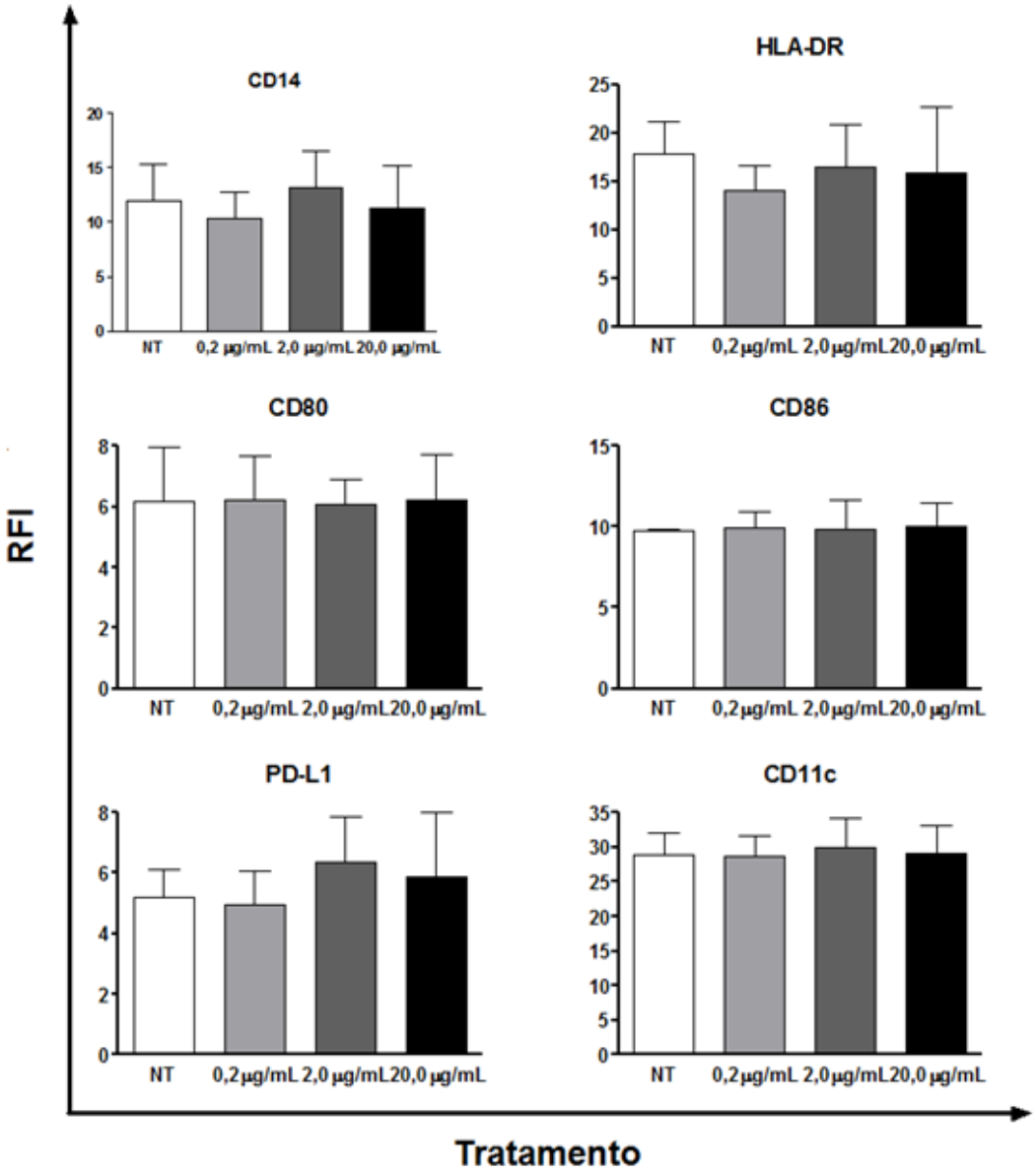
Quando se analisa a população de monócitos, observa-se que, embora não haja diferença estatística entre os grupos, a dose de 2,0 µg/mL promoveu um ligeiro aumento da frequência de células que expressam PD-L1 (Figura 5) bem como do nível de expressão das moléculas CD14 e PD-L1 (Figura 6) quando comparado ao grupo que não recebeu tratamento (NT).

Figura 5 – Frequência de monócitos expressando as moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c após tratamento com diferentes concentrações de Tα1.



Monócitos obtidos do sangue periférico, foram tratados com Tα1 em diferentes concentrações: 0,2 µg/mL, 2,0 µg/mL e 20,0 µg/mL e incubados por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água. Após este período de cultura, as células foram marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. NT: Não tratado. n = 3. Para cada condição foram analisados 10.000 eventos.

Figura 6 – Intensidade mediana de fluorescência relativa das moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c em monócitos tratados com diferentes concentrações de Tα1.



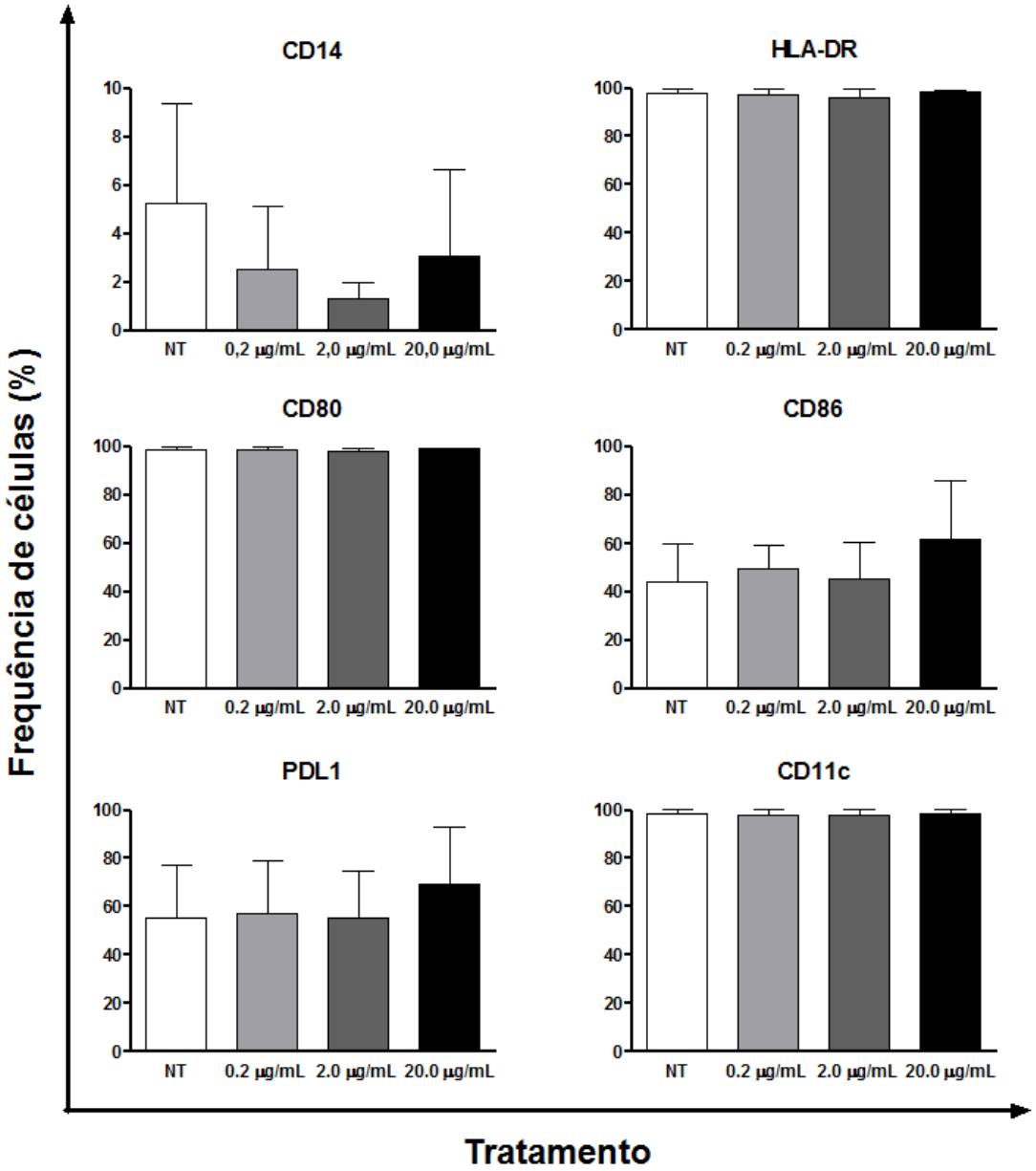
Monócitos obtidos do sangue periférico, foram tratados com Tα1 em diferentes concentrações: 0,2 µg/mL, 2,0 µg/mL e 20,0 µg/mL e incubados por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água. Após este período de cultura, as células foram marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. NT: Não tratado. n = 3. Para cada condição foram analisados 10.000 eventos. RFI = MFI amostra/MFI de controle não marcado.

Ao se analisar o perfil fenotípico de mo-DCs frente ao tratamento com Tα1, nota-se que ocorreu diminuição aparente na população que expressa CD14 em todas as doses avaliadas, sendo que para 2,0 µg/mL tal diminuição foi mais acentuada. Também foi observado que há uma leve tendência de aumento na população que expressa CD86, PD-L1 e HLA-DR na concentração de 20,0 µg/mL

assim como uma queda sutil, porém não significativa na expressão de CD80 na dose de 2,0 µg/mL (Figura 7).

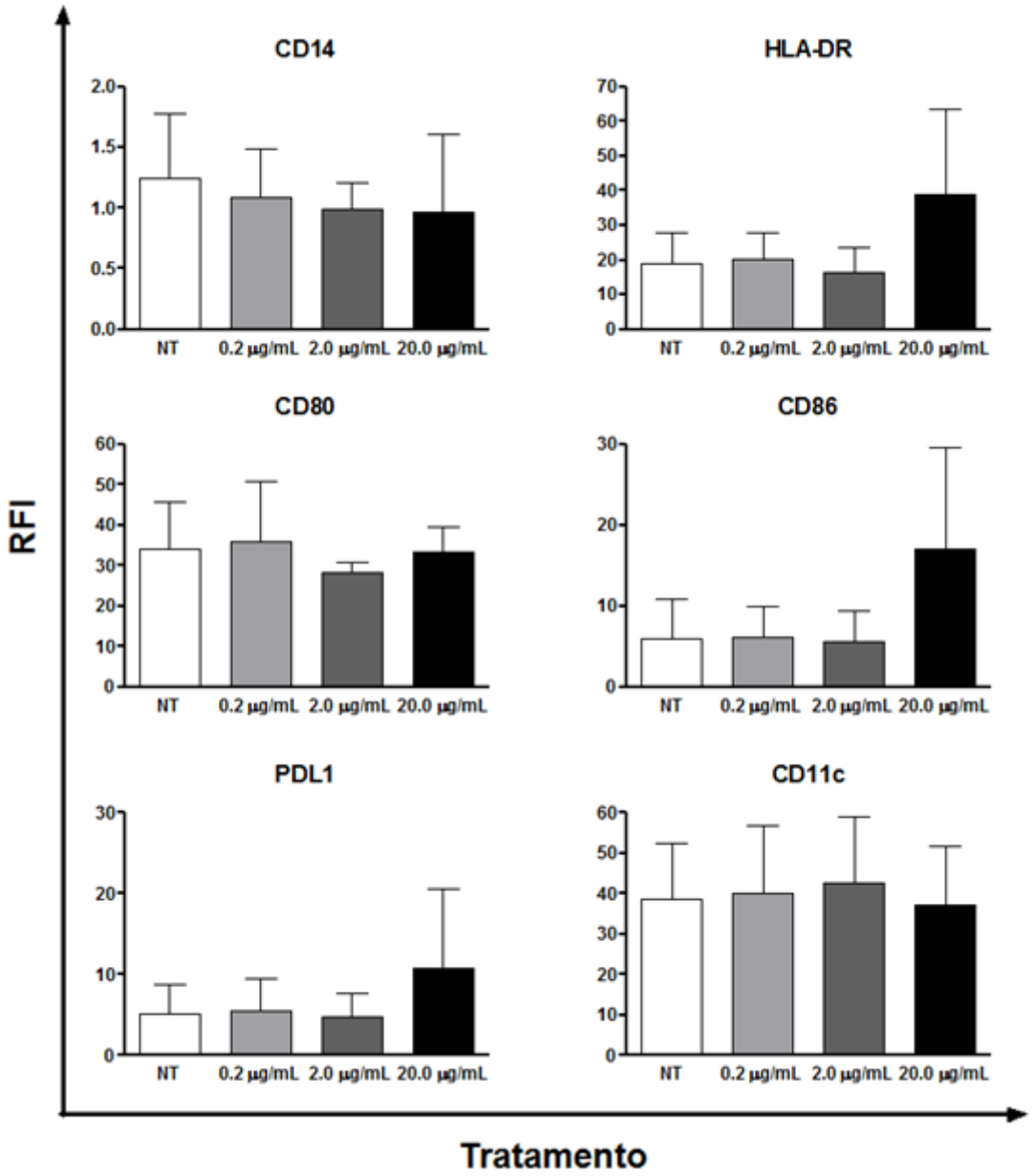
Em termos de nível de expressão, as mo-DCs mostraram aumento que não atingiu significância estatística da expressão das moléculas HLA-DR, CD86 e PDL1, quando tratadas com Tα1 na concentração de 20 □g/mL (Figura 8).

Figura 7 – Frequência de mo-DCs expressando as moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c após tratamento com diferentes concentrações de Tα1.



Mo-DCs tratados com Tα1 em diferentes concentrações: 0,2µg/mL, 2,0µg/mL e 20,0µg/mL no 5º dia de cultura e incubados por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água. Após o período de cultura, as células foram marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. NT: Não tratado. n = 3. Para cada condição foram analisados 10.000 eventos.

Figura 8 – Intensidade mediana de fluorescência relativa das moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c em mo-DCs tratados com diferentes concentrações de Tα1.

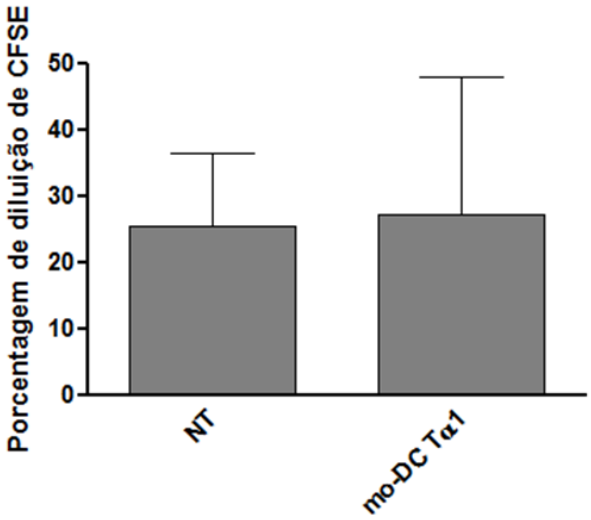


Mo-DCs foram tratados com Tα1 em diferentes concentrações: 0,2µg/mL, 2,0µg/mL e 20,0µg/mL no 5º dia de cultura e incubados por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água. Após o período de cultura, as células foram marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. NT: Não tratado. n = 3. Para cada condição foram analisados 10.000 eventos. NT: Não tratado. n = 3. Foram analisadas 10.000 células. RFI = MFI amostra/MFI de controle não marcado.

