PATRICIA ARGENTA TONIOLO

**STAT E SOCS NA MODULAÇÃO FUNCIONAL DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE DOADORES SAUDÁVEIS
E PACIENTES COM CÂNCER**

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

São Paulo
2014

PATRICIA ARGENTA TONIOLO

**STAT E SOCS NA MODULAÇÃO FUNCIONAL DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE DOADORES SAUDÁVEIS
E PACIENTES COM CÂNCER**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto

Versão original

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Toniolo, Patricia Argenta.

STAT e SOCS na modulação funcional de células dendríticas derivadas de doadores saudáveis e pacientes com câncer. / Patricia Argenta Toniolo. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunobiologia de tumores e das células dendríticas.

Versão do título para o inglês: STAT and SOCS in the functional modulation of dendritic cells derived from healthy donors and CLL patients.

1. Células dendríticas 2. STAT 3. SOCS 4. Imunomodulação 5. Leucemia I. Barbuto, Prof. Dr. José Alexandre Marzagão II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0137/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Patricia Argenta Toniolo.

Título da Tese: STAT e SOCS na modulação funcional de células dendríticas
derivadas de doadores saudáveis e pacientes com câncer.

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

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

São Paulo, 03 de março de 2011.

PARECER 987/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 16.02.2011, APROVOU o projeto intitulado: "*Suppressors Of Cytokines Signaling (SOCS) na modulação funcional de células dendríticas derivadas de pacientes com câncer*" sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. JOSÉ ALEXANDRE M. BARBUTO e a aluna PATRÍCIA ARGENTA TONIOLO.

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

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em
16.02.2012

Atenciosamente,

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

Ao meu pai Gilson e minha mãe
Kátia, minha fonte de inspiração de
perseverança e força de vontade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo carinho e incentivo constante à minha educação e aos meus irmãos pelo apoio.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e contribuir para minha formação.

Ao grupo de pesquisa do Dr. David Frank do Dana-Farber por ter aberto as portas de seu laboratório, confiado e permitido o desenvolvimento dos meus projetos de pesquisa independentemente. Foi um prazer ter trabalhado com vocês. Um enorme aprendizado.

Ao meu marido Pedro por cuidar de mim, me emprestar seu cérebro e agüentar meu bom humor (na verdade, vc que me estressa mas te amo mesmo assim!).

À amiga Bruna pelas ótimas conversas, conselhos e trocas de confidências, além de ter resolvido todos meus “pepinos” quanto não estava em São Paulo. Sempre bom e gratificante ter você por perto. Sei que você me entende em todos os aspectos.

À amiga Grá pelas boas idéias, bons momentos de descontração e por saber que posso contar com você para o que der e vier.

Aos amigos e colegas do laboratório de Imunologia de Tumores pelo companheirismo e pelas “troca de idéias” (mesmo que online, né Nélío?).

À Célia por toda ajuda desde os meus primeiros dias no laboratório e pelas boas risadas.

À eternas amigas Mariana Cabeção e Amaranta que mesmo de muito longe estão sempre tão perto!

A FAPESP pelo apoio financeiro.

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

Obrigada a todos!

*“A person who never made a mistake
never tried anything new.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

TONIOLO, P. A. **STAT e SOCS na modulação funcional de células dendríticas derivadas de doadores saudáveis e pacientes com câncer**. 2014. 118 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014

O comprometimento funcional das células dendríticas (DCs) é uma das maneiras pela qual os tumores escapam do controle da resposta imune. A descoberta de novos alvos terapêuticos que possam reverter o efeito imunossupressor dos tumores no fenótipo e função das DCs são de grande relevância clínica. Aqui, investigamos se as vias de sinalização de STAT6 e STAT5, importantes para a diferenciação e maturação das DCs, estariam envolvidas nos defeitos de DCs de pacientes com leucemia linfóide crônica (LLC). Também investigamos o efeito da inibição farmacológica de STAT5 e STAT3 na maturação de DCs induzida por LPS. Encontramos que monócitos de pacientes com LLC possuem alteração na sinalização de STAT6 induzida por IL-4 (mas não na sinalização de STAT5 induzida por GM-CSF) que previne a maturação fenotípico-funcional das DCs. As DCs derivadas de monócitos de pacientes com LLC apresentam baixos níveis de HLA-DR, moléculas co-estimuladoras e CD83 e reduzida secreção de citocinas pró-inflamatórias (provavelmente devido a baixa expressão de TLR4 e suas moléculas associadas), resultando na diminuída proliferação de linfócitos T inflamatórios e maior frequência de linfócitos Tregs. Embora os monócitos dos pacientes possuam alta expressão de IL-4R, a atividade de STAT6 está inibida devido aos elevados níveis de SOCS5. O tratamento de monócitos de doadores saudáveis com IL-10 reproduz este mecanismo alterado, observado nos pacientes, por aumentar a expressão de IL-4R e, cronicamente, aumentar a expressão de SOCS5, que inibe STAT6. Isto resulta na diferenciação de DCs alteradas, indicando que altos níveis de SOCS5 podem estar envolvidos na função defeituosa das DCs da CLL. A tentativa de inibir STAT3 através do tratamento das DCs com pirimetamina, composto que encontra-se em ensaio clínico para LLC, não afetou a maturação e a função das DCs de pacientes com LLC. Isto pode ser decorrente da não interferência da pirimetamina na atividade de STAT3 das DCs. Já a inibição de STAT5 nas DCs de doadores saudáveis foi conseguida tratando-as com JQ1. JQ1 inibe a maturação das DCs, prevenindo o aumento da expressão de CD80, CD86 e CD83, e bloqueando a secreção de IL-12, o que resulta na reduzida indução de células T pró-inflamatórias. O efeito inibitório da JQ1 está associado com a diminuição da sinalização do receptor de GM-CSF, que consequentemente inibe pSTAT5. A expressão de STAT5 constitutivamente ativo nas DCs tratadas com JQ1 restaura os níveis de GM-CSF e do seu receptor, e reverte os efeitos desta droga nas DCs, aumentando a expressão de CD86, CD83 e IL-12. Juntos, estes achados mostram que STAT5 tem um papel importante na maturação das DCs e sugerem que o tratamento com JQ1 pode levar à imunossupressão, diferentemente da pirimetamina. Já SOCS5 pode ser um novo potencial alvo terapêutico no tratamento do câncer.

Palavras-chave: Células Dendríticas. STAT. SOCS. Imunomodulação. Leucemia.

ABSTRACT

TONIOLO, P. A. **STAT and SOCS in the functional modulation of dendritic cells derived from healthy donors and CLL patients.** 2014. 118 p. PhD thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The functional impairment of dendritic cells (DCs) is one of the mechanisms of tumor escape from the immune control. Discovery of new targets that can reverse the immunosuppressive effect of tumors on DCs hold great therapeutic promise. Here, we investigated whether STAT6 and STAT5 signaling pathways, which are important for DCs differentiation and maturation, are involved in defects of monocyte-derived DCs from patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). Additionally, we explored the effects of STAT5 and STAT3 pharmacologic inhibition on LPS-induced maturation of DCs. We identified that monocytes from CLL patients have an alteration in IL-4-induced STAT6 signaling (but not in GM-CSF-induced STAT5 signaling), which prevents DCs phenotypic and functional maturation. Monocyte-derived DCs from CLL patients display low levels of HLA-DR, costimulatory molecules and CD83, and reduced secretion of pro-inflammatory cytokines (possibly due to the low expression of TLR4 and its related molecules), which result in a decreased proliferation of T-cells and in an increased frequency of Tregs. Although patients' monocytes exhibit high IL-4R expression, STAT6 activity is inhibited because of the elevated SOCS5 levels. IL-10-treatment of healthy donors' monocytes mimics this altered mechanism observed in patients, through increasing IL-4 receptor expression and, chronically, enhancing SOCS5 expression, which inhibits pSTAT6. This leads to a defective DC differentiation, indicating that a high SOCS5 level could be involved on CLL-DCs impaired function. Next, we attempt to inhibit STAT3 by treating DCs with pyrimethamine, a clinical trial compound for CLL. Pyrimethamine does not affect the maturation and function of DCs from CLL, which may be due to the lack of action of pyrimethamine on STAT3 activity in DCs. Moreover, we inhibited STAT5 by treating DCs from healthy donors with JQ1. JQ1 prevents LPS-induced DCs maturation by preventing upregulation of CD80, CD86 and CD83, and blocking the secretion of IL-12, resulting in a decreased induction of pro-inflammatory T cells. The inhibitory effect of JQ1 is associated with the downregulation of GM-CSF receptor signaling, which, consequently, inhibits STAT5 phosphorylation. Expression of activated STAT5 in JQ1-treated DCs increases the levels of GM-CSF and GM-CSF receptor, and overcomes the effects of JQ1 on DCs by enhancing the expression of CD86, CD83 and IL-12. Together, our findings show that STAT5 has an important role during the maturation of DCs, and suggest that JQ1 treatment, but not pyrimetamine, can lead to immunosuppression. Additionally, SOCS5 emerges as a new potential therapeutic target for cancer treatment.

Key words: Dendritic cell. STAT. SOCS. Immunomodulation. Leukemia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Via de sinalização de STAT.....	23
Figura 2 - Método de análise das células dendríticas (DCs) derivadas de monócitos sanguíneos para caracterização fenotípica por citometria fluxo.....	44
Figura 3 - Caracterização fenotípica das células dendríticas derivadas de monócitos de doadores saudáveis e pacientes com LLC.....	54
Figura 4 - DCs derivadas de monócitos de pacientes com LLC são fenotipicamente alteradas.....	55
Figura 5 - DCs imaturas derivadas de monócitos de pacientes com LLC expressam baixos níveis dos receptores de agonistas de ativação.....	58
Figura 6 - DCs de pacientes com LLC induzem menos proliferação e baixa produção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos T alogênicos.....	60
Figura 7 - DCs de pacientes com LLC induzem/expandem maior frequência de células T reguladoras do que os controles saudáveis.....	61
Figura 8 - Monócitos de pacientes com LLC possuem elevada expressão do IL-4R.....	62
Figura 9 - A ativação de STAT6 está diminuída nos monócitos de pacientes com LLC enquanto os níveis de SOCS5 estão elevados.....	64
Figura 10 - Expressão diferencial das SOCS nas DCs de pacientes com LLC.....	65
Figura 11 - Monócitos de pacientes com LLC não apresentam alteração na expressão do receptor de GM-CSF e na atividade transcricional de STAT5.....	66
Figura 12 - IL-4 exógeno mantém a expressão de SOCS5 elevada nos monócitos dos pacientes com LLC e não restaura o fenótipo alterado das DCs.....	67
Figura 13 - A expressão de IL-4R e SOCS5 é induzida por IL-10.....	69
Figura 14 - IL-10 mas não IL-6 inibe a maturação das DCs de doadores saudáveis.....	70
Figura 15 - Tratamento com pirimetamina não altera a viabilidade das DCs derivadas de monócitos de doadores saudáveis.....	71
Figura 16 - Tratamento com pirimetamina não altera o fenótipo das DCs derivadas de monócitos de doadores saudáveis.....	72
Figura 17 - DCs derivadas de doadores saudáveis tratadas com pirimetamina aumentam a produção de IL-12.....	73
Figura 18 - Pirimetamina não altera a fosforilação de STAT1, STAT3 e STAT5 nas DCs derivadas de doadores saudáveis.....	74

Figura 19 - Tratamento com pirimetamina não altera a expressão de SOCS1 e SOCS3 nas DCs de doadores saudáveis.	74
Figura 20 - Tratamento com pirimetamina não altera a expressão dos genes alvo de STAT3 nas DCs de doadores saudáveis.....	75
Figura 21 - Pirimetamina inibe a expressão gênica dependente de STAT3 e STAT1 mas não de NF-kB.	76
Figura 22 - Tratamento <i>in vitro</i> com pirimetamina não altera o fenótipo das DCs derivadas de monócitos de pacientes com LLC.	77
Figura 23 - Tratamento <i>in vivo</i> com pirimetamina não altera o fenótipo das DCs derivadas de monócitos de pacientes com LLC.	77
Figura 24 - Pirimetamina não altera a capacidade das DCs de pacientes com LLC e de doadores saudáveis de induzir proliferação de linfócitos T CD3 ⁺ alogênicos.....	78
Figura 25 - JQ1 inibe a atividade funcional de STAT5 nas DCs.....	81
Figura 26 - JQ1 inibe a maturação das DCs.....	84
Figura 27 - O efeito da JQ1 na maturação das DCs é dependente de STAT5.	86
Figura 28 - DCs tratadas com JQ1 causam diminuição da proliferação de linfócitos T alogênicos.	87
Figura 29 - Linfócitos T estimulados pelas DCs tratadas com JQ1 produzem menos citocinas pró-inflamatórias e seletivamente inibem a polarização Th1..	88
Figura 30 - A inibição de Jak nas DCs gera um fenótipo similar à inibição seletiva de STAT5 por JQ1.....	89
Figura 31 - O fenótipo defeituoso das DCs de pacientes com LLC está associado com o aumento de SOCS5 causado pela IL-10 liberada pelos tumores.....	96
Figura 32 - JQ1 inibe a maturação das DCs.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados dos pacientes com leucemia linfóide crônica (LLC).....38

Tabela 2 - Sequência de iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real.....47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
BSA	Albumina Bovina do Soro
CCR7	Receptor de quimiocina 7
CD	Cluster of differentiation
cDNA	DNA Complementar
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
DCs	Células Dendríticas
CSF2RA	Receptor 2 do fator de crescimento de colônia
ChIP	Imunoprecipitação de cromatina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
DS	Doador saudável
EGFP	Abreviatura do inglês <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
FSC	<i>Forward Scattered</i>
GM-CSF	Fator de Crescimento de Colônia de Granulócito e Macrófago
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano-DR
iDCs	Células Dendríticas Imaturas
IFN-γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
kDa	Kilo Dalton
LPS	Lipopolissacarídeo
LLC	Leucemia linfóide crônica
LRS	Câmara de leucorredução
mDCs	Células Dendríticas Maduras
MFI	Intensidade Mediana de Fluorescência
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNAs	RNAs Mensageiro
PBMCs	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

PGE-2	Prostaglandina E2
qPCR	Reação em Cadeia Polimerase quantitativa
RNA	Ácido Ribonucléico
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Transcrição Reversa
SFB	Soro Fetal Bovino
SOCS	Supressor da sinalização de citocinas
SSC	<i>Side Scattered</i>
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TLR	Receptor do tipo <i>toll</i>
TGF-β	Fator de Transformação do Crescimento β
TNFα	Fator de Necrose Tumoral α
Tregs	Linfócitos T reguladores
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	18
2 OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo geral.....	34
2.2 Objetivos específicos.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Casuística.....	37
3.2 Isolamento de monócitos e diferenciação em DCs.....	38
3.3 Tratamento das DCs com drogas inibidoras de STATs.....	39
3.4 Quantificação da viabilidade celular.....	40
3.5 Ensaio de proliferação	41
3.6 Citometria de fluxo	41
3.6.1 <i>Marcação de superfície</i>	41
3.6.2 <i>Marcação intracelular de citocinas</i>	42
3.6.3 <i>Deteção intracelular de FOXP3</i>	43
3.6.4 <i>Método de análise de monócitos e DCs</i>	43
3.7 Phosflow.....	44
3.8 ELISA	45
3.9 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	45
3.10 Obtenção e quantificação de lisado protéico	47
3.11 Western blotting	48
3.12 Ensaio de luciferase com linhagens celulares repórter	49
3.13 Imunoprecipitação de cromatina (ChIP).....	49
3.14 Transdução com vetor lentiviral	51
3.15 Análise estatística	51
4 RESULTADOS.....	52
4.1 Análise fenotípica de DCs derivadas de pacientes com LLC.....	53
4.2 Expressão dos receptores de ativação em DCs de pacientes com LLC.....	56
4.3 Atividade funcional das células dos pacientes com LLC.....	58

4.4 Mecanismo responsável pelas alterações fenotípicas das DCs de pacientes com LLC	61
4.4.1 <i>Desregulação na via de sinalização STAT6 e SOCS5 em monócitos</i>.....	61
4.4.2 <i>IL10/STAT3 regulam a expressão de IL-4R e SOCS5 nos monócitos</i>	67
4.5 Pirimetamina na modulação de células dendríticas	70
4.6 JQ1 na modulação de células dendríticas	78
5 DISCUSSÃO	90
6 CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS	105
ANEXO	117
A - Artigos publicados ou submetidos para publicação	118

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O sistema imune funciona como um sistema de reconhecimento que conta com a participação coordenada de seus componentes inatos e adaptativos a fim de gerar uma resposta imunológica efetiva. Os mecanismos que regulam a duração e amplitude destas respostas são necessários para prevenir a ativação exagerada do sistema imune, capaz de causar danos teciduais e auto-imunidade. Neste sentido, as células dendríticas (DCs), células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs; do inglês, *antigen presenting cells*), destacam-se por exercerem papel essencial na iniciação e modulação da resposta imune, possuindo a capacidade única de promover a conexão entre imunidade inata e adaptativa. Nelas encontra-se a habilidade de captura de antígenos, através dos receptores inatos, integrada à sua capacidade de estimular linfócitos T *naive*, induzindo sua diferenciação quer em células efetoras, quer em células reguladoras. Desta forma, as DCs conduzem um repertório de respostas imunológicas que provocam desde a resistência a infecções e ao câncer até a tolerância (BANCHEREAU et al., 2000; STEINMAN; BANCHEREAU, 2007).

O processo de maturação das DCs possui um papel crítico no balanço entre manutenção de tolerância e indução de imunidade. Na maioria dos tecidos, as DCs encontram-se em um estado imaturo, monitorando o microambiente onde se encontram através da captura de antígenos. Embora estas células apresentem grande capacidade endocítica, não estão aptas a estimular linfócitos T *naive*, uma vez que não possuem os níveis necessários de sinais acessórios para ativação primária dos linfócitos (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; MELLMAN; STEINMAN, 2001; MOHAMADZADEH; LUFTIG, 2004). Num estado imaturo, as DCs induzem linfócitos T à anergia ou à diferenciação em células supressoras (STEINMAN, 2003). No entanto, frente a estímulos pró-inflamatórios, as DCs sofrem processo de diferenciação e maturação, caracterizado pela redução da capacidade endocítica e 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), além de aumentar a expressão do marcador de maturação CD83 e secreção de grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias (BANCHEREAU et al., 2000; CAUX et al., 1994). Durante o processo de maturação, as DCs passam a expressar o receptor para a quimiocina CCR7, que direciona sua migração aos órgãos linfóides secundários (GUERMONPREZ et al., 2002; SALLUSTO et al., 1999), onde são capazes de recrutar outras DCs e linfócitos T (ADEMA et al., 1997). Após sua

maturação fenotípica e funcional, as DCs tornam-se competentes na ativação de linfócitos T (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; BANCHEREAU et al., 2000).

No microambiente tumoral, as DCs também desempenham um papel crucial na indução e manutenção de uma resposta imune efetiva. Já é bem estabelecido que as células tumorais contêm antígenos reconhecidos ou reconhecíveis pelo sistema imunológico do paciente (MANDRUZZATO et al., 1997; PIESCHE et al., 2007; WOLFEL et al., 1995). Sendo assim, as DCs são capazes de internalizar, processar e apresentar os antígenos associados ao tumor (TAAs do inglês: *tumor associated antigens*) para ativar resposta de linfócitos T específicos (STEINMAN; BANCHEREAU, 2007). No entanto, devido sua grande relevância para a resposta imune, não surpreendentemente, as DCs são um dos principais alvos dos mecanismos de escape tumoral. Estes se manifestam nas deficiências funcionais tanto de DCs, quanto de seus precursores, em pacientes com câncer (DELLA BELLA et al., 2003; HASEBE et al., 2000; NEVES et al., 2005; ORSINI et al., 2003; ORSINI et al., 2013; TREFZER et al., 2005; WANG et al., 2006a). As células tumorais geram um microambiente imunossupressor, através da liberação de vários fatores solúveis, tais como VEGF, IL-6, IL-10 e TGF- β , capazes de afetar a diferenciação e maturação das DCs (GABRILOVICH, 2004; GOTTFRIED; KREUTZ; MACKENSEN, 2008; MICHIELSEN et al., 2011). Vários estudos, inclusive do nosso grupo, mostraram que, em pacientes com câncer, as DCs derivadas de monócitos sanguíneos, *in vitro*, possuem fenótipo típico de células imaturas e redução na capacidade de induzir linfoproliferação quando comparadas às DCs obtidas de doadores saudáveis (AZEVEDO-SANTOS, 2010). Ainda, DCs derivadas de células de pacientes com carcinoma de mama apresentam maior capacidade de induzir linfócitos T reguladores (RAMOS et al., 2012). Estas alterações são sistêmicas, encontradas tanto nas células infiltrantes de tumor quanto nas células circulantes do sangue periférico, sendo a remoção cirúrgica deste capaz de restaurar a diferenciação normal das DCs, além de aumentar o número destas células no sangue periférico (ALMAND et al., 2000; BELLONE et al., 2006). Em pacientes com leucemia linfóide crônica (LLC, do inglês: *Chronic lymphocytic leukemia*) foi observado que as DCs são defeituosas apenas durante a fase de doença ativa, enquanto as DCs dos pacientes com doença em remissão não são alteradas (ORSINI et al., 2004). Estes dados, mais uma vez, reforçam a influência de fatores imunossupressores sobre as DCs. Por outro lado, defeitos fenotípico-funcionais nas

DCs derivadas de monócitos de pacientes com câncer são encontrados mesmo que as DCs sejam diferenciadas *in vitro* na ausência de fatores derivados do tumor, sugerindo a presença de alterações nos seus monócitos precursores (HASEBE et al., 2000; NEVES et al., 2005; ORSINI et al., 2013).

Sabe-se que as DCs compreendem uma população heterogênea, que abrange diversos subtipos celulares com diferentes fenótipos e propriedades funcionais. Em humanos, já foram evidenciadas DCs presentes no sangue, classificadas em BDCA1⁺ e BDCA3⁺, na derme, classificadas em CD1a⁺ e CD14⁺, além das células de Langerhans da epiderme (DZIOONEK et al., 2000; KLECHEVSKY et al., 2008). No entanto, as células de escolha para maioria dos estudos, inclusive para abordagens terapêuticas contra o câncer, têm sido as DCs diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos do sangue periférico, conforme descrito por Sallusto e Lanzavecchia (1994). Estudos recentes mostraram que, em humanos, os monócitos também podem se diferenciar em DCs, as quais se assemelham àquelas descritas por Sallusto e Lanzavecchia. Segura e colaboradores (2013) encontraram uma população de DCs em ambientes inflamatórios, como ascite em pacientes com câncer de ovário e de mama, que são comumente derivadas de monócitos e que têm assinatura gênica semelhante a das DCs derivadas de monócitos *in vitro* (SEGURA et al., 2013). Assim, estes dados suportam aqueles encontrados em DCs geradas *in vitro*. Além do mais, são consistentes com os resultados mostrando que as alterações nas DCs diferenciadas *in vitro* podem ser decorrentes de defeitos intrínsecos desde seus monócitos precursores.

As alterações observadas nas DCs dos pacientes com câncer, já se manifestam na redução do número de células maduras funcionalmente competentes (BALEEIRO et al., 2008; DELLA BELLA et al., 2003; ORSINI et al., 2003), caracterizadas pela baixa expressão das moléculas codificadas pelo MHC, CD80 e CD86 (BALEEIRO et al., 2008). Além disso, citocinas pró-inflamatórias, importantes para desencadear a resposta imunológica, são produzidas em níveis reduzidos pelas DCs (ALMAND et al., 2000; BELLONE et al., 2006). Por outro lado, a presença de IFN-gama, uma citocina pró-inflamatória, tanto nos linfonodos quanto no microambiente tumoral pode contribuir para mais um mecanismo de escape envolvendo as DCs. Esta citocina é capaz de promover a troca das subunidades catalíticas do proteassoma padrão para as subunidades catalíticas do imunoproteassoma, nas células tumorais e nas DCs. O processamento de antígenos

tumorais para geração de epítomos antigênicos, muitas vezes só ocorre se a degradação destes antígenos for realizada pelo proteassoma padrão. Sendo assim, a presença do imunoproteassoma nas DCs de pacientes com neoplasias, resulta na ausência de apresentação de certos epítomos tumorais imunogênicos (MOREL et al., 2000). Ainda, as DCs, no tumor, parecem acumular lipídeos, mais especificamente triglicerídeos, e isto acaba por reduzir a sua capacidade de processamento e apresentação de antígenos (HERBER et al., 2010). Juntos, esses fenômenos resultam na incapacidade das DCs de estimular adequadamente a resposta de linfócitos T específicos aos antígenos tumorais, podendo induzir tolerância imune.

Recentes estudos mostraram que a plasticidade das DCs, de induzir imunoestimulação ou imunossupressão, influencia a progressão tumoral. Scarlett e colaboradores (2012) mostraram, em tumores de ovário, que a progressão agressiva de câncer foi causada pela mobilização de DCs com fenótipo imunossupressor, induzido por fatores liberados pelo tumor (PGE2 e TGF- β), e não pela perda da imunogenicidade tumoral (SCARLETT et al., 2012). Ainda, dados clínicos evidenciaram que o bloqueio de sinais imunossupressores, como CTLA4 e PDL1/PDL, permitem ao sistema imune recuperar o controle da progressão do tumor (PARDOLL; DRAKE, 2012; TOPALIAN et al., 2012), sugerindo que os tumores permanecem imunogênicos, sendo a imunossupressão responsável pela progressão maligna. Assim sendo, pode-se concluir que é bem estabelecido que o microambiente tumoral afeta as DCs. No entanto, pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares responsáveis pelas alterações das DCs causadas pelo tumor. Há trabalhos mostrando que os fatores liberados pelo tumor podem levar a ativação das vias de sinalização de STAT3 e p38 MAPK e que a inibição destas vias restaura a função das DCs de pacientes com câncer (NEFEDOVA; GABRILOVICH, 2007; OOSTERHOFF et al., 2012; WANG et al., 2006b). Portanto, um estudo mais aprofundado dos mecanismos envolvidos na diferenciação e maturação das DCs, os quais podem ser afetados pelo tumor, pode desvendar as moléculas que diretamente causam defeitos nestas células.

Tanto os processos de diferenciação e maturação das DCs, quanto sua atuação em iniciar e conduzir a resposta imune, são coordenados por diferentes padrões de citocinas e fatores de crescimento. Estes, por sua vez, transduzem seus sinais extracelulares para o núcleo através de proteínas transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição, STATs (do inglês *Signal Transducers and Activators of*

Transcription) ativadas (BROMBERG; DARNELL, 2000; DIMITRIOU et al., 2008; YOSHIMURA; NAKA; KUBO, 2007; YOSHIMURA, 2009) (Figura 1). Muitos receptores de citocinas não possuem atividade tirosina quinase intrínseca, por isso a ativação é mediada por tirosina-quinases associadas ao receptor, as quais são membros da família Janus quinase (JAK) (DARNELL, 1998; HEINRICH et al., 2003). Após a ligação da citocina ao seu receptor, JAKs são ativadas e fosforilam os resíduos de tirosina no domínio intracelular do receptor. Estes resíduos tornam-se alvos para ligação dos STATs. Estes fatores de transcrição são fosforilados por JAKs, dimerizam-se e são translocados para o núcleo, onde se ligam a região promotora de seus genes alvo para iniciar a transcrição gênica dos mesmos (DARNELL, 1998). Várias JAKs (JAK1 a JAK3 e Tyk-2) e STATs (STAT1 a STAT6) são ativados para transduzir os sinais das citocinas, e recentes estudos têm demonstrado um papel não redundante e específico para cada membro JAK-STAT, na resposta a diferentes citocinas (DARNELL, 1998; YOSHIMURA, 2006; YU; KORTYLEWSKI; PARDOLL, 2007).

