

ISABELLA KATZ MIGLIORI LEÃO DE MOURA

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE NF- κ B EM CÉLULAS DENDRÍTICAS DE
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

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

São Paulo
2016

ISABELLA KATZ MIGLIORI LEÃO DE MOURA

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE NF- κ B EM CÉLULAS DENDRÍTICAS DE
PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

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
2016

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

Moura, Isabella Katz Migliori Leão de.

Avaliação funcional de NF-kB em células dendríticas de pacientes com câncer de mama / Isabella Katz Migliori Leão de Moura. -- São Paulo, 2016.

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: Imunologia de tumores.

Versão do título para o inglês: Functional evaluation of NF-kB in dendritic cells of breast cancer patients.

1. Neoplasias mamárias 2. Células dendríticas 3. Tolerância imunológica 4. Fatores de transcrição 5. Quimiocinas 6. Radioimunoensaio 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/SBIB019/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Isabella Katz Migliori Leão de Moura.

Título da Tese: Avaliação funcional de NF-kB em células dendríticas de
 pacientes com câncer de mama.

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:

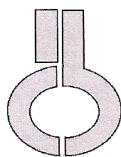
Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do ICB



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, 18 de abril de 2011.

PARECER 990/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 23.03.2011, APROVOU o projeto intitulado: "Avaliação funcional de NF-kB em células dendríticas de pacientes com câncer de mama" sob responsabilidade de execução dos autores Prof. **JOSÉ ALEXANDRE M. BARBUTO** e a aluna **ISABELLA KATZ MIGLIORI**.

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 **23.03.2012**.

Atenciosamente,

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

Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Referência da Saúde da Mulher do Hospital Pérola Byington



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

Comitê de Ética em Pesquisa

São Paulo, 31 de maio de 2011.

FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DATA DA APROVAÇÃO: 25/05/2011

Protocolo nº: 020/11

TÍTULO DO ESTUDO: "Avaliação funcional de NF-kB em células dendríticas de pacientes com câncer de mama".

NOME DO INVESTIGADOR PRINCIPAL: Isabela Katz Migliori.

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

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

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

*À minha família.
Em particular aos meus pais Luis e Marta, à minha irmã Barbara e ao meu marido
Thiago. Nada que eu pudesse conquistar na vida valeria algo sem o amor
incondicional, apoio irrestrito e incentivo constante de vocês.
Tenho tudo, pois tenho vocês.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto (“Professor”) pelo exemplo de caráter e vivência da ciência com humanidade e humildade; pelo apoio, carinho e orientação segura no amadurecimento dos meus conhecimentos; pelo admirável raciocínio lógico; por me ensinar a valorizar o aprendizado que cada experimento tem a oferecer (principalmente os que “deram errado” – extrapolo isto para a vida); pela paciência durante todos esses anos, permitindo que eu traçasse meu próprio caminho; e, por fim, pela confiança irrestrita depositada em mim, sem a qual não teria sido possível a conclusão desta tese. A admiração e apreço pelo profissional e pessoa que é seguirão sempre comigo.

À Dra. Patrícia Bergami (Patty), pela amizade sincera, sugestões valiosas e carinho e auxílio irrestritos durante todos esses anos.

À Profa. Dra. Zulma Felisbina da Silva Ferreira, por ter me recebido em seu laboratório e permitido que fosse meu segundo lar, onde realizei os ensaios de EMSA e *supershift*, essenciais para o presente estudo; por todos os ensinamentos com a técnica; pela colaboração irrestrita e confiança; pela orientação segura e sugestões fundamentais, que possibilitaram a realização desta tese.

À Profa. Dra. Regina Pekelman Markus e ao Prof. Dr. Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes, por compartilharem seus vastos conhecimentos comigo, contribuindo de forma construtiva no meu amadurecimento.

Aos meus pais Luis (pá) e Marta (mã), por todo amor e carinho do mundo; pelos exemplos de vida; pelas oportunidades que me forneceram, permitindo que eu tivesse todas as ferramentas para alcançar aquilo que eu almejasse; por me ensinarem o caminho, mas deixarem eu seguir o próprio, apoiando as minhas decisões; por terem me incentivado e confiado em mim; e por terem impedido, por tudo acima, que eu esmorecesse nesta árdua jornada.

À minha irmã Barbara (Pinha), por todo o apoio e carinho, pelo exemplo de pessoa corajosa e convicta, e pela profissional admirável que é. Tenho ainda muito a aprender com você.

À minha avó Ernestina e ao meu avô Paulo (*in memorian*), sempre presentes na minha vida (ainda que vovô só em pensamento), tendo contribuído para minha formação como pessoa.

Aos meus tios e primos, e a toda minha família, por serem sempre meu porto-seguro.

Ao meu querido marido Thiago, por todo o amor, apoio, carinho, incentivo, companheirismo, compreensão, encorajamento e paciência ao longo de tantos anos; por compartilhar as alegrias e dividir as tristezas e as dificuldades; por ser quem é, e me fazer querer ser melhor. Sigo qualquer caminho a seu lado.

Aos meus sogros, Paulo e Vera, pelo carinho e apoio constantes.

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

À equipe do Hospital Pérola Byington, em especial ao enfermeiro Henrique Gomes Guedes, pela triagem, seleção e disposição irrestrita na coleta das amostras de sangue das pacientes e na obtenção das informações dos prontuários; pelo apoio técnico e emocional. Sem seu sincero auxílio, não teria conseguido.

Às pacientes que concordaram em participar deste estudo, pela confiança em momento de tanta fragilidade.

À querida Eni, não apenas por todo o suporte burocrático competente, mas por ter feito diferença quando necessário, me mantendo no caminho, me encorajando e acreditando em mim. Sua sensibilidade na percepção das dificuldades e suas palavras sinceras e seguras nos momentos mais frágeis me deram forças para continuar. Serei eternamente grata a você.

Ao Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Camara, que manteve seu laboratório sempre à minha disposição para uso dos equipamentos, como o de PCR em tempo real e a coluna de seleção magnética, e de reagentes, quando necessário; pelo carinho; e pelas palavras gentis e sinceras, que me confortaram em tantos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Gustavo Amarante Mendes, pelo uso constante do Nanodrop.

Ao Prof. Dr. Antonio Condino Neto, pelo uso constante da coluna de seleção magnética.

Ao Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins e à Dra. Telma Miyuki Oshiro, pelos conselhos valiosos e incentivo durante a qualificação, que culminaram no presente estudo.

A todos os professores do Departamento de Imunologia do ICB da USP, pelas aulas ministradas, contribuindo na minha formação, bem como disponibilização de seus laboratórios e reagentes.

À Célia Regina Pizzo, à Claudinha Cunha e à Meire Ioshie Hiyane, por todo o carinho e auxílio, sempre disponíveis a ajudar no que fosse necessário, durante todos esses anos.

À querida amiga Bruna, tão fundamental no meu retorno ao Laboratório, me incentivando e me dando forças para continuar.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia de Tumores do Departamento de Imunologia do ICB-USP, atuais e antigos, por todo o auxílio experimental, discussão valiosa de resultados e auxílio nas análises dos dados; pela convivência dentro e fora do Laboratório; pelas risadas e por terem compartilhado tantos momentos alegres e também de angústias, tornando o dia-a-dia muito mais suave e divertido: Aline, Ana Carolina, Cecília, Graziela, Karen, Lilian, Maria, Mariana, Otávio, Patrícia, Ricardo, Roberto, Rodrigo Salomão, Sarah, Thiago e Kleber.

Ao meu querido ex-aluno de pré-Iniciação Científica Michel, cuja força de vontade e determinação me orgulham até hoje. Aprendi muito mais com você, do que você comigo.

Aos colegas do Departamento de Imunologia do Departamento de Imunologia do ICB-USP, que me doaram sangue e coletaram sangue para mim; por terem acompanhado minha jornada, sempre com palavras gentis e votos sinceros de incentivo, me auxiliando sempre que necessitei.

Aos colegas do Laboratório de Cronofarmacologia do Departamento de Fisiologia do IB-USP, que sempre me receberam com muito carinho, me deixaram à vontade e me auxiliaram sempre que necessitei, em especial à Marina, à Érika e ao Sanseray.

Aos gentis funcionários do Departamento, Jotelma, Amanda e João, por toda a ajuda prestada em questões burocráticas.

Aos funcionários do setor Audiovisual, Moisés, Márcio e Andréas, sempre dispostos a ajudar.

A todos os funcionários da portaria, e em especial ao Sr. Octacílio e ao Sr. Milton, pela sempre gentil recepção e cuidado com a segurança.

Ao Dr. Jacques Labrunie e à Ana Paula Santos Celidonio, por não medirem esforços para eu que conciliasse o trabalho e o Doutorado; pela flexibilização dos meus horários, pelo apoio irrestrito, paciência e confiança depositada em mim. Serei eternamente grata aos esforços coletivos realizados, que contribuíram diretamente na minha formação acadêmica e profissional.

À querida amiga e eterna tutora Paola, pelo constante incentivo, tendo diretamente me apoiado, motivado e ensinado; pela confiança irrestrita; por ter compartilhado seu conhecimento; por ter permitido que eu errasse e aprendesse com o erro; por sua visão e liderança segura; pelo exemplo de profissional admirável; pela sincera amizade que levarei para a vida. Não teria conseguido sem você.

Aos queridos amigos Igor, Gustavo e Daniela, pelo apoio constante e irrestrito dentro e fora do escritório, pelas risadas sem fim, por todos os ensinamentos, por todos os conselhos, por todas as besteiras, por tudo. Vocês são parte desta conquista.

Aos demais amigos do escritório, Jacqueline, Janaína, Andrea, Priscila e Marina por terem diretamente me apoiado, me incentivado e me motivado nesta jornada, não medindo esforços para que eu chegasse ao fim.

Aos demais colegas de trabalho, profissionais e paralegais, que de um jeito ou de outro me fizeram mais forte, contribuindo indiretamente nesta jornada.

Aos meus queridos “amigos-irmãos” da UNESP, Priscilla, Flávio e Janayna, que mesmo fisicamente distantes nunca deixaram de torcer por mim, me incentivando e me acompanhando ao longo de tantos anos. Foram minha família por quatro anos e continuarão sendo sempre. O carinho que sinto por vocês não se traduz em palavras.

Às minhas eternas “amigas-irmãs” do Colégio Visconde de Porto Seguro, Juju, Nath, Rê e Pepê, por terem acompanhado de perto minha jornada, compartilhado minhas dificuldades, alegrias e tristezas; por terem vibrado com as minhas conquistas pessoais e profissionais como se fossem próprias; por terem me incentivado, me dado broncas mas também suporte; por terem compreendido minhas ausências; por serem exemplos de pessoas íntegras e maravilhosas; por estarem sempre disponíveis “para o que der e vier”. Não preciso de muitos amigos, pois tenho vocês.

À FAPESP, pelo tão importante apoio financeiro, possibilitando o uso do dinheiro público de forma gratificante.

E finalmente, àqueles cujos nomes não foram explicitamente citados, mas que contribuíram direta ou indiretamente com este estudo, deixo meus sinceros agradecimentos.

Obrigada a todos!

“It has been an amazing privilege to watch the progress of immunology from the early days of clonal selection and cell-mediated immunity to the present. This progress may seem overwhelming for investigators who are now beginning in the field, when they encounter hundreds of molecules with their CD numbers (in contrast there were only two markers when I began (...)), and dozens of cytokines, chemokines, cell types, signal transducers, and transcription factors. (...) It was exciting when dendritic cells appeared first as novel cells, and it remains exciting that these cells represent a novel force in medicine.”

Ralph M. Steinman (1943-2011)

RESUMO

MIGLIORI-LEÃO DE MOURA, I. K. **Avaliação funcional de NF- κ B em células dendríticas de pacientes com câncer de mama.** 2016. 138 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

As células dendríticas (DCs) são as principais células apresentadoras de antígenos e responsáveis pelo direcionamento da resposta imune e, por isso, são utilizadas em tratamentos imunoterápicos onde a ativação de células T é crítica, como no câncer. Porém, DCs de pacientes com câncer apresentam alterações fenotípicas e funcionais, contribuindo para o escape tumoral à resposta imune. Uma das alterações em células do sistema imune, associadas ao câncer, ocorre na via do fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B). Este fator é uma combinação de dímeros de membros da família Rel (p65/RelA, c-Rel, RelB, p50/NF- κ B1, e p52/NF- κ B2), que, quando ativados, migram para o núcleo e controlam inúmeros genes associados à resposta imune. Também na fisiologia das DCs há participação intensa de NF- κ B. Assim, visto que processos cruciais de diferenciação e maturação das DCs são regulados pelo fator de transcrição nuclear *kappa* B, nos propusemos a estudar esta via em células dendríticas derivadas de monócitos (Mos) de pacientes com câncer de mama, partindo da hipótese de que alterações desta via contribuam, nesses indivíduos, para a geração de DCs com fenótipo alterado, levando ao escape tumoral. A análise fenotípica das DCs indicou menor frequência de células CD86⁺, CD83⁺ e HLA-DR⁺ ao final das culturas das pacientes em comparação com as culturas controles ($p < 0,05$). A análise de citocinas no sobrenadante das culturas para diferenciação em DCs indicou aumento na concentração de IL-8, citocina associada a um pior prognóstico de câncer de mama e regulada por NF- κ B, nas culturas de pacientes do quinto dia (iDCs), 1 e 24 horas após estímulo de ativação com TNF- α , em comparação com as de controles, embora estas diferenças não tenham atingido significância estatística. Ainda, a análise da presença de NF- κ B no núcleo de Mos (recém selecionados), iDCs (quinto dia da cultura) e mDCs (24 horas após ativação com TNF- α) indicou que as pacientes falham em modular tal fator de transcrição, isto é, sua presença não distingue estes estágios de maturação, ao contrário do que ocorre em células de doadoras saudáveis. Isto se reflete numa maior quantidade de NF- κ B no núcleo de iDCs de pacientes, e numa ausência de aumento significativo de translocação de NF- κ B para o núcleo após a ativação, como ocorre com as células provenientes de doadoras saudáveis ($p < 0,001$). Tais alterações podem ser decorrentes alterações na expressão de genes que codificam proteínas inibidoras de NF- κ B, IKKs, e co-ativadores transcripcionais. Com relação à composição das subunidades, os experimentos de *supershift* indicaram que tanto iDCs como mDCs de pacientes e controles possuem, nas condições testadas, p50, p65, RelB e cRel. No entanto, enquanto iDCs controles possuem uma quantidade relativa maior de p50 e menor das demais subunidades, com diminuição na contribuição relativa de p50 após a ativação, as iDCs de pacientes, de modo geral, já apresentam o perfil das mDCs controles, até onde se pôde avaliar. Tomados em conjunto, os resultados globais indicam diferenças entre as DCs controles e de pacientes quanto à modulação de NF- κ B, as quais podem ser potencialmente responsáveis pelos defeitos observados nas DCs, contribuindo para o escape à resposta imune.

Palavras-chave: Neoplasias mamárias. Células dendríticas. Tolerância imunológica. Fatores de transcrição. Quimiocinas. Radioimunoensaio.

ABSTRACT

MIGLIORI-LEÃO DE MOURA, I. K. **Functional evaluation of NF- κ B in dendritic cells of breast cancer patients.** 2016. 138 p. PhD thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Dendritic cells (DCs) are the main antigen presenting cells and responsible for directing the immune response. Therefore, they are used in immunotherapy treatments where the activation of T cells is critical, such as in cancer. However, DCs from cancer patients present phenotypic and functional changes, contributing to tumor escape from the immune system. One of the alterations in the immune system cells associated with cancer occurs on the nuclear transcription factor *kappa* B (NF- κ B) pathway. This transcription factor is actually a combination of dimers of Rel family members (p65/RelA, c-Rel, RelB, p50/NF- κ B1 and p52/NF- κ B2) which, when activated, migrates to the nucleus and control many genes associated with the immune response. Also in the physiology of DCs there is active participation of the NF- κ B. Thus, considering that crucial processes of differentiation and maturation of dendritic cells (DCs) are regulated by NF- κ B, we proposed to study this pathway in monocyte-derived DCs from breast cancer patients, based on the hypothesis that alterations in such pathway may contribute in these individuals to the generation of DCs having phenotypic and functional changes, leading to tumor escape. Phenotypic analysis of DCs showed lower frequency of CD86⁺, CD83⁺ and HLA-DR⁺ cells the end of the cell cultures from compared with control cultures ($p < 0.05$). Cytokine analysis in the supernatants of cultures for differentiation into DCs showed an increase in the concentration of IL-8, cytokine associated with a poor breast cancer prognosis and regulated by NF- κ B, in cultures from patients from fifth day (iDCs), 1 and 24 hours after activation of DCs with TNF- α stimulation, compared to controls, although these differences did not reach statistical significance. Furthermore, analysis of the presence of NF- κ B in the nucleus of monocytes (newly selected) iDCs (fifth day of culture) and mDCs (24 hours after activation with TNF- α) indicated that patients fail to modulate this transcription factor, that is, its presence does not distinguish between these stages of maturation, unlike what occurs in cells of healthy donors. This is reflected in a greater amount of NF- κ B in the nucleus of iDCs from patients and in an absence of significant increase in the translocation of NF- κ B to the nucleus upon activation, as can be seen with cells from healthy donors ($p < 0.001$). Such changes may be due to altered expression of genes encoding NF- κ B inhibitory proteins, IKKs, and transcriptional co-activators. Regarding the composition of the subunits, the supershift experiments indicated that both iDCs and mDCs from patients and controls present, under the conditions tested, p50, p65, RelB and cRel. However, while iDCs from controls have a higher relative amount of p50 and less contribution of the other subunits, with a decrease in the relative contribution of p50 after activation, the iDCs from patients, generally, already have the same profile observed in mDCs from controls. Taken together, the results indicate differences between patients' and controls' DCs as to the modulation of NF- κ B, which can potentially be responsible for the observed defects in cancer patients' DCs, contributing to the tumor escape from the immune response.

Key words: Breast neoplasms. Dendritic cells. Immunological tolerance. Transcription factors. Chemokines. Radioimmunoassay.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Subunidades que compõem o NF-κB.....	28
Figura 2 – Vias de ativação de NF-κB.....	30
Figura 3 – Análise da pureza de monócitos após seleção negativa.....	47
Figura 4 – Primeira forma de análise das células por citometria de fluxo.....	49
Figura 5 – Segunda forma de análise das células por citometria de fluxo.....	50
Figura 6 – Eletroforese do produto de extração de RNA evidenciando bandas características.....	54
Figura 7 – Eletroforese dos produtos de PCR dos genes avaliados por PCR em tempo real.....	57
Figura 8 – Curvas de dissociação dos primers desenhados para PCR em tempo real.....	59
Figura 9 – Aspecto geral da cultura para diferenciação em DCs.....	66
Figura 10 – Caracterização geral das células em cultura para diferenciação em DCs.....	67
Figura 11 – Caracterização fenotípica dos monócitos de doadoras saudáveis e pacientes com câncer de mama.....	70
Figura 12 – Intensidades medianas de fluorescência relativas das moléculas em monócitos positivos de doadoras saudáveis e pacientes com câncer de mama.....	71
Figura 13 – Caracterização fenotípica das células dendríticas imaturas diferenciadas a partir de monócitos de doadoras saudáveis e pacientes com câncer de mama.....	72
Figura 14 – Intensidades medianas de fluorescência relativas das moléculas em células dendríticas imaturas positivas, diferenciadas a partir de monócitos de doadoras saudáveis e pacientes com câncer de mama.....	73
Figura 15 – Caracterização fenotípica das células dendríticas estimuladas com TNF-α, diferenciadas a partir de monócitos de doadoras saudáveis e pacientes com câncer de mama.....	74
Figura 16 – Intensidades medianas de fluorescência relativas das moléculas em células dendríticas positivas estimuladas com TNF-α, diferenciadas a partir de monócitos de doadoras saudáveis e pacientes com câncer de mama.....	75
Figura 17 – Avaliação da integridade das proteínas extraídas e da pureza do extrato nuclear.....	77

Figura 18 – Determinação da quantidade de proteínas do extrato nuclear.....	78
Figura 19 – As bandas observadas no EMSA correspondem ao NF-κB.....	79
Figura 20 – Funcionalidade dos anticorpos utilizados nos ensaios de <i>supershift</i>.....	81
Figura 21 – Análise densitométrica das bandas geradas no ensaio de <i>supershift</i>.....	82
Figura 22 – Translocação de NF-κB para o núcleo após ativação.....	83
Figura 23 – Monócitos e DCs diferenciadas de monócitos de pacientes com câncer de mama apresentam alterações na quantidade de NF-κB no núcleo.....	86
Figura 24 – DCs derivadas de pacientes com câncer de mama apresentam alterações no padrão de constituição de NF-κB no núcleo.....	90
Figura 25 – Avaliação de IL-8 no sobrenadante das culturas para diferenciação em DCs.....	93
Figura 26 – Avaliação de IL-6 no sobrenadante das culturas para diferenciação em DCs.....	94
Figura 27 – Avaliação da expressão de genes selecionados.....	97
Figura 28 – Avaliação da expressão de genes que codificam as subunidades de NF-κB.....	98
Figura 29 – <i>Heat maps</i> dos resultados de expressão gênica por arranjo de PCR em tempo real.....	101
Figura 30 – Relação de genes cuja expressão gênica por arranjo de PCR em tempo real está possivelmente alterada em pacientes com câncer de mama.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados relativos às pacientes analisadas.....	43
Tabela 2 – Frequência das faixas etárias por grupo.....	43
Tabela 3 – Frequência de pacientes segundo variáveis tumorais.....	44
Tabela 4 – Dados referentes aos anticorpos murinos usados para citometria de fluxo.....	48
Tabela 5 – Sequências dos <i>primers</i> para PCR em tempo real.....	56
Tabela 6 – Relação dos genes investigados por arranjo de PCR em tempo real.....	62
Tabela 7 – Frequência, avaliada por <i>supershift</i> , das subunidades que compõem o NF- κ B em iDCs e mDCs de pacientes e controles.....	87
Tabela 8 – Resultado da expressão de genes relacionados com a via de NF- κ B por arranjo de PCR em tempo real.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
APCs	Células apresentadoras de antígenos
BSA	Albumina bovina do soro
CD	Cluster of differentiation
cDNA	DNA complementar
Ct	<i>Threshold cycle</i>
DCs	Células dendríticas
DEPC	Água tratada com dietil dicarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EMSA	Ensaio de mobilidade eletrofética em gel
FSC	<i>Foward scatered</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GM-CSF	Fator de crescimento de colônia de granulócito e macrófago
HDAC	Histona desacetilase
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano-DR
iDCs	Células dendríticas imaturas
IFN-γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
IKB	proteína inibidora <i>kappa</i> B
IKK	proteína quinase de IKB
LPS	Lipopolissacarídeo
mDCs	Células dendríticas maduras
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
Mos	Monócitos
mRNAs	RNAs mensageiros
NF-κB	Fator nuclear <i>kappa</i> B
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGE-2	Prostaglandina E2
rMFI	Intensidade mediana de fluorescência relativa
RNA	Ácido ribonucléico
RPMI	Meio <i>roswell park memorial institute</i>
RT	Transcrição reversa
SFB	Soro fetal bovino
SSC	<i>Side scatered</i>
TCR	Receptor de células T
Th1	Linfócitos T auxiliares 1
Th2	Linfócitos T auxiliares 2
TLR	Receptor tipo Toll
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
Tregs	Linfócitos T reguladores

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	21
2 OBJETIVOS.....	39
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 Casuística.....	42
3.2 Coleta de sangue periférico, seleção de monócitos e diferenciação em DCs.....	44
3.3 Marcação das células para citometria de fluxo e análise.....	47
<i>3.3.1 Análise fenotípica.....</i>	<i>48</i>
3.4 Extração de proteínas nucleares e citosólicas.....	50
3.5 Western Blot.....	51
3.6 Ensaio de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA) para o NF-κB.....	51
<i>3.6.1 Marcação da sonda.....</i>	<i>51</i>
<i>3.6.2 Reação de ligação e corrida do gel.....</i>	<i>52</i>
3.7 Citometric Bead Array (CBA) para avaliação de citocinas no sobrenadante de culturas para diferenciação em DCs.....	53
3.8 Extração de RNA total.....	53
3.9 Transcrição reversa, PCR e PCR em tempo real para genes selecionados.....	54
<i>3.9.1 Desenho dos primers.....</i>	<i>56</i>
<i>3.9.2 Análise dos resultados de PCR em tempo real.....</i>	<i>58</i>
3.10 Arranjo de PCR em tempo real para genes relacionados com a via de NF-κB.....	60
3.11 Análise estatística.....	63
4 RESULTADOS.....	64
4.1 Caracterização fenotípica de DCs.....	65
4.2 Padronização da extração de proteínas nucleares.....	75
<i>4.2.1 Integridade das proteínas dos extratos nuclear e citoplasmático.....</i>	<i>75</i>
<i>4.2.2 Pureza do extrato nuclear.....</i>	<i>75</i>
4.3 Padronização do EMSA.....	76
<i>4.3.1 Curva da quantidade de proteínas do extrato nuclear.....</i>	<i>76</i>
<i>4.3.2 Ensaio de competição com oligonucleotídeo frio.....</i>	<i>77</i>

4.3.3 Teste dos anticorpos para os ensaios de supershift.....	78
4.3.4 Translocação de NF- κ B para o núcleo após ativação.....	82
4.4 Avaliação da presença de NF-κB em Mos e iDCs e da translocação de NF-κB para o núcleo após a ativação das DCs em pacientes e controles.....	82
4.5 Avaliação da composição de NF-κB em iDCs e DCs após a ativação em pacientes e controles.....	86
4.6 Avaliação das citocinas no sobrenadante das culturas para diferenciação em DCs.....	90
4.7 Avaliação da expressão de genes selecionados.....	94
4.8 Avaliação da expressão de genes relacionados com a via de NF-κB.....	97
5 DISCUSSÃO.....	102
6 CONCLUSÕES.....	115
REFERÊNCIAS.....	119
ANEXOS.....	133
ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Doador Saudável).....	134
ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Paciente).....	136
ANEXO C – Fotografia digitalizada de filme radiográfico obtido após EMSA	138

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O sistema imune tem como funções primárias o reconhecimento de antígenos e a geração de diversas respostas qualitativas diferentes. As células dendríticas (DCs; do inglês, *dendritic cells*), denominadas dessa maneira por seu aspecto morfológico (do grego “dendron” = árvore) (STEINMAN; COHN, 1973), são células com papel central neste processo, pois, além de serem as principais células apresentadoras de antígenos (APCs; do inglês, *antigen presenting cells*), são capazes de reconhecer perturbações na homeostasia dos tecidos e, mediante estímulos apropriados ao padrão da perturbação tecidual, direcionar o sistema para uma resposta imune adequada aos antígenos por ela apresentados (revisto por STEINMAN; BANCHEREAU, 2007; revisto por STEINMAN, 2012).