4.2 Avaliação da capacidade aloestimuladora de mo-DCs tratadas ou não com Tα1

A análise de diluição do CFSE em linfócitos T CD3$^+$ alogenêicos estimulados com mo-DCs, tratadas ou não com Tα1 mostrou que tal tratamento não afetou a capacidade das mo-DCs estimularem a resposta desses linfócitos (Figura 9). Embora a tendência de aumento d HLA-DR e de CD86 pudesse sugerir que mo-DCs tratadas com Tα1 devessem ter maior capacidade de estimular a proliferação de linfócitos, o aumento de PD-L1, também notado, poderia contrabalançar tal efeito.

Figura 9 – Diluição de CFSE em linfócitos T CD3$^+$ alogenêicos estimulados com mo-DCs tratadas ou não com Tα1.



Linfócitos T CD3$^+$ alogenêicos corados com CFSE foram cocultivados por 5 dias com mo-DCs obtidas da diferenciação de monócitos e tratadas ou não, por 24h com Tα1 na concentração de 20,0 µg/mL. Após os 5 dias de cocultura, os linfócitos foram analisados quanto à diluição do CFSE. n = 2. Para cada condição foram analisados 20.000 eventos.

4.3 Ação da Tα1 no fenótipo e na função de mo-DCs diferenciadas na presença de sobrenadante tumoral

Como observado nos resultados preliminares, Tα1 mostrou ser capaz de modular, mesmo que discretamente, a expressão de moléculas de superfície em mo-DCs. Sendo assim, foi avaliada a capacidade deste hormônio tímico de alterar o fenótipo de mo-DCs diferenciadas na presença de sobrenadante tumoral.

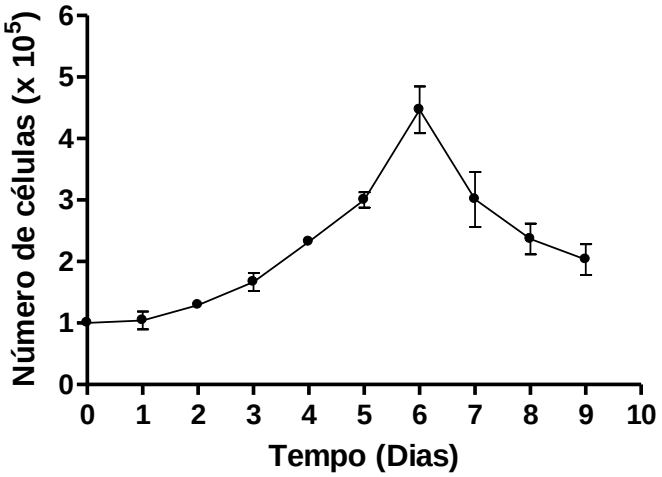
4.3.1 Cinética de crescimento linhagem celular OVCAR-3

Primeiramente, foi necessário estabelecer o melhor momento da cultura para coleta do sobrenadante. Então, foi construída uma curva de crescimento da linhagem tumoral de carcinoma de ovário, OVCAR-3. A escolha dessa linhagem

deve-se ao fato de que entre os tumores do trato genital feminino, o câncer de ovário ocupa o segundo lugar em mortalidade no mundo e o primeiro em países desenvolvidos como os EUA (Jemal et al., 2010).

Conforme mostra a figura 10, por volta do 2º dia de cultura as células iniciam a fase exponencial de crescimento, atingindo o pico no 6º de cultura. Baseado nesta curva, o 6º dia foi o escolhido para a coleta do sobrenadante.

Figura 10 – Crescimento da linhagem celular OVCAR-3 no decorrer do tempo.



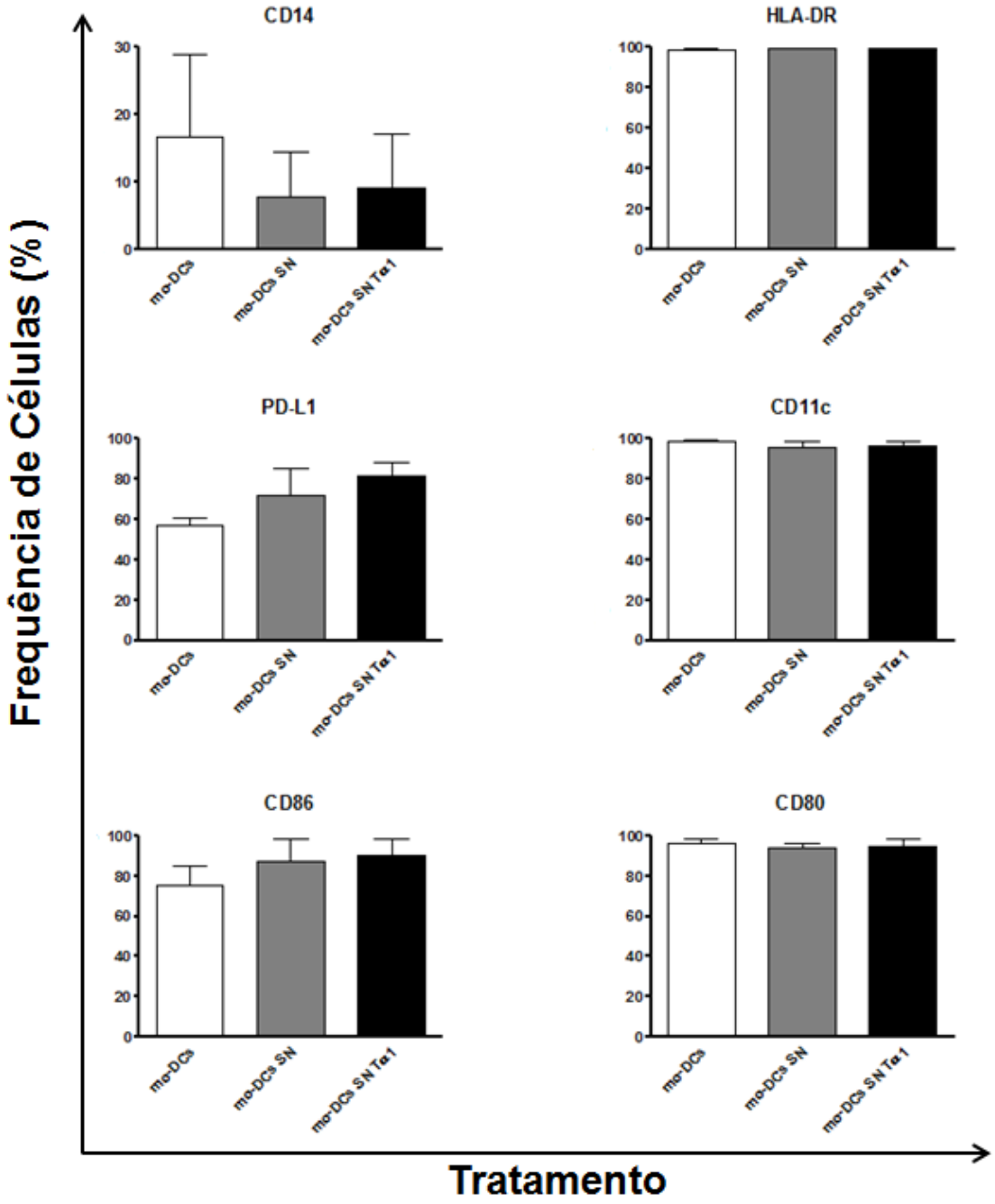
Células da linhagem OVCAR-3 ($1x10^5$ células) foram cultivadas em 10 placas de Petri, em meio R20 e mantidas a 37ºC em estufa com atmosfera com 5% de CO_2 e saturada de água. A cada dia de cultura, as células de uma das placas eram tripsinizadas, retiradas da placa, contadas e analisadas quanto à viabilidade por sua capacidade de excluir o azul de Trypan. Foram realizados 3 experimentos independentes. Cada ponto corresponde à média ± desvio padrão do número de células encontrado naquele dia de cultura.

4.3.2 Análise de marcadores de superfície em mo-DCs diferenciadas na presença de sobrenadante, tratadas ou não com Tα1.

Estabelecido o momento de coleta do sobrenadante tumoral, mo-DCs foram diferenciadas na presença deste sobrenadante e no 5º dia de cultura, foram tratadas com 20 αg/mL de Tα1 e incubadas em estufa de CO_2 por 24h.

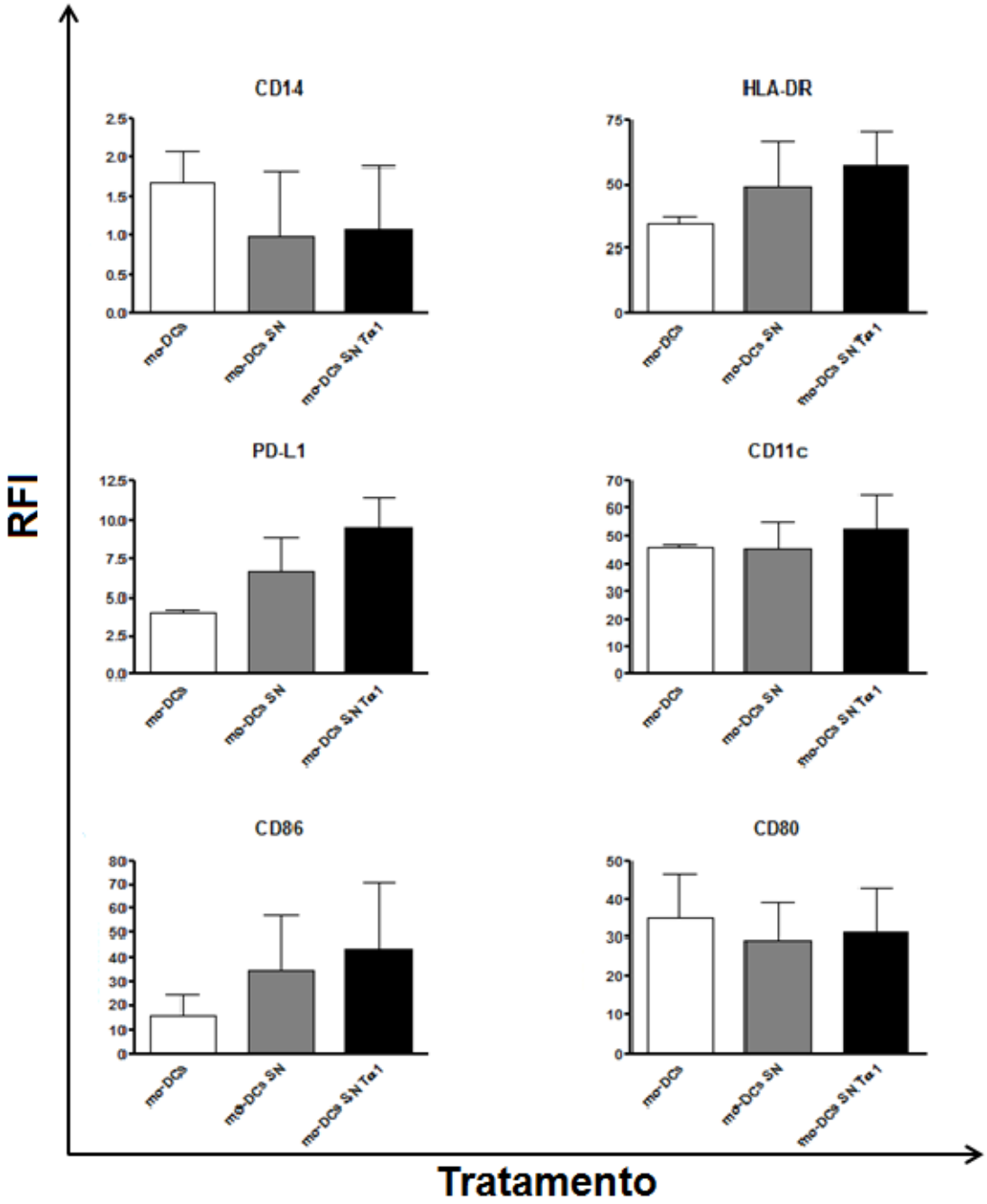
Após o período de incubação, as células foram marcadas e submetidas à citometria de fluxo. Os resultados obtidos na diferenciação de monócitos na presença de sobrenadante tumoral mostram que há um aparente aumento não só na frequência de células que expressam PD-L1, mas também no nível de expressão desta molécula (figuras 11 e 12).

Figura 11 – Efeito da Tα1 sobre a frequência de mo-DCs expressando as moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c após cultura na presença de sobrenadante tumoral.



Mo-DCs duferenciadas na presença de sobrenadante tumoral proveniente do 6º dia de cultura da linhagem celular OVCAR-3 foram tratadas com Tα1 na concentração de 20,0 µg/mL no 5º dia de cultura e incubados por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água. Após o período de cultura, as células foram marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. NT: Não tratado. n = 2. Para cada condição foram analisadas 10.000.

Figura 12 – Efeito da Tα1 sobre a intensidade mediana de fluorescência das moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c marcadores expressas por mo-DCs após cultura na presença de sobrenadante tumoral.



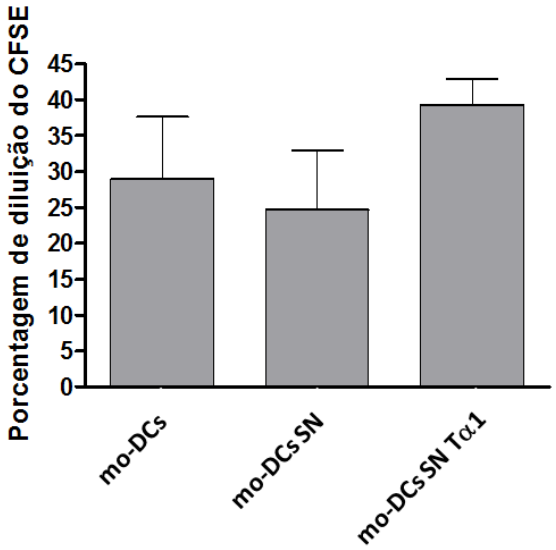
Mo-DCs diferenciadas na presença de sobrenadante tumoral proveniente do 6º dia de cultura da linhagem celular OVCAR-3 foram tratadas com Tα1 na concentração de 20,0 µg/mL no 5º dia de cultura e incubados por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água. Após o período de cultura, as células foram marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. NT: Não tratado. n = 2. Para cada condição foram analisados 10.000 eventos. RFI = MFI amostra/MFI de controle não marcado.

4.3.3 Avaliação da capacidade aloestimuladora de mo-DCs diferenciadas na presença de sobrenadante tumoral e tratadas ou não com Tα1

Após análise do efeito de Tα1 sobre a expressão de moléculas de superfície das mo-DCs diferenciadas na presença de sobrenadante tumoral, avaliou-se a capacidade aloestimuladora destas células. Para isto, as mo-DCs foram co-cultivadas por cinco dias com linfócitos $CD3^+$ corados com CFSE e, então, foi avaliada a diluição do CFSE.

A figura 13 mostra o efeito do sobrenadante na função das mo-DCs o qual é refletido na queda da proliferação dos linfócitos. Já o tratamento com Tα1 provocou uma recuperação da atividade aloestimuladora das mo-DCs diferenciadas em meio condicionado.

Figura 13 – Diluição de CFSE em linfócitos alogenêicos estimulados com mo-DCs na presença de sobrenadante tumoral e tratadas ou não com Tα1.