Figura 1 - Via de sinalização de STAT. Após o reconhecimento de citocinas ou fatores de crescimento pelos seus respectivos receptores, a função de tirosina-quinase das Jaks é ativada. Estas, autofosforilam-se e fosforilam os resíduos de tirosina no domínio intracelular do receptor. Os STATs são recrutados para o receptor e fosforilados por JAKs. Uma vez fosforilados, os STATs dimerizam-se e são translocados para o núcleo, onde se ligam à região promotora de seus genes alvo para iniciar a transcrição gênica.

A diferenciação de DCs humanas a partir de monócitos sanguíneos, *in vitro*, é feita na presença das citocinas IL-4 e GM-CSF. Esta última citocina pode ativar STAT1, STAT3 e STAT5 (ESASHI et al., 2008; JACKSON et al., 2004; LUTZ et al., 2002). A importância de STAT5 no desenvolvimento das DCs já foi demonstrada por estudos apontando que a ativação de STAT5 por GM-CSF promove a diferenciação de DCs mielóides, por inibir o desenvolvimento de DCs plasmocitóides (ESASHI et al., 2008; LI et al., 2012). Há também estudos mostrando que as células diferenciadas em baixas doses de GM-CSF são resistentes ao estímulo de maturação do lipopolissacarídeo (LPS), TNF e CD40-L, gerando DCs imaturas tolerogênicas (LUTZ et al., 2002). No entanto, o papel específico de STAT5 durante a maturação das DCs ainda não é completamente compreendido. Enquanto isso, a presença de IL-4 ativa o fator de transcrição STAT6 que está diretamente envolvido na diferenciação dos monócitos em DCs. Quando DCs são geradas na ausência de STAT6, não respondem a IL-4 e permanecem imaturas, também pela resistência aos estímulos de maturação (LUTZ et al., 2002). Além disso, IL-4 tem efeito sinérgico com GM-CSF na indução da ativação de STAT1, e, a sinalização deste fator de transcrição é essencial para completa maturação das DCs (JACKSON et al., 2004). O padrão de ativação dos STATs varia durante a diferenciação e maturação das DCs. Em DCs murinas, o sinal de STAT5 é constitutivamente ativado durante todos os estágios de maturação das DCs. Já STAT6 é ativado durante os estágios iniciais da diferenciação e vai declinando a medida que as células maturam (JACKSON et al., 2004). Em contraste, STAT1 está ativado em baixos níveis durante todos os estágios do desenvolvimento das DCs, mas é nas maduras que esta molécula é significativamente ativada (pelo efeito combinado de GM-CSF e LPS) para atingir sua maturação funcional (HU et al., 2009; JACKSON et al., 2004). Isto mostra que um dos efeitos dos estímulos pró-inflamatórios, como do LPS, em promover a maturação das DCs é reprimir a sinalização de STAT6 e induzir a sinalização de STAT1. No entanto, dependendo da fase da diferenciação na qual as DCs são expostas aos estímulos pró-inflamatórios, sua maturação pode ser inibida ao invés de estimulada. Apesar de ser uma potente citocina pró-inflamatória e, muitas vezes, fazer parte do “coquetel de maturação” das DCs, a exposição inicial dos monócitos ao IFN- γ resulta na geração de DCs tolerogênicas, devido a sua inibição maturacional mediada pela inibição de STAT6 (ROJAS-CANALES et al.,

2011). Esta é uma das maneiras pela qual os fatores liberados pelo tumor podem afetar a geração das DCs.

A busca dos mecanismos pelos quais tumores provocam alterações funcionais das DCs é relevante, principalmente considerando que estas células são intensamente exploradas como ferramentas para imunoterapia do câncer. Resultados preliminares de ensaios clínicos com vacinas baseadas em DCs tem demonstrado respostas clínicas limitadas. Isto, em parte, pode ser consequência da utilização de DCs autólogas para produção de vacinas, uma vez que, estas células são afetadas pelo tumor não sendo, portanto, funcionalmente competentes (BARBUTO, 2013). Um parâmetro crítico, que ainda é foco de debates na imunoterapia do câncer, é a maturação das DCs diferenciadas *in vitro* (HANSEN et al., 2012). Normalmente utiliza-se o coquetel de ativação formado por citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 β , IL-6) e prostaglandina E2 (PGE2), embora haja dados mostrando ser necessária a ativação de receptores Toll-like (TLR) para que haja produção de IL-12 pelas DCs (MACAGNO et al., 2007). A combinação de TNF e PGE2, porém, foi relatada como capaz de provocar o aumento da produção de IL-12 e induzir a maturação das DCs humanas, comparavelmente ao LPS (RIESER et al., 1997). Ainda que o efeito combinado de PGE2 e citocinas pró-inflamatórias possa melhorar a migração das DCs mediada por CCR7 (SCANDELLA et al., 2002), PGE2, isoladamente, parece ter efeito inibitório na produção de IL-12 (KALINSKI et al., 2001; VAN DER POUW KRAAN et al., 1995). Por isso, alguns grupos tem usado a combinação de PGE2 com TLR para estimular simultaneamente a migração e produção de IL-12 pelas DCs. Outros fatores como, IFN- γ e MPL (monofosforil lipídeo A) também tem sido estudados como parte do coquetel de maturação das DCs. Na verdade, há várias combinações possíveis para o coquetel de maturação. No entanto, o que ainda necessita ser investigado é se as DCs dos pacientes, utilizadas para imunoterapia do câncer, estão comprometidas quanto a expressão dos receptores para os agonistas de ativação. De maneira geral, LPS é o agonista de ativação mais utilizado para estudo da maturação das DCs diferenciadas *in vitro*, por ativar uma complexa cascata de transdução de sinal que leva a produção de citocinas inflamatórias e à maturação das DCs (IWASAKI; MEDZHITOV, 2004). Há dados mostrando que LPS, indiretamente, induz a ativação de STAT1, STAT3 e STAT5, através da produção de interferons do tipo I e GM-CSF (HU et al., 2008; HU et al., 2012; YAMAOKA et al., 1998). A participação dos STATs na ativação das DCs

induzida por LPS, mais uma vez, mostra a importância destes fatores também durante a maturação destas células.

Um dos mecanismos de modulação da via de sinalização Jak/STAT depende de uma família de proteínas intracelulares, supressoras da sinalização de citocinas (SOCS, do inglês *Suppressor Of Cytokine Signaling*) e proteína SH2 induzida por citocina (CisH) (Figura 1). Estas regulam a duração e intensidade dos sinais induzidos pelas citocinas, fatores de crescimento e também do LPS, através da inibição da sinalização mediada por Jak/STAT. Também tem sido descrito um significativo papel das proteínas SOCS no desenvolvimento de tumores (CHONG et al., 2003; KOBAYASHI; YOSHIMURA, 2005; SHEN et al., 2004; YOSHIMURA, 2006; ZENG et al., 2008). Existem oito membros da família CISH-SOCS (CISH, SOCS1-SOCS7), cada um apresentando um domínio central SH2, um domínio N-terminal de tamanho e sequência variáveis e uma região C-terminal, de 40 aminoácidos, conhecida como SOCS *box*. A função da SOCS *box* é o recrutamento do sistema ubiquitina transferase (elongina B e C, cullin-5, RING-box-2 e E2 ubiquitina transferase). Os membros da família CISH-SOCS, e outras moléculas que contêm o domínio SOCS *box*, provavelmente funcionam como uma E3 ubiquitina ligase, e medeiam a degradação proteassomal de proteínas associadas através do seu domínio N-terminal (DIMITRIOU et al., 2008; KAMURA et al., 2004; YOSHIMURA; NAKA; KUBO, 2007; YOSHIMURA, 2009). Diferentemente das demais proteínas, os membros SOCS1 e SOCS3 combinam o mecanismo genérico de induzir a degradação de proteínas pelo proteassoma à inibição específica, pois possuem uma região inibidora de quinase (KIR) no seu domínio N-terminal e podem impedir diretamente a ativação de JAK (DIMITRIOU et al., 2008; YOSHIMURA, 2006; YOSHIMURA; NAKA; KUBO, 2007).

Cada vez mais, estudos vêm mostrando que as proteínas SOCS podem estar envolvidas na diferenciação e função das DCs, havendo uma variação quanto à sua expressão, dependendo do estágio de diferenciação em que as DCs se encontram (DIMITRIOU et al., 2008; HU et al., 2009; JACKSON et al., 2004). Foi constatado, em modelos murinos, que IL-4 e GM-CSF induzem aumento da expressão de SOCS1, SOCS2, SOCS3 e CisH, sugerindo seu envolvimento na diferenciação das DCs (HU et al., 2009; JACKSON et al., 2004). A expressão de SOCS3 pelas DCs parece ter um papel importante no balanço entre imunidade e tolerância. Dados de trabalhos realizados em modelos murinos, em que as DCs foram transduzidas com

SOCS3, revelaram uma redução na expressão das moléculas MHCII e CD86, além de induzir a produção de IL-10 e diminuir IFN- γ e IL-12, modificações que direcionaram a resposta linfocitária para o polo Th2, com aumento da produção de IL-4, IL-5 e IL-10 por estas células (LI et al., 2006). Por outro lado, DCs murinas deficientes de SOCS3 apresentam ativação persistente de STAT3, o qual tem como gene alvo o TGF- β , havendo expansão de células Tregs (MATSUMURA et al., 2007). STAT3 é capaz de modular negativamente a maturação funcional das DCs, tornando-as tolerogênicas. Sumimoto e colaboradores (2006) mostraram que STAT3 é uma das moléculas requeridas para a produção dos fatores imunossupressores liberados pelo tumor, tais como VEGF, IL-10 e IL-6, que por sua vez, inibem a expressão de moléculas imunoestimuladoras, como IL-12 e TNF (fator de necrose tumoral) pelas DCs (SUMIMOTO et al., 2006). Quanto à SOCS1, as primeiras observações foram feitas em camundongos deficientes para esta molécula, sugerindo uma função imunossupressora (CHONG et al., 2003; HANADA et al., 2003; HANADA et al., 2005). DCs murinas deficientes de SOCS1 secretam grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ , IL-12, IL-6 e TNF, em resposta ao LPS (lipopolissacarídeo), além de expressarem altos níveis de MHC e moléculas co-estimuladoras (HANADA et al., 2005). Shen et al. (2004) mostraram que o silenciamento de SOCS1 através da tecnologia do RNA pequeno de interferência (siRNA) aumenta a resposta imune específica a antígenos tumorais (SHEN et al., 2004). Na ausência de seu regulador SOCS1, STAT1 encontra-se super ativado e muitos genes regulados por interferons (IFN) têm sua expressão aumentada, conferindo às DCs um perfil imunogênico (SHEN et al., 2004).

Em humanos, a maturação das DCs diferenciadas *in vitro* por LPS induz significativo aumento na expressão de SOCS1, SOCS2, SOCS3 e CisH (HU et al., 2009; POSSELT et al., 2011). O papel de SOCS2 na maturação das DCs ainda é contraditório. Por um lado, há trabalhos mostrando que SOCS2 é requerido para maturação das DCs induzida por LPS, sendo que sua inibição diminui a expressão de moléculas co-estimuladoras pelas DCs (HU et al., 2009; HU et al., 2012). Já outros dados mostram que a expressão de SOCS2 é induzida mais tardiamente pelo estímulo do LPS, comparando-se com a rápida indução de SOCS1 e SOCS3, e então SOCS2 seria responsável por finalizar a fase de maturação das DCs, regulando-as negativamente (POSSELT et al., 2011). SOCS1, em humanos, foi

descrito como um modulador negativo da capacidade estimuladora das DCs de ativar linfócitos T (HONG et al., 2009).

Como se pode notar, até o momento, os estudos do papel das proteínas SOCS nas DCs têm sido um tanto limitados a SOCS1, SOCS2 e SOCS3, tanto em modelo murino quanto em humanos. Recentemente, CisH foi descrito como uma molécula importante para o desenvolvimento e maturação de DCs derivadas de medula óssea, capacitando-as a induzir uma resposta de linfócitos T citotóxicos contra células tumorais (MIAH et al., 2012). Embora não se tenha dados suficientes para explicar a função de SOCS5 nas DCs, já foi mencionado que SOCS5 tem expressão constitutiva e não sofre influência das citocinas IL-4 e GM-CSF, que promovem a diferenciação das DCs (JACKSON et al., 2004). Em linfócitos, SOCS5 influencia o balanço entre a diferenciação de células Th1 e Th2. SOCS5 suprime a ativação de STAT6 dependente de IL-4, através da sua interação com o receptor de IL-4, impedindo, assim, a ligação de Jak1. Isto leva à diferenciação em linfócitos Th1, enquanto os linfócitos Th2 expressam SOCS3 (SEKI et al., 2002). É possível que, nas DCs, SOCS5 desempenhe uma função similar, apesar de não ser induzido por IL-4, poderia inibir a sinalização do seu respectivo receptor.

Diante do importante papel que os STATs e seus reguladores SOCS representam para a diferenciação e maturação das DCs, é de se esperar que eles sejam alvos em potencial para imunoterapia do câncer. Além do mais, os STATs são um ponto de convergência entre o sistema imune e o microambiente tumoral. Principalmente porque os STATs também são expressos, e de maneira desregulada, pelos tumores e tem sido apontados como significativamente envolvidos na progressão e agressividade dos tumores (FRANK, 2003). Em condições fisiológicas, os STATs são ativados rápida e transitoriamente. No entanto, em muitos tipos de tumores, como câncer de mama, de ovário e neoplasias hematológicas, STAT3 e STAT5 estão constitutivamente ativados. Isto induz o aumento da expressão de seus genes alvo, envolvidos com proliferação, diferenciação, apoptose e angiogênese (FRANK, 2007; GESBERT; GRIFFIN, 2000; KIM et al., 2005; WALKER; NELSON; FRANK, 2007). Aparentemente, a interação entre o sistema imunológico e o microambiente tumoral tem grande relevância clínica, a qual deve ser considerada na busca do tratamento ideal para o câncer. Uma vez que o ambiente imunossupressor gerado pelos tumores pode afetar o sistema imune, particularmente as DCs, e este passa atuar em benefício das células tumorais, a

busca por terapias direcionadas a um alvo em comum destes dois sistemas poderia aperfeiçoar os resultados das terapias convencionais, além de favorecer a imunoterapia. Neste aspecto, os STATs são bastante atrativos e promissores para o tratamento do câncer, por estarem envolvidos na conexão destas duas interfaces. Ao exemplo de STAT3 que na células neoplásicas contribui para a progressão do câncer e no sistema imune para a imunossupressão associada ao tumor. STAT3 é ativado pelos fatores supressores produzidos pelo tumor, gerando um eficiente mecanismo de retroalimentação positiva, por garantir aumento da atividade de STAT3 nas células tumorais e nas células imunes associadas ao tumor (YU; KORTYLEWSKI; PARDOLL, 2007). Já STAT5 é um mediador essencial em neoplasias hematológicas induzidas por tirosina-quinases mutadas, como BCR-ABL e Jak2V617F (HOELBL et al., 2006; WALZ et al., 2012). Ele pode ser ativado através da secreção autócrina e parácrina de citocinas que sinalizam através de Jak. Desta forma, como STAT5 é um ponto de convergência para uma variedade de quinases, e também é um dos mediadores diretos da expressão gênica anormal em tumores, pode ser considerado um importante alvo terapêutico. Portanto, os STATs poderiam ser o elemento que faltava para aprimorar o tratamento do câncer, já que as respostas clínicas à imunoterapia tem sido insatisfatórias e as terapias convencionais causadoras de efeitos colaterais, muitas vezes não tolerados pelos pacientes.

As terapias convencionais, utilizadas no tratamento do câncer, em geral, possuem como alvo as células tumorais em processo de divisão. A administração repetitiva destes agentes citotóxicos em altas doses é prejudicial à imunidade dos pacientes, pois causa, também, a inibição da divisão celular de leucócitos, na medula óssea e nos tecidos linfóides periféricos (LAKE; ROBINSON, 2005; ZITVOGEL et al., 2008). Sendo assim, têm-se buscado tratamentos direcionados especificamente às células tumorais, deixando as células normais intactas. Nesse sentido, o grupo do pesquisador David Frank passou a estudar novas estratégias farmacológicas que modulassem a expressão gênica dependente de STAT. Foram testados cerca de 200 mil diferentes compostos, já conhecidos por serem seguros para uso humano, a fim de acelerar o desenvolvimento de ensaios clínicos. Dentre os medicamentos encontrados pelo grupo destacam-se: Nifuroxazida, comumente usada no tratamento de diarreias, como inibidor da fosforilação de STAT3, mediante a inibição de Jak2 e Tyk2 (NELSON et al., 2008); Pimozida, um agente psicotrópico

usado no tratamento da síndrome de Tourette, como inibidor da função de STAT5 (NELSON et al., 2011); Pirimetamina, droga anti-parasitária usada no tratamento da toxoplasmose e malária, como efetivo inibidor de STAT3, independente da inibição de Jak2 (TAKAKURA et al., 2011). Atualmente, estão em andamento, os ensaios clínicos, nas fases 1 e 2, usando-se pirimetamina no tratamento de pacientes com leucemia linfóide crônica (LLC). Entretanto, ainda não há estudos mostrando se, além de ser potencialmente eficaz contra as células tumorais, esta droga também seria capaz de modular as DCs *in vitro* e *in vivo*, tornando-as mais imunogênicas, devido à inibição de STAT3.

A ativação exacerbada de STAT3 também faz parte da patogênese da LLC (HAZAN-HALEVY et al., 2010). Mediante a ativação alterada de NF-kB ocorre aumento da produção de IL-6 pelas células leucêmicas, o qual ativa STAT3. Este, por sua vez, aumenta a resistência do tumor à apoptose, por induzir a expressão de Mcl-1 e Bclx, o que torna estas células também resistentes a certas drogas quimioterápicas (ALLEN et al., 2011; DIETRICH et al., 2012). A LLC é um tipo de câncer bastante atrativo para a investigação e aplicação de novas estratégias imunoterapêuticas. Um dos motivos é pela disponibilidade dessas células cancerosas no sangue periférico, não necessitando esperar que o paciente seja submetido a uma cirurgia para se ter acesso ao tumor. Além do mais, esta é uma doença de curso natural longo e progressão lenta, que pode permitir o desenvolvimento de respostas imunes contra células tumorais, desde que encontrada a estratégia correta de imunização (HUS et al., 2008; MAURO et al., 1999). O que caracteriza a LLC é o acúmulo anormal de linfócitos B monoclonais maduros e não-funcionais, no sangue periférico, medula óssea, linfonodos e outros órgãos linfóides (LINET et al., 2007). O perfil imunológico das células leucêmicas é definido pela expressão de CD19, CD23 e CD20 com co-expressão de CD5 (GINALDI et al., 1998; HALLEK et al., 2008). Os pacientes com LLC apresentam uma variedade de alterações imunológicas (DEARDEN, 2008; ORSINI et al., 2004), já tendo sido descritas alterações funcionais nas células T, NK (do inglês, *natural killer*), monócitos, macrófagos, neutrófilos e, inclusive, nas DCs destes pacientes (DEARDEN, 2008; ORSINI et al., 2003; ORSINI et al., 2004).

Outra droga que vem sendo alvo de estudos para tratamento do câncer é JQ1. Esta foi originalmente sintetizada como um inibidor da família de bromodomínios BET (composto por BRD2, BRD3, BRD4 e BRDT), um grupo de reguladores

transcricionais (FILIPPAKOPOULOS et al., 2010). Os bromodomínios medeiam a interação não covalente proteína-proteína por associação com resíduos de lisina acetilada pós-traducionais (ZENG; ZHOU, 2002). A função destas proteínas é o reconhecimento de histonas acetiladas, encontradas em regiões transcricionalmente ativas da cromatina, promovendo o recrutamento de ativadores da transcrição (DELMORE et al., 2011; FILIPPAKOPOULOS et al., 2010). JQ1 se liga seletivamente e com alta afinidade ao domínio de ligação da acetil-lisina, ou bromodomínios, das proteínas BET (FILIPPAKOPOULOS et al., 2010). Sendo assim, JQ1 inibe a transcrição gênica por impedir a ligação dos bromodomínios BET às histonas acetiladas. Já foi demonstrado que JQ1 bloqueia a função de STAT5 em células leucêmicas e células de linfoma, através da inibição de BRD2, o qual é um mediador crítico da atividade de STAT5 (LIU et al., 2014). JQ1 também foi encontrado por diminuir a fosforilação de STAT5 (e exercer um efeito anti-tumoral) em células de leucemia linfoblástica aguda, através da supressão da transcrição do receptor de IL-7 (o qual sinaliza via STAT5) (OTT et al., 2012). Além deste papel promissor no tratamento do câncer, JQ1 tem mostrado propriedades anti-inflamatórias em macrófagos murinos (BELKINA; NIKOLAJCZYK; DENIS, 2013; WIENERROITHER et al., 2014). Por isso, estudar o efeito de JQ1 em DCs humanas chamou nossa atenção. Assim como para a pirimetamina, não há dados mostrando o efeito da JQ1 em DCs humanas, o que seria interessante para averiguar se ambas drogas (JQ1 e pirimetamina) são eficazes contra o tumor sem levar os pacientes à imunossupressão. Além disso, como um inibidor de STAT5, o emprego da JQ1 permite investigar o ainda não estabelecido papel de STAT5 durante a maturação das DCs.

Assim, pode-se observar que os STATs estão envolvidos funcionalmente em vários tipos celulares, incluindo as células do sistema imune, como as DCs, e células neoplásicas. A ativação controlada e regulada (pelas SOCS) dos STATs são indispensáveis para a diferenciação e maturação das DCs. Ao mesmo tempo, um desequilíbrio entre STAT e SOCS pode causar danos ao desenvolvimento das DCs e ainda contribuir para a progressão tumoral. Além do mais, a ativação descontrolada dos STATs também é responsável pelas características malignas do tumor, que tem como consequência a liberação de fatores imunossupressores. Tais fatores podem afetar as DCs, interligando estas duas interfaces de maneira a contribuir para a patogenicidade do câncer. Com base nisso, o estudo das

alterações na via de sinalização dos STATs, em DCs de pacientes com câncer, é relevante para descobrirmos novos e potenciais alvos para terapia contra o câncer. Este trabalho, portanto, procurou investigar os mecanismos moleculares, dependentes de STAT, causadores dos defeitos observados nas DCs derivadas de pacientes com câncer. Assim como, investigar o efeito de novas drogas anti-tumorais (pirimetamina e JQ1) e inibidoras de STATs sobre as DCs. Pretendemos, assim, contribuir para a compreensão da fisiopatologia das DCs em pacientes com câncer e, talvez, fornecer subsídios para o aprimoramento de seu uso clínico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar o envolvimento da via de sinalização STAT e de suas proteínas reguladoras SOCS nas alterações fenotípico-funcionais de DCs derivadas de pacientes com câncer e as consequências da inibição desta via, durante a maturação funcional das DCs, através de drogas inibidoras de STAT. Assim, visou-se contribuir para compreensão dos mecanismos causadores de defeitos nas DCs de pacientes com câncer, a fim de revertê-los e gerar células mais capacitadas em ativar a resposta imunológica.

2.2 Objetivos específicos

- Comparar os monócitos e DCs derivadas de pacientes com câncer e de doadores saudáveis quanto:

- a) Os marcadores fenotípicos que caracterizam a diferenciação e maturação das DCs, geradas a partir de monócitos do sangue periférico;
- b) À produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias
- c) À capacidade de induzir a ativação de linfócitos T alogênicos e indução/expansão de Tregs;
- d) À expressão dos receptores de agonistas de ativação das DCs e dos receptores envolvidos na diferenciação de monócitos em DCs (IL-4 e GM-CSF);
- e) Estado de ativação das vias de sinalização envolvidas na diferenciação das DCs, incluindo IL-4/STAT6, GM-CSF/STAT5 e a expressão dos reguladores SOCS;

- Avaliar o efeito da pirimetamina (inibidor de STAT3) durante a maturação das DCs derivadas de doadores saudáveis quanto:

- a) Os seus marcadores fenotípicos;
- b) Ao perfil de citocinas produzidas;
- c) Ao estado de ativação das vias de sinalização STAT1, STAT3, e STAT5 e expressão dos reguladores SOCS;
- d) À capacidade de induzir a ativação de linfócitos T alogênicos;

- Avaliar o efeito do tratamento *in vitro* e *in vivo* com pirimetamina sobre as DCs de pacientes com LLC quanto aos seus marcadores fenotípicos e ao seu estado funcional.
- Avaliar o efeito da JQ1 (inibidor de STAT5) durante a maturação das DCs derivadas de doadores saudáveis quanto:
 - a) Ao estado de ativação da via de sinalização STAT5;
 - b) Os seus marcadores fenotípicos;
 - c) Ao perfil de citocinas produzidas;
 - d) Mecanismo pelo qual STAT5 pode afetar a maturação das DCs;
 - f) À capacidade de induzir a ativação de linfócitos T alogênicos;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

As amostras de sangue periférico dos pacientes com leucemia linfóide crônica (LLC) e dos controles saudáveis foram obtidas, respectivamente, do Centro de Oncologia Hematológica e do Centro de Doação de Sangue do Instituto de Câncer Dana-Farber (Boston/MA), após o consentimento dos mesmos. Este trabalho foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Parecer 987). Dentre os pacientes diagnosticados com LLC, foram estudados 28 pacientes em fase de doença ativa, de acordo com a contagem de leucócitos (WBC) que foi em média 116 mil células/mm³ (ou 116%), sendo os valores normais de leucócitos presente no sangue de 4 a 11 mil células/mm³ (ou 4 a 11%). Os dados dos pacientes com LLC estão especificadas na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1 - Dados dos pacientes com leucemia linfóide crônica (LLC)

LLC	Idade	Gênero	WBC (%)	% Linfócitos	% Monócitos
1	62	M	186,1	93	1
2	75	M	234,1	89	2
3	80	F	81,3	84	3
4	66	F	163,2	86	3
5	69	F	117,4	81	4
6	74	M	167,1	94	3
7	60	M	45,8	76	2
8	54	M	62,4	75	2
9	72	M	69,6	88	1
10	52	F	127,2	93	1
11	60	F	145,5	86	2
12	58	F	259,2	90	2
13	50	F	60,2	79	2
14	60	M	71,5	89	1
15	71	F	49,7	79	5
16	72	F	64,7	86	3
17	54	F	76,5	90	2
18	76	F	75,2	86	ND
19	58	M	57,3	70	4
20	78	M	105,9	78	9
21	59	M	89,3	92	ND
22	67	F	59,9	85	2
23	59	F	97,7	81	ND
24	72	M	77,4	88	1
25	70	M	44	63	4
26	65	M	424,6	ND	8
27	74	M	154,9	86	2
28	47	F	81,3	79	1

LLC: pacientes com leucemia linfóide crônica; WBC: contagem de leucócitos (do inglês, *White Blood Count*), valores de referência: 4 a 11%, ou 4.000 a 11.000/mm³, sendo a %x1000/mm³; Valores de referência para % de linfócitos: 25 a 45%; Valores de referência para % de monócitos: 2 a 10%; ND: valor não disponível.

