Rodrigo Nalio Ramos

INVESTIGAÇÃO DE UM POSSÍVEL VIÉS IMUNOSSUPRESSOR EM CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE CÂNCER

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

São Paulo
2011

Rodrigo Nalio Ramos

INVESTIGAÇÃO DE UM POSSÍVEL VIÉS IMUNOSSUPRESSOR EM CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE CÂNCER

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Ramos, Rodrigo Nalio.
Investigação de um possível viés imunossupressor em células dendríticas derivadas de indivíduos portadores de câncer / Rodrigo Nalio Ramos. -- São Paulo, 2011.

Orientador: 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: Investigation of a possible immunosuppressive bias in dendritic cells derived from cancer patients

Descritores: 1. Câncer 2. Células dendríticas 3. Células T reguladoras 4. Tolerância Imunológica I. Barbuto, José Alexandre Marzagão II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB043/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rodrigo Nalio Ramos.

Título da Dissertação: Investigação de um possível viés imunossupressor em células dendríticas derivadas de indivíduos portadores de câncer.

Orientador(a): José Alexandre Marzagão Barbuto.

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

( ) 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) 3091-7438
e-mail: cep@ icb.usp.br

São Paulo, 18 de junho de 2009.

PARECER 902/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 96ª reunião realizada em 16.06.09, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Investigação de um possível viés imunossupressor em células dendríticas derivadas de indivíduos portadores de câncer*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão.**

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **16 de junho de 2010.**

Atenciosamente,

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

Ilmo.Sr.
RODRIGO NALIO RAMOS
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Centro de Referência da Saúde da Mulher

Comitê de Ética em Pesquisa

São Paulo, 01 de outubro de 2009.

FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DATA DA APROVAÇÃO : 30/09/2009

TÍTULO DO ESTUDO: "Investigação de um Possível Viés Imunossupressor em células Dendríticas Derivadas de Indivíduos Portadores de Câncer"

NOME DO INVESTIGADOR PRINCIPAL :Rodrigo Nalio Ramos

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

O Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ,tendo sido a referida aprovação constado em ata.

Dr. Jorge Yoshinori Shida
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa do CRSM

À minha mulher Evelyn, aos meus pais Moacir e Manuela, e à minha irmã Izabela pelo apoio, dedicação e incentivo durante toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao amor da minha vida, Evelyn, que me acompanha, me apóia, me incentiva, me alerta, me conforta e se faz tão essencial para a minha sobrevivência durante todos esses anos.

Aos meus pais pelo amor incondicional, apoio emocional e financeiro, incentivo constante à minha educação e por tudo que abrange a minha formação humana.

À minha irmã por todo apoio, incentivo e discussões sócio-educativas.

Aos meus familiares, em especial a minha vó Raphaela (*in memoriam),* que sempre me incentivaram e me apoiaram para a continuidade da minha formação profissional.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto pela oportunidade de compartilhar com sua imensa capacidade intelectual e vivenciar a ciência com humanidade e sabedoria.

Ao Dr. Fábio Laginha pela colaboração no processo de obtenção das pacientes no Hospital Pérola Byington.

A Equipe de Mastologia do Hospital Pérola Byington representada pela Dra. Marianne Pinotti pela cordialidade e colaboração na realização do trabalho.

Ás enfermeiras Cidinha e Valdete pela amizade, auxílio e prestatividade na coleta do sangue das pacientes do Hospital Pérola Byington.

Aos professores Momtchillo Russo, Róger Chammas e Niels pelas sugestões e críticas durante o exame de qualificação.

A todos os professores do departamento pelas aulas ministradas.

Aos amigos do laboratório de Imunologia de Tumores Ana Carolina, Ana Paula, Bruna, Bruno, Cristiano, Giovana Alonso, Giovana Cechim, Graziela, Isabella, João Paulo, Karen, Lilian, Maria, Murilo, Otávio, Patrícia Bergami, Patrícia

Toniolo, Renato, Roberta e Roberto pelas discussões intelectuais, auxílios e momentos únicos dentro e fora do laboratório.

A Célia e a Claudinha por toda ajuda e constante ensinamento durante todo esse período.

A todos meus colegas de departamento pelas discussões imunológicas, as trocas de conhecimentos, momentos de descontração e empréstimo de reagentes.

Aos funcionários Amanda, Amarildo (*in memoriam*), Eni, Jotelma e Thiago pela ajuda nas questões burocráticas.

À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

Aos meus amigos Fernando (“Bean”), Flávio (“Chaves”), Marcelo (“Sasso”), Victor (“Vitaun”) e Raphael (“ET”) pelos incentivos e pelos momentos de descontração e longa amizade fora do ambiente de trabalho.

E a todas as pessoas que ajudaram na realização deste trabalho de forma direta ou indireta.

Obrigado a todos!

“Só é suficientemente duro para romper os mitos o pensamento que pratica violência contra si mesmo”.

Theodor W. Adorno
(1903 – 1969)

RESUMO

RAMOS, R. N. **Investigação de um possível viés imunossupressor em células dendríticas derivadas de indivíduos portadores de câncer.** 2011. 100 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

As células dendríticas (DCs) são as mais eficazes células apresentadoras de antígenos. Mesmo com a possibilidade da geração de DCs *in vitro*, que permitiu a criação de protocolos de vacinação antitumoral, mecanismos de tolerância periférica, mediados por células T reguladoras, impedem uma resposta imune antitumoral eficaz. O presente estudo visou avaliar, *in vitro,* a geração de linfócitos T reguladores por células dendríticas derivadas de pacientes portadoras de câncer de mama. Para tanto, DCs foram diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico de pacientes com câncer, por sete dias, na presença de GM-CSF e IL-4 (DCs imaturas - iDCs), e ativadas, por adição de TNF-α no dia cinco de cultura (DCs maduras - mDCs). As DCs foram caracterizadas, por citometria de fluxo, quanto à: expressão de CD1a, CD11c, CD14, CD80, CD86, CD83, CD123, PD-L1, HLA-ABC e HLA-DR; produção de IL-10 e TGF-beta1, por ELISA; e ainda em ensaio funcional, que se deu pela co-cultura das DCs com linfócitos T ($CD3^{+}$, $CD3^{+}CD25^{neg}$ ou $CD4^{+}CD25^{neg}$), isolados por microsferas imunomagnéticas. Após co-cultura, a expressão de CD25, a proliferação (diluição de CFSE), a produção de citocinas (IFN-γ, IL-10, TGF-beta1) e a geração de células Tregs foram analisadas. As células foram caracterizadas como Tregs por seu fenótipo ($CD4^{+}CD25^{+}CD127^{low}CTLA\text{-}4^{+}Foxp3^{+}$) e sua capacidade supressora sobre linfócitos alogeneicos. iDCs de pacientes apresentaram aumento da expressão de CD86 (com duas subpopulações: $CD86^{High}$ e $CD86^{Low}$) e CD123 além de produção elevada de IL-10 e TGF-beta1 bioativo. Co-culturas com DCs de pacientes apresentaram níveis altos de TGF-beta1 bioativo (298,08 pg/ml x ctrl: 57,63 pg/ml) e induziram um alta freqüência de Tregs (iDCs: 57% ± 4,1; mDCs: 48% ± 5,0 x ctrl: 2,5% ± 0,7) a partir de precursores $CD25^{neg}Foxp3^{neg}$, que foram capazes de suprimir a proliferação de linfócitos alogeneicos. O bloqueio de TGF-beta nas co-culturas reduziu parcialmente a freqüência de Treg geradas por DCs de pacientes. Esses achados são condizentes com a alta freqüência de Tregs no sangue periférico dessas mesmas pacientes (19,5% ± 2,3 x 8% ± 2,3) e com a presença de células com fenótipo de DCs no sangue, apresentando marcação semelhante a iDCs geradas *in vitro*. Por outro lado, iDCs provenientes de doadoras saudáveis induziram estimulação linfocitária mais intensa (35,7% ± 7,9 x 11,8 ± 5,9% $CD25^{+}$), intensa proliferação de linfócitos $CD4^{+}$ (82,7% x 29,4%) e $CD8^{+}$ (73,8% x 21%) e alta produção de IFN-γ (109,85 pg/ml x 7,86 pg/ml) nas co-culturas. Estes dados indicam que DCs derivadas de monócitos de pacientes com câncer de mama apresentam um viés imunossupressor que não é estritamente dependente do seu *status* de maturação ou de TGF-beta. Esses achados além de contribuir para a compreensão das interações entre o sistema imune e as neoplasias, devem ser considerados no delineamento de protocolos imunoterapêuticos baseados em DCs.

Palavras-chave: Câncer. Células Dendríticas. Células T reguladoras. Tolerância imunológica.

ABSTRACT

RAMOS, R. N. **Investigation of a possible immunosuppressive bias in dendritic cells derived from cancer patients.** 2011. 100 p. Masters thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Dendritic cells (DCs) are the most effective professional antigen-presenting cells. Even considering the possibility of generating DCs *in vitro*, which allowed the design of antitumor vaccination protocols, mechanisms of peripheral tolerance mediated by regulatory T cells prevent an effective antitumor immune response. The aim of our study was evaluate, *in vitro*, the induction of regulatory T cells by dendritic cells derived from breast cancer patients.DCs were differentiated from breast cancer patients' blood monocytes, for seven days, in the presence of GM-CSF and IL-4 (immature DCs- iDCs) and activated by TNF-α on day five of culture (mature DCs- mDCs). DCs were characterized by flow cytometry to CD1a, CD11c, CD14, CD80, CD86, CD83, CD123, PD-L1, HLA-ABC and HLA-DR expression; the cytokine secretion to IL-10 and bioactive TGF-beta1, by ELISA; and in functional assay by co-culturing DCs with T lymphocytes ($CD3^+$, $CD3^+CD25^{neg}$ or $CD4^+CD25^{neg}$) isolated by microbeads. Cell activation (CD25 expression), proliferation (CFSE dilution), cytokine production (IFN-gamma, IL-10 and TGF-beta1) and *de novo* regulatory T cells (Tregs) generation, were analyzed in these co-cultures after 5 or 6 days. Tregs were characterized by their phenotype ($CD4^+CD25^+CD127^{Low}CTLA\text{-}4^+Foxp3^+$) and suppressive capability on allogeneic T cell proliferation. Patients' iDCs showed a higher expression of CD86 (two subpopulation: $CD86^{High}$ and $CD86^{Low}$) and CD123 beyond the elevated production of IL-10 and bioactive TGF-beta1. Co-cultures using patients' DCs presented high levels of bioactive TGF-beta1 (298.08 pg/ml x ctrl: 57.63 pg/ml) and induced elevated frequency of Tregs (iDCs: 57% ± 4.1; mDCs: 48% ± 5.0 x ctrl: 2.5% ± 0.7) from $CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ precursors, which were able to suppress the allogeneic lymphocyte proliferation. The TGF-beta blocking partially reduced the frequency of induced Tregs by patients' DCs. These findings are consistent with the higher frequency of Tregs on peripheral blood of those patients (19.5% ± 2.3 x ctrl 8% ± 2.3) and the presence of DCs also on the blood, showing similar markings with iDCs generated *in vitro*. Contrastingly, iDCs from healthy donors were better stimulator cells, leading to a higher $CD25^+$ cell frequency (ctrl 35.7% ± 7.9 x 11.8 ± 5.9% $CD25^+$), more intense proliferation of $CD4^+$ (82.7% x 29.4%) and $CD8^+$ (73.8% x 21%) cells and higher production of IFN-gamma (109.85 pg/ml x 7.86 pg/ml) on co-cultures. These data indicate that DCs derived from breast cancer patients show an immunosuppressive bias that is not strictly dependent on DCs maturation status or TGF-beta. Finally, these observations call to caution in the use of patients' monocytes for the generation of DC-based vaccines and also contribute to the comprehension of the interactions between the immune system and cancer.

Key words: Cancer. Dendritic Cells. Regulatory T cells. Immunological Tolerance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráficos representativos das análises fenotípicas realizadas para avaliação de células T reguladoras em células mononucleares não aderentes ...47

Figura 2. Fenotipagem de linfócitos T reguladores em células mononucleares não aderentes separadas *ex vivo* de pacientes com câncer.....48

Figura 3. Freqüência de linfócitos T reguladores em células mononucleares não aderentes de pacientes com câncer de mama e de doadoras saudáveis controle. 48

Figura 4. Fotografias representativas de células dendríticas imaturas diferenciadas *in vitro* após 7 dias de cultura em meio RPMI acrescido de 10% de SFB e antibióticos na presença de IL-4 e GM-CSF. 50

Figura 5. Análise fenotípica de células dendríticas imaturas diferenciadas *in vitro*......51

Figura 6. Gráfico da frequência de marcadores de superfície em células dendríticas imaturas diferenciadas *in vitro*. 51

Figura 7. Gráficos da Intensidade Mediana de Fluorescência de moléculas de superfície em dendríticas imaturas diferenciadas *in vitro*......52

Figura 8. Gráficos da expressão de CD80 e CD86 em células dendríticas imaturas diferenciadas *in vitro*......52

Figura 9. Gráficos representativos da fenotipagem e análise das populações de monócitos e células dendríticas sanguíneas de pacientes com câncer de mama. 54

Figura 10. Gráficos da freqüência de moléculas de superfície em monócitos, células dendríticas sanguíneas, células dendríticas imaturas e maduras provenientes de pacientes com câncer de mama. 55

Figura 11. Gráficos da Intensidade Mediana de Fluorescência de moléculas de superfície em monócitos, células dendríticas sanguíneas, células dendríticas imaturas e maduras provenientes de pacientes com câncer de mama. 56

Figura 12. Gráficos representativos do isolamento de linfócitos por selecão imunomagnética......58

Figura 13. Capacidade estimuladora de células dendríticas imaturas de pacientes em linfócitos T. 59

Figura 14. Capacidade linfo-estimuladora de células dendríticas imaturas na geração de linfócitos $CD25^+$. 60

Figura 15. Avaliação da geração de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ por células dendríticas imaturas de pacientes com câncer de mama.....62

Figura 16. Estimulação de diferentes linfócitos isolados por células dendríticas imaturas de pacientes com câncer de mama na geração de linfócitos T reguladores.....63

Figura 17. Gráficos representativos da avaliação da geração de células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ por células dendríticas imaturas de pacientes com câncer. ...63

Figura 18. Avaliação da geração de células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ por monócitos, células dendríticas imaturas e maduras de pacientes com câncer de mama.....64

Figura 19. Análise fenotípica de células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ geradas por células dendríticas imaturas de pacientes com câncer.....66

Figura 20. Avaliação da capacidade supressora de células $CD25^{+}$ geradas em co-cultura com células dendríticas imaturas de pacientes com câncer. 66

Figura 21. Avaliação por ensaio de Bioplex da produção de citocinas nas co-culturas.....68

Figura 22. Avaliação da produção de citocinas por ELISA.....68

Figura 23. Avaliação do papel de TGF-*β* na geração de linfócitos T reguladores por células dendríticas imaturas de pacientes com câncer de mama. 70

Figura 24. Relação da Intensidade Mediana de Fluorescência das moléculas CD80 e CD86 em DCs com a freqüência de linfócitos T reguladores gerados nas co-culturas. 72

Figura 25. Separação das subpopulações de células dendríticas imaturas $CD86^{Low}$ e $CD86^{High}$ de pacientes portadoras de câncer de mama por citometria de fluxo. 72

Figura 26. Avaliação da geração de linfócitos T reguladores por subpopulações de células dendríticas imaturas $CD86^{Low}$ e $CD86^{High}$ de pacientes portadoras de câncer de mama. 73

Figura 27. Gráficos comparativos da geração de linfócitos T reguladores por subpopulações de células dendríticas imaturas $CD86^{Low}$ e $CD86^{High}$ de pacientes com câncer de mama. 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados demográficos de pacientes portadores de câncer e indivíduos saudáveis incluídos na pesquisa.....33

Tabela 2 - Anticorpos utilizados para análise por citometria de fluxo.....38

Tabela 3 - Freqüência e Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) das moléculas de superfície nas populações de células dendríticas imaturas. 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
cAMP	Monofosfato Cíclico de adenosina
CD	“Cluster of differentiation”
CCR7	Receptor 7 de quimiocinas
CFSE	“Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester”
CTLA-4	Proteína 4 Associada a Linfócitos T Citotóxicos
CTLs	Linfócitos T citotóxicos
DCs	Células Dendríticas
DC1	Células Dendríticas mielóides
DC2	Células Dendríticas plasmocitóides
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
Foxp3	*Forkhead Box* P3 (Fator de Transcrição de células T reguladoras)
G-CSF	Fator de Crescimento de Colônias de Granulócitos
GM-CSF	Fator de Crescimento de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
HLA-ABC	Antígenos Leucocitários Humanos-ABC
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano-DR
HSP	Proteína de Choque Térmico
iDCs	Células Dendríticas Imaturas
IFN	Interferon
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iTreg	Células T reguladoras induzidas
LPS	Lipopolissacarídeo (bacteriano)
mDCs	Células Dendríticas Maduras
MFI	Intensidade Mediana de Fluorescência
MHC- I	Complexo Principal de Histocompatibilidade classe I
MHC- II	Complexo Principal de Histocompatibilidade classe II
Mono	Monócitos

MRL	Ensaio de estimulação de linfócitos T alogeneicos
NFκB	Fator Nuclear κB
nTreg	Células T reguladoras naturais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMCs	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PGE2	Prostaglandina E2
Pha	Fitohemaglutinina A
SFB	Soro Fetal Bovino
SK-BR-3	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama
TCR	Receptor de Células T
Th1	Linfócitos T *helper* 1
Th2	Linfócitos T *helper* 2
Th3	Linfócitos T reguladores produtores de TGF-*β*
Th17	Linfócitos T *helper* 17
Tr1	Linfócitos T reguladores produtores de IL-10
Tregs	Linfócitos T reguladores
TGF-*β*	Fator de Crescimento e Transformação *β*
TNF-*α*	Fator de Necrose Tumoral α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

2 OBJETIVOS 29

3 MATERIAL E MÉTODOS 31

3.1 Obtenção das amostras de sangue periférico de pacientes portadores de câncer e de doadoras sadias 32

3.2 Obtenção de monócitos e células dendríticas sanguíneas 34

3.3 Diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos do sangue periférico in vitro 34

3.4 Análise de marcadores de maturação de monócitos e DCs por Citometria de Fluxo 35

3.5 Fenotipagem de linfócitos T por Citometria de fluxo 36

3.6 Marcação intracelular de Foxp3 e CTLA-4 em linfócitos 36

3.7 Separação das subpopulações de células T para co-culturas 40

3.8 Avaliação da atividade estimuladora das DCs 40

3.9 Avaliação da proliferação celular de linfócitos T 40

3.10 Avaliação da geração de células T reguladoras por DCs 41

3.11 Investigação da capacidade supressora de células $CD25^+$ geradas por estimulação de DCs 41

3.12 Detecção da produção de citocinas por BIOPLEX 42

3.13 Detecção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA) 42

3.14 Bloqueio de TGF-β nas co-culturas 43

3.15 Separação de subpopulações de células dendríticas imaturas por Facs-Sorting 43

3.16 Análise estatística 44

4 RESULTADOS 45

4.1 Avaliação da freqüência de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Tregs) circulantes em pacientes portadores de câncer 46

4.2 Caracterização fenotípica de células dendríticas imaturas provenientes de pacientes portadoras de câncer de mama 49

4.3 Caracterização fenotípica de monócitos, células dendríticas sanguíneas, células dendríticas imaturas e células dendríticas maduras provenientes de pacientes portadoras de câncer de mama 53

4.4 Isolamento de subpopulações de linfócitos por microesferas magnéticas para os ensaios de co-cultura 57

4.5 Avaliação da capacidade estimuladora de células dendríticas derivadas de pacientes portadoras de câncer de mama.....58

4.6 Análise da geração de células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ (Tregs) por células dendríticas provenientes de pacientes portadores de câncer de mama.....60

4.7 Avaliação fenotípica e funcional de células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ geradas em co-culturas 64

4.8 Análise da produção de citocinas por células dendríticas e nas co-culturas.....67

4.9 Avaliação da participação de TGF-β na indução de células T reguladoras por iDCs de pacientes com câncer de mama.....69

4.10 Análise da indução de células T reguladoras por subpopulações de iDCs $CD86^{High}$ e $CD86^{Low}$ provenientes de pacientes com câncer de mama 70

5 DISCUSSÃO..... 75

6 CONCLUSÕES..... 84

REFERÊNCIAS 87

1 INTRODUÇÃO

Conhecimentos acumulados ao longo dos anos demonstram que as células dendríticas (DCs) são as células apresentadoras de antígenos (APCs) mais eficazes em iniciar respostas imunes específicas através da ativação de linfócitos T quando em situações de desequilíbrio homeostático gerados em ambientes inflamatórios ou de perigo. As respostas imunes adaptativas são induzidas, coordenadas e reguladas por células dendríticas que em seu estado imaturo possuem características intrínsecas que possibilitam capturar antígenos com grande eficiência nos tecidos periféricos e processá-los em pequenos fragmentos, ao mesmo tempo em que sofrem maturação e migram para os órgãos linfóides secundários para a posterior apresentação desses antígenos para linfócitos T *naive* (MELLMAN; STEINMAN, 2001). A maturação de DCs está associada a uma redução de sua capacidade endocítica e fagocítica, aumento na produção de citocinas inflamatórias e aquisição da capacidade de migração, principalmente através da expressão do receptor para quimiocinas, CCR7 (CAUX et al., 1994a; YANAGIHARA et al., 1998; GUERMONPREZ et al., 2002). A expressão deste receptor permite que as DCs que captaram antígenos dirijam-se aos tecidos linfóides, mais especificamente para as áreas de células T, onde são capazes de recrutar outras DCs e linfócitos, através da liberação de quimiocinas (ADEMA et al., 1997; SOZZANI et al., 1998; SALLUSTO et al., 1999; KATOU et al., 2001). Além disso, a maturação de DCs também é caracterizada pelo aumento da expressão de moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC II) e de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 e CD40) na superfície destas células, que as tornam capazes de ativar de forma efetiva linfócitos T *naive* ou de memória (CAUX et al., 1994b; BANCHEREAU et al., 2000).

As DCs constituem uma população heterogênea tanto em camundongos como em humanos, principalmente pela ampla gama de marcadores moleculares de superfície e os diferentes estágios de maturação e ativação que as caracterizam em distintas subpopulações (ARDAVIN et al., 2001; SHORTMAN; LIU, 2002). Embora seja controverso o sistema de divisão proposto por alguns autores, as DCs humanas podem ser divididas em dois grupos principais: as DCs mielóides ou DC1 ($CD11c^{+}CD123^{neg}$) e DCs

plasmocitóides ou DC2 ($CD11c^{neg}CD123^{+}$). Apesar de essas células serem encontradas em baixa freqüência na circulação, a maioria dos estudos a respeito dessas subpopulações de DCs e sua origem não vêm do isolamento direto dos tecidos, mas sim do desenvolvimento e diferenciação de precursores sanguíneos em cultura (PULENDRAN et al., 1999; PULENDRAN et al., 2001). DCs mielóides podem ser geradas a partir do cultivo de monócitos sanguíneos em presença de GM-CSF e IL-4 (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994) ou ainda através de precursores $CD34^{+}$ cultivados em presença de GM-CSF e TNF-α (MENETRIER-CAUX et al., 1998). DCs mielóides geradas *in vitro* possuem, inicialmente, características de células dendríticas imaturas e podem ser induzidas a maturar, aumentando a expressão, entre outras, das moléculas CD83 e HLA-DR, pela adição de estímulos inflamatórios necessários como TNF-α, IL-1β, LPS e CD40L, entre outros (CAUX et al., 1994a; ROMANI et al., 1996; ZHOU; TEDDER, 1996; VERHASSELT et al., 1997). Outra via de desenvolvimento a partir de monócitos resulta na geração das DC plasmocitóides, (RISSOAN, et al., 1999), células geradas em cultura na presença de IL-3, que podem tornar-se maduras frente a estímulos microbianos ou virais. No entanto, de acordo com estudos realizados (STEINMAN, 1991; BANCHEREAU; STEINMAN, 1998), as células dendríticas mielóides possuem maior capacidade e eficácia na apresentação de antígenos aos linfócitos T quando comparadas aos demais tipos de APCs e são comumente utilizadas em protocolos de imunoterapia.