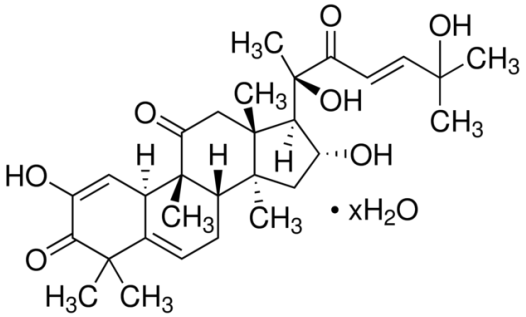
Linfócitos T $CD3^+$ alogenêicos corados com CFSE foram cocultivados com mo-DCs obtidas da diferenciação de monócitos, na presença de sobrenadante tumoral proveniente do 6º dia de cultura da linhagem celular OVCAR-3 e tratadas por 24h com Tα1 na concentração de 20,0 µg/mL no 5º dia de cultura. Após 5 dias de cocultura, os linfócitos foram analisados quanto à diluição do CFSE.. n = 2. Para cada condição foram analisadas 20.000.

4.4 Efeito da Cucurbitacina I (JSI-124) sobre fenótipo de células mononucleares aderentes (Monócitos) e Mo-DCs

4.4.1 Determinação da concentração de DMSO

A hipótese inicial do trabalho foi de que a ação da Tα1 sobre células dendríticas dependia de sua ação sobre a ativação do fator de transcrição STAT-3. Para realizar tal avaliação, foi necessário comparar a ação do hormônio tímico a de um inibidor já conhecido na literatura, a cucurbitacina I também chamada de JSI-124 (Blaskovich et al., 2003). JSI-124 tem caráter apolar (Figura 14), e por essa razão, para poder ser utilizada, deve ser diluída em dimetilsulfóxido (DMSO), o qual é tóxico para as células. Sendo assim, antes de iniciar os experimentos com o inibidor, foi realizado ensaio de citotoxicidade a fim de estabelecer a concentração de DMSO que fosse menos tóxica às células.

Figura 14 – Estrutura química do inibidor de STAT3, JSI-124.

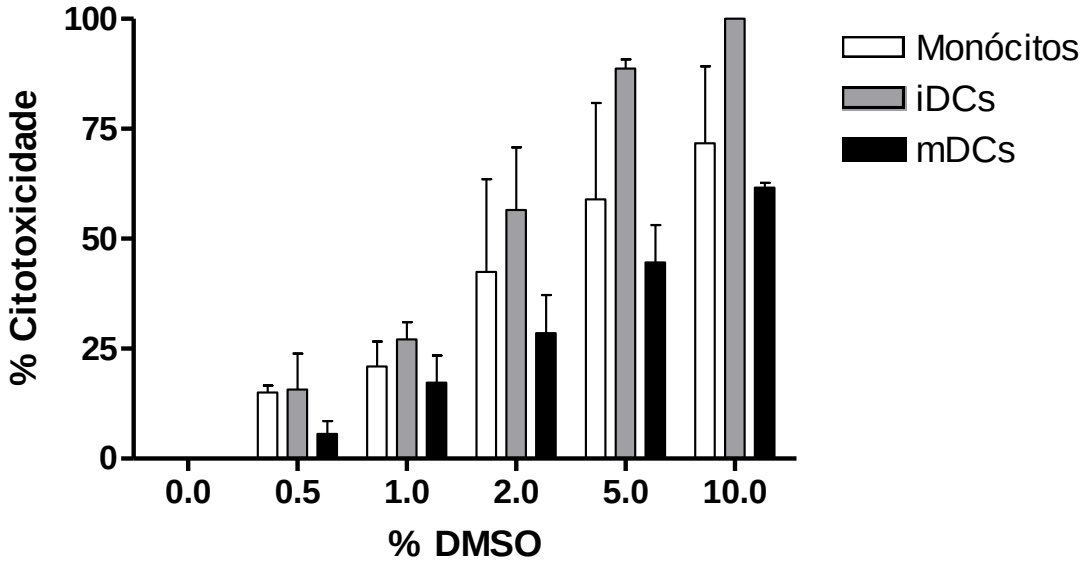


Fonte: Sigma, 2013.

Para este ensaio foi utilizada a técnica do MTT, que fornece uma medida indireta da citotoxicidade, baseando-se na capacidade de células de converter o MTT em cristais de formazam.

Os resultados mostram que na concentração de 0,5% de DMSO a porcentagem de citotoxicidade é em média de 10 - 12% (Figura 15), por essa razão, optou-se por diluir o inibidor JSI-124 de tal modo que a concentração final de tratamento fosse menor que 0,5% garantindo assim a viabilidade das células. Além disso, pode-se observar que há diferença entre as células estudadas no que diz respeito à sensibilidade frente ao DMSO sendo que as células dendríticas imaturas parecem ser mais sensíveis ao solvente, enquanto as células dendríticas maduras parecem ser as mais resistentes (Figura 15).

Figura 15 – Citotoxicidade do DMSO para monócitos e células dendríticas.



Células do sangue mononucleares aderentes (monócitos), células dendríticas imaturas (5ºdia de diferenciação) e as células dendríticas maduras (2º dia após estímulo com TNF) foram tratadas com diferentes concentrações de DMSO. Após 24 horas de incubação em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água, a citotoxicidade foi determinada, por ensaio colorimétrico, utilizando MTT. A densidade óptica (DO) foi determinada em espectrofotômetro a 550 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de citotoxicidade, segundo a fórmula: 100 – [(DO da amostra/DO controle) x 100].

4.4.2 Análise fenotípica de monócitos e mo-DCs após tratamento com JSI-124

Uma vez determinada a concentração de inibidor que deveria ser utilizada, foram conduzidos ensaios de citometria de fluxo, empregando-se a mesma estratégia de análise. Monócitos e mo-DCs foram tratados com diferentes concentrações de JSI-124 (0,5 µM, 1 µM e 2 µM), IL-6 (100 ng/mL) e PMA (40 nM) como controles de ativação de STAT-3 e comparados com o grupo sem tratamento, o qual continha meio de cultura (R10) acrescido de 0,01% de DMSO (Meio).

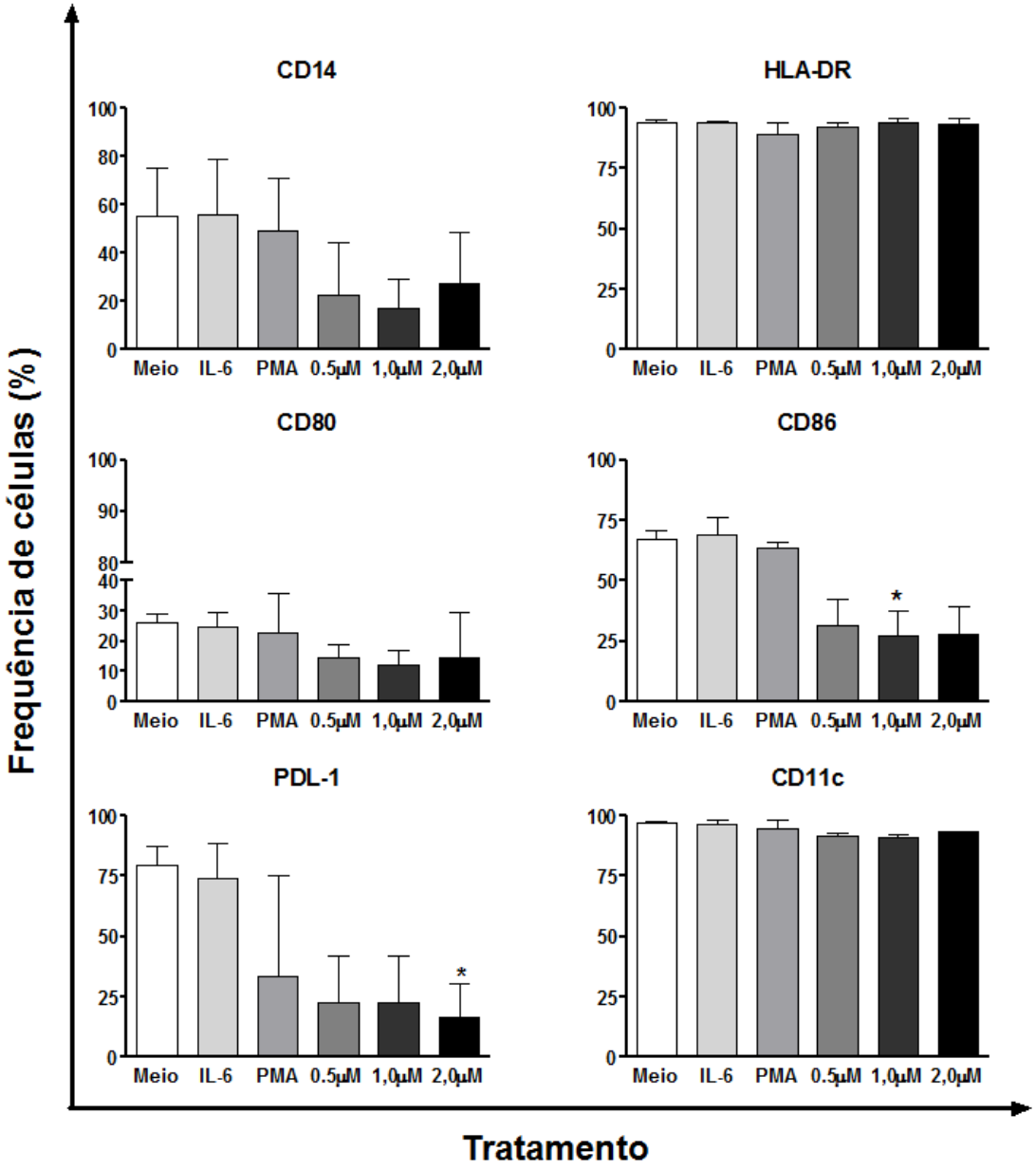
Os resultados mostram que o tratamento foi capaz de modular a expressão dos marcadores de superfície das células estudadas tanto em termos de frequência de células como em intensidade de expressão (Figuras 16, 17, 18 e 19).

Analisando-se a população de monócitos quanto à frequência de expressão dos marcadores, nota-se que houve uma queda na frequência de células que expressam CD86 e PD-L1, sendo significativa a diferença para as doses de 1,0 µM e 2,0 µM do inibidor, respectivamente. Também foi observada queda aparente na

população de monócitos que expressa CD14 e CD80. Para as demais moléculas não houve modulação (Figura 16).

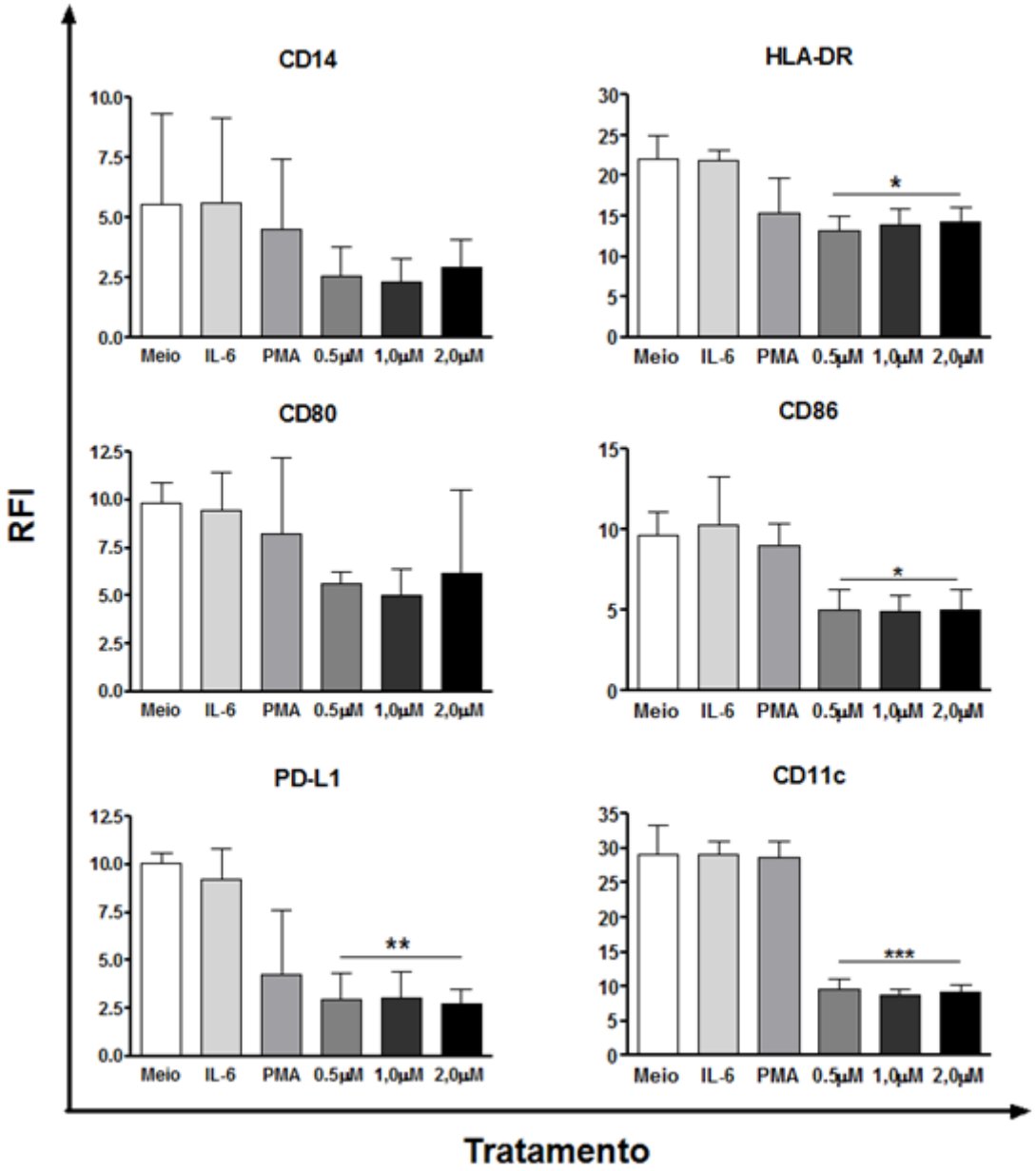
Já avaliação do nível de expressão das moléculas de superfície nos monócitos tratados com o inibidor mostrou que houve tendência de queda de CD14 e CD80 e diminuição significativa da expressão de HLA-DR, CD86, PD-L1 e CD11c. É intrigante notar que estes efeitos ocorreram independentemente da concentração de inibidor utilizada (Figura 17).

Figura 16 – Frequência de monócitos expressando as moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c após tratamento com diferentes concentrações de JSI-124.



Monócitos obtidos do sangue periférico foram tratados com JSI-124 em diferentes concentrações: 0,5 µM, 1 µM e 2 µM e incubados por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água. Após o período de cultura, controles foram incubados com IL-6 (100 ng/mL) ou com PMA (40 nM) por 15 min, a 37ºC. As células, então, foram marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. Meio = R10 + 0,01% de DMSO. Para cada condição foram analisadas 10.000. n = 3. * $p<0,05$ em relação ao grupo meio.

Figura 17 – Intensidade mediana de fluorescência relativa das moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c em monócitos tratados com diferentes concentrações de JSI-124.