Neste sentido, é bem caracterizado o papel das DCs tanto na indução de resposta, quanto na manutenção de tolerância. Isso ocorre pois as DCs, localizadas na maioria dos tecidos, são especializadas na captura e no processamento de antígenos, uma vez que estão continuamente convertendo proteínas em peptídeos, e apresentando-os no contexto de moléculas codificadas por genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC; do inglês, *major histocompatibility complex*) aos linfócitos T. Quando ativadas por estímulos pró-inflamatórios, as DCs sofrem alterações em muitas moléculas de membrana, como por exemplo aumento de expressão de HLA-DR e das moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 e CD40, bem como aumento da expressão do marcador de maturação CD83. Além disso, diminuem sua capacidade endocítica e migram, direcionadas pelo receptor para quimiocinas, CCR7, para os órgãos linfóides secundários, para apresentação antigênica para os linfócitos T. Essa interação DC-linfócito T resulta em seleção dos linfócitos cujos receptores clonais reconhecem especificamente o peptídeo no contexto das moléculas do MHC, ativando-os, induzindo-os à proliferação e à diferenciação em uma determinada subpopulação, conectando, portanto, a resposta imune inata à adaptativa (revisto por BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; revisto por CYSTER, 1999; revisto por ITANO; JENKINS, 2003; revisto por RANDOLF; ANGELI; SWARTZ, 2005; SALLUSTO et al., 1999; revisto por STEINMAN, 2012).

As DCs não apenas direcionam o sistema imune a “atacar” aquilo que é reconhecido como estranho ou aberrante, mas também dirigem o sistema imune a não responder ao que é reconhecido como próprio, de modo a evitar doenças autoimunes. Normalmente, as células T maduras não respondem aos peptídeos próprios que são apresentados, visto que durante o desenvolvimento destas células,

apenas aquelas que reconhecem auto-antígenos com baixa afinidade são selecionadas a amadurecer e entrar na circulação (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998). Além disso, as DCs, quando se localizam na periferia, em um estado imaturo, possuem baixa expressão de moléculas co-estimuladoras na membrana, induzindo linfócitos T à anergia ou à diferenciação em células supressoras (STEINMAN, 2003).

Deste modo, a diferenciação de linfócitos T é influenciada por algumas características das DCs, como nível de expressão das moléculas co-estimuladoras, padrão de expressão de receptores, padrão de citocinas secretadas no ambiente, entre outras (STEINMAN; BANCHEREAU, 2007). Assim, subpopulações de células T auxiliares (Th; do inglês, *T helper*) adquirem as mais diferentes capacidades, desde a produção de IFN- γ (células Th1), importante, por exemplo, no combate a infecções por bactérias intracelulares (MALDONADO-LOPEZ et al., 1999; NAPOLITANI et al., 2005; PULENDRAN et al., 1999), até a produção de IL-10 (células T reguladoras 1 ou Tregs1), citocina com efeito supressor de linfócitos (JONULEIT et al., 2000).

Considerando a gama de respostas imunes sob influência das DCs, e a possibilidade de modulação *in vivo* ou diferenciação dessas células *in vitro*, a partir de monócitos de sangue periférico (CAUX et al., 1992; LANZAVECCHIA, 1994; ROMANI et al., 1994; ROMANI et al., 1996; SALLUSTO; ZHOU; TEDDER, 1996), não é de surpreender que as DCs sejam alvo de investigação para utilização em tratamentos imunoterápicos das mais diversas condições, como doenças infecciosas, doenças autoimunes, transplantes e câncer (O'NEILL, 2006; OSHIRO; ALMEIDA; PALUCKA et al., 2010; PHILLIPS; GIANNOUKAKIS; TRUCCO, 2009; SILVA-DUARTE, 2009). Além disso, visto que os processos de diferenciação e maturação das células dendríticas são cruciais para a correta indução de resposta imune e ativação de linfócitos T virgens, e que a inibição destes processos, por sua vez, pode levar à supressão da resposta e/ou à indução de tolerância (revisito por BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; LUTZ; SCHULER, 2002), é esperado que “falhas” das DCs contribuam significativamente para a progressão tumoral.

Nosso laboratório, em particular, se dedica há bastante tempo ao estudo do câncer, tendo contribuído para um melhor entendimento dos mecanismos de evasão tumorais, já que muitos deles atuam sobre as DCs (AZEVEDO-SANTOS, 2010; BALEEIRO; BARBUTO, 2008; BALEEIRO et al., 2008a; BALEEIRO et al., 2008b; CLAVIJO-SALOMON et al.; 2015; NEVES et al., 2005; RAMOS et al., 2012;

ROMAGNOLI et al., 2013; ROMAGNOLI et al., 2015), as quais desempenham um importante papel na resposta antitumoral (revisto por SCHULER; STEINMAN, 1997). Essas, em pacientes com câncer, possuem fenótipo alterado, apresentando expressão diferenciada de moléculas co-estimuladoras e MHC-II, tornando-se células com reduzida capacidade de apresentação de antígenos, o que auxiliaria o tumor no escape à resposta imune (AZEVEDO-SANTOS, 2010; CHAUX et al., 1996; GABRILOVICH et al., 1997; revisto por GABRILOVICH, 2004; NEVES et al., 2005). Observações de nosso laboratório, corroboradas por outras da literatura (CHAUX et al., 1997; DELLA BELLA et al., 2003; GABRILOVICH; CIERNIK; CARBONE, 1996; GABRILOVICH et al., 1997; PEDERSEN et al., 2005; RADMAYR et al., 1995), sugerem que os defeitos funcionais nas DCs intratumorais se manifestam também em DCs diferenciadas *in vitro*, a partir de monócitos do sangue periférico de pacientes com câncer (BALEEIRO et al., 2008; CLAVIJO-SALOMON et al., 2015; NEVES et al., 2005; RAMOS et al., 2012), o que representa um obstáculo à utilização dessas DCs em tratamentos imunoterápicos (revisto por BANCHEREAU; PALUCKA, 2005; ZOU, 2005). Desenvolve-se no laboratório, portanto, um protocolo de vacinação terapêutica com a utilização de células híbridas, a partir de células tumorais autólogas e DCs alogênicas, com resultados bastante positivos (BARBUTO et al., 2004; DALL'OGGIO; SROUGI; BARBUTO, 2003; NEVES et al., 2005).

Para citar alguns exemplos, no estudo realizado em pacientes com melanoma ou com carcinoma renal metastáticos observou-se, após a vacinação terapêutica com as células híbridas, estabilização da doença em cerca de 70% dos casos, por um período mediano de cerca de 6 meses (BARBUTO et al., 2004). Neste mesmo estudo, um paciente com carcinoma renal metastático apresentou resposta efetiva após a imunoterapia, com involução completa das metástases (DALL'OGGIO; SROUGI; BARBUTO, 2003). Há ainda um relato do nosso laboratório que indica que o defeito observado nas DCs derivadas de monócitos é reversível. Em um paciente com carcinoma de células renais cromóforo, a retirada do tumor foi associada com diminuição da expressão de PD-L1 em DCs derivadas de monócitos, mas também, de modo surpreendente, de CD205, HLA-DR, CD80 e CD86. Ainda, a capacidade dessas células em estimular a proliferação de células T aumentou, juntamente com o aumento de expressão de IL-2R α e aumento da produção de IFN- γ (CLAVIJO-SALOMON et al., 2015). Essas observações sugerem não apenas que a

imunossupressão sobre as DCs e seus precursores, causada pelo tumor, seja importante forma de escape à resposta imune, mas também que há muito a ser estudado, para que possamos identificar quais mecanismos são determinantes para a obtenção de uma resposta imune efetiva contra o tumor, e qual a melhor maneira de consegui-la com tratamento imunoterápico utilizando DCs.

Assim, visando o aprofundamento do conhecimento sobre os mecanismos responsáveis pelas alterações fenotípicas e funcionais das DCs em portadores de câncer, iniciou-se em nosso laboratório o estudo da via do fator nuclear *kappa B* (NF- κ B; do inglês, *nuclear fator kappa B*) em DCs diferenciadas a partir de monócitos de pacientes com diversos tipo de neoplasias (processo FAPESP # 2008/11278-1), partindo da hipótese de que esta via contribua, nesses indivíduos, para a geração de DCs com fenótipo alterado, levando ao escape tumoral. Este estudo indicou haver diferenças entre DCs maduras de paciente com câncer e doadores sadios com relação à composição das subunidades que compõem os dímeros de NF- κ B, abrindo questão a ser melhor estudada neste projeto ora proposto. Essa questão, assim como observado no estudo realizado em nosso laboratório, se fundamenta também em dados da literatura, alguns dos quais merecem ser citados, e que justificam o estudo realizado.

O NF- κ B foi inicialmente identificado como um fator de transcrição que se liga na região acentuadora do gene que codifica a cadeia leve *kappa* de células B – o sítio κ B (SEN; BALTIMORE, 1986a; SEN; BALTIMORE, 1986b). Tão logo foi identificado, emergiu não apenas como um dos maiores reguladores do sistema imune, mas do organismo como um todo (revisto por BONIZZI; KARIN, 2004; revisto por VALLABHAPURAPU; KARIN, 2009). Isto porque o NF- κ B compreende uma família de fatores de transcrição envolvidos na regulação de uma variedade de respostas fisiológicas e fisiopatológicas diferentes (revisto por COURTOIS; GILMORE, 2006; KARIN, 2006; revisto por LENARDO; PIERCE; BALTIMORE, 1987; LENARDO et al., 1989; revisto por O'NEILL; KALTSCHMIDT, 1997), sendo expresso de maneira ubíqua no organismo. Esses fatores de transcrição possuem papel crucial em processos como hematopoiese (BOTTERO; WITHOFF; VERMA, 2006; GERONDAKIS; SIEBENLIST, 2010), morte celular e resposta inflamatória (revisto por BONIZZI; KARIN, 2004; LAWRENCE, 2009; revisto por LI; VERMA, 2002), e já foram associados a doenças inflamatórias (GOLDMINZ et al., 2013; VOGEL; MATSUMURA, 2009; WANG et al., 2009) e ao câncer (BRAUN

et al., 2006; DOLCET et al., 2005; HAGEMANN et al., 2008; revisto por KARIN, 2006; revisto por XIA; SHEN; VERMA, 2014).

O NF- κ B é composto por homo ou heterodímeros de proteínas que pertencem à família Rel, pois compartilham o domínio de homologia Rel (RHD; do inglês, *Rel homology domain*), de cerca de 300 aminoácidos na porção N-terminal, o qual é responsável pela dimerização das subunidades, interação com as proteínas inibidoras de NF- κ B, as I κ Bs (do inglês, *inhibitors of NF- κ B*), e ligação de NF- κ B ao DNA. As proteínas que podem dar origem ao NF- κ B são produzidas, em mamíferos, por cinco genes: *rela*, *relb*, *rel*, *nfkb1* e *nfkb2*, os quais codificam as seguintes proteínas: RelA (ou p65), RelB, cRel, NF- κ B1 (ou p50 e sua forma precursora p105) e NF- κ B2 (ou p52 e sua forma precursora p100), respectivamente. As proteínas precursoras p105 e p100 são parcialmente proteolisadas pelo proteassoma (processamento), resultando na produção de suas formas maduras p50 e p52, respectivamente (DOLCET et al., 2005; PERKINS; GILMORE, 2006).

A ativação de NF- κ B pode ser resultado da sinalização por diferentes vias, como estímulos por citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento, produtos microbianos, etc. Por sua vez, o NF- κ B pode atuar na transativação de mais de 200 genes relacionados à sobrevivência celular, apoptose, crescimento celular, resposta imune e inflamação (revisto por AGGARWAL, 2004; revisto por BONIZZI; KARIN, 2004; revisto por LI; VERMA, 2002). Em células normais, a ativação de NF- κ B ocorre após estímulo por uma ou mais das muitas vias mencionadas, que então leva à modulação da expressão de seus genes-alvo. Existem mecanismos reguladores que causam o retorno de NF- κ B ao seu estado inativo, cessando por sua vez tal estímulo (revisto por LAWRENCE, 2009).

Na maioria dos tipos celulares os dímeros de NF- κ B se encontram predominantemente no citoplasma, onde se mantêm na sua forma inativa pela interação com as I κ Bs (ou com as formas precursoras p105 e p100), as quais impedem a translocação dos dímeros para o núcleo. As I κ Bs são caracterizadas pela presença de múltiplas repetições de anquirina, sítio responsável por mediar a interação proteína-proteína. Dentre os membros desta família de proteínas inibidoras, as proteínas I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ são as mais bem caracterizadas. Contêm dois resíduos conservados de serina que podem ser fosforilados pelas I κ B-quinases, as IKKs, sinalizando para a degradação dependente de ubiquitina pelo proteassoma. Uma vez que as proteínas inibidoras são degradadas, o NF- κ B pode ser translocado

para o núcleo, atuando como fator de transcrição de uma variedade de genes (visto por BEINKE; LEY, 2004; revisto por BONIZZI; KARIN, 2004; revisto por LAWRENCE, 2009; revisto por LI; VERMA, 2002; revisto por SUN; LEY, 2008). O Bcl-3, por sua vez, é um membro peculiar da família das I κ Bs, pois interage com homodímeros de p50 e p52, que não possuem domínios de transativação, atuando como coativador transcricional (revisto por BEINKE; LEY, 2004; revisto por LAWRENCE, 2009).

As proteínas precursoras p105 e p100 compartilham homologia estrutural com as I κ Bs na porção C-terminal. Nesse sentido, assim como as I κ Bs, p105 e p100 se ligam ao NF- κ B maduro, sequestrando-o no citoplasma. De forma semelhante, e como já mencionado, a proteólise parcial de p105 e p100 pelo proteassoma resulta na produção das formas maduras, p50 e p52, respectivamente, que podem, em conjunto com a subunidade a qual estão ligadas, migrar para o núcleo e modular a expressão gênica. Ainda, p105 pode se ligar a dímeros de NF- κ B e ser completamente degradada pelo proteassomo, liberando o NF- κ B para atuar no DNA (BEINKE; LEY, 2004; SUN; LEY, 2008).

Uma característica importante das subunidades RelA, RelB e c-Rel é a presença do domínio de transativação (TAD; do inglês, *transcription activation domain*) na porção C-terminal, de modo que dímeros que possuem estas subunidades podem regular positivamente a transcrição de genes. Visto que p50 e p52 não possuem este domínio, precisam interagir, por exemplo, com cofatores, tais como a proteína Bcl-3, ou com as subunidades de NF- κ B que possuem TAD (BEINKE; LEY, 2004; CARLOTTI et al., 2000; CHEN, 2008; LENARDO; SIEBENLIST, 1994; PALMER; SUN; LEY, 2008; revisto por VALLABHAPURAPU; KARIN, 2009). Uma representação esquemática das subunidades de proteínas que compõem a família do NF- κ B pode ser observada na Figura 1.

Família do NF- κ B

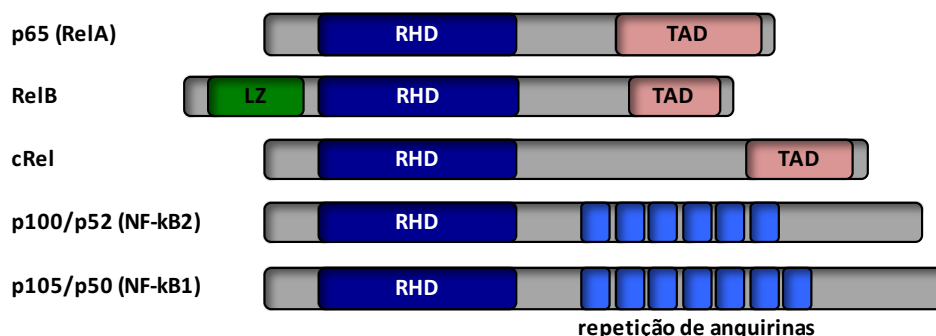


Figura 1 – Subunidades que compõem o NF- κ B. Representação esquemática simplificada das subunidades de proteínas que compõem a família do NF- κ B, contendo os principais domínios. RHD = domínio de homologia Rel; LZ = zíper de leucina; TAD = domínio de transativação (esquema baseado em Hayden e Ghosh, 2004; Ghosh e Hayden, 2008).

Enquanto que RelB heterodimeriza predominantemente com p100 (DOBRZANSKI; RYSECK; BRAVO, 1995), assim como com a sua forma processada p52 (SENFTLEBEN et al., 2001; YILMAZ et al., 2003), p65 e cRel heterodimerizam predominantemente com p50 (revisto por KARIN; BEN-NERIAH, 2000). Ainda, RelB é considerado um membro peculiar da família, pois é o único que possui um motivo zíper de leucina, o que conferiria a este membro características funcionais diferentes (revisto por MILLET; MCCALL; YOZA, 2013).

O mecanismo de ativação do NF- κ B mais bem caracterizado é denominado de via clássica ou canônica, mediada predominantemente por dímeros de p50/RelA e p50/cRel. Esta via, de modo geral, é essencial para a resposta imune, inflamação e promoção da sobrevivência celular. Nesta via, estímulos por vários receptores imunes, como por meio dos receptores tipo Toll (TLR; do inglês, *Toll-like receptors*), receptor de IL-1 (IL-1R), receptor do fator de necrose tumoral (TNFR; do inglês, *tumor necrosis factor receptor*), entre outros, desencadeiam eventos de transdução de sinal que levam à ativação do complexo IKK, composto por duas subunidades catalíticas (IKK-1 e IKK-2) e uma subunidade reguladora NEMO (do inglês, *NF- κ B essential modulator*). A ativação desta cascata conta com a participação do adaptador TAK-1 (do inglês, *transforming growth factor β activated kinase*) que, acredita-se, atue diretamente na fosforilação do loop de ativação de IKK-2. A IKK ativada, por sua vez, fosforila a I κ B α , desencadeando a poliubiquitinação e a degradação mediada pelo proteossoma desta proteína inibidora, permitindo a libertação então das subunidades associadas de NF- κ B, que translocam para o

núcleo (BEINKE; LEY, 2004; SUN; LEY, 2008).

A via alternativa de sinalização do NF- κ B, ou não canônica, por outro lado, é estimulada por receptores tais como LT β R (receptor β de linfotoxina) e CD40, sendo importante para a organogênese linfóide secundária, maturação de células B e imunidade humoral adaptativa. Esta via envolve a ativação, por meio de NIK (quinase indutora de NF- κ B), de IKK-1, que atua fosforilando a p100 para promover seu processamento em p52, que se transloca ao núcleo predominantemente sob a forma de heterodímeros de p52/RelB (BEINKE; LEY, 2004; SUN; LEY, 2008).

Reconhece-se ainda a via de ativação de p105, que atua, entre outros, como proteína inibidora de homodímeros de p50 no citoplasma. Esta via está particularmente envolvida em respostas imunes e inflamatórias. Na presença de estímulos comuns aos da via clássica, o complexo IKK fosforila p105, a qual é também poliubiquitinada, sinalizando para sua completa degradação pelo proteassoma e culminando com a translocação nuclear dos homodímeros de p50 (BEINKE; LEY, 2004; SUN; LEY, 2008). Uma representação esquemática das vias de ativação de NF- κ B (canônica, não canônica e de p105) pode ser observada na Figura 2.

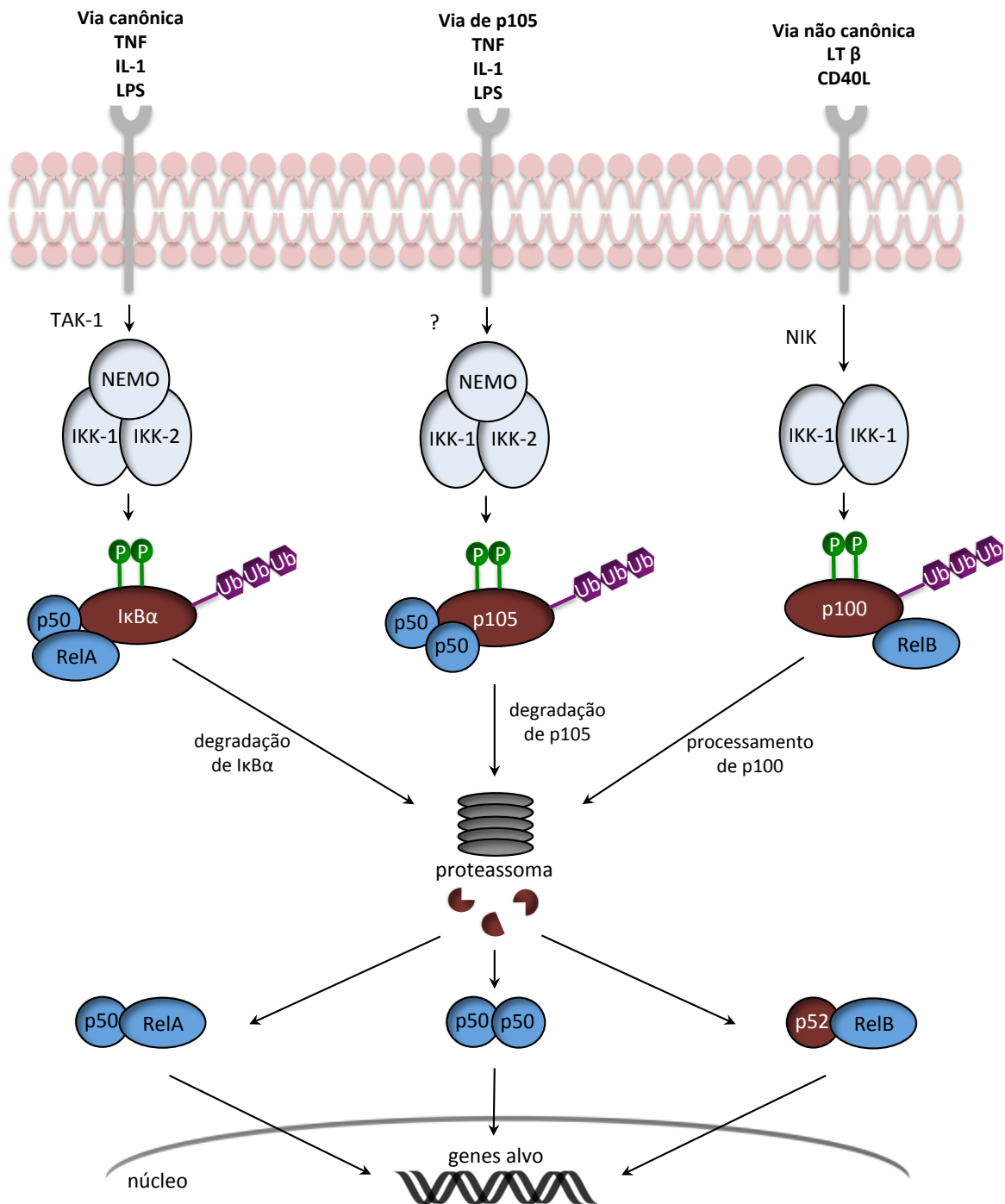


Figura 2 – Vias de ativação de NF-κB. Representação esquemática simplificada das vias de ativação do NF-κB: canônica, não canônica e de p105 (esquema baseado em Ghosh e Hayden, 2008; Hayden e Ghosh, 2004; Sun e Ley, 2008).

Os mecanismos que levam à terminação da atividade transcricional de NF-κB são igualmente relevantes, visto que são necessários para que este fator de transcrição retorne, na forma de complexos latentes, ao citoplasma, de modo a manter a responsividade celular para estímulos subsequentes. Este processo é elegantemente controlado por dois mecanismos distintos: por nova síntese das

proteínas inibidoras I κ Bs, criando, portanto, um *loop* de *feedback* negativo; e por degradação dependente de ubiquitina das subunidades de NF- κ B no núcleo (revisto por WAN; LENARDO, 2010).