DCs possuem um papel essencial na determinação do tipo de resposta imune gerada, com evidências de distintos sinais na ativação de células T entre diferentes subtipos de DCs encontradas (SHORTMAN; LIU, 2002). Alguns estudos propõem que as distintas subpopulações, tanto as isoladas de tecidos, quanto as diferenciadas *in vitro*, ativariam diferentes respostas. Rissoan e colaboradores (RISSOAN et al., 1999) mostraram que as DCs mielóides induziam a produção de citocinas inflamatórias (Th1) enquanto as DCs plasmocitóides promoviam uma resposta de perfil Th2, *in vitro*. Por outro lado, um estudo feito por Cella e colaboradores (CELLA et al., 2000) mostrou que DC plasmocitóides produziam IL-12 e induziam uma resposta com perfil Th1 em presença de LPS, enquanto outros fatores, como IL-10, TGF-*β* e PGE2,

podiam estimular DCs mielóides imaturas a induzir uma diferenciação do tipo Th2 (KING et al., 1998; KALINSKI et al., 1999a). Adicionalmente em 2000, Tanaka e colaboradores (TANAKA et al., 2000) mostraram que, em cultura, DCs mielóides induziriam o desenvolvimento de uma resposta com padrão Th1 quando a proporção DC: célula T fosse alta e o padrão Th2 quando esta relação fosse baixa. Outros estudos alertam para a importância da cinética no desenvolvimento de DCs mostrando que células dendríticas recém ativadas produzem grandes quantidades de IL-12, porém perdem esta capacidade após certo período e passam a induzir uma resposta de perfil Th2 (KALINSKI et al., 1999b; LANGENKAMP et al., 2000). Recentemente outros estudos têm focado não somente no balanço imune Th1/Th2 como também na identificação de subtipos de DCs capazes de gerar e/ou expandir subpopulações de linfócitos T reguladores e T *helper* 17. Classicamente, DCs plasmocitóides têm sido relacionadas com a indução de Tregs *in vitro* em diferentes modelos de estudo (OCHANDO et al., 2006; SHARMA et al., 2007; OUABED et al., 2008) e, mais recentemente, com ativação de linfócitos Th17 na encefalomielite autoimune experimental (EAE) em camundongos (ISAKSSON et al., 2009). Paralelamente, a identificação de DCs mielóides $CD11c^{+}CD103^{+}$ periféricas presentes, principalmente, em mucosas murinas revelam alto potencial dessas em induzir células Treg nesse microambiente através da produção de altos níveis de TGF-*β* bioativo e ácido retinóico, promovendo a homeostase da tolerância oral (COOMBES et al., 2007; SUN et al., 2007). Adicionalmente, estudos realizados para a utilização clínica de DCs mielóides no tratamento de doenças auto-imunes revelaram sucesso na indução de DCs tolerogênicas manipuladas *in vitro* sob a influência de citocinas como IL-10, TGF-*β*1 e/ou agentes farmacológicos durante a diferenciação e maturação (HACKSTEIN; THOMSON, 2004). Contudo, o estudo das DCs mostra que este tipo celular apresenta grande heterogeneidade funcional, e é submetido a mecanismos de controle ainda insuficientemente conhecidos, principalmente no estudo de tumores. A possibilidade da geração de DCs *in vitro* foi fator fundamental para a criação de protocolos de imunoterapia com a utilização dessas células, principalmente no desenvolvimento de vacinas antitumorais, como já realizadas em nosso laboratório (BARBUTO et al., 2004). A definição mais precisa dos

fatores que influenciam a diferenciação funcional das DCs pode permitir, portanto, grande ganho na eficiência de seu uso como imunomoduladoras. Um dos obstáculos consideráveis para o sucesso pleno de vacinas antitumorais a base de DCs, ao contrário do que se vê na tolerância oral e tolerância gastrointestinal, é a presença de células T com funções reguladoras no ambiente tumoral (BANCHEREAU; PALUCKA, 2005). Alguns estudos demonstram que células dendríticas possuem grande capacidade em converter linfócitos T em células T supressoras pela diferenciação em Foxp3$^+$ *in vitro* (JONULEIT et al., 2000) ou através da adição de TGF-*β* nas culturas (LUO et al., 2007). Mesmo com os avanços no conhecimento sobre as interações entre células dendríticas e T reguladoras durante o estabelecimento de respostas imunes antitumorais (BANCHEREAU; PALUCKA, 2005; COLOMBO; PICONESE, 2007; BELKAID; OLDENHOVE, 2008) pouco se sabe sobre os mecanismos supressores e/ou reguladores gerados no desenvolvimento de carcinomas mamários.

Diversos subtipos de células T reguladoras CD4$^+$ têm sido descritas em literatura com base em sua origem, mecanismos de geração, perfil da expressão de marcadores e função. As células T reguladoras são populações altamente heterogêneas nos ambientes tumorais e têm a capacidade de mediar efeitos imunossupressores através da produção de fatores solúveis, como citocinas, ou por meio de mecanismos contato-dependente (ZOU 2006; CURIEL 2007a; STRAUSS et al., 2007). Atualmente podem ser identificadas por dois principais segmentos: primeiramente em células T reguladoras naturais (nTreg) originalmente geradas no timo, subdivididas em nTreg Foxp3$^+$ e células T reguladoras naturais produtoras de IL-10 (Tr1) (RONCAROLO et al., 2006) e TGF-*β* (Th3) (FARIA; WEINER, 2005) e ainda em células T reguladoras Foxp3$^+$ induzíveis (iTregs), geralmente diferenciadas de linfócitos T *naive* em tecidos periféricos (CHEN et al., 2003). As células T reguladoras naturais (nTreg), portadoras de fenótipo CD4$^+$CD25$^+$ (KRONENBERG; RUDENSKY, 2005), são as principais células envolvidas no processo de equilíbrio homeostático, compreendendo entre 5-10% das células T CD4$^+$ circulantes. As células T CD4$^+$ que co-expressam, constitutivamente, a cadeia α do receptor de IL-2 (CD25) foram descritas primeiramente em roedores

(PAPIERNIK et al., 1998), e mais posteriormente em humanos (JONULEIT et al., 2001). As células T $CD4^+$ especializadas em suprimir a resposta imune desempenham papel essencial na regulação da resposta e a eliminação ou inativação destas resulta no desenvolvimento de doenças auto-imunes e acentua a resposta imune a aloantígenos e a tumores (SAKAGUCHI et al., 2001; SHEVACH, 2002). O fator de transcrição intranuclear Foxp3 foi descrito como característico da população de células Treg naturais (FONTENOT et al., 2003; HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003) e tem a capacidade de programar o desenvolvimento e função das células Treg, culminando na supressão da resposta imune através, principalmente, do contato célula-célula (SCHUBERT et al., 2001; COFFER; BURGERING, 2004). Outra característica destas células é não responderem a estimulação por TCR como uma célula efetora, entretanto, necessitam da ativação por esta via para se tornarem supressoras e exercerem sua função (THORNTON; SHEVACH, 1998; SHEVACH, 2002). Apesar da ausência de um senso comum sobre a especificidade de células Treg e suas características variantes e dependentes do microambiente de atuação, estudos descrevem que a ação das Treg sobre os linfócitos ativados é antígeno inespecífico e dependente do contato célula-a-célula (THORNTON; SHEVACH, 2000; DIECKMANN et al., 2002; SHEVACH, 2002).

Vários pesquisadores têm focado seus estudos na identificação de marcadores característicos e específicos das células Treg $CD4^+CD25^+$ que ocorrem naturalmente, o qual facilitaria a identificação das mesmas. Assim, como revisto por Sakaguchi e colaboradores (SAKAGUCHI et al., 2010), além da expressão constitutiva de CD25 e Foxp3, as células Treg apresentam várias moléculas de superfície tais como: $CD45RO^+$, $CD62L^+$, $CD95^+$, CTLA-4^+, $GITR^+$, $iCOS^+$, $CD103^+$, $CD127^{low}$, $PD1^+$ entre outros, podendo ser modulados conforme seu estado de ativação. Acredita-se que a ação das células Treg sobre as APCs humanas e murinas podem ser diversas. Especificamente em DCs, as Tregs podem promover a diminuição da expressão de moléculas codificadas pelo MHC II e de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 via LAG-3 e CTLA-4 respectivamente, mantendo estas em seu estado imaturo; podem inibir a secreção de citocinas pró-inflamatórias aumentando o limiar da produção de IL-10; promovem a deprivação de ATP do meio extracelular,

essencial para a maturação das DCs; e ainda podem manter-se aderidas as DCs via Nrp-1 por longos períodos, o que impede que a apresentação de antígenos seja realizada (revisto por SHEVACH, 2009). As células Treg atuam também sobre os linfócitos e influenciam principalmente sua função por aumentarem a expressão de receptor de TGF-*β* e por reduzir sua capacidade proliferativa, induzindo anergia, apoptose e ainda, a conversão destas células em um fenótipo regulador (NI; REDMOND, 2006). Estudos destacam ainda que alguns mecanismos de controle da resposta imune adaptativa mediado por Tregs podem ser induzidos pela liberação de citocinas supressoras como IL-10, TGF-*β* e IL-35; a produção de AMP cíclico e granzima B, e ainda, indiretamente, pelo alto consumo de IL-2 do microambiente devido à sua alta expressão do receptor IL-2Rα (CD25) (revisto por SHEVACH, 2009).

Muitos estudos têm feito associações entre a presença de células T reguladoras e os mecanismos de escape em diversos tipos de tumores (ZOU, 2005; ZOU, 2006; CURIEL, 2007b). Evidências indicam que o caráter supressor das células T reguladoras pode ser apontado como uma das cruciais vias para o escape tumoral e um dos principais obstáculos para o sucesso da imunoterapia antitumoral (SHEVACH, 2002; DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; SAKAGUCHI, 2005; ZOU, 2005). Em diversos tipos de tumores observa-se um aumento do número de células T reguladoras no sangue periférico e no tecido tumoral (CURIEL et al., 2004; ZOU, 2006; STRAUSS et al., 2007). São conhecidos atualmente vários processos no qual as células Tregs são peça fundamental no controle de respostas imunes, no entanto muito dos mecanismos cruciais na geração dessas células são devidos a atuação de células dendríticas amplamente heterogêneas em diferentes sítios infecciosos e tumorais (BELKAID; OLDENHOVE, 2008). Vários estudos demonstram que um aumento no número destas células em cânceres como de pâncreas (LIYANAGE et al., 2002), mama (LIYANAGE et al., 2002), pulmão (WOO et al., 2002) e ovário (CURIEL et al., 2004) se relacionam com uma menor sobrevivência dos pacientes.

O câncer é uma patologia de natureza genética caracterizada pela diferenciação anormal de células sadias, presentes em órgãos ou tecidos, que perdem a capacidade de manterem-se em homeostase, apresentando assim

alterações em sua maquinaria celular. Tais mudanças estão ligadas, principalmente, ao controle da proliferação, aos mecanismos de apoptose e a alta instabilidade genômica. Como conseqüência inicial desses fatos, tais células podem originar tumores primários, desenvolvidos em seu tecido de origem e tardiamente podem adquirir a capacidade de migração, invasão e crescimento em sítios secundários (diferentes dos sítios de formação dos tumores primários), caracterizando assim em metástases. Segundo dados estatísticos do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de mama representa, nos países ocidentais, uma das principais causas de morte entre mulheres e no Brasil para 2010 eram esperados 49.240 novos casos de câncer de mama, ou seja, 49 novos casos a cada 100 mil mulheres. Os estudos estatísticos indicam o aumento de sua freqüência tantos nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento (RADICE; REDAELLI, 2003; JEMAL et al., 2004). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nas décadas de 60 e 70 registrou-se um aumento de 10 vezes nas taxas de incidência ajustadas por idade nos Registros de Câncer de Base Populacional de diversos continentes. No Brasil esse tipo de câncer é o que mais gera mortalidade entre as mulheres. Muito dos avanços no campo de combate a esse tipo de câncer se dá através dos avanços no desenvolvimento de metodologias de prevenção e prognóstico que crescem a cada dia. A identificação de marcadores moleculares dos cânceres em geral e das demais células, também do sistema imune, envolvidas no processo tumoral, têm despertado grande interesse na comunidade científica, uma vez que os mesmos podem ser utilizados no diagnóstico precoce da doença, na avaliação do prognóstico da paciente e também na determinação da conduta terapêutica (DOWSETT, 1998; SRIVASTAVA; GOPAL-SRIVASTAVA, 2002; KEEN; DAVIDSON, 2003).

Outra vertente de pesquisas muito recorrentes nos dias atuais, são os conhecimentos gerados na descoberta de antígenos associados a tumores (TAAs), identificados pela própria resposta imune dos pacientes (GERVOIS et al., 1990; PANDOLFINO et al., 1992; VAN DER BRUGGEN et al., 1994). Dentre os diversos antígenos tumorais mais estudados atualmente, pode-se citar o HER-2/neu, superexpresso em 20-40% dos tumores de mama, 20-25%

dos carcinomas de ovário e 80-85% dos adenocarcinomas coloretais e de pâncreas, como revisto por Baxevanis et al. (2006). A expressão de HER-2/neu por células tumorais em pacientes é capaz de estimular tanto a resposta imune humoral quanto a celular em boa parte dos pacientes, podendo ser reconhecidas por CTLs (FISK et al., 1995; DISIS; CHEEVER, 1997; JAGER et al., 2000; KIESSLING et al., 2002). No entanto, a escolha do antígeno tumoral como alvo terapêutico e a resposta T específica podem não ser os únicos fatores de avaliação no que se diz respeito à indução de uma resposta imune antitumoral eficaz. Estudos clínicos recentes realizados para o tratamento de câncer de colo do útero indicaram elevada ativação e proliferação de linfócitos HPV16 E6/E7 específicos após a vacinação das pacientes, no entanto a grande maioria desses linfócitos se caracterizou pelo fenótipo $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ e por seu alto potencial supressor, o que de fato anula a potencialidade desse alvo imunoterapêutico (WELTERS et al., 2010).

No contexto da imunologia contra tumores, o sucesso ou falha da eliminação de células neoplásicas pode, muitas vezes, estar relacionado ao balanço entre imunidade e tolerância durante o estabelecimento de uma resposta imune antitumoral. Células tumorais podem não somente proliferar e disseminar no organismo como também mimetizam mecanismos utilizados pelo sistema imune para a diminuição/supressão da resposta imune assim como a geração de respostas adaptativas do tipo Th2 ou T regulador. Entre esses se destacam: a produção de citocinas imunossupressoras, como TGF-*β* (TADA et al., 1991) ou IL-10, IL4 e IL5 (YAMAMURA et al., 1993); a expressão de moléculas de co-estímulo negativo, como PD-L1 (B7-H1) (BLANK; MACKENSEN, 2007) e moléculas relacionadas à indução de apoptose, como FAS-L (CD95L) (GORDON; KLEINERMAN, 2009). As interações promovidas entre células cancerígenas, células teciduais e o sistema imune, presentes no microambiente tumoral, proporcionam um conjunto de fatores, tanto locais como sistêmicos, favorecedores do crescimento, do escape e da “proteção” das células tumorais, reduzindo e/ou atenuando a eficiência de tratamentos imunoterapêuticos. Alguns autores defendem ainda que a ausência de uma fase aguda durante o desenvolvimento do processo tumoral poderia influenciar diretamente a qualidade da apresentação dos antígenos assim como a

ativação dos linfócitos T e geração de respostas adaptativas mais complexas (ZOU, 2005).

Considerando o contexto apresentado, o presente estudo visa amplificar os conhecimentos sobre as interações entre células do sistema imune atuantes no processo de ativação ou regulação da resposta antitumoral efetiva, buscando investigar o papel imunomodulador de células dendríticas a cerca do desenvolvimento do câncer de mama.

2 OBJETIVOS

O presente estudo visou investigar e comparar o potencial estimulador de células dendríticas derivadas de indivíduos sadios e indivíduos portadores de câncer quanto à capacidade tolerogênica na estimulação de linfócitos T reguladores *in vitro*. Especificamente pretendeu-se:

1) Comparar a freqüência inicial de células T com fenótipo regulador presentes no sangue periféricos de pacientes portadores de carcinoma mamário e doadoras saudáveis;

2) Caracterizar fenotipicamente e avaliar a capacidade de monócitos, DCs imaturas e DC maduras, obtidas de indivíduos portadores de câncer na geração/expansão de linfócitos T com fenótipo regulador;

3) Avaliar a atividade “reguladora” dos linfócitos estimulados *in vitro* pelas diferentes APCs sobre a estimulação de PBMCs alogenêicas previamente ativadas;

4) Investigar possíveis mecanismos envolvidos na indução de linfócitos T reguladores por células dendríticas de pacientes com câncer de mama.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras de sangue periférico de pacientes portadores de câncer e de doadoras sadias

Cerca de 30 ml de sangue periférico (PBMCs) foram coletados de pacientes portadores de câncer e de doadoras saudáveis, em tubos BD Vacutainer® (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) heparinizados após consentimento por escrito dos doadores e sob prévia aprovação dos comitês de ética e pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas e do Hospital Pérola Byington. Para o estudo principal foram considerados como critérios de elegibilidade, pacientes portadores de câncer de mama do sexo feminino e doadoras sadias, com idade superior a 18 anos e peso acima de 50 Kg. A tabela contendo os dados demográficos dos indivíduos da pesquisa está representada na página a seguir (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados demográficos de pacientes portadores de câncer e indivíduos saudáveis incluídos na pesquisa

Indivíduo	Idade	Sexo	Diagnóstico
P.01	54	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.02	49	F	Câncer do colo do útero
P.03	65	F	Câncer do colo do útero
P.04*	67	F	Sarcoma do endométrio
P.05	58	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.06	57	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.07	71	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.08	44	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.09	46	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.10	53	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.11	55	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.12	55	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.13	76	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.14	48	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.15	42	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.16	66	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.17	44	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.18	62	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.19	63	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.20	40	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.21	60	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.22	57	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.23	64	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.24	70	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.25	40	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.26	62	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.27	63	F	Carcinoma mamário ductal invasivo
P.28	50	M	Glioblastoma Multiforme
P.29	70	M	Glioblastoma Multiforme
P.30	66	M	Glioblastoma Multiforme
P.31	78	M	Adenocarcinoma gástrico
P.32	09	M	Linfoma de célula T
C.01	54	F	Controle saudável
C.02	40	F	Controle saudável
C.03	39	F	Controle saudável
C.04	55	F	Controle saudável
C.05	53	F	Controle saudável
C.06	53	F	Controle saudável

(P.= paciente; C.= controle; M= masculino; F= feminino; *amostra não utilizada, a paciente apresentava linfocitose no momento da doação da amostra).

3.2 Obtenção de monócitos e células dendríticas sanguíneas

Para a purificação de monócitos e células dendríticas sanguíneas, cerca de 30 mL do sangue foram coletados, diluídos em PBS estéril e colocados em tubos plásticos cônicos de 50 mL, aos quais foram acrescentados, no fundo do tubo, 12 mL de Ficoll-Paque. O material foi submetido a um gradiente de centrifugação, primeiramente a 900 g por 30 minutos, a 18 ºC. A camada de células mononucleares formada foi retirada, colocada em outro tubo juntamente com meio de cultura RPMI 1640 e centrifugada a 600g por 10 min, e posteriormente lavadas por mais 2 vezes a 300 g e 200 g, respectivamente, para eliminação das plaquetas. O *pellet* celular foi coletado, as células quantificadas, ressuspendidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) (R-10; Sigma) acrescido de antibiótico-antimicótico (100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 25 µg/ml anfotericina, Gibco, EUA) e utilizadas para os experimentos de fenotipagem ou de co-cultura com linfócitos, conforme os itens seguintes.

3.3 Diferenciação de células dendríticas derivadas de monócitos do sangue periférico *in vitro*

Para a purificação de células mononucleares, cerca de 30 mL do sangue foram coletados, diluídos em PBS estéril e colocados em tubos plásticos cônicos de 50 mL, aos quais foram acrescentados, no fundo do tubo, 12 mL de Ficoll-Paque. O material foi submetido a um gradiente de centrifugação, primeiramente a 900 g por 30 minutos, a 18 ºC. A camada de células mononucleares formada foi retirada, colocada em outro tubo juntamente com meio de cultura RPMI e centrifugada a 600 g por 10 min, e posteriormente lavadas por mais 2 vezes a 300 g e 200 g, respectivamente, para eliminação das plaquetas. O *pellet* celular foi coletado, as células quantificadas, ressuspendidas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) (R-10; Sigma) acrescido de antibiótico-antimicótico (100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 25 µg/ml anfotericina, Gibco, EUA) e colocadas em placa de cultura de 6 poços, na concentração de $1x10^7$/mL e

foram mantidas em estufa de CO_2 em período *over-night* (de 15-18hs) a 37 ºC, para aderência. Após esse período, as células não-aderentes foram retiradas e fenotipadas ou congeladas a -70 ºC com DMSO e as aderentes cultivadas por 7 dias em meio R-10 acrescido de 50 ng/mL de IL-4 e 50 ng/mL de GM-CSF. Para a obtenção de células dendríticas maduras, utilizadas em alguns experimentos, foi adicionado 50 ng/mL de TNF-α no quinto de cultura como estímulo de maturação. Após o período de cultura, as placas foram submetidas a um banho de gelo por cerca de 10 minutos, para facilitar a retirada e coleta das células aderentes. Estas foram lavadas em meio RPMI e testadas em sua viabilidade por sua capacidade de excluir o Azul de Trypan (0,4%), em seguida foram submetidas à análise fenotípica por citometria de fluxo, assim como, utilizadas para os demais ensaios do estudo.

3.4 Análise de marcadores de maturação de monócitos e DCs por Citometria de Fluxo

DCs e monócitos foram avaliados quanto ao seu fenótipo de membrana através da marcação de moléculas de superfície com anticorpos monoclonais. Para determinação do fenótipo de membrana, células obtidas das culturas foram marcadas com anticorpos monoclonais comerciais (BD Pharmigen) específicos seguintes: CD11c (DCs mielóides), CD123 (DCs plasmocitóides), CD80 (molécula co-estimuladora), CD86 (molécula co-estimuladora), CD83 (maturação de DC), CD40 (ativação celular), CD1a (DC derivadas de monócitos *in vitro*), CD274 (PD-L1 – molécula de co-estímulo negativo), HLA-ABC (MHC de classe I), HLA-DR (MHC de classe II) e *lineage* (negativo para CD56, CD3, CD19, CD14 – nos estudos iniciais). Células obtidas das culturas foram contadas em alíquotas de $1x10^5$ células, foram colocadas em tubos plásticos (Eppendorf) de 1,5 mL e lavadas/centrifugadas três vezes por 10 segundos, a 13000 rpm, a 4 ºC contendo 200 µL de tampão para citometria (PBS suplementado com 0,5% de soroalbumina bovina e 0,02% de azida sódica) para obtenção de um *pellet*, ao qual foram adicionados anticorpos específicos para os marcadores de interesse. Em seguida, foram incubadas por 20 min a 4 ºC com os anticorpos de interesse. Após este período, o material foi

lavado por duas vezes (10 segundos, a 13000 rpm, a 4 ºC) novamente com 200 µL de tampão para citometria (PBS suplementado com 0,5% de soroalbumina bovina e 0,02% de azida sódica). Após as lavagens, as células, já marcadas, foram ressuspensas em 300 µL de PBS-formol a 1% com a leitura realizada em citômetro de fluxo (FACS Calibur - BD). Os dados obtidos foram analisados usando-se o *software* FlowJo versão 7.2.4 (Three Star). A listagem dos anticorpos e fluorocromos utilizados, bem como suas funções são apresentados na tabela 2 e quadro 1, respectivamente.

3.5 Fenotipagem de linfócitos T por Citometria de fluxo

A fenotipagem dos linfócitos humanos para moléculas de superfície foi realizada por citometria de fluxo conforme protocolo padrão, já descrito no item três. As células foram lavadas e incubadas com os anticorpos específicos conjugados com fluorocromos por 20 minutos a 4 °C para as seguintes moléculas conforme a necessidade dos experimentos: CD3 (marcador específico de linfócitos T), CD4 (subpopulação de linfócito T), CD8 (subpopulação de linfócito T), CD25 (linfócitos T ativados e reguladores), CD45RA (linfócitos T *naive*), CD45RO (linfócitos T de memória), CD127 (expressão baixa em linfócitos T reguladores) e PD-1 (programador de morte 1). A listagem dos anticorpos e fluorocromos utilizados, bem como suas funções são apresentados na Tabela 2 e Quadro 1, respectivamente.