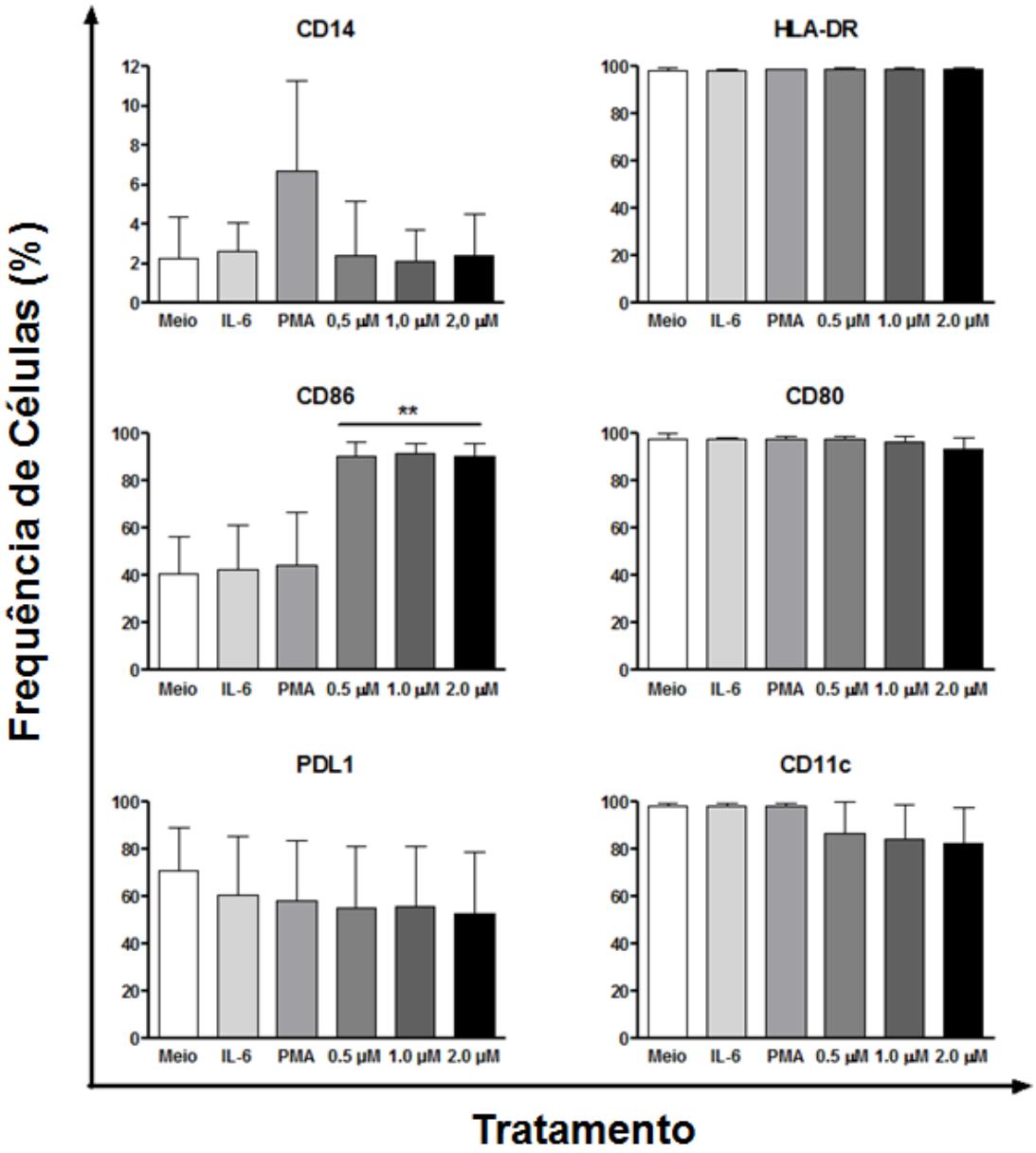


Monócitos obtidos do sangue periférico foram tratados com JSI-124 em diferentes concentrações: 0,5 µM, 1 µM e 2 µM e incubados por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água. Após o período de cultura controles foram incubados com IL-6 (100 ng/mL) ou com PMA (40 nM) por 15 min, a 37ºC. As células, então, marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. Meio = R10 + 0,01% de DMSO. Para cada condição foram analisadas 10.000. n = 3. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ e *** $p<0,001$ em relação ao grupo meio.

Já ação do inibidor JSI-124 nas mo-DCs foi distinta da observada em monócitos. Observa-se que o tratamento com JSI-124 proporcionou aumento na frequência de mo-DCs que expressam CD86, independentemente da concentração utilizada. Da mesma forma, nota-se aparente diminuição da população que expressa

a molécula PD-L1. Para os demais marcadores de superfície estudados não houve alteração (Figura 18).

Figura 18 – Frequência de mo-DCs expressando as moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c após tratamento com JSI-124.



Mo-DCs foram tratados com JSI-124 em diferentes concentrações: 0,5 µM, 1 µM e 2 µM no 5º dia de cultura e incubados por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água. Após o período de cultura, controles foram incubados com IL-6 (100 ng/mL) ou com PMA (40 nM) por 15 min, a 37ºC. As células, então, foram marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. Meio = R10 + 0,01% de DMSO. Para cada condição foram analisadas 10.000. n = 3. ** $p<0,01$ em relação ao grupo meio.

A avaliação das mo-DCs em termos de expressão de moléculas de superfície mostra que ocorreu aumento dos níveis de HLA-DR, de CD86, independente da

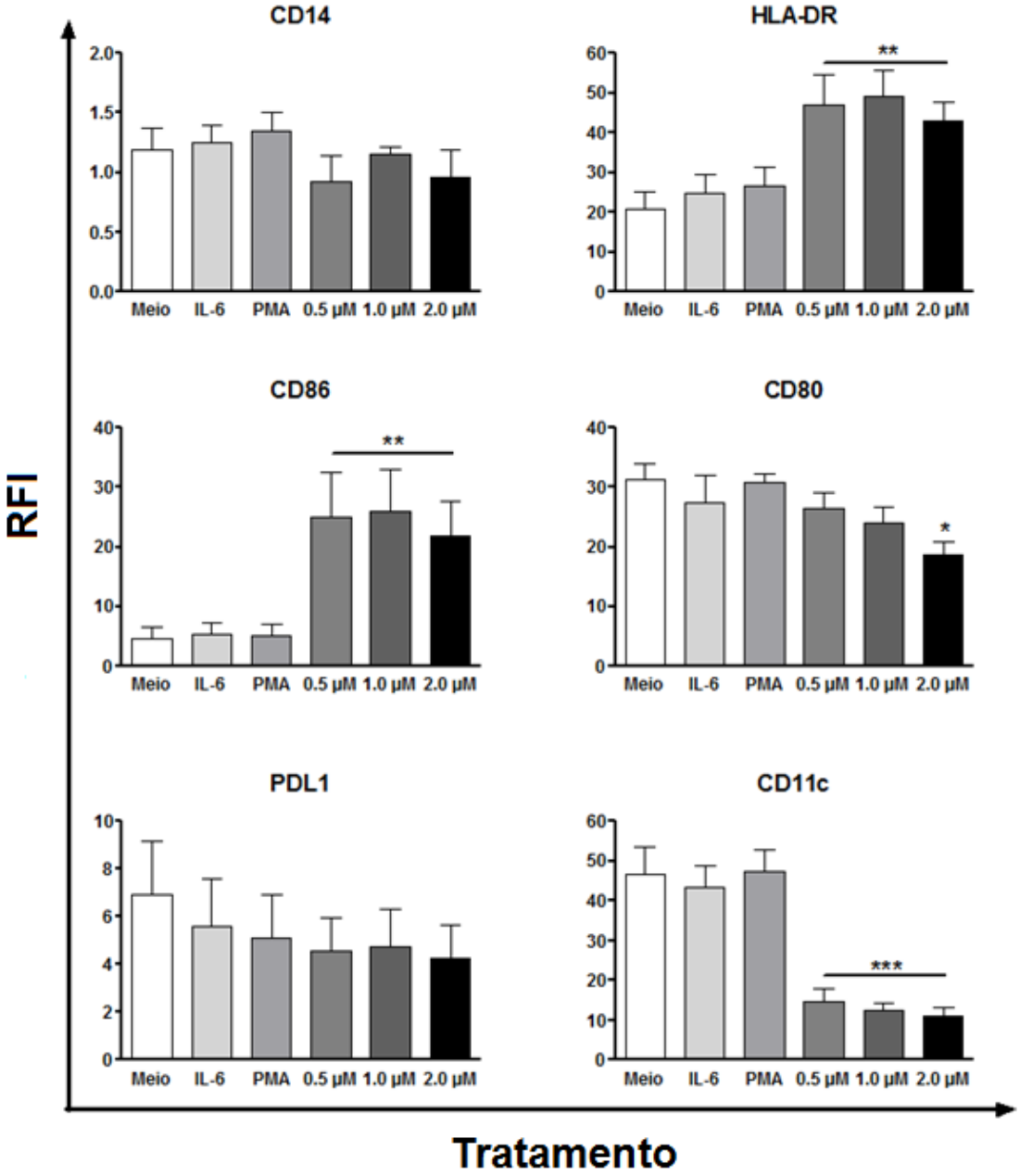
dose de inibidor utilizada. Houve também diminuição de CD11c, não importando a dose utilizada, de CD80 para dose de 2,0µM e aparente queda de expressão de PD-L1 (Figura 19).

Os resultados mostram, portanto, que o fenótipo das células tratadas com JSI-124 diferem daquele encontrado nas mesmas células tratadas com Tα1, indicando assim que o hormônio tímico não parece interferir, nas condições testadas, na ativação do fator de transcrição STAT-3.

Por outro lado, a inibição de STAT-3 por JSI-124 em células dendríticas gerou resultados intrigantes, principalmente quando se considera o aumento CD86, a aparente queda de PD-L1 e a diminuição da expressão de CD11c nas mo-DCs. Vale notar que os resultados do mesmo tratamento sobre monócitos também foram intrigantes, mas não foram investigados no presente trabalho.

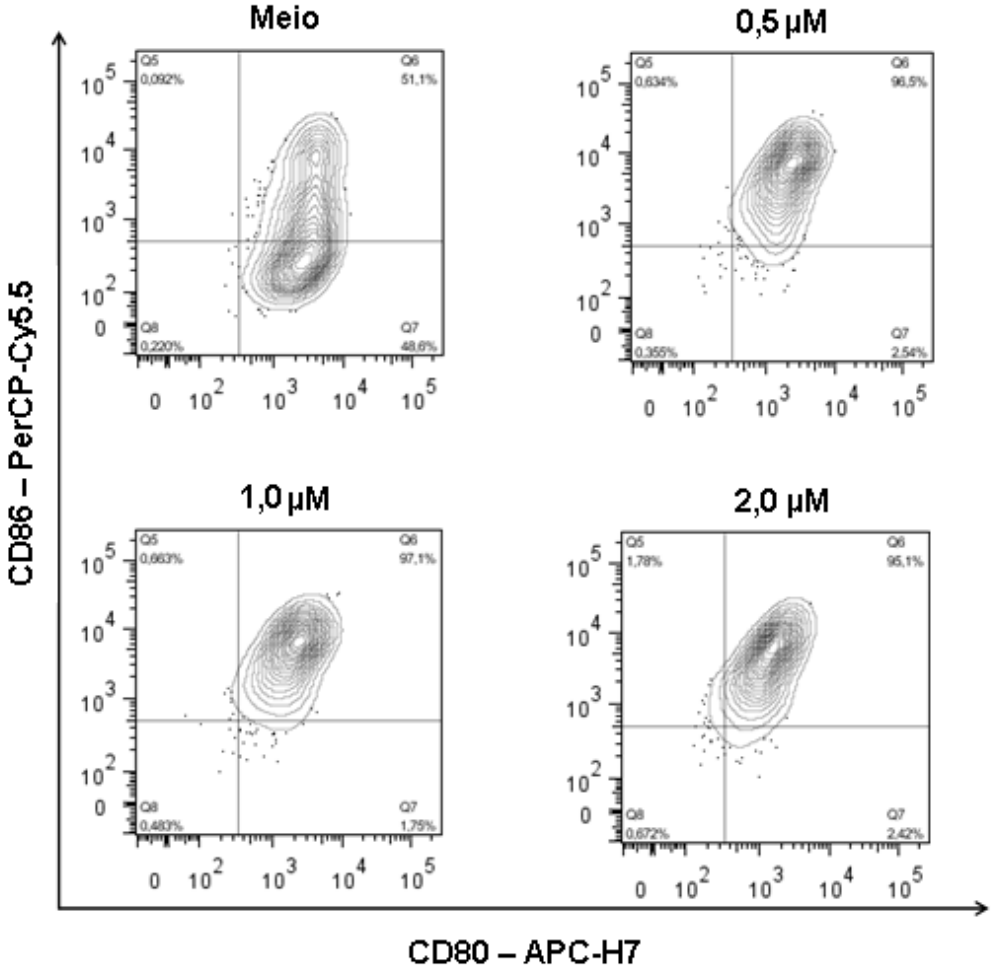
Para análise da expressão de CD86, construíram-se gráficos mostrando simultaneamente, a expressão de CD80 e CD86 (figura 20). Observa-se que para o grupo sem tratamento há duas populações de células, uma exclusivamente $CD80^+$ e outra $CD80^+CD86^+$. Após o tratamento com JSI-124, há, quase que exclusivamente, uma única população, a qual expressa as duas moléculas (Figura 20).

Figura 19 – Intensidade mediana de fluorescência relativa das moléculas CD14, HLA-DR, CD80, CD86, PD-L1 e CD11c em mo-DCs tratados com diferentes concentrações de JSI-124.



Mo-DCs, foram tratados com JSI-124 em diferentes concentrações: 0,5 µM, 1 µM e 2 µM no 5º dia de cultura e incubados por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água. Após o período cultura, controles foram incubados com IL-6 (100 ng/mL) ou com PMA (40 nM) por 15 min, a 37ºC. As células, então, foram marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. Meio = R10 + 0,01% de DMSO. Para cada condição foram analisadas 10.000. n = 3. * $p<0,05$ e ***$p<0,001$ em relação ao grupo meio.

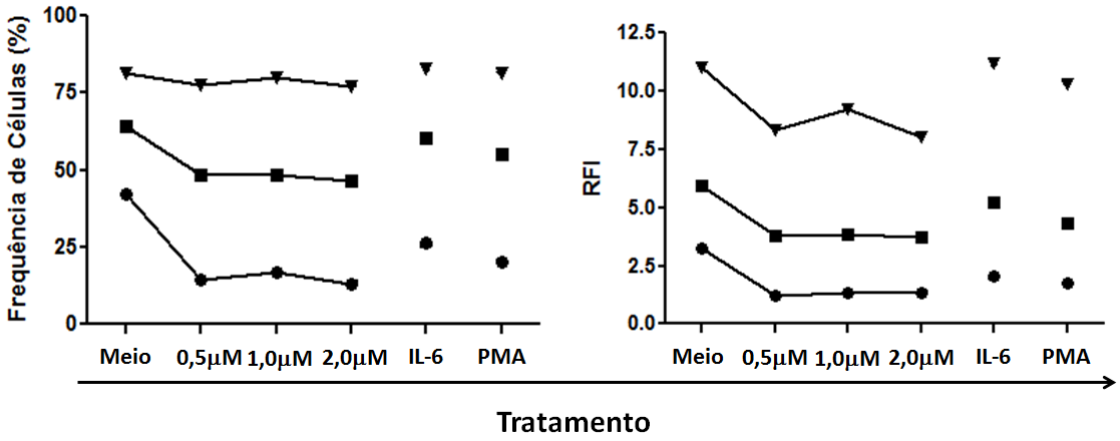
Figura 20 – Expressão de CD80 e CD86 por mo-DCs antes e após o tratamento com JSI-124 em diferentes concentrações.