Em particular, em DCs, vale citar a importância do NF- κ B em processos fundamentais da fisiologia dessas células. Em modelos de estudo utilizando camundongos *single knockout* para os genes que codificam as subunidades da família Rel, revelou-se importância de RelB na diferenciação das DCs e de RelB e cRel em sua capacidade de ativação de linfócitos T (GERONDAKIS et al., 1999; ZANETTI et al., 2003). Nenhum outro membro da família em animais *single knockout* demonstrou estar relacionado a falhas na capacidade de diferenciação e também na função das DCs, possivelmente devido a certo grau de redundância na atividade regulada por membros desses fatores de transcrição. Porém, em estudos utilizando camundongos *double knockout*, revelou-se também a participação de dímeros de NF- κ B contendo p50 e p52, bem como de dímeros contendo p50 e p65 na diferenciação em DCs, já que se observou redução significativa no número total dessas células em animais *double knockout* para as subunidades p50 e p52 (GERONDAKIS et al., 1999), e ausência total de DCs no baço de camundongos *double knockout* para as subunidades p50 e p65 (OUAAZ et al., 2002). Neste último, não foram observadas diferenças nos precursores mielóides, nem na capacidade de diferenciação em macrófagos, revelando a possibilidade de ação seletiva de p50 e p65 na capacidade de sobrevivência das DCs.

Ainda, estudos com células humanas, em que houve o bloqueio da via do NF- κ B, tanto por superexpressão de I κ B α (YOSHIMURA et al., 2001b), quanto por inibição competitiva do NF- κ B (GIANNOUKAKIS et al., 2000), observou-se comprometimento grave da capacidade de apresentação de antígenos pelas DCs. Este bloqueio afetou três aspectos fundamentais do processo de maturação: expressão de moléculas de HLA-II, de moléculas co-estimuladoras, como CD80, CD86 e CD40, e de citocinas imuno-estimuladoras, como IL-12 e TNF- α (YOSHIMURA et al., 2001a). Estudo mais recente apontou papel crucial das subunidades p50 e cRel na regulação de genes importantes para a resposta de linfócitos T, como CD40, IL-12 e IL-18, e papel crucial de RelA na expressão de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 α e IL-6 (WANG et al., 2007).

Coletivamente, esses dados sugerem não apenas a importância de NF- κ B em processos críticos para o desenvolvimento da resposta imune pelas DCs, mas

também chamam a atenção para a função diferencial desempenhada pelas subunidades que compõem os dímeros de NF- κ B. De fato, a composição dos dímeros pode variar dependendo do tipo celular, da natureza do estímulo e do tempo após a exposição inicial ao mesmo (HAYDEN; GHOSH, 2004; PERKINS, 1997; SACCANI; PANTANO; NATOLI, 2003). Neste contexto, partimos da hipótese que, por possuir controle sobre processos tão relevantes nas DCs, alterações das subunidades de NF- κ B possam comprometer severamente a capacidade de apresentação de antígenos pelas DCs, podendo ser esta uma importante via de modulação pelo câncer para escape à resposta imune.

Enquanto muito é sabido sobre a contribuição das subunidades de NF- κ B, tanto na inflamação (LAWRENCE, 2009), quanto em células transformadas, as quais podem auxiliar ou retardar o desenvolvimento tumoral, sejam eles tumores sólidos (MUKHOPADHYAY; ROTH; MAXWELL, 1995; SOVAK et al., 1997; WANG et al., 2009) ou hematológicos (BRAUN et al., 2006), não está descrita na literatura a contribuição de NF- κ B, ou a relação entre a expressão diferencial das subunidades de NF- κ B, em DCs de pacientes portadores de neoplasias, de modo que este foi, portanto, o objetivo geral do projeto.

Para melhor investigar essa questão, utilizamos como objeto de estudo o câncer de mama. Trata-se do tipo de neoplasia mais prevalente em mulheres no mundo – com exceção do câncer de pele não melanoma – representando 25% de todos os tipos de câncer diagnosticados nesta parcela da população, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Além disso, é a principal causa de morte por câncer em mulheres no mundo. No Brasil, foram estimados 57 mil novos casos de câncer de mama para o ano de 2014 (INCA, 2014).

A etiologia do câncer de mama é multifatorial, incluindo componentes genéticos, dieta, fatores reprodutivos e hormonais. Esta doença ocorre mais frequentemente em mulheres com menarca anterior aos 11 anos, nulíparas ou que tiveram a primeira gestação a termo após os 30 anos. Ainda, também são fatores de risco de desenvolvimento do câncer de mama, a menopausa tardia (após os 50 anos), a utilização de contraceptivos orais, o peso aumentado pós-menopausa e o consumo de álcool. Por outro lado, alguns fatores parecem contribuir para uma diminuição do risco de câncer de mama, como alta ingestão de frutas, legumes e fibras, atividade física e aleitamento. A associação do tabagismo com o câncer de

mama permanece incerta, tendo inclusive sido apontado como possível fator protetor, por levar à diminuição de níveis de estrogênio (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

O tipo de câncer de mama mais frequentemente diagnosticado (de 40 até 75%, dependendo da série) corresponde ao carcinoma ductal invasivo ou carcinoma sem outra especificação (NOS; do inglês, *not otherwise specified*) (BOMBONATI; SGROI, 2011), objeto do presente estudo. Trata-se de um grupo heterogêneo de tumores que não exibe características distintivas suficientes para atingir a classificação de um tipo histológico específico, como o carcinoma lobular ou o carcinoma tubular. No entanto, ao contrário do que sugerem as nomenclaturas, a grande maioria dos tumores de mama tem origem em uma mesma região, que é a unidade lobular-ductal terminal. Como consequência da ausência de características histológicas de tipos específicos, sendo o diagnóstico por exclusão, o carcinoma ductal invasivo compreende uma grande diversidade de subtipos, com características histopatológicas diversas que influenciam o comportamento clínico, sendo, portanto, de extrema importância no tratamento e prognóstico da doença (CORBEN, 2013; TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

Alguns fatores estão relacionados ou são considerados indicativos do grau de malignidade do tumor, influenciando a sobrevida das pacientes, tais como idade, tamanho do tumor primário, comprometimento linfonodal axilar, grau histológico do tumor, marcadores biológicos, taxa de proliferação das células tumorais, entre outros (CORBEN, 2013; TAVASSOLI; DEVILEE, 2003). Dentre os mencionados, o grau histológico é considerado um dos indicadores prognósticos mais consistentes (ELSTON; ELIS, 1991; FITZGIBBONS et al., 1999; HENSON et al., 1991). De fato, a importância de classificar o tumor com relação a seu grau histológico já foi claramente demonstrada em diferentes estudos clínicos, com valor prognóstico até em casos de pacientes com tumores de 1 cm ou inferiores (CHEN, 1998).

Um dos métodos de graduação histológica mais comumente empregados é o sistema combinado de Nottingham, de acordo com o método de Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston e Ellis (1991). Neste sistema, avaliam-se independentemente as características: porcentagem de formação de túbulos, grau de pleomorfismo nuclear e índice mitótico, por contagem precisa em campo definido, atribuindo-se um valor de 1 a 3 a cada uma delas. A soma dos valores de cada característica resulta na graduação dos carcinomas ductais invasivos em tumores de

grau I, ou bem diferenciados (quando a soma dos valores está entre 3 e 5), de grau II, ou moderadamente diferenciados (quando a soma é 6 ou 7) ou de grau III, ou pouco diferenciados (quando a soma é 8 ou 9). Nesta classificação, piores prognósticos são atribuídos a tumores mais indiferenciados (CORBEN, 2013; TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

É interessante chamar a atenção para o fato de que, como fator prognóstico único no câncer de mama, dentre os componentes do grau histológico de Nottingham, o índice mitótico foi considerado o mais importante (BAAK et al., 1985). A formação de túbulos e o pleomorfismo nuclear mostraram nenhum valor prognóstico adicional (formação de túbulos) ou valor prognóstico adicional limitado (pleomorfismo nuclear) em relação ao índice mitótico em mulheres com tumores iniciais com até 55 anos de idade e sem comprometimento linfonodal (BAAK et al., 1995).

O grau nuclear, de forma diversa do grau histológico, se aplica a todos os tipos histológicos de carcinomas, uma vez que não envolve a determinação do padrão de crescimento tumoral, e sim a avaliação citológica do núcleo. O método mais comum de determinação do grau nuclear é o método de Black, modificado segundo Fisher e colaboradores (1980). De acordo com este método, a avaliação das características: tamanho do núcleo, contorno da membrana nuclear, anisonucleose, cromatina e nucléolo resulta nos graus 1, 2 ou 3, de modo que, quanto maior o grau nuclear, mais indiferenciado é o tumor (BANSAL et al., 2014). Segundo estudos da literatura, o grau nuclear apresenta correlação positiva com parâmetros indicadores de mau prognóstico de pacientes com câncer da mama, como a superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (Her-2/*neu*; do inglês, *human epidermal growth factor receptor 2*) (também conhecido como c-erbB-2) e o índice mitótico elevado (MARTINEZ-ARRIBAS et al., 2006; YANG, 2001), bem como com tumores negativos para os receptores hormonais de estrógeno (ER; do inglês, *estrogen receptor*) e de progesterona (PR; do inglês, *progesterone receptor*) (MARTINEZ-ARRIBAS et al., 2006), sendo, portanto, um fator que correlaciona-se ao prognóstico clínico.

Assim, são também investigados em todos os tumores primários de mama, a expressão destes marcadores biológicos (ER, PR e Her-2/*neu*), os quais direcionam o curso clínico em associação com outros fatores e que funcionam como fatores preditivos e prognósticos adicionais (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004).

Aproximadamente 70 a 80% dos carcinomas ductais invasivos são positivos para os receptores hormonais. Em particular, a frequência de positividade de tumores ER é maior que PR, de modo que a maioria dos tumores PR-positivos é também ER-positivo (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

Os receptores hormonais do tumor se ligam aos hormônios circulantes e estimulam a proliferação tumoral. Assim, uma forma de tratamento adjuvante para essas pacientes é a terapia ablativa desses hormônios, que pode produzir remissão clínica. Assim, existe uma associação positiva entre a presença de receptores hormonais e um prognóstico mais favorável (EISENBERG; KOIFMAN, 2001). De maneira geral, as pacientes que possuem tumores positivos para ER apresentam intervalos livres da doença maiores que aquelas que possuem tumores ER-negativos. Estudos mais longos, porém, sugerem que a significância prognóstica não persiste a longo prazo, o que pode indicar que estes tipos de tumores possuam um comportamento mais indolente, de crescimento mais lento e com maior intervalo para surgimento de recidiva (revisto por CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004).

Assim, enquanto a significância prognóstica geral dos receptores hormonais é limitada, sua significância preditiva de resposta ao tratamento já é bem estabelecida, de modo que a presença dos receptores de estrógeno ou progesterona é considerada poderoso fator preditivo de benefício à terapia adjuvante com tamoxifeno. Neste sentido, todas as mulheres positivas para os receptores de hormônios para as quais há indicação de terapia adjuvante sistêmica, devem receber terapia hormonal, a menos que de outra maneira contraindicado (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004; HOFF et al., 2013).

Já os tumores caracterizados pela superexpressão do marcador biológico *Her-2/neu* são considerados, de modo geral, tumores mais agressivos, tendo sido correlacionados com pior prognóstico, com tendência a altas taxas de recidiva e mortalidade (revisto por CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004; LEONG; ZHUANG, 2011). O proto-oncogene *Her-2/neu* codifica uma glicoproteína transmembrana com atividade tirosina quinase homóloga ao receptor do fator de crescimento epidérmico, estando presente em níveis baixos nas células epiteliais e mioepiteliais do tecido mamário normal. Porém, em muitos tipos tumorais, o gene está amplificado e/ou superexpresso (ARTEAGA; MOULDER; YAKES, 2002). Em particular, aproximadamente 15 a 30% dos tumores de mama (dependendo da série) possuem superexpressão do receptor *Her-2/neu* na membrana, sendo denominados tumores

Her-2/*neu* positivos (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003). A superexpressão deste receptor, que em tumores parece sinalizar de maneira ligante-independente, promove sinais que estimulam o crescimento celular e conseqüente crescimento tumoral, sendo, de maneira semelhante aos receptores hormonais, um importante alvo terapêutico (HOFF et al., 2013; LEONG; ZHUANG, 2011).

De modo semelhante aos receptores hormonais, a expressão de Her-2/*neu* permite a adoção de tratamento dirigido com um anticorpo humanizado, o trastuzumab (Herceptin, Roche, Mannheim, Baden-Württemberg, Alemanha). Tal estratégia tem conseguido sobrevida significativa em combinação com quimioterapia, tanto como primeira linha de tratamento, quanto como tratamento adjuvante, conforme apontado por diversos estudos (MARTY et al., 2005; PICCART-GEBHART et al., 2005; ROMOND et al., 2005; SLAMON et al., 2001).

Por fim, não se pode deixar de chamar atenção particular aos marcadores de proliferação celular, os quais foram extensivamente investigados para avaliação de prognóstico. Um dos métodos de indicação direta de proliferação celular é por meio da marcação, por imuno-histoquímica, de Ki-67, proteína nuclear presente apenas em células em proliferação, e ausente em células em repouso (GERDES et al., 1983). Estudos demonstraram que maior porcentagem de positividade para este marcador confere maior risco de recidiva e pior taxa de sobrevivência em pacientes com câncer de mama inicial (DE AZAMBUJA et al., 2007; DOWSETT et al., 2007).

Mais recentemente, os avanços na tecnologia de análises por microarranjos possibilitaram a investigação de milhares de genes simultaneamente, culminando com a classificação dos tumores em subtipos com base no perfil de expressão gênica (DE ABREU; WELLS; TSONGALIS, 2013). O primeiro estudo nesta área classificou inicialmente os tumores de mama em quatro subtipos distintos: luminal, superexpressão de Her-2/*neu* (ou Her-2/*neu* positivos), basal símile e normal símile (PEROU et al., 2000). Posteriormente, novos estudos demonstraram que o grupo luminal poderia ser adicionalmente dividido em dois subgrupos, luminal A e luminal B (HU et al., 2006). Ainda, identificaram um novo subtipo molecular, o *claudin-low*, que apresenta baixa expressão de genes envolvidos na junção e adesão celular (HERSCHKOWITZ et al., 2007).

Visto que o estudo da expressão do RNA mensageiro por microarranjos ainda não é factível na rotina clínica, mas visando traduzir o conhecimento adquirido ao nível do mRNA para o nível protéico, outras versões utilizando imuno-histoquímica

vem sendo aplicadas (SOARES; ANDRADE, 2012). Reconhecem-se, de maneira geral, pelo menos quatro subtipos de tumores diferentes com base na expressão por imuno-histoquímica de marcadores: luminal A (ER+ e/ou PR+; Her-2/*neu*-; Ki-67 < 14%), luminal B (ER+ e/ou PR+; Her-2/*neu*-; Ki-67 ≥ 14%), superexpressão de Her-2/*neu* (Her-2/*neu*+) e triplo negativo ou *basal-like* (ER- e PR-; Her-2/*neu*-). Vale ressaltar que há divergência na literatura quanto à expressão dos marcadores e classificação conforme os subtipos acima apontados, outras classificações sendo possíveis (SERRA et al., 2014).

Ainda que a classificação tumoral seja a maneira adotada para a condução clínica e terapêutica de pacientes, há um número crescente de evidências demonstrando que há que se levar em consideração também fatores relacionados com as características imunológicas de pacientes com câncer. Estudos relevantes descreveram que o perfil das células imunes presentes no infiltrado tumoral é um importante fator preditivo para a progressão da doença (revisto por FRIDMAN et al., 2013). Na realidade, de acordo com um destes estudos, em que caracterizaram as células imunes do infiltrado de tumores colorretais em um número relevante de pacientes, revelou-se que características imunológicas, tais como tipo, densidade e localização das células imunes no interior das amostras de tumor, seriam o fator mais importante na análise patológica de tumores para a avaliação prognóstica de pacientes, confirmando a importância de uma resposta imune adaptativa efetiva no combate às células tumorais (GALON et al., 2013).

Torna-se evidente, portanto, que na patogênese do câncer, há que se considerar a importância do balanço entre a capacidade de imunovigilância das células imunes, as quais possuem um papel essencial na imunidade antitumoral (revisto por HART, 1997; revisto por SCHULER; STEINMAN, 1997), e a suscetibilidade de imunossupressão das mesmas pelo tumor, como forma de escape à resposta imune (revisto por ANTONIA; EXTERMANN; FLAVELL, 1998; revisto por BOTTI et al., 1998; revisto por CHOUAIB et al., 1997).

Neste contexto, em que as DCs possuem relevância central, e tendo em vista pois, a alta incidência do câncer de mama em mulheres no mundo, este vem sendo o alvo de alguns estudos no laboratório, com resultados interessantes. Células dendríticas diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos provenientes de sangue periférico de pacientes com carcinoma de mama ductal invasivo apresentaram diminuição significativa na frequência de células HLA-DR⁺, CD86⁺ e CD11c⁺, além

de redução significativa na capacidade de indução de proliferação de linfócitos T alogênêicos, em comparação com DCs de voluntárias saudáveis (AZEVEDO-SANTOS, 2010). Ainda, DCs imaturas provenientes dessas pacientes possuíram capacidade elevada de indução de Tregs (RAMOS et al., 2012). Esses dados permitem que se proponha que, na patogênese desse tipo de câncer, as alterações fenotípicas e funcionais das DCs representam um mecanismo central para escape à resposta imune.

Assim, considerando-se a importância de NF- κ B na diferenciação e maturação das DCs, bem como as alterações fenotípicas e funcionais presentes em DCs de pacientes com câncer, propôs-se este estudo, procurando estabelecer o papel deste fator de transcrição nas alterações apresentadas pelas DCs, especificamente em pacientes com câncer de mama. Vale notar que a compreensão das características que conferem às DCs sua capacidade imunomoduladora, bem como dos mecanismos responsáveis pelas alterações desta capacidade em pacientes com câncer, abre a possibilidade de se identificar maneira eficiente de, eventualmente, corrigi-las.

2 OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi avaliar a contribuição do fator nuclear de transcrição *kappa* B, e a relação entre a expressão diferencial de suas subunidades, em células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes portadoras de câncer de mama, e correlacionar os achados às alterações fenotípicas e funcionais dessas células. Especificamente, pretendeu-se avaliar nas pacientes, em comparação com doadoras saudáveis:

- a translocação/presença de NF- κ B no núcleo das células;
- a composição dos dímeros de NF- κ B no núcleo (p50/NF- κ B1, p52/NF- κ B2, p65/RelA, RelB e c-Rel);
- a correlação da presença das subunidades de NF- κ B com:
 - o fenótipo de DCs;
 - o padrão de citocinas produzido nas culturas de DCs;
 - a expressão de genes regulados por NF- κ B.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (990/CEP) e pela Direção de Ensino do Hospital Pérola Byington (020/11).

Amostras de sangue de voluntárias sem sintomas clínicos de doença (controles) e pacientes com câncer de mama foram coletadas após concordaram em participar da pesquisa, por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos A e B, respectivamente).

No total, foram coletadas amostras de sangue de 45 pacientes provenientes do Hospital Pérola Byington, imediatamente antes de cirurgia para a retirada do tumor. A análise das amostras foi realizada em 39 pacientes do sexo feminino, com diagnóstico confirmado de carcinoma ductal invasivo. Seis amostras foram excluídas da análise por não se enquadrarem nos critérios estabelecidos de sexo ou tipo tumoral. O grupo das pacientes apresentou mediana de idade de 54 anos (entre 31 e 84 anos) (Tabela 2). A maioria das pacientes analisadas possuía classificação histológica tumoral (correspondente à classificação molecular) *Her-2/neu* (28%), e as seguintes classificações histopatológicas: grau nuclear 2 (55,3%), grau histológico de Nottingham 2 (66,7%) e índice de proliferação tumoral $\geq 14\%$ (74,3%) (Tabela 3).

Já o grupo controle, composto por 42 voluntárias do sexo feminino sem sintomas clínicos da doença, apresentou mediana de idade de 29 anos (entre 20 e 58 anos) (Tabela 2). As voluntárias foram selecionadas a partir do Departamento de Imunologia do ICB ou eram acompanhantes das pacientes internadas.

Na Tabela 1 estão relacionadas as 39 pacientes analisadas e suas respectivas idades, além das seguintes informações relacionadas ao tumor, disponíveis nos prontuários das pacientes: graus nuclear (GN) e histológico (GH), características histopatológicas para os marcadores geralmente analisados em pacientes com câncer de mama – receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) e receptor de fator de crescimento de epiderme 2 (*Her-2/neu*) – índice mitótico (IM) e classificação histológica correspondente da classificação molecular.

Tabela 1 – Dados relativos às pacientes analisadas. Descrição das 39 pacientes analisadas, com diagnóstico confirmado de carcinoma ductal invasivo, e suas idades, segundo as variáveis tumorais: grau nuclear (GN) e histológico de Nottingham (GH), avaliação histopatológica para os marcadores biológicos tumorais: receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) e receptor de fator de crescimento de epiderme 2 (Her-2/*neu*), índice mitótico (IM) e classificação histológica correspondente da classificação molecular. n. a. = não se aplica; d = duvidoso.

Paciente	Idade (anos)	GN	GH	Marcadores Biológicos						IM	Classificação Histológica	
				ER	PR	Her-2/ <i>neu</i>						
P01	45	2	2	+	20%	+	20%	+	0			
P04	46	2	2	+	95%	+	95%	d	2+	+	30%	Luminal B
P06	46	2	2	+	95%	+	95%	+	3+	+	5%	Her-2/ <i>neu</i>
P07	73	2	2	+	100%	+	95%	-	1+	+	5%	Luminal A
P08	63	3	3	+	100%	+	20%	d	2+	+	80%	Her-2 duvidoso
P09	84	1	1	+	90%	-	n. a.	-	0	+	10%	Luminal A
P10	44	2	2	+	95%	+	50%	-	0	+	10%	Luminal A
P11	54	2	2	+	90%	-	n. a.	d	2+	+	70%	Her-2 duvidoso
P13	34	3	3	+	90%	+	90%	+	3+	+	70%	Her-2/ <i>neu</i>
P14	49	2	2	+	85%	+	70%	+	3+	+	30%	Her-2/ <i>neu</i>
P15	50	3	2	+	95%	+	90%	-	1+	+	10%	Luminal A
P16	52	2	2	+	100%	+	100%	-	1+	+	60%	Luminal B
P17	42	3	2	+	100%	+	100%	-	0	+	5%	Luminal A
P18	60	2		+	60%	+	80%	-	1+	+	5%	Luminal A
P19	59	2		+	90%	+	90%	-	0	+	20%	Luminal B
P20	54	3	3	+	70%	+	90%	+	3+	+	20%	Her-2/ <i>neu</i>
P22	58	3	2	+	100%	+	30%	+		+	40%	Her-2/ <i>neu</i>
P23	46	3	3	+	40%	-	n. a.	d	2+	+	2+	Her-2 duvidoso
P25	65	2	1	+	100%	+	100%	d	2+	+	30%	Her-2 duvidoso
P26	62	2	2	+	100%	+	20%	-	0	+	60%	Luminal B
P27	53	2	2	+	90%	+	40%	-		+	40%	Luminal B
P28	49	2	2	+		-		+	3+	+	20%	Her-2/ <i>neu</i>
P29	56	3	3	+	80%	+	30%	-	0	+	20%	Luminal B
P30	56	2	2	+	100%	+	80%	-	1+	+	50%	Luminal B
P31	44			-	n. a.	-	n. a.	-		+	80%	Triplo negativo
P32	65	2	2	+	100%	+	60%	+	3+	+	40%	Her-2/ <i>neu</i>
P33	31	3	3	-	n. a.	-	n. a.	-	0	+	80%	Triplo negativo
P34	54	2	2									
P35	46	2	2	-	n. a.	-	n. a.	d		+	50%	Her-2 duvidoso
P36	55	2	2	+	10%	-	n. a.	-	0	+	<14%	Luminal A
P37	57	3	3	-	n. a.	-	n. a.	+	3+	+	20%	Her-2/ <i>neu</i>
P38	46	3	3	-	n. a.	-	n. a.	d		+	10%	Her-2 duvidoso
P39	69	2	2	+	100%	+	100%	-	0	+	10%	Luminal A
P40	60	3	3									
P41	47	3	3									
P42	63	3	2	+	100%	+	50%	+	3+	+	40%	Her-2/ <i>neu</i>
P43	36	3	2	+	100%	+	80%	d	2+	+	50%	Her-2 duvidoso
P44	36	2	2	+	100%	+	20%	-	0	+	30%	Luminal B
P45	55	3	2	-	n. a.	-	n. a.	+	3+	+	40%	Her-2/ <i>neu</i>

Tabela 2 – Frequência das faixas etárias por grupo. Frequência de pacientes e voluntárias segundo as faixas etárias. DP = desvio padrão.

Idade	Pacientes		Voluntárias	
	N	%	N	%
≤ 35 anos	2	5,1	31	73,8
36 a 50 anos	15	38,5	6	14,3
51 a 70 anos	20	51,3	5	11,9
≥ 71 anos	2	5,1	0	0
Total	39	100%	42	100%
Mediana	54		29	
Varição	31 a 84 anos		20 a 58 anos	

Tabela 3 – Frequência de pacientes segundo variáveis tumorais. Frequência de pacientes segundo às variáveis tumorais: Classificação Histológica, Grau Nuclear, Grau Histológico e Índice de Proliferação.