3.2 Isolamento de monócitos e diferenciação em DCs

As amostras de sangue periférico foram obtidas por venóclise em tubos contendo heparina. Para purificação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), as amostras foram diluídas em RPMI, na proporção de 1:1, foram colocadas em tubos plásticos cônicos de 50 mL, sobre 12 mL de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) e centrifugadas a 900 g por 25 min, a 18 °C. A camada de células

mononucleares formada foi retirada, colocada em outro tubo juntamente com RPMI-1640 e centrifugada a 600 g por 10 min. As células foram lavadas, com RPMI, por mais 2x a 300 e 200 g, respectivamente, para eliminação das plaquetas. O sedimento foi coletado, as células quantificadas e submetidas à separação por esferas magnéticas. A concentração celular foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

A partir das PBMCs, as células CD14⁺ (monócitos) foram selecionadas positivamente em coluna imunomagnética por MACS (*MultiSort MicroBeads*) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (Miltenyi Biotec), com pureza superior a 90%. Os monócitos obtidos foram cultivados durante 5 dias, em placas de 24 ou 6 poços numa concentração de 5x10⁵ células/mL, no meio RPMI suplementado com soro fetal bovino inativado, 50 ng/mL de IL-4 (Peprotech) e 50 ng/mL de GM-CSF (Peprotech), para sua diferenciação de DCs. As células foram mantidas na estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂ e saturada com água, a 37 °C. No quinto dia de cultura, as células foram estimuladas com LPS (Sigma) na concentração final de 50 ng/mL, para maturação das DCs. As DCs imaturas (não estimuladas) e maduras foram removidas no sexto dia da cultura, com solução salina gelada e auxílio de um êmbolo de seringa, para os ensaios subseqüentes. Os sobrenadantes das culturas das DCs imaturas (iDCs) e maduras (mDCs) foram coletados para estudo da produção de citocinas, e mantidos a -80 °C até o momento da análise.

As células provenientes da seleção negativa, durante a separação por esferas magnéticas, onde se encontram os linfócitos, foram coletadas e congeladas a -80 °C, em soro fetal bovino (SFB) e DMSO (9:1), para posterior utilização em ensaios para avaliação da resposta linfocitária.

3.3 Tratamento das DCs com drogas inibidoras de STATs

As DCs foram submetidas ao tratamento com as drogas pirimetamina e JQ1, inibidoras de STAT3 e STAT5, respectivamente, durante sua fase de maturação com LPS.

Para o tratamento com a pirimetamina, as DCs foram diferenciadas na presença de IL-4 e GM-CSF, a partir de monócitos do sangue periférico isolados através de esferas imunomagnéticas CD14⁺, conforme descrito no Item 3.2. No

quinto dia da cultura de diferenciação foi adicionado, às iDCs, a droga pirimetamina nas concentrações finais de 5 μ M, 10 μ M e 15 μ M, durante 1 hora. Após este período, as iDCs foram estimuladas com LPS (50 ng/mL) para sua maturação, durante 24 horas.

Para o tratamento com a droga JQ1, as PBMCs foram isoladas conforme descrito no Item 3.2. Em seguida, as células foram mantidas, a 37 °C, na estufa (5% de CO₂ e saturada com água), para aderência das células mononucleares, durante 2 horas. As células não aderentes, presentes no sobrenadante, foram removidas, e às aderentes adicionou-se IL-4 (50 ng/mL) e GM-CSF (50 ng/mL) para diferenciação em DCs. No quinto dia da cultura foi adicionado, às iDCs, a droga JQ1 nas concentrações finais de 0,125 μ M, 0,25 μ M e 0,5 μ M, durante 1 hora. Após este período, as iDCs foram estimuladas com LPS (50 ng/mL) para sua maturação, durante 24 horas.

Como controles foram utilizadas iDCs e mDCs tratadas apenas com o veículo de diluição das drogas, DMSO. Avaliou-se e comparou-se as iDCs e mDCs não tratadas com as drogas (pirimetamina e JQ1), com as iDCs e mDCs tratadas, por citometria de fluxo, real time PCR e *imunoblotting*. Os sobrenadantes das culturas foram coletados para estudo da produção de citocinas, e mantidos a -80 °C até o momento da análise.

3.4 Quantificação da viabilidade celular

Para verificar se a pirimetamina e a JQ1 causam citotoxicidade, avaliou-se a viabilidade das DCs tratadas com estas drogas. As células viáveis foram mensuradas através do ensaio de bioluminescência dependente de adenosina trifosfato (ATP), CellTiter-Glo (Promega), de acordo com o fabricante. Este ensaio, mede o número de células viáveis em cultura baseado na quantificação de ATP presente, um indicador de células metabolicamente ativas. Brevemente, as DCs foram diferenciadas e tratadas com as drogas, conforme descrito nos Itens 3.2 e 3.3. Ao final da cultura (dia 6), as células foram transferidas para placas de 96 poços, onde foi adicionado o reagente bioluminescente, e incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente. O índice combinatório para mensurar o efeito das drogas no número de células viáveis foi calculado através do *software* CalcuSyn (Conservion).

3.5 Ensaio de proliferação

Os linfócitos T CD3⁺ de doadores saudáveis alogênicos foram isolados positivamente em coluna imunomagnética por MACS (*MultiSort MicroBeads*) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (Miltenyi Biotec), com pureza superior a 95%. Após a seleção, estas células foram semeadas em placas de 96 poços (fundo em U), juntamente com as DCs derivadas de pacientes, de doadores saudáveis e àquelas submetidas ou não ao tratamento com os inibidores de Jak/STAT), respectivamente. As células T CD3⁺ foram marcadas com 2 µM de *cell trace violet* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A co-cultura foi mantida durante 120 h à 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂. No quinto dia, o sobrenadante das co-culturas foi coletado para avaliação da produção de citocinas por ELISA e as células foram analisadas por citometria de fluxo. As células foram marcadas com os anticorpos anti-CD4 conjugado com Alexa Fluor® 647 e anti-CD8 conjugado com PE (Biolegend®, San Diego, CA, USA), durante 20 min a 4 °C (Item 3.6). O índice e a porcentagem de divisão celular foram avaliados usando-se o *software* FlowJo 8.7.6 (Tree Star inc., Ashland, OR, EUA).

3.6 Citometria de fluxo

3.6.1 Marcação de superfície

Para determinar o fenótipo de membrana das DCs, essas células foram marcadas com anticorpos monoclonais comerciais, adquiridos na BD Bioscience Pharmingen, para as seguintes moléculas: CD11c (marcador de DCs mielóides), CD14 (marcador de linhagem monocítica mielóide), CD80 e CD86 (B7-1 e B7-2, moléculas co-estimuladoras), CD83 (marcador de DCs ativadas/maduras), CD40 (molécula co-estimuladora), HLA-DR (molécula do MHC-II, expressa em APCs profissionais). Com exceção dos anticorpos para CD14 e CD83, que foram utilizados na diluição 1/20, os demais foram utilizados na diluição de 1/40. Foram usados os seguintes anticorpos marcados: anti-CD11c com isotiocinato de fluoroceína (FITC), anti-CD80 com ficoeritrina conjugada ao fluorocromo Cy7 (PE-Cy7), anti-CD14 com complexo protéico peridina clorofila I (PerCP), anti-CD83 com aloficocianina (APC), anti-CD86 com *Pacific Blue* e anti-HLA-DR com V500.

Após a contagem em câmara de Neubauer, alíquotas de 1 a 2×10^5 células, obtidas das culturas, foram colocadas em tubos cônicos de 1,5 mL e lavadas três vezes, por centrifugação, a 17946 g, a 4 °C por 10 s, com 300 µL de tampão para citometria PBS-BSA (PBS suplementado com 0,5% de soroalbumina bovina e 0,02% de azida sódica). Ao sedimento obtido foram adicionados os anticorpos específicos para os marcadores de interesse. As células foram incubadas ao abrigo da luz por 20 min a 4 °C. Após esse período, foram acrescentados 200 µL de PBS-BSA e o material lavado duas vezes nas mesmas condições. As células marcadas foram ressuspensas com 300 µL de PBS-BSA contendo 2% de formaldeído para a fixação das mesmas. A aquisição foi realizada no citômetro de fluxo, FACSCanto II (Becton & Dickinson, NJ, EUA) e os dados obtidos foram analisados no *software* FlowJo 8.7.6 (Tree Stars Inc.).

3.6.2 Marcação intracelular de citocinas

Neste ensaio, usou-se o kit para marcação intracitoplasmática da BD® (*Cytofix/Cytoperm*). Inicialmente, as células foram estimuladas com o coquetel de ativação: *Leucocyte Activation Cocktail, with GoldiPlug* (BD), conforme descrito pelo fabricante, incubando-se por um período de 4 h. Após esse período, as células foram suspensas em 400 µL de PBS 1X 2% FCS. Fez-se uma etapa de lavagem e seguiu-se a marcação de superfície incubando-se por 30 minutos a 4 °C no escuro com os devidos anticorpos. Após centrifugação e descarte do sobrenadante as células foram permeabilizadas e fixadas com a solução *Cytofix/cytoperm* 1x fornecida pelo kit. Incubou-se por 20 min no escuro em 4 °C. Após esse período adicionaram-se 400 µL de PBS 2% FCS gelado e centrifugou-se por 5 min a 600 g, descartando-se o sobrenadante. Adicionaram-se 200 µL do tampão *PermWash* 1x e centrifugou-se a suspensão por 5 min a 600 g, descartando-se o sobrenadante. Repetiu-se esse passo mais uma vez. Após a segunda centrifugação, descartou-se o sobrenadante, agitou-se vigorosamente e adicionaram-se os anticorpos anti-citocinas, incubando-se por 30 minutos no gelo e no escuro. Os anticorpos utilizados foram: anti-IL-4 PE e anti-IFN γ APC. Após essa etapa, lavaram-se duas vezes as células com 200 µL de tampão de permeabilização. Após a segunda lavagem, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 300 µL de tampão Facs (PBS 1X 2 % FCS). Em seguida, fez-se a aquisição no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton & Dickinson, NJ, EUA). Um total de 100000 células foram

adquiridas e os dados obtidos foram analisados no *software* FlowJo 8.7.6 (Tree Stars Inc.).

3.6.3 Detecção intracelular de FOXP3

Neste ensaio, usou-se o kit para marcação intracitoplasmática da eBioscience (Human Regulatory T Cell Staining Kit). Inicialmente, 10^6 células foram suspensas em 100 uL de PBS 1x 2%SFB (soro fetal bovino). Fez-se a marcação de superfície com o mix de anticorpos anti-CD4 e anti-CD25, incubando-se por 30 min a 4 °C no escuro. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, as células foram fixadas com uma solução de Fixação/Permeabilização 1x fornecida pelo kit, incubando-se 1 hora no escuro e no gelo. Após este período, adicionou-se 1 mL de PBS 2%SFB gelado e centrifugou-se por 10 min a 600 g, descartando-se o sobrenadante. Adicionaram-se 200 uL de tampão de Permeabilização 1x e centrifugou-se a suspensão por 10 min a 600 g, descartando-se o sobrenadante. Repetiu-se este passo mais uma vez. Após a segunda centrifugação, descartou-se o sobrenadante, agitou-se vigorosamente e adicionaram-se 8 uL de anticorpo anti-Foxp3 PE, incubando-se por 30 min no gelo e no escuro. Após esta etapa, lavaram-se as células 2 vezes com 200 uL de tampão de Permeabilização. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 300 uL de tampão Facs (PBS1X 2%SFB). Fez-se, então, a aquisição em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton & Dickinson, NJ, EUA). Um total de 100000 células foram adquiridas e os dados obtidos foram analisados no *software* FlowJo 8.7.6 (Tree Stars Inc.).

3.6.4 Método de análise de monócitos e DCs

Para analisar as moléculas presentes na superfície dos monócitos, delimitou-se uma região em tamanho (FSC – *forward scatter*) por granulosidade (SSC – *side scatter*), na população que possuía estes parâmetros característicos dos monócitos. Em seguida, os *doublets* foram eliminados e avaliou-se os marcadores de interesse na população de células CD14⁺. No caso da fenotipagem de DCs delimitou-se a região de tamanho por granulosidade característicos destas células, excluiu-se os *doublets*, e avaliou-se as células que eram HLA-DR⁺CD14⁻, de forma a eliminar monócitos e macrófagos da análise. Um exemplo do método de análise para DCs de pacientes com LLC e controles saudáveis está demonstrado na Figura 1.

Figura 2 - Método de análise das células dendríticas (DCs) derivadas de monócitos sanguíneos para caracterização fenotípica por citometria fluxo. As DCs imaturas (iDCs) e maduras (mDCs) foram removidas, no sexto dia, da cultura de diferenciação para caracterização dos marcadores de superfície, por citometria de fluxo. Figura representativa do método de análise para iDCs e mDCs. À esquerda: plots representativos de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC), onde delimitou-se a região para seleção da população com estes parâmetros característicos de DCs de doadores saudáveis (A) e de pacientes com leucemia linfóide crônica - LLC (B). Meio: plots representativos da exclusão dos doublets, onde delimitou-se a região de SSC-A por SSC-H para seleção da população singlet de DCs de doadores saudáveis (A) e de pacientes com LLC (B). À direita: Dot plots representativos de CD14 por HLA-DR dentro das regiões de tamanho e granulosidade e singlets, em que se delimitou a região das células HLA-DR⁺ CD14⁻, onde as análises fenotípicas foram realizadas.

3.7 Phosflow

Para avaliar o estado de ativação da via IL-4/STAT6, 2.10^5 células (monócitos, iDCs ou mDCs de pacientes e controles saudáveis), por condição, foram ressuspensas em 300 μ l de meio RPMI 10% SFB, pré aquecido a 37° C, e transferidas para tubos Facs. Em seguida, acrescentou-se 50 ng/mL de IL-4 e incubou-se as células durante 15 minutos a 37 °C, na estufa (5% de CO₂ e saturada com água), para ativação da via STAT6. Como controle foram usadas células não estimuladas com IL-4. Após o estímulo, as células foram fixadas acrescentando-se 300 μ l de paraformaldeído 4% e incubadas por 10 minutos a 37° C. Após esse período, centrifugaram-se as amostras a 600 g por 5 minutos. Adicionou-se 1 ml de metanol 90% gelado e incubou-se no gelo por 30 minutos. Em seguida, adicionaram-se 2 ml de PBS 1x e centrifugou-se a suspensão por 7 minutos a 600 g. Após

descarte do sobrenadante, adicionaram-se 100 µl de tampão de lavagem Facs (PBS 1X 2%SFB) e incubou-se a suspensão por 15 minutos à temperatura ambiente para reidratação. Após a reidratação, acrescentaram-se 200 µl de tampão de lavagem Facs e centrifugou-se a suspensão por 5 minutos a 600 g. Descartou-se o sobrenadante, resuspendeu-se o sedimento celular em 90 µl de tampão de lavagem Facs e acrescentaram-se, tanto nas células estimuladas como não estimuladas, 10 µl de PE *mouse* anti-pSTAT6 pY641 (BD, Becton Dickinson, NJ, EUA). Incubou-se a suspensão por 30 minutos no gelo e no escuro. Após esse período, lavou-se três vezes com tampão de lavagem FCS e, após a última centrifugação, resuspendeu-se o sedimento celular em 400 µl de tampão de lavagem Facs. Em seguida, fez-se a aquisição das amostras no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton & Dickinson, NJ, EUA) e os dados obtidos foram analisados no *software* FlowJo 8.7.6 (Tree Stars Inc.). Um total de 100000 eventos foram adquiridos. O cálculo do aumento da fosforilação de STAT6 foi feito comparando-se as condições com e sem estímulo.

3.8 ELISA

As citocinas presentes no sobrenadante das culturas das DCs foram detectadas por ensaio imunoenzimático, com os kits ELISA MAXTM Deluxe para as citocinas TNF, IL-12p70 e IL-10 (Biolegend®, San Diego, CA, USA), como descrito pelo fabricante. A densidade óptica da reação imunoenzimática foi determinada em espectrofotômetro na absorvância de 450 nm (SpectraMax M3, Molecular Devices). O cálculo das concentrações foi feito com auxílio do *software* SoftMax Pro 5.4.1, através da equação de regressão linear com base na curva padrão.

3.9 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Cerca de $5-10 \times 10^6$ células (monócitos, iDCs e mDCs), tiveram seu RNA extraído com o kit *RNeasy Plus Mini* (Qiagen), como recomendado pelo fabricante. Quantificou-se o RNA purificado por espectrofotometria (NanoDrop 8000) nos comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm. O grau de pureza das amostras foi verificado através da análise da relação entre 260 e 280 nm. Sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores de razão maiores que 1,7.

A transcrição reversa, para obtenção do cDNA (DNA complementar), foi feita com 100 ng de RNA total, num volume final de 40 µl, usando a enzima transcriptase reversa MultiScribe™ MuLV (Invitrogen™) (50 U/µL) e os reagentes do kit TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Invitrogen™). O RNA foi diluído em 15,4 µL de água livre de RNase e foi adicionado 2 µL de Randon Hexamers (50µM), 4 µL de tampão (10X) , 8,8 µL de cloreto de magnésio (25mM), 8 µL de mix de dNTPs (10 mM, 2,5mM de cada), 0,8 µL de inibidor de RNase (20U/µL) e 1 µL da enzima. A reação foi incubada a 25 °C por 10 minutos, 48 °C por 30 minutos e a 95 °C por 5 minutos.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em placas de 96 poços, com o *RT²Real-Time™ SYBR Green/ROX PCR master mix* (SABioscience) e o equipamento Perkin-Elmer ABI Prism 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems). A reação foi realizada conforme instruções do fabricante. O cálculo da quantificação relativa (QR) foi realizado pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e utilizando como gene de referência o RNA ribossômico 18s (18sRNA).

A fórmula utilizada para a quantificação relativa (QR) foi:

$$QR = 2^{-\Delta\Delta Ct}, \text{ onde } \Delta Ct = Ct_{\text{alvo}} - Ct_{\text{referência}}, \text{ e } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{amostra}} - \Delta Ct_{\text{controle}}$$

Os genes avaliados foram: *IL-12*, *TNF*, *IL-6*, *IL-10*, *TGF-β*, *TLR-4*, *MD2*, *MyD88*, *TRIF*, *CD120a*, *CD120b*, *EP2*, *EP4*, *IL-6R*, *IL-1βR*, *IL-4R*, *CSF2RA*, *STAT1*, *STAT5*, *STAT6*, *SOCS1*, *SOCS2*, *SOCS3*, *SOCS5*, *CISH*, *TNFSF10*, *TRIM22*, *PTPRC*, *CDK6*, *Mcl-1*, *Bcl-x*, *Bcl-6*, *ciclina D1* e *PIM1*, usando-se como controle endógeno o gene *18sRNA*. Foram consideradas válidas, apenas as amplificações onde a curva de dissociação apresentou pico único. As sequências dos iniciadores foram desenhadas no NCBI (do inglês *National Center for Biotechnology Information*) e estão representadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Sequência de iniciadores utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Genes	Forward	Reverse
<i>SOCS1</i>	TGGTGCACACAACCAGGTG	GAGGAGGAGGAAGAGGAGGA
<i>SOCS2</i>	CTTGAGCCCTCCGGAAT	TCTCTTTGGCTTCATTAACAGTCA
<i>SOCS3</i>	TCAAGACCTTCAGCTCCAAG	TGACGCTGAGCGTGAAGAAG
<i>SOCS5</i>	ACCCAGAGTTCATTGGATGC	CCCACAGTATCCTGCAACCT
<i>STAT1</i>	TACTCCAGGCCAAAGGAAGC	AGAAGGGTGAACCTCAGACACA
<i>STAT5b</i>	GTACCCACAGAACCCTGACTC	GGGATCCACTGACTGTCCAT
<i>STAT6</i>	TCCCAGAGCACTTCCTCTTC	GTCCAGGACACCATCAAACC
<i>CISH</i>	CTGCTGTGCATAGCCAAGAC	GTGCCTTCTGGCATCTTCTG
<i>TNFSF10</i>	ATGGCTATGATGGAGGTCCAG	TTGTTCTGCATCTGCTTCAGC
<i>TRIM22</i>	GGATGCCAGCAGGCTCATCTCAG	TTCAGCATCACGTCCACCCAGTAGT
<i>PTPRC</i>	AGCACCTACCCTGCTCAGAA	TTCAGCCTGTTCTTTGCTT
<i>CDK6</i>	TCTTGCTCCAGTCCAGCTAC	TCTCCTGGGAGTCCAATCAC
<i>Bcl-x</i>	GGTATTGGTGAGTCGGATCG	TGCTGCATTGTTCCCATAGA
<i>Bcl-6</i>	CTGCAGATGGAGCATGTTGT	TCTTCACGAGGAGGCTTGAT
<i>IL-6</i>	CTCGAGCCCACCGGAACGA	GGACCGAAGGCGCTTGTGGA
<i>IL-12p40</i>	TCCTGCCCAGAGCAAGATGTGT	ATGGCCACGAGGGGAGATGC
<i>IL-10</i>	CCTGGAGGAGGTGATGCCCA	ATCGATGACAGCGCCGTAGCC
<i>TNF</i>	CGGCCCCCAGAGGGAAGAGT	GAGGGTTTGCTACAACATGGGCT
<i>IL-1β</i>	CACGCTCCGGGACTCACAGC	GGAGAACACCACTTGTTGCTCCA
<i>TGF-β1</i>	GGAAATTGAGGGCTTTCGCC	CCGGTAGTGAACCCGTTGAT
<i>TLR4</i>	GGATGATGCCAGGATGATGTCT	ATTAGGAACCACTCCACGC
<i>MD2</i>	GCACATTTTCTACATTCCAAGGAG	TGCGCTTTGGAAGATTCATGG
<i>MyD88</i>	AGAGGTTGGCTAGAAGGCCA	CTTCTGATGGGCACCTGGA
<i>TRIF</i>	CCGGATCCCTGATCTGCTTGG	GGTGAAGGCATGTTCCACACT
<i>CD120b</i>	TGTGACAGCCTTGGGTCTAC	CAAGTGAGGCACCTTGGCTT
<i>CD120a</i>	CTAGACACTGATGACCCCGC	GAATTCCTTCCAGCGCAACG
<i>IL-1R</i>	TGGGGAAGACATTGTTGAGGT	TTCAGATGAACCACCCAGCC
<i>EP2</i>	GCTCCTTGCCCTTTCACGATTT	AGGATGGCAAAGACCCAAGG
<i>EP4</i>	CCGCTCGTGGTGCGAGTATT	GGATGGGGTTCACAGAAGCA
<i>IL-6R</i>	CCACCCCCATGCAGGCACTTAC	GAACCTGGGAGGCTTGTGCGAT
<i>IL-4Rα</i>	AACGACCCGGCAGATTTCAG	CGTGCCCTGTAGGAAATCCC
<i>CSF2RA</i>	GGATGCCGTGGGGTTTACA	GGTTCTACGCAAACATCGCC
<i>18sRNA</i>	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG

3.10 Obtenção e quantificação de lisado protéico

As células foram lavadas 1 x com PBS gelado (a 1500 rpm por 10 minutos, a 4 °C), ressuspendidas em tampão de lise (25 μ L para 3×10^6 células) e incubadas durante 15 minutos, no gelo. O tampão de lise usado foi EBC 1 x (50 mM TRIS - pH 8, 250 mM NaCl, 0,5% NP-40) acrescido de inibidores de protease (10 μ L/mL de EBC), momentos antes do uso. Após o período de lise, o material foi centrifugado a

14.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C, o sobrenadante foi transferido para novo tubo e deixado no gelo, enquanto determinava-se a concentração protéica. A quantificação foi feita pelo método de Bradford, utilizando-se o reagente (*Biorad Protein Assay*) diluído em água (1:5). Colocou-se 1 mL do reagente de Bradford em cada cubeta e adicionou-se 1 µL do lisado. A leitura foi feita no espectrofotômetro (Beckman DU640, Fullerton, CA, USA) na densidade óptica (O.D) de 595 nm. Em seguida, adicionou-se ao lisado o mesmo volume de tampão de amostra 2 x (SB, *Sample Buffer*), acrescido de BME (β-mercaptoetanol 40 µL/mL de SB) e corante (loading dye 20 µL/mL de SB). Misturou-se as amostras e, em seguida, elas foram deixadas no banho seco, a 100 °C por 5 minutos. Então, os tubos foram deixados no gelo por mais 2 minutos e congelados a -20 °C.

3.11 Western blotting

Culturas celulares contendo 3×10^6 DCs foram lisadas e a concentração protéica do lisado obtida, conforme descrito no Item 3.10. Procedeu-se a separação protéica, usando 15 µg do lisado, em SDS-PAGE a 8%. Ao término da corrida, as proteínas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose, utilizando-se folhas de papel de filtro embebidas em tampão de transferência [48 mM Tris-HCl pH 7,5, 39 mM glicina, 0,037% SDS (p/v)]. Com auxílio da placa de transferência *Hoefler Semiphor* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA), a preparação foi submetida a uma corrente de 200 mA por 1 h. A membrana foi lavada com TBST (20 mM Tris-base, 0,1% Tween20, 140 mM NaCl) sob agitação por 10 min à temperatura ambiente (TA), seguida por bloqueio com tampão TBST contendo 5% de leite desnatado, à TA por 1 h. Feito isto, a membrana foi incubada, sob agitação, *overnight* à 4 °C, com os anticorpos fosforilados, feitos em coelho, anti-pSTAT1, anti-pSTAT3 ou anti-pSTAT5 (Cell Signaling, Beverly, MA, EUA), e os anticorpos para STAT1, STAT3 ou STAT5 totais, feitos em coelho (Santa Cruz Biotechnology, CA), na diluição 1:10.000 em TBST. Em seguida, a membrana foi deixada à TA, durante 1 h sob agitação. Ao término da incubação, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST, à TA por 5 min, e incubada com anti-IgG de cabra conjugados com peroxidase de raiz forte (Santa Cruz Biotechnology, CA), diluídos em TBST (1:10.000) por 1 h à TA. A membrana foi novamente lavada 4 x com TBST (15 minutos), e incubada por 2

min com solução de substrato *ECL plus* fornecida pelo fabricante do kit Amersham *ECL plus Western blotting detection system* (GE Healthcare, Munich, Alemanha). A membrana foi analisada com o auxílio do GBox (Syngene, Frederick, MD, EUA).