3.6 Marcação intracelular de Foxp3 e CTLA-4 em linfócitos

Para a marcação de Foxp3 e CTLA-4 (CD152), células mantidas em co-cultura por 6 dias foram retiradas e primeiramente lavadas em tampão para citometria (protocolo padrão). Em seguida foi realizada a marcação das moléculas de superfície CD4 e CD25 e, em alguns experimentos, CD127, CD45RO e PD-1 (como descrito no item III.3). Após a incubação dos anticorpos de superfície e as lavagens, as marcações de Foxp3 e CTLA-4 foram realizada através da utilização de *kit PE Anti-Human Foxp3 Staining Set* (eBioscience, San Diego, CA, EUA – cod. 72-5774-40), seguindo as instruções do fabricante.

Após centrifugação dos tubos a 1.500 rpm por 5 minutos, as células foram ressuspendidas em 500 µL/tubo de solução permeabilizadora/fixadora diluída 1:4 e incubadas por 45 minutos a 4 ºC no escuro. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de tampão de lavagem (SFB diluído em água Milli-Q 1x) a 1.500 rpm por 5 minutos. Os anticorpos anti-Foxp3, anti-IgG1k (inespecífico) e anti-CTLA-4 foram então adicionados, seguido de nova incubação por 30 minutos a 4 ºC. As células foram então lavadas por mais duas vezes, ressuspendidas em tampão para citometria, lidas imediatamente no citômetro de fluxo (FACS Calibur - BD Biosciences) e analisadas posteriormente com o *software* FlowJo 7.2.5 (Tree Stars Inc.). As marcações intracelulares foram consideradas positivas partindo da marcação basal de anticorpos monoclonais controles (IgG1kappa) para a confirmação. A listagem dos anticorpos e fluorocromos utilizados, bem como suas funções são apresentados na tabela 2 e quadro 1, respectivamente.

Tabela 2 - Anticorpos utilizados para análise por citometria de fluxo

Molécula	Clone	Isótipo	Fluorocromo
CD1a	HI149	IgG1, k	PE
CD3	HIT3a	IgG2a, k	FITC; APC
CD4	RPA-T4	IgG1, κ	FITC ; PE
CD8	SK1	IgG1, κ	PerCP
CD8	RPA-T8	IgG1, κ	PE-Cy5
CD11c	B-Iy6	IgG1, k	PE
CD14	M5E2	IgG2a, k	FITC; PE
CD19	HIB19	IgG1, k	FITC
CD25	2A3	IgG1, κ	APC
CD40	5C3	IgG1, k	PE-Cy5
CD45RA	HI100	IgG2b, k	APC
CD45RO	UCHL1	IgG2a, k	APC
CD56	NCAM16.2	IgG2b, k	FITC
CD80	L307.4	IgG1, k	PE-Cy5
CD83	HB15e	IgG1, k	PE-Cy5
CD86	2331 (FUN-1)	IgG1, k	PE
CD123	9F5	IgG1, k	PE-Cy5
CD127	HIL-7R-M21	IgG1, k	PERCP-Cy5
CD152	BNI3	IgG2a, k	PE-Cy5
CD274	MIH1	IgG1, κ	PE
CD279	MIH4	IgG1, κ	APC
FOXP3	259D/C7	IgG1	PE
HLA-ABC	G46-2.6	IgG1, κ	FITC, PE, PE-Cy5
HLA-DR	L243 (G46-6)	IgG2a, k	APC

Quadro 1 - Funções conhecidas das moléculas analisadas

Moléculas	Expressão Celular Principal	Principais funções atribuídas
CD1a	Timócitos e células dendríticas	Apresentação de antígenos não-peptídicos (lipídicos e glicolipídicos) a algumas células T
CD3	Linfócitos T e timócitos	Transdução de sinal do TCR
CD4	Subpopulação de linfócitos T, timócitos, monócitos e macrófagos	Co-receptor de sinalização e adesão de linfócitos T
CD8	Subpopulação de linfócitos T e timócitos	Co-receptor de sinalização e adesão de linfócitos T
CD11c	Monócitos, macrófagos, granulócitos, células dendríticas, células NK	Integrina; adesão de monócitos ao endotélio e às proteínas da matriz extracelular, principal integrina de macrófagos e células dendríticas
CD14	Monócitos, macrófagos e granulócitos	liga-se ao complexo de LPS, necessária para a ativação do macrófago induzida por LPS
CD19	Maioria dos linfócitos B	Formação do complexo CD19-CD21-CD81 para ativação de linfócitos B via BCR
CD25	Linfócitos T e B ativados, macrófagos ativados	Receptor da cadeia α de IL-2; liga-se a IL-2, subunidade de IL-2R
CD40	Linfócitos B, macrófagos, células dendríticas, células endoteliais	Liga-se ao CD154 (ligante de CD40); papel na ativação de linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e células endoteliais
CD45RA	Linfócitos T *naive*, linfócitos B e monócitos *naive*	Papel crítico na sinalização mediada pelo receptor antigênico de linfócitos B e T *naive*
CD45RO	Linfócitos T de memória, subconjuntos de linfócitos B, monócitos e macrófagos	Papel crítico na sinalização mediada pelo receptor antigênico de linfócitos T e B de memória
CD56	Células NK, subpopulações de linfócitos T e B, cérebro	Superfamília das imunoglobulinas; Adesão homotípica
CD80	Células dendríticas, linfócitos B e macrófagos	Co-estimulador para ativação de linfócitos T, ligante para CD28 e CD152 (CTLA-4)
CD83	Células dendríticas e de Langerhans, linfócitos B do centro germinativo	Liga-se ao ácido siálico, tem expressão aumentada em células dendríticas maduras
CD86	linfócitos B e T, monócitos, células dendríticas	Co-estimulador para ativação de linfócitos T, ligante para CD28 e CD152 (CTLA-4)
CD123	Monócitos, macrófagos, megacariócitos	Cadeia α do receptor de IL-3; Liga-se a IL-3 e em associação com CD131, medeia efeitos biológicos de IL-3
CD127	Precursores de linfócitos, linfócitos T e reduzido em Tregs humanas	Cadeia α do receptor de IL-7; Liga-se a IL-7 e em associação com CD132, medeia efeitos biológicos de IL-7
CD152 (CTLA-4)	Linfócitos T ativados e T reguladores	Pode ligar-se a CD80 e CD86 nas APCs e promover a sinalização inibitória nos linfócitos T
CD274 (PD-L1)	Macrófagos, monócitos células dendríticas, linfócitos T	Molécula de co-estímulo negativo liga-se ao PD-1 em linfócitos e promove sua inativação
CD279 (PD-1)	Linfócitos T , B e células mielóides ativadas	Molécula responsável por receber sinais de inibição nos linfócitos após a ligação via PD-Ls
Foxp3	células T reguladoras e transitório em células T ativadas	Fator de transcrição de células T reguladoras
HLA-ABC	Todas as células	Moléculas de classe I do MHC
HLA-DR	Monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B	Moléculas de classe II do MHC

Fonte: Abbas et al. (2003)

3.7 Separação das subpopulações de células T para co-culturas

Nos experimentos de co-cultura, linfócitos provenientes de doadores saudáveis ou pacientes, foram 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), anti-CD4 (separação da sub-população de linfócitos T) e anti-CD25 (depleção ou separação de células ativadas) e posteriormente magneticamente selecionadas por *MACS®-sorting* de acordo com as instruções do fabricante. Para análise da pureza das subpopulações isoladas foi realizada citometria de fluxo após cada procedimento de separação celular considerando-se aceitável a pureza ≥ 95%.

3.8 Avaliação da atividade estimuladora das DCs

Na avaliação da capacidade estimuladora das células dendríticas geradas *in vitro*, DCs provenientes de indivíduos sadios ou pacientes foram co-cultivadas com linfócitos T $CD3^+$ autólogos ou alogeneicos previamente corados por CFSE, na proporção 1 DC: 10 linfócitos T, em um volume final de 300 µL/poço (meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e antibióticos-antimicóticos), 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 37º C, quando o perfil linfocitário foi avaliado.

3.9 Avaliação da proliferação celular de linfócitos T

Nos ensaios de avaliação da proliferação celular, linfócitos T $CD3^+$ foram incubados em tampão PBS-BSA 0,1%, contendo 5µM de CFSE (LYONS, 2000). A incubação foi feita a 37 ºC, no escuro, por 10 min. Após este período, as células foram lavadas duas vezes em meio RPMI gelado, suplementado com 10% de soro bovino fetal, condicionadas por 5 minutos em gelo e posteriormente lavadas em RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino para os ensaios de co-cultura. Os linfócitos foram co-cultivados com diferentes DCs, como descrito no item oito, e ao término da cultura (5 dias),

foram marcados com anticorpos de superfície anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e a diluição do CFSE foi avaliada por citometria de fluxo (FACS Calibur - BD). Os dados obtidos foram analisados usando-se o *software* FlowJo versão 7.2.5 (Three Star).

3.10 Avaliação da geração de células T reguladoras por DCs

Para avaliar a capacidade de DCs na geração de células Treg, DCs provenientes de indivíduos sadios ou pacientes foram co-cultivadas com linfócitos T $CD3^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ ou T $CD4^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ (previamente isolados por *beads* magnéticas e confirmados por citometria de fluxo) autólogos ou alogeneicos, na proporção 1 DC: 10 linfócitos, em um volume final de 300 µL/poço (meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB), em placa de 96 poços em fundo “U”. As células foram mantidas por seis dias em estufa com atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água a 37 ºC. A freqüência de células geradas apresentando fenótipo característico de Tregs ($CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}CTLA\text{-}4^{+}$ ou $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}C127^{low}$) foi determinada por citometria de fluxo ao final do tempo de cultura, sempre considerando a população inicial (Foxp3 negativa) utilizada.

3.11 Investigação da capacidade supressora de células $CD25^{+}$ geradas por estimulação de DCs

Após o término das co-culturas entre linfócitos $CD3^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ e DCs provenientes de indivíduos sadios ou pacientes, a população de células $CD25^{+}$ resultante foi isolada por *beads* magnéticas e colocada em co-cultura com PBMCs alogeneicas (1 $CD25^{+}$: 10 PBMCs) previamente coradas com CFSE e sob a estimulação por fitohemaglutinina (PHA) durante 3 dias em estufa com atmosfera contendo 5% de CO_2 a 37 ºC. Ao fim do tempo de cultura as células foram retiradas da placa e avaliou-se a diluição de CFSE por citometria de fluxo das PBMCs ativadas por PHA. O cálculo de capacidade supressora foi realizado pela fórmula a seguir.

% de Supressão = MFI (Pha) / MFI (exp). x 100.

Onde: *MFI Pha* = MFI de CFSE das PBMCs ativadas por fitohemaglutinina

MFI exp.= MFI de CFSE das PBMCs ativadas por fitohemaglutinina adicionadas de células $CD25^+$ de co-culturas com iDCs de doadoras controle ou de iDCs pacientes com câncer de mama.

3.12 Detecção da produção de citocinas por BIOPLEX

Sobrenadantes das co-culturas foram submetidos ao ensaio de detecção da produção das citocinas: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17, TNF-α, IFN-γ, pela técnica de BIOPLEX. O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante (Multiplex, Millipore).

3.13 Detecção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Para detecção das citocinas IL-10 e IFN-γ nos sobrenadantes das culturas foram utilizados os kits BD OptEIA™ para citocinas (BD Biosciences) e para TGF-*β*1 (bioativo) foi utilizado kit TGF-beta1 Ready-SET-Go!® (eBioscience, San Diego, CA, EUA). Nestes ensaios, placas de 96 poços de fundo chato Maxisorp (Nunc) foram sensibilizadas com 50 µL/poço do anticorpo (Ac) de captura para cada citocina, diluído em tampão $NaCO_3$ (pH 9,5) e mantidas a 4 ^oC *"overnight"*. Após três lavagens com 200µL/poço de tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20, pH 7,2), as placas foram bloqueadas com 200 µL/poço de tampão de bloqueio (PBS com 10% de soro fetal bovino) por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, após Três lavagens, as amostras e a curva-padrão foram incubadas por um período de 2 h em temperatura ambiente. Para a curva-padrão, citocinas recombinantes foram incubadas em duplicatas de 45 µL por poço das diluições seriadas (fator 2 de diluição), conforme recomendações do fabricante. Após 5 lavagens, foram adicionados 50µL/poço de Ac de detecção diluído em tampão de bloqueio, juntamente com estreptoavidina, seguindo-se uma nova incubação por 1 h, à temperatura ambiente, no escuro. Após esse período a placa foi lavada sete

vezes e adicionou-se 50µL/poço de substrato (H_2O_2 e tetrametilbenzidina, BD Biosciences) foram adicionados, com incubação de 30 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. Por fim, 50µL/poço de H_2SO_4 (2N) foram adicionados para interromper a reação e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm. O cálculo das concentrações foi feito com auxílio do *software* Softmax Pro, através da equação de regressão linear com base na curva padrão e a análise de dados foi executada com auxílio do *software* Prisma versão 5.

3.14 Bloqueio de TGF-*β* nas co-culturas

No dia zero das co-culturas de iDCs de pacientes com linfócitos $CD4^{+}CD25^{neg}$ alogeneicos, foram adicionado anticorpos neutralizadores anti-TGF-*β* na concentração de 1 ng/ml (R;D Systems) diluídos em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma) contendo antibiótico-antimicótico (100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 25 µg/ml anfotericina, Gibco, EUA).

3.15 Separação de subpopulações de células dendríticas imaturas por *Facs-Sorting*

Cerca de 10^6 iDCs diferenciadas de monócitos de pacientes com câncer de mama após 7 dias de incubação na presença de GM-CSF e IL-4 foram retiradas da placa de cultura, lavadas em meio RPMI-1640 e em seguida lavadas em tampão de Facs estéril por duas vezes. Posteriormente promoveu-se a incubação das mesmas com anticorpos anti-CD86 (PE) na concentração ideal, a lavagem em tampão de Facs padrão e a ressuspensão das mesmas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino acrescido de antibióticos-antimicóticos. No passo seguinte, as iDCs foram submetidas ao *sorting*, inicialmente pela seleção por tamanho e granulosidade característicos e subseqüentemente pelas subpopulações $CD86^{High}$ e $CD86^{Low}$ com a utilização do *FacsCalibur* (BD Biosciences) através do software *CellQuest*. Os

dados relativos a eficiência de separação por *Facs-sorting* foram analisados usando-se o *software* FlowJo versão 7.2.5 (Three Star).

3.16 Análise estatística

Os dados obtidos foram, inicialmente, submetidos à análise quanto ao padrão de distribuição normal (Gaussiana) e em seguida, utilizou-se o teste t (t Student) pareado para verificar as diferenças entre os dados gerados por células dendríticas de pacientes e indivíduos saudáveis. Para a análise estatística entre monócitos, iDCs e mDCs de pacientes foi utilizado o teste de variância ANOVA com pós teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $p \leq 0,05$ (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,0001$) nos resultados analisados. A análise estatística e os gráficos apresentados foram gerados com auxílio do *software* GraphPad Prisma versão 5 para Windows.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da freqüência de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Tregs) circulantes em pacientes portadores de câncer

Células não aderentes (CNAs) frescas, obtidas do dia zero das culturas de diferenciação de células dendríticas de pacientes e indivíduos controle, foram submetidas à fenotipagem por citometria de fluxo quanto a marcadores de superfície (CD4, CD25, CD127, PD-1, CD45RO) e intracelulares (Foxp3 e CTLA-4), característicos de células T reguladoras (embora a molécula CTLA-4 seja de superfície, sua detecção é mais sensível quando as células são submetidas a protocolo de marcação intracelular). Após a marcação das células com anticorpos específicos e a leitura em citômetro de fluxo, os dados foram analisados com o *software* FlowJo versão 7.2.4 (Tree Stars). Para tal, realizou-se um *gate* na população de linfócitos respeitando-se os parâmetros de tamanho (FSC – *forward scatter*) por granulosidade (SSC – *side scatter*) (Figura 1A), e nestes, avaliou-se a expressão isolada de CD25 (Figura 1B), e nas células positivas para este marcador, a expressão de CD4 e Foxp3 simultaneamente em pacientes e em indivíduos controle (Figura 1C e 1D). A expressão de Foxp3, por ser intranuclear e variar entre experimentos, foi avaliada com a utilização de anticorpos isotipo-controle em todos os experimentos. Com a finalidade comparativa, pacientes portadores de diferentes tipos de tumores foram selecionados para a análise da freqüência de células circulantes com fenótipo regulador. Os resultados obtidos indicaram uma maior freqüência de Tregs ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) em pacientes com câncer de mama, de colo do útero e adenocarcinoma gástrico quando comparados ao controle (Figura 2). Sabendo que pacientes com câncer de mama apresentavam indicativos de diferenças na freqüência de Tregs periféricas, focamos e aumentamos o número dos indivíduos do estudo e nossos dados revelaram que a freqüência de Tregs em pacientes com câncer de mama foi significativamente maior (19,5% ± 2,33 x 8,0 % ± 2,3; $*p \leq 0,05$) quando comparada aos indivíduos controle (Figura 3A), com a expressão de CTLA-4 mostrou-se similar nos dois grupos analisados (Figura 3B). Em células de pacientes, células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, foram selecionadas para a avaliação de

marcadores característicos de células T reguladoras CTLA-4, CD127, PD-1 e CD45RO (Figura 3C).

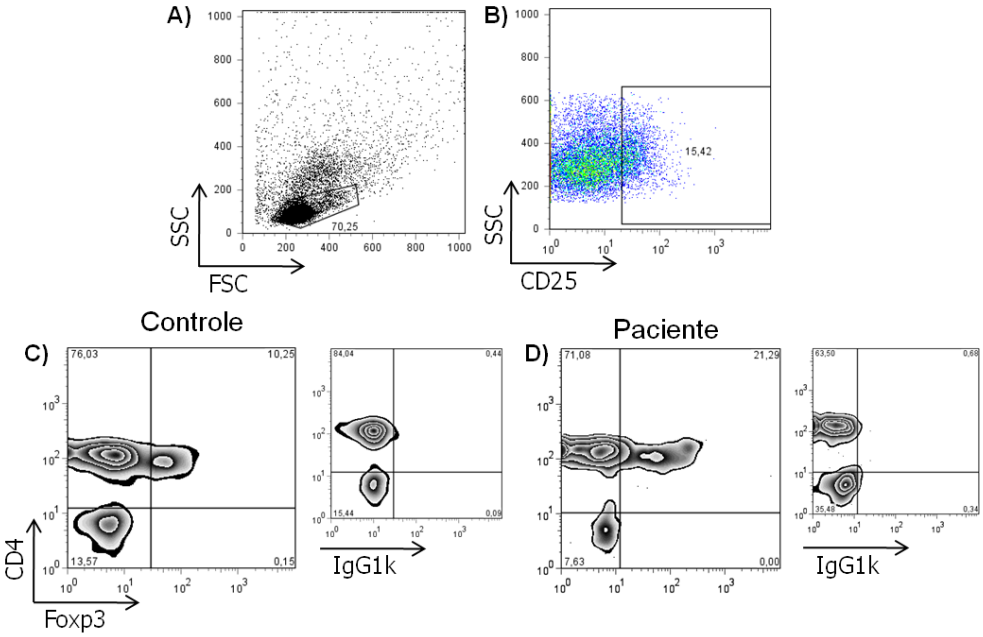


Figura 1. Gráficos representativos das análises fenotípicas realizadas para avaliação de células T reguladoras em células mononucleares não aderentes As análises foram realizadas primeiramente por *gates* realizados em tamanho por granulosidade na população de linfócitos (A), seguido pela seleção de células $CD25^{+}$ (B) e posteriormente pela avaliação da expressão de CD4 e Foxp3 de maneira simultânea em pacientes e controles (C e D). Anticorpos de Isotipo controle foram utilizado para validar a análise da marcação intranuclear de Foxp3.

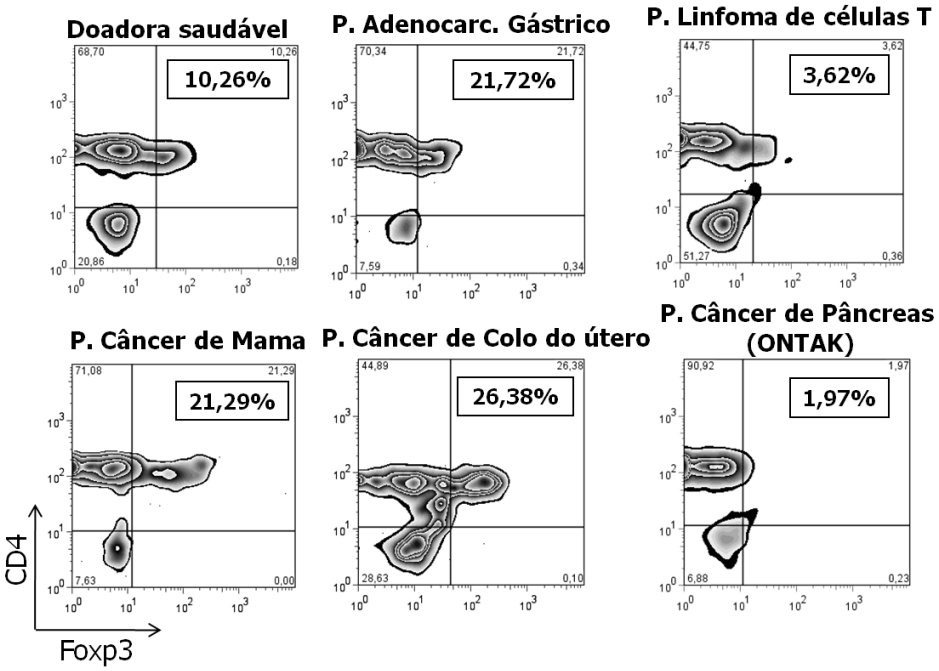
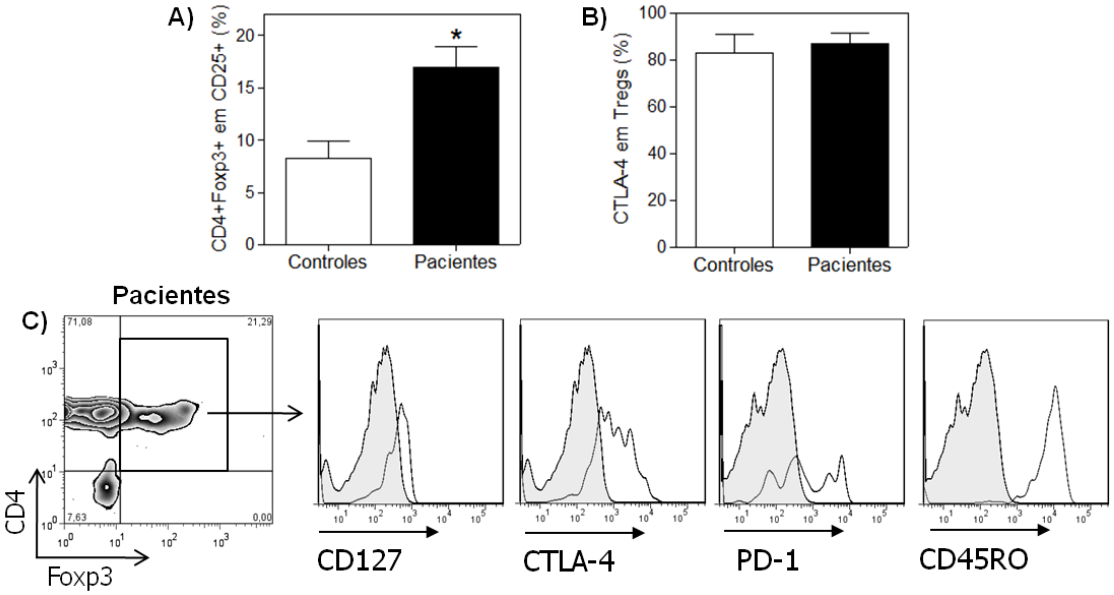


Figura 2. Fenotipagem de linfócitos T reguladores em células mononucleares não aderentes separadas *ex vivo* de pacientes com câncer. CNAs obtidas das culturas foram submetidas à fenotipagem com anticorpos específicos para CD25, CD4 e Foxp3. População de linfócitos foi selecionada por tamanho por granulosidade, pela seleção de células $CD25^+$ e avaliação simultânea da



expressão de CD4 e Foxp3.

Figura 3. Freqüência de linfócitos T reguladores em células mononucleares não aderentes de pacientes com câncer de mama e de doadoras saudáveis controle. Em A, análise da expressão de células $CD4^+Foxp3^+$ no *gate* $CD25^+$. Em B, expressão de CTLA-4 no *gate* de células $CD4^+Foxp3^+$ em $CD25^+$. (n= 6; * $p \leq 0,05$ - teste t Student). Em C, expressão de CD127, CTLA-4, PD-1 e CD45RO em células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, histogramas preenchidos representam células não-marcadas.