Variável	N	%
Classificação Histológica		
Luminal A	8	22,8
Luminal B	8	22,8
Triplo negativo	2	5,7
Her-2/ <i>neu</i>	10	28,6
Her-2 duvidoso	7	20
Total	35	100%
Grau Nuclear		
1	1	2,6
2	21	55,3
3	16	42,1
Total	38	100%
Grau Histológico		
1	2	5,5
2	24	66,7
3	10	27,8
Total	36	100%
Índice de Proliferação		
< 14%	9	25,7
≥ 14%	26	74,3
Total	35	100%

3.2 Coleta de sangue periférico, seleção de monócitos e diferenciação em DCs

Para a purificação de células mononucleares do sangue periférico, cerca de 30 mL de sangue foram coletado em tubo contendo anticoagulante heparina e distribuídos em dois tubos cônicos de 50 mL contendo 12 mL de *Ficoll-Paque Plus* (GE Healthcare) por tubo. O material foi centrifugado a 900 g a 18 °C por 30 minutos (raio do rotor: 14,5 cm). A camada de células mononucleares formada foi retirada com auxílio de pipeta Pasteur, colocada em outro tubo contendo meio RPMI 1640 e centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos. As células foram lavadas por mais duas vezes a 1100 rpm e 900 rpm, respectivamente, para eliminação das plaquetas. O botão celular foi coletado, as células quantificadas e ressuspensas em 10 mL de solução tampão gelada (*autoMACS Rising Solution* (Miltenyi Biotec) + PBS-BSA 0,5%) e centrifugadas a 300 g a 4 °C por 10 minutos. Vale ressaltar que, em alguns experimentos, conforme indicados, as células mononucleares do sangue periférico foram obtidas a partir de câmaras de leucorredução provenientes da doação de plaquetas por aférese.

Em seguida, para a separação magnética dos monócitos a partir das células

mononucleares do sangue periférico (PBMCs) realizou-se seleção negativa com a utilização de microesferas magnéticas (*Monocyte Isolation Kit II*, Miltenyi Biotec). As células foram ressuspensas em 30 μL desse mesmo tampão para cada 10^7 células. Adicionou-se 10 μL para cada 10^7 células de *FcR blocking reagent* e de *Biotin Ab-cocktail*, a fim de bloquear a ligação dos anticorpos aos receptores Fc presentes nas células e de marcar com anticorpos conjugados à biotina as células CD3^+ , CD7^+ , CD16^+ , CD19^+ , CD56^+ , CD123^+ e Glicoforina A^+ , respectivamente. Essa mistura foi homogeneizada e incubada por 15 minutos a 4 °C. Adicionou-se 30 μL da solução tampão para cada 10^7 células, seguido da adição de 20 μL de *anti-Biotin microbeads* para cada 10^7 células, ou seja, anticorpos anti-Biotina conjugados a microesferas magnéticas. Essa mistura foi homogeneizada e incubada por 20 minutos a 4 °C. Após a incubação, retirou-se os anticorpos não ligados pela adição de 2 mL de tampão para cada 10^7 células seguida de centrifugação a 300 g a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi completamente aspirado com pipeta e as células ressuspensas em 500 μL da solução tampão. A coluna de separação magnética (MS ou LS, Miltenyi Biotec) foi acoplada ao separador magnético (*MACS-sorting*, Miltenyi Biotec) e preparada com a adição da solução tampão (500 μL para MS ou 3 mL para LS). Após o tampão ter penetrado a coluna, as células foram adicionadas. A coluna foi lavada três vezes, utilizando-se por vez o volume descrito para cada coluna, e o efluente, composto da fração monocítica (não marcada) coletado. Estas células foram centrifugadas a 300 g a 18 °C por 10 minutos, ressuspensas em meio AIM-V (Invitrogen) e contadas. A qualidade da seleção foi avaliada por citometria de fluxo por marcação das células antes e depois da seleção com o anticorpo para a molécula CD14 (Figura 3).

Em alguns experimentos, conforme indicados, os monócitos foram selecionados positivamente com a utilização de microesferas magnéticas específicas para a molécula CD14 (*CD14 MicroBeads*, Miltenyi Biotec). O protocolo utilizado foi semelhante ao descrito para seleção negativa. Após quantificação, ressuspensão em 10 mL de solução tampão gelada (*autoMACS Rising Solution* (Miltenyi Biotec) + PBS-BSA 0,5%) e centrifugação a 300 g a 4 °C por 10 minutos, o botão celular resultante foi ressuspendido em 80 μL de tampão para cada 10^7 células seguido da adição de 20 μL para cada 10^7 células de microesferas magnéticas conjugadas a anticorpo anti-CD14. Essa mistura foi homogeneizada e incubada a 4 °C por 30 minutos. Após a incubação, retirou-se os anticorpos não ligados pela

adição de 2 mL de tampão para cada 10^7 células seguida de centrifugação a 300 g a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi completamente aspirado com pipeta e as células ressuspendidas em 500 μ L da solução tampão. A preparação da coluna foi realizada da mesma maneira, conforme indicado para a seleção negativa. Após as três lavagens da coluna com tampão, esta foi removida do suporte magnético e acoplada em tubo cônico. Adicionou-se 2X 1 ou 5 mL de tampão à coluna, a depender da coluna utilizada (MS ou LS), e com o auxílio do êmbolo, as células retidas foram coletadas. Estas células foram centrifugadas a 300 g a 18 °C por 10 minutos, ressuspendidas em meio AIM-V (Invitrogen) e contadas.

Por fim, para a indução de diferenciação de monócitos em células dendríticas, estes foram plaqueados em placa de 24 poços (10^6 células por poço) na presença de 50 ng/mL de IL-4 e 50 ng/mL de GM-CSF por cinco dias. Ao quinto dia, as células dendríticas imaturas foram ativadas pela adição de 50 ng/mL de TNF- α por diferentes tempos. Vinte e quatro horas para a avaliação da expressão nuclear de NF- κ B, 24 ou 48 horas para avaliação do fenótipo das moléculas de membrana das DCs e 1 ou 2 horas, conforme indicado, para avaliação da expressão gênica. Em alguns experimentos, conforme indicados, utilizou-se 100 ng/ μ L de LPS ou ainda coquetel de ativação (10 ng/mL de TNF- α , 10 ng/mL de IL-1 β , 10 ng/mL de IL-6 e 1 μ g/mL de PGE-2) para a ativação das DCs ao quinto dia, por diferentes tempos.

Para remoção das células da cultura, os sobrenadantes, contendo células em suspensão foram transferidos para um tubo cônico de 15 mL e centrifugados a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com pipeta, aliquoteado e armazenado a -80 °C para posterior análise de citocinas. O botão celular foi ressuspendido com PBS gelado. As células ainda aderidas à placa foram retiradas por pipetagem com PBS gelado e reunidas às demais células. As células foram novamente centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos e o botão celular foi ressuspendido com 1 mL de PBS acrescido dos agentes DTT (1 mM) e PMSF (0,1 mM) imediatamente descongelados (PBS-extração), no caso de extração de proteínas nucleares, PBS gelado (no caso de extração de mRNA) ou de PBS suplementado com 0,5% soroalbumina bovina – BSA – e acrescido de 0,02% de azida sódica (tampão para citometria), no caso de marcação fenotípica para citometria de fluxo. Após, as células foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 segundos em tubos cônicos de 1,5 mL para a formação de botão celular. O sobrenadante foi completamente removido com pipeta e (i) as células congeladas a -

80 °C para posterior extração de proteínas, ou (ii) ressuspensas com 1 mL de Trizol e congeladas a -80 °C para posterior extração de mRNA ou (iii) ressuspensas com tampão para citometria para proceder com o protocolo de marcação fenotípica para citometria de fluxo.

Para a obtenção de monócitos, também avaliados quanto à expressão das moléculas de superfície por citometria de fluxo e quanto à presença de NF-κB no núcleo, uma alíquota da fração monocítica recém selecionada foi coletada para marcação ou congelada a -80 °C para posterior extração de proteínas nucleares, respectivamente.

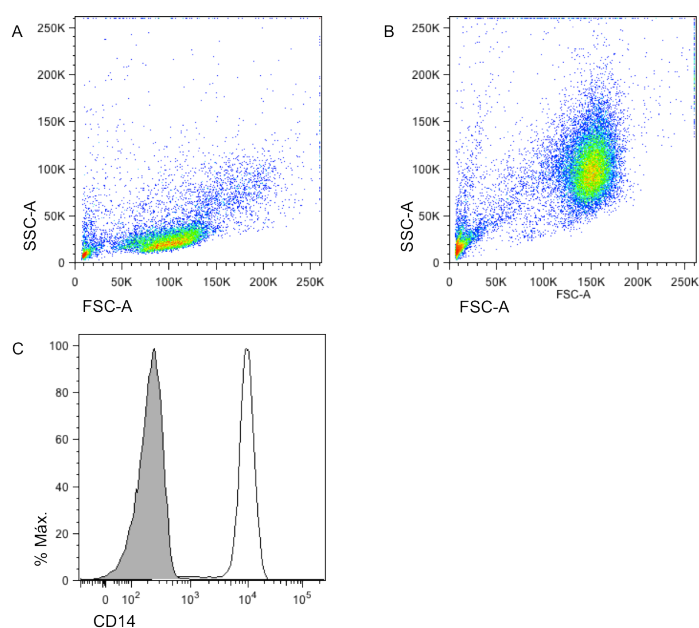


Figura 3 – Análise da pureza de monócitos após seleção negativa. Gráficos pseudo-coloridos de tamanho por granulosidade (FSC-A x SSC-A) antes (A) e após (B) a seleção negativa de monócitos com auxílio de coluna magnética, mostrando o enriquecimento da população com os parâmetros esperados de monócitos. O histograma (C) da população selecionada mostra positividade para a molécula CD14 – histograma vazio – em relação a células não marcadas – histograma cheio.

3.3 Marcação das células para citometria de fluxo e análise

Para determinação do fenótipo de membrana de monócitos (Mos), DCs imaturas (iDCs) e maduras (mDCs), essas células foram marcadas com anticorpos monoclonais comerciais para as seguintes moléculas de membrana: CD14, CD11c, HLA-DR, CD80, CD86, CD40, CD83, PD-L1 (CD274), CCR5 (CD195) e CCR7 (CD197), de acordo com a Tabela 4.

As células obtidas em cultura foram colocadas em tubos de 1,5 mL

(Eppendorf) contendo a concentração de 1×10^5 células/mL. As amostras foram centrifugadas/lavadas 3 vezes a 13000 rpm por 10 segundos em 200 μ L de tampão para citometria (PBS suplementado com 0,5% soroalbumina bovina – BSA – e acrescido de 0,02% de azida sódica). Ao *pellet* obtido foram adicionados anticorpos específicos de cada marcação e após adição dos anticorpos as amostras foram incubadas por 20 minutos a 4 °C, ao abrigo da luz. Ao término da incubação, foram adicionadas às amostras 200 μ L de PBS-BSA 0,5%, e foram centrifugadas a 13000 g por 10 segundos. O sobrenadante foi dispensado, e o processo de lavagem repetido por duas vezes. Ao final da lavagem, o sobrenadante foi dispensado e a amostra ressuspensa em 300 μ L de PBS-BSA 0,5% formaldeído 2%, para fixar as células marcadas. A leitura das células foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II com o *software* FACSDiva (BD Biosciences).

Tabela 4 – Dados referentes aos anticorpos murinos usados para citometria de fluxo. Tabela de anticorpos monoclonais, indicando a especificidade do anticorpo (molécula), o clone, o isotipo e a cor, utilizados para citometria de fluxo de monócitos e células dendríticas. Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Biosciences.

Molécula	Clone	Isotipo	Cor
CD14	M5E2	IgG _{2a} , K	FITC
CD11c	B-ly6	IgG ₁ , K	PE-Cy5
HLA-DR	G46-6	IgG _{2a} , K	V500
CD1a	HI149	IgG ₁ , K	FITC
CD80	L307.4	IgG ₁ , K	PE
CD86	2331 (FUN-1)	IgG ₁ , K	APC
CD40	5C3	IgG ₁ , K	APC-H7
CD83	HB15e	IgG ₁ , K	APC
PD-L1 (CD274)	MIH1	IgG ₁ , K	PE
CCR5 (CD195)	2D7/CCR5	IgG _{2a} , K	FITC
CCR7 (CD197)	3D12	IgG _{2a} , K	PE-Cy7

3.3.1 Análise fenotípica

A análise fenotípica das células foi realizada com o auxílio do *software* FlowJo versões 8.7 ou X 10.0.7r2 ou para Macintosh (TreeStar). Empregaram-se duas formas de análise, que levaram a resultados semelhantes. Em uma delas (Figura 4) partiu-se do gráfico de tamanho-área por altura (FSC-A x FSC-H), em que se delimitou um *gate* para a seleção dos *singlets*, eliminando tanto *doublets* quanto *debris* celulares (Figura 4B). A partir deste *gate*, delimitou-se um segundo *gate* para seleção das células HLA-DR⁺, a partir do qual as demais análises fenotípicas foram realizadas (Figura 4C). Em uma outra forma de análise (Figura 5), os *debris*

celulares foram removidos pela delimitação de um *gate* contendo células com tamanho e granulosidade característicos das células em análise (Figura 5A), a partir de qual as células cuja membrana se encontrava íntegra pela menor marcação com o corante Live/Dead foram novamente selecionadas (Figura 5B). Por fim, delimitou-se um terceiro *gate* para seleção das células HLA-DR⁺, a partir do qual as demais análises fenotípicas foram realizadas (Figura 5C).

Para a análise da Intensidade Mediana de Fluorescência relativa (rMFI) das moléculas de interesse nas células positivas para tais moléculas, os valores encontrados foram normalizados pela divisão pelo valor daquele fluorocromo nas células sem marcação.

Vale ressaltar que a análise de expressão e rMFI de HLA-DR, em particular, foi realizada na população de *singlets* ou de células “*Live*”, portanto antes da delimitação do *gate* das células HLA-DR⁺, onde as demais análises fenotípicas foram realizadas.

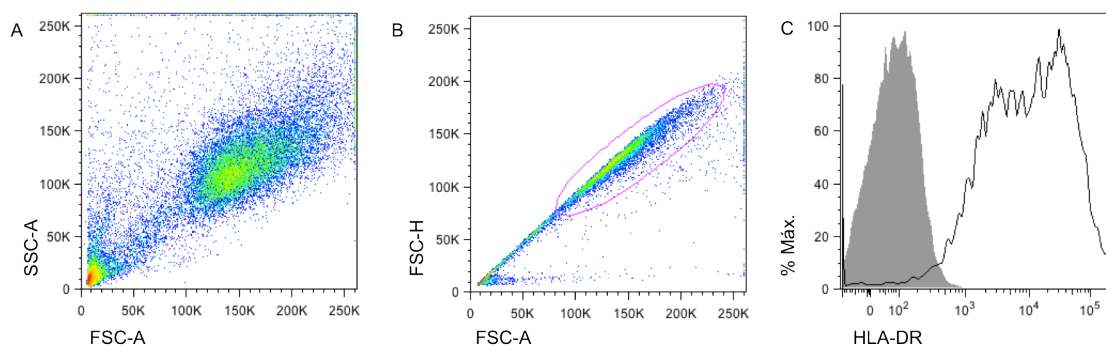


Figura 4 – Primeira forma de análise das células por citometria de fluxo. A: Gráfico pseudo-colorido de tamanho por granulosidade (FSC-A x SSC-A) indicando células dendríticas maduras, com tamanho e granulosidade esperados para DCs do sétimo dia da cultura. B: Gráfico pseudo-colorido de tamanho de área por altura (FSC-A x FSC-H) indicando o *gate* para a seleção de *singlets*. C: Histograma indicativo do *gate* para seleção da população HLA-DR⁺ – histograma vazio – em relação a células não marcadas – histograma cheio.

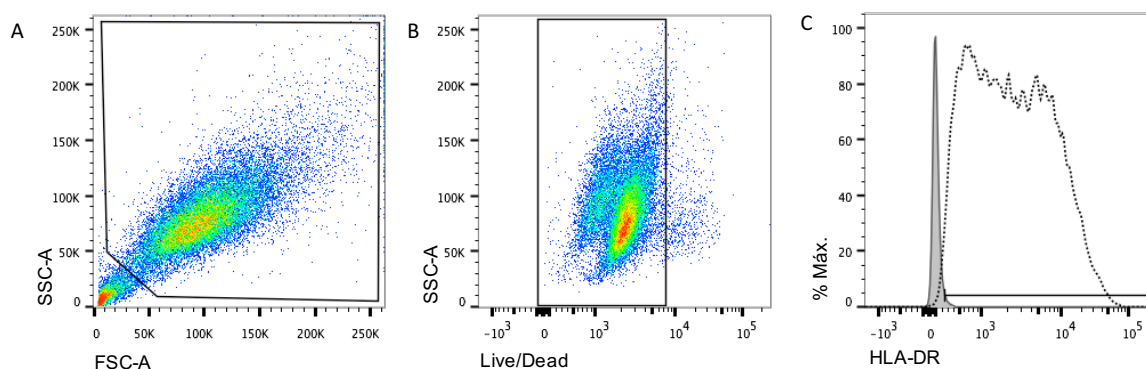


Figura 5 – Segunda forma de análise das células por citometria de fluxo. A: Gráfico pseudo-colorido de tamanho por granulosidade (FSC-A x SSC-A) indicando células dendríticas imaturas, com tamanho e granulosidade esperados para iDCs do quinto dia da cultura. B: Gráfico pseudo-colorido de granulosidade pelo fluorocromo do corante *Live/Dead* (SSC-A x *Live/Dead*) indicando o *gate* para a seleção das células cuja membrana encontrava-se íntegra. C: Histograma indicativo do *gate* para seleção da população HLA-DR⁺ – histograma vazio – em relação a células não marcadas – histograma cheio.

3.4 Extração de proteínas nucleares e citosólicas

As células dendríticas ou monócitos, obtidos nas condições descritas, centrifugados e congelados a -80°C , foram descongelados e ressuspensos em $400\ \mu\text{L}$ de tampão de lise gelado (10 mM de HEPES pH 7,5, 10 mM de KCl, 0,1 mM de EDTA pH 8,0, Glicerol 10%, 1 mM de DTT recém descongelado e 0,1 mM de PMSF recém descongelado) e mantidos no gelo por 15 minutos. Em seguida adicionou-se a cada amostra NP-40 10% em tampão de lise, e com auxílio de vórtex, as amostras foram lisadas por agitação vigorosa por 10 segundos. Após, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm a 4°C por 1 minuto, e o sobrenadante resultante (extrato citoplasmático) foi descartado. O botão formado por núcleos foi lavado por ressuspensão com $100\ \mu\text{L}$ de tampão de lise gelado e centrifugado a 13000 rpm a 4°C por 1 minuto. Ao final dessa centrifugação, ressuspendeu-se o botão nuclear com a adição de 20 a $50\ \mu\text{L}$ de tampão de extração nuclear gelado (10 mM de HEPES pH 7,5, 500 mM de KCl, 0,1 mM de EDTA pH 8,0, Glicerol 10%, 1 mM de DTT recém descongelado e 0,1 mM de PMSF recém descongelado). As amostras foram incubadas em agitador a 1400 rpm a 4°C por 15 minutos e depois centrifugadas a 13000 rpm a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante (extrato nuclear) foi coletado, transferido para novo microtubo e estocado a -80°C . (Método adaptado de SCHREIBER et al., 1989). No dia do ensaio de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA; do inglês, *electrophoretic mobility gel shift assay*) ou do ensaio de redução adicional da mobilidade eletroforética

(*supershift*) a quantificação protéica foi realizada a 280 nm no espectrofotômetro ND-1000 (Nanodrop).

3.5 Western Blot

Os extratos nuclear e citoplasmático, obtidos pela técnica de extração descrita anteriormente, foram submetidos à técnica de Western Blot para avaliar a integridade das proteínas extraídas e a possível contaminação do extrato nuclear com proteínas provenientes do extrato citoplasmático, utilizando-se anticorpos específicos para β -actina e CD80, respectivamente.

Utilizou-se a quantidade de 50 μ g de proteína por amostra, que foram preparadas adicionando-se tampão de amostra às proteínas, na relação v/v 1:4. Estas foram aplicadas em um gel 10% SDS-PAGE e a corrida realizada a 60 V (gel de empacotamento) e 120 V (gel de corrida) até que o corante azul de bromofenol presente no tampão de amostra tenha deixado o gel. Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose, via semi-seca, por eletroforese a 15 V por 35 minutos em tampão de transferência. Após a transferência, a membrana foi bloqueada e marcada utilizando o sistema SNAP-ID (Millipore, Billerica, MA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O bloqueio de sítios inespecíficos da membrana de nitrocelulose foi realizado com 0,5% m/v de leite desnatado em TBST (tampão Tris salino com Tween-20 0,1% (v/v)). Os anticorpos primários utilizados foram: 1:10000 *mouse* anti- β -actina (Sigma, #7076) e 1:6666,67 *rabbit* anti-CD80 (Abcam, #ab53003); e os secundários (1:1000): anti-*mouse* (Cell Signaling, #7076) e anti-*rabbit* (Cell Signaling, #7074). A membrana foi então revelada com o sistema quimioluminescente (kit ECL Plus, GE Healthcare) e o sinal visualizado no transiluminador G:Box (Syngene).

3.6 Ensaio de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA) para o NF- κ B

3.6.1 Marcação da sonda

A fita-dupla do oligonucleotídeo consenso para o NF- κ B, de sequência 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC-3' (Promega, Madison, WI, EUA), foi marcada pela adição de ATP contendo o radioisótopo 32 P na posição gama ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$). Para isso,

foram misturados em um microtubo, contendo 1 μ L de enzima T4 polinucleotídeo quinase (10 U/ μ L) (Invitrogen), os seguintes reagentes: 5 μ L de água, 5X *Exchange Reaction Buffer* (Invitrogen, fornecido com a enzima), 2 μ L de oligonucleotídeo para o NF- κ B (1,75 pmol/ μ L – Promega) e 1 μ L de [γ - 32 P]ATP (3000 Ci/mmol a 10 mCi/mL). Após incubação a 37 °C por 10 minutos, a sonda marcada foi purificada com a coluna Microspin G-25 (GE) de acordo com instruções do fabricante, e armazenada a -20 °C. No dia do ensaio, determinou-se a atividade da sonda em contador de cintilação líquida.

3.6.2 Reação de ligação e corrida do gel

No dia do ensaio, após a quantificação do extrato protéico, em microtubo cônico de 1,5 mL, fez-se a diluição do extrato protéico em água ultrapura para obtenção de 3 μ g em volume final de 15 μ L. A um tubo, denominado de sonda livre (SL) – controle negativo, adicionou-se apenas a água. Os tubos foram mantidos no gelo até a adição de 2 μ L de tampão de ligação 10X para EMSA (10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 0,5 mM DTT; and 0,5 mM EDTA; 4% Glicerol) e 2 μ L de Poly(dIdC) (1 μ g/ μ L) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) por amostra. Estas foram centrifugadas a 2000 g a 4 °C por 30 segundos e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos. Adicionou-se em seguida 1 μ L de sonda marcada (aproximadamente 30 000 cpm) por amostra. Estas foram novamente centrifugadas a 2000 g a 4 °C por 30 segundos e incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. Por fim, adicionou-se 2 μ L de tampão de corrida 10X sem corante (250 mM Tris-HCl, pH 7,5; 40% Glicerol) às amostras, e 2 μ L de tampão de corrida 10X contendo azul de bromofenol (250 mM Tris-HCl, pH 7,5; 40% Glicerol, 0,2% Azul de Bromofenol) ao tubo controle negativo. Para os ensaios de *supershift*, após a diluição do extrato nuclear protéico, adicionou-se 1 μ L de anticorpo específico para cada uma das proteínas da família Rel (anti-p50, anti-p52, anti-p65, anti-RelB e anti-cRel – Santa Cruz Biotechnology: sc-114x, sc-298x, sc-109x, sc-226x e sc-70x, respectivamente), com incubação da amostra a temperatura ambiente por 45 minutos. Em seguida, o EMSA foi realizado como descrito anteriormente.

O conteúdo total da reação foi separado por eletroforese a 150 V por 1,5 hora em gel de poliácridamida 6% (acrilamida/bisacrilamida 37,5 : 1), em tampão TBE 0,25X (10X: 0,9 M Tris; 0,9 M Ácido Bórico; 10 mM EDTA), após pré-corrída do gel a 150 V por 20 minutos. Ao final da corrida, secou-se o gel a vácuo, procedendo-se em seguida

a exposição do filme (Kodak Biomax MS – Sigma-Aldrich) ao gel em cassete por 24 a 48 horas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a revelação e escaneamento do filme (ANEXO C), a intensidade das bandas foi quantificada por densitometria com auxílio do *software* ImageJ (versão 1.48r).