Mo-DCs foram tratadas com JSI-124 em diferentes concentrações: 0,5 µM, 1 µM e 2 µM no 5º dia de cultura e incubadas por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água. Após o período de cultura, as células foram marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. Meio = R10 + 0,01% de DMSO. Para cada condição foram analisadas 10.000. Este gráfico é representativo de três experimentos independentes, que geraram resultados semelhantes.

Ao se analisarem os dados referentes à molécula PD-L1, observa-se tendência de queda, tanto na frequência de população que a expressa como nos níveis de expressão. Dados da literatura sugerem que a expressão de PD-L1 está relacionada à ativação de STAT-3 (Wölfle, et al., 2011), portanto, era de se esperar que a inibição desse fator de transcrição resultasse na diminuição da expressão de PD-L1. Analisando cada doador separadamente, observa-se que tal fenômeno é mantido (Figura 21), o que está, portanto, de acordo com os dados da literatura.

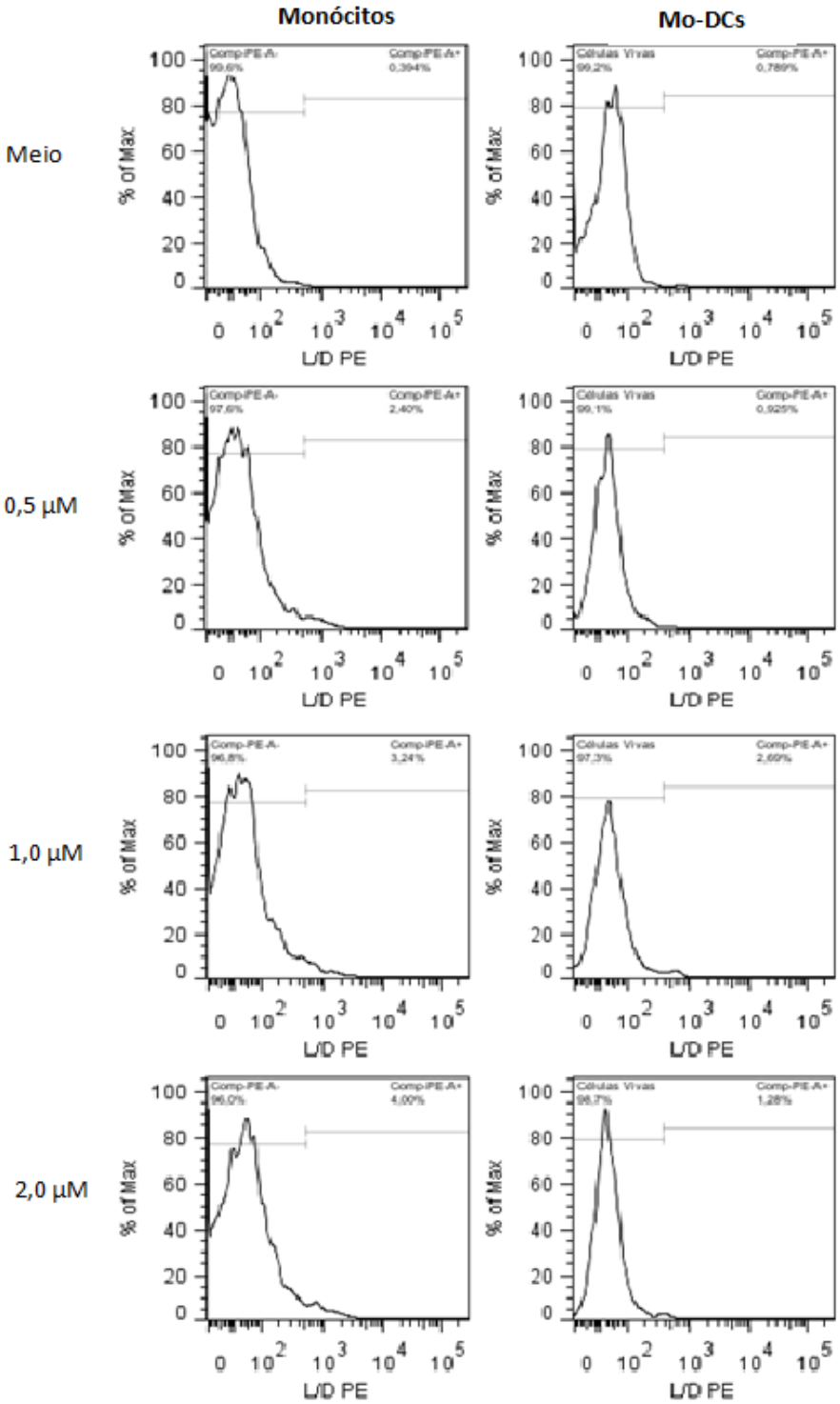
Figura 21 – Análise da expressão individual de PD-L1 em mo-DCs.



Mo-DCs foram tratados com JSI-124 em diferentes concentrações: 0,5 µM, 1 µM e 2 µM no 5º dia de cultura e incubados por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de umidade. As células foram marcadas e analisadas por citometria de fluxo. Cada símbolo representa um doador diferente. Meio: R10 + 0,01% de DMSO. n = 3. Foram analisadas 10.000 células por condição.

A queda dos marcadores tanto em monócitos como em Mo-DCs levanta a dúvida se o inibidor JSI-124 ao invés de modular a expressão das moléculas, estaria matando as células. Para elucidar essa questão, foi realizada uma marcação para verificar a morte das células. Monócitos e Mo-DCs foram marcados com corante para células mortas do kit *Live/Dead* (Invitrogen) e analisadas por citometria de fluxo. As células tratadas com as diferentes concentrações de JSI-124 (e não tratadas) foram avaliadas para à marcação com o corante. Como observado pela figura 22, a morte celular não parece explicar os efeitos do JSI-124; a porcentagem de células mortas, mesmo sendo dose-dependente no caso dos monócitos, não ultrapassou 4% (2µM) e, para as Mo-DCs, mais resistentes à droga, o máximo de morte alcançado foi 2,69% (1,0µM).

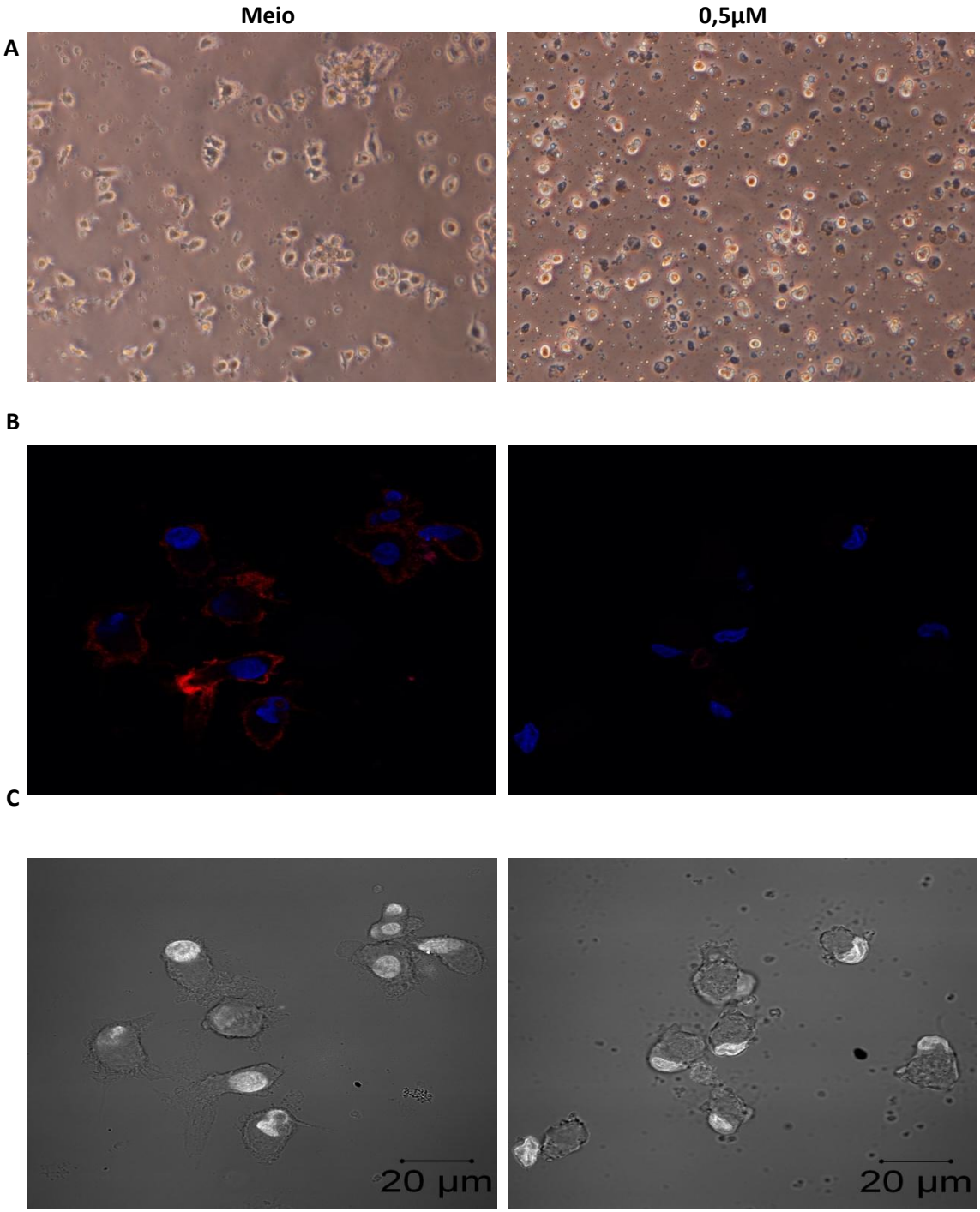
Figura 22 – Viabilidade de mo-DCs e monócitos tratados com JSI-124.



Monócitos e mo-DCs foram tratados com JSI-124 em diferentes concentrações: 0,5 µM, 1 µM e 2 µM no 5º dia de cultura e incubados por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água. As células foram marcadas e avaliadas quanto a viabilidade, por citometria de fluxo. Meio: R-10 + 0,01% de DMSO. Este gráfico é representativo de três experimentos independentes, que geraram resultados semelhantes. Foram analisadas 10.000 células/condição.

Como mostrado anteriormente, mo-Dcs tratadas com o inibidor JSI-124 mostraram queda surpreendente na expressão de CD11c. Para confirmar tal fenômeno, foi realizada imunofluorescência dessas células, e como visto na figura 23B, praticamente não se detecta expressão de CD11c após o tratamento com JSI-124 (0,5µM). Notam-se também alterações morfológicas após o tratamento com o inibidor de STAT3 (Figuras 23A e 23C). Na imagem de microscopia de luz (Figura 23A) observa-se que as células submetidas ao tratamento mostram-se mais arredondadas dando a impressão de estar menos aderidas à placa.

Figura 23 – Imagens de mo-DCs antes e após tratamento com 0,5µM de JSI-124.



Mo-DCs foram tratados com JSI-124 na concentração de 0,5 µM no 5º dia de cultura e incubados por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água. (A) Imagens de contraste de fase em microscópio de luz invertido (Aumento de 100x). (B) Imagens mostrando marcação de CD11c em vermelho. (Objetiva de 63x (1,4NA) em óleo de imersão); azul: DAPI. (C) Imagens de mo-DCs em maior aumento (objetiva de 63x (1,4NA) em óleo de imersão) em contraste de fase evidenciando a morfologia das células .Meio: R10 + 0,01% de DMSO.

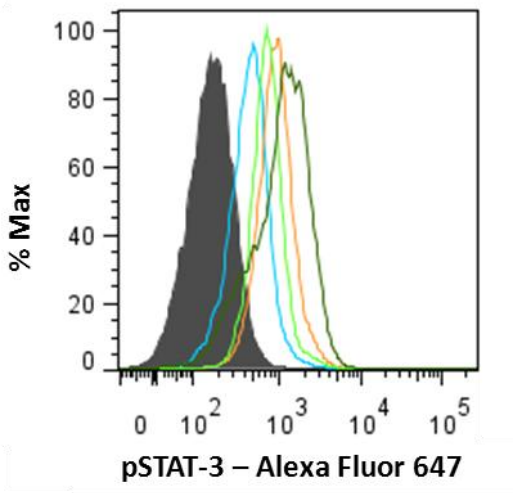
4.5 Análise do nível fosforilação de STAT-3 em mo-iDCs tratadas ou não com JSI-124

Foi mostrado que o tratamento com JSI-124 foi capaz de modular fenotipicamente as mo-iDCs. O próximo passo foi mostrar o nível de fosforilação de STAT-3 bem como sua inibição nas mo-iDCs tratadas ou não com JSI-124. Nota-se pelos resultados obtidos na fenotipagem das mo-DCs que a modulação ocorre já na concentração mínima utilizada, 0,5 μM, portanto, para este ensaio foi utilizada esta concentração de inibidor.

Para tal, as mo-iDCs foram marcadas extracelularmente e posteriormente submetidas à fixação e permeabilização para então serem marcadas com anticorpo primário anti-pSTAT-3 e finalmente com anticorpo secundário. Como controle positivo da fosforilação de STAT-3 foram utilizadas células da linhagem HeLa, as quais foram estimuladas com IFN-α.

Observa-se pela figura 24, que a fosforilação basal das células é relativamente alta apontando MFI de 870 (laranja). Nota-se também que houve inibição da fosforilação, mesmo que discreta, nas células tratadas com JSI-124 (verde claro). As células utilizadas como controle positivo são evidenciadas pelo histograma verde escuro. Há também dois outros controles, as células não marcadas (cinza escuro preenchido) e células tratadas somente com o anticorpo secundário (azul).

Figura 24 – Histograma referente à medida de fosforilação de STAT3.

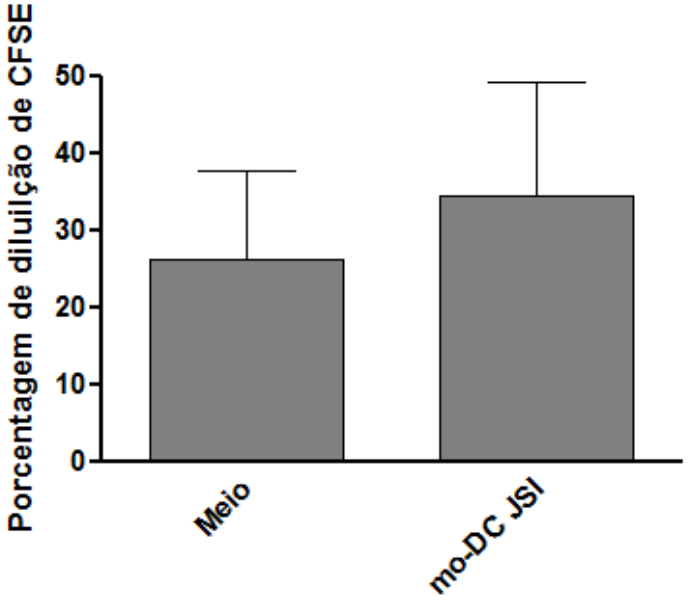


Mo-iDCs foram tratadas 24h com 0,5 μM de JSI-124. Essas células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas para p-STAT3. Células marcadas somente com anticorpo secundário (azul); mo-iDCs tratadas (verde claro); mo-iDCs não tratadas (laranja); Células HeLa estimuladas com IFN-alfa verde escuro).

4.6 Avaliação da capacidade aloestimuladora de mo-DCS tratadas ou não com JSI-124

O inibidor de STAT-3 exerceu efeito marcante no fenótipo das mo-DCs, com aumento na expressão da molécula de coestímulo CD86 assim como de HLA-DR. Então, o próximo passo foi verificar a capacidade aloestimuladora das mo-DCS tratadas com o inibidor, JSI-124. Como se pode observar pela figura 25, as mo-DCs tratadas apresentaram maior potencial aloestimulador que as células não tratadas com o inibidor.