3.12 Ensaio de luciferase com linhagens celulares repórter

Para identificar os fatores de transcrição (STAT1, STAT3, STAT5 e NF- κ B) inibidos pelas drogas pirimetamina e JQ1 foram usadas linhagens celulares repórter, nas quais foi mensurado a atividade da luciferase dependente destes fatores de transcrição. As células repórter são responsivas a fatores de transcrição individuais, que aumentam a expressão da luciferase por se ligarem à sua região promotora. Para mensurar a atividade da luciferase dependente de STAT3, STAT1, STAT5 ou NF- κ B foram usadas as linhagens STAT3-luc/U3A (LYNCH et al., 2007), STAT1-luc/ZF (WAGNER et al., 1990), STAT5-luc/T47D (NELSON et al., 2006) e NF- κ B-luc/293 (catalog no. 219078; Stratagene, La Jolla, CA), respectivamente. Para testar a atividade inibitória das drogas, foram plaqueadas 10^4 células em placas de 96 poços opacas, no meio de cultura D-MEM acrescido de 10% SFB. No dia seguinte, a droga foi adicionada e as células incubadas durante 1 h, à 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂. Logo depois, as células foram estimuladas com 10 ng/mL de IL-6 (STAT3-luc/U3A), 10 ng/mL de IFN- γ (STAT1-luc/ZF), 100 ng/mL de prolactina (STAT5-luc/T47D) ou 10 ng/mL de TNF (NF- κ B-luc/293). IL-6 e TNF foram obtidas da Peprotech, enquanto IFN- γ e prolactina foram obtidas da R&D Systems (Minneapolis, MN). Seis horas depois, a atividade da luciferase foi quantificada usando o reagente Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI) e o luminômetro Luminoskan Ascent (Labsystems, Helsinki, Finland)

3.13 Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)

Para cada condição, cerca de 1.5×10^7 células foram usadas. As células foram fixadas com formaldeído 1% por 10 min à temperatura ambiente, seguido pela neutralização do formaldeído usando-se 0.125 M de glicina. Lavou-se as células com PBS. Os núcleos foram isolados em 400 μ L de tampão de lise celular (10 mM Tris, pH 8.0, 10 mM NaCl, 0.2% Nonidet P-40) contendo inibidores de fosfatases e

proteases (ortovanadato de sódio, fluoreto de fenilmetilsulfonilo, pepstatina, aprotinina, leupeptina) e incubados por 10 min no gelo. Os núcleos foram centrifugados a 2500 rpm, em microcentrifuga refrigerada, e foram lisados em 100 μ L tampão de lise nuclear (50 mM Tris, pH 8.1, 10 mM EDTA, 1% SDS, inibidores de fosfatases e proteases) durante 10 min no gelo. Foi adicionado 1 mL de tampão de diluição IP (20 mM Tris, pH 8.1, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.01% SDS) e a cromatina foi cortada por sonicação até um tamanho médio de 500-1000 pares de bases. Os restos celulares foram removidos por centrifugação, o sobrenadante dividido em três alíquotas e 700 μ L de tampão de diluição IP foram adicionados em cada alíquota. Foram adicionados 2.5 μ g de anticorpo anti-STAT5 (Santa Cruz Biotechnology) e os tubos foram deixados agitando *overnight* a 4 °C. Após isto, 60 μ L de proteína A/G beads (Santa Cruz Biotechnology) foram adicionadas e as amostras foram incubadas sob agitação durante 4 a 5 horas a 4 °C. As beads foram, então, lavadas três vezes com tampão de lavagem IP I (20 mM Tris, pH 8.1, 2 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS), por 10 min cada, a 4 °C. Em seguida, lavou-se uma vez com tampão de lavagem IP II (10 mM Tris, pH 8.1, 1 mM EDTA, 0.25 M LiCl, 1% Nonidet P-40, 1% ácido desoxicólico) por 10 min a 4 °C. Foi realizada três lavagens com TE gelado. Após eluir duas vezes usando 200 μ L de tampão de eluição (100 mM bicarbonato de sódio, 1% SDS) por 10 min à temperatura ambiente, 16 μ L de 5 M NaCl foi adicionado e as ligações cruzadas foram revertidas incubando-se a 65 °C *overnight*. O DNA foi purificado usando *PCR purification kit* (Qiagen). 100 μ L de cada produto do ChIP foi recuperado e 1 μ L foi usado para qPCR, a qual foi feita em triplicata usando os primers para: CSF2RA (TTTGCATGTGGTCTTTGAGG e TTCTTGACAACACCCAGCAC), Cish (CCCGCGGTTCTAGGAAGAC e CGAGCTGCTGCCTAATCCT), SOCS2 (AGGCCGATTCTGGAAG e CGACGAGACTTGGCAAGAG), CD83 (CTGGCCCTCAAATTCTTTCA e TGAGACGTTAGCCAGTGGAA), CD80 (CCAAATCTTCACCCACCTA e CTGAGGAAAAGCGAATGGAA) ou rodopsina (TGGGTGGTGTCTATCTGGTAA e GGATGGAATGGATCAGATGG). Os resultados foram normalizados pelo *input* e expressos relativos a ligação numa região de controle negativo (onde não há ligação de STAT5) no gene da rodopsina. Os programas Match Browser (<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/match/bin/match.cgi>) e UCSC Genome Browser

(<http://genome.ucsc.edu>) foram usados para identificar potenciais sítios de ligação de STAT5 na região reguladora dos genes.

3.14 Transdução com vetor lentiviral

O vetor lentiviral com expressão de eGFP, SiEW, expressando uma forma mutante de STAT5a ativada constitutivamente (caSTAT5) foi clonada e produzida como descrito (VAFAIZADEH et al., 2010). iDCs (cerca de 3×10^5) foram infectadas com lentivírus expressando caSTAT5 ou vetor vazio no quinto dia de cultura, na presença de 4 µg/mL de polibreno (Sigma-Aldrich), e centrifugadas a 2500rpm, 32 °C por 30 min. O meio foi trocado 150 min após a transdução e as iDCs foram tratadas com JQ1 ou DMSO por 1 hora e, em seguida, estimuladas com LPS (100ng/mL). Após 24 horas, mDCs foram analisadas por citometria de fluxo ou coletadas para análise do RNA. A eficiência da transdução foi entre 60% a 70%.

3.15 Análise estatística

Para a análise dos resultados, utilizou-se os seguintes testes: *student T test*, para comparação entre dois grupos; *one-way* ANOVA (teste de análise da variância) seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas Tukey-Kramer, para comparação entre mais de dois grupos de estudo. A análise estatística dos dados de citometria de fluxo entre iDCs e mDCs de pacientes, assim como a análise de PCR em tempo real e de ELISA entre pacientes e controles foi feita pelo *student T test* não pareado. A comparação entre iDCs e mDCs de pacientes e controles e a curva dose resposta das DCs tratadas com pirimetamina e JQ1 foram analisadas por ANOVA. Os dados de DCs tratadas ou não com JQ1 e inibidor de Jak foram analisados pelo *student T test* pareado. As análises estatísticas foram feitas com o programa Prism 6.0 (GraphPad Software inc., La Jolla, CA, EUA). Os dados são apresentados como média e erro padrão. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas entre os grupos quando foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise fenotípica de DCs derivadas de pacientes com LLC

Sabe-se que o microambiente tumoral induz um perfil imunológico supressor com consequências sistêmicas. As células dendríticas (DCs), por sua vez, são afetadas por este ambiente imunossupressor. Em pacientes com leucemia linfóide crônica (LLC), já foi descrito defeitos fenotípico-funcionais em DCs derivadas de monócitos sanguíneos (ORSINI et al., 2004). Desta forma, para comprovar estes defeitos nas DCs dos pacientes incluídos neste estudo, primeiramente investigou-se o perfil fenotípico destas células comparando-o ao daquelas diferenciadas a partir de monócitos de doadores saudáveis (DS). Os monócitos foram diferenciados com a adição das citocinas IL-4 e GM-CSF e ativados no quinto dia da cultura de diferenciação com LPS, para completa maturação. Avaliou-se, dentre as células que tinham tamanho e granulosidade característicos de DCs, a expressão das moléculas CD14, CD11c, HLA-DR, CD80, CD86, CD40 e CD83, indicativas de diferenciação e maturação de DCs, por citometria de fluxo (Figura 3). Conforme esperado, as células dos doadores saudáveis apresentaram fenótipo de DC diferenciada e madura, observado pela baixa expressão de CD14 e alta expressão de CD11c, de HLA-DR, da molécula de ativação CD83 e das moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 e CD40) (Figura 3 e 4A). No entanto, as DCs dos pacientes não apresentaram este fenótipo característico. Não houve aumento na expressão das moléculas HLA-DR, CD80, CD86, CD83 e CD40 nas DCs dos pacientes, mesmo após a maturação induzida com LPS. Os níveis de expressão destas moléculas nas células dos pacientes foram equivalentes aos de DCs imaturas dos doadores saudáveis (Figura 4A). A molécula CD11c teve uma tendência a expressão diminuída nas iDCs e mDCs dos pacientes comparativamente aos controles saudáveis. Por outro lado, a expressão do CD14 foi equivalente nos pacientes e controles, o que indica se tratar de células monocíticas mielóides, grupo de células das quais as DCs fazem parte (Figura 4A). Notavelmente, a expressão de CD80 e CD40 aumentou significativamente nas DCs maduras dos pacientes quando comparadas às suas DCs imaturas, embora este aumento tenha sido irrisório se comparado com o obtido pelas DCs dos doadores saudáveis (Figura 4B).

Figura 3 - Caracterização fenotípica das células dendríticas derivadas de monócitos de doadores saudáveis e pacientes com LLC. Histogramas representativos da intensidade mediana de fluorescência (MFI) das moléculas de superfície CD14, CD11c, HLA-DR, CD80, CD86, CD40 e CD83 nas DCs de doadores saudáveis (à esquerda) e de pacientes com LLC (à direita), analisadas por citometria de fluxo. As análises foram feitas na população de células CD14⁺HLA-DR⁺, após exclusão dos *doublets*. Do lado direito de cada histograma são mostrados os valores para MFI. Dados representativos de 6 experimentos independentes.

Figura 4 - DCs derivadas de monócitos de pacientes com LLC são fenotipicamente alteradas.

(A) iDCs (sem LPS) e mDCs (estimuladas com LPS por 24 h), diferenciadas a partir de monócitos de pacientes com LLC e doadores saudáveis, foram analisadas e comparadas para a expressão dos marcadores de superfície indicados, por citometria de fluxo. Os *doublets* foram excluídos da análise e as DCs foram definidas como CD14⁺HLA-DR⁺. A intensidade mediana de fluorescência (MFI) das moléculas de superfície das DCs está apresentada em gráficos de barra, representativos de seis experimentos independentes. Dados mostrados como média $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, comparado com todos outros grupos. (B) A expressão das moléculas de superfície das DCs foi comparada entre iDCs e mDCs de pacientes com LLC, por citometria de fluxo. As células foram analisadas como descrito em (A). Dados mostrados como média $\pm$ SEM de cinco experimentos independentes. (C) A expressão do mRNA das citocinas das DCs maduras de pacientes com LLC e doadores saudáveis foi analisada por PCR quantitativa (qPCR). A expressão do mRNA foi normalizada pelo 18S rRNA, e o aumento relativo foi determinado dividindo-se a expressão em cada amostra pela média dos valores expressos pela mDCs dos doadores saudáveis. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de oito experimentos independentes. (D) As citocinas produzidas no sobrenadante das mDCs de pacientes com LLC e doadores saudáveis foram mensuradas por ELISA. Cada *plot* individual representa um doador diferente. * $p < 0.05$. DS, doadores saudáveis. LLC, leucemia linfóide crônica.

Para verificar a capacidade das DCs dos pacientes com LLC de influenciar a resposta dos linfócitos T (promovendo o terceiro sinal necessário na apresentação de antígenos), foi explorado o padrão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias produzidas pelas DCs de pacientes e controles. Conforme esperado, as DCs dos doadores saudáveis expressaram altos níveis de mRNA das citocinas pró-inflamatórias, IL12, TNF e IL6, assim como da citocina anti-inflamatória IL-10 e do imunossupressor TGF- β . Em contrapartida, as DCs dos pacientes expressaram apenas níveis elevados de TGF- β , enquanto que a expressão das citocinas pró-inflamatórias e também de IL-10 foi reduzida (Figura 4C). Consistente com estes achados, observou-se no sobrenadante das DCs dos doadores saudáveis grandes

quantidades de IL12p70, TNF e IL-10 secretadas, enquanto que apenas IL-10 e baixos níveis de TNF foram detectados no sobrenadante das DCs derivadas dos pacientes (Figura 4D). Juntos estes resultados mostram que as DCs dos pacientes com LLC possuem um fenótipo alterado, as quais não diferenciam-se completamente em DCs maduras e são incapazes de produzir citocinas pró-inflamatórias em níveis equivalentes aos dos doadores saudáveis, ao passo que produzem IL-10 e TGF- β .

4.2 Expressão dos receptores de ativação em DCs de pacientes com LLC

Uma vez que as células dendríticas dos pacientes não maturaram após o estímulo com LPS, diferentemente das células dos doadores saudáveis, foi investigado se as DCs imaturas dos pacientes expressavam os receptores necessários para sua ativação, através da análise do seu mRNA. O complexo do receptor de LPS consiste de dois receptores de interação (CD14 e TLR4) e da proteína associada MD2. Como visto anteriormente (Figura 4A), as células dos pacientes expressam a molécula CD14. No entanto, a expressão de mRNA de TLR4 e de MD2 foi reduzida nas células dos pacientes (cerca de 7 vezes para TLR4 e 4.5 vezes para MD2) (Figura 5A). Já a expressão das moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF, que transduzem o sinal do complexo do receptor TLR4, não foi significativamente alterada nos pacientes comparando-se com os controles, embora nas iDCs dos pacientes haja tendência à diminuição da expressão de TRIF (Figura 5A). Deste modo, estes resultados indicam que a ativação das DCs dos pacientes com LLC pela via de sinalização de TLR4 é diminuída devido a reduzida expressão do complexo do seu receptor. Interessantemente, a estimulação das DCs imaturas com uma dose bem elevada de LPS (500ng/mL) parece começar a induzir aumento da expressão das moléculas de superfície (HLA-DR, CD11c, CD80, CD86, CD40 e CD83) nas células dos pacientes com LLC (dados não mostrados). Apesar disso, este aumento não se compara aos níveis de expressão obtidos pelas DCs dos doadores saudáveis. Isto mostra que as células dos pacientes são menos responsivas ao LPS, possivelmente por causa da baixa expressão do seu receptor.

Além do LPS, há outros agonistas utilizados para ativação das células dendríticas diferenciadas *in vitro*, tais como TNF (fator de necrose tumoral), PGE2 (prostaglandina E2), IL-6, IL-1 β e agonistas de outros TLRs (HANSEN et al., 2013).

Assim, foi questionado se as células dos pacientes expressariam os receptores destes agonistas, de modo que os mesmos pudessem ser utilizados na maturação das DCs ao invés do LPS. Primeiramente, foi verificado se as DCs dos pacientes expressavam outros TLRs (TLR3, TLR5, TLR7 e TLR9). A expressão de TLR3 e TLR5 foi diminuída nas iDCs dos pacientes com LLC, enquanto que não houve diferença significativa na expressão de TLR7 e TLR9, embora haja uma forte tendência à redução (Figura 5B). Existem dois receptores que se ligam ao TNF chamados CD120a (TNFR1) e CD120b (TNFR2), sendo o CD120a o receptor de alta afinidade que medeia a maturação das DCs (DING et al., 2011). A análise da expressão do mRNA destes receptores mostrou que CD120a foi menos expresso nas iDCs dos pacientes (7,8 vezes). Já a expressão de CD120b foi equivalente a dos doadores saudáveis (Figura 5C). Os receptores de PGE2 testados, EP2 e EP4, que respondem à PGE2 nas DCs, não foram significativamente diferentes nas células dos pacientes comparadas às dos controles, embora haja tendência a expressão diminuída nas DCs dos pacientes. Em adição, IL-6R (receptor para IL-6) e IL-1R (receptor para IL-1 β) foram menos expressos nas iDCs de pacientes (3,5 e 27 vezes, respectivamente) (Figura 5C). Assim, estes dados revelaram que as DCs dos pacientes são defeituosas quanto a expressão dos receptores dos agonistas de ativação testados, indicando o porquê destas células não serem ativadas eficientemente.

Figura 5 - DCs imaturas derivadas de monócitos de pacientes com LLC expressam baixos níveis dos receptores de agonistas de ativação. (A) A expressão do mRNA de TLR4 e suas moléculas associadas na ativação pelo LPS foi avaliada em iDCs de pacientes com LLC e de doadores saudáveis por qPCR. A expressão do mRNA foi normalizada pelo 18S rRNA, e o aumento relativo foi determinado dividindo-se a expressão em cada amostra pela média dos valores expressos pela iDCs dos doadores saudáveis. (B, C) A expressão do mRNA dos receptores TLR (B) e dos receptores de TNF, PGE2, IL-6 e IL-1 (C) foi analisada nas iDCs de pacientes e controles por qPCR, relativa ao controle endógeno 18S rRNA. Os dados mostrados são representativos de 5 ou 8 experimentos independentes. Dados mostrados como média $\pm$ SEM. * $p < 0.05$. DS, doadores saudáveis. LLC, leucemia linfóide crônica.

4.3 Atividade funcional das células dos pacientes com LLC

Tendo em vista este fenótipo defeituoso das DCs derivadas de pacientes com LLC, procurou-se investigar as propriedades funcionais destas células *in vitro*. Assim, avaliou-se a capacidade das DCs dos pacientes para induzir resposta proliferativa de linfócitos T, determinada por ensaios de aloestimulação. As DCs diferenciadas de doadores saudáveis demonstraram sua maturidade funcional exibindo uma boa capacidade de estimular tanto linfócitos T CD4⁺ quanto linfócitos T CD8⁺ alogênicos. Em contraste, um menor efeito aloestimulador de linfócitos T CD4⁺ foi mostrado pelas DCs derivadas dos pacientes com LLC, enquanto que, em média, a estimulação de linfócitos T CD8⁺ não foi diferente da induzida pelos doadores saudáveis (Figura 6A). Estes achados foram consistentes com dados fenotípicos e confirmam o comprometimento funcional das DCs dos pacientes com LLC.

O padrão de resposta gerada pelos linfócitos T estimulados com DCs de pacientes foi explorado através da análise das citocinas produzidas no sobrenadante das co-culturas. O estímulo das DCs dos doadores saudáveis induziu tanto a produção de IFN- γ e TNF quanto de IL-10 pelos linfócitos T CD3⁺, enquanto que

estes mesmos linfócitos T quando estimulados pelas DCs dos pacientes com LLC produziram apenas IL-10 e baixos níveis de IFN- γ (Figura 6B). Interessantemente, apesar das DCs de alguns pacientes com LLC induzirem proliferação de linfócitos T CD8⁺ igualmente às DCs dos doadores saudáveis, a frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ foi intensamente reduzida (Figura 6C). Ainda, para explorar a habilidade das DCs dos pacientes de induzir a polarização dos linfócitos T CD4⁺ para uma resposta Th1 ou Th2, determinou-se a porcentagem de células produtoras de IFN- γ , TNF e IL-4, por marcação intracelular de citocinas. Enquanto as DCs dos controles saudáveis induziram linfócitos T CD4⁺ produtores tanto de IFN- γ e TNF quanto de IL-4, a frequência de linfócitos produtores destas citocinas quando estimulados pelas DCs dos pacientes foi diminuída. Então, as DCs dos controles saudáveis foram capazes de induzir linfócitos T alogênicos a se diferenciarem em células Th1 produtoras de IFN- γ e TNF e em células Th2 produtoras de IL-4. Diferentemente, as DCs derivadas dos pacientes com LLC, que produziram baixíssimos níveis de IL-12, induziram menos células T efetoras produtoras de IFN- γ e TNF, assim como de IL-4 (Figura 6C). Isto indica que as DCs dos pacientes possuem pequena capacidade de induzir tanto resposta Th1 quanto Th2.

Figura 6 - DCs de pacientes com LLC induzem menos proliferação e baixa produção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos T alogênicos. Co-cultura de DCs com linfócitos T CD3⁺ alogênicos, isolados por seleção magnética, foi acessada para comparar a capacidade imunoestimuladora das mDCs de pacientes com LLC às mDCs de doadores saudáveis. **(A)** As mDCs foram co-cultivadas com linfócitos T CD3⁺ previamente marcados com CellTrace Violet por cinco dias. *Plots* representando a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, mensurada pela diluição de CellTrace, acessado por citometria de fluxo (painel acima). Os números nos *plots* representam a frequência de células proliferativas. O índice de proliferação dos linfócitos T CD4⁺ (à esquerda) e CD8⁺ (à direita) foi calculado com o *software* FlowJo 8.7 (painel abaixo). Dados mostrados como média $\pm$ SEM de sete experimentos independentes realizados em duplicata ou triplicata. **(B)** Concentração de citocinas no sobrenadante das co-culturas de linfócitos T CD3⁺ com mDCs, mensurada por ELISA. **(C)** Linfócitos T CD3⁺, co-cultivados com mDCs, foram analisados por marcação intracelular de citocinas produzidas por células T CD4⁺ e CD8⁺. *Plots* acima mostram a porcentagem de TNF e IFN- γ (Th1) produzidos pelas células T CD4⁺. *Plots* do meio mostram a porcentagem de IL-4 (Th2) produzido pelas células T CD4⁺. *Plots* abaixo mostram as células T CD8⁺ produtoras de TNF e IFN- γ . A representação gráfica da frequência de células CD4⁺ TNF⁺, CD4⁺ IFN- γ ⁺, CD4⁺ IL-4⁺, CD8⁺ TNF⁺ e CD8⁺ IFN- γ ⁺, está apresentadas à direita de cada respectivo *plot*. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0.05$. DS, doadores saudáveis. LLC, leucemia linfóide crônica.

Estudos prévios tem mostrado que células T reguladoras (Tregs) estão aumentadas em pacientes com LLC (D'ARENA et al., 2011; GIANNPOULOS et al., 2008). Então, avaliou-se o potencial das DCs derivadas de pacientes com LLC de induzir/expandir Tregs. Concordando com o perfil fenotípico imunossupressor das DCs dos pacientes, estas também induziram maior frequência de células Tregs

(CD4⁺CD127^{lo}CD25^{hi}FOXP3⁺) (Figura 7A). Outras moléculas importantes para a função das Tregs, como LAP e CTLA4 (CHAUDHRY; RUDENSKY, 2013), também foram encontradas aumentadas nas Tregs induzidas/expandidas pelas DCs de pacientes e de controles, quando comparadas à expressão nos linfócitos T CD4⁺ totais (Figura 7B). Contudo, as Tregs induzidas pelas DCs dos pacientes expressaram menos LAP e CTLA4 do que as Tregs induzidas pelas DCs dos controles, indicando que estas células podem ter um perfil diferenciado.

Figura 7 - DCs de pacientes com LLC induzem/expandem maior frequência de células T reguladoras do que os controles saudáveis. (A) mDCs derivadas de pacientes com LLC ou de doadores saudáveis foram co-cultivadas com linfócitos T CD3⁺, e avaliadas para a indução/expansão de Tregs. As Tregs foram definidas como células CD4⁺CD127^{lo}CD25^{hi}FOXP3⁺. (B) A expressão das moléculas LAP e CTLA-4 foi avaliada e comparada entre as células definidas como T CD4⁺ totais e as células Tregs co-cultivadas com mDCs de pacientes e controles. MFI, intensidade mediana de fluorescência. Os dados mostrados são representativos de três experimentos independentes realizados em duplicata ou triplicata. * $p < 0.05$. DS, doadores saudáveis. LLC, leucemia linfóide crônica.

4.4 Mecanismo responsável pelas alterações fenotípicas das DCs de pacientes com LLC

4.4.1 Desregulação na via de sinalização STAT6 e SOCS5 em monócitos

Tendo visto que as DCs de pacientes com LLC são fenotipicamente defeituosas e incapazes de responder aos estímulos de maturação, foi questionado se os monócitos destes pacientes teriam alterações moleculares que prejudicassem

sua diferenciação em DCs. Primeiramente, os monócitos dos pacientes foram avaliados quanto a expressão dos marcadores de superfície CD14, CD11c, HLA-DR, CD80, CD86, CD40 e CD83, por citometria de fluxo. Contudo, a expressão destas moléculas foi semelhante entre monócitos de pacientes e de controles (Figura 8A). Então, o próximo passo foi avaliar o receptor de IL-4 (IL-4R) nos monócitos, uma vez que esta citocina é necessária para sua diferenciação em DCs. Notavelmente, IL-4R foi mais abundante nos monócitos dos pacientes com LLC do que nos controles, tanto na expressão de mRNA (Figura 8B) quanto na expressão protéica (Figura 8C).

Figura 8 - Monócitos de pacientes com LLC possuem elevada expressão do IL-4R. (A) Monócitos de pacientes com LLC e doadores saudáveis foram analisados para a expressão dos marcadores de superfície indicados, por citometria de fluxo. A população de monócitos foi definida como CD14⁺HLA-DR⁺, após a exclusão dos *doublers*. MFI, intensidade mediana de fluorescência. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de sete e nove, controles e pacientes independentes, respectivamente. (B) A expressão do mRNA do receptor de IL-4 (IL-4R) foi avaliada nos monócitos de pacientes com LLC e de doadores saudáveis por qPCR. A expressão do mRNA foi normalizada pelo 18S rRNA, e o aumento relativo foi determinado dividindo-se a expressão em cada amostra pela média dos valores expressos pelos monócitos dos doadores saudáveis. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de cinco experimentos independentes. (C) *Plots* representando a expressão de IL-4R nos monócitos dos pacientes e controles, avaliada por citometria de fluxo na população de células definida como em (A) (painel à esquerda). Quantificação da expressão de IL-4R nos monócitos avaliados por citometria de fluxo (painel direito acima). Lisados dos monócitos de pacientes e doadores saudáveis analisados por *immunoblotting* para IL-4R. Tubulina foi usada como controle endógeno (painel direito abaixo). Dados mostrados como média $\pm$ SEM de cinco experimentos independentes. * $p < 0.05$. DS, doadores saudáveis. LLC, leucemia linfóide crônica. C1: controle 1; P1: paciente 1.

Sabendo-se que IL-4R sinaliza via STAT6 (JACKSON et al., 2004), foi explorado o estado de ativação desta via nos monócitos dos pacientes. Consistente com a expressão elevada de IL-4R, viu-se que a expressão do mRNA de STAT6 foi aumentada nos monócitos dos pacientes (Figura 9A). No entanto, os monócitos dos pacientes apresentaram níveis proeminentemente menores na indução da fosforilação na tirosina de STAT6, após o estímulo com IL-4 (Figura 9B). Além disso, observou-se que durante a diferenciação destes monócitos em DCs, a fosforilação de STAT6 vai diminuindo. O estado de fosforilação encontrado nas DCs imaturas e maduras dos pacientes, contudo, foi equivalente aos níveis encontrados nos doadores saudáveis (Figura 9B). Isto sugere que STAT6 é mais relevante durante o estágio inicial da diferenciação dos monócitos em DCs e que esta via de sinalização está afetada nos monócitos dos pacientes.