3.7 *Citometric Bead Array* (CBA) para avaliação de citocinas no sobrenadante de culturas para diferenciação em DCs

Para análise de citocinas (IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-12p70 e IL-10) nos sobrenadantes de culturas para diferenciação em DCs, retirados no quinto dia da cultura, após 1, 24 e/ou 48 horas da ativação com TNF- α , e congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o dia do ensaio, utilizou-se o kit *Citometric Bead Array* (BD Biosciences). De acordo com as instruções do fabricante, a concentração de citocinas é baseada em uma curva padrão, obtida por meio de diluição da amostra padrão do kit. Foram realizadas diluições seriadas de 1:2 a 1:256, que corresponderam às concentrações de 5000 a 20 pg/mL. Foram adicionados 50 μL da mistura de *beads* de captura de citocinas para cada tubo da amostra e curva padrão. Foram adicionados 50 μL do reagente de detecção nos tubos contendo as amostras e curva padrão, com exceção do controle negativo. Em seguida, as amostras foram incubadas por 3 horas a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, foi adicionado 1 mL de tampão de lavagem em cada tubo e o material foi centrifugado a 1500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi retirado por inversão e foram adicionados 300 μL do tampão de diluição da amostra em cada tubo para aquisição em citômetro. Após a calibração do citômetro, de acordo com as instruções do fabricante, procedeu-se com a leitura das amostras, realizada no mesmo dia do preparo das mesmas.

3.8 Extração de RNA total

O RNA total de 5 a 10×10^6 células foi extraído com adição de 1 mL de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e ressuspensão vigorosa com auxílio de pipeta. As amostras foram então incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente para a completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio e os tubos fechados contendo as amostras foram agitados manualmente de forma vigorosa por 15 segundos. Estas foram então incubadas de 2 a 3 minutos à

temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa incolor superior, contendo o RNA, foi retirada e transferida para outro tubo. O RNA foi então precipitado adicionando-se 0,5 mL de álcool isopropílico e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12000 g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75% em água tratada com dietil dicarbonato (DEPC). Após leve agitação, as amostras foram centrifugadas a 7500 g por 5 minutos a 4 °C, o sobrenadante removido e o precipitado seco à temperatura ambiente. Por fim, o RNA foi dissolvido em água DEPC para um volume de 15 µL e armazenado a -80 °C para posterior quantificação pelo espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 no comprimento de onda de 260 nm e avaliação da qualidade da extração (A_{260}/A_{280}). A integridade do RNA extraído foi avaliada pela visualização de duas bandas fortes correspondentes aos RNAs das subunidades ribossomais 18S e 28S, após eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com *GelRed Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, Hayward, CA, EUA) (Figura 6).

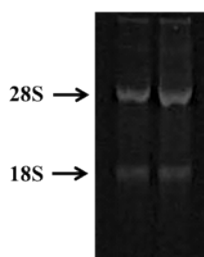


Figura 6 – Eletroforese do produto de extração de RNA evidenciando bandas características. Fotografia digital da eletroforese em gel de agarose do produto de extração de RNA total. Após extração do RNA total de monócitos ou células dendríticas, o produto de extração foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0%, em que se observou o padrão de migração dos RNAs das subunidades ribossomais 18S e 28S.

3.9 Transcrição reversa, PCR e PCR em tempo real para genes selecionados

Para avaliar a expressão dos genes da família Rel (NF-κB1, NF-κB2, p65, RelB e cRel) bem como de genes relacionados com a maturação e a ativação das DCs (CD80, CD86, CD83, CD40, HLA-DR, IL-8), a expressão destes sendo regulada por NF-κB, utilizou-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real com o kit SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

Para tanto, amostras de RNA de iDCs e DCs estimuladas com TNF-α por 1 h foram submetidas à transcrição reversa (RT) para obtenção do DNA complementar

(cDNA), que por sua vez foi amplificado por PCR em tempo real com a utilização de *primers* específicos. Assim, amostras de 500 ng de RNA total extraído íntegro foram diluídas para 11 μL com água DEPC em microtubo livre de RNase de 0,5 mL. A essas amostras adicionou-se 1 μL de oligo(dT)₁₈ *primer* (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Este se hibridiza por complementaridade na cauda 3'poli(A) presente no RNA mensageiro maduro. As amostras foram então incubadas no termociclador a 70 °C por 5 minutos, seguido de incubação a 25 °C por 10 minutos, durante a qual adicionou-se por amostra um volume de 8 μL contendo 4 μL de tampão da RT (5X) , 2 μL de mix de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) (2,5 mM), 1 μL de ditioneitol (DTT) (0,1 M) e 1 μL da enzima transcriptase reversa SuperScript™ III (Invitrogen Life Technology) (200 U/ μL). As condições seguintes no termociclador foram 42 °C por 1 hora e 15 minutos e 70 °C por 15 minutos. As amostras de cDNA assim obtidas foram então armazenadas a -20 °C. Para garantir que houve a síntese correta do cDNA para a reação de PCR em tempo real, as amostras foram primeiramente amplificadas por uma reação de PCR tradicional em que se utilizaram *primers* para o gene β -actina. A mistura da reação de PCR (25 μL) consistiu de 2,5 μL do tampão (10X), 0,75 μL de MgCl_2 (50 mM), 2,0 μL do mix de dNTPs (2,5 mM), 1,25 μL de cada *primer* (10 pmol/ μL), 0,2 μL da enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen) (5U/ μL) e 1 μL do cDNA. As condições para a reação no termociclador consistiram de uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 60 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, com uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Após eletroforese em gel de agarose 1% corado com *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium) e visualização da banda única correspondente ao produto esperado, prosseguiu-se com a PCR em tempo real. Cada reação (12,5 μL) foi composta por 6,25 μL de SYBR, 4,25 μL de água ultrapura autoclavada, 0,375 μL de cada *primer* (10 pmol/ μL) e 1 μL de cDNA (previamente diluído a 1:10). As condições para a reação foram: 95 °C por 10 minutos para a ativação da enzima AmpliTaq Gold DNA Polimerase presente no SYBR mix, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto, seguido da curva de dissociação (95 °C por 1 minuto, 60 °C por 30 segundos e 95 °C por 30 segundos). A reação de PCR em tempo real foi realizada no equipamento QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems).

3.9.1 Desenho dos primers

Para avaliar a expressão dos genes selecionados, foram desenhados *primers* específicos para amplificação por PCR em tempo real. Um par de *primers* foi desenhado para avaliar a expressão do gene constitutivo β -actina, necessário para a normalização dos resultados. Os *primers* foram desenhados com base nas seqüências de cDNAs presentes no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com o auxílio do *software* PRIMER 3, e sintetizados pela Invitrogen Life Technologies. Restringiu-se o tamanho do produto amplificado para até 200 pb, com anelamento dos *primers* em éxons diferentes. As seqüências dos *primers*, números de identificação das seqüências dos cDNA do banco de dados do NCBI e tamanhos do produto amplificado estão descritos na Tabela 5. Uma PCR comum foi realizada com esses pares de *primers* para avaliar a qualidade dos mesmos (Figura 7).

Tabela 5 – Seqüências dos *primers* para PCR em tempo real. Seqüências dos *primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real. Seqüências dos *primers* *foward* (F) e *reverse* (R) para CD80, CD86, CD40, CD83, HLA-DR, IL-8, β -actina, p50, p52, p65, RelB, cRel, e números de identificação das seqüências de cDNA presentes no banco de dados do NCBI utilizadas para o desenho desses.

Gene	Seqüências dos <i>primers</i>	#NCBI	Tamanho do produto
CD80	F5'-AGGGAACATCACCATCCAAG-3' R5'-TGCCAGTAGATGCGAGTTTG-3'	NM_005191	181 pb
CD86	F5'-TGTACGACGTTTCCATCAGC-3' R5'-ATCCAAGGAATGTGGTCTGG-3'	NM_006889 NM_175862	160 pb
CD40	F5'-CGGGTCCAGCAGAAGGGCAC-3' R5'-CTGGGCAGGGCTCGCAGATG-3'	NM_001250.4	175 pb
CD83	F5'-CTTGCTCCGAAGATGTGGAC-3' R5'-CTCTCTTCACCACCCTCCAA-3'	NM_004233.3 NM_001040280.1	100 pb
HLA-DR	F5'-GGTGGAGCACTGGGGCTTGG-3' R5'-ACAGAGGCCCCCTGCGTTCT-3'	NM_019111.3	197 pb
IL-8	F5'-ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC-3' R5'-AACCCCTCTGCACCCAGTTTTTC-3'	NM_000584	112 pb
β -actina	F5'-ACGAAACTACCTTCAACTCCATCAT-3' R5'-ATGATCTTGATCTTCATTGTGCTG-3'	NM_001101.3	166 pb
NF- κ B1	F5'-CGTGAAGATGCTGCTGGCCGT-3' R5'-CCAAGTGCAAGGGCGTCTGGT-3'	NM_003998	194 pb
NF- κ B1	F5'-GCTGGGGATCTGCGCCGTTT-3' R5'-CGCTGCTCGGCCCTCCGTAAG-3'	NM_002502	168 pb

Gene	Seqüências dos <i>primers</i>	#NCBI	Tamanho do produto
p65/RelA	F5'-CTCAAGATCTGCCGAGTGAAC-3' R5'-GTCCCGTGAAATACACCTCAAT-3'	NM_021975	112 pb
RelB	F5'-GATTTGCCGAATTAACAAGGAA-3' R5'-GCTGAACACCACTGATATGTCC-3'	NM_006509	103 pb
cRel	F5'-GCCTCCGGTGCCTATAACCCG-3' R5'-ATGCTGCCTGCTGATCGCC-3'	NM_002908	101 pb

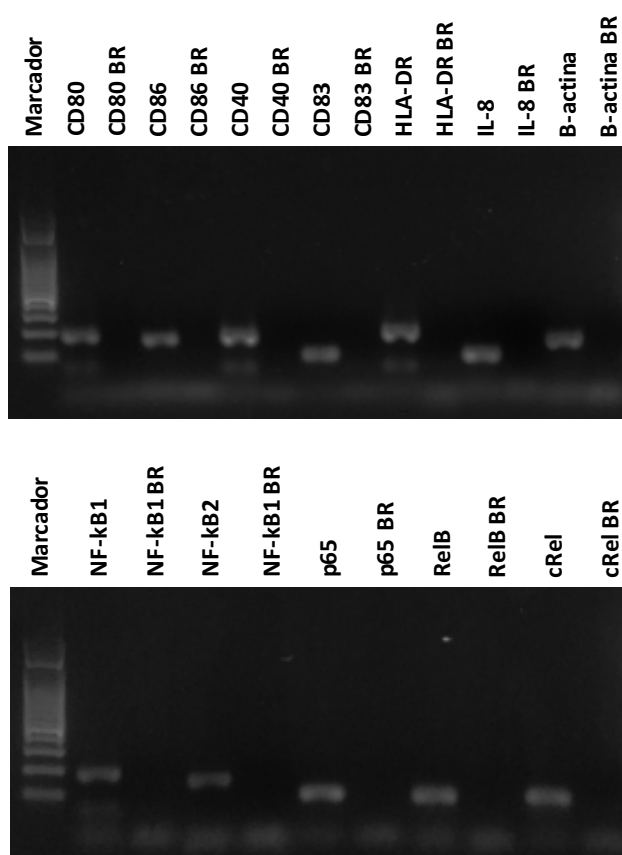


Figura 7 – Eletroforese dos produtos de PCR dos genes avaliados por PCR em tempo real. Fotografia digital da eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto da reação em cadeia da polimerase, realizada para avaliação da qualidade dos pares de *primers* desenhados para amplificar os cDNAs: CD80, CD86, CD40, CD83, HLA-DR, IL-8, β -actina, NF-kB1, NF-kB2, p65, RelB e cRel, e respectivos controles negativos (BR: branco). Marcador = marcador de peso molecular (100pb).

3.9.2 Análise dos resultados de PCR em tempo real

O método matemático utilizado para quantificar a expressão dos mRNAs de interesse foi o método Ct (*Threshold cycle*) comparativo (LIVAK e SCHMITTGEN,

2001). Segundo o método Ct comparativo, subtrai-se o Ct da amostra de interesse pelo Ct do gene constitutivo dessa mesma amostra, no caso, β -actina, dando origem ao valor Δ Ct. Em seguida, calcula-se o $\Delta\Delta$ Ct, que trata da diferença entre o valor de Δ Ct de uma amostra em questão e o Δ Ct de uma amostra calibradora, à qual todas as amostras farão referência. Neste projeto, no experimento de cinética de expressão dos mRNAs das subunidades de NF- κ B (item 4.5), utilizaram-se os valores de Δ Ct do monócito, na análise de expressão dos mRNAs das subunidades pelo tempo, e do grupo p65/RelA, no caso da análise dos mRNAs de uma subunidade em relação as demais em cada tempo, como amostras calibradoras. Por fim, calcula-se o valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, obtendo-se, assim, a expressão relativa de determinado gene de interesse. Este método parte do princípio de que a eficiência da reação de amplificação do gene alvo deve ser igual à do gene constitutivo, ambas próximas de 100%. Testaram-se as eficiências de amplificação dos diferentes genes, e após constatação de eficiências acima de 90%, foi possível eleger esse método de análise. Para a escolha do gene constitutivo, testaram-se os genes da β -actina e GAPDH. Ambos variaram pouco entre as amostras, porém, pelo número grande de amostras e de genes analisados de uma vez por placa, apenas um deles pôde ser utilizado como gene constitutivo, tendo sido escolhido o gene da β -actina. As curvas de dissociação representativas de cada par de *primers* podem ser observadas na Figura 8.

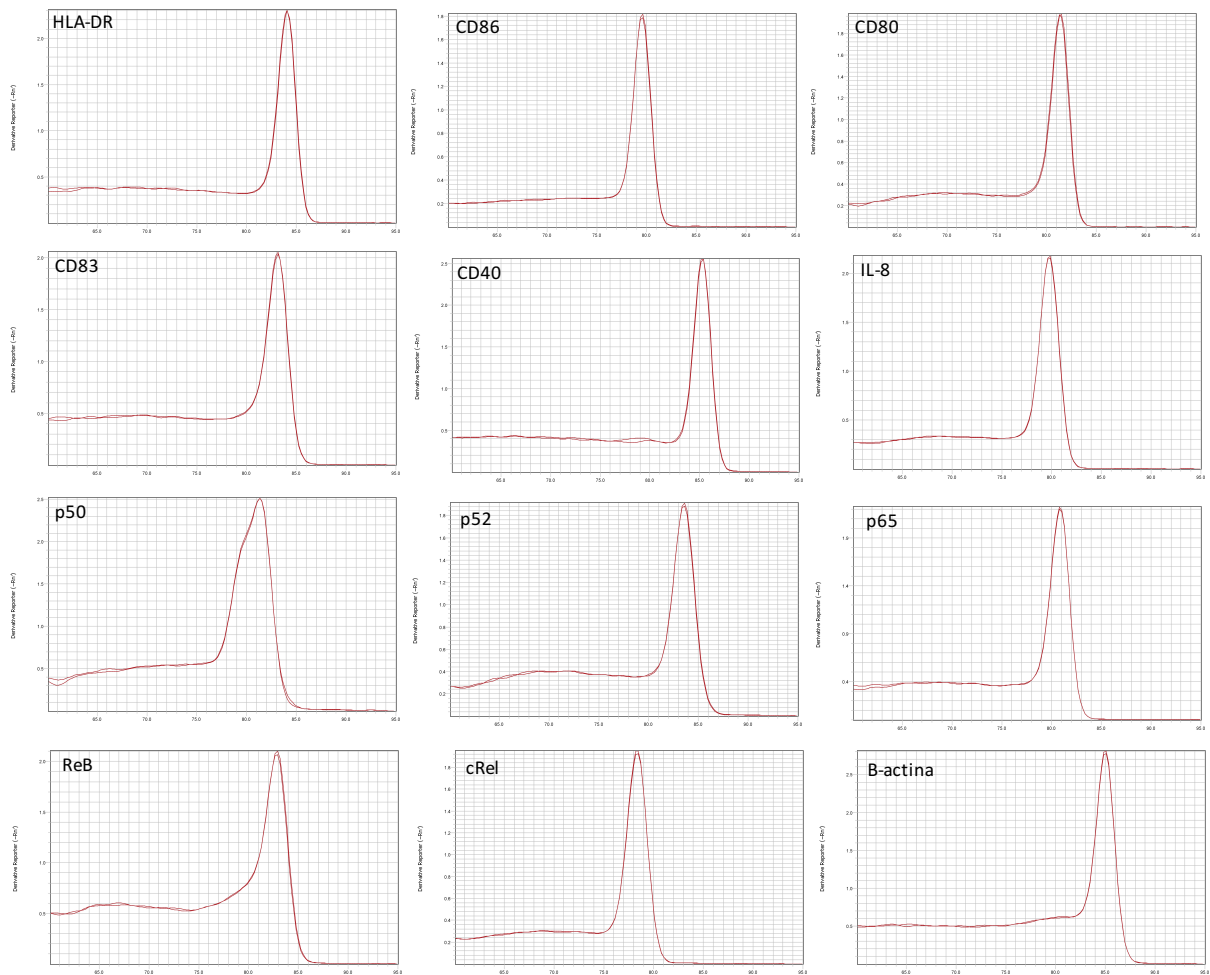


Figura 8 – Curvas de dissociação dos primers desenhados para PCR em tempo real. Curvas de dissociação representativas dos *primers* para HLA-DR, CD86, CD80, CD83, CD40, IL-8, p50, p52, p65, RelB, cRel e β -actina, obtidas por PCR em tempo real, a partir de RNA total extraído de células dendríticas. A presença de um pico único de dissociação corresponde à amplificação de um produto específico.

3.10 Arranjo de PCR em tempo real para genes relacionados com a via de NF- κ B

Para a avaliação da expressão gênica de componentes da maquinaria de sinalização mediada por NF- κ B, utilizou-se o kit comercial de placas de arranjo de PCR em tempo real (*RT² Profiler PCR Array Human NF κ B Signaling Pathway Plus* (CAT: 330231 PAHS-025YA, Qiagen) e mix de reagentes para PCR em tempo real contendo SYBR Green (*RT² SYBR Green ROX qPCR Mastermix*, CAT: 330521, Qiagen) seguindo as instruções do fabricante para o equipamento QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Cada arranjo inclui genes que codificam membros da família Rel, genes responsivos ao NF- κ B, ligantes extracelulares e receptores que ativam a via, além de quinases e fatores de

transcrição que propagam o sinal. Os estudos com estes arranjos de PCR em tempo real foram realizados com 3 amostras de pacientes e seus respectivos controles experimentais (somando 6 ensaios). Estas amostras foram selecionadas a partir dos resultados obtidos no ensaio de CBA, em que o critério de seleção foi o aumento de concentração de IL-8 no sobrenadante da cultura de pacientes em relação a seu respectivo controle experimental, após 1 h da ativação com TNF- α . Assim, as pacientes selecionadas para este ensaio foram: P40, P43 e P36, cujos sobrenadantes das culturas para diferenciação em DCs apresentaram aumentos crescentes de concentração de IL-8 em relação aos sobrenadantes das culturas dos respectivos controles experimentais, de 1,3, 1,5 e 2,4 vezes, respectivamente. Cada cDNA foi reversamente transcrito com o kit *RT² First Strand Kit* (CAT: 330401, Qiagen), seguindo as instruções do fabricante, a partir de 500 ng de mRNA total extraído com Trizol (protocolo fornecido no item 3.8 acima) de DCs do 5º dia de cultura após 1 h de ativação com TNF- α . Cada placa de PCR continha 84 poços com *primers* específicos para 84 genes relevantes à via em questão, 5 poços com *primers* específicos para genes constitutivos (β -actina, β -2-microglobulina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), hipoxantina fosforribosiltransferase-1 (HPRT-1) e proteína ribossomal, grande, P0 (RPLP0)), que possibilitam a análise pelo método Ct comparativo, e 7 controles de reação, que permitem a avaliação da performance da transcrição reversa, a determinação de contaminação com DNA genômico e a avaliação da performance da PCR em cada ensaio. Vale ressaltar que os 6 ensaios realizados passaram nos três testes de qualidade fornecidos pelas placas, garantindo a reprodutibilidade dos resultados. As corridas de PCR em tempo real foram previamente analisadas para checagem da curva de dissociação e determinação manual do *threshold* para cada gene, o qual deve ser o mesmo dentre as placas a serem submetidas à mesma análise. Em seguida, os resultados de Ct foram exportados e analisados pelo método Ct comparativo com o auxílio do *software* SABiosciences PCR Array Data Analysis, disponível *online* no endereço www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php. A normalização da expressão gênica foi realizada com base nas médias das expressões gênicas de β -actina e RPLP0, as mais constantes entre os grupos. Ainda, para as análises, determinou-se Ct de 35 como valor de corte. Na Tabela 6 consta a lista de genes examinados, a posição dos genes na placa, o número de identificação das seqüências de cDNA

presentes no banco de dados do NCBI (GenBank), o símbolo dos genes utilizado nas figuras e o nome dos genes em inglês.

Tabela 6 – Relação dos genes investigados por arranjo de PCR em tempo real. Genes examinados no arranjo de PCR em tempo real (RT² Profiler PCR Array) *Human NFκB Signaling Pathway Plus*, a posição dos genes na placa, o número de identificação das seqüências de cDNA presentes no banco de dados do NCBI (GenBank), o símbolo dos genes utilizado nas figuras e o nome dos genes em inglês.

Posição	GenBank	Símbolo	Nome do Gene
A01	NM_000029	AGT	<i>Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)</i>
A02	NM_005163	AKT1	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
A03	NM_005171	ATF1	<i>Activating transcription factor 1</i>
A04	NM_004049	BCL2A1	<i>BCL2-related protein A1</i>
A05	NM_138578	BCL2L1	<i>BCL2-like 1</i>
A06	NM_005178	BCL3	<i>B-cell CLL/lymphoma 3</i>
A07	NM_001166	BIRC2	<i>Baculoviral IAP repeat containing 2</i>
A08	NM_032415	CARD11	<i>Caspase recruitment domain family, member 11</i>
A09	NM_033292	CASP1	<i>Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)</i>
A10	NM_001228	CASP8	<i>Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
A11	NM_002982	CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
A12	NM_002985	CCL5	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i>
B01	NM_001250	CD40	<i>CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5</i>
B02	NM_003879	CFLAR	<i>CASP8 and FADD-like apoptosis regulator</i>
B03	NM_001278	CHUK	<i>Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase</i>
B04	NM_000757	CSF1	<i>Colony stimulating factor 1 (macrophage)</i>
B05	NM_000758	CSF2	<i>Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)</i>
B06	NM_000759	CSF3	<i>Colony stimulating factor 3 (granulocyte)</i>
B07	NM_005228	EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
B08	NM_001964	EGR1	<i>Early growth response 1</i>
B09	NM_005229	ELK1	<i>ELK1, member of ETS oncogene family</i>
B10	NM_003824	FADD	<i>Fas (TNFRSF6)-associated via death domain</i>
B11	NM_000639	FASLG	<i>Fas ligand (TNF superfamily, member 6)</i>
B12	NM_005252	FOS	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
C01	NM_002133	HMOX1	<i>Heme oxygenase (decycling) 1</i>
C02	NM_024013	IFNA1	<i>Interferon, alpha 1</i>
C03	NM_000619	IFNG	<i>Interferon, gamma</i>
C04	NM_001556	IKBKB	<i>Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta</i>
C05	NM_003639	IKBKG	<i>Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma</i>
C06	NM_000572	IL10	<i>Interleukin 10</i>
C07	NM_000575	IL1A	<i>Interleukin 1, alpha</i>
C08	NM_000576	IL1B	<i>Interleukin 1, beta</i>
C09	NM_000877	IL1R1	<i>Interleukin 1 receptor, type I</i>
C10	NM_001569	IRAK1	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>
C11	NM_001570	IRAK2	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 2</i>
C12	NM_002228	JUN	<i>Jun proto-oncogene</i>
D01	NM_000595	LTA	<i>Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)</i>
D02	NM_002342	LTBR	<i>Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)</i>
D03	NM_173844	MALT1	<i>Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1</i>
D04	NM_005921	MAP3K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>
D05	NM_002468	MYD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene (88)</i>

Posição	GenBank	Símbolo	Nome do Gene
D06	NM_002502	NFKB2	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100)</i>
D07	NM_006092	NOD1	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1</i>
D08	NM_021144	PSIP1	<i>PC4 and SFRS1 interacting protein 1</i>
D09	NM_002880	RAF1	<i>V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
D10	NM_002908	REL	<i>V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian)</i>
D11	NM_021975	RELA	<i>V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)</i>
D12	NM_006509	RELB	<i>V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B</i>
E01	NM_001664	RHOA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
E02	NM_003804	RIPK1	<i>Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1</i>
E03	NM_007315	STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa</i>
E04	NM_013254	TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
E05	NM_182919	TICAM1	<i>Toll-like receptor adaptor molecule 1</i>
E06	NM_003254	TIMP1	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 1</i>
E07	NM_003263	TLR1	<i>Toll-like receptor 1</i>
E08	NM_003264	TLR2	<i>Toll-like receptor 2</i>
E09	NM_003265	TLR3	<i>Toll-like receptor 3</i>
E10	NM_138554	TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
E11	NM_006068	TLR6	<i>Toll-like receptor 6</i>
E12	NM_017442	TLR9	<i>Toll-like receptor 9</i>
F01	NM_003844	TNFRSF10A	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a</i>
F02	NM_003842	TNFRSF10B	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b</i>
F03	NM_001065	TNFRSF1A	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A</i>
F04	NM_003810	TNFSF10	<i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10</i>
F05	NM_003789	TRADD	<i>TNFRSF1A-associated via death domain</i>
F06	NM_021138	TRAF2	<i>TNF receptor-associated factor 2</i>
F07	NM_003300	TRAF3	<i>TNF receptor-associated factor 3</i>
F08	NM_004620	TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
F09	NM_001165	BIRC3	<i>Baculoviral IAP repeat containing 3</i>
F10	NM_004591	CCL20	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 20</i>
F11	NM_004233	CD83	<i>CD83 molecule</i>
F12	NM_002089	CXCL2	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 2</i>
G01	NM_002090	CXCL3	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 3</i>
G02	NM_000201	ICAM1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
G03	NM_000584	IL8	<i>Interleukin 8</i>
G04	NM_002198	IRF1	<i>Interferon regulatory factor 1</i>
G05	NM_003998	NFKB1	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1</i>
G06	NM_020529	NFKBIA	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>
G07	NM_004556	NFKBIE	<i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon</i>
G08	NM_003764	STX11	<i>Syntaxin 11</i>
G09	NM_052864	TIFA	<i>TRAF-interacting protein with forkhead-associated domain</i>
G10	NM_000594	TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
G11	NM_006291	TNFAIP2	<i>Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2</i>
G12	NM_006290	TNFAIP3	<i>Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3</i>
	NM_001101	ACTB	<i>Actin, beta</i>
	NM_001002	RPLP0	<i>Ribosomal protein, large, P0</i>

3.11 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 6 para Macintosh (versão 6.0e). Os dados obtidos foram, inicialmente, analisados quanto à normalidade da distribuição pelo teste de D'Agostino & Pearson. Em caso de distribuição normal, realizou-se o teste paramétrico T não pareado (com correção de Welch para variâncias significativamente diferentes, quando necessário). Em caso de distribuição não normal, realizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Em todas as análises, considerou-se significativo o valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização fenotípica de DCs

As células dendríticas foram originadas a partir de monócitos de sangue periférico de doadoras saudáveis e pacientes com câncer de mama, e tratados com GM-CSF e IL-4 por cinco dias para diferenciação em células dendríticas imaturas. No quinto dia da cultura, as células foram ativadas com TNF- α , obtendo-se ao sétimo dia da cultura as células dendríticas maduras. As fotografias digitais abaixo representam o aspecto geral das culturas nos dias zero, cinco e sete, e em destaque, o aspecto morfológico representativo de monócitos, DC imaturas e maduras nesses dias da cultura, respectivamente (Figura 9).