Figura 25 – Diluição de CFSE em linfócitos alogenêicos estimulados com mo-DCs e tratadas ou não com JSI-124.



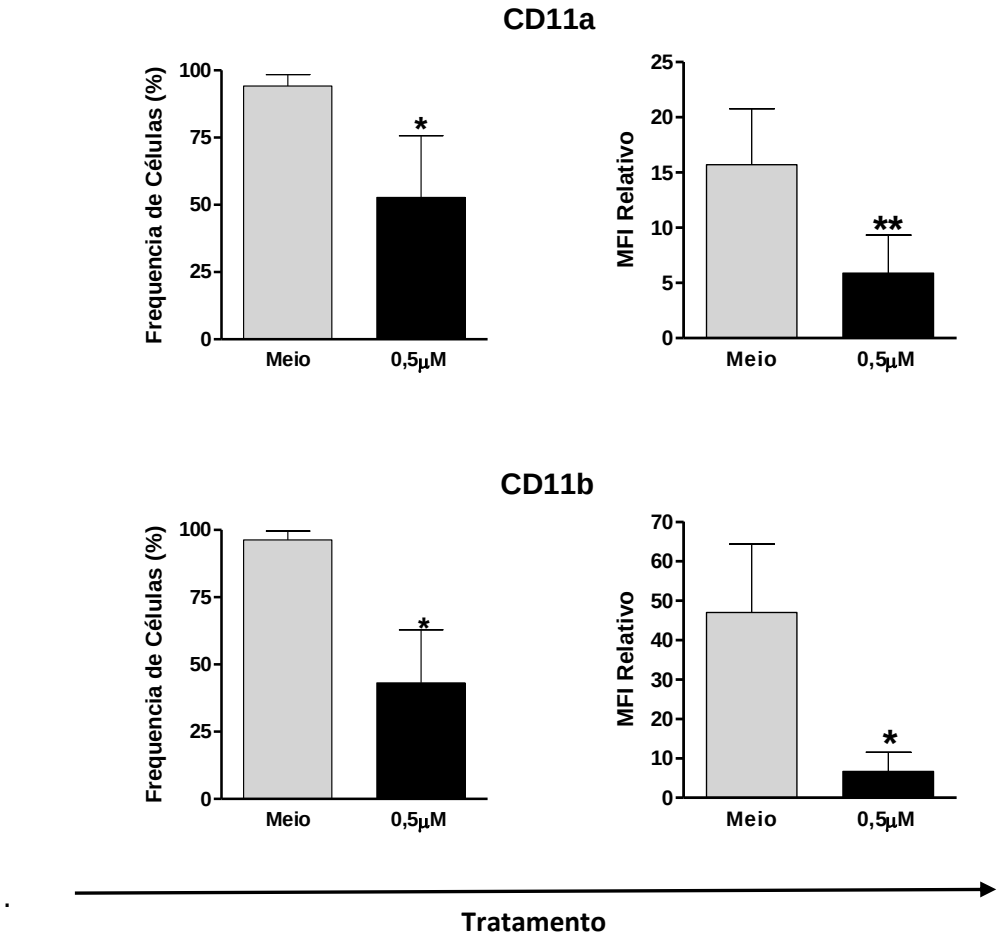
Linfócitos T CD3^{+} alogenêicos corados com CFSE foram cocultivados por 5 dias com mo-DCs obtidas da diferenciação de monócitos e tratadas por 24h com JSI-124 na concentração de 0,5µM. Após os 5 dias de cocultura, os linfócitos foram analisados quanto à diluição do CFSE. n = 2. Para cada condição foram analisados 20.000 eventos.

4.7 Efeito do JSI-124 sobre a expressão de CD18, CD11a e CD11b por Mo-DCs

A queda na expressão de CD11c observada em Mo-DCs tratadas com o inibidor de STAT-3 levantou a seguinte questão: Será que JSI-124 também interfere na expressão das outras integrinas da mesma família, CD11a e CD11b? Para elucidar essa questão, a expressão dessas moléculas foi avaliada nas Mo-DCs tratadas com o inibidor de STAT-3. Para isso, as Mo-DCs foram marcadas segundo painel da tabela 1. Seguiu-se a mesma estratégia de análise.

Como observado na figura 26, a população de células que expressa CD11a e CD11b diminui após tratamento com JSI-124, sendo que o mesmo ocorre com a intensidade de expressão dessas moléculas.

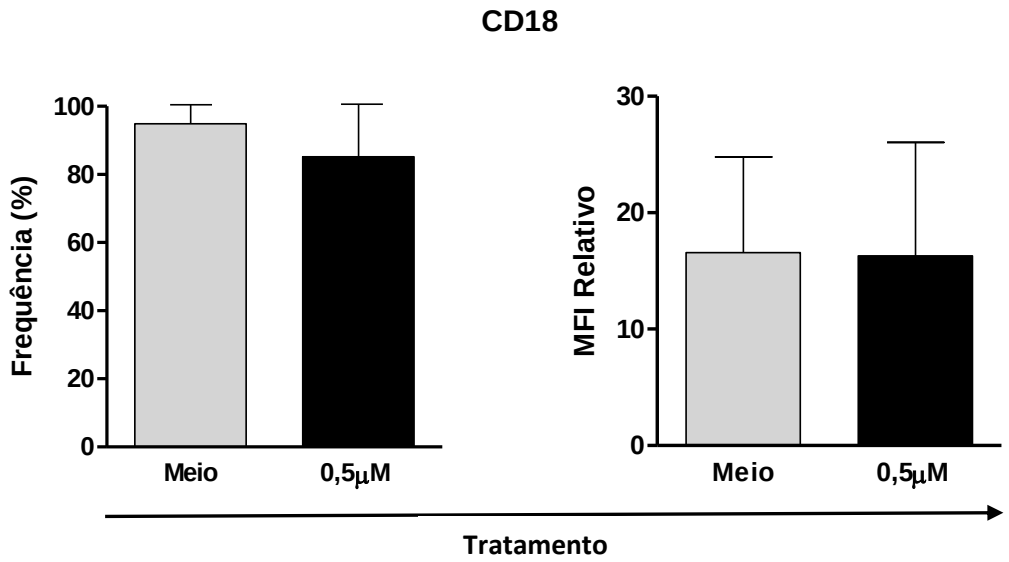
Figura 26 – Efeito do JSI-124 sobre a expressão de CD11a e CD11b por Mo-DCs.



Mo-DCs foram tratados com JSI-124 na concentração de 0,5 µM no 5º dia de cultura e incubados por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água. Após o período de cultura, as células foram marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. Meio = R10 + 0,01% de DMSO. Para cada condição foram analisadas 10.000. n = 3. ** p<0,01 em relação ao grupo meio. RFI = MFI amostra/MFI de controle não marcado.

Os resultados acima descritos levam a supor que o tratamento de JSI-124 poderia estar modulando, de fato, a expressão da molécula CD18, isso porque CD11a, CD11b e CD11c formam heterodímeros com CD18 para sua expressão na membrana. Por isso, a expressão da molécula CD18 foi então avaliada em Mo-DCs tratadas com JSI-124. Como resultado obtivemos algo intrigante, já que não houve alteração da expressão de CD18 nas células, embora estas tenham perdido a expressão de todas as moléculas da família CD11 investigadas (Figura 27).

Figura 27 – Expressão de CD18 por mo-DCs tratadas com JSI-124.



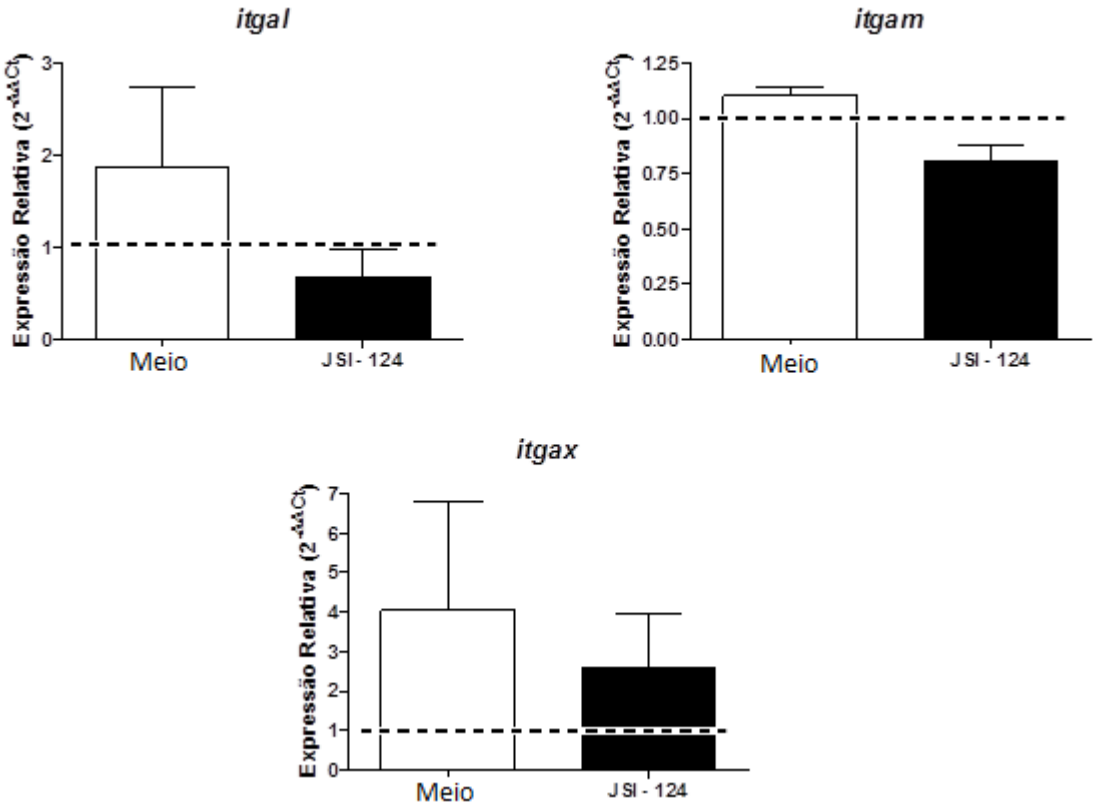
Mo-DCs foram tratadas com JSI-124 na concentração de 0,5 μM no 5º dia de cultura e incubadas por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água. Após o período de cultura, as células foram marcadas com anticorpos fluorescentes e analisadas por citometria de fluxo. Meio = R10 + 0,01% de DMSO. Para cada condição foram analisadas 10.000. n = 3. ** p<0,01 em relação ao grupo meio. RFI = MFI amostra/MFI de controle não marcado.

4.8 Avaliação da expressão gênica de CD11a, CD11b e CD11c

O passo seguinte foi avaliar a expressão gênica das leucointegrinas nas células tratadas ou não com JSI-124. Para a realização dos experimentos mo-DCs de mais dois doadores diferentes foram submetidas ou não ao tratamento com o inibidor de STAT-3 e posteriormente, seu RNA foi extraído, convertido em cDNA. Com o cDNA em mãos, a próxima etapa foi realizar o qPCR para avaliação da expressão dos genes *itgal* (CD11a), *itgam* (CD11b) e *itgax* (CD11c) nas amostras dos doadores.

A figura 28 mostra a expressão relativa dos genes *itgal, Itgam e itgax* das mo-iDCs tratadas ou não com o inibidor de STAT-3. Nota-se que nas células não tratadas a expressão dos genes *ital e itgax* é ligeiramente alta quando comparada à expressão do gene normalizador *hprt1* (expressão relativa 1,00). Além disso, observa-se que o tratamento com JSI-124 regulou negativamente a expressão dos genes estudados. Tal resultado corrobora os dados obtidos na análise de citometria.

Figura 28 – Expressão relativa dos genes *itgal*, *itgam* e *itgax* em mo-iDCs tratadas ou não com JSI-124.



Mo-DCs foram tratados com JSI-124 na concentração de 0,5 µMno 5º dia de cultura e incubados por 24h em estufa a 37ºC em atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de umidade. amostra/MFI não marcado. Foi realizado qRT-PCR para avaliar a expressão dos genes *itgal*, *itgam* e *itgax* frente ao tratamento com JSI-124. Para o cálculo da expressão relativa foi usado o método de Livak, que consiste em subtrair o Ct (*threshold cicle*) do gene de interesse pelo Ct do gene *housekeeping* no caso HPRT1, obtendo-se o ΔCt. Em seguida subtrai-se o ΔCt pelo ΔCt do gene cuja expressão relativa será considerada 1, obtendo-se então o ΔΔCt. Por fim, calcula-se o $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que representa quantas vezes o gene está aumentado ou diminuído. Média ± desvio padrão. N=2.

5 DISCUSSÃO

Embora haja evidências na literatura que demonstrem a capacidade da Tα1 de interferir no processo de diferenciação e maturação de células dendríticas humanas (Yao et al., 2007), os resultados aqui obtidos mostraram que esse hormônio tímico não exerceu o efeito esperado no fenótipo de monócitos e de mo-DCs, ao menos quanto aos parâmetros analisados. Tα1 não foi capaz de modular fenotipicamente os monócitos tratados mas influenciou o fenótipo das mo-DCs, proporcionando aumento aparente na expressão de CD86, HLA-DR e PD-L1. Funcionalmente, as células tratadas com o hormônio também não foram mostraram modificação de sua capacidade de estimular linfócitos alogenêicos.

Na verdade, o efeito de Tα1 nas mo-DCs derivadas de doadores saudáveis, mostrou-se contrário ao observado no experimento piloto realizado com mo-DCs de pacientes com câncer de mama, no qual o hormônio modulou negativamente a expressão da molécula de superfície PD-L1. Uma provável justificativa para tal diferença é, como se pode notar, a origem dos monócitos. A capacidade de se articular uma resposta imune efetiva contra o tumor depende do perfeito funcionamento do sistema imune; o tumor, por sua vez, é capaz de evadir-se da resposta imune, afetando os diversos componentes do sistema, entre os quais chamam a atenção as células dendríticas. De fato, há dados na literatura, inclusive de nosso laboratório, que mostram que mesmo os monócitos circulantes de portadores de câncer apresentam alterações que modificam as Mo-DCs deles derivadas (Ramos et al., 2012).

Assim, na tentativa de reproduzir o observado com células de pacientes sob tratamento com Tα1, mo-DCs diferenciadas na presença de sobrenadante de células de carcinoma de ovário, OVCAR-3, foram tratadas com o hormônio tímico.

Os resultados obtidos na diferenciação de monócitos na presença de sobrenadante tumoral mostram que, como se poderia prever, há modificações do fenótipo das mo-DCs. Notou-se um aumento ainda que marginal, tanto da frequência, quanto do nível de expressão de HLA-DR, CD86 e PD-L1. Tal fenótipo conferiu a essas células uma capacidade aloestimuladora menor. Essa característica fenotípica apresentada pelas mo-DCs assemelha-se à apresentada por mo-DCs de pacientes com câncer. Dados da literatura mostram que mo-DCs de pacientes com

câncer apresentam fenótipo diferente das mo-DCs de doadores saudáveis (Neves et al., 2005). Em estudo com pacientes com câncer de mama, descreveu-se maior expressão de PD-L1 nas mo-DCs, menor capacidade de indução de proliferação de linfócitos T ao mesmo tempo em que maior ativação de células T reguladoras ($CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$), com maior produção de IL-10 e TGF-beta (Ramos et al., 2012).