Após a fosforilação da tirosina, as STATs translocam do citoplasma para o núcleo e ligam-se ao DNA para induzirem a transcrição de seus genes alvo. Então, foi investigado se a reduzida fosforilação de STAT6 nos monócitos dos pacientes resultaria na diminuição da sua atividade transcricional. Para tal, avaliou-se a expressão do mRNA dos genes alvos de STAT6, tais como Stat1, Tnfsf10, Trim22, Ptprc e Cdk6 (BAUS et al., 2009) (Figura 9C). A expressão dos genes Stat1, Tnfsf10, Trim22, Ptprc, os quais são regulados negativamente por STAT6, foi elevada nos pacientes. Por outro lado, Cdk6, o qual pode ser induzido ou reprimido por STAT6, foi menos expresso nos monócitos dos pacientes. Estes achados vão de acordo com a reduzida fosforilação de STAT6, a qual resulta na diminuição da atividade transcricional dependente deste fator de transcrição.

Para explorar o motivo pelo qual a ativação de STAT6 está inibida nos monócitos dos pacientes com LLC, avaliou-se a expressão do seu regulador negativo SOCS5. Tendo os níveis de mRNA quanto os níveis de proteína de SOCS5 foram altamente mais expressos nos monócitos dos pacientes em comparação com os controles (Figura 9D e 9E). Diferente de SOCS5, a expressão de outros membros da família das SOCS (SOCS1, SOCS2 e SOCS3), os quais são induzidos durante a diferenciação e maturação das DCs (JACKSON et al., 2004; POSSELT et al., 2011), foi menor nos monócitos dos pacientes. Vale a pena destacar que, enquanto a expressão das diferentes SOCS não variou nos controles, nos monócitos dos pacientes apenas SOCS5 variou, apresentando um aumento brusco (Figura 9D). Isto indica que a desregulação na expressão de SOCS5 nos monócitos dos

pacientes poderia estar envolvida com a defeituosa diferenciação das DCs, por inibir a fosforilação de Stat6. Por outro lado, viu-se que esta alta expressão de SOCS5 nos monócitos dos pacientes, encontra-se diminuída nas DCs imaturas, sendo inclusive menor do que a expressão de SOCS5 nas DCs imaturas dos controles. Nas DCs maduras, a expressão de SOCS5 continuou no mesmo nível das DCs imaturas, sendo que em 7 de 10 pacientes analisados a expressão de SOCS5 foi similar nos controles e pacientes. Já as outras SOCS mantiveram-se menos expressas nas DCs imaturas e maduras dos pacientes comparadas aos controles, assim como visto para os monócitos (Figura 10).

Figura 9 - A ativação de STAT6 está diminuída nos monócitos de pacientes com LLC enquanto os níveis de SOCS5 estão elevados. (A) O mRNA dos monócitos de pacientes com LLC e de doadores saudáveis foi analisado por qPCR para a expressão de STAT6, normalizada pelo 18S rRNA. O aumento relativo foi determinado dividindo-se a expressão em cada amostra pela média dos valores expressos pelos monócitos dos doadores saudáveis. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de cinco experimentos independentes. (B) Os monócitos de pacientes e controles foram deixados sem estímulo ou estimulados com IL-4, por 15 min, para avaliar a fosforilação da tirosina 641 de STAT6 (pSTAT6) por citometria de fluxo. Histogramas representativos mostram a MFI de pSTAT6 nos monócitos (painel à esquerda). pSTAT6 foi avaliado nos monócitos, iDCs e mDCs de pacientes e de controles, e mostrado como a razão entre a MFI de pSTAT6 nas células estimuladas com IL-4 pela MFI das células não estimuladas (painel à direita). As análises foram feitas dentro da região de monócitos ou de DCs, após a exclusão dos *doublets*. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de quatro experimentos independentes. (C) Os genes alvo de STAT6 foram avaliados nos monócitos por qPCR, analisada conforme descrito em A. (D) A expressão do mRNA das SOCS indicadas, analisada por qPCR, foi comparada entre monócitos de pacientes e controles. Análises foram feitas como em A. (E) Os lisados dos monócitos de controles (C) e pacientes (P) foram analisados por *immunoblotting* para SOCS5. A intensidade das bandas, dos lisados dos monócitos avaliados por *immunoblotting*, foi quantificada e está representada como a razão entre SOCS5 e o controle endógeno calnexina (SOCS5/calnexina) (painel à direita). Dados de três experimentos independentes. * $p < 0.05$. DS, doadores saudáveis. LLC, leucemia linfóide crônica.

Figura 10 - Expressão diferencial das SOCS nas DCs de pacientes com LLC. A expressão do mRNA das SOCS indicadas foi analisada nas DCs imaturas (iDCs) e maduras (mDCs) de pacientes e controles por qPCR. A expressão do mRNA foi normalizada pelo 18S rRNA, e o aumento relativo foi determinado dividindo-se a expressão em cada amostra pela média dos valores expressos pelas iDCs ou mDCs dos doadores saudáveis. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de oito experimentos independentes. * $p < 0.05$. DS, doadores saudáveis. LLC, leucemia linfóide crônica.

Uma vez que GM-CSF, em combinação com IL-4, também é necessário para diferenciação dos monócitos em DCs, avaliou-se o receptor de GM-CSF (CSF2RA) e a atividade transcricional de STAT5, o qual é responsável pela sinalização deste receptor. Contudo, não observou-se diferença na expressão de mRNA e de proteína do receptor de GM-CSF (Figura 11A), nem na expressão do mRNA de STAT5 (Figura 11B) entre monócitos de pacientes e controles. Ainda, foi investigada a expressão dos genes alvo de STAT5, incluindo Cish, Mcl-1, Bcl-x e Ciclina D1 (regulados positivamente) (BARASH, 2012; GESBERT; GRIFFIN, 2000; MATSUMOTO et al., 1997), e Bcl-6 (regulado negativamente) (WALKER; NELSON; FRANK, 2007). Os monócitos dos pacientes apresentaram aumento de dois genes alvos, Bcl-x e Ciclina D1, redução de Mcl-1 e não houve diferenças quanto a expressão de Cish e Bcl-6, comparando-se com os controles (Figura 11C).

Figura 11 - Monócitos de pacientes com LLC não apresentam alteração na expressão do receptor de GM-CSF e na atividade transcricional de STAT5. (A) A expressão do mRNA do receptor de GM-CSF (CSF2RA) foi avaliada nos monócitos de pacientes com LLC e de doadores saudáveis por qPCR. A expressão do mRNA foi normalizada pelo 18S rRNA, e o aumento relativo foi determinado dividindo-se a expressão em cada amostra pela média dos valores expressos pelos monócitos dos doadores saudáveis (painel à esquerda). Histogramas representando a expressão do receptor de GM-CSF nos monócitos, avaliada por citometria de fluxo na população de células definida como CD14⁺HLA-DR⁺, após a exclusão dos *doublets* (painel à direita). (B) A expressão do mRNA de STAT5 foi avaliada nos monócitos por qPCR, analisada como descrito em A. (C) Os genes alvo de STAT5 foram avaliados nos monócitos por qPCR, analisada como descrito em A. Todos os dados são mostrados como média $\pm$ SEM de cinco experimentos independentes. * $p < 0.05$. DS, doadores saudáveis. LLC, leucemia linfóide crônica.

Juntos estes resultados mostram que os monócitos dos pacientes com LLC não possuem alterações na expressão protéica dos marcadores de superfície, tão pouco na expressão do mRNA do receptor de GM-CSF e STAT5. Porém, expressaram mais IL4-R e STAT6, apesar da ativação desta via estar diminuída, resultado consistente com sua reduzida atividade transcricional e aumentada expressão do seu regulador negativo, SOCS5. Sendo assim, tais resultados apontam para um defeito nas células dos pacientes com LLC desde os monócitos precursores das DCs.

Uma vez que houve reduzida fosforilação de STAT6 nos monócitos dos pacientes apenas após o estímulo com IL-4 (Figura 9B), verificou-se os níveis de mRNA de SOCS5 nos monócitos de pacientes e controles com e sem adição de IL-4. Foi observado que SOCS5 continua significativamente mais expresso nos monócitos dos pacientes com LLC, independente do estímulo de IL-4 (Figura 12A). Além disso, foi questionado se aumentando a dose de IL-4, durante a diferenciação dos monócitos em DCs, seria suficiente para restaurar o fenótipo tolerogênico das células dos pacientes com LLC. Contudo, mesmo elevadas doses de IL-4 não foram capazes de alterar o fenótipo das DCs, tanto dos pacientes quanto dos controles (Figura 12B). Isto indica que, apesar dos altos níveis de IL-4R nos monócitos dos

pacientes, os elevados níveis de SOCS5 comprometem a sinalização de STAT6 e a diferenciação das DCs. Já nas células dos controles, a quantidade inicial de IL-4 parece já estar saturada, de maneira a induzir uma máxima diferenciação dos monócitos em DCs.

Figura 12 - IL-4 exógeno mantém a expressão de SOCS5 elevada nos monócitos dos pacientes com LLC e não restaura o fenótipo alterado das DCs. (A) A expressão do mRNA de SOCS5 foi comparada entre monócitos de pacientes e doadores saudáveis estimulados com IL-4, por 30 min, ou deixados sem estímulo. mRNA foi normalizado pelo 18S rRNA, e o aumento relativo foi determinado dividindo-se a expressão em cada amostra pela média dos valores expressos pelos monócitos dos doadores saudáveis. (B) DCs foram diferenciadas a partir de monócitos de pacientes com LLC e doadores saudáveis, na presença das diferentes concentrações de IL-4 indicadas. No quinto dia de cultura, as DCs foram estimuladas com LPS e analisadas para a expressão de CD80 e CD86, por citometria de fluxo. A população de DCs foi definida como CD14⁺HLA-DR⁺, após a exclusão dos *doublets*. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de seis e quatro experimentos independentes. * $p < 0.05$. DS, doadores saudáveis. LLC, leucemia linfóide crônica.

4.4.2 IL10/STAT3 regulam a expressão de IL-4R e SOCS5 nos monócitos

As células tumorais da LLC são conhecidas por liberarem fatores solúveis, tais como IL10 e IL-6, que podem afetar a diferenciação e a função das DCs. Dados da literatura mostram níveis séricos elevados destes fatores em pacientes com LLC (FAYAD et al., 2001; GARAUD et al., 2011; ORSINI et al., 2003). Uma vez que IL-10 e IL-6 ativam STAT3, primeiramente, buscou-se identificar se a fosforilação de STAT3 estaria alterada nos monócitos dos pacientes, como consequência da exposição a estes fatores solúveis no soro. Os níveis da fosforilação da tirosina de

STAT3 foram significativamente aumentados nos monócitos dos pacientes, após serem estimulados (Figura 13A). Isto indica que o estímulo crônico, sobre monócitos dos pacientes, causado por estes fatores solúveis liberados pelo tumor pode tornar a ativação de STAT3 mais propensa quando estimulada. Sendo IL-4R um gene alvo de STAT3 (MAUER et al., 2014), levantou-se a possibilidade de que IL-10 e/ou IL-6 poderiam ser os responsáveis pelos elevados níveis de IL-4R apresentados pelos monócitos dos pacientes e, possivelmente, também pelo aumento de SOCS5. Para testar esta hipótese, monócitos derivados de doadores saudáveis foram tratados com IL-10 e IL-6, e avaliados ao longo do tempo para a expressão de mRNA de IL-4R e SOCS5. O tratamento com IL-10 causou aumento da expressão de IL-4R, a partir de 4 horas, e esta expressão continuou elevada por pelo menos 96 horas. Enquanto isso, a expressão de SOCS5 foi induzida mais tardiamente por IL-10, atingindo seu ápice com 72 horas (Figura 13B). Por outro lado, o tratamento com IL-6 gerou aumento na expressão de IL-4R, mas não de SOCS5 (Figura 13C). Em adição, investigou-se os níveis protéicos de SOCS5 e o estado de fosforilação de STAT6 após o estimular os monócitos de doadores saudáveis com IL-10. Para avaliar a fosforilação de STAT6, os monócitos tratados com IL-10 foram adicionalmente estimulados por 30 min com IL-4. Nota-se que a expressão protéica de SOCS5 é inversa à fosforilação de STAT6 (Figura 13D). Enquanto os níveis de SOCS5 foram aumentados 96 horas após o estímulo da IL-10, a fosforilação de STAT6 (aumentado com 12 horas) diminuiu. Conforme esperado, STAT3 fosforilado foi aumentado devido ao estímulo da IL-10 e vai diminuindo ao longo do tempo. Estes achados sugerem que IL-10 atua da seguinte maneira: precocemente, aumenta a ativação de STAT3, e, portanto, causa o aumento de IL-4R; tardiamente, induz a expressão de SOCS5, que vai regular negativamente a sinalização do IL-4R, através da inibição da fosforilação de STAT6.

Figura 13 - A expressão de IL-4R e SOCS5 é induzida por IL-10. (A) *Plots* representando a quantidade de STAT3 fosforilado (pSTAT3) nos monócitos de pacientes e controles, sem estímulo (s/est.) ou estimulados com IL-6 por 15 min (+IL-6), analisados por citometria de fluxo. Os números nos *plots* representam os valores da MFI para pSTAT3 (painel à esquerda). pSTAT3 é mostrada como a razão entre a MFI de pSTAT3 nos monócitos de pacientes e controles estimulados com IL-4 pela MFI dos respectivos monócitos não estimulados (painel à direita). Dados mostrados como média $\pm$ SEM de quatro experimentos independentes. * $p < 0.05$. DS, doadores saudáveis. LLC, leucemia linfóide crônica. (B, C) Os monócitos de doadores saudáveis foram tratados com IL-10 (A) ou IL-6 (B) e o RNA das células foi avaliado por qPCR para a expressão de IL-4R e SOCS5, no intervalo de tempo de 4 h a 96 h. Dado representativo de 2 experimentos independentes. (D) Os lisados dos monócitos dos controles tratados com IL-10, durante 12 h e 96 h, foram analisados por *immunoblotting* para SOCS5 e pSTAT3 (painel acima) ou pSTAT6 (painel do meio). Para análise de pSTAT6, os monócitos sem tratamento (S/t) ou tratados com IL-10, foram estimulados com IL-4 por 30 min. A intensidade das bandas dos lisados avaliados por *immunoblotting* foi quantificada e está representada como a razão entre STAT ou SOCS5 e calnexina (painel abaixo).

Por fim, para confirmar o efeito imunossupressor da IL-10 no fenótipo das DCs, monócitos de doadores saudáveis foram diferenciados em DCs na presença de IL-10 e avaliados quando a expressão dos marcadores de superfície. Da mesma forma que as DCs diferenciadas a partir de monócitos dos pacientes com LLC, a expressão das moléculas HLA-DR, CD11c, CD80, CD86, CD83 e CD40 foi significativamente reduzida nas mDCs de doadores saudáveis diferenciadas na presença de IL-10 (Figura 14A). Para comparar o efeito da IL-10, a qual induz a expressão de SOCS5, com o efeito causado pela IL-6, a qual não induz SOCS5, investigou-se também o fenótipo das DCs diferenciadas na presença de IL-6. Diferentemente do efeito causado pela IL-10, a indução da expressão das moléculas

de superfície nas mDCs foi semelhante na presença e ausência de IL-6 (Figura 14B). Estes dados mostram que a IL-10, mas não a IL-6, além de aumentar a expressão de SOCS5, também altera o fenótipo das DCs, indicando uma correlação de SOCS5 com este fenótipo defeituoso.

Figura 14 - IL-10 mas não IL-6 inibe a maturação das DCs de doadores saudáveis. (A, B) Monócitos de doadores saudáveis foram diferenciados em DCs na presença de IL-10 ou de IL-6. No quinto dia da cultura, as células foram maturadas com LPS e avaliadas para a expressão dos marcadores de superfície indicados, por citometria de fluxo. A população de DCs foi definida como CD14⁻HLA-DR⁺, após a exclusão dos *doublers*. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de quatro experimentos independentes. * $p < 0.05$. # $p < 0.05$.

4.5 Pirimetamina na modulação de células dendríticas

Pelo fato da droga pirimetamina ser um inibidor de STAT3 e estar em ensaio clínico para tratamento de câncer em pacientes com LLC, avaliou-se se esta droga exerce algum efeito sobre DCs. Realizou-se uma curva dose-resposta onde foram testadas as concentrações de 5 μ M, 10 μ M e 15 μ M de pirimetamina. Inicialmente, foi analisada a viabilidade das células tratadas com a droga, através do ensaio bioluminescente (CellTiter-Glo). Esse ensaio mede o número de células viáveis em cultura baseando-se na quantificação de ATP presente, um indicador de células metabolicamente ativas. Nas três doses testadas não foram observadas alterações na viabilidade das DCs (Figura 15).

Figura 15 - Tratamento com pirimetamina não altera a viabilidade das DCs derivadas de monócitos de doadores saudáveis. DCs imaturas foram tratadas com a concentração indicada de pirimetamina, durante 1 hora, e então, foram estimuladas com LPS (lipopolissacarídeo) por 24 horas. A viabilidade celular foi mensurada, em DCs tratadas ou não com pirimetamina e estimuladas ou não por LPS, usando um ensaio bioluminescente dependente de ATP. A viabilidade relativa foi baseada nas DCs imaturas não tratadas com a droga. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de cinco experimentos independentes.

Em seguida, foi analisada a expressão dos marcadores de superfície nas DCs tratadas com três diferentes doses da pirimetamina, por citometria de fluxo. Houve um aumento significativo da expressão de HLA-DR nas DCs tratadas com 15 μ M da droga (Figura 16). Além disso, houve uma tendência ao aumento da expressão de HLA-DR nas outras doses testadas (5 μ M e 10 μ M), assim como uma tendência ao aumento de CD86 e CD40, após o tratamento com pirimetamina. Todavia, o tratamento com a droga não alterou moléculas CD80, CD83 e CD11c (Figura 16).

Figura 16 - Tratamento com pirimetamina não altera o fenótipo das DCs derivadas de monócitos de doadores saudáveis. DCs imaturas foram tratadas com as concentrações indicadas de pirimetamina, durante 1 hora, e então, foram estimuladas com LPS (lipopolissacarídeo) por 24 horas. As células foram analisadas quanto a intensidade mediana de fluorescência (MFI) das moléculas de superfície indicadas, por citometria de fluxo. As análises foram feitas na população de células CD14⁺HLA-DR⁺, após a exclusão dos *doublets*. A MFI relativa foi baseada nas DCs maturadas com LPS e não tratadas com a droga. Py: pirimetamina. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de cinco experimentos independentes. * $p < 0.05$, comparado com DC+LPS.

Uma vez que a concentração da droga utilizada nos pacientes do ensaio clínico é de 10 μ M, esta dose foi escolhida para dar continuidade aos ensaios com DCs. A expressão do mRNA das citocinas IL-12, TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-10, foi avaliada nas DCs tratadas com pirimetamina, após 6 e 24 horas da ativação com LPS (Figura 17A). Viu-se um aumento significativo da expressão de IL-12 nas DCs tratadas e ativadas 24 horas com LPS e nestas mesmas células observou-se também tendência ao aumento da expressão de IL-1 β . Para as demais citocinas testadas não houve mudanças na expressão após tratamento com a droga. A fim de confirmar os dados acima, foi mensurada a produção das citocinas IL-12p70, TNF e IL-10 pelas DCs maduras (24 após ativação com LPS) tratadas ou não com a droga, por ELISA (Figura 17B). Observou-se uma tendência ao aumento da produção de IL-12p70 pelas DCs tratadas, confirmando os resultados da expressão de mRNA de IL-12. Também consistente com a expressão de mRNA, a produção de TNF e IL-10 não mudou com adição da droga (Figura 17B).

Figura 17 - DCs derivadas de doadores saudáveis tratadas com pirimetamina aumentam a produção de IL-12. DCs imaturas foram tratadas com pirimetamina (10 uM), durante 1 hora, e estimuladas com LPS. **(A)** As DCs foram estimuladas durante 6 e 24 horas para análise da expressão do mRNA das citocinas indicadas, por qPCR. Dados foram normalizados pela expressão do 18sRNA. O aumento relativo foi determinado dividindo-se a expressão em cada amostra pelo valor expresso pelas mDCs não tratadas com a droga. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de cinco experimentos independentes. * $p < 0.05$. **(B)** ELISA para avaliar a produção de citocinas, mensuradas no sobrenadante das culturas de DCs tratadas (ou não) com pirimetamina, 24 horas após o estímulo do LPS. Py: pirimetamina. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de sete experimentos independentes. * $p < 0.05$.

Devido a pirimetamina ter sido identificada como um inibidor de STAT3 em linhagens tumorais, foi avaliado se esta droga é capaz de inibir a atividade STAT3 nas DCs, por *immunoblotting*. As vias de STAT1 e STAT5 também foram avaliadas para verificar se a droga inibe STAT3 especificamente. Viu-se que após 15 minutos da ativação com LPS não houve modificações na fosforilação de STAT3, tampouco de STAT1 e STAT5 (dados não mostrados). Contudo, após 16 horas de ativação com LPS, foi observado aumento na fosforilação destas três moléculas (Figura 18A), o que indica que a ativação destas vias por LPS é indireta e autócrina. Em seguida, avaliou-se nas DCs (16 horas após ativação com LPS) se a ativação das vias de STAT3, STAT1 e STAT5 foi inibida pelo tratamento com pirimetamina, o que não foi observado (Figura 18A). A quantificação das proteínas fosforiladas relativas as proteínas totais (pSTAT3/STAT3, pSTAT1/STAT1 e pSTAT5/STAT5) não mostrou

diferenças após tratamento com a droga (Figura 18B). Considerando-se que as proteínas totais são genes alvo das fosforiladas e também podem ser alteradas, verificou-se a relação fosfo-proteínas pela tubulina. Contudo, também não houve modificações em pSTAT3, pSTAT1 e pSTAT5, nas DCs tratadas com pirimetamina (Figura 18C). Em adição, foi analisada a expressão do mRNA de duas proteínas reguladoras de STATs, SOCS1 e SOCS3, não sendo observadas diferenças de expressão entre mDCs tratadas e não tratadas com a droga (Figura 19).

Figura 18 - Pirimetamina não altera a fosforilação de STAT1, STAT3 e STAT5 nas DCs derivadas de doadores saudáveis. DCs imaturas foram tratadas com pirimetamina (10 μ M), durante 1 hora, e estimuladas com LPS durante 16 horas. **(A)** Análise das proteínas STAT1, STAT3 e STAT5 totais e fosforiladas (p), por *immunoblotting*, em 3 diferentes doadores saudáveis. **(B)** e **(C)** Histogramas mostrando a quantificação protéica do *immunoblotting*. **(B)** Relação entre as proteínas fosforiladas pelas totais. **(C)** Relação entre as proteínas fosforiladas pelo controle endógeno tubulina. Py: pirimetamina. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de três experimentos independentes.

Figura 19 - Tratamento com pirimetamina não altera a expressão de SOCS1 e SOCS3 nas DCs de doadores saudáveis. iDCs foram tratadas com pirimetamina (10 μ M), durante 1 hora, e estimuladas com LPS durante 24 horas, para análise da expressão do mRNA de SOCS1 e SOCS3, por qPCR. Gráficos em barra mostram a expressão do mRNA de SOCS em iDCs e mDCs tratadas (ou não) com pirimetamina. Dados foram normalizados pela expressão do 18sRNA. O aumento relativo foi determinado dividindo-se a expressão em cada amostra pelo valor expresso pelas mDCs não tratadas com a droga. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de cinco experimentos independentes.

Como não foi observada alteração na fosforilação de STAT3, após o tratamento das DCs com pirimetamina, investigou-se a atividade transcricional de STAT3. Isto porque a pirimetamina poderia estar inibindo a atividade de STAT3 não através da fosforilação, mas bloqueando outros pontos da cascata de sinalização. Contudo, também não foi observado mudanças na expressão dos genes alvo de STAT3 avaliados (IL-6R, IRF-1, IRF-9, Bcl-6 e STAT1) após o tratamento com pirimetamina (Figura 20).

Figura 20 - Tratamento com pirimetamina não altera a expressão dos genes alvo de STAT3 nas DCs de doadores saudáveis. DCs imaturas foram tratadas com pirimetamina (10uM), durante 1 hora, e estimuladas com LPS durante 24 horas. Os genes alvo de STAT3 foram analisados em iDCs (sem LPS) e mDCs (com LPS) tratadas com pirimetamina (Py), por qPCR normalizada pelo controle endógeno 18S rRNA. O aumento relativo foi determinado dividindo-se a expressão em cada amostra pelo valor expresso pelas mDCs não tratadas com a droga. Dados mostrados como média ± SEM de quatro experimentos independentes.

Uma vez que não houve inibição de STAT3 nas DCs tratadas com pirimetamina, avaliou-se a funcionalidade da alíquota da droga utilizada nesses ensaios, assim como a especificidade da droga com relação as vias de STAT1 e NF- κ B. Para tanto, utilizou-se um sistema de células repórter em que a luciferase é regulada por fatores de transcrição individuais. Para STAT3, foi usada a linhagem celular U3A-luciferase (STAT3-luc). Uma vez que as células são ativadas com IL-6, ocorre a ativação de STAT3 que por sua vez induz a expressão da luciferase. O sinal da luciferase é convertido em luz e quantificado com adição do reagente Bright-Glo. O mesmo foi feito para as linhagens ZF-luciferase (STAT1-luc) e NF- κ B-luciferase (NF- κ B-luc), com a diferença que nestas linhagens encontra-se os sítios de ligação para STAT1 e NF- κ B, respectivamente, e as células foram ativadas com IFN- γ e TNF, respectivamente. A pirimetamina reduziu em 63% a atividade da luciferase dependente de STAT3, nas três doses testadas (Figura 21). Ainda, parece haver um pequeno efeito de inibição da transcrição dependente de STAT1 (cerca de 30%), mas não em níveis comparáveis à STAT3 e nenhum efeito na transcrição

mediada pelo NF- κ B (Figura 21). Com isso, a pirimetamina mostrou ser mais específica à inibição de STAT3.

Figura 21 - Pirimetamina inibe a expressão gênica dependente de STAT3 e STAT1 mas não de NF- κ B. Linhagens celulares repórter para STAT3 (STAT3-luc/U3A), STAT1 (STAT1-luc/ZF) e NF- κ B (NF-B-luc/293) foram tratadas com pirimetamina nas concentrações indicadas, durante 1 hora, e, então, estimuladas com 10 ng/mL de IL-6, IFN- γ e TNF, respectivamente, por 6 horas. A atividade da luciferase foi quantificada com luminômetro. Dados mostrados como média $\pm$ SD de 1 experimento feito em triplicata.

Uma vez observado que nas linhagens celulares a pirimetamina inibe a transcrição da luciferase dependente de STAT3, mas sem efeito inibitório na atividade de STAT3 nas DCs, os próximos passos foram avaliar a atuação da droga diretamente nas células dos pacientes com LLC, tratados *in vitro* e *in vivo* com a pirimetamina. O tratamento *in vitro* das DCs derivadas de monócitos de pacientes com LLC com pirimetamina (10 μ g/mL) não alterou a expressão das moléculas de superfície avaliadas HLA-DR, CD11c, CD80, CD86, CD83 e CD40 (Figura 22). Da mesma forma, a expressão destas moléculas nas iDCs e mDCs de pacientes do ensaio clínico tratados com pirimetamina não foi alterada (Figura 23 A e B).

Em adição, observou-se que o tratamento das DCs, tanto de pacientes quanto dos controles, com pirimetamina não altera sua capacidade de induzir proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (Figura 24A e B).