É possível observar-se aumento de tamanho das células com os estímulos de diferenciação e ativação, bem como maior número de células arredondadas, com prolongamentos de membrana visíveis ao micrométrico, no sétimo dia da cultura em comparação com o quinto dia. Além disso, após o estímulo de ativação com TNF- α , as mDCs encontram-se predominantemente desaderidas da placa de cultura. A partir da fotografia digital da mDC em destaque pode-se observar dendritos bem pronunciados, característicos dessas células. Ainda, o aspecto geral das células de acordo com os parâmetros de tamanho e granulosidade ao citômetro de fluxo (Figura 9A), bem como exemplos de histogramas da expressão das moléculas CD14, HLA-DR e CD86 em Mo, iDCs e mDCs ao longo do processo de diferenciação e ativação, estão representados nas Figuras 10B, C e D, respectivamente.

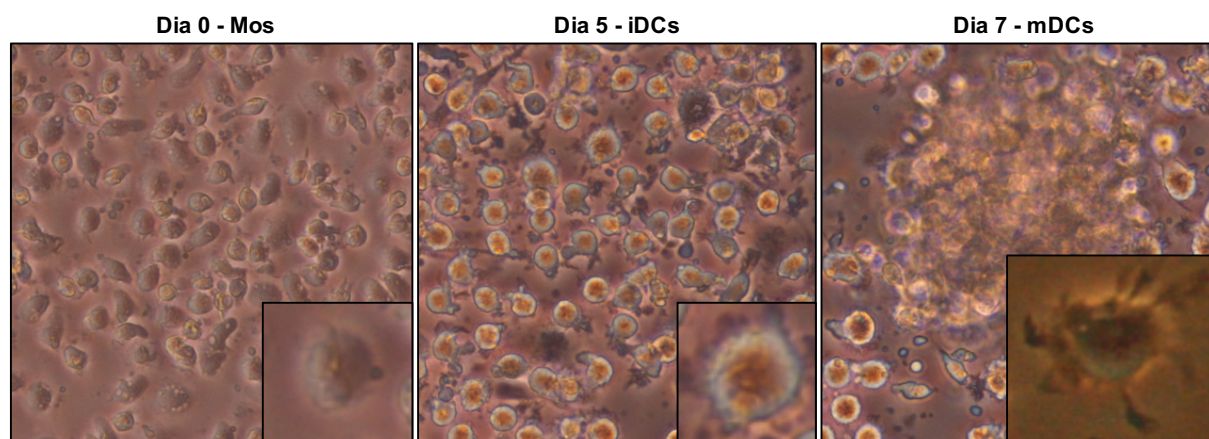


Figura 9 – Aspecto geral da cultura para diferenciação em DCs. Fotografias digitais representativas de uma cultura para diferenciação em células dendríticas (200x de aumento), a partir de monócitos selecionados negativamente, cultivadas em meio AIM-V e estímulo de ativação por TNF- α , nos dias zero, cinco e sete da cultura, indicando monócitos (Mos), células dendríticas imaturas (iDCs) e maduras (mDCs), respectivamente. Em destaque, aumentos realizados no computador a partir das fotografias digitais.

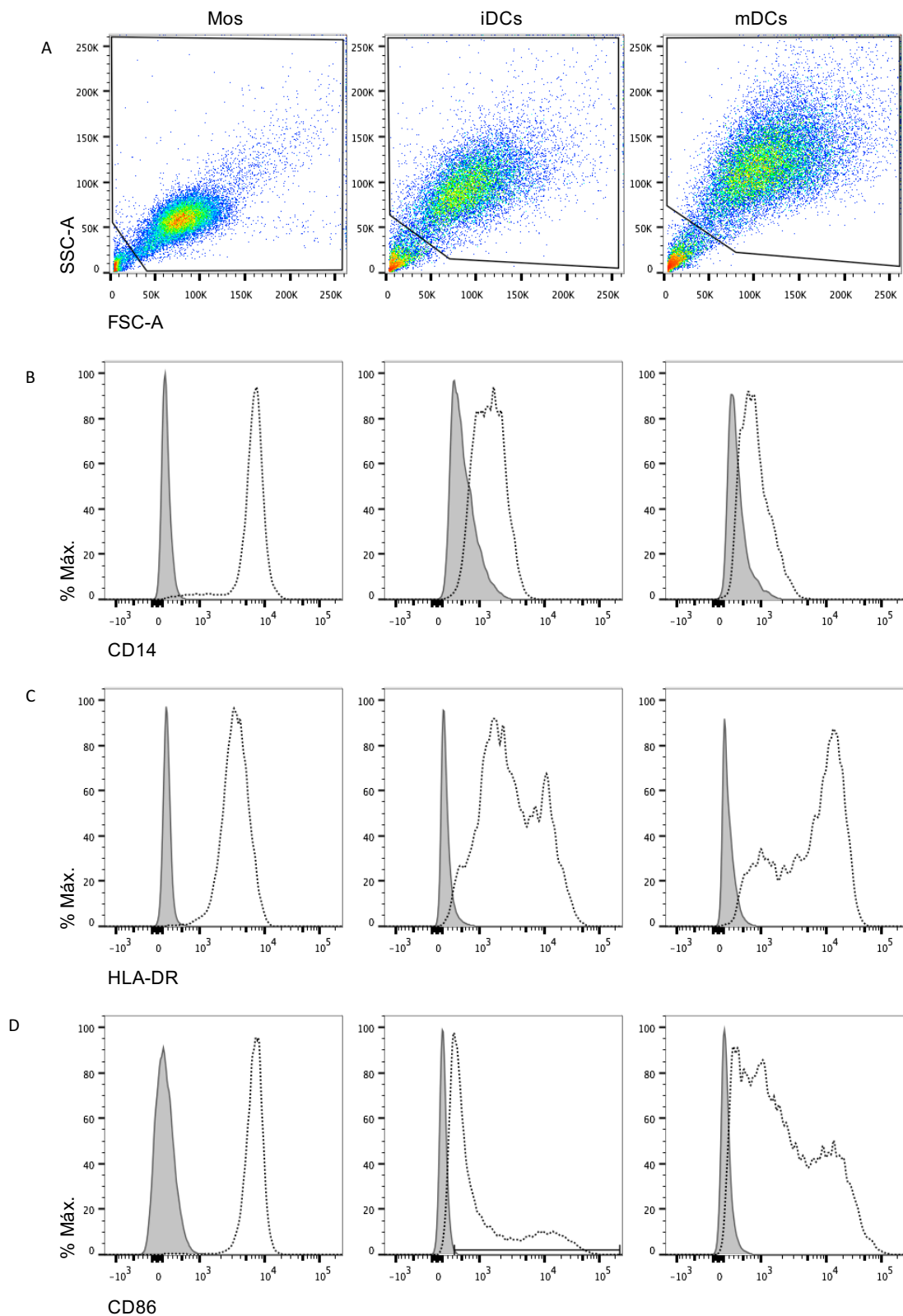


Figura 10 – Caracterização geral das células em cultura para diferenciação em DCs. A: Gráficos pseudocoloridos de tamanho por granulosidade (FSC-A X SSC-A) indicando aspecto geral das células nos dias zero, cinco e sete da cultura para diferenciação em DCs. B-D: Histogramas das intensidades medianas de fluorescência das moléculas de membrana CD14 (B), HLA-DR (C) e CD86 (D) de Mo, iDCs e mDCs (histogramas vazios), em comparação com células não marcadas (histogramas cheios), a partir de cultura para diferenciação em DCs realizada em meio AIM-V e estímulo de ativação por TNF- α .

Nas Figuras 11 a 15 são apresentados gráficos de dispersão com as medianas das frequências das células positivas para as diferentes moléculas na superfície de Mo, iDCs e mDCs, a partir de culturas realizadas com células de pacientes com câncer de mama e controles, bem como as intensidades medianas de fluorescência relativas (rMFI) de tais moléculas nas células positivas para as mesmas (Figuras 12, 14 e 16, respectivamente).

De modo geral, observou-se tanto com relação à frequência quanto com relação à rMFI, uma acentuada variabilidade entre indivíduos do mesmo grupo, mais evidente em algumas moléculas do que em outras.

Inicialmente, a análise da frequência em monócitos indicou ausência de diferenças ou tendências de diferenças consistentes com relação às moléculas avaliadas. Já a análise de rMFI indicou uma discreta tendência de aumento de CD11c e CCR7 em células de pacientes em comparação com controles. No entanto, essas diferenças não foram significativas.

Durante a diferenciação em células dendríticas a partir de monócitos, houve contínua diminuição na frequência de células CD14⁺ (diminuição esta indicativa da diferenciação dos monócitos em células dendríticas) tanto em controles quanto em pacientes, sendo que após a ativação, a diferença na frequência foi mais evidente em controles do que em pacientes. A análise da rMFI, no entanto, não indicou diferenças entre os grupos em nenhum momento avaliado.

A frequência de células HLA-DR⁺ se apresentou elevada após a seleção das células monocíticas, tanto em controles quanto em pacientes. No quinto dia da cultura, quando se obtêm as iDCs, as altas frequências se mantiveram em ambos os grupos, tendo sido observada, no entanto, maior heterogeneidade na frequência de células positivas para este marcador nas culturas das pacientes. Ainda, após estímulo de ativação, enquanto as culturas controles mantiveram, de modo geral, as altas frequências observadas de células HLA-DR⁺ (mediana = 97,4%), houve diminuição significativa nas culturas das pacientes (mediana = 86,9%) ($p < 0,05$). A análise da rMFI, no entanto, não indicou diferenças entre os grupos em nenhum momento avaliado.

A frequência de células CD11c⁺ permaneceu elevada ao longo da cultura, tanto em pacientes quanto em controles, embora iDCs e mDCs de pacientes tenham apresentado maior heterogeneidade na frequência. A análise da rMFI, no entanto, indicou uma tendência de aumento nas células das pacientes nos três momentos

avaliados, embora as diferenças não tenham sido significativas, possivelmente devido à grande variabilidade de rMFIs dessa molécula entre os indivíduos em ambos os grupos.

A frequência de monócitos CD86⁺ não variou entre pacientes e controles, sendo quase máxima em ambos os grupos. No entanto, houve evidente diminuição na frequência de iDCs e mDCs CD86⁺ em pacientes, sendo estatisticamente significativa apenas no último caso ($p < 0,05$), em que as medianas das frequências de mDCs controles e de pacientes foram 94,7% e 61,6%, respectivamente. No entanto, a análise das rMFIs não revelou diferenças entre os grupos.

Já a frequência de iDCs positivas para as demais moléculas não variou entre pacientes e controles (CD40, PD-L1, CCR5 e CCR7), ou apresentou uma discreta tendência à diminuição em pacientes em comparação com controles (CD80 e CD83). Quanto à rMFI das moléculas, esta acompanhou a frequência quando a não variação em pacientes e controles (CD40, PD-L1, CCR5) ou, ao contrário do que observado para a frequência, apresentou uma tendência de diminuição (CCR7) ou uma discreta tendência de aumento (CD83) em iDCs de pacientes em comparação com controles. A rMFI de CD80 em iDCs permaneceu praticamente a mesma, apesar da observada tendência de diminuição na frequência de iDCs em pacientes em comparação com controles.

Por fim, a análise de frequência de mDCs positivas para as demais moléculas indicou que, após estímulo de ativação, houve um aumento na frequência de mDCs CD80⁺ em controles, enquanto que as mDCs das pacientes permaneceram com a mesma frequência observada anteriormente ao estímulo. No entanto, essa diferença não atingiu significância estatística. Fenômeno semelhante foi observado na frequência de mDCs CD83⁺, que se manteve elevada após a ativação em controles, enquanto que em mDCs de pacientes houve uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) de frequência, apesar do pequeno número amostral. A frequência de mDCs positivas para CD40 não variou, enquanto que para PD-L1, CCR5 e CCR7 observou-se uma tendência de diminuição em pacientes em comparação com controles, embora tais diferenças não tenham sido significativas.

Na análise da rMFI das células positivas para tais moléculas, chama a atenção a tendência de diminuição de CD40 e CCR7 e, em menor escala, CCR5, em mDCs de pacientes em comparação com controles.

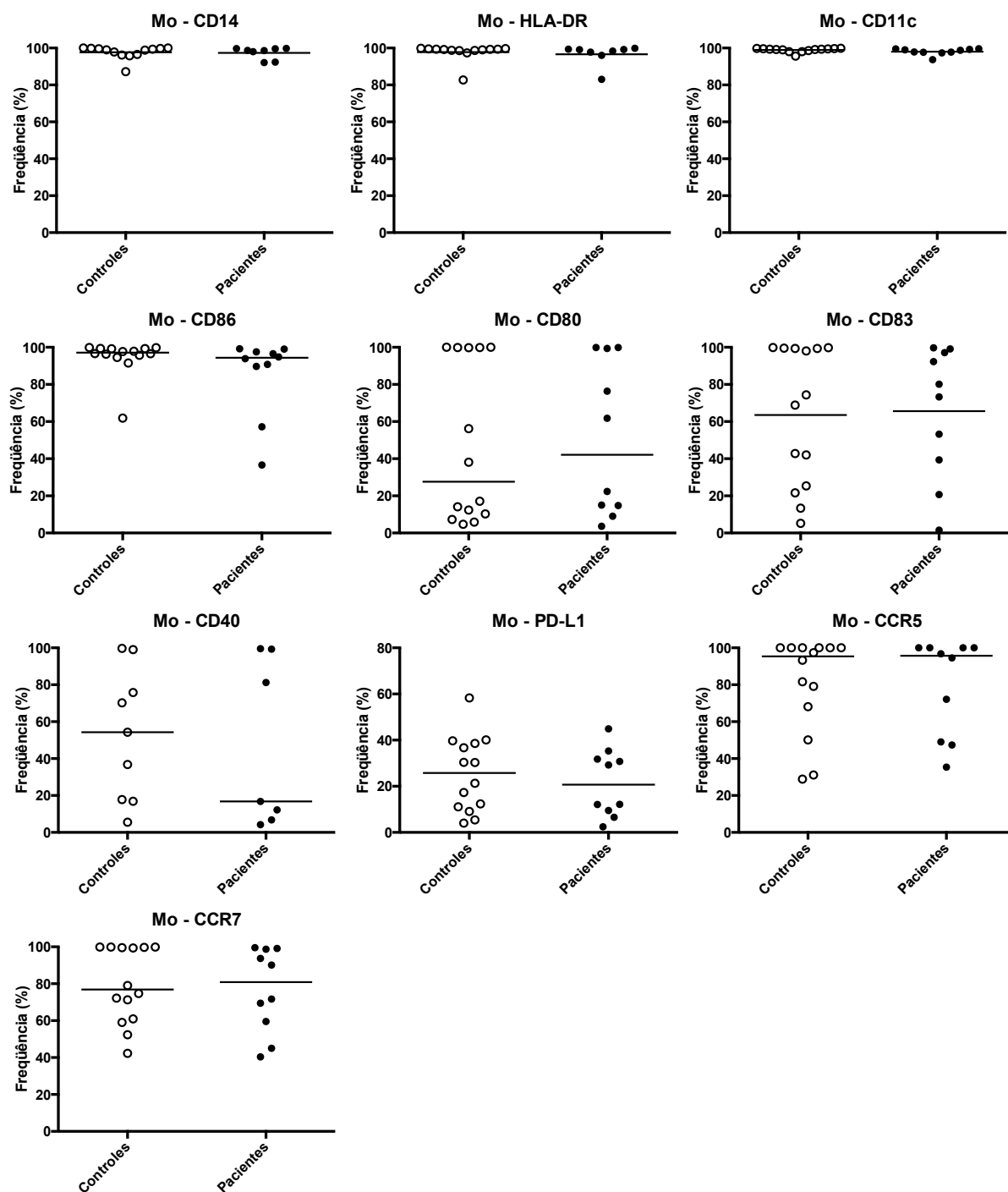


Figura 11 – Caracterização fenotípica dos monócitos de doadoras saudáveis e pacientes com câncer de mama. Gráficos de dispersão indicativos da frequência (em porcentagem) de células positivas para as moléculas de superfície CD14, HLA-DR, CD11c, CD80, CD86, CD83, CD40, PD-L1, CCR5 e CCR7 em monócitos (Mo) selecionados negativamente a partir de amostra de sangue periférico de doadoras saudáveis (controles) e pacientes com câncer de mama. As barras indicam as medianas.

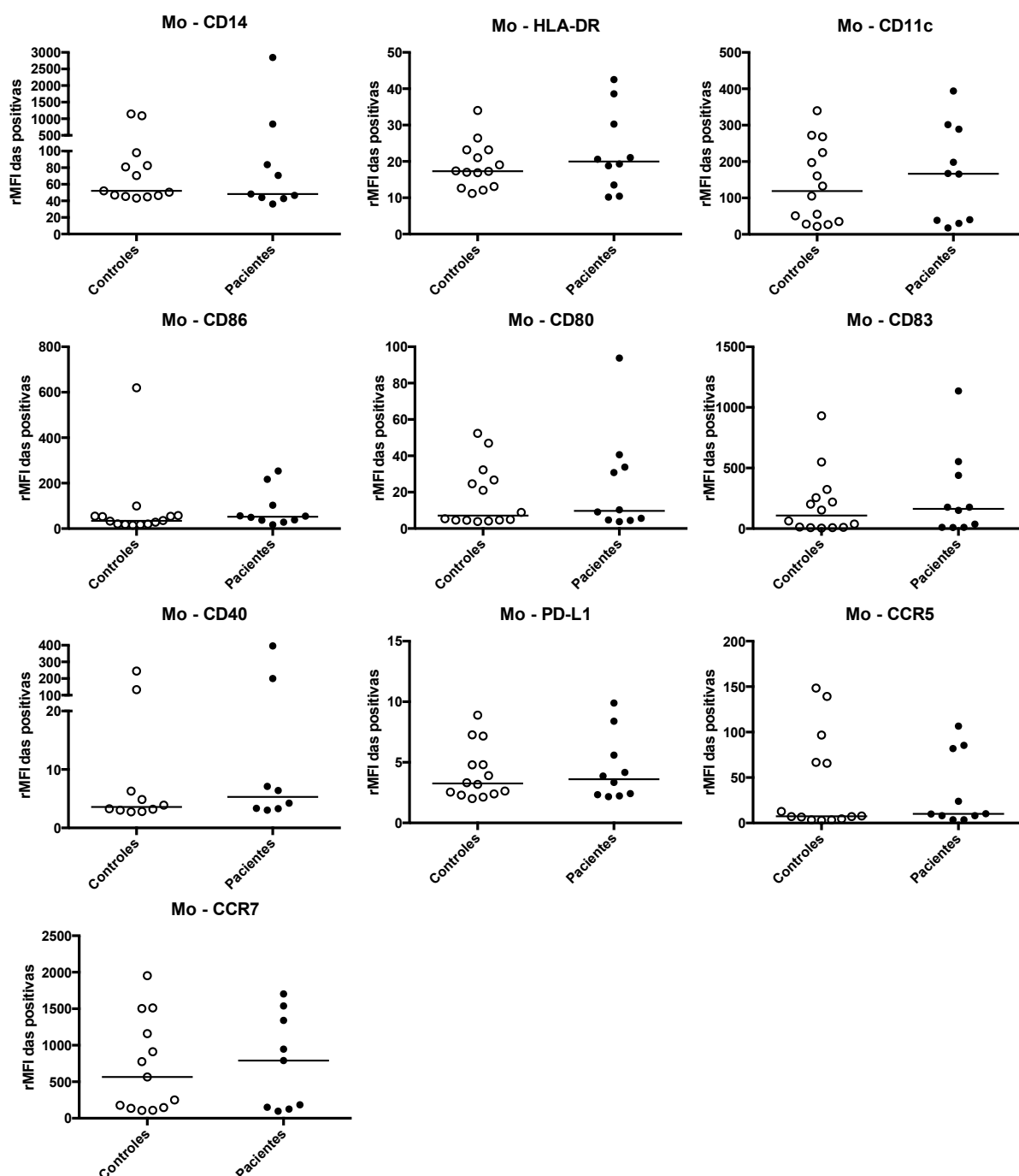


Figura 12 – Intensidades medianas de fluorescência relativa das moléculas em monócitos positivos de doadoras saudáveis e pacientes com câncer de mama. Gráficos de dispersão indicativos das intensidades medianas de fluorescência relativa (rMFI) das moléculas de superfície CD14, HLA-DR, CD11c, CD80, CD86, CD83, CD40, PD-L1, CCR5 e CCR7 em monócitos (Mo) positivos, selecionados negativamente a partir de amostra de sangue periférico de doadoras saudáveis (controles) e pacientes com câncer de mama. As barras indicam as medianas.

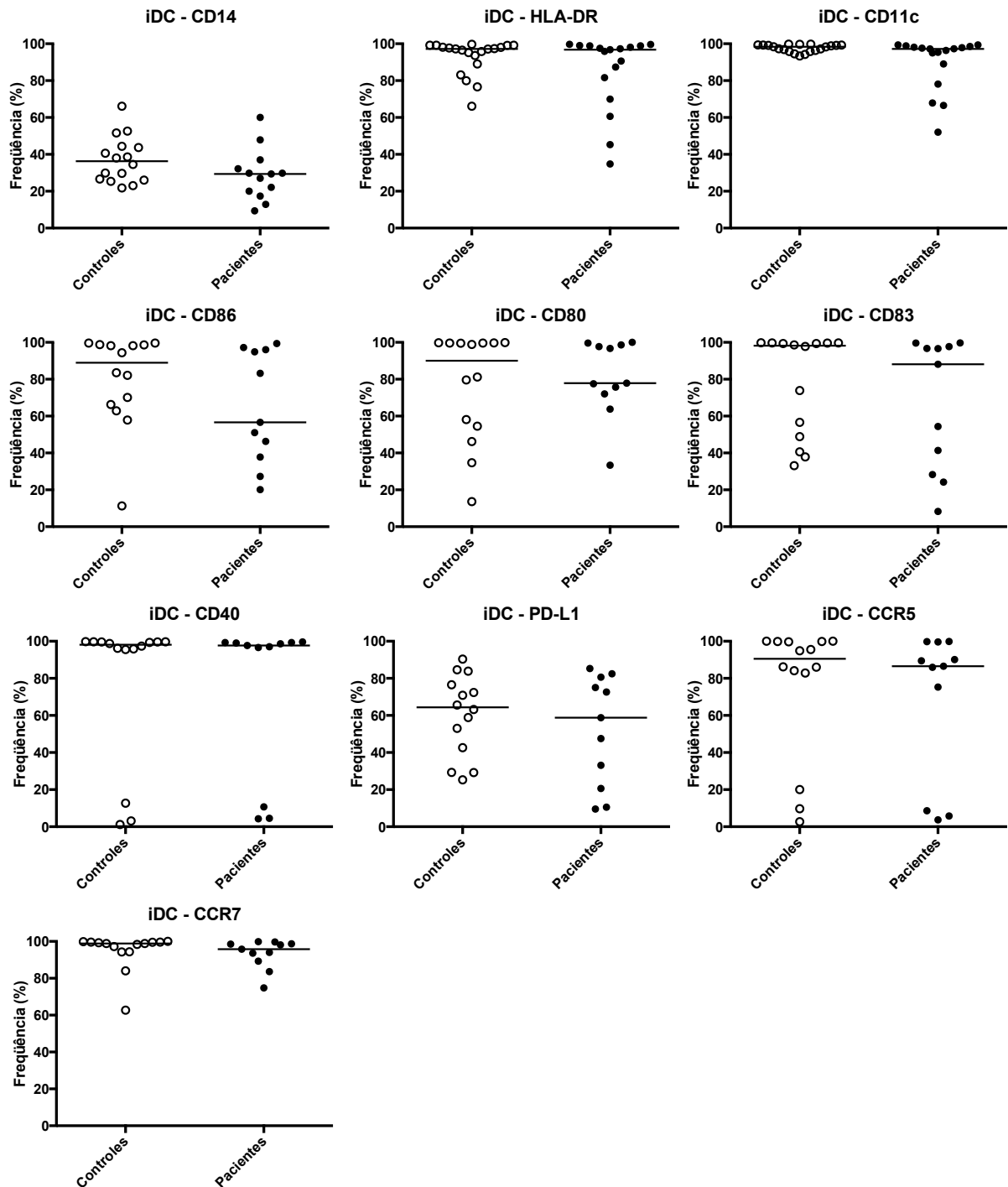


Figura 13 – Caracterização fenotípica das células dendríticas imaturas diferenciadas a partir de monócitos de doadoras saudáveis e pacientes com câncer de mama. Gráficos de dispersão indicativos da frequência (em porcentagem) de células dendríticas imaturas (iDCs) positivas para as moléculas de superfície CD14, HLA-DR, CD11c, CD80, CD86, CD83, CD40, PD-L1, CCR5 e CCR7, retiradas no quinto dia da cultura para diferenciação em DCs a partir de monócitos de sangue periférico de doadoras saudáveis (controles) e pacientes com câncer de mama. As barras indicam as medianas.