No presente trabalho, ao se avaliar o efeito do hormônio tímico sobre mo-DCs diferenciadas na presença de meio condicionado (sobrenadante da linhagem tumoral OVCAR 3), notou-se que este proporcionou não só o tendência ao aumento na frequência de células que expressam PD-L1, mas também aumento ainda maior no nível de expressão desta molécula, como também de HLA-DR e CD86. Estes dados mostram que mo-DCs diferenciadas na presença do meio condicionado apresentam modificações fenotípicas, tais como poderiam ser esperadas, caso produtos de secreção do tumor tivessem efeito sobre os monócitos.

É interessante notar, que a análise simples da expressão dos marcadores não parece ser suficiente para determinar a função destas mo-DCs, uma vez que há aumento tanto de moléculas associadas à indução de resposta (HLA-DR e CD86), quanto de PD-L1, molécula associada ao controle negativo da mesma resposta. Na verdade, a análise funcional dessas células acabou demonstrando que este fenótipo (aumento de HLA-DR, CD86 e de PD-L1) está associado à diminuição da capacidade aloestimuladora das mo-DCs, ao menos nas condições aqui testadas. Sendo assim, seria de se esperar, caso a timosina tivesse, de fato, efeito capaz de "corrigir" os efeitos inibidores da presença de tumores no organismo, que o tratamento *in vitro* que realizamos, aumentasse o potencial estimulador das mo-DCs diferenciadas na presença do sobrenadante tumoral.

Entretanto Tα1 não só não foi capaz de reverter o fenótipo das células diferenciadas na presença do sobrenadante, como também pareceu potencializar o efeito observado, estando mais uma vez em desacordo com os dados observados no experimento piloto. Assim, poder-se-ia concluir que os experimentos-piloto representaram artefatos não reprodutíveis ou que as condições *in vitro* testadas, não foram capazes de reproduzir aquelas presentes nos pacientes. Esta última hipótese parece mais aceitável, uma vez que no paciente, os efeitos da presença do tumor não se resumiriam a um sobrenadante agindo sobre monócitos apenas, mas sim, sobre todas as células do sistema, inclusive células precursoras de medula óssea.

Em contrapartida, os experimentos desenhados como controles para nossa hipótese inicial – da ação da timosina via STAT-3 - acabaram por gerar dados muito intrigantes. O tratamento com um inibidor de STAT-3, o JSI-124, foi capaz de afetar significativamente o fenótipo tanto de monócitos como de mo-DCs. JSI-124 proporcionou nos monócitos a diminuição da expressão da maioria das moléculas observadas, entre elas HLA-DR, CD86, PD-L1 e CD11c. É descrito que a inibição de STAT-3 pode levar ao descontrole dos processos inflamatórios, uma vez que STAT-3 parece ser fator responsável por limitar respostas inflamatórias (Kortylewski, Yu, 2008), regulando a produção de TNF-α (De Jong et al., 2012). Em concordância com isto, há o fato de que animais nocaute para esta molécula desenvolveram colite em virtude da não-regulação da resposta inflamatória (Takeda et al., 1999). Todavia, a queda da expressão de moléculas de membrana dos monócitos por inibidores da STAT-3, como a aqui observada, não parece ter sido descrita na literatura, nem seria de fácil explicação, uma vez que o descontrole da resposta inflamatória, como descrito, seria mais facilmente explicado pelo aumento da expressão de várias destas moléculas, com exceção de PD-L1, do que pela queda de expressão, como notamos.

Ainda mostrando a complexidade dos possíveis papéis da STAT-3 na fisiologia destas células, tem-se que o efeito de seu inibidor sobre as mo-DCs foi distinto do observado em monócitos. Enquanto nestes últimos o inibidor provocou queda de HLA-DR e CD86, nas mo-DCs, houve aumento dos dois marcadores e queda de PD-L1. É interessante porém notar, que o alvo destes foi a mo-DC e não os monócitos, sugerindo, portanto, que estas células dendríticas estariam mais envolvidas nos processos inflamatórios onde a interferência com STAT-3 teve efeitos claros, do que os monócitos.

A população de células dendríticas é heterogênea e a descrição de seus diversos tipos e subtipos ainda não se pode considerar concluída (Naik, et al. 2007). Recentemente, vem ganhando destaque mais um subtipo de DCs, as chamadas “inflammatory dendritic cells” (Segura et al., 2013). Neste contexto, é muito interessante notar que, a resposta aqui observada ao tratamento das mo-DCs com o inibidor da STAT-3, corresponde mais ao esperado, considerando os efeitos desta inibição em modelos animais (Nefedova et al., 2005b), do que a resposta induzida em monócitos, sugerindo, talvez, que estas mo-DCs tenham um papel mais relevante do que o até hoje suspeitado em processos inflamatórios.

Além deste possível efeito “inflamatório”, o tratamento com JSI-124 conferiu às mo-DCs um fenótipo mais favorável à apresentação de antígenos, pois ao avaliarmos os dados de proliferação de linfócitos T $CD3^+$, mostramos que as mo-DCs tratadas com o inibidor foram mais eficazes em induzir proliferação de linfócitos. Todavia, o efeito mais intrigante do tratamento das mo-DCs com JSI-124 não foi ainda discutido: a queda na expressão das leucointegrinas CD11a, CD11b e CD11c.

Essas moléculas constituem as cadeias alfa das leuco-integrinas, expressas na membrana leucocitária formando heterodímeros com a cadeia beta-2, CD18. Estes dados indicam que a expressão de todas as cadeias alfa das leuco-integrinas dependem da fosforilação de STAT-3. Isto pode ser observado a nível proteico para as três moléculas e para CD11a e CD11b também a nível de mRNA. Esta observação é interessante e, de certa forma condizente com presença de sequencias-alvo para este fator nas regiões promotoras destas duas integrinas (UCSC, 2013). Há ainda outros dados concordantes na literatura: Panopoulos e colaboradores mostraram que a expressão de CD11b é regulada pela ativação de PU.1 que por sua vez é dependente da molécula STAT-3 (Panopoulos et al., 2002). Foi mostrado também que N-Acetilcisteína (NAC) atua como inibidor da ativação de STAT-3 em linfócitos B e como consequência houve aumento da expressão de CD11a (Nadeau et al., 2012). Em contrapartida, Hashizume e colaboradores mostraram que o mesmo NAC proporcionou diminuição desta molécula em células da linhagem mielóide (Hashizume et al., 2002). Isto mostra que as vias de sinalização formam redes de extrema complexidade cujo efeito pode variar de uma linhagem celular para outra.

Nas mo-DCs, a inibição da STAT-3, promovendo a queda na expressão de CD11a, uma integrina constitutivamente expressa em células da linhagem mieloide (revisto por Stewart et al., 1995) poderia ser utilizada como alternativa de tratamento para algumas enfermidades, como por exemplo a psoríase, uma vez que dados da literatura sugerem que a molécula CD11a apresenta grande relevância clínica para a progressão desta doença (Guttman-Yassk et al., 2008). Ainda neste cenário, vale ainda notar que vem sendo destacado cada vez mais o papel das células dendríticas, que em virtude de suas características biológicas, são consideradas personagens centrais na fisiopatologia da psoríase (Johnson-Huang et al., 2012). Tal papel é ainda confirmado por dados clínicos em que o uso do anticorpo monoclonal

Efalizumab, anti-CD11a, que reduz o número de células dendríticas presentes na pele psoriática leva à melhora no quadro da doença (Lowes et al., 2005).

Em contrapartida, deve-se considerar o efeito da inibição da ativação de STAT-3 sobre as demais leucointegrinas, CD11b e CD11c. Estas moléculas exercem função de receptores para complemento (CRs), mais precisamente para metabólitos de C3 (Li et al., 2011). Foi mostrado que CR3 (CD11b) é o receptor de complemento dominante em células dendríticas, contribuindo de modo crucial para a fagocitose de organismos opsonizados (Sandor et al., 2012). Desta forma, torna-se difícil prever o efeito “final” da inibição da expressão de todas as leuco-integrinas sobre a fisiologia das células dendríticas e do sistema imune.

Embora a queda de CD11c não tenha sido descrita anteriormente na literatura, o fenômeno foi evidenciado e confirmado no presente trabalho em várias repetições do experimento, tanto por citometria de fluxo quanto por microscopia de fluorescência. Além disso, ao se avaliar o nível de expressão gênica desta alfa integrina, têm-se uma redução da expressão (ainda que marginalmente significativa) nas mo-DCs tratadas com JSI-124. Confirmado este efeito, seria muito interessante investigar os mecanismos pelos quais a STAT-3 regula a expressão deste gene, uma vez que, ao menos até onde pode-se notar, o gene não tem uma região-alvo para STAT-3 conhecida.

Além disso, sabe-se que a expressão da subunidade alfa depende da beta, ou seja, da expressão da molécula CD18 (Springer et al., 1984). Assim, ao obter os primeiros resultados mostrando a queda de expressão de CD11a, CD11b e CD11c, nossa primeira hipótese foi a de que CD18 era o alvo de STAT-3 e não as cadeias alfa. Todavia, nossos resultados evidenciaram que embora houvesse queda na expressão da componente alfa das leuco-integrinas, tanto a nível proteico quanto de mRNA, a expressão de CD18 permaneceu inalterada. Será que CD18 pode ser expresso na membrana isoladamente? Ou haverá outro parceiro de dimerização para sua expressão na membrana? Estas questões não puderam ser respondidas no presente trabalho, mas merecem investigação.

Finalmente, a ação de JSI-124 sobre as mo-DCs não se limitou à expressão de moléculas de superfície. Notou-se que há alteração na morfologia dessas células quando submetidas ao tratamento, as quais se mostraram menos aderidas e com morfologia mais esférica. De fato STAT-3 está envolvido na dinâmica dos microtúbulos, e a ausência desta molécula leva a desorganização celular e a

formação de filamentos descontínuos (Ng et al., 2006). Fibroblastos que não expressam STAT-3 mostraram alterações na organização da actina, com comprometimento na polarização celular. Além disso, a perda de expressão de STAT-3 faz com que as células migrem de modo aleatório (Teng et al., 2009). É possível que tais efeitos dependam das interações entre STAT-3 e membros da família das Rho GTPases. Sabe-se que tais moléculas, em particular RhoA, Cdc42 e Rac1, modulam a dinâmica dos microtúbulos e da actina (Nobes, Hall, 1999) e que STAT-3 é capaz de modular a função de Rac1; a ausência de STAT-3 leva a hiperativação de Rac1 e isto interfere no processo de migração celular, uma vez que há diminuição da formação de lamelipodia (Teng et al., 2009). Embora este não tenha sido motivo de investigação no presente estudo, é interessante notar que tais alterações em células como as dendríticas, cuja função depende essencialmente de sua migração no organismo, pode ter consequências funcionais muito significativas também.

Em resumo, no presente trabalho, mostramos que Tα1 não interfere no processo de ativação do fator de transcrição STAT-3. Além disso, os resultados obtidos com o hormônio tímico não reproduzem aqueles encontrados em mo-DCs de pacientes com câncer também tratadas também com este hormônio.

Por outro lado, obtivemos resultados surpreendentes com o inibidor de STAT-3, JSI-124, utilizado como controle. O tratamento com JSI-124 levou a alterações fenotípicas nas mo-DCs fazendo com que estas células exibissem um perfil próximo ao infamatório, com aumento na expressão de HLA-DR e CD86 e concomitante queda de PD-L1. Além disso, mostramos que STAT-3 parece estar envolvino na expressão das leucointergrinas, uma vez que sua inibição proporcionou queda da expressão em nível proteico e gênico destas moléculas.

6 CONCLUSÃO

- A modulação fenotípica sofrida por mo-DCs frente ao tratamento com hormônio tímico, Tα1, foi diferente da promovida pelo inibidor de STAT-3, JSI-124, utilizado como controle, o que nos leva a sugerir que Tα1 não interfere no estado de fosforilação do fator de transcrição STAT-3;

- Embora não tenha apresentado efeito modulador na expressão de moléculas de superfície em monócitos, pode-se observar que Tα1 mostrou efeito no fenótipo das mo-DCs, promovendo aumento da expressão de CD86, PD-L1 e HLA-DR;

- Mo-DCs tratadas com Tα1 não apresentaram capacidade aloestimuladora maior que as mo-DCs não tratadas;

- O inibidor de STAT-3, usado como controle, foi capaz de modular tanto monócitos como as mo-DCS tratadas com ele; nos monócitos promoveu queda da maioria dos marcadores estudados, em contrapartida nas DCs promoveu aumento na expressão de HLA-DR, CD86 ao mesmo tempo que diminuíu a de PD-L1.

- As mo-DCs tratadas com JSI-124 apresentaram maior capacidade aloestimulatória;

- A inibição da ativação de STAT-3 nas mo-DCs acarretou na diminuição da expressão das leucointegrinas CD11a, CD11b e CD11c, sugerindo que este fator de transcrição está envolvido na expressão destas moléculas;

REFERÊNCIAS*

Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). [cited from 25 may. 2011]. Disponível em: http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900

Aggarwal BB, Kunnumakkara AB, Harikumar KB, et al. Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship?. Ann NY Acad Sci. 2009;1171:59–76.

Almand B, Resser JR, Lindman B, et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. Clinical Cancer Research. 2000;6(5):1755-66.

Ammon C, Meyer SP, Schwarzfischer L, et al. Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells. Immunology. 2000;100:364-9.

Ansari MJI, Salama AD, Chitnis T, et al. The Programmed Death-1 (PD-1) Pathway Regulates Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic (NOD) Mice. JEM. 2003;198(1):63-69.

Baleeiro RB, Anselmo LB, Soares FA, et al. High frequency of immature dendritic cells and altered in situ production of interleukin-4 and tumor necrosis factor-*a* in lung cancer. Cancer Immunol Immunother. 2008;57:1335–45.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature. 1998;393(6673):245-52.

Barbuto JAM, Ensina LF, Neves AR, et al. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. Cancer Immunol. Immunother. 2004;53(12):1111-18.

Barbuto JAM, Bergami-Santos P, Mitteldorf CA, et al. Response of advanced refractory neuroblastoma to dendritic-tumor cell hybrid vaccination. In: 13th International Congress on Immunology. Abstract. Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 2007.

Baxevanis CN, Sotiriadou NN, Gritzapis AD, et al. Immunogenic HER-2/neu peptides as tumor vaccines. Cancer Immunol Immunother. 2006;55:85–95.

Bennaceur K, Chapman JA, Touraine J, et al. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their effect in dendritic cells. Biochimica et Biophysica Acta. 2009;1795(1):16–24.

Bergami-Santos P, Cristofani L, Odone-Filho V, et al. Long term complete remission of metastatic renal cell carcinoma after immunoterapy with alogeneic dendritic cells fused with autologous tumor cells vaccine. In: Gordon Research Conferences on cell-cell fusion. Abstract. Colby-Sawyer College. New London, NH, USA. July 19-24, 2009.

Bianchi M. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. Journal of Leukocyte Biology. 2007;81:1-5.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org

Burnte M. Cancer-A Biological Approach. British Medical Journal. 1957;779-86.

Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, et al. 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. JEM. 1996;184:747-52.

Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. Curr Opin Immunol. 1997;9(1):10–6.

De Jong PR, Schadenberg AWL, Van den Broek T, et al. Stat3 regulates monocyte tnf-alpha production in systemic inflammation caused by cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. Plos One. 2012;7(4):e35070.

Della-Bella S, Gennaro M, Vaccari M, et al. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. British Journal of Cancer. 2003;89(8):1463-72.