Figura 22 - Tratamento *in vitro* com pirimetamina não altera o fenótipo das DCs derivadas de monócitos de pacientes com LLC. iDCs de pacientes com LLC tratadas com a pirimetamina, durante 1 hora, e estimuladas com LPS por 24 horas foram analisadas quanto a expressão das moléculas de superfície indicadas, por citometria de fluxo. Os *doublets* foram excluídos da análise e as DCs foram definidas como CD14⁺HLA-DR⁺. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de três experimentos independentes. Py: pirimetamina.

Figura 23 - Tratamento *in vivo* com pirimetamina não altera o fenótipo das DCs derivadas de monócitos de pacientes com LLC. DCs foram diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico coletado de pacientes com LLC em ensaio clínico com pirimetamina. (A, B) DCs imaturas e maduras (estimuladas com LPS por 24 horas) foram analisadas para a expressão das moléculas de superfície indicadas, por citometria de fluxo. Os *doublets* foram excluídos da análise e as DCs foram definidas como CD14⁺HLA-DR⁺. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de quatro (controles) e dois (pacientes) experimentos independentes. Py: pirimetamina.

Figura 24 - Pirimetamina não altera a capacidade das DCs de pacientes com LLC e de doadores saudáveis de induzir proliferação de linfócitos T CD3⁺ alogênicos. Co-cultura de DCs com linfócitos T CD3⁺ alogênicos, isolados por seleção magnética, foi acessada para comparar a capacidade imunoestimuladora das mDCs de pacientes com LLC às mDCs de doadores saudáveis, tratadas ou não com pirimetamina (Py). As mDCs foram co-cultivadas com linfócitos T CD3⁺ previamente marcados com Cell Trace Violet por cinco dias. **(A)** *Plots* representando a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e **(B)** de linfócitos CD8⁺, mensurada pela diluição de CellTrace, acessado por citometria de fluxo. Os números nos *plots* representam a frequência de células que não entraram em divisão (à direita) e a frequência das células que proliferaram mais intensamente (à esquerda). Dados representativos de três experimentos independentes realizados em duplicata ou triplicata. DS, doadores saudáveis. LLC, leucemia linfóide crônica.

4.6 JQ1 na modulação de células dendríticas

Dados anteriores mostraram que o inibidor de bromodomínios JQ1 reduz a função de STAT5 através da inibição da proteína BRD2 em células de linfoma e células leucêmicas (LIU et al., 2014). Para compreender o papel de STAT5 no processo de maturação de DCs humanas e determinar o potencial deste fator de transcrição como um alvo terapêutico, utilizou-se JQ1 como modulador farmacológico de STAT5 em células hemopoéticas. Primeiramente, foi investigado se JQ1 também poderia inibir a atividade de STAT5 em DCs estimuladas com LPS. Observou-se que o estímulo promovido pelo LPS aumentou proeminentemente a ativação da fosforilação da tirosina de STAT5 nas DCs. Já o tratamento com JQ1 suprimiu este efeito, sem ter alterado significativamente a expressão protéica de

STAT5 (Figura 25A). JQ1 reduziu a razão entre STAT5 fosforilado e STAT5 total (pSTAT5/STAT5) nas DCs maturadas com LPS para níveis semelhantes àqueles observados nas DCs imaturas (Figura 25B). Uma vez que LPS induz ativação não apenas de STAT5 mas também de STAT1 e STAT3 (HU et al., 2012; YAMAOKA et al., 1998), foi avaliado se JQ1 estaria afetando estes outros membros da família STAT. A razão entre pSTAT1/STAT1 e pSTAT3/STAT3 não foi alterada pelo tratamento com JQ1 quando comparada às mDCs tratadas apenas com veículo, indicando que a inibição de bromodomínios BET por JQ1 seletivamente reduz a ativação de STAT5 sem influenciar a ativação de outras STATs (Figura 25B).

Sabe-se que, após a fosforilação da tirosina, as STATs translocam do citoplasma para o núcleo. Então, o próximo passo foi avaliar se a inibição da fosforilação de STAT5 causada pela JQ1 refletiria na diminuição da localização nuclear de STAT5. Para tal, isolou-se a fração nuclear de mDCs que foram previamente tratadas com JQ1 ou com veículo. Como controle positivo, as células também foram tratadas com inibidor de Jak I (Jaki), o qual bloqueia completamente a atividade das Jak quinases e consequentemente inibe a sinalização via STATs. Nas DCs, o acúmulo nuclear tanto de STAT5 total como da sua forma fosforilada foram aumentados após o estímulo do LPS. Entretanto, o tratamento das DCs com JQ1 reduziu a localização nuclear de STAT5 total e fosforilado (Figura 25C). Estes dados reforçam que JQ1 inibe a ativação de STAT5 e, portanto, diminui a sua localização nuclear, o que resultaria na inibição da sua atividade transcricional.

Em seguida, avaliou-se o efeito de JQ1 na atividade transcricional de STAT5 nas mDCs, através da análise da expressão do mRNA dos genes alvos de STAT5, tais como Cish, SOCS2, SOCS3, Bcl-x e Bcl-6 (Figura 25D e E). Consistente com a indução da fosforilação de STAT5, o estímulo do LPS levou ao aumento da expressão de SOCS2, SOCS3 e Bcl-x nas mDCs. Contudo, o tratamento com JQ1 inibiu este efeito, e os níveis de expressão destes genes alvo foram equivalentes àqueles expressos pelas iDCs. Por outro lado, Bcl-6, o qual é inibido por STAT5, teve sua expressão diminuída após o estímulo com LPS e o tratamento com JQ1 tendeu a reverter este efeito (Figura 25D e E). Com relação a expressão de Cish, embora a maturação das DCs induzidas por LPS não tenha levado ao aumento dos níveis de mRNA de Cish, JQ1 foi capaz de reprimir a expressão deste gene quando comparado com as mDCs controles. Além disso, foi observado através da análise por imunoprecipitação de cromatina (ChIP) que a maturação das DCs estava

associada com o aumento da ligação de STAT5 à região reguladora de *CisH* e *SOCS2*. Este recrutamento de STAT5 foi reduzido após o tratamento das DCs com JQ1 (Figura 25F). Desta forma, estes resultados mostram que JQ1 inibe diretamente a ligação de STAT5 à região reguladora de seus genes alvo e, então, diminui a atividade transcricional dependente deste fator de transcrição.

Já foi demonstrado que a ativação de STAT5 induzida por LPS ocorre de maneira indireta, através da produção de GM-CSF (YAMAOKA et al., 1998). Consistente com este mecanismo, não foi possível detectar STAT5 fosforilado imediatamente (15 min) após o estímulo do LPS, conforme observado após o tratamento com citocinas (dados não mostrados), mas a fosforilação de STAT5 foi observada 24h após o estímulo com LPS (Figura 25A). Este perfil de fosforilação de STAT5 tardia levantou a possibilidade de que JQ1 estaria inibindo STAT5 por reprimir a sinalização via GM-CSF. Afim de verificar esta hipótese, primeiramente, avaliou-se a expressão de GM-CSF e do seu receptor específico (*CSF2RA*, subunidade alfa) nas mDCs tratadas com JQ1 ou com veículo. Observou-se que JQ1 bloqueou a indução da expressão de GM-CSF e do seu receptor causada pelo estímulo do LPS (Figura 25G). Em seguida, para determinar o mecanismo responsável por este efeito, analisou-se a região reguladora de *CSF2RA* onde foi identificado um forte potencial sítio de ligação de STAT. Então, foi realizado ChIP para verificar se STAT5 poderia ligar-se à este sítio durante a maturação das DCs. Observou-se que STAT5 foi recrutado para este sítio de ligação na região promotora de *CSF2RA* após a adição do LPS, fenômeno este inibido pelo tratamento com JQ1 (Figura 25H). Estes dados revelam *CSF2RA* como um novo gene alvo de STAT5 nas DCs.

Juntos, estes resultados mostram que JQ1 seletivamente inibe a fosforilação de tirosina de STAT5 e diminui sua translocação nuclear, resultando em baixa indução transcricional de seus genes alvo. Além disso, esta diminuição na atividade de STAT5, causada pelo tratamento com JQ1 nas DCs, está associada com a inibição da expressão de GM-CSF e de seu receptor.

Figura 25 - JQ1 inibe a atividade funcional de STAT5 nas DCs. DCs imaturas (iDCs) foram tratadas com JQ1 ou com veículo por 1 h e estimuladas com LPS por 24 h. **(A)** Os lisados das DCs tratadas conforme descrito acima foram analisados por *immunoblotting* para STAT5 total ou fosforilado. **(B)** A intensidade das bandas, dos lisados das DCs avaliados por *immunoblotting*, para cada STAT foi quantificada e está representada como a razão entre STAT fosforilado e STAT total (pSTAT/STAT). **(C)** Os extrato nucleares das DCs tratadas como descrito acima foram analisados por *immunoblotting* para STAT5. O inibidor de Jak (Jaki) foi utilizado como controle positivo da inibição de STAT. PARP e actina foram usados como marcadores de núcleo e citoplasma, respectivamente. **(D)** O RNA das iDCs (sem LPS) e mDCs (com LPS) pré-tratadas com JQ1 ou com veículo foi analisado por PCR quantitativa (qPCR) para a expressão dos genes alvo de STAT5. A expressão do mRNA foi normalizada pela expressão do controle endógeno 18S rRNA (RNA ribossomal 18S). O aumento relativo foi determinado dividindo-se a expressão em cada amostra pelo valor expresso pelas mDCs. **(E)** A expressão dos genes alvo de STAT5, analisada por qPCR, foi comparada entre as mDCs tratadas e não tratadas com JQ1 e está apresentada como *plots* individuais, representando cinco doadores diferentes. **(F)** A ligação de STAT5 no DNA dos sítios indicados foi analisada por ChIP-qPCR. Os resultados expressos foram analisados com relação a ligação numa região de controle negativo (onde não há ligação de STAT5) no gene da rodopsina. **(G)** A expressão do mRNA de GM-CSF e do seu receptor (CSF2RA) foi analisada por qPCR relativa ao controle endógeno 18S rRNA. **(H)** A ligação de STAT5 na região reguladora de CSF2RA foi analisada por ChIP-qPCR. Os dados de ChIP mostrados representam dois doadores independentes, e os demais dados são representativos de 3 ou 5 experimentos independentes. Dados mostrados como média $\pm$ SEM. * $p < 0.05$.

Embora dados da literatura tenham mostrado que STAT5 é requerido para a diferenciação *in vitro* de DCs, há também indícios de que este fator de transcrição seja importante para a maturação destas células (JACKSON et al., 2004; MIAH et al., 2012). Desta forma, sendo JQ1 inibidor de STAT5 nas DCs, avaliou-se o efeito desta droga na expressão dos marcadores de superfície durante a maturação das DCs. As iDCs foram tratadas com JQ1 por 1 h e estimuladas com LPS por 24 h, quando foram analisadas por citometria de fluxo. O aumento da expressão do marcador de ativação CD83 e das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, que ocorre nas DCs estimuladas com LPS, foi intensamente atenuado pelo tratamento com JQ1 (mais de 50% de redução para CD80 e CD83 e cerca de 35% para CD86) (Figura 26A). Enquanto isso, as moléculas CD14, CD11c, HLA-DR e CD40 não foram alteradas (Figura 26B). A curva dose-resposta mostrou que a inibição da expressão das moléculas CD80, CD86 e CD83 foi dose-dependente e que não houve mudança significativa na inibição das outras moléculas avaliadas, com nenhuma das doses testadas (Figura 26B). A expressão inalterada das moléculas indica que as células permanecem com características de DCs mielóides, mantêm a capacidade de apresentação de antígenos (sinal 1, baseado na expressão de HLA-DR) e a habilidade para responder aos sinais de maturação dependente de CD40. É importante ressaltar que a viabilidade celular, mensurada através do ensaio luminescente com CellTiter-Glo, não foi alterada pela JQ1 em nenhuma das doses testadas (0,125 μ M, 0,25 μ M e 0,5 μ M) (Figura 26F). Estes resultados mostram que JQ1 prejudica a capacidade de maturação das DCs, embora não cause um bloqueio completo da maturação.

A reduzida indução de CD83, CD80 e CD86 após o tratamento com JQ1 levantou a hipótese de que esta droga bloqueia a maturação das DCs por inibir diretamente a interação de STAT5 com as sequências reguladoras genômicas destes genes. Para avaliar isto, primeiramente, foi identificado um potencial sítio de ligação de STAT5 na região reguladora de CD83 e utilizou-se um sítio de ligação na região reguladora de CD80 previamente descrito (ZHANG et al., 2014). É interessante notar que não foram identificados sítios de ligação de STAT5 na região reguladora proximal de CD86, levantando a questão de que STAT5 poderia regular CD86 através de um locus *enhancer* distante. Como próximo passo, fez-se ChIP para determinar a ligação relativa de STAT5 nas regiões reguladoras de CD83 e CD80. Enquanto a adição de LPS aumentou a ligação de STAT5 nas regiões

reguladores de ambos CD83 e CD80, o pré-tratamento com JQ1 inibiu o recrutamento de STAT5, consistente com a redução de STAT5 fosforilado e a sua translocação nuclear observada após o tratamento com JQ1 (Figura 26C).

Estes dados demonstram que JQ1 especificamente inibe a expressão de CD83 e CD80 e previne o recrutamento de STAT5 para suas regiões reguladoras. Isto representa um significativo mecanismo pelo qual o tratamento com JQ1 pode prejudicar a maturação das DCs.

Ainda, para avaliar melhor o efeito da JQ1 no fenótipo das DCs, foi analisado se JQ1 poderia interferir com a produção de citocinas anti (IL-10 e TGF- β) e pró-inflamatórias (IL-12 e TNF). Como esperado, as iDCs expressaram menos mRNA de IL-12 e TNF, mas expressaram mais IL-10 e TGF- β comparadas às mDCs (Figura 26D). JQ1 bloqueou o aumento de IL-12 e a diminuição de TGF- β que ocorre com a maturação induzida pelo LPS (Figura 26D). Vale a pena destacar que não houve alteração na expressão de IL-12 e TGF- β nas iDCs tratadas com JQ1 (Figura 26D). Além disso, diferentemente da IL-12, o aumento na expressão de TNF após a maturação com LPS não foi alterado pela JQ1. O tratamento com JQ1 reduziu a expressão de IL-10 tanto na iDC quanto na mDC. Esta redução foi de magnitude similar (aproximadamente 50%) para iDC e mDC tratadas com JQ1 comparadas às respectivas células tratadas apenas com veículo (Figura 26D). Consistente com estes achados, observou-se que a secreção de IL-12p70 e IL-10 pelas mDCs tratadas com JQ1 foi significativamente reduzida quando comparadas às mDCs controles. Por outro lado, a quantidade de TNF mensurada no sobrenadante das DCs não foi modificada pela JQ1 (Figura 26E). Estes dados confirmam que a JQ1 está prevenindo a maturação das DCs e, desta forma, mantendo-as em um estado imaturo.

Figura 26 - JQ1 inibe a maturação das DCs. (A) No quinto dia da cultura de diferenciação de DCs, as iDCs pré-tratadas com JQ1 por 1 hora foram maturadas com LPS e, 24 h depois, mDCs foram analisadas para a expressão dos marcadores de superfícies por citometria de fluxo. Os *doublets* foram excluídos da análise e as DCs foram definidas como CD14⁻HLA-DR⁺. A intensidade mediana de fluorescência (MFI) das moléculas de superfície das DCs está apresentada em histogramas representativos de sete experimentos independentes. As curvas brancas representam a autofluorescência das células controle (não marcadas com anticorpo). (B) Curva dose-resposta da JQ1 na expressão das moléculas CD80, CD86 e CD83, analisadas por citometria de fluxo. A MFI está apresentada relativa à MFI das mDCs. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de sete experimentos independentes. (C) A ligação de STAT5 ao DNA dos sítios indicados foi analisada por ChIP-qPCR. Os resultados foram expressos relativos a ligação numa região de controle negativo (onde não há ligação de STAT5) no gene da rodopsina. (D) A expressão do mRNA das citocinas das DCs tratadas conforme descrito em (A) foi analisada por qPCR. A expressão do mRNA foi normalizada pelo 18S rRNA, e o aumento relativo foi determinado dividindo-se a expressão em cada amostra pelo valor expresso pelas mDCs. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de seis experimentos independentes. (E) As citocinas produzidas no sobrenadante das mDCs tratadas com JQ1 ou com veículo foi mensurada por ELISA. Cada *plot* individual representa um doador diferente. (F) O número de células viáveis foi mensurado através do ensaio bioluminescente dependente de ATP. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de cinco experimentos independentes * p <0.05, ** p <0.0001.

Uma vez que JQ1 pode inibir o efeito de outros fatores de transcrição dependentes de proteínas contendo bromodomínios, o próximo passo foi testar se o efeito da JQ1 na maturação das DCs era dependente do seu efeito sobre STAT5. Dado que a JQ1 reprime a expressão de GM-CSF nas mDCs, considerou-se que a adição de GM-CSF exógeno pudesse aumentar a atividade de STAT5 nas DCs tratadas com JQ1 e, consequentemente, facilitar a maturação destas células. As

DCs foram pré-tratadas com JQ1, estimuladas com LPS na presença de GM-CSF recobinante humano e avaliadas quanto a expressão de CD80, CD86 e CD83. A adição de GM-CSF não foi capaz de aumentar a expressão destas moléculas nas mDCs, o que sugere que a reduzida expressão do receptor de GM-CSF restringe funcionalmente esta via (Figura 27A).

Para acessar diretamente o papel de STAT5 na maturação das DCs, estas células foram transduzidas com um vetor lentiviral codificando apenas eGFP ou eGFP e uma forma constitutivamente ativa de STAT5 (caSTAT5). A caSTAT5 mutante tem atividade transcricional constitutiva e pode sobrepor o efeito inibitório de JQ1 (LIU et al., 2014). Após a transdução, as DCs foram tratadas com JQ1 e a maturação induzida com LPS. Para confirmar a atividade funcional de caSTAT5, foi avaliada a expressão dos genes alvo de STAT5, GM-CSF e CSF2RA, os quais foram proeminentemente induzidos (Figura 27B). Em seguida, foi investigada a expressão de CD80, CD86 e CD83 nas DCs transduzidas com caSTAT5, considerando-se na análise apenas a subpopulação de células que era eGFP⁺CD14⁻HLA-DR⁺. Mesmo na presença de JQ1, caSTAT5 aumentou significativamente a expressão de CD86 e CD83 (embora não a de CD80) quando comparado com as DCs transduzidas com vetor vazio (Figura 27C). Além disso, os níveis de IL-12 foram aumentados nas DCs transduzidas com caSTAT5 na presença de JQ1, enquanto que o TGF- β permaneceu sem alterações (Figura 27D). Em adição, a expressão de caSTAT5 resultou no aumento da regulação dos seus genes alvos, *CisH* e *Bcl-x*, os quais foram previamente mostrados por serem inibidos por JQ1 (Figura 27E). Estes resultados mostram que o efeito de JQ1 em inibir a maturação das DCs é dependente, ao menos em parte, do seu efeito sobre STAT5.

Figura 27 - O efeito da JQ1 na maturação das DCs é dependente de STAT5. (A) As iDCs foram tratadas com JQ1 por 1 h e maturadas com LPS na presença de GM-CSF recombinante humano. No sexto dia da cultura de diferenciação, as DCs foram analisadas por citometria de fluxo para a expressão de CD80, CD86 e CD83. A população de DCs foi definida como CD14⁻HLA-DR⁺, após a exclusão dos *doublets*. A MFI está apresentada relativa à MFI das mDCs. Dados mostrados como média ± SEM de três experimentos independentes. (B, C, D, E) iDCs foram transduzidas com lentivirus expressando caSTAT5 (STAT5 constitutivamente ativo) ou vetor vazio por 150 min. O meio de cultura foi trocado e as células foram tratadas com JQ1 ou DMSO por 1 h, sendo, em seguida, estimuladas com LPS. (B) A expressão do mRNA de GM-CSF e CSF2RA foi analisada 24 h após a maturação com LPS, por qPCR (normalizada pelo 18S rRNA). (C) Para análise das moléculas de superfície das DCs, após a transdução lentiviral e o tratamento com JQ1, a população de DCs foi definida como CD14⁻HLA-DR⁺, dentro da população que era eGFP⁺, as quais estão expressando caSTAT5 (painel acima). A expressão de CD80, CD86 e CD83 foi acessada por citometria de fluxo (painel abaixo). Dados apresentados para 5 doadores diferentes. (D) O mRNA para IL-12 e TGF-β foi quantificado nas mDCs tratadas com JQ1 após a transdução com caSTAT5 ou vetor vazio. Dados de dois experimentos independentes são mostrados. D1, doador 1; D2, doador 2. (E) Análise da expressão do mRNA dos genes alvos de STAT5 expressos pelas mDCs tratadas com JQ1 após a transdução com caSTAT5 ou vetor vazio. Dados mostrados como média ± SEM de dois experimentos independentes. * $p < 0.05$.

Tendo mostrado que JQ1 inibiu a expressão de citocinas e marcadores de superfície associados com a maturação das DCs, testou-se o papel fisiológico desta inibição na função da DC. Para tanto, avaliou-se a habilidade das mDCs tratadas com JQ1 em induzir uma resposta de linfócitos T alogênicos, *in vitro*. As mDCs

tratadas com JQ1 induziram menos proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ quando comparadas com a induzida pelas mDCs tratadas com veículo (Figura 28). Tais resultados mostram que as DCs tratadas com JQ1 possuem uma menor capacidade em estimular a proliferação de células T, o que vai de acordo com a sua comprometida capacidade de maturação.

Figura 28 - DCs tratadas com JQ1 causam diminuição da proliferação de linfócitos T alogênicos. A proliferação de linfócitos T CD3⁺ alogênicos, isolados por seleção magnética, foi acessada para determinar a capacidade imunoestimuladora das DCs maturadas com LPS na presença ou na ausência de JQ1. As mDCs tratadas com JQ1 ou com veículo foram co-cultivadas com linfócitos T CD3⁺ previamente marcados com Cell Trace Violet por cinco dias. *Plots* representam a proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, mensura pela diluição de Cell Trace, acessado por citometria de fluxo (painel à direita). Os números nos *plots* representam a frequência de células que não entraram em divisão (à direita) e a frequência das células que proliferaram mais intensamente (à esquerda). O índice de divisão dos linfócitos T CD4⁺ (acima) e CD8⁺ (abaixo) foi calculado com o *software* FlowJo 8.7 (painel à esquerda). Dados mostrados como média $\pm$ SEM de oito experimentos independentes. * $p < 0.05$.

Para explorar o padrão da resposta mediada pelos linfócitos T que esta sendo induzido pelas mDCs tratadas com JQ1, foi, primeiramente, avaliado o padrão de citocinas produzidas no sobrenadante das co-culturas. Os linfócitos T alogênicos estimulados com as mDCs tratadas com JQ1 produziram menos citocinas inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF do que os linfócitos cultivados com as mDCs não tratadas. Além disso, não houve alteração significativa na produção de IL-10 (Figura 29A). Também foi avaliado se as mDCs tratadas com JQ1 alteram a polarização dos linfócitos T CD4⁺ por meio da determinação da porcentagem de

células produtoras de IFN- γ e TNF (resposta Th1) ou IL-4 (resposta Th2) e IL-10, por marcação intracelular de citocinas. Houve uma menor porcentagem de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ e TNF quando estimulados pelas mDCs tratadas com JQ1 em comparação com as mDCs não tratadas (Figura 29B). Por outro lado, a JQ1 não alterou a capacidade das mDCs de induzir linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-4 e IL-10 (Figura 29B). Em adição, o tratamento com JQ1 também prejudicou a capacidade das mDCs de estimular linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ e TNF (Figura 29B). Além disso, mDCs tratadas com JQ1 não modificaram a indução/expansão de células T reguladoras (CD4⁺CD127^{Low}CD25⁺FOXP3⁺) (Figura 29C). Estes dados indicam que DCs tratadas com JQ1 induzem menos polarização Th1 enquanto matêm sua habilidade de induzir linfócitos Th2 e Tregs.

Figura 29 - Linfócitos T estimulados pelas DCs tratadas com JQ1 produzem menos citocinas pró-inflamatórias e seletivamente inibem a polarização Th1. Concentração de citocinas no sobrenadante das co-culturas de linfócitos T CD3⁺ com mDCs, mensurada por ELISA. **(B)** Linfócitos T CD3⁺ co-cultivados com DCs maturadas na presença ou na ausência de JQ1, foram analisados por marcação intracelular de citocinas em células T CD4⁺ ou CD8⁺. *Plots* acima mostram as células T CD8⁺ produtoras de TNF e IFN γ . *Plots* do meio mostram a porcentagem de TNF e IFN γ (tipo Th1) produzidos pelas células T CD4⁺. *Plots* abaixo mostram a porcentagem de IL-10 e IL-4 (tipo Th2) produzidos pelas células T CD4⁺. A representação gráfica da frequência de células CD8⁺ TNF⁺, CD8⁺ IFN γ ⁺, CD4⁺ TNF⁺, CD4⁺ IFN γ ⁺, CD4⁺ IL-4⁺, CD4⁺ IL-10⁺, estão apresentadas à direita. Dados mostrados como média $\pm$ SEM de cinco experimentos independentes realizados em duplicata. **(C)** iDCs ou mDCs pré-tratadas com JQ1 ou veículo foram co-cultivadas com linfócitos T CD3⁺ e os linfócitos T CD4⁺ foram avaliados para a indução/expansão de Tregs. As Tregs foram definidas como células CD4⁺CD127^{Low}CD25⁺FOXP3⁺. *Plots* são representativos de cinco experimentos independentes. * $p < 0.05$.

Por fim, para confirmar se o efeito da JQ1 nas DCs era causalmente relacionado com a inibição de STAT5, as DCs foram tratadas com Jaki e maturadas com LPS. O fenótipo e a função destas células foram analisados, respectivamente, através da expressão de seus marcadores de superfície e sua habilidade de estimular a proliferação de linfócitos T. Da mesma forma que as DCs tratadas com JQ1, o aumento da expressão das moléculas CD80, CD86 e CD83 foi inibido pelo tratamento com Jaki, enquanto que a expressão de CD11c e HLA-DR não foram significativamente alteradas (Figura 30A). Interessantemente, a expressão de CD40 também foi reduzida pelo tratamento com Jaki, enquanto JQ1 não modulou esta molécula de maneira significativa (Figura 30A). Isto pode refletir o efeito da Jaki em uma via de sinalização independente de STAT5. Assim como JQ1, o tratamento das DCs com Jaki induziu menos proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ quando comparadas às DCs não tratadas (Figura 30B). Tais resultados mostram que a inibição específica de STAT5 pela JQ1 foi comparável à inibição de STATs pela Jaki, indicando que STAT5 possui um papel importante em manter o fenótipo e função das DCs como eficientes células apresentadoras de antígenos.