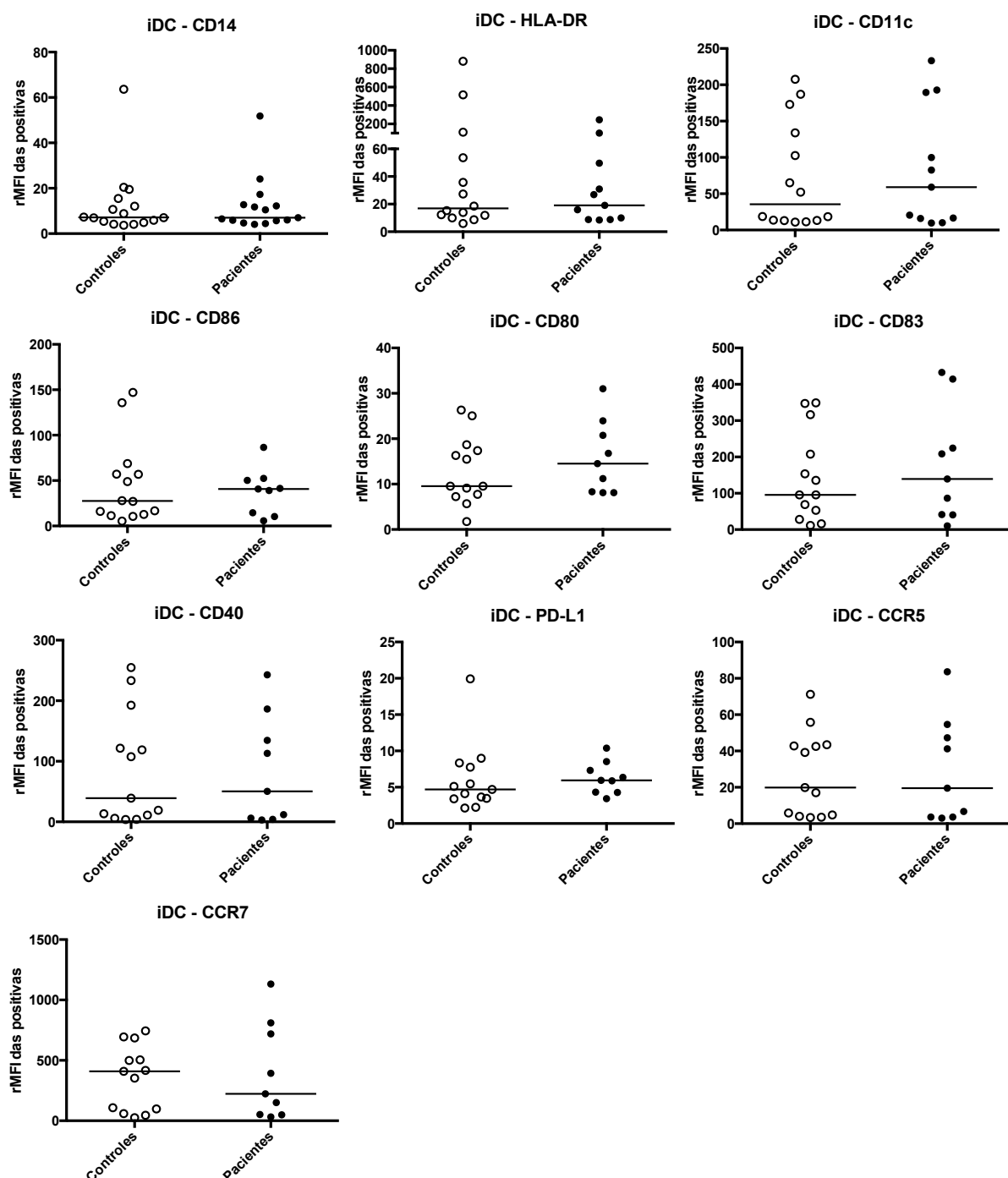


Figura 14 – Intensidades medianas de fluorescência relativas das moléculas em células dendríticas imaturas positivas, diferenciadas a partir de monócitos de doadoras saudáveis e pacientes com câncer de mama. Gráficos de dispersão indicativos das intensidades medianas de fluorescência relativas (rMFI) das moléculas de superfície CD14, HLA-DR, CD11c, CD80, CD86, CD83, CD40, PD-L1, CCR5 e CCR7 em células dendríticas imaturas (iDCs) positivas, retiradas no quinto dia da cultura para diferenciação em DCs a partir de monócitos de sangue periférico de doadoras saudáveis (controles) e pacientes com câncer de mama. As barras indicam as medianas.

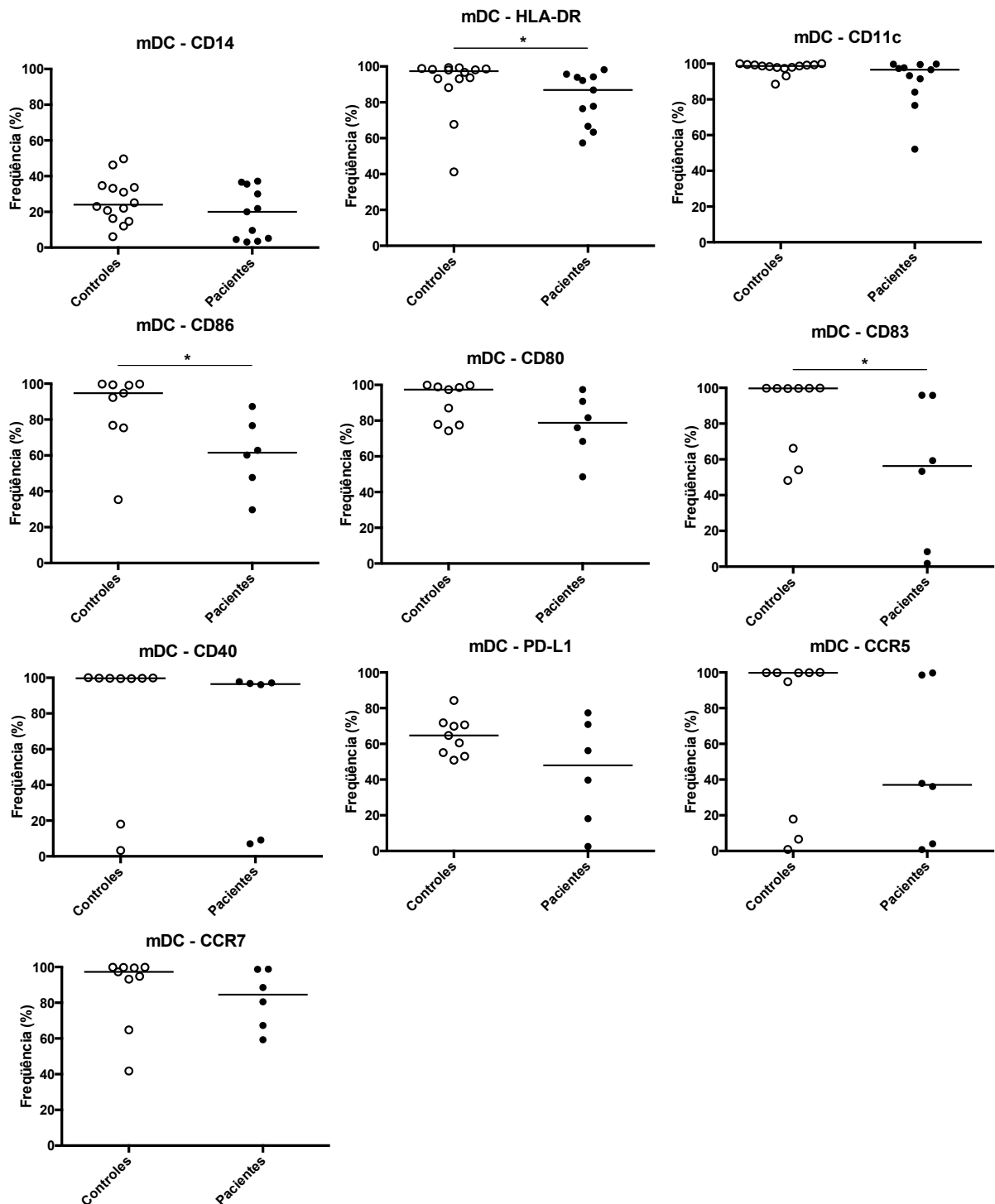


Figura 15 – Caracterização fenotípica das células dendríticas estimuladas com $TNF-\alpha$, diferenciadas a partir de monócitos de doadoras saudáveis e pacientes com câncer de mama. Gráficos de dispersão indicativos da frequência (em porcentagem) de células dendríticas positivas para as moléculas de superfície CD14, HLA-DR, CD11c, CD80, CD86, CD83, CD40, PD-L1, CCR5 e CCR7, retiradas no sexto ou sétimo dia da cultura para diferenciação em DCs a partir de monócitos de sangue periférico de doadoras saudáveis (controles) e pacientes com câncer de mama, após 24 ou 48 horas do estímulo de ativação com $TNF-\alpha$ (mDCs). As barras indicam as medianas. * $p < 0,05$

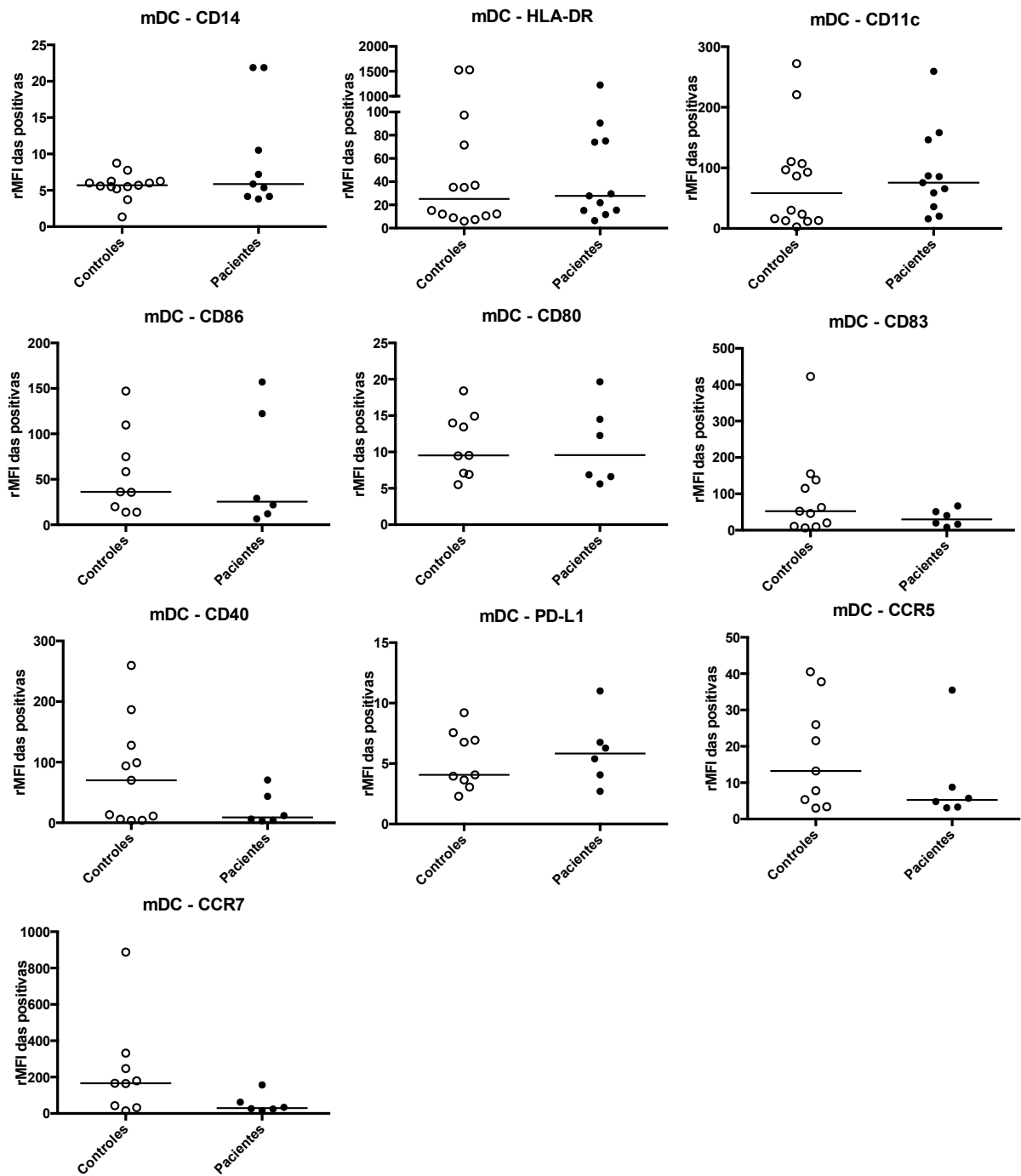


Figura 16 – Intensidades medianas de fluorescência relativas das moléculas em células dendríticas positivas estimuladas com $TNF-\alpha$, diferenciadas a partir de monócitos de doadoras saudáveis e pacientes com câncer de mama. Gráficos de dispersão indicativos das intensidades medianas de fluorescência relativas (rMFI) das moléculas de superfície CD14, HLA-DR, CD11c, CD80, CD86, CD83, CD40, PD-L1, CCR5 e CCR7 em células dendríticas positivas, retiradas no sexto ou sétimo dia da cultura para diferenciação em DCs a partir de monócitos de sangue periférico de doadoras saudáveis (controles) e pacientes com câncer de mama, após 24 ou 48 horas do estímulo de ativação com $TNF-\alpha$ (mDCs). As barras indicam as medianas.

4.2 Padronização da extração de proteínas nucleares

4.2.1 Integridade das proteínas dos extratos nuclear e citoplasmático

Para a confirmação da integridade das proteínas dos extratos nuclear e citoplasmático de DCs maduras, garantindo a viabilidade do método de extração de proteínas, realizou-se a técnica de Western Blot para identificação da proteína β -actina, relatada na literatura como presente em ambos os extratos (MCDONALD et al., 2006).

Como esperado, em duas culturas para diferenciação em DCs realizadas independentemente (denominadas 1 e 2), assim como as respectivas extrações de proteínas, foram observadas bandas específicas para β -actina tanto no extrato nuclear quanto no citoplasmático (Figura 17A). A justaposição da membrana de nitrocelulose, em que está presente o marcador de peso molecular, com a figura em tamanho real obtida pelo sistema de captação de imagem, indica o peso das bandas entre 58 kDa e 38 kDa, compatível com o peso esperado de 42 kDa da β -actina.

4.2.2 Pureza do extrato nuclear

A fim de avaliar a pureza do extrato nuclear, ou seja, confirmar se o extrato nuclear estava livre de proteínas citoplasmáticas, o que poderia influenciar na quantificação e ensaios futuros de EMSA, realizou-se outro Western Blot para a avaliação da presença da proteína CD80 nos extratos nuclear e citoplasmático de DCs maduras. Esta é uma molécula co-estimuladora de membrana da célula dendrítica, para qual o anticorpo já se encontrava no laboratório. Não há descrição na literatura da presença dessa proteína no núcleo das DCs. Devido à baixa concentração de proteínas nos extratos provenientes da cultura 2, realizou-se este ensaio apenas com os extratos provenientes da cultura 1.

Foi observada a presença de uma banda correspondente ao peso esperado de 60 kDa da proteína CD80 no extrato citoplasmático (Figura 17B). Embora esta banda particular não estivesse presente no extrato nuclear, outras bandas inespecíficas apareceram em ambos os extratos, possivelmente devido à ligação inespecífica resultante da ausência de padronização da técnica com este anticorpo.

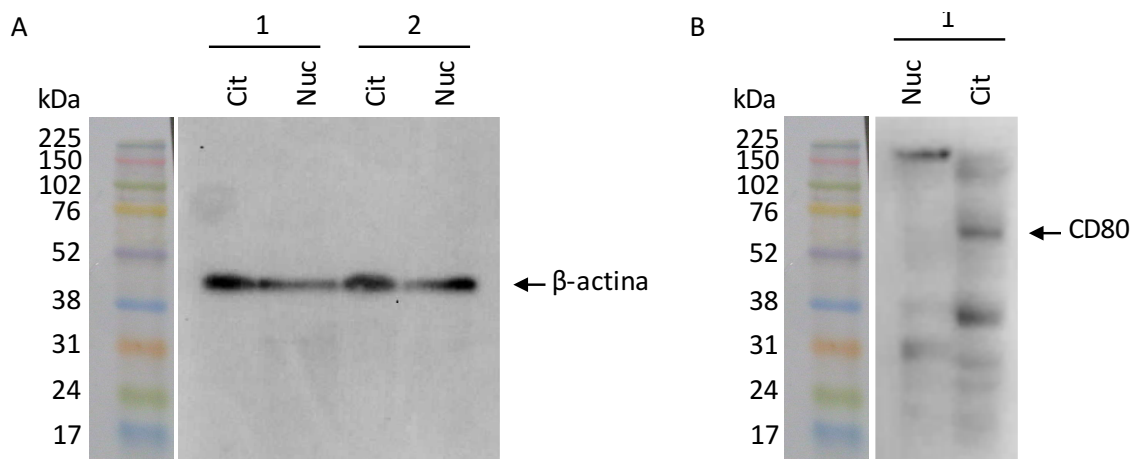


Figura 17 – Avaliação da integridade das proteínas extraídas e da pureza do extrato nuclear. Fotografia digital obtida por sistema de captação de imagem quimioluminescente após realização da técnica de Western Blot, indicando (A) banda compatível com tamanho esperado de 42 kDa da proteína β -actina, presente nos extratos citoplasmáticos (Cit) e nucleares (Nuc) de duas culturas independentes (1 e 2) para diferenciação em células dendríticas; e (B) banda compatível com tamanho esperado de 60 kDa da proteína CD80, presente no extrato citoplasmáticos (Cit) de uma cultura (1) para diferenciação em células dendríticas. Marcador de peso molecular justaposto para imagem ilustrativa a partir da fotografia digital da membrana de nitrocelulose.

4.3 Padronização do EMSA

4.3.1 Curva da quantidade de proteínas do extrato nuclear

Para identificar a quantidade ideal de proteínas nucleares para a visualização adequada de NF- κ B, realizou-se uma cultura para diferenciação em DCs a partir da seleção positiva de células CD14, em que as células foram ativadas no quinto dia da cultura com coquetel de citocinas, e retiradas da cultura um minuto após a ativação. Essas células foram submetidas à extração de proteínas, e o extrato nuclear utilizado para fazer uma curva da quantidade de proteínas (Figura 18).

Inicialmente, pode-se observar a presença de dois complexos proteicos marcados com a sonda radioativa, denominados como complexo 1 (C1) e complexo 2 (C2). Ensaios subsequentes demonstraram que ambos representam NF- κ B.

Como esperado, o aumento da quantidade de proteínas nucleares (2 μ g, 4 μ g, 6 μ g e 8 μ g) refletiu um aumento proporcional de intensidade das bandas observadas até atingir um platô de saturação (Figura 18B). A quantidade de proteína escolhida para a realização dos ensaios futuros foi de 3 μ g, que dá origem a bandas com intensidade de marcação que permite detectar tanto aumentos quanto diminuições da mesma (Figura 18A).

A sonda livre, que aparece ao final da fotografia digitalizada a partir do filme radiográfico após EMSA ou *supershift*, assim como o poço também denominado de sonda livre pela ausência de extrato nuclear proteico (SL), foram descartados nas representações fotográficas de EMSA ou *supershift* subsequentes, sendo ilustrados apenas na Figura 18A.

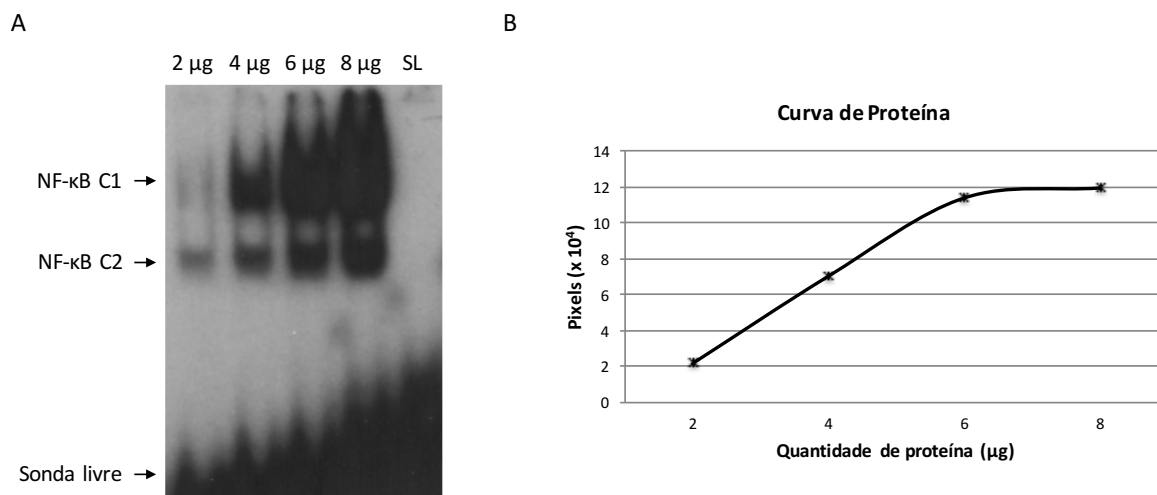


Figura 18 – Determinação da quantidade de proteínas do extrato nuclear. A: Fotografia digitalizada a partir do filme radiográfico obtido após EMSA, indicando a expressão de NF-κB em diferentes quantidades de extrato nuclear protéico (2, 4, 6 e 8 µg), extraído de uma cultura para diferenciação em células dendríticas selecionadas positivamente e ativadas no quinto dia da cultura com coquetel de citocinas por 1 minuto. B: Curva gerada a partir quantificação densitométrica das bandas de NF-κB correspondentes. SL: Sonda livre na ausência de extrato nuclear protéico.

4.3.2 Ensaio de competição com oligonucleotídeo frio

Para avaliar a especificidade do ensaio ao NF-κB, realizou-se o ensaio de competição com oligonucleotídeo frio (seqüência de oligonucleotídeo não-radioativo a qual o NF-κB se liga), que consistiu em fazer o EMSA adicionando oligo frio em excesso molar de 2X, 10X e 50X em relação ao oligo radioativo (Figura 19). Espera-se que a competição, por ligação do NF-κB ao oligo frio, cause uma diminuição da intensidade das bandas correspondentes.

A análise por EMSA indicou a formação de dois complexos protéicos, denominados como complexo 1 (C1) e complexo 2 (C2). Foi possível observar que a medida em que se aumentou a concentração de oligo frio em relação ao oligo marcado, as bandas observadas desapareceram (primeiro C1, com 2X, e depois C2, com 50X). Quando o oligo frio utilizado foi específico para outro fator de transcrição,

o AP-1 (proteína ativadora-1) (5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3'; Promega, Madison, W, EUA), utilizado em excesso molar, não houve competição, como esperado, e as bandas permanecem evidentes.