Dendritic Cells in fundamental and clinical immunology - dc2010: Forum on Vaccine Science. Lugano. Switzerland. Sep. 26-30, 2010.

Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, et al. Increased circulating myeloid derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin–cyclophosphamide chemotherapy. Cancer Immunol Immunother. 2009;58(1):49–59.

Diaz-Jr LA, Williams R, Wu J. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. Nature. 2012;486(7404):537-40.

Dong H, Chen L. B7-H1 pathway and its role in the evasion of tumor immunity. J. Mol Med. 2003;81(5):281-7.

Ferreira ACF, Alcantara PS, Otoch JP, et al. Dendritic cells functional deficiency in cancer: is the nf-kb pathway involved?. In: 11th International Symposium on dendritic cells in fundamental and clinical immunology - dc2010: Forum on Vaccine Science. Abstract. Lugano. Switzerland. Sep 26-30, 2010.

Friesen C, Fulda S, Debatin K-M. Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells. Leukemia. 1997;11:1833-41.

Gabrilovich DI, Ciernik IF, Carbone DP. Dendritic Cells in Antitumor Immune Responses.Cellular Immunology. 1996;170:101–10.

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. N Engl J Med. 2012;366:883-92.

Ghebeh H, Tulbah A, Mohammed S, et al. Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative ki-67-expressing tumor cells. Int J Cancer. 2007;121(4):751–8.

Goldstein AL, Low TL, Mcadoo M, et al. Thymosin alpha1: isolation and sequence analysis of an immunologically active thymic polypeptide. Proc Natl Acad Sci USA. 1977;74(2):725-9.

Granstein RD, Ding W, Ozawa H. Induction of Anti-Tumor Immunity with Epidermal Cells Pulsed with Tumor-Derived RNA or Intradermal Administration of RNA. The Society for Investigative Dermatology. 2000;114(4):632-6.

Grulich AE, Vajdic CM, Cozen W. Altered Immunity as a Risk Factor for Non-Hodgkin Lymphoma. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2007;16:405-8.

Guix M, Faber AC, Wang SE, et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins. J. Clin. Invest. 2008;118:2609–19.

Guttman-Yassky E, Vugmeyster Y, Lowes MA, et al. Blockade of CD11a by Efalizumab in Psoriasis Patients Induces a Unique State of T-Cell Hyporesponsiveness. Journal of Investigative Dermatology. 2008;128:1182–91.

Hashizume K, Hatanaka Y, Fukuda I, et al. N-acetyl-l-cysteine suppresses constitutive expression of cd11a/lfa-1alpha protein in myeloid lineage. Leuk Res. 2002;26(10):939-44.

Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, et al. Programmed cell death ligand 1 and tumor infiltrating $CD8^+$ t lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(9):3360–65.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 2011;144:646-674.

Huang Y, Chen Z, Zhou C, et al. The modulation of thymosin alpha 1 in the maturation, differentiation and function of murine bone marrow-derived dendritic cells in the absence or presence of tumor necrosis factor-alpha. International Immunopharmacology. 2004;4(4):539-46.

Ichihara F, Kono K, Takahashi A. Increased Populations of Regulatory T Cells in Peripheral Blood and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients with Gastric and Esophageal Cancers. Clinical Cancer Res. 2003;9:4404-8.

Inaba BK, Inaba M, Naito M, et al. Dendritic Cell Progenitors Phagocytose Particulates, Including Bacillus Calmette-Guerin Organisms, and Sensitize Mice to Mycobacterial Antigens In Vivo. JEM. 1993;178:479-88.

Ingulli E, Mondino A, Khoruts A, et al. In Vivo Detection Cell Antigen Presentation to CD4+ T Cells. JEM. 1997;185(12):2133-41.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics. Ca Cancer Journal for Clinicians. 2010;60(5):277-300.

Johnson-Huang L, Pensabene CA, Shah KR, et al. Post-Therapeutic Relapse of Psoriasis after CD11a Blockade Is Associated with T Cells and Inflammatory Myeloid DCs. Plos One. 2012;7(2):e30308.

Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, et al. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their pd-1 expression. Clinical Cancer Research. 2004;10(15):5094–100.

Kortylewski M, Yu H. Role of stat-3 in suppressing anti-tumor immunity. Curr Opin Immunol. 2008;20(2):228-33.

Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, et al. B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. Journal of Experimental Medicine. 2006;203(4):871-88.

Kryczek I, Wei S, Zhu G, et al. Relationship between B7-H4, regulatory t cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. Cancer Research. 2007;67(18):8900-5.

Li J, Liu CH, Wang FS. Thymosin alpha 1: biological activities, applications and genetic engineering production. Peptides. 2010;31(11):2151-8.

Li K, Fazekasova H, Wang N, et al. Expression of complenent components, receptors and regulators by human dendritic cells. Mol Immunol. 2011;48(9-10):1121-7.

Ma XT, Wang S, Ye YJ, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling pathway in human colorectal carcinoma. World J Gastroenterol. 2004;10(11):1569-73.

Lowes MA, Chamlan F, Abello MV, et al. Increase in TNF-a and inducible nitric oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). PNAS. 2005;102(52):19057-62.

Mami NB, Mohty M, Aurran-Schleinitz T, et al. Blood dendritic cells in patients with chronic lymphocytic leukaemia. Immunobiology. 2008;213:493-8.

Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. Oncogene. 2000;19:6550-65.

Moody TW, Fagarasan M, Zia F, et al. Thymosin alpha 1 down-regulates the growth of human non-small cell lung cancer cells in vitro and in vivo. Cancer Research. 1993;53(21):5214-18.

Moody TW, Tuthill C, Badamchian M, et al. Thymosin alpha1 inhibits mammary carcinogenesis in fisher rats. Peptides. 2002;23(5):1011-4.

Nadeau PJ, Roy A, Gervais-st-amour C, et al. Modulation of CD40-activated b lymphocytes by n-acetylcysteine involves decreased phosphorylation of stat3. Mol Immunol. 2012;49(4):582-92.

Naik SH, Sathe P, Park H-Y, et al. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. Nature Immunology. 2007;8(11):1217-26.

Nefedova Y, Huang M, Kusmartsev S, et al. Hyperactivation of stat3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. Journal of Immunology. 2004;172(1):464-74.

Nefedova Y, Cheng P, Gilkes D, et al. Activation of dendritic cells via inhibition of jak2/stat3 signaling. Journal of Immunology. 2005;175(7):4338-46.

Nefedova Y, Nagaraj S, Rosenbauer A, et al. Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. Cancer Research. 2005;65(20):9525-35.

Neves AR, Ensina LF, Anselmo LB, 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. 2005;54:61–6.

Niu G, Wright KL, Huang M, et al. Constitutive stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. Oncogene. 2002;21(13):2000- 8.

Ng DC, Lin BH, Lim CP, et al. Stat3 regulates microtubules by antagonizing the depolymerization activity of stathmin. J. Cell Biol. 2006;172:245-57.

Nobes CD, Hall A. Rho gtpases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. J. Cell Biol. 1999;144:1235-44.

Okasaki T, Honjo T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. International Immunology. 2007;19(7):813–24.

Panchagnula R. Pharmaceutical aspects of paclitaxel. International Journal of Pharmaceutics. 1998;172:1-15.

Panopoulos AD, Bartos D, Zhang L, et al. Control of myeloid-specific integrin alpha mbeta 2 (CD11b/CD18) expression by cytokines is regulated by stat3-dependent activation of PU.1. J Biol Chem. 2002;277(21):19001-7.

Pardoll DM. Therapeutic vaccination for cancer. Clinical Immunology. 2000;95(1):44-62.

Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit t-cell activation by distinct mechanisms. Mol Cell Biol. 2005;25(21):9543-53.

Peng X, Zhang P, Xin Wang, et al. Signaling Pathways Leading to the Activation of IKK and MAPK by Thymosin a1. Ann NY Acad. 2007;1112:339–50.

Perez SA, Kallinteris NL, Bisias S, et al. Results from a Phase I Clinical Study of the Novel li-key/HER-2/neu(776-790) Hidrid Peptide Vaccine in Patients with Prostate Cancre. Clinical Cancer Research. 2010;16:3495-506.

Philpott DJ, Girardin SE. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. Molecular Immunology. 2004;41:1099–108.

Ramos RN, Chin LS, Santos APSA, et al. Monocyte-derived immature dendritic cells from breast cancer patients induce high frequency of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory t cells in vitro. In: 11th International Symposium on dendritic cells in fundamental and clinical immunology - dc2010: Forum on Vaccine Science. Abstract. Lugano. Switzerland. Sep 26-30, 2010.

Ramos RN, Chin LS, dos Santos AP, et al. Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4+CD25+FOXP3+ regulatory t cells. J Leukoc Biol. 2012;92(3):673-82.

Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The jak/stat signaling pathway. Journal of Cell Science, 2004;117:1281-3.

Romani L, Bistoni F, Gaziano R, et al. Thymosin alpha 1 activates dendritic cells for antifungal TH1 resistance through toll-like receptor signaling. Blood. 2004;103(11):4232-9.

Romani L, Bistoni F, Perruccio K, et al. Thymosin α1 activates dendrict cell tryptophan catabolism and establishes a regulatory environment balance of inflammation and tolerance. Blood. 2006;108:2265-74.

Saeki H, Moore AM, Brown MJ, et al. Cutting Edge: Secondary Lymphoid-Tissue Chemokine (SLC) and CC Chemokine Emigration Pathway of Mature Dendritic Receptor 7 (CCR7) Participate in the Cells from the Skin to Regional Lymph Nodes. J Immunol. 1999;162:2472-5.

Sallusto F, Cella M, Danieli C, et al. Dendritic Cells Use Macropinocytosis and the Mannose Receptor to Concentrate Macromolecules in the Major Histocompatibility Complex Class II Compartment: Downregulation by Cytokines and Bacterial Products. JEM. 1995;182:389-400.

Sallusto F, Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultures human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor.plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α JEM. 1994;179:1109-118.

Sándor N, Kristóf K, Paréj K, et al. CR3 is the dominant phagocytotic complement receptor on human dendritic cells. Immunobiology. 2012. In press.

Segura E, Durand M, Amigorena S. Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ–resident dendritic cells. JEM. 2013;210(5):1035-47.

Segura E, Touzot M, Bohineust A, et al. Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. Immunity. 2013;38:336-348.

Selenko-Gebauer N, Majdic O, Szekeres A, et al. B7-H1 (Programmed Death-1 Ligand) on Dendritc Cells Is Involved in the Induction and Maintenance of T Cell Anergy. J Immunol. 2003;170:3637-44.

Sewart M, Thiel M, Hogg N. Leukocyte integrins. Current Opinion in Cell Biology. 1995;7:690-6.

Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene. 2003;22(47):7265-79.

Sigma. [cited from 23 out. 2013]. Disponível em: www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c4493?lang=en&region=US

Sliwkowsski MX, Mellman I. Antibody Therapeutics in Cancer. Science. 2013;341:1192-8.

Springer TA, Thompson WS, Miller LJ. Inherited deficiency of the mac-l, lfa-1, p150,95 glycoprotein family and its molecular basis. JEM. 1984;160:1901-18.

Smith FO, Klapper JA, Winderlich JR, et al. Impact of a recombinant fowlpox vaccine on the efficacy of adoptive cell therapy with tumor infiltrating lymphocytes in a patient with metastatic melanoma. J Immunother. 2009;32(8):870-4.

Smyth MJ, Krasovskis E, Sutton V, et al. The drug efflux protein, P glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. 1998;95:7024-9.

Steinman RM. Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. Annu Rev Immunol. 2012;30:1-22.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. JEM. 1973;137:1142-62.

Strunk D, Egger C, Leitner G, et al. A Skin Homing Molecule Defines the Langerhans Cell Progenitor in Human Peripheral Blood. JEM. 1997;185(6):1131-6.

Szabolcs P, Moore MAS, Young JW. Expansion of Immunostimulatory Dendritic Cells Among the Myeloid Progeny of Human CD34+ Bone Marrow Precursors Cultured with c-kit Ligand, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, and TNF-α. Journal of Immunology. 1995;154:5851-61.

Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, et al. Enhanced TH1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of stat3 in macrophages and neutrophils. Immunity. 1999;10(1):39-49.

Teng TS, Lin B, Manser E, et al. Stat3 promotes directional cell migration by regulating rac1 activity via its activator betapix. J Cell Sci. 2009;122:4150-9.

Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. Cancer Research. 2006;66(7):3381-5.

University of California Santa Cruz (UCSC). [cited from 25 oct. 2013]. Disponível em: http://genome.ucsc.edu/

Vicari AP, Chiodoni C, Vaure C, et al. Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by cpg immunostimulatory oligonucleotide and anti–interleukin 10 receptor antibody. The Journal of Experimental Medicine. 2002;196(4):541-9.

Wölfle SJ, Strebovsky J, Bartz H, et al. PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. Eur J Immunol. 2011;41:413–24.

Xie T, Wei D, Liu M, et al. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. Oncogene. 2004;23:3550-60.

Xie T, Huang F, Aldape KD, et al. Activation of Stat3 in Human Melanoma Promotes Brain Metastasis. Cancer Res. 2006;66:3188-96.

Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, et al. Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. The Journal of Immunology. 2002;169:5538-45.

Yao Q, Doan LX, Zhang R, et al. Thymosin-alpha1 modulates dendritic cell differentiation and functional maturation from human peripheral blood CD14+ monocytes. Immunology Letters. 2007;110(2):110-20.

Yardley DA. Drug Resistance and the Role of Combination Chemotherapy in Improving Patient Outcomes. International Journal of Breast Cancer. 2013;1-15.

Young JW, Koulova L, Soergel SA, 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. 1992;90:229-37.

Yu H, Huang X, Liu X, et al. Regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells contribute to the immune escape of papillary thyroid cancer coexisting with multinodular non-toxic goiter. Endocrine. 2013;44:172-81.

Zhang P, Chan J, Dragoi AM, et al. Activation of IKK by thymosin a1 requires the TRAF6 signalling pathway. EMBO. 2005;6(6):531-7.

Zhang YW, Wang LM, Jove R, et al. Requirement of Stat3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis. Oncogene. 2002;21:217-26.

ANEXO – Termo de Consentimento

Universidade de São Paulo

Instituto de Ciências Biomédicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: "Inibição de STAT3 por timosina alfa-1: estratégia eficaz para recuperação funcional de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com câncer?"

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu (nome/profissão),..... .... residente e domiciliado na ....., portador da Cédula de identidade, RG ..... , e inscrito no CPF/MF ..... nascido(a) em ___ / ___ /_____ , abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo "**Inibição de STAT3 por timosina alfa-1: estratégia eficaz para recuperação funcional de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com câncer?**". Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

I) O estudo se faz necessário para que se procure descobrir uma maneira de corrigir as falhas do organismo no combate ao câncer;

II) Será realizada uma coleta única de cerca de 30mL de sangue para este estudo;

III) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados no estudo;

IV) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

V) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;

VI) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;

VII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.

( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

VIII) Concordo que o material possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo para mim.

( ) Sim ou ( ) Não

IX) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP -, no fone (11) 3091-7733 (e-mail: *cep@icb.usp.br*) ou pesquisador responsável, no fone (11) 3091-7375 para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.

X) Eu ou meu representante, quando for o caso, devo rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE - apondo assinatura na última página do referido Termo.

XI) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE– apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

XII) Resolução 196/96 - Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

São Paulo, de de

( ) Paciente / ( ) Responsável .....

Testemunha 1 : _____

Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : _____

Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: _____

Cristiano Jacob de Moraes (Farmacêutico-Bioquímico)