4.2 Caracterização fenotípica de células dendríticas imaturas provenientes de pacientes portadoras de câncer de mama

Células mononucleares obtidas a partir do sangue periférico de pacientes e doadoras saudáveis foram cultivadas por 7 dias em meio RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos-antimicóticos na presença de IL-4 e GM-CSF para a diferenciação de monócitos em células dendríticas imaturas (iDCs). Posteriormente, as células foram removidas da placa de cultura e submetidas à análise fenotípica por citometria de fluxo.

iDCs de pacientes com câncer de mama constituem uma população morfologicamente mais heterogênea em relação as iDCs de indivíduos controles (Figura 4). Apesar de essa diferença ser minimamente percebida através das fotos, a avaliação por citometria de fluxo nos parâmetros de tamanho (FSC – *forward scatter*) por granulosidade (SSC – *side scatter*) deixa evidente a discrepância entre as iDCs dos diferentes grupos (Figura 5A). Para a análise dos marcadores de superfície, a população de iDCs foi selecionada por um primeiro *gate* em tamanho por granulosidade (Figura 5A) e em seguida pela seleção de células negativas para CD14 (marcador característico de monócitos) e positivas para HLA-DR (moléculas de MHC classe II) onde analisamos todos os outros marcadores (Figura 5B).

O estudo dos marcadores fenotípicos indicou uma similaridade da freqüência de células $CD14^{neg}$/HLA-DR^{+} nos *gates* realizados, o que permite avaliar mais fielmente os demais marcadores dentro dessa seleção. Em nossos resultados, nota-se uma freqüência significativamente maior das moléculas CD86 (co-estimuladora) e CD123 (receptor de IL-3) nas iDCs das pacientes quando comparadas aos controles (Figura 6 e Tabela 3). Outras moléculas avaliadas como CD80 (co-estimuladora) e CD83 (marcador de ativação) apresentaram uma tendência ao aumento nas iDCs das pacientes, por outro lado a freqüência da molécula CD1a (DCs derivadas de monócitos *in vitro*) se mostrou significantemente reduzida (Figura 6A e Tabela 3). Em relação ao MFI (Intensidade Mediana de Fluorescência), para as mesmas moléculas avaliadas, observa-se um aumento significativo das moléculas CD86 e CD123 nas iDCs das pacientes enquanto a molécula CD83 se mostrou significantemente

aumentada nas iDCs de doadoras saudáveis (Figura 7 e Tabela 3). Outras moléculas como CD11c, CD1a, CD80, HLA-ABC e HLA-DR apresentaram apenas tendências na diferença de expressão entre os dois grupos de iDCs, porém tais diferenças não foram estatisticamente significativas (Figura 7 e Tabela 3). A análise isolada da molécula CD86, que representou as diferenças mais evidentes entre os grupos investigados, indicou uma expressão diferenciada em iDCs de pacientes com câncer de mama. A população de iDCs $CD80^{+}CD86^{+}$ duplo-positivas foi significantemente maior nas células de pacientes (Figuras 8A e 8C) e os histogramas analisados da molécula CD86 isoladamente indicam o aparecimento de duas subpopulações com diferentes expressões, uma $CD86^{Low}$ e uma $CD86^{High}$ (Figura 8B). Esses achados podem indicar diferenças funcionais, investigadas em outros itens dessa dissertação.

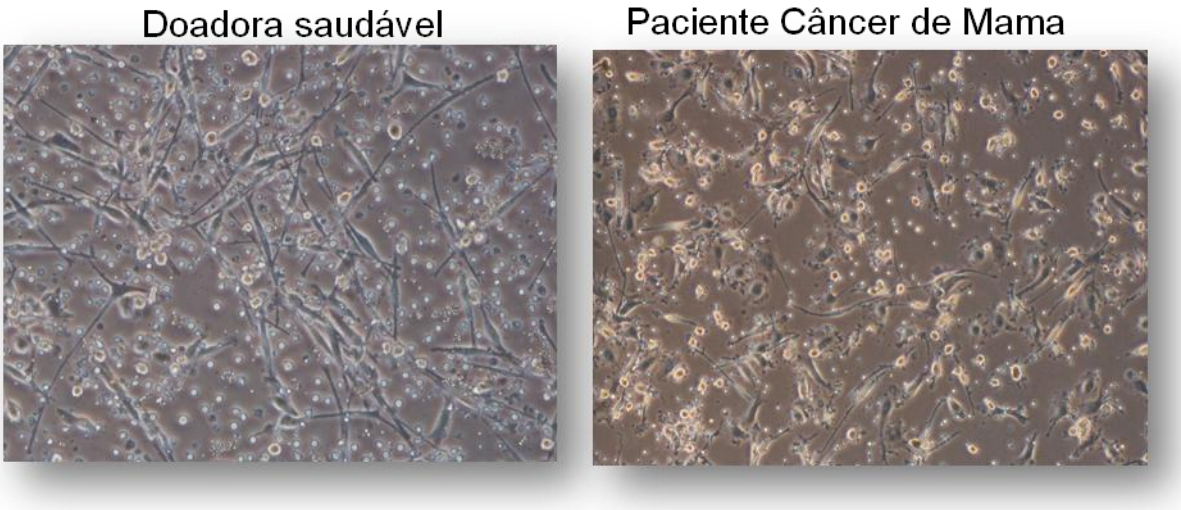


Figura 4. Fotografias representativas de células dendríticas imaturas diferenciadas *in vitro* após 7 dias de cultura em meio RPMI acrescido de 10% de SFB e antibióticos na presença de IL-4 e GM-CSF. Nota-se maior heterogeneidade das iDCs provenientes das pacientes com câncer de mama em comparação com iDCs saudáveis. (Imagens realizadas em microscópio ótico por objetivas de 20x).

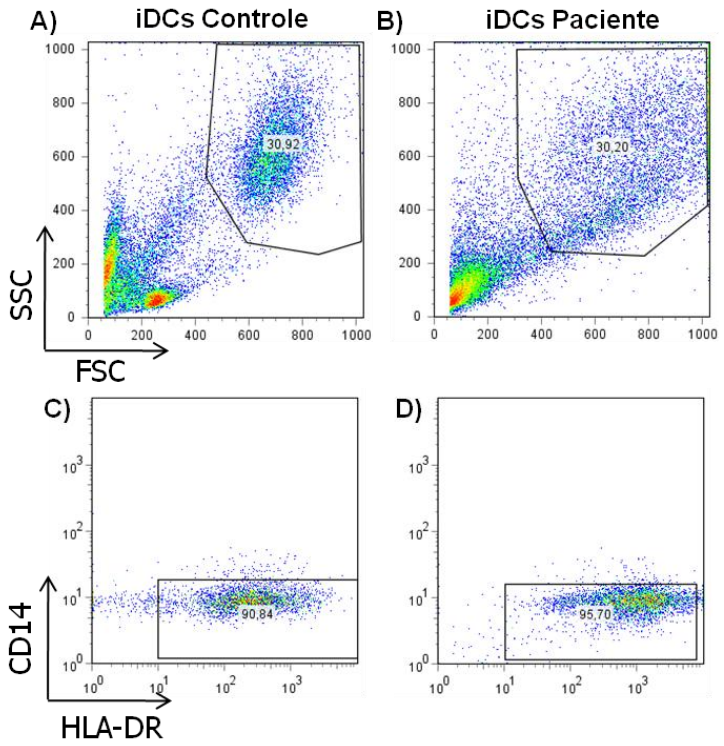


Figura 5. Análise fenotípica de células dendríticas imaturas diferenciadas *in vitro*. Em A e B, análise comparativa das populações de células dendríticas provenientes de doadoras saudáveis e pacientes com câncer de mama quanto aos parâmetros de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC). Em C e D, *gates* realizados em células $CD14^{neg}$/HLA-DR^{+} de doadoras saudáveis e pacientes com câncer de mama para a análise dos demais marcadores de superfície.

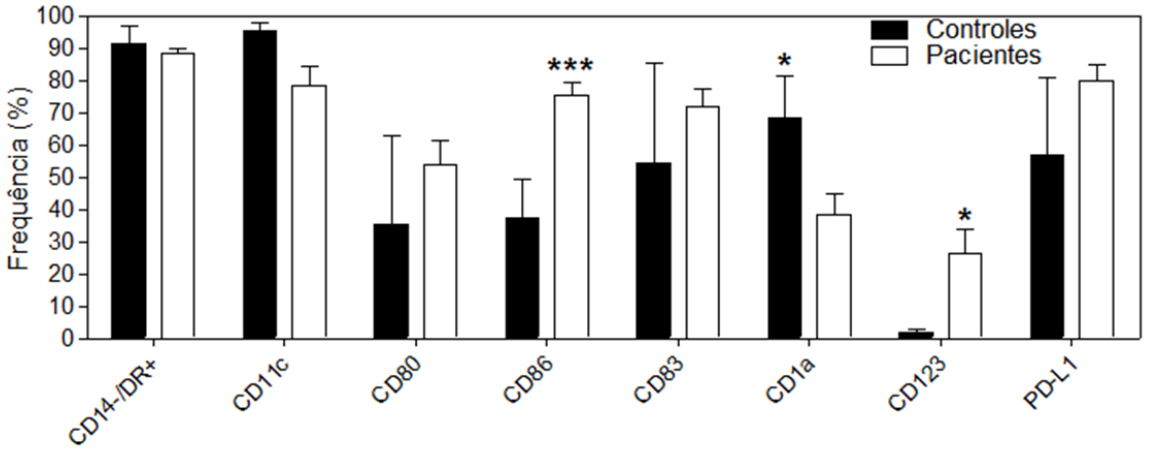


Figura 6. Gráfico da frequência de marcadores de superfície em células dendríticas imaturas diferenciadas *in vitro*. Gráfico representam a freqüência da expressão de moléculas de superfície em iDCs de doadoras saudáveis e de pacientes com câncer de mama (controle, n= 5; pacientes, n= 9; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,0001– teste t Student).

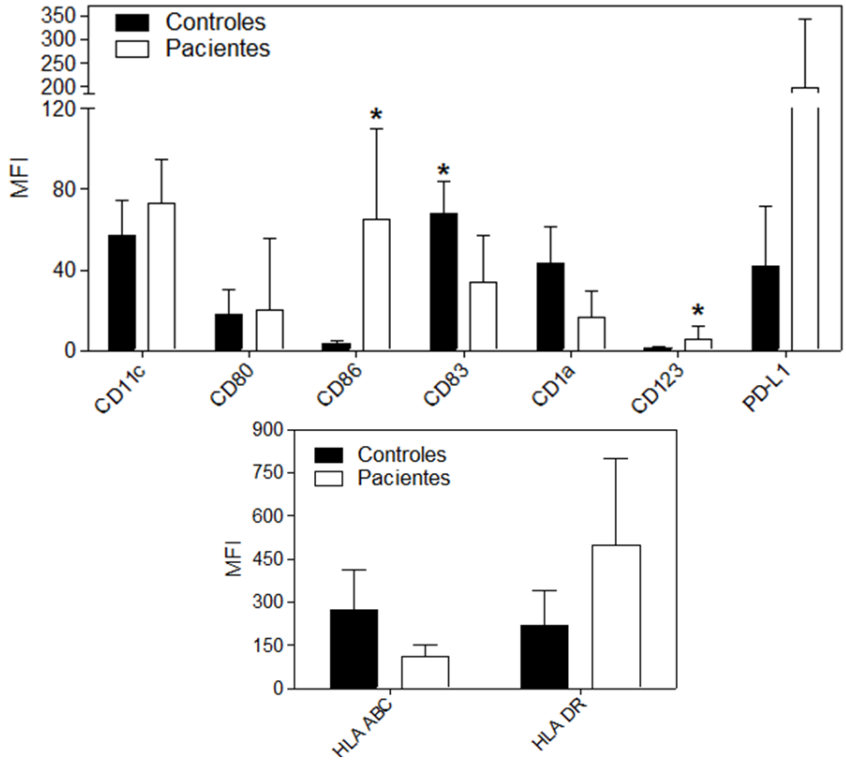


Figura 7. Gráficos da Intensidade Mediana de Fluorescência de moléculas de superfície em dendríticas imaturas diferenciadas *in vitro*. Gráficos representam o MFI (Intensidade Mediana de Fluorescência) das moléculas de superfície avaliadas em iDCs de doadoras saudáveis e de pacientes com câncer de mama (controle, n= 5; pacientes, n= 9; * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,0001– teste t Student).

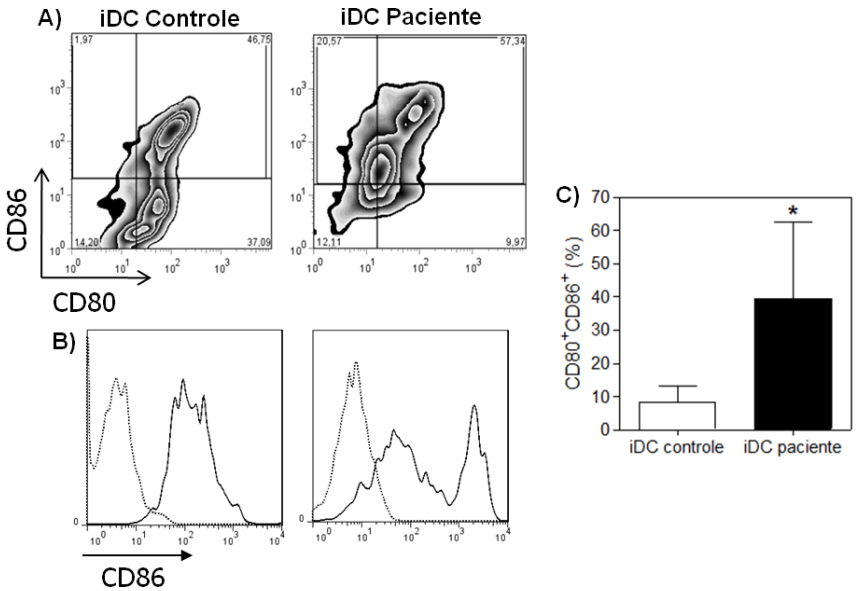


Figura 8. Gráficos da expressão de CD80 e CD86 em células dendríticas imaturas diferenciadas *in vitro*. Gráficos (A) e histogramas (B) representativos indicando a expressão de CD80-CD86 e CD86 isoladamente em iDCs provenientes de doadoras saudáveis e de pacientes com câncer de mama. Linhas pontilhadas representam as células sem marcação. Em C, gráfico da freqüência de iDCs $CD80^{+}CD86^{+}$ provenientes de doadoras saudáveis e de pacientes. (controle, n= 5; pacientes, n= 9; * p ≤ 0,05; – teste t Student).

Tabela 3- Freqüência e Intensidade Mediana de Fluorescência (MFI) das moléculas de superfície nas populações de células dendríticas imaturas.

Moléculas	Freqüência (%)		MFI	
	saudáveis	pacientes	saudáveis	pacientes
$CD14^{neg}/DR^{+}$	87,29 ± 0,59	88,19 ± 5,51	----------	----------
CD11c	95,20 ± 2,66	78,37 ± 16,50	56,76 ± 17,5	73,1 ± 21,9
CD123	1,94 ± 0,81	26,53 ± 22,16*	1,00 ± 0,86	5,84 ± 6,13*
CD1a	68,11± 13,38*	38,11 ± 18,44	43,0 ± 18,25	16,29 ± 13,05
CD80	35,26 ± 12,16	53,94 ± 23,96	18,0 ± 12,54	19,86 ± 35,6
CD86	37,25 ± 12,16	75,58 ± 11,7***	3,33 ± 1,53	64,7 ± 45,1*
CD83	54,16 ± 31,36	71,60 ± 16,95	68,1 ± 16,0*	33,67 ± 23,55
PD-L1	56,66 ± 24,0	79,75 ± 10,3	41,47 ± 30	198,5 ±143,1
HLA-DR	----------	----------	185 ± 68,31	502,8 ± 134,8

(controles n= 5; pacientes n= 9; * p≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,0001 teste t Student)

4.3 Caracterização fenotípica de monócitos, células dendríticas sanguíneas, células dendríticas imaturas e células dendríticas maduras provenientes de pacientes portadoras de câncer de mama

Nessa fase do estudo avaliamos a dinâmica da expressão das moléculas de superfície durante a diferenciação de DCs de pacientes portadoras de câncer de mama, e ainda comparamos com DCs obtidas diretamente do sangue. Para tal, monócitos (dia zero da cultura – $CD14^{+}$), iDCs (após 7 dias na presença de IL-4 e GM-CSF), mDCs (após 7 dias na presença de IL4 e GM-CSF com adição de TNF-α no 5º dia) e DCs diretamente do sangue ($CD14^{neg}$/HLA-DR^{+}) foram marcadas com anticorpos específicos para as moléculas de superfície de interesse e analisadas quanto a freqüência e o MFI desses marcadores (Figura 9). Apesar da origem e o processo de diferenciação serem distintos, células dendríticas fenotipadas diretamente do sangue periférico das pacientes com câncer de mama possuem maiores similaridades com iDCs do que com monócitos ou mDCs, tanto em freqüência

como MFI nas moléculas avaliadas (Figuras 10 e 11). Foi observada uma freqüência significantemente maior apenas na molécula CD123, mostrando-se mais expressa em DCs sanguíneas do que iDCs, fato relevante considerando a presença de DCs plasmocitóides $CD11c^{neg}CD123^{+}$ circulantes (Figura 10). Em relação ao MFI, a molécula CD11c se apresentou significantemente menor e a molécula PD-L1 maior em iDCs diferenciadas quando comparadas as DCs sanguíneas (Figura 11).

Nota-se, ainda, que a maturação das iDCs, após a adição de TNF-α no quinto dia de cultura, foi eficaz, indicado principalmente pelo aumento significativo da expressão de CD86 e CD40 e o aumento médio da expressão das moléculas CD80, CD83 e HLA-DR (Figura 11).

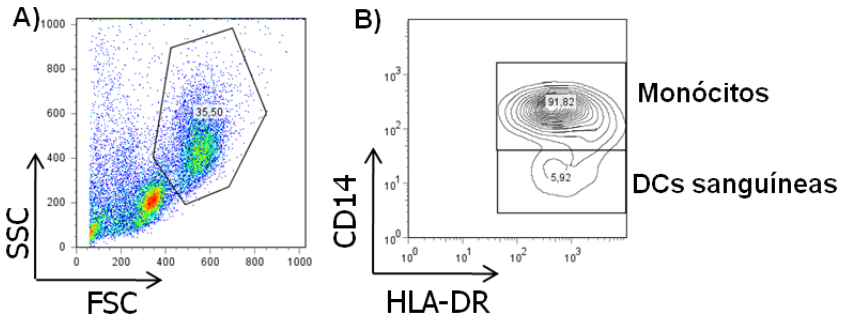


Figura 9. Gráficos representativos da fenotipagem e análise das populações de monócitos e células dendríticas sanguíneas de pacientes com câncer de mama. Células mononucleares do sangue de pacientes foram separadas por gradiente de ficoll e em seguida fenotipadas considerando-se, primeiramente, tamanho por granulosidade (A) e, em seguida, células $CD14^{+}$ como monócitos e células $CD14^{neg}$/HLA-DR^{+} como DCs sanguíneas (B).

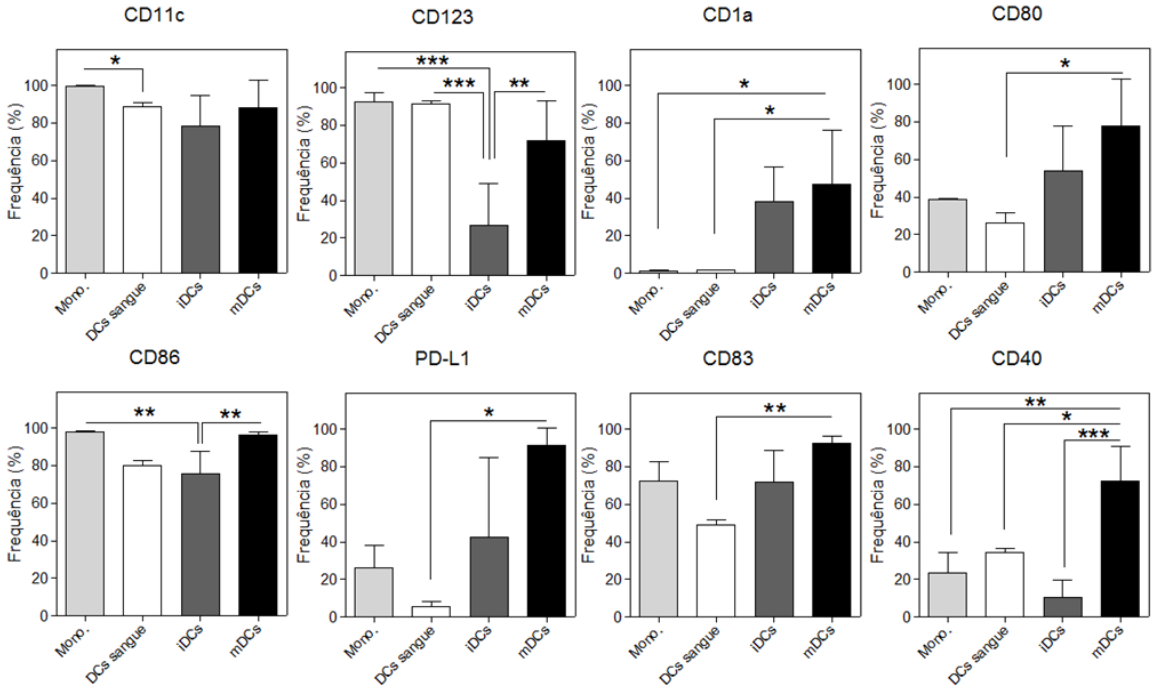


Figura 10. Gráficos da freqüência de moléculas de superfície em monócitos, células dendríticas sanguíneas, células dendríticas imaturas e maduras provenientes de pacientes com câncer de mama. Monócitos (Mono), Células Dendríticas do sangue (DCs sangue), Células Dendríticas imaturas (iDCs) e maduras (mDCs) diferenciadas de monócitos de pacientes foram fenotipadas e analisadas comparativamente quanto à freqüência de moléculas de superfície. (Mono. n= 3; DCs sangue n= 3; iDCs n= 9; mDCs n= 4 pacientes; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,0001– teste ANOVA com pós teste de Bonferroni).