Figura 30 - A inibição de Jak nas DCs gera um fenótipo similar à inibição seletiva de STAT5 por JQ1. (A) As iDCs pré-tratadas com Jaki foram maturadas com LPS e analisadas para a expressão das moléculas de superfície indicadas, por citometria de fluxo. *Doublets* foram excluídos da análise e as DCs foram definidas como CD14⁻HLA-DR⁺. Os gráficos em barras mostram a intensidade mediana de fluorescência (MFI) dos marcadores das DCs. Dados mostrados como média ± SEM de seis experimentos independentes. (B) mDCs tratadas com Jaki ou com veículo foram co-cultivadas com linfócitos T CD3⁺ alógenos previamente marcados com Cell Trace Violet, por cinco dias. A proliferação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foi mensurada pela diluição de Cell Trace, acessado por citometria de fluxo (painel à direita). Os números nos *plots* representam a frequência de células que não entraram em divisão (à direita) e a frequência das células que proliferaram mais intensamente (à esquerda). O índice de divisão dos linfócitos T CD4⁺ (acima) e CD8⁺ (abaixo) foi calculado com o *software* FlowJo 8.7 (painel à esquerda). Dados mostrados como média ± SEM de oito experimentos independentes. **p*<0.05, ***p*<0.0001, #*p*<0.05.

5 DISCUSSÃO

O comprometimento funcional das células dendríticas (DCs) é um dos meios utilizados pelos tumores para escapar do controle da resposta imune (CIRONE et al., 2008; ORSINI et al., 2004). Embora estas alterações funcionais sejam bastante descritas, os mecanismos responsáveis por elas são pouco conhecidos. Sabe-se que a diferenciação e maturação das DCs, e muito da própria condução da resposta imune, dependem de citocinas, cuja sinalização envolve a via de STAT e suas proteínas reguladoras SOCS. Desta forma, este trabalho procurou investigar o papel destas moléculas nas DCs derivadas de monócitos de pacientes com LLC e as consequências da sua inibição durante a maturação funcional das DCs de doadores saudáveis. Observamos que as células dos pacientes com LLC tem defeitos fenotípico-funcionais consequentes de uma reduzida da atividade de STAT6 e da expressão de SOCS5 nos seus monócitos precursores, enquanto que STAT5 mostrou-se importante para a maturação das DCs de doadores saudáveis.

Os monócitos dos pacientes com LLC foram incapazes de se diferenciarem completamente em DCs, gerando células defeituosas que permanecem com características imaturas. Já foi demonstrado que as DCs derivadas de pacientes com câncer são menos sensíveis aos agentes que induzema sua maturação do que as DCs obtidas de doadores saudáveis (PEDERSEN et al., 2005). Neste trabalho, foi observado que o estímulo por LPS não foi suficiente para induzir, nas DCs dos pacientes, um aumento na expressão das moléculas co-estimuladoras, de HLA-DR, e do marcador de ativação CD83, em níveis comparáveis aos doadores saudáveis, fenômeno que, associado à liberação de citocinas pró-inflamatórias, é necessário para maturação fenotípica e funcional das DCs (BANCHEREAU et al., 2000; CAUX et al., 1994). As células dos pacientes com LLC também não foram capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-12, em níveis equivalentes aos dos doadores saudáveis. No entanto, produziram fatores imunossupressores como a IL-10 e o TGF- β . Este perfil pode explicar a reduzida atividade aloestimuladora das DCs derivadas de pacientes e o padrão de resposta anti-inflamatória gerado pelos linfócitos T efetores, observado pela baixa produção de IFN- γ e TNF. Na verdade, as DCs dos pacientes induziram menor proliferação de linfócitos T CD4⁺ produtores tanto de IFN- γ e TNF quanto de IL-4. Já a proliferação de linfócitos T CD8⁺ não foi comprometida, mas a frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ foi intensamente reduzida. Isto indica que as alterações fenotípicas das DCs dos pacientes com LLC, assim como a baixa produção de IL-12, afetam a geração de

células Th1, Th2 e de linfócitos T CD8⁺ inflamatórios. Estes achados confirmaram alguns dados já descritos para LLC, mostrando que as DCs de pacientes com doença ativa têm reduzida expressão de moléculas co-estimuladoras e menor capacidade aloestimuladora, defeitos os quais são restaurados nas DCs de pacientes em remissão (ORSINI et al., 2004).

Além do perfil fenotípico imunossupressor das DCs dos pacientes com LLC, foi observado que estas células induzem maior frequência de linfócitos Tregs (CD4⁺CD127^{low}CD25^{hi}FOXP3⁺), assim como também já foi encontrado em outros tipos de câncer (RAMOS et al., 2012). Estes achados corroboram e podem explicar os dados mostrando que há maior frequência de células Tregs na circulação periférica de pacientes com LLC, a qual é correlacionada com o estágio clínico de doença mais avançada (D'ARENA et al., 2011). Além disso, observamos que as células Tregs induzidas/expandidas pelas DCs de pacientes expressaram mais LAP e CTLA-4 do que as células T CD4⁺ totais. No entanto, as Tregs induzidas pelas DCs de pacientes expressaram níveis significativamente menores de LAP e CTLA-4 do que as Tregs induzidas pelas DCs dos controles. Isto sugere um mecanismo de escape dos tumores, indicando que apesar das células Tregs dos pacientes não parecerem tão poderosas na sua atividade imunossupressora, baseada na expressão de LAP e CTLA-4, elas também não terão atividade de linfócitos T efetores. Assim, o câncer poderia estar desviando as células T efetoras para a condição de Tregs, numa tentativa de escapar da resposta imune.

A maturação das DCs de pacientes geradas *in vitro* é um parâmetro crítico no que diz respeito a indução de resposta imune efetiva contra o câncer, sendo uma das maiores dificuldades a indução da produção de IL-12 por estas células. Há muitos estudos que, ainda, investigam a melhor forma de ativar as DCs de pacientes com câncer (HANSEN et al., 2013; HONG et al., 2012; LIM et al., 2012). No entanto, não há registros mostrando se as DCs derivadas de LLC expressam os receptores dos agonistas de ativação, tais como TNF, IL-6, PGE2, IL-1 β e LPS. Observou-se, neste estudo, uma reduzida expressão de TLR4 e MD2 em DCs imaturas dos pacientes com LLC, o que explica a incapacidade de maturação destas células quando estimuladas por LPS. Além disso, outros TLRs também foram menos expressos nas DCs dos pacientes. A expressão dos receptores das citocinas presentes no coquetel de ativação usado para as DCs maturarem (TNF, IL-6, PGE2, IL-1 β) (JONULEIT et al., 1997) também foram investigados nas DCs imaturas,

encontrando-se uma reduzida expressão dos receptores de TNF, IL-6 e IL-1 β . Para o TNF, observou-se uma significativa redução da expressão do receptor tipo 1 (TNFR1 ou CD120a) pelas DCs imaturas dos pacientes, mas não do receptor tipo 2 (TNFR2 ou CD120b). TNFR1 é o receptor de alta afinidade para TNF e, ao menos em modelo murino, foi demonstrado que TNFR1 é quem medeia a estimulação do TNF para maturação das DCs e a consequente resposta de linfócitos T CD8⁺ (DING et al., 2011). Já os receptores de PGE2 (EP2 e EP4) não foram diferentemente expressos em pacientes e controles. O estímulo da PGE2 associado ao do TNF atuam sinergicamente na indução da produção de altos níveis de IL-12 pelas DCs (RIESER et al., 1997). No entanto, apenas a presença de PGE2 pode causar um efeito imunossupressor, por ser o requerimento mínimo necessário para redirecionar o desenvolvimento das DCs em células supressoras mielóides, MDSCs (do inglês, *myeloid-derived suppressor cells*) (OBERMAJER et al., 2011). Interessantemente, o receptor de IL-6 teve expressão reduzida nas DCs imaturas dos pacientes com LLC. A inibição deste receptor parece não interferir com a maturação das DCs (BETTS et al., 2011). De maneira geral, o balanço entre a expressão dos receptores de ativação das DCs sugere uma maior atividade dos receptores de PGE2. Este mediador lipídico, além de ser um dos fatores liberados pelo tumor, está envolvido em muitos processos biológicos e representa um elemento chave na regulação do sistema imune (LEGLER et al., 2010). Dependendo do contexto e do microambiente, PGE2 pode promover ou suprimir a resposta imune (LEGLER et al., 2010; MUTHUSWAMY et al., 2008; MUTHUSWAMY et al., 2010).

Os defeitos fenotípico-funcionais das DCs derivadas de monócitos de pacientes com câncer continuam sendo intensamente explorados (HASEBE et al., 2000; ORSINI et al., 2013). No entanto, apesar das especulações de que alterações nos monócitos dos pacientes com câncer estariam comprometendo a diferenciação das DCs, o mecanismo responsável por estas alterações ainda é desconhecido. Assim, neste estudo, foi avaliado se os monócitos de pacientes com LLC possuem defeitos que impedem a sua diferenciação em DCs. Fenotipicamente, não foram observadas diferenças entre monócitos de pacientes e doadores saudáveis, quanto a expressão de HLA-DR, de moléculas co-estimuladoras e de CD83. No entanto, quando avaliada a sinalização de IL-4, uma das citocinas importantes para a diferenciação dos monócitos em DCs, encontrou-se algumas alterações. A expressão do IL-4R foi muito mais elevada nos monócitos dos pacientes. Contudo, a

sinalização deste receptor foi diminuída, uma vez que a fosforilação da tirosina de STAT6 apresentou-se reduzida, assim como sua atividade transcricional, baseada na expressão dos genes alvo de STAT6, incluindo Cdk6 e CD45 (genes frequentemente alterados no tumor), Tnfsf10 (relacionado à apoptose) e Stat1 e Trim22 (envolvidos na resposta imune). Já foi demonstrado que DCs murinas geradas na ausência de STAT6 não respondem à IL-4 e permanecem imaturas, pela incapacidade de responderem aos estímulos de maturação (LUTZ et al., 2002). Ainda, em humanos, foi demonstrado que durante a diferenciação de DCs, a exposição dos monócitos a IFN- γ resulta em DCs imaturas com fenótipo de células tolerogênicas, devido a inibição da fosforilação de STAT6 (ROJAS-CANALES et al., 2011). Estes dados da literatura suportam nossos achados mostrando que a sinalização desregulada de STAT6, durante a diferenciação dos monócitos dos pacientes com LLC em DCs, pode gerar células defeituosas, incapazes de responderem aos estímulos de maturação, conferindo-as, então, um perfil tolerogênico.

Em adição à alteração na via de sinalização de STAT6 encontrada nos monócitos dos pacientes, foi observado que a expressão de SOCS5, um regulador negativo de STAT6 (SEKI et al., 2002), foi muito mais abundante nestas células. Assim, a elevada expressão de SOCS5 poderia estar inibindo a atividade de STAT6 nos monócitos dos pacientes com LLC. SOCS5 liga-se ao IL-4R, impedindo a interação entre Jak1 e IL-4R e, conseqüentemente, inibindo a sinalização deste receptor (SEKI et al., 2002). Interessantemente, a expressão de SOCS5 foi a única, dentre SOCS1, SOCS2 e SOCS3, que variou durante a diferenciação e maturação das DCs. Enquanto que nos monócitos dos pacientes os níveis de SOCS5 apresentaram-se significativamente mais elevado, esta expressão foi reduzida nas DCs. Já a expressão das outras SOCS não mudou dos monócitos para as DCs imaturas e maduras, em ambos pacientes e controles, apesar da expressão nos pacientes ter sido sempre menor do que nos controles. Estes dados vão contra aqueles publicados mostrando que as fases de diferenciação e maturação das DCs são acompanhadas pelo aumento da expressão de SOCS1, SOCS2 e SOCS3 (JACKSON et al., 2004; POSSELT et al., 2011). Nossos achados também indicam que SOCS5, e não as outras SOCS, estaria interferindo com a diferenciação das DCs.

Diferentemente da reduzida sinalização da via de STAT6, a fosforilação da tirosina de STAT3 foi aumentada nos monócitos dos pacientes com LLC. Isto ocorre, provavelmente, em decorrência da sua exposição aos fatores solúveis liberados pelo tumor, que induzem a ativação da via de sinalização de STAT3, como IL-10 e IL-6. Pacientes com LLC possuem níveis séricos elevados de IL-10 e IL-6, mostrados por serem produzidos pelas células leucêmicas (FAYAD et al., 2001; GARAUD et al., 2011; ORSINI et al., 2003), o que suporta nossos achados para alta fosforilação de STAT3. Por sua vez, foi observado que ativação da via de STAT3, induzida tanto por IL-10 quanto por IL-6, levou ao aumento da expressão do IL-4R em monócitos de doadores saudáveis, o que suporta o achado de que IL-4R é um gene alvo de STAT3 (MAUER et al., 2014). Além disso, IL-10 foi capaz de aumentar tardiamente a expressão de SOCS5 e inibir a fosforilação de STAT6. O efeito imunossupressor da IL-10 foi comprovado pelo fenótipo defeituoso das DCs diferenciadas na presença desta citocina. Este fenótipo alterado foi muito semelhante ao observado nas DCs diferenciadas a partir de monócitos dos pacientes com LLC. Já a presença de IL-6, a qual não foi capaz de induzir aumento de SOCS5, também não alterou o fenótipo das DCs. Juntos, nossos resultados sugerem que a presença crônica de IL-10 no soro dos pacientes com LLC faz com que os monócitos fiquem mais sensíveis a estímulos que induzam a fosforilação de STAT3 (Figura 31). Os elevados níveis de STAT3 nos monócitos levam a aumentada expressão de IL-4R. Porém, uma vez que a exposição crônica à IL-10 também causa o aumento de SOCS5 nos monócitos, a sinalização de IL-4R é bloqueada, através da inibição da fosforilação de STAT6 por SOCS5. Uma vez inibida a sinalização de IL-4R, que é necessária para a diferenciação das DCs, estas células não se diferenciam em DCs maduras funcionalmente competentes (Figura 31).

Figura 31 - O fenótipo defeituoso das DCs de pacientes com LLC está associado com o aumento de SOCS5 causado pela IL-10 liberada pelos tumores. Nos doadores saudáveis (DS), a adição de IL-4 para a diferenciação de monócitos em DCs ativa a via de sinalização de STAT6, que é regulada por SOCS5, e a presença de LPS induz a maturação das DCs. Diferentemente, a presença de IL-10 circulante produzido pelos tumores aumenta a fosforilação de STAT3 nos monócitos dos pacientes com LLC, resultando na super-expressão do receptor de IL-4 (IL-4R). No entanto, a fosforilação de STAT6 está diminuída, devido a elevada expressão de SOCS5, a qual também pode ser resultante da exposição crônica à IL-10. Essa desregulação implica na inibição da maturação fenotípica induzida por LPS nas DCs dos pacientes com LLC.

Foi demonstrado, neste estudo, que o possível mecanismo pelo qual a diferenciação das DCs de pacientes com LLC está prejudicada envolve a via de sinalização de STAT3. Sabe-se que a ativação de STAT3 pelo tumor leva a produção de fatores imunossupressores (como IL-10) cuja sinalização converge na ativação de STAT3 pelas DCs condicionadas ao tumor, formando um ciclo de retroalimentação entre células tumorais e DCs (YU; KORTYLEWSKI; PARDOLL, 2007). Por intermediar esta comunicação, STAT3 é um alvo promissor para terapia do câncer e já foi mostrado que a inibição de STAT3 melhora a função das DCs na leucemia mielóide aguda (BRADY et al., 2013). Neste estudo, utilizou-se a droga inibidora de STAT3 pirimetamina (TAKAKURA et al., 2011), a qual encontra-se em ensaio clínico em pacientes com LLC no instituto de câncer Dana-Farber da Harvard Medical School, para investigar se esta droga é capaz de melhorar a função das

DCs destes pacientes, além de inibir o crescimento tumoral. A princípio, observou-se que o tratamento de DCs de doadores saudáveis com pirimetamina induz um aumento na produção de IL-12 comparando-se com as DCs não tratadas. Também houve uma tendência ao aumento da expressão das moléculas HLA-DR, CD86 e CD40, pelas DCs tratadas. Contudo, o tratamento com a droga não inibiu STAT3 nem alterou a expressão das SOCS. Funcionalmente, o tratamento das DCs com pirimetamina também não alterou a indução da proliferação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. O efeito da pirimetamina nas DCs dos doadores saudáveis foi sutil, no sentido de melhorar a imunogenicidade destas células. Levando-se em conta que as DCs de doadores saudáveis não tem as mesmas alterações que as dos pacientes, seria possível que o efeito da pirimetamina fosse mais marcante nas DCs dos pacientes. No entanto, não foram observadas mudanças quanto a expressão das moléculas de superfície e nem na indução de proliferação de linfócitos T pelas DCs dos pacientes com LLC tratadas *in vitro* ou mesmo nas DCs diferenciadas de pacientes em ensaio clínico com a pirimetamina. Foi demonstrado, em modelo murino, e também em humanos, que a inibição de STAT3 em DCs é capaz de induzir resistência aos fatores supressores liberados pelo tumor e melhorar a resposta imune anti-tumoral (IWATA-KAJIHARA et al., 2011). Em contrapartida, outro grupo de pesquisa mostrou que a inibição apenas de STAT3 afeta, principalmente, o efeito supressor de IL-6, e que a inibição combinada de STAT3 e p38 MAK é mais eficaz em superar as alterações das DCs mediadas pelos fatores supressores do tumor (OOSTERHOFF et al., 2012). Portanto, também seria possível que o efeito da pirimetamina nas DCs dos pacientes fosse mais expressivo se combinado com outros inibidores, uma vez que não só IL-6 mas também IL-10 pode ser liberada na LLC e afetar as DCs. Ainda, o fato da pirimetamina inibir STAT3 nas células tumorais, mas não nas DCs, mostra que esta droga é eficaz contra a progressão do tumor sem afetar as DCs. A vantagem disso é que a pirimetamina não causa imunossupressão como efeito colateral, diferente de muitas drogas que encontram-se em ensaio clínico (SCHMITZ et al., 2012).

Além de STAT3, outro alvo terapêutico contra o câncer é o fator de transcrição STAT5, o qual também é constitutivamente ativado e oncogênico em vários tipos de tumores (BRITSCHGI et al., 2012; LIN; MAHAJAN; FRANK, 2000). Além disso, STAT5 em conjunto com STAT6, é importante para a diferenciação de monócitos em DCs, pois medeia a sinalização do receptor de GM-CSF. Neste

trabalho, nos propomos avaliar se a droga inibidora da atividade de STAT5 nas células tumorais, JQ1 (um inibidor de bromodomínios BET) (LIU et al., 2014; OTT et al., 2012), também afeta as DCs. Observamos que a JQ1 possui efeito imunomodulador sobre DCs, por inibir a ativação de STAT5. A presença de JQ1 durante a maturação das DCs induzida por LPS leva a uma redução dose-dependente da expressão de CD80, CD86 e CD83. Em adição, DCs tratadas com JQ1 exibem reduzida produção de IL-12p70 e IL-10, mas não de TNF. Estes efeitos da JQ1 nas DCs dependem da sua inibição em STAT5, uma vez que a introdução de uma forma constitutivamente ativa de STAT5 pode reverter os efeitos desta droga. A co-cultura de DCs tratadas com JQ1 com linfócitos T alogênicos resulta em diminuída produção de IFN- γ e TNF enquanto IL-10 e IL-4 não são alteradas. Ainda, a habilidade das DCs tratadas com JQ1 de induzir a resposta de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ é menor do que a das DCs controles.

A relevância precisa de STAT5 para a maturação das DCs ainda é incerta. Desde que STAT5 é um mediador do efeito biológico de GM-CSF, relatos prévios têm focado mais no estudo do papel deste fator de transcrição durante a diferenciação em iDCs (COHEN et al., 2008; JACKSON et al., 2004; LEHTONEN et al., 2002; MIAH et al., 2012), em vez de durante sua maturação. STAT5 é constantemente ativado durante a maturação de DCs murinas em células apresentadoras de antígenos imunogênicas, sugerindo seu envolvimento neste processo (JACKSON et al., 2004; MIAH et al., 2012). Neste estudo, utilizou-se JQ1 como um potencial inibidor, clinicamente relevante, da função de STAT5, para investigar seu papel nas DCs humanas, diferenciadas na presença de GM-CSF e IL-4 e maturadas com LPS. A JQ1 foi capaz de inibir a fosforilação e a subsequente translocação nuclear de STAT5 inibindo, então, a transcrição de seus genes alvo, incluindo *CisH*, *SOCS2* e *Bcl-x*. Confirmando o papel de JQ1 na alteração da regulação destes genes por STAT5, encontrou-se uma diminuída ligação de STAT5 na região reguladora de *CisH* e *SOCS2*. *CisH*, um gene alvo específico de STAT5 (LEHTONEN et al., 2002; MIAH et al., 2012), pode direcionar a diferenciação de DCs murinas em células imunogênicas através de STAT5 ativado por GM-CSF (MIAH et al., 2012). Da mesma forma, *SOCS2*, uma molécula reguladora que faz parte da mesma família de *CisH*, parece ser essencial para a maturação de DC induzida por LPS (HU et al., 2009). Estes dados suportam nossos achados em que a regulação negativa de *CisH* e *SOCS2* mediada pela inibição de STAT5 por JQ1 poderia

explicar a inibição da maturação das DCs. Ainda, a inibição de STAT5 pela JQ1 está associada com a capacidade desta droga em prevenir a sinalização de GM-CSF, a qual é crucial para ativação de STAT5 induzida por LPS (YAMAOKA et al., 1998). Encontramos que a JQ1 bloqueia a indução da expressão de GM-CSF e do seu receptor (CSF2RA) pelo LPS. Além disso, STAT5 liga-se ao promotor do CSF2RA, sugerindo-o como um novo gene alvo de STAT5 que é diretamente reprimido pelo tratamento com JQ1.

O efeito de JQ1 na função das mDCs pode ser devido a inibição da expressão de suas importantes moléculas de superfície. O aumento de CD80 e CD86 foi bloqueado pela JQ1 nas mDCs. Isto resulta num defeituoso sinal de co-estimulação, o segundo sinal clássico necessário para ativação de linfócitos T naive (ODOJIL; MILLER, 2009). Achados semelhantes foram demonstrados em camundongos *knockout* para STAT5 especificamente nas células CD11c⁺, as quais mostraram alterada expressão de CD80 e CD86 e inibição da resposta Th2 após estímulo com linfopoetina estromal tímica (TSLP) (BELL et al., 2013; TORMO; GAUCHAT, 2013). Além do mais, mDCs tratadas com JQ1 apresentaram reduzida expressão de CD83, um importante marcador de maturação descrito como essencial na indução de proliferação de linfócitos T e na produção de IFN- γ (AERTS-TOEGAERT et al., 2007; PINHO et al., 2014). É interessante notar que JQ1 inibiu diretamente o recrutamento de STAT5 para a região reguladora de CD83, indicando que esta molécula é um potencial gene alvo de STAT5. Contribuindo para a atividade imunoestimuladora defeituosa das DCs tratadas com JQ1, a produção de IL-12 por estas células foi marcadamente reduzida quando comparada às DCs controles, enquanto que a expressão do TGF- β foi mantida em níveis comparados àqueles das iDCs. Curiosamente, TNF não foi afetado pelo tratamento com JQ1. Estas características das mDCs tratadas com JQ1 fortemente sugerem que esta droga está mantendo as DCs em um estado imaturo mesmo após o estímulo do LPS.

Devido a reduzida expressão de CSF2RA nas mDCs tratadas com JQ1, a adição de GM-CSF exógeno simultaneamente com LPS foi incapaz de induzir ativação de STAT5 ou de aumentar a expressão de CD80, CD86 e CD83 nestas células. No entanto, a introdução de caSTAT5 restaurou a expressão de ambos GM-CSF e de seu receptor. Foi possível notar que, quando atividade de STAT5 foi restaurada, o fenótipo alterado das DCs tratadas com JQ1 foi revertido, pelo menos parcialmente, conforme demonstrado pelo aumento da expressão de CD86 e CD83

e aumento dos níveis de IL-12, confirmando, então, o importante papel de STAT5 na ativação das DCs induzida por LPS. Embora STAT5 regule diretamente a transcrição de CD80, é possível que STAT5 possa cooperar com outros fatores de transcrição dependentes de proteínas contendo bromodomínios, os quais são inibidos pela JQ1.

Como esperado a partir de seu fenótipo de superfície celular e ao padrão de citocinas secretadas, as mDCs tratadas com JQ1 possuem uma comprometida capacidade de induzir a proliferação de linfócitos T. Na verdade, tanto os linfócitos T CD4 quando os T CD8 estimulados pelas mDCs tratadas com JQ1 produziram pequenas quantidades de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF. Isto vai de acordo com a também diminuída produção de IL-12 pelas mDCs tratadas com JQ1, uma vez que a IL-12 é importante para induzir células com perfil de reposta Th1 (IFN- γ ⁺TNF⁺). Além disso, estas células não afetaram a geração de células com perfil de reposta Th2 (IL-4⁺) ou a indução e expansão de células Tregs (CD4⁺CD127^{low}CD25⁺FOXP3⁺). Estes resultados vão de acordo com o efeito direto da JQ1 sobre os linfócitos T, em que JQ1 não interfere com a diferenciação de células Th2 ou Tregs humanas ou murinas a partir de linfócitos T CD4⁺ naives (MELE et al., 2013). Desta forma, mDCs tratadas com JQ1 podem inibir a diferenciação de linfócitos Th1 (resposta inflamatória) mas não a diferenciação de outros subtipos de linfócitos T.

Além de suas propriedades anti-tumorais, JQ1 já foi relatada com o potencial de inibir a resposta imune inata por inibir macrófagos murinos (BELKINA; NIKOLAJCZYK; DENIS, 2013; WIENERROITHER et al., 2014). Neste trabalho, mostramos que JQ1 pode também afetar profundamente a iniciação de uma resposta imune adaptativa por reduzir a co-estimulação (sinal 2) e a produção de citocinas pró-inflamatórias (sinal 3) em DCs estimuladas por LPS (Figura 32). Além disso, nossos dados suportam um significativo papel para CSF2RA na fosforilação de STAT5 durante a maturação de DCs humanas e indica que este fator de transcrição é o provável alvo de JQ1 (Figura 32), embora o envolvimento de outros fatores de transcrição não possa ser completamente descartado.

Figura 32 - JQ1 inibe a maturação das DCs. O estímulo com LPS induz a maturação das DCs aumentando a expressão de MHC, das moléculas co-estimuladoras, e de CD83, o que induz um aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, assim estimulando efetivamente a resposta das células T. JQ1 inibe este processo de maturação, por prevenir o aumento da expressão de CD80, CD86 e CD83 e por bloquear a secreção de IL-12, resultando na reduzida indução de células T pró-inflamatórias. O efeito inibitório da JQ1 está associado com a diminuição da sinalização do receptor de GM-CSF, o qual, consequentemente, inibe a fosforilação de STAT5, sua translocação nuclear e a transcrição de seus genes alvo, incluindo CisH, Bcl-x, CD83 e CSF2RA.