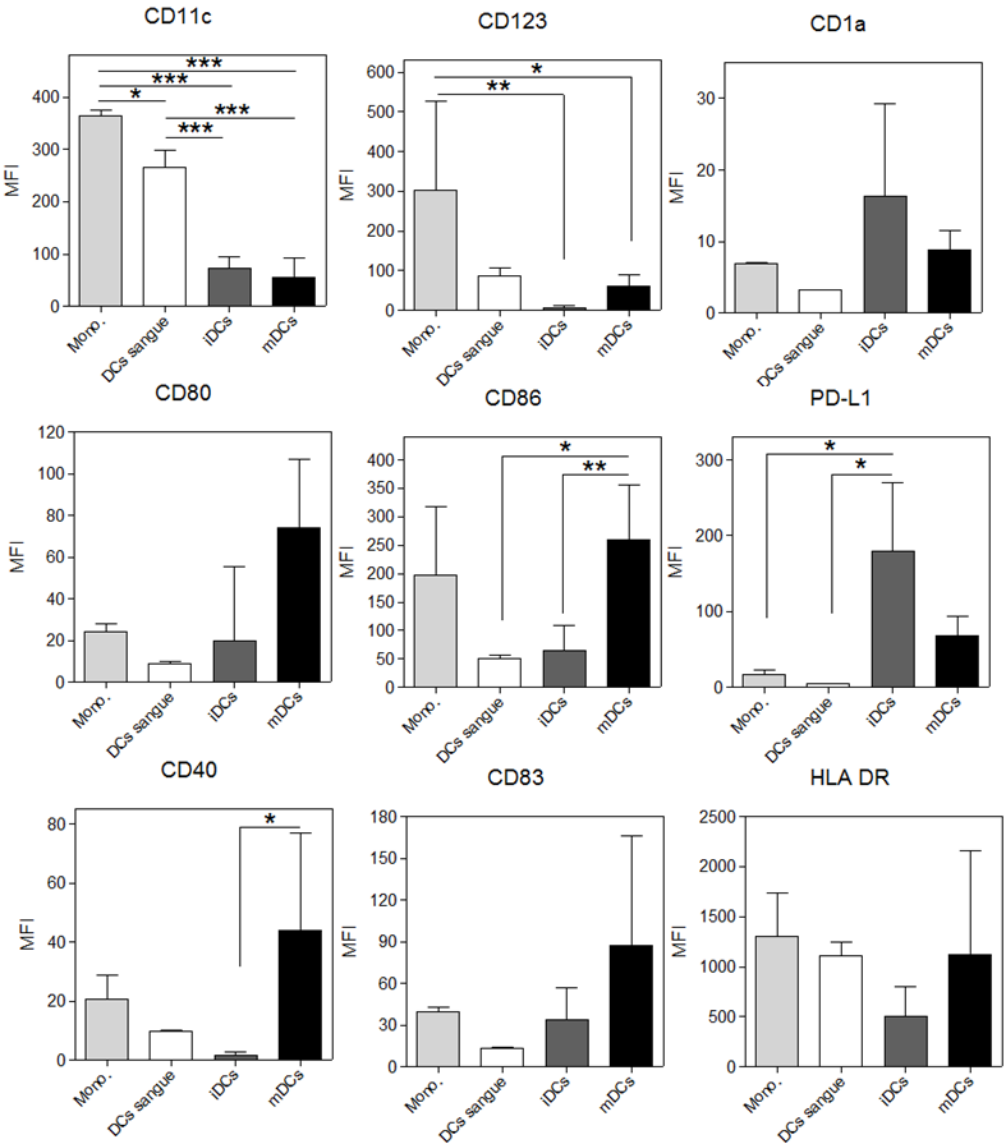


Figura 11. Gráficos da Intensidade Mediana de Fluorescência de moléculas de superfície em monócitos, células dendríticas sanguíneas, células dendríticas imaturas e maduras provenientes de pacientes com câncer de mama. Monócitos (Mono), Células Dendríticas do sangue (DCs sangue), Células Dendríticas imaturas (iDCs) e maduras (mDCs) diferenciadas de monócitos de pacientes foram fenotipadas e analisadas comparativamente quanto ao MFI de moléculas de superfície. (Mono. n= 3; DCs sangue n= 3; iDCs n= 9; mDCs n= 4 pacientes; *p ≤ 0,05; **p ≤ 0,01; ***p ≤ 0,0001– teste ANOVA com pós teste de Bonferroni).

4.4 Isolamento de subpopulações de linfócitos por microesferas magnéticas para os ensaios de co-cultura

Para a avaliação da capacidade estimuladora de iDCs, CNAs de doadores saudáveis (não relacionados), foram submetidas a separação imunomagnética por *beads* para o isolamento de populações $CD3^+$, $CD3^+CD25^{neg}$ e $CD4^+CD25^{neg}$. A avaliação da eficiência do isolamento imunomagnético foi realizada por citometria de fluxo. Linfócitos $CD3^+$ foram isolados a partir de CNAs conforme instruções do fabricante (Miltenyi Biotec), com pureza obtida superior a 97% (Figura 12A). Tais células foram coradas por CFSE e posteriormente utilizadas nas co-culturas com diferentes APCs. Com o intuito de selecionar linfócitos T não ativados e que não possuíssem fenótipo de Tregs ($CD3^+CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ ou $CD4^+CD25^{neg}Foxp3^{neg}$), células $CD3^+$ ou $CD4^+$ previamente isoladas foram submetidas a subseqüente seleção por *beads* para a depleção de células $CD25^+$. Tais ensaios revelaram pureza superior a 96% de células $CD3^+CD25^{neg}$ (Figura 12B) e superior a 97% de células $CD4^+CD25^{neg}$ (Figura 12C). A análise das células duplamente isoladas apresentou mais de 78% de células $CD45RA^+$ (Figura 12D) e expressão nula de células $Foxp3^+$ (Figura 12E). Células $CD3^+CD25^{neg}$ e $CD4^+CD25^{neg}$ foram utilizadas posteriormente nos ensaios de geração de Tregs por diferentes DCs derivadas de pacientes ou doadoras saudáveis.

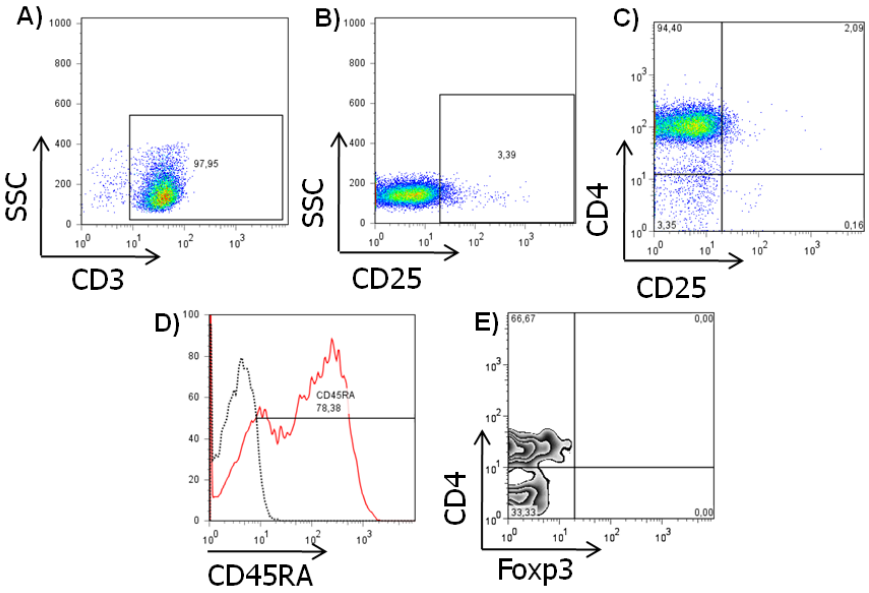


Figura 12. Gráficos representativos do isolamento de linfócitos por selecão imunomagnética. Em A, células $CD3^+$ isoladas (< 97%). Em B e C respectivamente, células $CD3^+CD25^{neg}$ (< 96%) e $CD4^+CD25^{neg}$ (< 97%) isoladas que posteriormente foram avaliadas quanto a expressão de CD45RA (D) e $CD4^+Foxp3^+$ (E) no *gate* de células $CD25^+$ remanescentes pós-isolamento magnético.

4.5 Avaliação da capacidade estimuladora de células dendríticas derivadas de pacientes portadoras de câncer de mama

Para os experimentos de proliferação, células dendríticas provenientes de indivíduos saudáveis ou de pacientes, em diferentes estágios de maturação (imaturas ou maduras), foram retiradas das placas após 7 dias de cultura, contadas e utilizadas como estimuladoras de linfócitos $CD3^+$ autólogos ou alogeneicos, previamente corados por CFSE, na proporção de 1 DC : 10 linfócitos T $CD3^+$.

Células dendríticas provenientes de pacientes, tanto imaturas (Figura 10) quanto maduras (dados não mostrados), apresentaram menor eficiência de estimulação de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ em todos os experimentos realizados. Linfócitos $CD4^+$ alogeneicos estimulados por iDCs de doadoras saudáveis apresentaram 82,7% de proliferação contra 29,4% de proliferação quando estimulados por iDCs de pacientes (Figura 13- linha de cima). Quanto à

avaliação da proliferação de células $CD8^+$, iDCs sadias induziram cerca de 73% de proliferação, contra 21% de proliferação por iDCs de pacientes com câncer de mama (Figura 13- linha de baixo).

Outro fator avaliado em nosso estudo foi a expressão de CD25 em linfócitos $CD3^+CD25^{neg}$, anteriormente isolados, após a estimulação por DCs saudáveis ou de pacientes. Em nossos dados preliminares observamos uma menor capacidade de DCs provenientes de pacientes (tanto imaturas quanto maduras) na ativação linfocitária, tanto em freqüência de células $CD25^+$ geradas quanto no MFI das mesmas (dados não mostrados). Observamos que iDCs saudáveis geraram em média 35,7% de linfócitos que passaram a expressar CD25 (Figura 14A e D), enquanto iDCs de paciente foram capazes de gerar em média 11,8% de linfócitos $CD25^+$ (Figura 14B e D). De modo esperado, como controle positivo, a estimulação por PHA induziu em torno de 94% de linfócitos $CD25^+$ (Figura 14C). Tais achados foram estatisticamente significantes com valor de $p \leq 0,05$, após a análise de co-culturas de várias pacientes e doadoras saudáveis reunidas (Figura 14D).

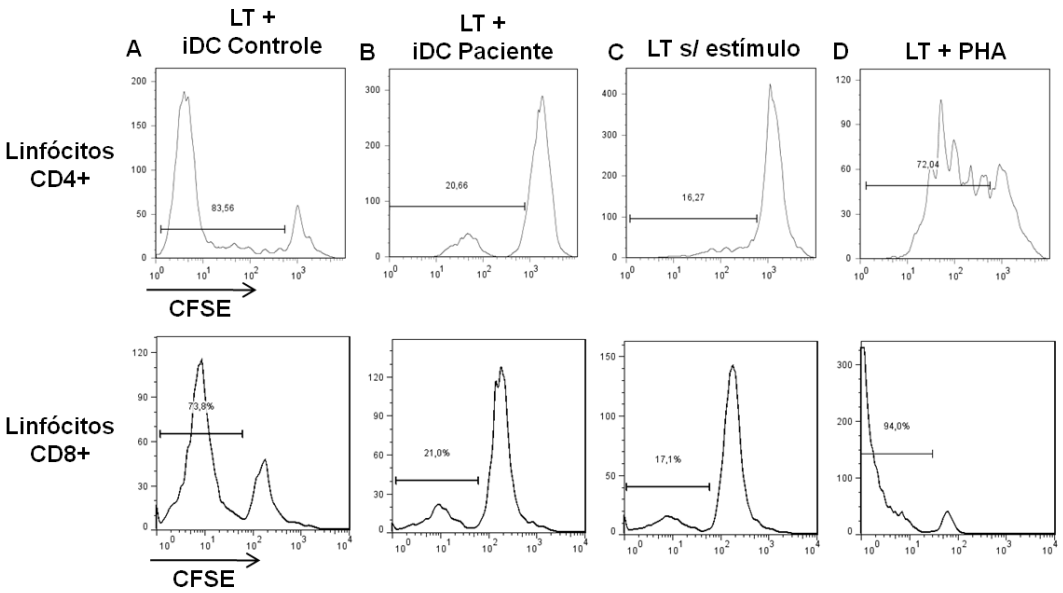


Figura 13. Capacidade estimuladora de células dendríticas imaturas de pacientes em linfócitos T. DCs imaturas de doadoras saudáveis e pacientes com câncer de mama, foram co-cultivadas com linfócitos $CD3^+$ alogeneicos (de doadores saudáveis) por 5 dias. Nas colunas A e B respectivamente, observa-se a proliferação de células $CD4^+$ e $CD8^+$ por iDCs saudáveis e de pacientes pela diluição de CFSE. Em C e D estão representados linfócitos não estimulados e estimulados por PHA, respectivamente.

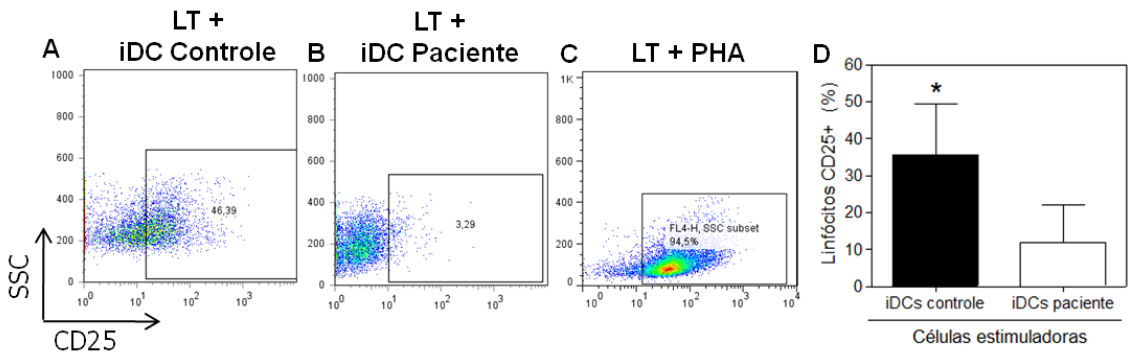


Figura 14. Capacidade linfo-estimuladora de células dendríticas imaturas na geração de linfócitos CD25^{+}. Linfócitos CD3^{+}CD25^{neg} alogeneicos foram co-cultivados por 6 dias com DCs imaturas de doadoras saudáveis (A), de pacientes com câncer de mama (B) ou estimulados por PHA (C). Em D, dados representando a comparação entre iDCs saudáveis e de pacientes. (controle n=4; pacientes n= 7; *p ≤ 0,05).

4.6 Análise da geração de células CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+} (Tregs) por células dendríticas provenientes de pacientes portadores de câncer de mama

Por apresentarem evidente deficiência na estimulação de linfócitos, avaliamos também a capacidade de DCs provenientes de pacientes com câncer na geração de células CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+} (Tregs), células atuantes na geração de tolerância. Para tal, células dendríticas provenientes de indivíduos saudáveis e pacientes com câncer de mama, em diferentes estágios de maturação (imaturas ou maduras), foram retiradas das placas após 7 dias de cultura, contadas e utilizadas como estimuladoras de linfócitos CD3^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg} ou CD4^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg} autólogos ou alogeneicos na proporção de 1 DC :10 linfócitos.

Resultados preliminares indicaram que co-culturas entre iDCs ou mDCs de pacientes com câncer de mama com linfócitos CD3^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg} alogeneicos promoveram as maiores freqüências de células CD4^{+}Foxp3^{+} dentro do *gate* da população CD25^{+} (iDC: 58,0%; mDC: 39,0%) em comparação com mDCs e iDCs em co-culturas autólogas (iDC: 3,8%; mDC: 2,1%) (dados não mostrados). Vale ressaltar, que DCs provenientes de indivíduos saudáveis, tanto em sistemas autólogos como em alogeneicos, induziram freqüência relativamente similares de células CD4^{+}Foxp3^{+}, (entre 2,11% e 4,53%) nos quatro grupos analisados. Contudo, esses valores foram sempre menores que os gerados por DCs de pacientes (dados não mostrados).

Esses achados nos levaram a focar e aprofundar no estudo da geração de Tregs por DCs de pacientes com câncer de mama e com o intuito de confirmar o fenômeno já observado, aumentamos o número de indivíduos estudados. Os dados obtidos com este aumento de casuística corroboram os ensaios pilotos, indicando uma capacidade significativamente maior da geração de células com fenótipo regulador ($CD4^{+}Foxp3^{+}$ em $CD25^{+}$) por iDCs provenientes de pacientes com câncer de mama sob linfócitos $CD3^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ (pacientes: 56,8% ± 4,2 x controles: 2,5% ± 0,7; $p \leq 0,0001$ - Figura 15). A análise do número absoluto de células geradas em co-cultura com o mesmo fenótipo regulador também se mostrou significativamente diferente entre iDCs saudáveis e de pacientes com câncer de mama (Figura 15D).

Em outro momento, para excluir possíveis interferências no fenômeno observado, realizamos ensaios excluindo alguns fatores relevantes. Primeiramente, para excluir a influência de células $CD8^{+}$ nos ensaios de co-cultura realizados, experimentos similares foram repetidos com a utilização de linfócitos $CD4^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ previamente isolados por *beads* magnéticas em contato com iDCs de pacientes portadoras de câncer de mama. Os resultados obtidos se mostraram similares (Figura 16) aos experimentos realizados com células $CD3^{+}CD25^{neg}$ anteriormente apresentados. O mesmo ocorreu em co-culturas onde promovemos a eliminação de células $CD3^{+}$ contaminantes da cultura inicial de iDCs de pacientes, o que também alterou a freqüência de células Treg geradas (Figura 16).

Posteriormente nos questionamos se esse fenômeno ocorreria também com iDCs provenientes de pacientes portadores de cânceres de outras naturezas, nos mesmos parâmetros realizados (ensaios alogeneicos). No entanto nossos dados indicaram que, embora relativamente elevadas, as freqüências de células Treg geradas nas co-culturas de três pacientes portadores de glioblastoma multiforme (6,0% ± 1,8) e um portador de linfoma (6,8%) foram bem mais próximas às geradas por iDCs controles (cerca de 3%) (Figura 17). Observa-se ainda que células $CD3^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ cultivadas na ausência de iDCs e de qualquer estímulo apresentaram uma freqüência de células com fenótipo regulador superior ao próprio ensaio com adição de iDCs

controles (cerca de 9%) (Figura 17), o que sugere que a presença de iDCs saudáveis possa desviar a geração de células Treg para um perfil de ativação da resposta, de maneira contrária ao observado com iDCs de pacientes com câncer de mama, que parecem induzir um perfil imunossupressor *in vitro*.

De maneira similar, mesmo a ativação de células dendríticas de pacientes com a adição de TNF-α não foi suficiente para reverter ou reduzir significantemente a freqüência de linfócitos $CD25^{+}$ e a freqüência de células Treg geradas após a estimulação de linfócitos $CD4^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ por 6 dias de co-cultura (Figura 18). Este fenômeno poderia indicar que a geração de um perfil de resposta tolerogênico pode estar relacionado ao processo de diferenciação entre monócitos e iDCs/mDCs ou ainda um defeito de origem medular originado pelo desenvolvimento tumoral nessas pacientes. Observamos ainda que a utilização de monócitos na estimulação de células $CD4^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$, geraram significantemente maior freqüência de células $CD25^{+}$ e reduzida freqüência de Tregs (Figura 18).

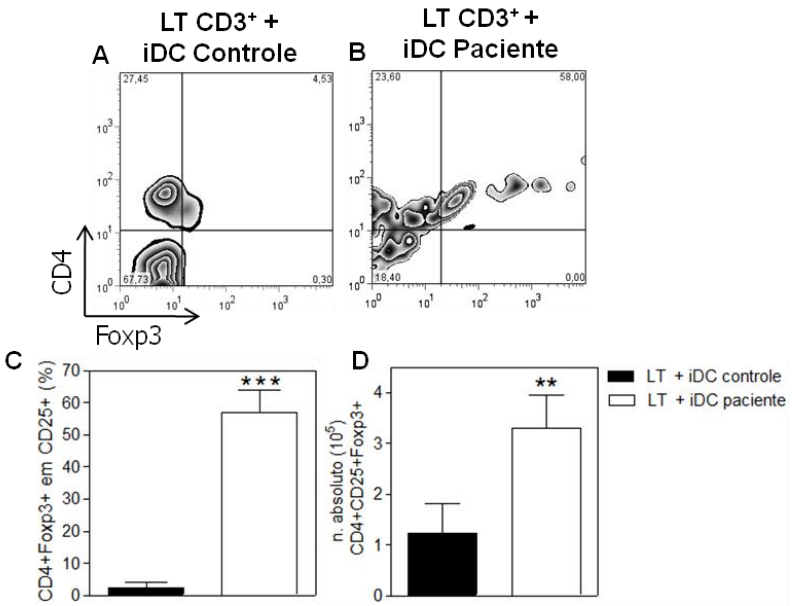


Figura 15. Avaliação da geração de células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ por células dendríticas imaturas de pacientes com câncer de mama. Em A e B, DCs imaturas, de doadoras saudáveis ou pacientes com câncer de mama foram co-cultivadas com linfócitos $CD3^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ alogeneicos durante 6 dias. Em C, gráfico reunindo quatro experimentos de cada grupo. Em D, número absoluto de células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ geradas nas mesmas co-culturas em C. (n= 4; ** $p \leq 0,01$;*** $p \leq 0,0001$- teste t Student).

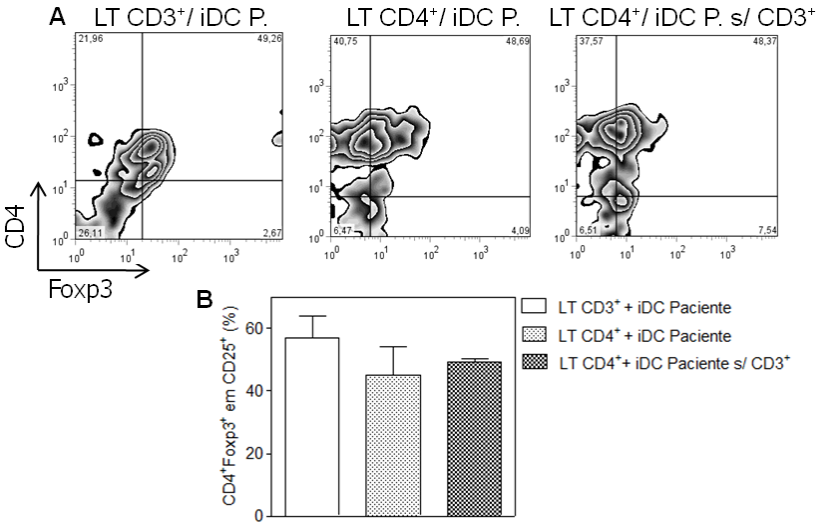


Figura 16. Estimulação de diferentes linfócitos isolados por células dendríticas imaturas de pacientes com câncer de mama na geração de linfócitos T reguladores. Em A, gráficos da geração de Tregs após co-culturas de iDCs de pacientes com linfócitos $CD3^{+}CD25^{neg}$, $CD4^{+}CD25^{neg}$ e iDCs de pacientes sem a presença de contaminantes $CD3^{+}$ estimulando células $CD4^{+}CD25^{neg}$. Em B, gráfico reunindo dados de três experimentos em cada grupo avaliado. (n= 3; teste t Student).

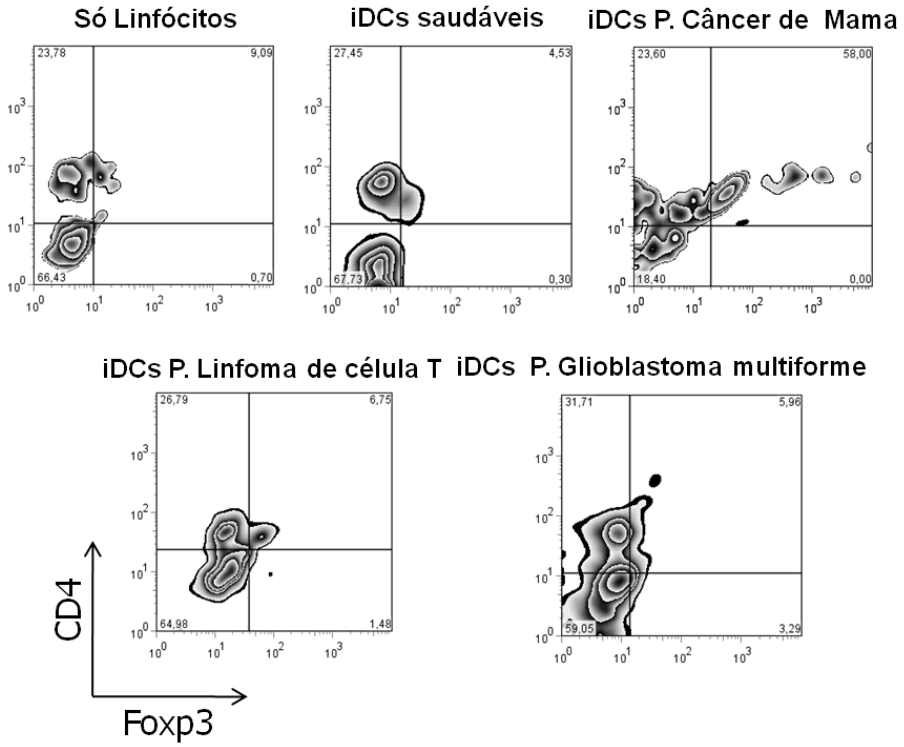


Figura 17. Gráficos representativos da avaliação da geração de células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ por células dendríticas imaturas de pacientes com câncer. DCs imaturas de doadoras controles e pacientes com diferentes cânceres foram co-cultivadas com linfócitos $CD3^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ alogeneicos durante 6 dias. Resultados são originados de *gates* na população $CD25^{+}$ e posterior análise para células duplo positivas para CD4 e Foxp3.

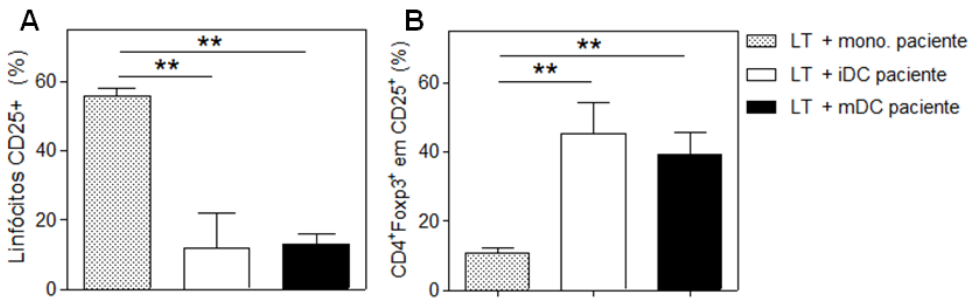


Figura 18. Avaliação da geração de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ por monócitos, células dendríticas imaturas e maduras de pacientes com câncer de mama. Linfócitos T $CD4^+CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ foram estimulados durante 6 dias por monócitos, DCs imaturas e DCs maduras de pacientes com câncer de mama para a avaliação da expressão de CD25 (A) e da geração de células Treg (B). (monócitos n= 3; iDCs n=6; mDCs n=4; ** $p \leq 0,01$- teste t Student pareado).

4.7 Avaliação fenotípica e funcional de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ geradas em co-culturas

Após a confirmação de que iDCs provenientes de pacientes com câncer de mama têm maior habilidade em gerar células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ que iDCs de doadoras saudáveis, se fez necessário avaliar se tais células geradas em co-cultura expressavam marcadores adicionais que as caracterizariam como pertencentes a população de células Treg. Desse modo, as moléculas CTLA-4 e CD127 e a proliferação por CFSE foram avaliados em células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$.

Inicialmente, com o intuito de identificar o potencial proliferativo de células Treg ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) geradas nas co-culturas, linfócitos $CD4^+CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ foram previamente corados por CFSE e após 6 dias avaliou-se a expressão simultânea de células positivas para CD4, CD25, Foxp3 e CFSE. Nossos dados revelaram um nível similar e moderado de proliferação em células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ tanto estimuladas por iDCs saudáveis como de pacientes (Figuras 19A e B). Por outro lado, a análise de células $CD4^+CD25^+Foxp3^{neg}$ indicou um maior nível de proliferação em células estimuladas por iDCs saudáveis em comparação as estimuladas por iDCs de pacientes. Porém, ainda sim, células Foxp3 negativas apresentaram maior limiar de proliferação que células $Foxp3^+$ *in vitro*, nos dois grupos avaliados (Figuras 19A e B).

Posteriormente, a avaliação da expressão da molécula CTLA-4 se mostrou similar tanto em linfócitos estimulados por iDCs de doadoras saudáveis (freqüência 83% ± 12,3; n=3) como por iDCs de pacientes (freqüência 88,5% ± 8,2; n=4) (Figura 19C), assim como previamente observado na caracterização fenotípica de Tregs a partir de CNAs. A avaliação do marcador CD127 (receptor α-IL7) em células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ foi encontrado em baixa expressão nos dois grupos analisados (Figura 19D), assim como na maioria dos experimentos de geração de Tregs. Tal marcador é classicamente descrito como caracteristicamente expresso em baixos níveis em células T reguladoras de origem humana (SAKAGUCHI et al., 2010)

Após a melhor caracterização dos linfócitos gerados em co-cultura, nos questionamos se tais células seriam funcionalmente hábeis em suprimir a proliferação de outros linfócitos sustentando a hipótese de células $Foxp3^{+}$. Para isso, células $CD25^{+}$ geradas nas co-culturas de iDCs (doadoras controle ou pacientes) com linfócitos alogeneicos, foram magneticamente isoladas por *beads* e co-cultivadas por 3 dias em contato com PBMCs alogeneicos (1 $CD25^{+}$: 10 PBMCs) previamente corados com CFSE e sob ativação de fitohemaglutinina (PHA). No dia 3 os linfócitos foram recuperados da placa de cultura e a diluição do CFSE nas células alvo foi avaliada por citometria de fluxo. Nossos dados revelam que células $CD25^{+}$ geradas em co-cultura com iDCs de pacientes com câncer de mama foram capazes de inibir, de modo parcial (cerca de 16% de supressão), a proliferação de linfócitos alogeneicos. Por outro lado, células $CD25^{+}$ geradas por iDCs de doadoras saudáveis aumentaram o potencial proliferativo (cerca de 14% de estimulação) quando adicionadas ao PBMC alogeneico (Figura 20). Esses achados indicam que mesmo sendo fenotipicamente similares, o potencial imunossupressor foi observado somente pelas células $CD25^{+}$ geradas na co-cultura de linfócitos $CD3^{+}CD25^{neg}$ com iDCs de pacientes com câncer de mama.

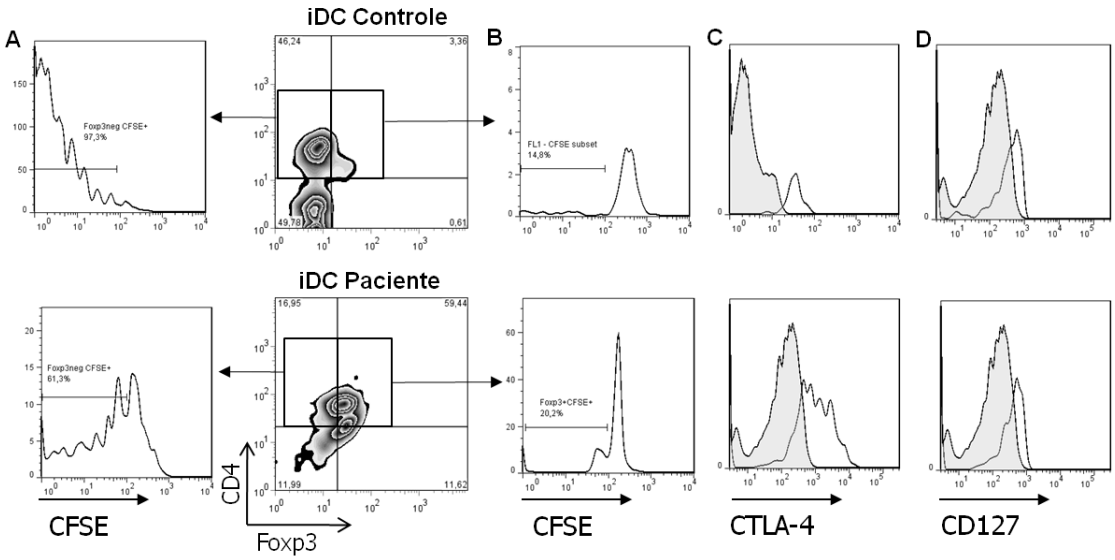


Figura 19. Análise fenotípica de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ geradas por células dendríticas imaturas de pacientes com câncer. Células $CD4^+CD25^+Foxp3^{neg}$ (A) e $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (B), geradas após a estimulação por iDCs de doadoras controle ou iDCs de pacientes, foram avaliadas quanto a diluição de CFSE após 6 dias de co-cultura. Posteriormente, a expressão de CTLA-4 (C) e CD127 (D) foram analisadas em células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ geradas nas mesmas co-culturas. Histogramas em cinza representam as células não marcadas.

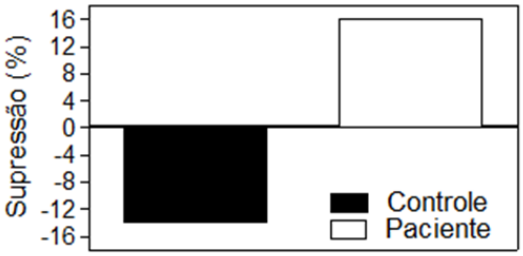


Figura 20. Avaliação da capacidade supressora de células $CD25^+$ geradas em co-cultura com células dendríticas imaturas de pacientes com câncer. Células $CD25^+$, provenientes das co-culturas de iDCs de doadoras controle ou iDCs de pacientes, foram isoladas por *beads* magnéticas e cultivadas por 3 dias com PBMCs alogeneicos corados com CFSE e estimulados por fitohemaglutinina (PHA). Posteriormente avaliou-se a diluição do CFSE por citometria de fluxo nas células alvo.

4.8 Análise da produção de citocinas por células dendríticas e nas co-culturas

Inicialmente, os sobrenadantes obtidos nas co-culturas foram submetidos à avaliação da presença de citocinas por ensaios de Bioplex (Millipore) conforme instruções do fabricante. Nossos ensaios não foram eficientes para detectar todas as citocinas em diferentes amostras, impossibilitando a aplicação de testes comparativos eficazes, no entanto esses resultados nos auxiliaram a obter dados norteadores quanto ao possível perfil de resposta gerado nessas co-culturas, o que possibilitou a repetição da análise de algumas citocinas por ensaios de ELISA, já padronizado em nosso laboratório.

De maneira preliminar, o sobrenadante das co-culturas de linfócitos $CD3^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ com iDCs de doadoras saudáveis indicaram maior presença de IFN-γ, TNF-α, IL-5, IL-6, IL10, IL-12(p70), IL-13 e IL-17 enquanto o sobrenadante das co-culturas com iDCs de pacientes com câncer de mama indicaram maior presença de IL-4 e IL-2 nos ensaios realizados por Bioplex (Figura 21). Nos ensaios de ELISA foram avaliadas a presença de IFN-γ, IL-10 TGF-*β*1 (bioativo), tanto no sobrenadante de iDCs sozinhas como nas co-culturas realizadas. Nossos resultados indicam, já no sobrenadante de culturas de iDCs somente, um aumento da produção de IL-10 (Figura 22A) e TGF-*β*1 (Figura 22B) por iDCs de pacientes em relação as iDCs de doadoras controle, porém sem significância estatística. Nas análises do sobrenadante das co-culturas, a estimulação de linfócitos $CD3^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ por iDCs de doadoras controles indicou uma produção significativamente maior de IFN-γ quando comparadas as iDCs de pacientes (Figura 22C), podendo sugerir, juntamente a dados já mostrados, que seriam eficientes estimuladoras da resposta linfocitária com um possível perfil Th1. Por outro lado, as co-culturas com iDCs de pacientes apresentam uma tendência de aumento da produção de IL-10 (Figura 22D) e um aumento significativo da produção de TGF-*β*1 bioativo (Figura 22E), dados que também corroboram o perfil da geração de células Treg supressoras induzidas por iDCs de pacientes com câncer de mama.

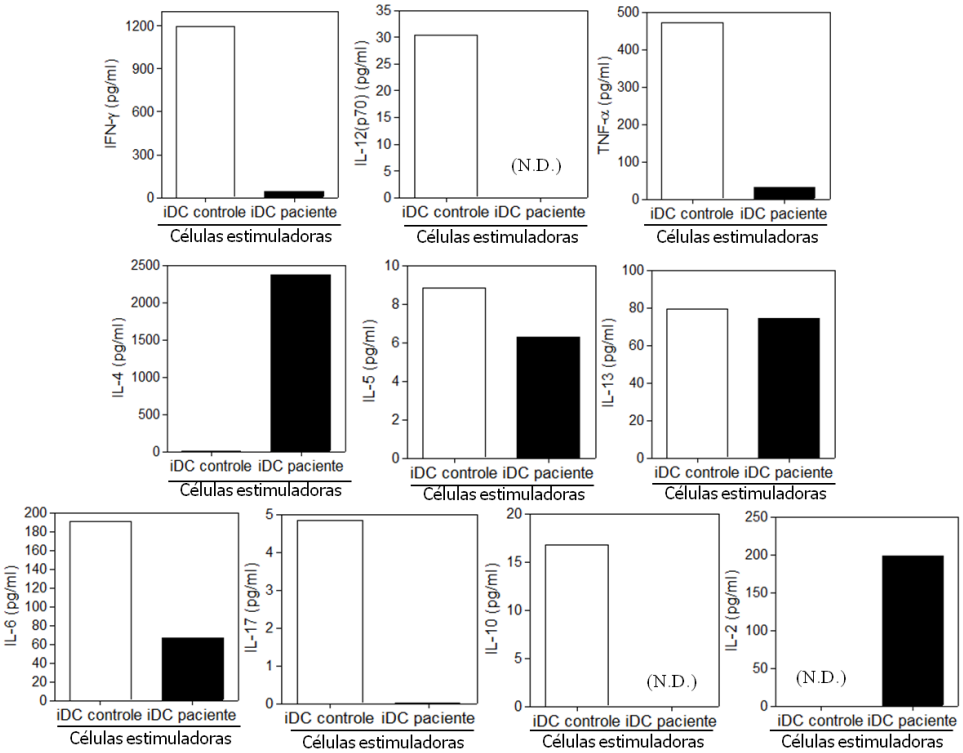


Figura 21. Avaliação por ensaio de Bioplex da produção de citocinas nas co-culturas. Os sobrenadantes coletados das co-culturas de linfócitos $CD3^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ com iDCs de pacientes ou doadoras saudáveis foram submetidos a avaliação de citocinas por Bioplex para IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-4 IL-5, IL-6, IL10, IL-12(p70), IL-13 e IL-17. (N.D.= citocinas não detectadas pelo ensaio).

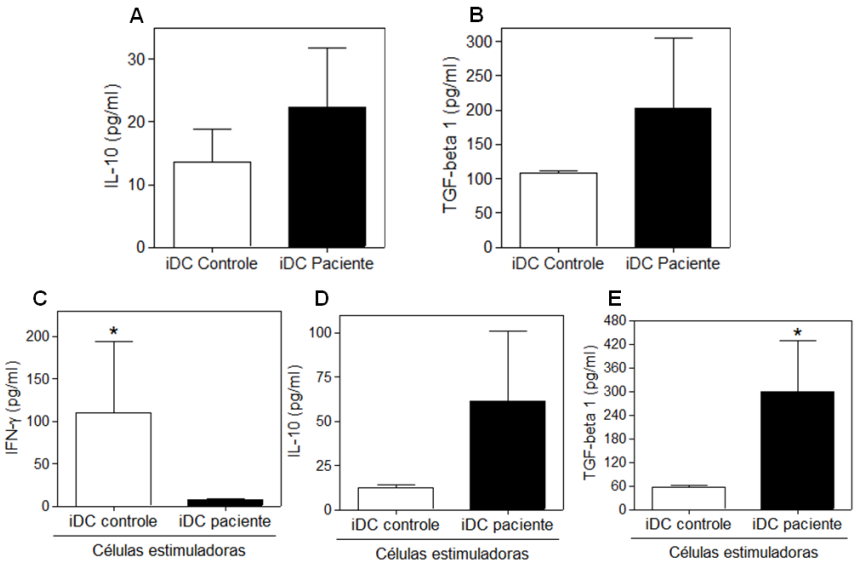


Figura 22. Avaliação da produção de citocinas por ELISA. Os sobrenadantes coletados das culturas ou co-culturas de iDCs de pacientes ou doadoras saudáveis foram submetidos a dosagem de citocinas por ELISA. Em A, gráficos da produção basal de IL-10 e TGF-*β*1 (bioativo) pelas iDCs sem a adição dos linfócitos. Em B, gráficos representam a produção de IFN-γ, IL-10 e TGF-*β*1 (bioativo) nas co-culturas de iDCs com linfócitos $CD3^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ alogeneicos após 6 dias (n= 4; * $p \leq 0,05$ – test t Student).

4.9 Avaliação da participação de TGF-*β* na indução de células T reguladoras por iDCs de pacientes com câncer de mama

Sabendo que iDCs de pacientes produzem altos níveis de TGF-*β* e essa produção se mostrou aumentada na análise do sobrenadante das co-culturas, nos questionamos se essa citocina participaria do processo de indução de células Treg por iDCs de pacientes com câncer de mama. Para essa investigação, 1 ng/ml de anticorpos monoclonais anti-TGF-*β* foram adicionados no dia zero das co-culturas entre iDCs de pacientes e linfócitos T $CD4^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ previamente isolados por *beads* magnéticas. Passados 6 dias, o número total de leucócitos foi contabilizado e verificou-se um aumento significativo nas co-culturas onde foi adicionado anti-TGF-*β* (Figura 23A), indicando um aumento de proliferação de células quando em ausência desta citocina. Realizou-se também a avaliação da geração de células $CD25^{+}$ nas mesmas condições apresentadas e não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados ou não com anticorpos neutralizadores para TGF-*β* (Figura 23B). Por outro lado, a freqüência de células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ (Figura 23C) ou $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}CD127^{low}$ (Figura 23D) foi reduzida de maneira significativa nos experimentos onde foi adicionado anti-TGF-*β*. No entanto, a neutralização de TGF-*β* indicou um redução apenas parcial da freqüência de células Treg quando comparado as co-culturas estimuladas por iDCs de doadoras saudáveis (rever Figura 14), não sendo capaz de inibir totalmente a indução de Tregs por iDCs de pacientes.

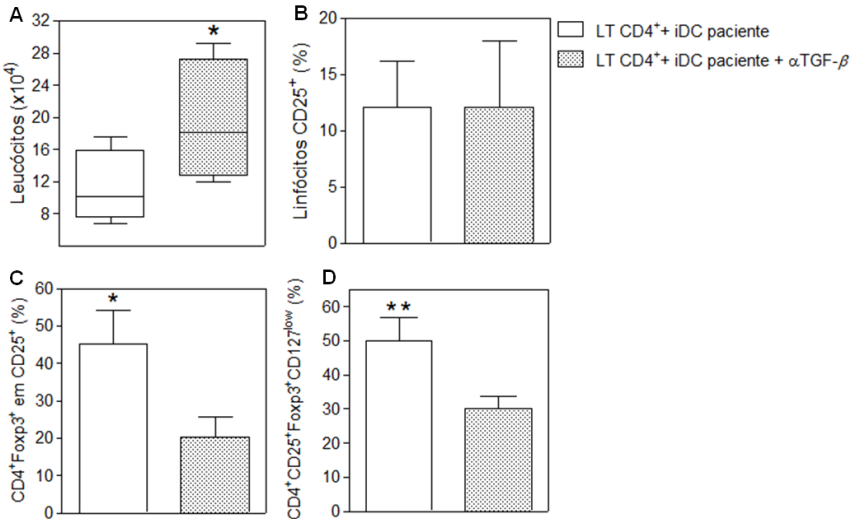


Figura 23. Avaliação do papel de TGF-*β* na geração de linfócitos T reguladores por células dendríticas imaturas de pacientes com câncer de mama. Anticorpos monoclonais anti-TGF-*β* (1 ng/ml) foram adicionados no dia zero das co-culturas entre iDCs de pacientes e linfócitos $CD4^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$. Após seis dias foram avaliados o número total de leucócitos (A), a freqüência de células $CD25^{+}$ e a geração de células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ (C) ou $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}CD127^{low}$ (D). (n= 4; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ – test t Student).

4.10 Análise da indução de células T reguladoras por subpopulações de iDCs $CD86^{High}$ e $CD86^{Low}$ provenientes de pacientes com câncer de mama

Conforme dados obtidos da avaliação da molécula CD86 entre células dendríticas imaturas de doadoras saudáveis e de pacientes com câncer de mama, observamos a presença de duas subpopulações com distintas expressões, $CD86^{High}$ e $CD86^{Low}$ em iDCs de pacientes. Esses achados, unidos ao fato de iDCs de pacientes também apresentarem diferenças significativas em freqüência e MFI de CD86 (rever Figuras 6 a 8), nos levaram a relacionar a expressão (MFI) das moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) com o potencial de iDCs de doadoras saudáveis, iDCs de pacientes e mDCs de pacientes na geração de células Treg. Observamos que iDCs saudáveis, que geraram baixas freqüências de Treg, possuíam o valor de MFI para CD80 sempre maior que os valores para CD86, no entanto, inversamente, iDCs e mDCs de pacientes apresentaram níveis de CD86 mais altos que da molécula CD80 (Figura 24). Adicionalmente, observamos que quando a freqüência de Tregs geradas, tanto por iDCs quanto por mDCs de pacientes, fosse próximo

ou superior a 40% o MFI dessas duas moléculas tinham seus valores reais aproximados. A partir daí nos questionamos se a geração de Tregs por DCs de pacientes estaria relacionado então a existência de diferentes subpopulações de células dendríticas e ainda, se TGF-*β* atuaria de maneira distinta nas diferentes co-culturas. Para tal, iDCs de duas pacientes, após o período de diferenciação, foram previamente marcadas com anticorpos anti-CD86 e posteriormente submetidas a separação por *Facs-sorting*. Inicialmente selecionaram-se as células por tamanho e granulosidade característicos (Figura 25A) com um enriquecimento de mais de 53% de células no *gate* (Figura 25A) e posteriormente as iDCs de cada paciente foram submetidas a separação da subpopulação $CD86^{Low}$ (Figura 25B – pureza > 98%) ou da subpopulação $CD86^{High}$ (Figura 25C – pureza > 95%). Após a separação das subpopulações de iDCs, tais células foram utilizadas como estimuladoras de linfócitos $CD4^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ alogeneicos durante 6 dias na presença ou não de anticorpos neutralizadores de TGF-*β* para a avaliação da expressão de CD25, geração de Tregs e número absoluto de células T reguladoras. Nossos dados revelaram que iDCs $CD86^{Low}$ induziram a menor freqüência de células $CD25^{+}$ em comparação com iDCs não separadas e iDCs $CD86^{High}$ e, ainda, a adição de anti-TGF-*β* não alterou a freqüência de células $CD25^{+}$ em nenhum dos grupos (Figura 26A e 27A). Em relação à geração de células Treg ($CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$), as duas subpopulações de iDCs parecem induzir freqüências similares de células Tregs entre si e também quando comparadas as iDCs não separadas (Figura 26B e 27B) e ainda a expressão de CD127 se mostrou similar entre todos os grupos de linfócitos estimulados (Figura 26C). No entanto, de maneira surpreendente, a adição de anti-TGF-*β* parece reduzir a freqüência de células Treg geradas apenas nas co-culturas estimuladas por iDCs $CD86^{Low}$ (Figura 26B e 27B). Quando avaliado o número absoluto de células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ geradas nas co-culturas, iDCs $CD86^{Low}$ foram as células que menos induziram Tregs quando comparadas aos demais grupos de iDCs. Por outro lado, iDCs $CD86^{High}$ parecem induzir o maior número de Tregs em co-cultura e, assim como na análise da freqüência de Tregs, novamente o bloqueio de TGF-*β* parece não influenciar a subpopulação de iDCs $CD86^{High}$ na geração de células Tregs também na análise do número absoluto (Figura 27C).

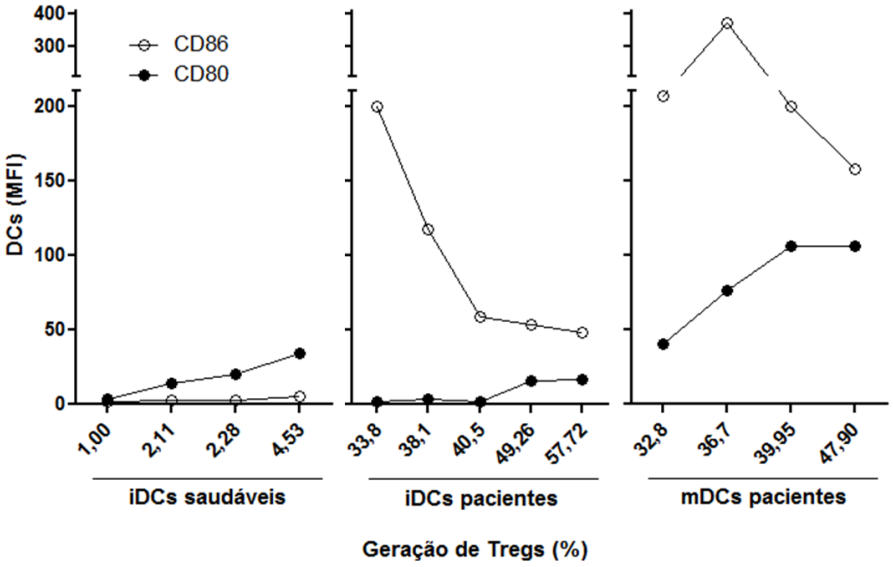


Figura 24. Relação da Intensidade Mediana de Fluorescência das moléculas CD80 e CD86 em DCs com a freqüência de linfócitos T reguladores gerados nas co-culturas. Valores do MFI das moléculas CD80 e CD86 em iDCs de doadoras saudáveis e em iDCs e mDCs de pacientes com câncer de mama foram co-relacionados com a geração de Tregs por essas células.