Juntos nossos resultados mostraram que o balanço entre os fatores de transcrição STATs e seus reguladores SOCS são importantes na modulação funcional das DCs, ora durante sua fase de diferenciação, ora durante sua fase de maturação. Sendo assim, a desregulação entre STAT6 e SOCS5, observada pelo bloqueio da atividade de STAT6 mediante a elevada expressão de SOCS5, nos monócitos dos pacientes com câncer, indicam que este seria o possível mecanismo responsável pela incapacidade dos monócitos se diferenciarem e maturarem em DCs fenotípico e funcionalmente competentes. Isto sugere que SOCS5 pode ser um potencial alvo para o desenho de novas imunoterapias no tratamento do câncer. Já a inibição de STAT5 pela droga JQ1, sugere que este fator de transcrição tem um papel importante durante a maturação das DCs induzida por LPS. Por outro lado, diferentemente da pirimetamina, JQ1 não parece ser uma boa alternativa para

tratamento do câncer, no sentido de que esta droga pode causar imunossupressão, podendo ser um importante alvo para o tratamento de doenças inflamatórias mediadas por células T.

6 CONCLUSÕES

- Células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com LLC possuem características de células imaturas, devido a baixa expressão dos marcadores de superfície, menor produção de citocinas pró-inflamatórias e reduzida atividade aloestimuladora;
- O estímulo do LPS não é capaz de maturar as células dendríticas de pacientes com LLC em níveis comparáveis aos doadores saudáveis, devido a reduzida expressão de TLR4 e MD2, assim como de outros TLRs e dos receptores de outros agonistas de ativação (TNF, IL-6 e IL-1 β);
- Os monócitos dos pacientes com LLC possuem alterações na via de sinalização do receptor de IL-4, vistas pela redução da atividade transcricional e da fosforilação de STAT6 e aumento da expressão do seu inibidor SOCS5;
- O efeito do inibidor de STAT3, pirimetamina, nas DCs dos doadores saudáveis foi sutil, no sentido de melhorar a imunogenicidade destas células;
- A pirimetamina não modificou a ativação de STAT3 e consequentemente não inferiu no perfil tolerogênico das DCs dos doadores saudáveis;
- O tratamento das DCs de pacientes com LLC com a pirimetamina não modificou seu fenótipo e a sua função, de maneira a não superar os defeitos encontrados nestas células mas também não piorá-los;
- JQ1 bloqueia a ativação de STAT5 induzida por LPS e inibe a maturação fenotípico-funcional das DCs de doadores saudáveis, conferindo-as um perfil tolerogênico, mostrando que STAT5 é importante para a maturação das DCs induzida por LPS.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

- ADEMA, G. J. et al. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature*, v. 387, n. 6634, p. 713-717, 1997.
- AERTS-TOEGAERT, C. et al. CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur. J. Immunol.*, v. 37, n. 3, p. 686-695, 2007.
- ALLEN, J. C. et al. c-Abl regulates Mcl-1 gene expression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, v. 117, n. 8, p. 2414-2422, 2011.
- ALMAND, B. et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin. Cancer Res.*, v. 6, n. 5, p. 1755-1766, 2000.
- BALEEIRO, R. B. et al. High frequency of immature dendritic cells and altered in situ production of interleukin-4 and tumor necrosis factor-alpha in lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, v. 57, n. 9, p. 1335-1345, 2008.
- BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 18, p. 767-811, 2000.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, v. 392, n. 6673, p. 245-252, 1998.
- BARASH, I. Stat5 in breast cancer: potential oncogenic activity coincides with positive prognosis for the disease. *Carcinogenesis*, v. 33, n. 12, p. 2320-2325, 2012.
- BARBUTO, J. A. Are dysfunctional monocyte-derived dendritic cells in cancer an explanation for cancer vaccine failures? *Immunotherapy*, v. 5, n. 2, p. 105-107, 2013.
- BAUS, D. et al. STAT6 and STAT1 are essential antagonistic regulators of cell survival in classical Hodgkin lymphoma cell line. *Leukemia*, v. 23, n. 10, p. 1885-1893, 2009.
- BELKINA, A. C. et al. BET protein function is required for inflammation: Brd2 genetic disruption and BET inhibitor JQ1 impair mouse macrophage inflammatory responses. *J. Immunol.*, v. 190, n. 7, p. 3670-3678, 2013.
- BELL, B. D. et al. The transcription factor STAT5 is critical in dendritic cells for the development of TH2 but not TH1 responses. *Nat. Immunol.*, v. 14, n. 4, p. 364-371, 2013.
- BELLONE, G. et al. Cooperative induction of a tolerogenic dendritic cell phenotype by cytokines secreted by pancreatic carcinoma cells. *J. Immunol.*, v. 177, n. 5, p. 3448-3460, 2006.
- BETTS, B. C. et al. Anti-IL6-receptor-alpha (tocilizumab) does not inhibit human monocyte-derived dendritic cell maturation or alloreactive T-cell responses. *Blood*, v. 118, n. 19, p. 5340-5343, 2011.

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

- BRADY, M. T. et al. Down-regulation of signal transducer and activator of transcription 3 improves human acute myeloid leukemia-derived dendritic cell function. *Leuk. Res.*, v. 37, n. 7, p. 822-828, 2013.
- BRITSCHGI, A. et al. JAK2/STAT5 inhibition circumvents resistance to PI3K/mTOR blockade: a rationale for cotargeting these pathways in metastatic breast cancer. *Cancer Cell*, v. 22, n. 6, p. 796-811, 2012.
- BROMBERG, J.; DARNELL, J. E., JR. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*, v. 19, n. 21, p. 2468-2473, 2000.
- CAUX, C. et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.*, v. 180, n. 4, p. 1263-1272, 1994.
- CHAUDHRY, A.; RUDENSKY, A. Y. Control of inflammation by integration of environmental cues by regulatory T cells. *J. Clin. Invest.*, v. 123, n. 3, p. 939-944, 2013.
- CHONG, M. M. et al. Suppressor of cytokine signaling-1 is a critical regulator of interleukin-7-dependent CD8⁺ T cell differentiation. *Immunity*, v. 18, n. 4, p. 475-487, 2003.
- CIRONE, M. et al. Suppression of dendritic cell differentiation through cytokines released by Primary Effusion Lymphoma cells. *Immunol. Lett.*, v. 120, n. 1-2, p. 37-41, 2008.
- COHEN, P. A. et al. STAT3- and STAT5-dependent pathways competitively regulate the pan-differentiation of CD34^{pos} cells into tumor-competent dendritic cells. *Blood*, v. 112, n. 5, p. 1832-1843, 2008.
- D'ARENA, G. et al. Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease. *Leuk. Res.*, v. 35, n. 3, p. 363-368, 2011.
- DARNELL, J. E., JR. Studies of IFN-induced transcriptional activation uncover the Jak-Stat pathway. *J. Interferon Cytokine Res.*, v. 18, n. 8, p. 549-554, 1998.
- DEARDEN, C. Disease-specific complications of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, p. 450-456, 2008.
- DELLA BELLA, S. et al. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br. J. Cancer*, v. 89, n. 8, p. 1463-1472, 2003.
- DELMORE, J. E. et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*, v. 146, n. 6, p. 904-917, 2011.
- DIETRICH, S. et al. Leflunomide induces apoptosis in fludarabine-resistant and clinically refractory CLL cells. *Clin. Cancer Res.*, v. 18, n. 2, p. 417-431, 2012.

- DIMITRIOU, I. D. et al. Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins. *Immunol. Rev.*, v. 224, p. 265-283, 2008.
- DING, X. et al. TNF receptor 1 mediates dendritic cell maturation and CD8 T cell response through two distinct mechanisms. *J. Immunol.*, v. 187, n. 3, p. 1184-1191, 2011.
- DZIOŃEK, A. et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.*, v. 165, n. 11, p. 6037-6046, 2000.
- ESASHI, E. et al. The signal transducer STAT5 inhibits plasmacytoid dendritic cell development by suppressing transcription factor IRF8. *Immunity*, v. 28, n. 4, p. 509-520, 2008.
- FAYAD, L. et al. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood*, v. 97, n. 1, p. 256-263, 2001.
- FILIPPAKOPOULOS, P. et al. Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*, v. 468, n. 7327, p. 1067-1073, 2010.
- FRANK, D. A. StAT signaling in cancer: insights into pathogenesis and treatment strategies. *Cancer Treat. Res.*, v. 115, p. 267-291, 2003.
- FRANK, D. A. STAT3 as a central mediator of neoplastic cellular transformation. *Cancer Lett.*, v. 251, n. 2, p. 199-210, 2007.
- GABRILOVICH, D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 4, n. 12, p. 941-952, 2004.
- GARAUD, S. et al. CD5 promotes IL-10 production in chronic lymphocytic leukemia B cells through STAT3 and NFAT2 activation. *J. Immunol.*, v. 186, n. 8, p. 4835-4844, 2011.
- GESBERT, F.; GRIFFIN, J. D. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood*, v. 96, n. 6, p. 2269-2276, 2000.
- GIANNOPOULOS, K. et al. Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Oncol. Rep.*, v. 20, n. 3, p. 677-682, 2008.
- GINALDI, L. et al. Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *J. Clin. Pathol.*, v. 51, n. 5, p. 364-369, 1998.
- GOTTFRIED, E. et al. Tumor-induced modulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev.*, v. 19, n. 1, p. 65-77, 2008.
- GUERMONPREZ, P. et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 20, p. 621-667, 2002.

- HALLEK, M. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, v. 111, n. 12, p. 5446-5456, 2008.
- HANADA, T. et al. Induction of hyper Th1 cell-type immune responses by dendritic cells lacking the suppressor of cytokine signaling-1 gene. *J. Immunol.*, v. 174, n. 7, p. 4325-4332, 2005.
- HANADA, T. et al. Suppressor of cytokine signaling-1 is essential for suppressing dendritic cell activation and systemic autoimmunity. *Immunity*, v. 19, n. 3, p. 437-450, 2003.
- HANSEN, M. et al. Comparison of clinical grade type 1 polarized and standard matured dendritic cells for cancer immunotherapy. *Vaccine*, v. 31, n. 4, p. 639-646, 2013.
- HANSEN, M. et al. Cellular based cancer vaccines: type 1 polarization of dendritic cells. *Curr. Med. Chem.*, v. 19, n. 25, p. 4239-4246, 2012.
- HASEBE, H. et al. Dysfunctional regulation of the development of monocyte-derived dendritic cells in cancer patients. *Biomed. Pharmacother.*, v. 54, n. 6, p. 291-298, 2000.
- HAZAN-HALEVY, I. et al. STAT3 is constitutively phosphorylated on serine 727 residues, binds DNA, and activates transcription in CLL cells. *Blood*, v. 115, n. 14, p. 2852-2863, 2010.
- HEINRICH, P. C. et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.*, v. 374, n. Pt 1, p. 1-20, 2003.
- HERBER, D. L. et al. Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Nat. Med.*, v. 16, n. 8, p. 880-886, 2010.
- HOELBL, A. et al. Clarifying the role of Stat5 in lymphoid development and Abelson-induced transformation. *Blood*, v. 107, n. 12, p. 4898-4906, 2006.
- HONG, B. et al. A super TLR agonist to improve efficacy of dendritic cell vaccine in induction of anti-HCV immunity. *PLoS One*, v. 7, n. 11, p. e48614, 2012.
- HONG, B. et al. Human suppressor of cytokine signaling 1 controls immunostimulatory activity of monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Res.*, v. 69, n. 20, p. 8076-8084, 2009.
- HU, J. et al. LPS regulates SOCS2 transcription in a type I interferon dependent autocrine-paracrine loop. *PLoS One*, v. 7, n. 1, p. e30166, 2012.
- HU, J. et al. SOCS2 influences LPS induced human monocyte-derived dendritic cell maturation. *PLoS One*, v. 4, n. 9, p. e7178, 2009.
- HU, Y. et al. Regulation of STAT pathways and IRF1 during human dendritic cell maturation by TNF-alpha and PGE2. *J. Leukoc. Biol.*, v. 84, n. 5, p. 1353-1360, 2008.

HUS, I. et al. Vaccination of B-CLL patients with autologous dendritic cells can change the frequency of leukemia antigen-specific CD8⁺ T cells as well as CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells toward an antileukemia response. *Leukemia*, v. 22, n. 5, p. 1007-1017, 2008.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.*, v. 5, n. 10, p. 987-995, 2004.

IWATA-KAJIHARA, T. et al. Enhanced cancer immunotherapy using STAT3-depleted dendritic cells with high Th1-inducing ability and resistance to cancer cell-derived inhibitory factors. *J. Immunol.*, v. 187, n. 1, p. 27-36, 2011.

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

JONULEIT, H. et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.*, v. 27, n. 12, p. 3135-3142, 1997.

KALINSKI, P. et al. Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood*, v. 97, n. 11, p. 3466-3469, 2001.

KAMURA, T. et al. VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev.*, v. 18, n. 24, p. 3055-3065, 2004.

KIM, K. T. et al. Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. *Blood*, v. 105, n. 4, p. 1759-1767, 2005.

KLECHEVSKY, E. et al. Functional specializations of human epidermal Langerhans cells and CD14⁺ dermal dendritic cells. *Immunity*, v. 29, n. 3, p. 497-510, 2008.

KOBAYASHI, T.; YOSHIMURA, A. Keeping DCs awake by putting SOCS1 to sleep. *Trends Immunol.*, v. 26, n. 4, p. 177-179, 2005.

LAKE, R. A.; ROBINSON, B. W. Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership. *Nat. Rev. Cancer*, v. 5, n. 5, p. 397-405, 2005.

LEGLER, D. F. et al. Prostaglandin E2 at new glance: novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 42, n. 2, p. 198-201, 2010.

LEHTONEN, A. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-induced STAT5 activation and target-gene expression during human monocyte/macrophage differentiation. *J. Leukoc. Biol.*, v. 71, n. 3, p. 511-519, 2002.

- LI, H. S. et al. The signal transducers STAT5 and STAT3 control expression of Id2 and E2-2 during dendritic cell development. *Blood*, v. 120, n. 22, p. 4363-4373, 2012.
- LI, Y. et al. Dendritic cells transduced with SOCS-3 exhibit a tolerogenic/DC2 phenotype that directs type 2 Th cell differentiation in vitro and in vivo. *J. Immunol.*, v. 177, n. 3, p. 1679-1688, 2006.
- LIM, S. N. et al. Combined TLR stimulation with Pam3Cys and Poly I: C enhances Flt3-ligand dendritic cell activation for tumor immunotherapy. *J. Immunother.*, v. 35, n. 9, p. 670-679, 2012.
- LIN, T. S. et al. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene*, v. 19, n. 21, p. 2496-2504, 2000.
- LINET, M. S. et al. Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. *Br. J. Haematol.*, v. 139, n. 5, p. 672-686, 2007.
- LIU, S. et al. Targeting STAT5 in Hematological Malignancies through Inhibition of the Bromodomain and Extra-Terminal (BET) Bromodomain Protein BRD2. *Mol. Cancer Ther.*, 2014.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LUTZ, M. B. et al. Differential functions of IL-4 receptor types I and II for dendritic cell maturation and IL-12 production and their dependency on GM-CSF. *J. Immunol.*, v. 169, n. 7, p. 3574-3580, 2002.
- LYNCH, R. A. et al. A small-molecule enhancer of signal transducer and activator of transcription 1 transcriptional activity accentuates the antiproliferative effects of IFN-gamma in human cancer cells. *Cancer Res.*, v. 67, n. 3, p. 1254-1261, 2007.
- MACAGNO, A. et al. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends Immunol.*, v. 28, n. 5, p. 227-233, 2007.
- MANDRUZZATO, S. et al. A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J. Exp. Med.*, v. 186, n. 5, p. 785-793, 1997.
- MATSUMOTO, A. et al. CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood*, v. 89, n. 9, p. 3148-3154, 1997.
- MATSUMURA, Y. et al. Selective expansion of foxp3-positive regulatory T cells and immunosuppression by suppressors of cytokine signaling 3-deficient dendritic cells. *J. Immunol.*, v. 179, n. 4, p. 2170-2179, 2007.

- MAUER, J. et al. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat. Immunol.*, v. 15, n. 5, p. 423-430, 2014.
- MAURO, F. R. et al. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood*, v. 94, n. 2, p. 448-454, 1999.
- MELE, D. A. et al. BET bromodomain inhibition suppresses TH17-mediated pathology. *J. Exp. Med.*, v. 210, n. 11, p. 2181-2190, 2013.
- MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, v. 106, n. 3, p. 255-258, 2001.
- MIAH, M. A. et al. CISH is induced during DC development and regulates DC-mediated CTL activation. *Eur. J. Immunol.*, v. 42, n. 1, p. 58-68, 2012.
- MICHIELSEN, A. J. et al. Tumour tissue microenvironment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer. *PLoS One*, v. 6, n. 11, p. e27944, 2011.
- MOHAMADZADEH, M.; LUFTIG, R. Dendritic cells: In the forefront of immunopathogenesis and vaccine development - A review. *J. Immune Based Ther. Vaccines*, v. 2, n. 1, p. 1, 2004.
- MOREL, S. et al. Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity*, v. 12, n. 1, p. 107-117, 2000.
- MUTHUSWAMY, R. et al. PGE(2) transiently enhances DC expression of CCR7 but inhibits the ability of DCs to produce CCL19 and attract naive T cells. *Blood*, v. 116, n. 9, p. 1454-1459, 2010.
- MUTHUSWAMY, R. et al. Ability of mature dendritic cells to interact with regulatory T cells is imprinted during maturation. *Cancer Res.*, v. 68, n. 14, p. 5972-5978, 2008.
- NEFEDOVA, Y.; GABRILOVICH, D. I. Targeting of Jak/STAT pathway in antigen presenting cells in cancer. *Curr. Cancer Drug Targets*, v. 7, n. 1, p. 71-77, 2007.
- NELSON, E. A. et al. Nifuroxazide inhibits survival of multiple myeloma cells by directly inhibiting STAT3. *Blood*, v. 112, n. 13, p. 5095-5102, 2008.
- NELSON, E. A. et al. Identification of human STAT5-dependent gene regulatory elements based on interspecies homology. *J. Biol. Chem.*, v. 281, n. 36, p. 26216-26224, 2006.
- NELSON, E. A. et al. The STAT5 inhibitor pimozide decreases survival of chronic myelogenous leukemia cells resistant to kinase inhibitors. *Blood*, v. 117, n. 12, p. 3421-3429, 2011.

NEVES, A. R. et al. Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. *Cancer Immunol. Immunother.*, v. 54, n. 1, p. 61-66, 2005.

OBERMAJER, N. et al. Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. *Blood*, v. 118, n. 20, p. 5498-5505, 2011.

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

ORSINI, E. et al. The circulating dendritic cell compartment in patients with chronic lymphocytic leukemia is severely defective and unable to stimulate an effective T-cell response. *Cancer Res.*, v. 63, n. 15, p. 4497-4506, 2003.

ORSINI, E. et al. Phenotypic and functional characterization of monocyte-derived dendritic cells in chronic lymphocytic leukaemia patients: influence of neoplastic CD19 cells in vivo and in vitro. *Br. J. Haematol.*, v. 125, n. 6, p. 720-728, 2004.

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

OTT, C. J. et al. BET bromodomain inhibition targets both c-Myc and IL7R in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, v. 120, n. 14, p. 2843-2852, 2012.

PARDOLL, D.; DRAKE, C. Immunotherapy earns its spot in the ranks of cancer therapy. *J. Exp. Med.*, v. 209, n. 2, p. 201-209, 2012.

PEDERSEN, A. E. et al. 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.

PIESCHE, M. et al. Identification of a promiscuous HLA DR-restricted T-cell epitope derived from the inhibitor of apoptosis protein survivin. *Hum. Immunol.*, v. 68, n. 7, p. 572-576, 2007.

PINHO, M. P. et al. Dendritic cell membrane CD83 enhances immune responses by boosting intracellular calcium release in T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.*, v. 95, n. 5, p. 755-762, 2014.

PODOJIL, J. R.; MILLER, S. D. Molecular mechanisms of T-cell receptor and costimulatory molecule ligation/blockade in autoimmune disease therapy. *Immunol. Rev.*, v. 229, n. 1, p. 337-355, 2009.

- POSSELT, G. et al. Suppressor of cytokine signaling 2 is a feedback inhibitor of TLR-induced activation in human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.*, v. 187, n. 6, p. 2875-2884, 2011.
- RAMOS, R. N. et al. Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J. Leukoc. Biol.*, v. 92, n. 3, p. 673-682, 2012.
- RIESER, C. et al. Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *J. Exp. Med.*, v. 186, n. 9, p. 1603-1608, 1997.
- ROJAS-CANALES, D. et al. Early exposure of interferon-gamma inhibits signal transducer and activator of transcription-6 signalling and nuclear factor kappaB activation in a short-term monocyte-derived dendritic cell culture promoting 'FAST' regulatory dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 167, n. 3, p. 447-458, 2011.
- SALLUSTO, F. et al. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur. J. Immunol.*, v. 29, n. 5, p. 1617-1625, 1999.
- SCANDELLA, E. et al. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, v. 100, n. 4, p. 1354-1361, 2002.
- SCARLETT, U. K. et al. Ovarian cancer progression is controlled by phenotypic changes in dendritic cells. *J. Exp. Med.*, v. 209, n. 3, p. 495-506, 2012.
- SCHMITZ, N. et al. Conventional chemotherapy (CHOEP-14) with rituximab or high-dose chemotherapy (MegaCHOEP) with rituximab for young, high-risk patients with aggressive B-cell lymphoma: an open-label, randomised, phase 3 trial (DSHNHL 2002-1). *Lancet Oncol.*, v. 13, n. 12, p. 1250-1259, 2012.
- SEGURA, E. et al. Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. *Immunity*, v. 38, n. 2, p. 336-348, 2013.
- SEKI, Y. et al. Expression of the suppressor of cytokine signaling-5 (SOCS5) negatively regulates IL-4-dependent STAT6 activation and Th2 differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 99, n. 20, p. 13003-13008, 2002.
- SHEN, L. et al. Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. *Nat. Biotechnol.*, v. 22, n. 12, p. 1546-1553, 2004.
- STEINMAN, R. M. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathol. Biol.*, v. 51, n. 2, p. 59-60, 2003.
- STEINMAN, R. M.; BANCHEREAU, J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, v. 449, n. 7161, p. 419-426, 2007.
- SUMIMOTO, H. et al. The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J. Exp. Med.*, v. 203, n. 7, p. 1651-1656, 2006.

- TAKAKURA, A. et al. Pyrimethamine inhibits adult polycystic kidney disease by modulating STAT signaling pathways. *Hum. Mol. Genet.*, v. 20, n. 21, p. 4143-4154, 2011.
- TOPALIAN, S. L. et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.*, v. 366, n. 26, p. 2443-2454, 2012.
- TORMO, A. J.; GAUCHAT, J. F. A novel role for STAT5 in DC: Controlling the Th2-response. *JAKSTAT*, v. 2, n. 4, p. e25352, 2013.
- TREFZER, U. et al. Tumour-dendritic hybrid cell vaccination for the treatment of patients with malignant melanoma: immunological effects and clinical results. *Vaccine*, v. 23, n. 17-18, p. 2367-2373, 2005.
- VAFAlZADEH, V. et al. Mammary epithelial reconstitution with gene-modified stem cells assigns roles to Stat5 in luminal alveolar cell fate decisions, differentiation, involution, and mammary tumor formation. *Stem Cells*, v. 28, n. 5, p. 928-938, 2010.
- VAN DER POUW KRAAN, T. C. et al. Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *J. Exp. Med.*, v. 181, n. 2, p. 775-779, 1995.
- WAGNER, B. J. et al. The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promoter. *EMBO J.*, v. 9, n. 13, p. 4477-4484, 1990.
- WALKER, S. R. et al. STAT5 represses BCL6 expression by binding to a regulatory region frequently mutated in lymphomas. *Oncogene*, v. 26, n. 2, p. 224-233, 2007.
- WALZ, C. et al. Essential role for Stat5a/b in myeloproliferative neoplasms induced by BCR-ABL1 and JAK2(V617F) in mice. *Blood*, v. 119, n. 15, p. 3550-3560, 2012.
- WANG, S. et al. Optimizing immunotherapy in multiple myeloma: Restoring the function of patients' monocyte-derived dendritic cells by inhibiting p38 or activating MEK/ERK MAPK and neutralizing interleukin-6 in progenitor cells. *Blood*, v. 108, n. 13, p. 4071-4077, 2006a.
- WANG, S. et al. Tumor evasion of the immune system: inhibiting p38 MAPK signaling restores the function of dendritic cells in multiple myeloma. *Blood*, v. 107, n. 6, p. 2432-2439, 2006b.
- WIENERROITHER, S. et al. Regulation of NO synthesis, local inflammation, and innate immunity to pathogens by BET family proteins. *Mol. Cell Biol.*, v. 34, n. 3, p. 415-427, 2014.
- WOLFEL, T. et al. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science*, v. 269, n. 5228, p. 1281-1284, 1995.
- YAMAOKA, K. et al. Activation of STAT5 by lipopolysaccharide through granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production in human monocytes. *J. Immunol.*, v. 160, n. 2, p. 838-845, 1998.

- YOSHIMURA, A. Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci.*, v. 97, n. 6, p. 439-447, 2006.
- YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling by the SOCS and Spred family proteins. *Keio J. Med.*, v. 58, n. 2, p. 73-83, 2009.
- YOSHIMURA, A. et al. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 7, n. 6, p. 454-465, 2007.
- YU, H. et al. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 7, n. 1, p. 41-51, 2007.
- ZENG, B. et al. Tumor-induced suppressor of cytokine signaling 3 inhibits toll-like receptor 3 signaling in dendritic cells via binding to tyrosine kinase 2. *Cancer Res.*, v. 68, n. 13, p. 5397-5404, 2008.
- ZENG, L.; ZHOU, M. M. Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett.*, v. 513, n. 1, p. 124-128, 2002.
- ZHANG, Q. et al. Cutaneous T cell lymphoma expresses immunosuppressive CD80 (B7-1) cell surface protein in a STAT5-dependent manner. *J. Immunol.*, v. 192, n. 6, p. 2913-2919, 2014.
- ZITVOGEL, L. et al. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 8, n. 1, p. 59-73, 2008.

ANEXO

A - Artigos publicados ou submetidos para publicação

Inhibiting STAT5 by the BET bromodomain inhibitor JQ1 disrupts human dendritic cells maturation. Toniolo PA, Liu S, Moraes-Vieira PM, Vafaizadeh V, Walker SR, Barbuto JAM, Frank DA. J Immunol. (em revisão).

Targeting STAT5 in Hematologic Malignancies through Inhibition of the Bromodomain and Extra-Terminal (BET) Bromodomain Protein BRD2. Liu S, Walker SR, Nelson EA, Cerulli R, Xiang M, Toniolo PA, Qi J, Stone RM, Wadleigh M, Bradner JE, Frank DA. Mol Cancer Ther.

Targeting transcription factors: promising new strategies for cancer therapy. Yeh JE, Toniolo PA, Frank DA. Curr Opin Oncol.

JAK2-STAT5 signaling: A novel mechanism of resistance to targeted PI3K/mTOR inhibition. Yeh JE, Toniolo PA, Frank DA. JAKSTAT.

Tumor Cells Incorporate Exosomes derived from Dendritic Cells through A Mechanism Involving the Tetraspanin CD9. Romagnoli GG, Toniolo PA, Migliori IK, Caldini EG, Ferreira MA, Pizzo CR, Bergami-Santos PC, Barbuto JAM. Exosomes And Microvesicles.