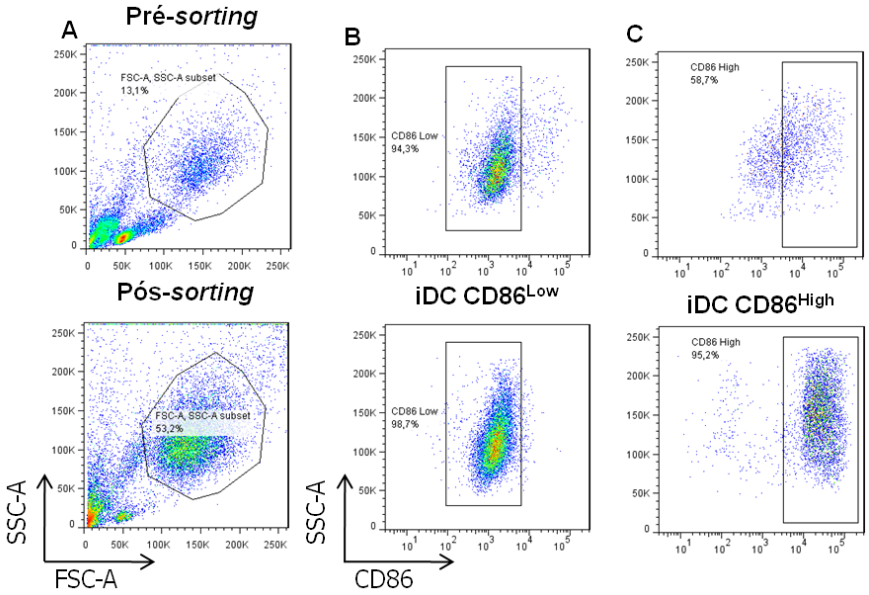


Figura 25. Separação das subpopulações de células dendríticas imaturas CD86^{Low} e CD86^{High} de pacientes portadoras de câncer de mama por citometria de fluxo. iDCs de pacientes foram marcadas com anticorpos anti-CD86 e posteriormente submetidas a separação de subpopulações CD86^{Low} e CD86^{High}. Em A, separação inicial das iDCs por tamanho e granulosidade. Em B e C, separação das subpopulações de iDCs CD86^{Low} e CD86^{High} respectivamente. (para cada subpopulação de iDCs separada foi utilizada uma paciente diferente).

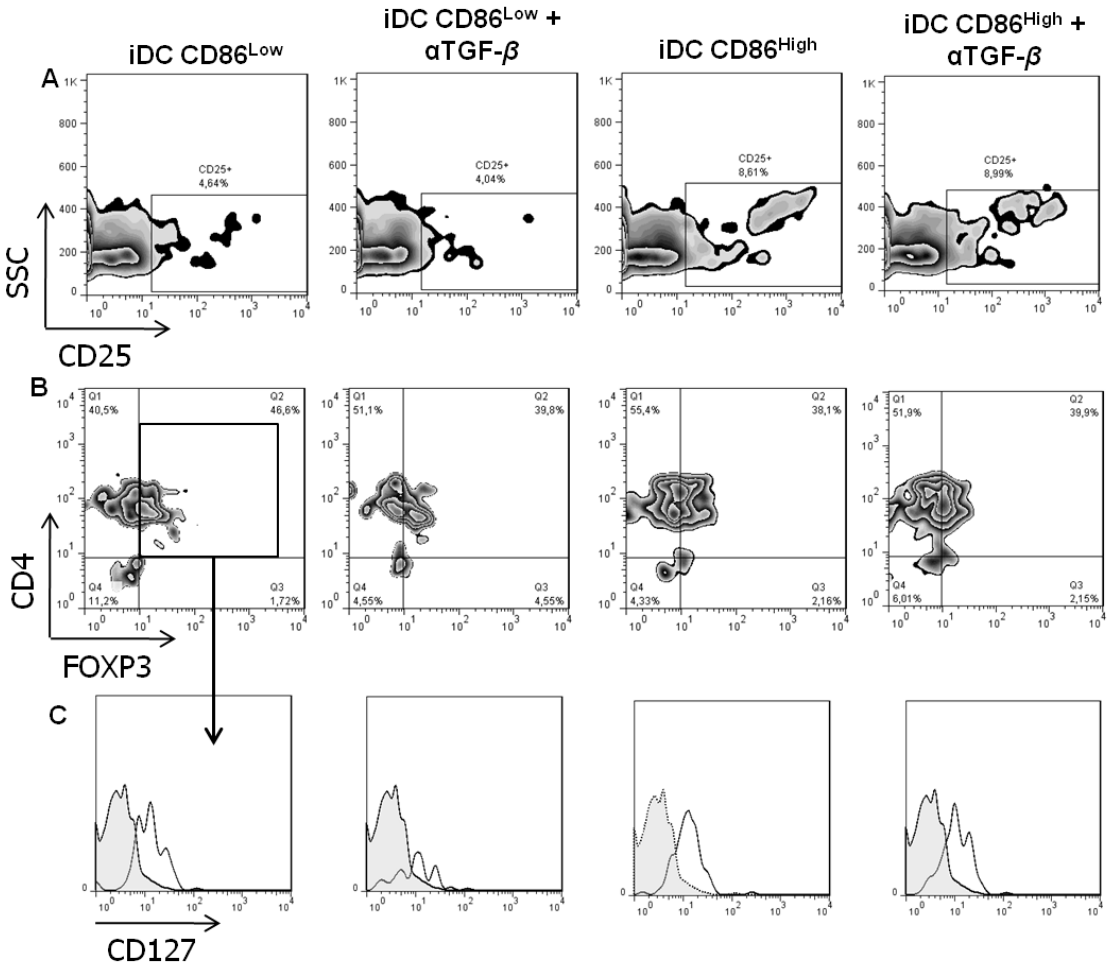


Figura 26. Avaliação da geração de linfócitos T reguladores por subpopulações de células dendríticas imaturas CD86^{Low} e CD86^{High} de pacientes portadoras de câncer de mama. Linfócitos CD4^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg} foram estimulados por subpopulações de iDCs CD86^{Low} e CD86^{High} de pacientes por seis dias. A freqüência de células CD25^{+} (A), de células Treg geradas (B) e a expressão de CD127 em células CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+} (C) foram avaliadas nas co-culturas também em presença de anti-TGF-*β* (1ng/ml).

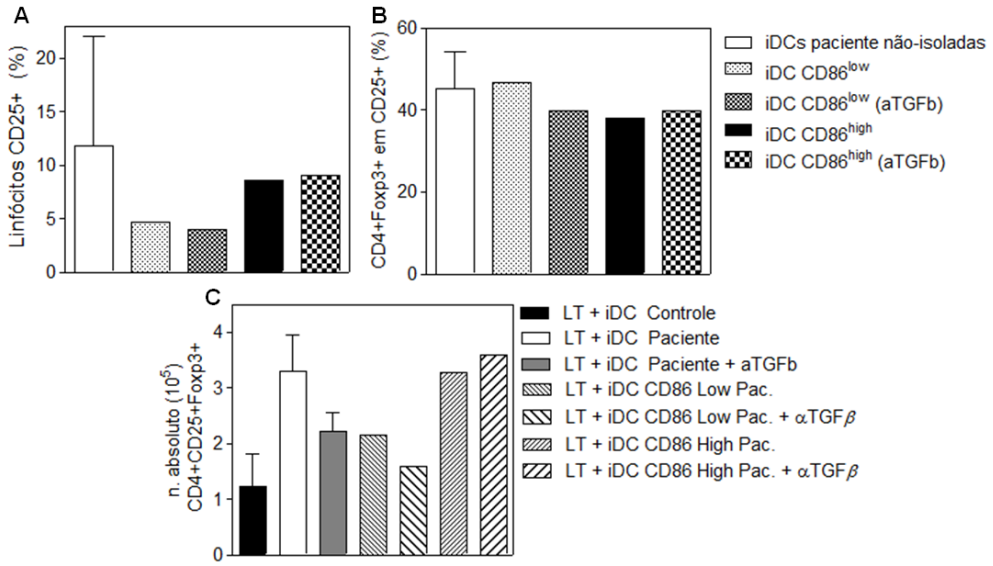


Figura 27. Gráficos comparativos da geração de linfócitos T reguladores por subpopulações de células dendríticas imaturas CD86^{Low} e CD86^{High} de pacientes com câncer de mama. Linfócitos CD4^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg} foram estimulados por iDCs CD86^{Low} e CD86^{High} de pacientes por seis dias na presença ou não de anti-TGF-*β* (1ng/ml). A freqüência de células CD25^{+} (A), de células Treg geradas (B) e o número absoluto de células CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+} (C) estão reunidos em gráficos comparativos.

5 DISCUSSÃO

Dados obtidos em nosso estudo revelam que células dendríticas imaturas (iDCs) derivadas de monócitos sanguíneos de pacientes com câncer de mama apresentam diferenças significativas tanto em sua constituição fenotípica quanto em suas habilidades funcionais quando comparadas a iDCs de doadoras saudáveis.

Fenotipicamente, além da heterogênea distribuição pelas imagens obtidas (Figura 4) e pelos parâmetros de tamanho por granulosidade (Figura 5), observou-se uma maior expressão de CD86 e CD123 tanto em freqüência quanto na intensidade mediana de fluorescência em iDCs provenientes de pacientes com câncer de mama (Figuras 6 e 7; tabela 3). A avaliação da expressão de CD80 e CD86 e a reunião dos dados obtidos em iDCs de pacientes pode indicar que a dinâmica da expressão dessas moléculas possui um papel relevante na indução de tolerância, haja visto que iDCs de doadoras saudáveis apresentam maior expressão média da molécula CD80 do que CD86 (MFI: CD80 = 18,0 ± 12,54 x CD86 = 3,33 ± 1,53), e por outro lado iDCs de pacientes expressam mais CD86 do que CD80 (MFI: CD80 = 19,86 ± 35,6 x CD86 = 64,7 ± 45,1). Adicionalmente, nota-se ainda que iDCs de pacientes possuem a expressão de CD86 de modo distinto das células de doadoras saudáveis, apresentando duas subpopulações bem definidas $CD86^{Low}$ e $CD86^{High}$ (Figura 8A e B) além de uma maior freqüência de células $CD80^{+}CD86^{+}$ (Figura 8C). Esses dados nos levaram, posteriormente, a análise funcional de iDCs $CD86^{Low}$ e $CD86^{High}$ na geração de células T reguladoras. Estudos realizados indicam que a capacidade estimuladora de DCs na diferenciação das subpopulações de linfócitos T reguladores pode estar relacionada, ao balanço na expressão de moléculas co-estimuladoras como CD80 e CD86 (ZHENG et al., 2004; PEREZ et al., 2008; ZENG et al., 2009), no entanto, dados da literatura atribuem a essas moléculas papéis contrastantes principalmente por serem realizados a partir de diferentes modelos. Como já descrito em outros trabalhos de nosso grupo (NEVES et al., 2005; BALEEIRO et al., 2008), nossos dados revelam a deficiência de iDCs de pacientes em estimular a resposta linfocitária principalmente por induzir uma alta freqüência de células T reguladoras mesmo em experimentos com algumas variações (Figuras 14 e 15), mesmo expressando altos níveis da molécula CD86. Outro

dado relevante foi a expressão aumentada em MFI de PD-L1 (Ligante 1 do programador de morte) em iDCs de pacientes com câncer de mama que, mesmo sem diferença estatística em comparação a iDCs sadias, nos aponta para um estudo mais aprofundado com o aumento do número de amostras para a avaliação dessa molécula. Estudos recentes apontam para a molécula PD-L1 como fator essencial na indução de tolerância, principalmente em respostas antitumorais. Tais achados descrevem a expressão de PD-L1 tanto por células tumorais (DONG et al., 2002) como por monócitos ativados das regiões peritumorais (KUANG et al., 2009) como moléculas atuantes na supressão da resposta imune. Outros autores descrevem que a indução de células T reguladoras Foxp3^{+} se relacionaria a presença e à sinalização da molécula PD-L1 em células dendríticas murinas (WANG et al., 2008) e humanas (ARMANATH et al., 2010) via seu ligante natural, PD-1, em linfócitos, por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos. Durante a supressão da resposta linfocitária, a molécula PD-L1 pode ligar-se ao seu receptor PD-1 (programador de morte 1) em linfócitos ativados inibindo assim a sinalização dos eventos TCR proximais (CHEMNITZ et al., 2004). A maior expressão de CD123 encontrada em iDCs de pacientes, apesar de característico de DCs plasmocitóides, parece estar relacionada a uma característica peculiar em DCs mielóides diferenciadas *in vitro*. Um estudo realizado por Munn e colaboradores (MUNN et al., 2002) indicou que DCs com alta expressão de 2,3 indolamina dioxigenase (IDO) também co-expressavam CD123 e CCR6 e eram potencialmente reguladoras da ativação linfocitária. De maneira complementar, outro estudo realizado por Nakamura et al. (2007) revelou que o aumento da expressão de IDO em tecidos tumorais de câncer de colo do útero foi responsável pelo recrutamento de células Foxp3^{+}. Dessa forma, a avaliação da expressão de IDO nas iDCs de pacientes com câncer de mama se tornou alvo interessante para a complementação de nosso estudo e identificação de possíveis mecanismos que controlariam o fenômeno encontrado, experimentos preliminares revelaram similar expressão de IDO em iDCs saudáveis e de pacientes pela avaliação por PCR (dados não apresentados), porém experimentos adicionais são essenciais para a confirmação desses dados. Outra hipótese é defendida por Frick e colaboradores (2010) que descreveram

as DCs hábeis na geração de regulação (Tregs) como caracteristicamente em um estágio conhecido como semi-maduro, onde algumas moléculas de superfície como CD80, CD86 e HLA-DR se apresentam altamente expressas enquanto outros marcadores típicos de ativação como CD40 e CD83 seriam similares a DCs imaturas, ao mesmo tempo em que citocinas de perfil pró-inflamatório como IL-1*β*, IL-6 e IL-12 não seriam produzidas durante a ativação dos linfócitos.

Outro dado importante foi observado quanto a similaridade da expressão de moléculas de superfície em DCs obtidas diretamente do sangue periférico e iDCs geradas *in vitro* a partir de monócitos das mesmas pacientes estudadas (Figuras 10 e 11). Mesmo levando-se em consideração as diferentes origens e processos de diferenciação entre essas duas populações de DCs, é possível observar que o *status* das DCs sanguíneas é compatível ao de células imaturas, principalmente pela baixa expressão de moléculas como CD80, CD86, CD83 e CD40 (Figuras 10 e 11) como similarmente descrito também por outros estudos (GABRILOVICH et al., 1997; DELLA BELLA et al., 2003; PINZON-CHARRY et al., 2007). Esses dados são muito relevantes ao que abrange o estudo da imunidade antitumoral *in vivo* e a investigação dos mecanismos pelos quais a resposta imune adaptativa é deficientemente iniciada por DCs periféricas de pacientes com câncer. Tais achados relacionados à fenotipagem de DCs nos questionam sobre o exato balanço das moléculas co-estimuladoras (positivas e negativas), assim como a de outras moléculas com função ainda não totalmente esclarecidas, e sua relação com os prováveis perfis de geração de respostas possivelmente induzidos (Th1, Th2, Th17 e T regulador) a partir de DCs provenientes de pacientes com câncer.

Nos ensaios funcionais, iDCs de pacientes foram ineficientes na estimulação de linfócitos tanto em sua capacidade linfo-proliferativa (Figura 13) como na ativação linfocitária pela expressão de CD25 (Figura 14). A proliferação de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ alogeneicos foi sempre menor quando esses foram estimulados por iDCs de pacientes em comparação com iDCs de doadoras saudáveis. Achados que vão ao encontro de dados previamente obtidos por nosso grupo (AZEVEDO-SANTOS, 2010) e também descritos em

literatura, onde nem mesmo DCs de pacientes em estado maduro (ativadas) são capazes de induzir uma maior estimulação de linfócitos quando comparadas as DCs de doadores sadios (GABRILOVICH et al., 1997; GERVAIS et al., 2005; PEDERSEN et al., 2005).

Adicionalmente iDCs de pacientes induziram uma alta freqüência de células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ (Figura 15) que apresentaram função supressora (Figura 20), acompanhado por uma elevada produção de TGF-beta1 bioativo (Figura 22B) a partir da estimulação de linfócitos $CD3^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$. Similarmente, a estimulação de linfócitos $CD4^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ imunomagneticamente isolados também indicaram o mesmo fenômeno (Figura 16). A capacidade de iDCs em gerar um perfil imunoregulador através da geração ou expansão de células T reguladoras/supressoras (tanto $Foxp3^{+}$ como $Foxp3^{neg}$) já foi descrita em células humanas e depende da adição às culturas de combinações específicas de mediadores (JONULEIT et al., 2000; DHODAPKAR et al., 2002). Até onde pudemos avaliar, nossa observação, da geração de Tregs diretamente por iDCs (derivadas de monócitos sanguíneos provenientes de pacientes com câncer de mama), sem adição de moduladores à cultura, é inédita. Na literatura, nota-se que a adição ou bloqueio de TGF-*β,* em combinação com outras citocinas, representa elemento fundamental dentro de sistemas que descrevem o fenômeno de indução de respostas do tipo T regulador em cultura (CHEN et al., 2003; FANTINI et al., 2004). Descreveu-se que iDCs em contato com células tumorais passam a ser grandes produtoras de TGF-*β*1 e, conseqüentemente são capazes de induzir Tregs em co-cultura (GHIRINGHELLI et al., 2005; DUMITRIU et al., 2009). Nossos dados, verificando a secreção espontânea desta citocina (Figura 22B) e, posteriormente, nas co-culturas (Figura 22D) sugerem que esta via poderia ser a responsável pelo fenômeno que observamos – caso se aceite um contato prévio dos precursores utilizados com células tumorais (ou seus produtos) no organismo. Dessa forma, investigamos a participação do TGF-*β* em nosso sistema a partir da adição de anticorpos neutralizadores (anti-TGF-*β* – 1ng/ml) as co-culturas de iDCs de pacientes com linfócitos $CD4^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ alogeneicos. Nossos resultados indicam que a participação de TGF-*β* é apenas parte do processo de expansão de Tregs por iDCs de pacientes *in vitro*,

considerando que a freqüência de células com fenótipo $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ ou com fenótipo $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}CD127^{Low}$ foi reduzida pela metade na presença de anticorpos bloqueadores (Figura 23), o que gerou o aumento significativo do número total de leucócitos nas co-culturas (Figura 23). De modo geral, a função tolerogênica de iDCs de pacientes depende apenas parcialmente da presença/produção de TGF-*β* nas co-culturas e, como discutido adiante, parece influenciar de modo distinto a estimulação de linfócitos estimulados por diferentes subpopulações de iDCs de pacientes.

A produção de IL-10 por iDCs de pacientes e em co-culturas não se mostrou significativamente diferente quando comparadas as iDCs e co-culturas de doadoras saudáveis (Figura 22), no entanto a tendência ao aumento dessa citocina, paralelamente a menor capacidade de iDCs de pacientes em ativar/estimular linfócitos (autólogos e alogeneicos), não exclui o fato de que células T reguladoras do tipo Tr1 (tipicamente Foxp3 negativas) possam também estar sendo geradas. Estas últimas não foram avaliadas ainda em nosso estudo.

O fato de iDCs de pacientes com câncer de mama induzirem uma maior geração de células Treg em contextos alogeneicos nos remetem a hipotetizar se esse fenômeno ocorreria também na estimulação de linfócitos autólogos em sistemas antígeno-específicos. Um estudo realizado por Vasir e colaboradores (VASIR et al., 2008) destaca, entre outras coisas, que DCs maduras provenientes de pacientes com câncer de mama quando fundidas com tumores primários de mama promovem a expansão de células Tregs autólogas ($CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$) ativamente supressoras, o que poderia indicar a existência de células Tregs tumor- específicas e embasar a continuação de nossa investigação sobre a especificidade das células geradas em nosso trabalho.

A caracterização, apenas fenotípica, de células por marcadores CD4, CD25, Foxp3, CD127 e CTLA-4 geradas em co-cultura com iDCs de pacientes com câncer de mama e doadoras saudáveis (Figura 19) seria incapaz de avaliar, por si só, a capacidade funcional das mesmas em suprimir a resposta imune *in vitro*. Mesmo considerando que o potencial proliferativo de células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ induzidas por iDCs (tanto pacientes como saudáveis) seja

menor que células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{neg}$ (Figuras 19), experimentos realizados com o intuito de investigar o potencial funcional dessas células, indicam que células $CD25^{+}$ (aproximadamente 57% $CD4^{+}Foxp3^{+}$) isoladas das co-culturas com iDCs de pacientes com câncer de mama são capazes de inibir, parcialmente, a proliferação de linfócitos alogeneicos sob a estimulação por PHA (Figura 20). Contrariamente ao que ocorre quando células $CD25^{+}$ (aproximadamente 2,5% $CD4^{+}Foxp3^{+}$), provenientes de co-culturas com iDCs saudáveis, são adicionadas as culturas e aumentam o potencial linfo-proliferativo (Figura 20). Tais achados podem ser explicados pelo fato da expressão de Foxp3 ocorrer de maneira transitória em células T "recém ativadas" e que somente a sustentação e manutenção desse fator de transcrição nessas mesmas células poderiam conferir-lhes a função supressora (WALKER et al., 2005; ALLAN et al., 2008).

Recentemente alguns autores creditam essa habilidade de iDCs de gerar células Tregs não somente ao balanço ou ausência de co-estimulação e a produção de citocinas imunossupressoras (ex. IL-10 e TGF-*β*) como também à presença de outras moléculas de superfície que participem do processo de indução de células T reguladoras *in vitro.* Receptores inibitórios como ILT3 e ILT4 foram descritos como altamente expressos em DCs hábeis em promover a indução de células T reguladoras pela ausência do triptofano (BRENK et al., 2009). Adicionalmente, outros estudos revelaram que a presença de células Treg promoveria um *feedback* capaz de aumentar e manter a expressão desses receptores nas DCs quando em co-cultura promovendo assim a constante manutenção da tolerância (CHANG et al., 2002).

Levando-se em conta a diferença no perfil de expressão de CD86 em iDCs de pacientes com câncer de mama como uma das principais diferenças fenotípicas em comparação a iDCs de doadoras saudáveis (Figura 8) e considerando que esse dado pode estar relacionado ao desvio no padrão de ativação/estimulação linfocitária (Figura 24), iDCs de pacientes foram isoladas por *Facs-sorting* em duas subpopulações apresentando distintas expressões de CD86, iDCs $CD86^{Low}$ e $CD86^{High}$ (Figura 25). Posteriormente essas células foram co-cultivadas com $CD4^{+}CD25^{neg}Foxp3^{neg}$ por seis dias na presença ou não de anticorpos monoclonais bloqueadores de TGF-*β*. Tais ensaios foram

realizados como experimentos preliminares com duas pacientes diferentes e os dados obtidos nos apontam que iDCs $CD86^{High}$ são capazes de induzir o dobro da freqüência de linfócitos $CD25^{+}$ (Figura 26A) quando comparadas a iDCs $CD86^{Low}$, no entanto a freqüência da geração de células $CD4^{+}Foxp3^{+}$ no *gate* de células $CD25^{+}$ se mostrou similar (Figura 26B). Por outro lado, considerando o número absoluto de células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ geradas por essas duas subpopulações de iDCs, observamos que iDCs $CD86^{High}$ induziram um número cerca de 50% maior dessas células do que iDCs $CD86^{Low}$, nos grupos que não receberam a adição de anti-TGF-*β*. Essa diferença se apresentou ainda maior quando analisados os dados das co-culturas que receberam 1 ng/ml de anti-TGF-*β*. Em co-culturas onde iDCs $CD86^{High}$ foram usadas como estimuladoras, o bloqueio de TGF-*β* resultou em um aumento no número de células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ geradas *in vitro* indicando não influenciar a habilidade funcional dessas DCs em induzir células Tregs (Figuras 26 e 27). Contrariamente, co-culturas com iDCs $CD86^{Low}$, quando em presença de anticorpos neutralizadores de TGF-*β* apresentaram uma redução de cerca de 30% no número de células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$. Nota-se ainda, que a comparação entre co-culturas estimuladas por iDCs $CD86^{Low}$ e $CD86^{High}$ na presença de anti-TGF-*β* indicam uma diferença duas vezes maior de células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ geradas por iDCs $CD86^{High}$ de pacientes (Figura 27). Esses apontamentos nos questionam sobre o verdadeiro papel de moléculas co-estimuladoras (tanto negativas quanto positivas) em corroboração a outros fatores solúveis (ex. citocinas) ou ainda não estudados, que possam interferir no funcionamento ideal de DCs de pacientes com câncer na estimulação de uma resposta imune efetiva, ideal para o excelente funcionamento de protocolos de imunoterapia.

A indução de células Treg por iDCs de pacientes, visto em nossos dados, é condizente com a alta freqüência de Tregs encontrada no sangue periférico dessas mesmas pacientes (Figura 1 a 3). Tal fato unido ao fenótipo imaturo encontrado por nós em DCs avaliadas do sangue periférico dessas mesmas pacientes (Figuras 10 e 11) pode sugerir uma hipótese de que DCs *in vivo* atuariam na geração/expansão de Tregs periféricas, contribuindo para a supressão da resposta imune antitumoral como uma estratégia válida para o

escape do sistema imune. No entanto, seriam necessários estudos adicionais sobre a funcionalidade dessas DCs sanguíneas, unidos aos dados já descritos, que possam dar base para a investigação dessa hipótese. Vale ressaltar ainda que dados preliminares obtidos na análise de pacientes portadores de outros tipos de tumores, tanto na análise de Tregs periféricas (Figura 2) quanto na geração de Tregs por iDCs (Figura 17), apontam para a ampliação dos estudos em tipos e gradações de tumores diferentes como alvos em potencial para a investigação da geração de tolerância por diferentes DCs.

Por meio de nosso estudo devemos considerar também que de maneira oposta, iDCs provenientes de doadoras controle induziram uma intensa proliferação de linfócitos $CD4^+$ e $CD8^+$ (Figura 13) acompanhado por uma maior ativação dos linfócitos (expressão de CD25) (Figura 14). Observamos também uma produção significativamente maior de IFN-γ nas co-culturas (Figura 22) e indícios do aumento de outras citocinas de perfil inflamatório como IL-6, IL-12p70 e TNF-α (Figura 21). Tais dados apontam para a caracterização de um perfil do tipo Th1 mesmo considerando que foram utilizadas DCs saudáveis em estado imaturo. Desse modo, reafirma-se a importância da utilização de células dendríticas provenientes de doadores saudáveis no desenvolvimento de imunoterapias no combate a tumores (BARBUTO et al., 2004).

De maneira geral, os dados obtidos em nosso estudo confirmam a nossa hipótese inicial da existência de um viés “imunossupressor” em DCs de pacientes com câncer. Os dados apresentados aqui suportam a idéia do uso de DCs sadias em protocolos imunoterapêuticos, pois são eficientemente hábeis em estimular a resposta linfocitária com baixa indução de células T fenotipicamente reguladoras.

Resultados gerados em nosso trabalho indicam a constatação de um fenômeno ainda pouco explorado em DCs de pacientes com câncer de mama e o detalhamento dos mecanismos que o governam se tornam alvos potencialmente importantes para o desenvolvimento de metodologias úteis na recuperação do estado ideal dessas DCs e sua aplicação em protocolos imunoterapêuticos contra tumores.

6 CONCLUSÕES

Através dos dados obtidos em nosso estudo podemos, especificamente, concluir que:

- Pacientes com câncer de mama possuem maior freqüência de Tregs circulantes que doadoras saudáveis com a expressão das moléculas CD45RO, $CD127^{Low}$, PD-1 e CTLA-4 no *gate* $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$;

- Células dendríticas imaturas (iDCs) de pacientes com câncer de mama, além de possuírem diferenças na distribuição em tamanho, também apresentam maior freqüência e intensidade mediana de fluorescência das moléculas CD86 e CD123 em comparação com iDCs de doadoras saudáveis;

- A análise da molécula CD86 indica que iDCs de pacientes com câncer de mama se apresentam em duas subpopulações $CD86^{Low}$ e $CD86^{High}$;

- Pacientes com câncer de mama possuem maior freqüência de iDCs $CD80^{+}CD86^{+}$ em comparação com doadoras saudáveis;

- DCs do sangue periférico de pacientes com câncer de mama apresentam similaridades fenotípicas (freqüência e MFI) com células dendríticas imaturas diferenciadas de monócitos *in vitro* dessas pacientes;

- iDCs de pacientes com câncer de mama induziram menor proliferação de linfócitos $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$ em comparação com iDCs de doadoras saudáveis;

- iDCs de pacientes com câncer de mama induziram menor freqüência de linfócitos $CD25^{+}$ em comparação com iDCs de doadoras saudáveis;

- Células dendríticas de pacientes com câncer de mama, tanto imaturas quanto maduras, induziram maior freqüência de Tregs ($CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$) em comparação com iDCs de doadoras saudáveis;

- Linfócitos $CD3^{+}CD25^{neg}$ ou $CD4^{+}CD25^{neg}$ estimulados por DCs de pacientes com câncer de mama resultou em similar freqüência de Tregs gerados em co-cultura;

- Tregs ($CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$) gerados em co-cultura indicaram pouca capacidade proliferativa (diluição de CFSE) juntamente com a expressão de CTLA-4 e $CD127^{Low}$;

- Tregs gerados em co-cultura por iDCs de pacientes com câncer de mama foram funcionalmente supressoras em contato com linfócitos alogeneicos;

- O bloqueio de TGF-*β* nas co-culturas foi capaz de reduzir parcialmente a freqüência de Tregs induzida por iDCs de pacientes com câncer de mama;
- A dinâmica da expressão de CD80 e CD86 em DCs parece estar relacionada à capacidade de indução de Tregs por essas APCs;

- A neutralização de TGF-*β* nas co-culturas de iDCs $CD86^{Low}$ parece reduzir a freqüência e número absoluto de Tregs geradas;

- A neutralização de TGF-*β* nas co-culturas de iDCs $CD86^{High}$ parece não diminuir a freqüência e número absoluto de Tregs geradas;

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS[1]

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular.** 4. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003. 544 p.

ADEMA, G. J. et al. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. **Nature**, v. 387, p. 713-717, 1997.

ALLAN, S. E. et al. Generation of potent and stable human CD4+ T regulatory cells by activation independent expression of FOXP3. **Mol. Ther.**, n. 16, p. 194–202, 2008.

AMARNATH, S. et al. Regulatory T Cells and Human Myeloid Dendritic Cells Promote Tolerance via Programmed Death Ligand-1. **PLoS Biology,** v. 8, n. 2, p. 1-13, 2010.

ARDAVÍN, C. et al. Origin and differentiation of dendritic cells. **Trends Immunol.,** v. 22, p. 691-700, 2001.

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

BALEEIRO, R. B.; ANSELMO, L. B.; SOARES, F. A.; PINTO, C. A. L.; RAMOS, O.; GROSS, J. L.; HADDAD, F.; YOUNES, R. N.; TOMIYOSHI, M. Y.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; BARBUTO, J. A. M. High frequency of immature dendritic cells and altered in situ production of interleukin-4 and tumor necrosis factor in lung cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 57, p. 1335–1345, 2008.

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

[1] De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BANCHEREAU, J.; PALUCKA, A. K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. **Nature Reviews Immunol.**, v. 5, p. 296-306, 2005.

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

BARBUTO, J. A.; ENSINA, L. F.; NEVES, A. R.; BERGAMI-SANTOS, P.; LEITE, K. R.; MARQUES, R.; COSTA, F.; MARTINS, S. C.; CAMARA-LOPES, L. H.; BUZAID, A. C. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 53, n. 12, p. 1111-1118, 2004.

BAXEVANIS, C. N.; SOTIRIADOU, N. N.; GRITZAPIS, A. D.; SOTIROPOULOU, P. A.; PEREZ, S. A.; CACOULLOS, N. T.; PAPAMICHAIL, M. Immunogenic HER-2/neu peptides as tumor vaccines. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 55, p. 85–95, 2006.

BELKAID, Y; OLDENHOVE, G. Tuning Microenvironments: Induction of Regulatory T Cells by Dendritic Cells. **Immunity**, v. 29, p. 362-371, 2008.

BLANK, C.; MACKENSEN, A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 56, p. 739-745, 2007.

BRENK, M. et al. Tryptophan Deprivation Induces Inhibitory Receptors ILT3 and ILT4 on Dendritic Cells Favoring the Induction of Human CD4+CD25+ Foxp3+ T Regulatory Cells. **J. Immunol.**, v. 183, p. 145-154, 2009.

CAUX, C. et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 1263-1272, 1994a.

CAUX, C. et al. B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 1841-1877, 1994b.

CELLA, M.; FACCHETTI, F.; LANZAVECCHIA, A.; COLONIA, M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. **Nat. Immunol.**, v. 1, p. 305-310, 2000.

CHANG, C. C. et al. Tolerization of dendritic cells by Ts cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 e ILT4. **Nat. Immunol.**, v. 3, n. 3, p. 237-243, 2002.

CHEMNITZ, J. M.; PARRY, R. V.; NICHOLS, K. E.; JUNE, C. H.; RILEY, J. L. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. **J. Immunol.**, v. 173, n. 2, p. 945-954, 2004.

CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K. J.; LI, L.; MARINOS, N.; MCGRADY, G.; WAHL, S. M. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **J. Exp. Med.**, v. 198, p. 1875–1886, 2003.

COFFER, P. J.; BURGERING, B. M. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 889–899, 2004.

COLOMBO, M. P.; PICONESE, S. Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy. **Nat. Rev. Cancer**, v. 7, p. 880-887, 2007.

COOMBES, J. L.; SIDDIQUI, K. R.; ARANCIBIA-CARCAMO, C. V.; HALL, J.; SUN, C. M.; BELKAID, Y. et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 1757-1764, 2007.

CURIEL, T. J. Regulatory T-cell development: is Foxp3 the decider? **Nat. Med.**, v. 13, n. 3, p. 250-253, 2007a.

CURIEL, T. J. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. **J. Clin. Invest.** v. 117, n. 5, p. 1167-1174, 2007b.

CURIEL, T. J.; COUKOS, G.; ZOU, L.; ALVAREZ, X.; CHENG, P.; MOTTRAM, P. et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nat. Med.**, v. 10, p. 942-949, 2004.

DELLA BELLA, S.; GENNARO, M.; VACCARI, M.; FERRARIS, C.; NICOLA, S.; RIVA, A.; CLERICI, M.; GRECO, M.; VILLA, M. L. Altered maturation of

peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. **Br. J. Cancer**, v. 89, n. 8, p. 1463-72, 2003.

DHODAPKAR, M. V.; STEINMAN, R. M. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8 (+) regulatory T cells in vivo in humans. **Blood**, v. 100, p. 174-177, 2002.

DIECKMANN, D. et al. Human CD4+CD25+ regulatory, contact dependent T cells induce interleukin 1-producing, contact independent type 1-like regulatory T cells. **J. Exp. Med.**, v. 196, p. 247–253, 2002.

DISIS, M. L.; CHEEVER, M. A. HER-2/neu protein: a target for antigen-specific immunotherapy of human cancer. **Adv. Cancer Res.**, v. 71, p. 343, 1997.

DONG, H.; STROME, S. E.; SALOMAO, D. R.; TAMURA, H.; HIRANO, F.; FLIES, D. B.; ROCHE, P.C.; LU, J.; ZHU, G.; TAMADA, K.; LENNON, V. A.; CELIS, E.; CHEN, L. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. **Nat. Med.**, v. 8, n. 8, p. 793-800, 2002.

DOWSETT, M. Improved prognosis for biomarkers in breast cancer. **Lancet**, v. 351, p. 1753-1754, 1998.

DUMITRIU, I. E. Human Dendritic Cells Produce TGF-*β*1 under the Influence of Lung Carcinoma Cells and Prime the Differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells. **J. Immunol.**, v. 182, p. 2795–2807, 2009.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. **Immunity**, v. 21, p. 137–148, 2004.

FANTINI, M. C. et al. Cutting Edge: TGF-beta Induces a Regulatory Phenotype in CD4+CD25- T Cells through Foxp3 Induction and Down-Regulation of Smad7. **J. Immunol.**, v. 172, p. 5149-5153, 2004.

FARIA, A. M.; WEINER, H. L. Oral tolerance. **Immunol. Rev.**, v. 206, p. 232–259, 2005.

FISK, B.; BLEVINS, T. L.; WHARTON, J. T.; IOANNIDES, C. G. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by

ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. **J. Exp. Med.**, v. 181, p. 2109-2117, 1995.

FONTENOT, A. P. et al. CD28 costimulation independence of target organ versus circulating memory antigen-specific CD4+ T cells. **J. Clin. Invest.**, v. 112, n. 5, p. 776-784, 2003.

FRICK, J. S.; GRÜNEBACH, F.; AUTENRIETH, I. B. Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: A novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. I**nt. J. of Medical Microbiology**, n. 300, p. 19–24, 2010.

GABRILOVICH, D. I.; CORAK, J.; CIERNIK, I. F.; KAVANAUGH, D.; CARBONE, D. P. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 3, n. 3, p. 483-490, 1997.

GERVAIS, A.; LEVÊQUE, J.; BOUET-TOUSSAINT, F.; BURTIN, F.; LESIMPLE, T.; SULPICE, L.; PATARD, J. J.; GENETET, N.; CATROS-QUEMENER, V. Dendritic cells are defective in breast cancer patients: a potential role for polyamine in this immunodeficiency. **Breast Cancer Res.**, v. 7, n. 3, p. 326-335, 2005.

GERVOIS, N.; HEUZE, F.; DIEZ, E.; JOTEREAU, F. Selective expansion of a specific anti-tumor CD8+ cytotoxic T lymphocyte clone in the bulk culture of tumor-infitrating lymphocytes from a melanoma patient: cytotoxic activity and T cell receptor gene rearrangements. **Eur. J. Immunol.**, v. 20, p. 825–831, 1990.

GHIRINGHELLI, F. et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-b-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. **J. Exp. Med.** v. 202, p. 919–929, 2005.

GORDON, N.; KLEINERMAN, E. S. The role of Fas/FasL in the metastatic potential of osteosarcoma and targeting this pathway for the treatment of osteosarcoma lung metastases. **Cancer Treat. Res.**, v.152, p.497-508, 2009.

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

HACKSTEIN, H.; THOMSON, A. W. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 24-34, 2004.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science.** v. 299, n. 5609, p. 1057-61, 2003.

ISAKSSON, M.; ARDESJO, B.; RONNBLOM, L.; KAMPE, O.; LASSMANN, H.; ELORANTA, M. L. et al. Plasmacytoid DC promote priming of autoimmune Th17 cells and EAE. **Eur. J. Immunol.**, v. 39, p. 2925-2935, 2009.

JÄGER, E.; NAGATA, Y.; GNJATIC, S.; WADA, H.; STOCKERT, E.; KARBACH, J.; DUNBAR, P. R.; LEE, S. Y.; JUNGBLUTH, A.; JÄGER D. Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 97, p. 4760-4765, 2000.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics. **CA. Cancer J. Clin.**, v. 54, p. 8-29, 2004.

JONULEIT, H.; SCHMITT, E.; SCHULER, G.; KNOP, J.; ENK, A. H. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4+ T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 1213–1222, 2000.

JONULEIT, H. et al. Identification and functional characterization of human CD4+CD25+ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. **J. Exp. Med.**, v. 193, p. 1285–1294, 2001.

KALINSKI, P.; HILKENS, C. M.; WIERENGA, E. A.; KAPSENBERG, M. L. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. **Immunol. Today**, v. 20, p. 561-567, 1999a.

KALINSKI, P. et al. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. **J. Immunol.**, v. 162, p. 3231-3236, 1999b.

KATOU, F. et al. Macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) and CCR4 are involved in the formation of T lymphocyte-dendritic cell clusters in human inflamed skin and secondary lymphoid tissue. **Am. J. Pathol.**, v. 158, p. 1263-1270, 2001.

KEEN, J.; DAVIDSON, N. E. The biology of breast carcinoma. **Cancer,** v. 97, n. 3, p. 825-833, 2003.

KIESSLING, R.; WEL, W. Z.; HERRMANN, F.; LINDENCRONA, J. A.; CHEUDHURY, A.; KONO, K.; SELIGER, B. Cellular immunity to the HER-2/neu proto oncogene. **Adv. Cancer Res.**, v. 85, p. 101-144, 2002.

KING, C. et al. TGF-beta1 alters APC preference, polarizing islet antigen responses toward a Th2 phenotype. **Immunity**, v. 8, p. 601-613, 1998.

KRONENBERG, M.; RUDENSKY, A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. **Nature**, v. 435, p. 598-604, 2005.

KUANG, D. M.; ZHAO, Q.; PENG, C.; XU, J.; ZHANG, J. P.; WU, C.; ZHENG, L. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. **J. Exp. Med.**, v. 206, n. 6, p. 1327-37, 2009.

LANGENKAMP, A.; MESSI, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. **Nat. Immunol.**, v. 1, p. 311-316, 2000.

LIYANAGE, U. K. et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. **J. Immunol.**, v. 169, n. 5, p. 2756-2761, 2002.

LUO, X. et al. Dendritic cells with TGF-b1 differentiate naive CD4+CD25+ T cells into islet-protective Foxp3+ regulatory T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 104, p. 2821–2826, 2007.

LYONS, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometry measurement of CFSE dye dilution. **J. Immunol. Methods**, v. 243, p. 147-154, 2000.

MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. **Cell**, v. 106, p. 255–258, 2001.

MENETRIER-CAUX, C.; MONTMAIN, G.; DIEU, M. C.; BAIN, C.; FAVROT, M. C.; CAUX, C.; BLAY, J. Y. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from

CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. **Blood,** v. 92, p. 4778-4791, 1998.

MUNN, D. H. et al. Potential Regulatory Function of Human Dendritic Cells Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase. **Science**, v. 297, p. 1867-1870, 2002.

NAKAMURA, T. et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer. **Cancer Science**, v. 989, n. 6, p. 874–881, 2007.

NEVES, A. R.; ENSINA, L. F.; ANSELMO, L. B.; LEITE, K. R.; BUZAID, A. C.; CÂMARA-LOPES, L. H.; BARBUTO, J. A. Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 54, n. 1, p. 61-66, 2005.

NI, C. N.; REDMOND, H. P. Regulatory T cells and autoimmunity. **J. Surg. Res.**, v. 130, p. 124-135, 2006.

OCHANDO, J. C.; HOMMA, C.; YANG, Y.; HIDALGO, A.; GARIN, A.; TACKE, F. et al. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. **Nat. Immunol.**, v. 7, p. 652-662, 2006.

OUABED, A.; HUBERT, F. X.; CHABANNES, D.; GAUTREAU, L.; HESLAN, M.; JOSIEN, R. Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 180, p. 5862-5870, 2008.

PANDOLFINO, M. C.; VIRET, C.; GERVOIS, N.; GUILLOUX, Y.; DAVODEAU, F.; DIEZ, E.; JOTEREAU, F. Specificity, T cell receptor diversity and activation requirements of CD4+ and CD8+ clones derived from human melanoma-infitrating lymphocytes. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, p. 1795–1802, 1992.

PAPIERNIK, M. et al. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R α-chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. **Int. Immunol.**, v. 10, p. 371–378, 1998.

PEDERSEN, A. E.; THORN, M.; GAD, M.; WALTER, M. R.; JOHNSEN, H. E.; GAARSDAL, E.; NIKOLAJSEN, K.; BUUS, S.; CLAESSON, M. H.; SVANE, I. M. Phenotypic and functional characterization of clinical grade dendritic cells generated from patients with advanced breast cancer for therapeutic vaccination. **Scand. J. Immunol.**, v. 61, n. 2, p. 147-156, 2005.

PEREZ, N. et al. Preferential Costimulation by CD80 Results in IL-10-Dependent TGF-*β*1-adaptive regulatory T cell generation. **J. Immunol.**, v. 180, p. 6566-6576, 2008.

PINZON-CHARRY, A.; HO, C. S.; MAXWELL, T.; MCGUCKIN, M. A.; SCHMIDT, C.; FURNIVAL, C.; PYKE, C. M.; LÓPEZ, J. A. Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer. **Br. J. Cancer.**, v. 97, n. 9, p. 1251-1259, 2007.

PULENDRAN, B. et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 96, p. 1036-1041, 1999.

PULENDRAN, B. et al. Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. **Trends Immunol.**, v. 22, p. 41-47, 2001.

RADICE, D.; REDAELLI, A. Breast cancer management: quality-of-life and cost considerations. **Pharmacoeconomics**, v. 21, p. 383-396, 2003.

RISSOAN, M. C. et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. **Science**, v. 283, p. 1183-1186, 1999.

ROMANI, N. et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. **J. Immunol. Methods**, v. 196, p. 137-151, 1996.

RONCAROLO, M. G.; GREGORI, S.; BATTAGLIA, M.; BACCHETTA, R.; FLEISCHHAUER, K.; LEVINGS, M. K. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. **Immunol. Rev.**, v. 212, p. 28–50, 2006.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nature Immunol.**, v. 6, p. 345–352, 2005.

SAKAGUCHI, S.; MIYARA, M.; COSTANTINO, C. M.; HAFLER, D. A. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, p. 490-500, 2010.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. **Immunol. Rev.**, v. 182, p. 18-32, 2001.

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

SALLUSTO, F. et al. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 1617-1625, 1999.

SCHUBERT, L. A. et al. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 37672–37679, 2001.

SHARMA, M. D.; BABAN, B.; CHANDLER, P.; HOU, D. Y.; SINGH, N.; YAGITA, H. et al. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 2570-2582, 2007.

SHEVACH, E. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 6, p. 389-400, 2002.

SHEVACH, E. M. Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. **Immunity**, v. 30, p. 636-645, 2009.

SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nature Rev. Immunol.**, v. 2, p. 151–161, 2002.

SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; D'AMICO, G.; LUINI, W.; BIANCHI, G.; KATAURA, M. et al. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. **J. Immunol.** v. 161, p. 1083-1086, 1998.

SRIVASTAVA, S.; GOPAL-SRIVASTAVA R. Biomarkers in cancer screening: a public health perspective. **J. Nutri.**, v. 132, n. 8, p. 2471S-2475S, 2002.

STEINMAN, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 271–296, 1991.

STRAUSS, L. et al. A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. **Clin. Cancer Res.**, v. 13, n. 15, p. 4345-4354, 2007.

SUN, C. M.; HALL, J. A.; BLANK, R. B.; BOULADOUX, N.; OUKKA, M.; MORA, J. R. et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. **J. Exp. Med.**, v. 204, p. 1775-1785, 2007.

TADA, T.; OHZEKI, S.; UTSUMI, K.; TAKIUCHI, H.; MURAMATSU, M.; LI, X. F. et al. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. **J. Immunol.**, v. 146, p. 1077-1082, 1991.

TANAKA, H.; DEMEURE, C. E.; RUBIO, M.; DELESPESSE, G.; SARFATI, M. Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 405-412, 2000.

THORNTON, A. M.; SHEVACH, E. M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 287–296, 1998.

VAN DER BRUGGEN, P.; BASTIN, J.; GAJEWSKI, T.; COULIE, P. G.; BOEL, P.; DE, S. C. et al. A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, p. 3038-3043, 1994.

VASIR, B. et al. Fusions of dendritic cells with breast carcinoma stimulate the expansion of regulatory T cells while concomitant exposure to IL-12, CpG oligodeoxynucleotides, and anti-CD3/CD28 promotes the expansion of activated tumor reactive cells. **J. Immunol.**, n. 181, p. 808-821, 2008.

VERHASSELT, V. et al. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. **J. Immunol.**, v. 158, p. 2919-2925, 1997.

WALKER, M. R.; CARSON, B. D.; NEPOM, G. T.; ZIEGLER, S. F.; BUCKNER, J. H. De novo generation of antigen specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25– cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, n. 102, p. 4103–4108, 2005.

WANG, L. et al. Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 105, n. 27, p. 9331–9336, 2008.

WELTERS, M. J.; KENTER, G. G.; DE VOS, VAN.; STEENWIJK, P. J.; LOWIK, M. J.; BERENDS-VAN, DER. MEER. D. M; ESSAHSAH, F. et al. Success or failure of vaccination for HPV16-positive vulvar lesions correlates with kinetics and phenotype of induced T-cell responses. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, v. 107, p. 11895-11899, 2010.

WOO, E. Y. et al. Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. **J. Immunol.**, v. 168, p. 4272–4726, 2002.

YAMAMURA, M.; MODLIN, R. L.; OHMEN, J. D.; MOY, R. L. Local expression of antiinflammatory cytokines in cancer. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 1005-1010, 1993.

YANAGIHARA S. et al. EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is upregulated upon maturation. **J. Immunol.**, v. 161, p. 3096-3102, 1998.

ZENG, M.; GUINET, E.; NOURI-SHIRAZI, M. B7-1 and B7-2 differentially control peripheral homeostasis of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. **Transplant Immunology,** n. 20, p. 171–179, 2009.

ZHENG, Y. et al. CD86 and CD80 Differentially Modulate the Suppressive Function of Human Regulatory T Cells. **J. Immunol.**, v. 172, p. 2778-2784, 2004.

ZHOU, L. J. TEDDER, T. F. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**, v. 93, p. 2588-2592, 1996.

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

ZOU, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, n. 4, p. 295-307, 2006.