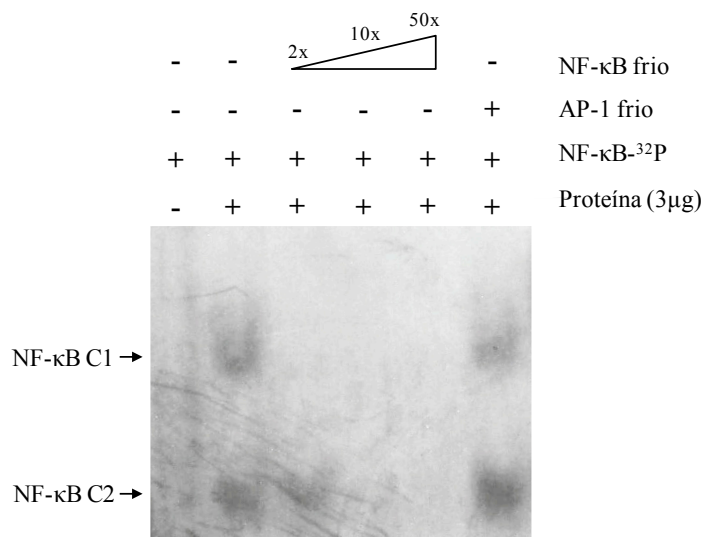


Figura 19 – As bandas observadas no EMSA correspondem ao NF-κB. Fotografia digitalizada a partir do filme radiográfico obtido após EMSA, indicando a expressão de NF-κB no ensaio de competição com oligonucleotídeo frio (0, 2, 10 e 50X) e competidor inespecífico (AP-1). Extrato nuclear obtido de uma cultura para diferenciação em células dendríticas selecionadas positivamente e ativadas no quinto dia da cultura com coquetel de citocinas por 1 minuto. SL: Sonda livre na ausência de extrato nuclear protéico; AP-1: Proteína ativadora-1.

4.3.3 Teste dos anticorpos para os ensaios de supershift

Para distinguir as subunidades presentes no NF-κB ativo das DCs diferenciadas, por meio dos ensaios de *supershift*, foi necessário testar os anticorpos adquiridos para estes ensaios, para que se pudesse afirmar com maior grau de certeza que uma ausência de *supershift* de fato representava ausência daquela subunidade, e não inatividade do anticorpo.

Para tanto, duas culturas de diferenciação em DCs foram realizadas: uma delas, em que se obteve o sangue por aférese e se utilizou o método de seleção positiva de monócitos (A), e outra, em que o sangue foi obtido a partir de câmara de leucorredução e os monócitos foram “selecionados” por aderência à placa por 1 hora e 30 minutos e as células não aderentes foram removidas por lavagem (B). Ambas as culturas foram realizadas em meio AIM-V na presença das citocinas GM-CSF e IL-4 por cinco dias para indução de diferenciação de monócitos em DCs. Ao quinto

dia as DCs da cultura A foram ativadas com coquetel de ativação e as da cultura B com TNF- α . Após cinco minutos de ativação, as células de ambas as culturas foram removidas, congeladas, e as proteínas posteriormente extraídas, e utilizadas no ensaio de *supershift* para teste dos anticorpos (Figura 20). O intuito de fazer culturas provenientes de métodos de coleta, diferenciação e ativação diferentes foi o de aumentar as possibilidades de que todas as subunidades fossem expressas em pelo menos uma condição.

Considerou-se no presente estudo a presença de determinada subunidade (1) pelo clássico surgimento de uma banda de peso molecular maior, devido à ligação do anticorpo ao complexo oligonucleotídeo-NF- κ B (*supershift*), acompanhado de uma diminuição na intensidade de uma ou mais bandas originais (por exemplo, Figura 20A, cultura A, p50 e p65). Com menor frequência (2) pelo clareamento da banda original na presença do anticorpo, indicando a remoção dos complexos contendo aquela subunidade, mesmo na ausência visível e inequívoca de *supershift* (Figura 24, amostra P25, mDC, cRel) – comportamento frequentemente observado com o anticorpo anti-cRel, que via de regra não produz uma banda, mas sim, um escurecimento das bordas externas do poço (Figura 20A, culturas A e B, cRel), mas que nem sempre é intenso suficiente para expor o filme; e, (3) pelo deslocamento das bandas para baixo, frequentemente acompanhado de aumento de intensidade das bandas, indicando ligação do anticorpo ao complexo oligonucleotídeo-NF- κ B, com alteração do padrão de corrida (Figura 20B, p52 e RelB).

Enquanto que as subunidades p50, p65, RelB e cRel compuseram o NF- κ B das DCs provenientes de ambas as culturas A e B, p52 não esteve presente em nenhuma (Figura 20A). No entanto, em um único ensaio realizado posteriormente, observou-se deslocamento das bandas correspondentes ao NF- κ B para baixo quando da utilização do anticorpo anti-p52, acompanhado de um aumento da intensidade das bandas, fenômeno compatível com a presença dessa subunidade (Figura 20B) conforme indicado acima, sugerindo funcionalidade de todos os anticorpos testados. Em particular, nesta amostra de DCs estimuladas com TNF- α , obtida de uma paciente com carcinoma ductal *in situ*, portanto excluída da análise de acordo com o presente estudo, também RelB demonstrou o mesmo comportamento (Figura 20B, RelB).

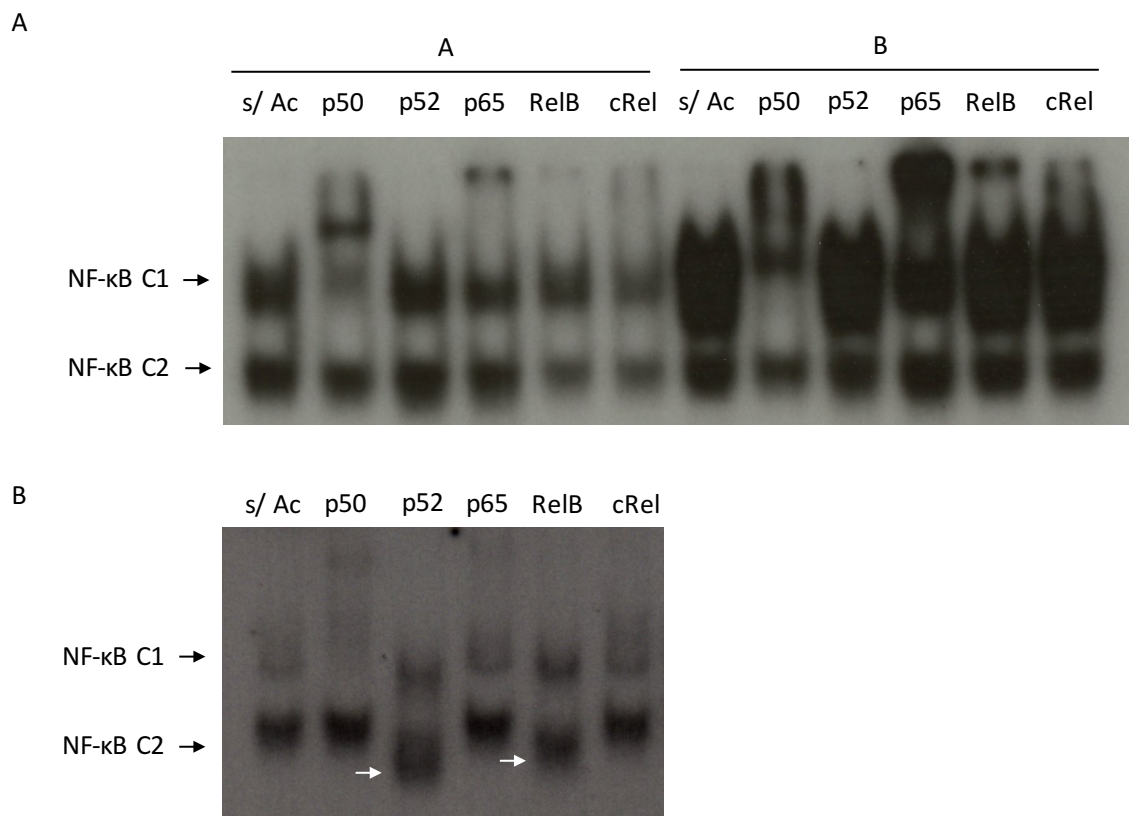


Figura 20 – Funcionalidade dos anticorpos utilizados nos ensaios de supershift. Fotografias digitalizadas a partir dos filmes radiográficos obtidos após *supershift*, indicando a presença de NF-κB na ausência de anticorpo (s/ Ac) e na incubação do extrato nuclear protéico com anticorpos para as subunidades de NF-κB (p50, p52, p65, RelB e cRel). A: Extrato nuclear obtido de (A) uma cultura para diferenciação proveniente de coleta de sangue por aférese, seleção positiva de monócitos e ativação no quinto dia da cultura com coquetel de citocinas por 5 minutos e (B) sangue proveniente de câmara de leucorredução, método de aderência de monócitos à placa por 1 hora e 30 minutos, posterior remoção das células não aderentes por lavagem e ativação no quinto dia da cultura com TNF- α por 5 minutos. B: Extrato nuclear obtido de uma cultura para diferenciação proveniente de coleta de sangue por aférese, seleção negativa de monócitos e ativação no quinto dia da cultura com TNF- α por 24 horas.

Para melhor avaliar a presença das subunidades nas DCs provenientes da cultura A, analisaram-se as bandas obtidas com auxílio de *software* de análise de imagem (Figura 21). Os gráficos correspondentes a cada poço confirmaram a análise visual efetuada acima. Enquanto os extratos nucleares incubados com anticorpos para as subunidades p50, p65, RelB e cRel geraram três picos, indicando o *supershift*, e conseqüentemente a presença daquela subunidade, o extrato nuclear incubado com anticorpo anti-p52 apresentou dois picos apenas, o mesmo padrão observado para o grupo controle (sem anticorpo), indicando ausência dessa subunidade no núcleo das DCs nas condições testadas.

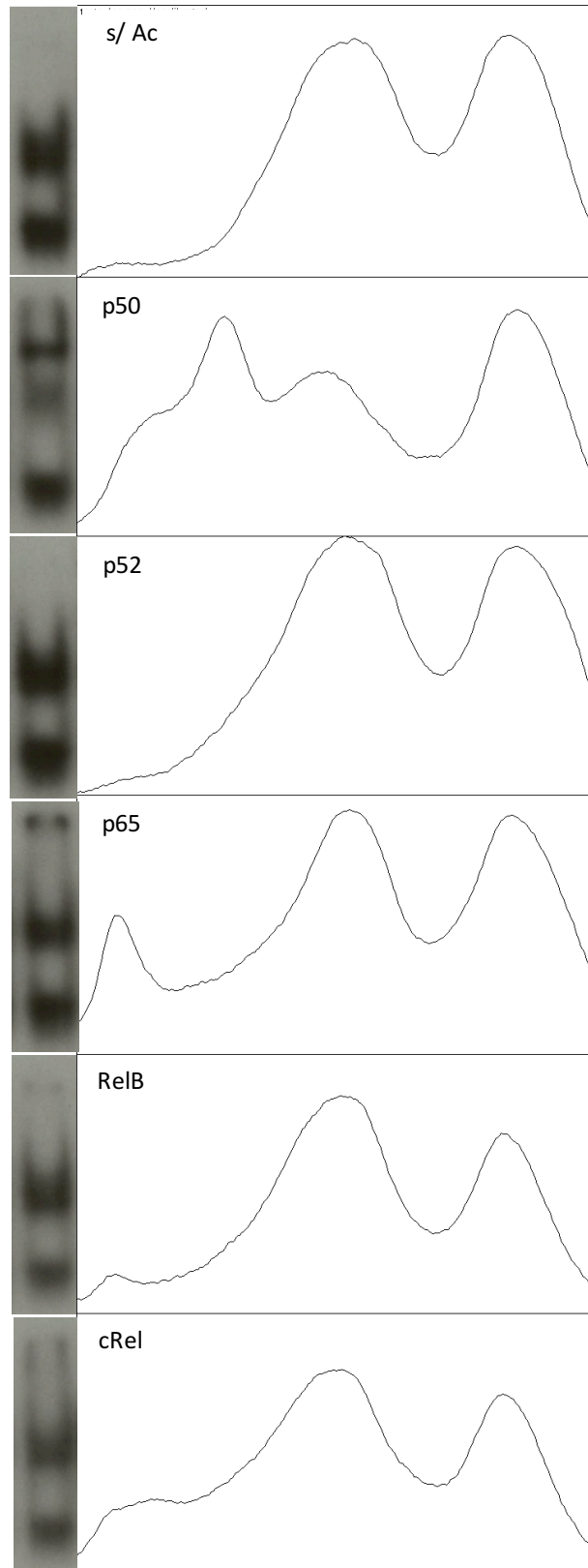


Figura 21 – Análise densitométrica das bandas geradas no ensaio de *supershift*. Fotografias digitalizadas a partir do filme radiográfico obtido após *supershift*, recortadas a partir da Figura 21A (cultura A), e respectivas curvas geradas a partir da análise densitométrica das bandas de NF-κB correspondentes, indicando ou não a presença das subunidades de NF-κB por *supershift*. *s/ Ac*: sem anticorpo.

4.3.4 Translocação de NF- κ B para o núcleo após ativação

Visando confirmar a efetividade dos ensaios de EMSA, realizaram-se experimentos para avaliar a responsividade das células diferenciadas pela translocação de NF- κ B para o núcleo após estímulos de ativação. Testaram-se em dois experimentos independentes, com células de doadores diferentes, bem como com diferentes meios de cultura (meio R-10 e meio AIM-V), os estímulos de ativação com TNF- α e LPS, pelo tempo de 24 horas, revelando o aumento esperado de translocação de NF- κ B para o núcleo, mais intenso nas DCs ativadas com LPS. A Figura 22 abaixo indica as diferentes condições de cultura realizadas e os resultados de intensidades de banda obtidos. O tempo de 24 horas de ativação das células com TNF- α foi utilizado nos experimentos subsequentes.

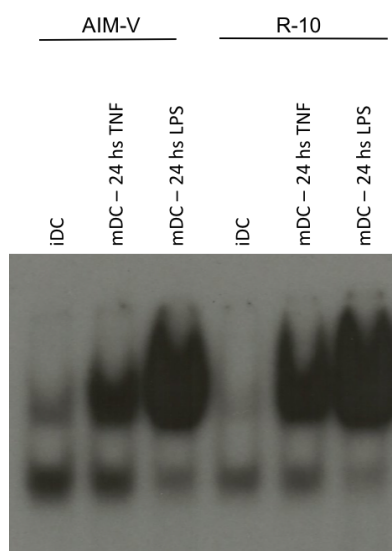


Figura 22 – Translocação de NF- κ B para o núcleo após ativação. Fotografia digitalizada a partir do filme radiográfico obtido após EMSA, indicando as intensidades das bandas de NF- κ B presente em células dendríticas imaturas (iDCs), bem como em DCs após a ativação com TNF- α ou LPS por 24 horas (mDCs).

4.4 Avaliação da presença de NF- κ B em Mos e iDCs e da translocação de NF- κ B para o núcleo após a ativação das DCs em pacientes e controles

A avaliação da presença de NF- κ B em Mos recém selecionados e em iDCs do quinto dia da cultura diferenciadas a partir dos mesmos, bem como a avaliação da translocação de NF- κ B para o núcleo 24 horas após a ativação das iDCs com TNF- α (mDCs) foi realizada por EMSA a partir de indivíduos controles e de pacientes com

câncer de mama. A diferenciação das células das pacientes foi concomitantemente realizada com pelo menos um controle experimental, de modo que pacientes e respectivos controles experimentais foram sempre “corridos” no mesmo gel. Na Figura 23 é possível observar os resultados obtidos.

Inicialmente, na Figura 23A, é possível observar cortes de fotografias digitalizadas, a partir dos filmes radiográficos obtidos após EMSA de Mos representativos e respectivas curvas geradas a partir da análise densitométrica das bandas. Embora a análise visual das fotografias não permita que tiremos conclusões seguras, é possível observar, a partir da análise das respectivas curvas geradas, que os monócitos de indivíduos controles possuem maior quantidade de NF- κ B no núcleo que os das pacientes. A análise densitométrica das bandas em valores absolutos (Figura 23C) confirmou a análise visual, embora tal diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Porém, na análise relativa (Figura 23D), que foi realizada por meio da normalização dos resultados densitométricos absolutos de um mesmo gel pela divisão destes pelo menor valor densitométrico obtido no monócito de um indivíduo controle por gel, tal diferença se mostrou significativa ($p < 0,01$).

Na Figura 23B estão representadas fotografias digitalizadas representativas das intensidades das bandas de NF- κ B em iDCs e mDCs de controles e pacientes, a partir dos filmes radiográficos obtidos após EMSA. Chama a atenção, na análise densitométrica em valores absolutos (Figura 23C), que a presença de NF- κ B no núcleo de iDCs controles é menor que no das pacientes, embora a análise estatística só tenha apontado diferença significativa ($p < 0,05$) se retirado o *outlier* observado no grupo das iDCs controles. Após 24 horas da ativação com TNF- α , há um aumento significativo de translocação de NF- κ B para o núcleo de mDCs controles ($p < 0,001$), enquanto esse aumento não é significativo nas mDCs das pacientes. Ainda, nota-se que o NF- κ B presente no núcleo das mDCs das pacientes após o estímulo de ativação parece não ultrapassar determinado nível, atingindo um valor máximo que é próximo ao valor mediano observado nas mDCs controles.

Além disso, a análise relativa, que foi realizada por meio a divisão do valor densitométrico obtido em mDC por sua respectiva iDC (Figura 23F) em cada grupo, confirmou que a translocação de NF- κ B em DCs estimuladas de pacientes é inferior que a observada em controles (valores medianos de pacientes e controles de 1,28 e 2,12, respectivamente), sendo tal diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$).

Quando se considera a análise relativa dos resultados obtidos em iDCs e mDCs (Figura 23E), realizada por meio da divisão dos valores densitométricos das DCs presentes em um mesmo gel pelo menor valor densitométrico obtido em iDC de um indivíduo controle por gel, perdeu-se a diferença anteriormente observada em iDCs, embora tenha ficado evidente que as mDCs das pacientes não aumentam ou quase não aumentam a resposta de translocação de NF- κ B com estímulo de ativação (valores medianos em iDCs e mDCs de 1,01 e 1,39, respectivamente), enquanto que as DCs controles respondem ao estímulo por meio de um aumento significativo de translocação (valores medianos em iDCs e mDCs de 1,0 e 2,16, respectivamente) ($p < 0,001$).

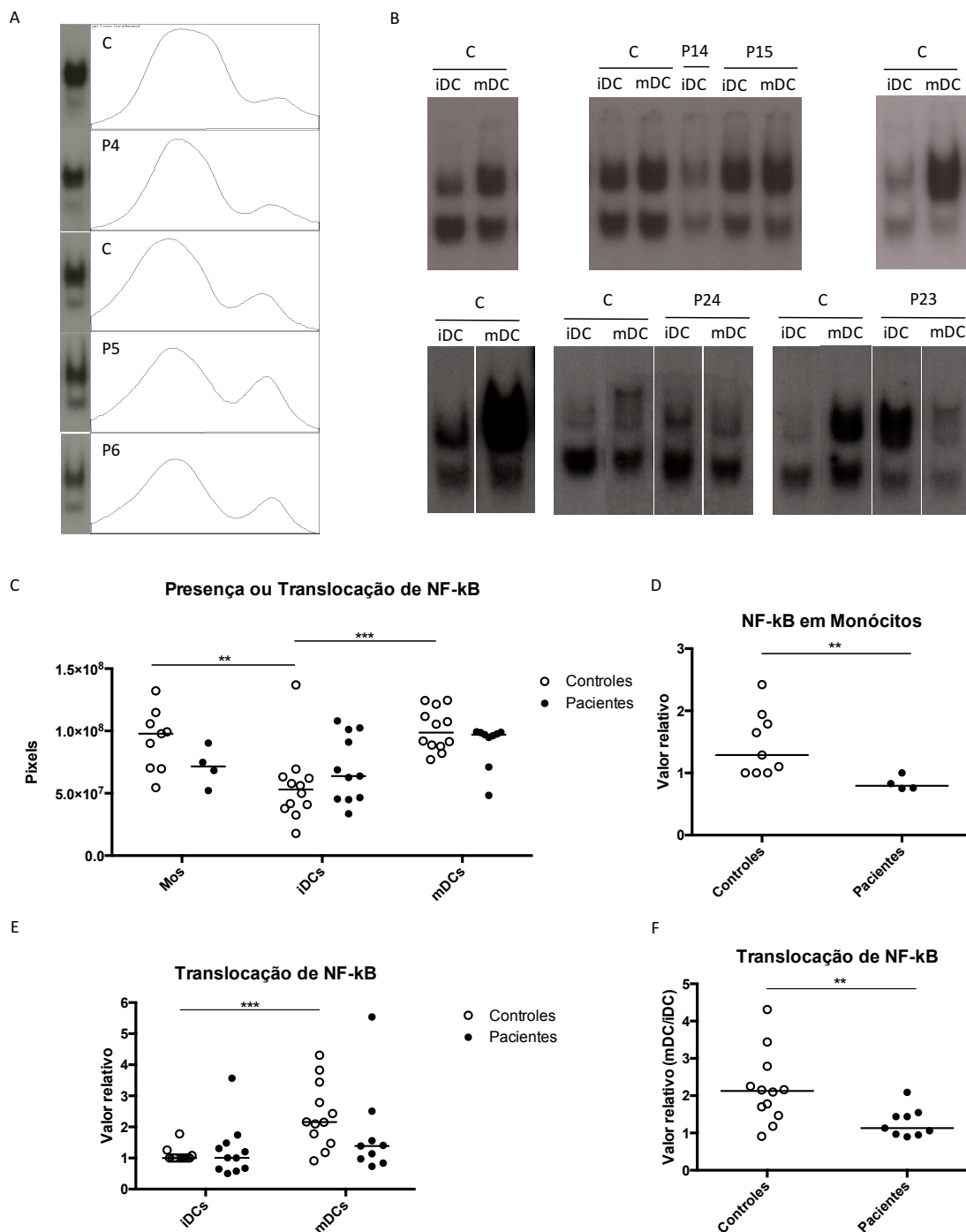


Figura 23 – Monócitos e DCs diferenciadas de monócitos de pacientes com câncer de mama apresentam alterações na quantidade de NF-κB no núcleo. A: Fotografias digitalizadas a partir dos filmes radiográficos obtidos após EMSA de Mos e respectivas curvas geradas a partir da análise densitométrica das bandas. B: Fotografias digitalizadas a partir dos filmes radiográficos obtidos após EMSA, indicando as intensidades das bandas de NF-κB em iDCs e mDCs. C: Resultado das análises densitométricas após EMSA indicando as quantidades totais (pixels) de NF-κB em Mos, iDCs e mDCs. D: Análise relativa obtida por meio divisão dos valores densitométricos absolutos em um mesmo gel pelo menor valor densitométrico obtido no monócito de um indivíduo controle por gel. E: Análise relativa dos resultados obtidos em iDCs e mDCs, realizada por meio da divisão dos valores densitométricos das DCs presentes em um mesmo gel pelo menor valor densitométrico obtido em iDC de um indivíduo controle por gel. F: Análise relativa realizada considerando a divisão do valor densitométrico obtido em mDC pela respectiva iDC. C: Controle; Mos: monócitos; iDCs: células dendríticas imaturas; mDCs: DCs estimuladas com TNF-α por 24 horas. As barras indicam as medianas; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.5 Avaliação da composição de NF- κ B em iDCs e DCs após a ativação em pacientes e controles

Os ensaios de *supershift* realizados em iDCs e DCs estimuladas por 24 horas com TNF- α (mDCs) indicaram que pacientes e controles possuem, nas condições testadas, dímeros de NF- κ B contendo as subunidades p50, p65, RelB e cRel (Tabela 7). Devido à baixa quantidade de proteínas nucleares em algumas amostras, particularmente nas de pacientes, alguns anticorpos não puderam ser testados em todos os ensaios.

As subunidades p50, p65 e RelB estiveram presentes em 100% das amostras testadas, tanto em iDCs quanto em mDCs de pacientes e controles. cRel, à exceção de um único ensaio com amostra de DCs estimuladas de um indivíduo controle, também foi prevalente. A subunidade p52, testada principalmente em iDCs de pacientes e controles e mDCs controles, não foi observada em nenhum ensaio.

Tabela 7 – Frequência, avaliada por *supershift*, das subunidades que compõem o NF- κ B em iDCs e mDCs de pacientes e controles.

	Controles		Pacientes	
	iDCs	mDCs	iDCs	mDCs
p50	100% 11/11	100% 11/11	100% 10/10	100% 8/8
p52	0% 0/10	0% 0/9	0% 0/5	0% 0/3
p65	100% 11/11	100% 11/11	100% 10/10	100% 8/8
RelB	100% 12/12	100% 11/11	100% 6/6	100% 6/6
cRel	100% 12/12	10,9% 10/11	100% 9/9	100% 6/6

A Figura 24 representa *supershifts* representativos realizados a partir de amostras de iDCs e DCs estimuladas com TNF- α por 24 horas, obtidas de culturas controles e de pacientes com câncer de mama (P17, P25 e P15).

A análise dos ensaios indicou que o NF- κ B de iDCs de indivíduos controles (Figura 24, controles) é constituído por dímeros contendo majoritariamente p50, com menor participação relativa de p65, RelB e cRel. Nas iDCs de indivíduos controles, praticamente todos os dímeros possuem a subunidade p50, visto que ao colocar o anticorpo com especificidade para essa proteína, a banda original do complexo 1

praticamente desaparece. As demais subunidades estão presentes em menor quantidade, indicando que provavelmente nas iDCs controles o NF- κ B é composto de homodímeros de p50 e heterodímeros de p50 com RelB e cRel. Já na mDC ocorre uma mudança de padrão, com aumento de participação relativa de dímeros contendo as subunidades p65, RelB e cRel. Aparentemente, nas mDCs controles, p50 não está presente em todos os dímeros ativos, visto que o anticorpo com especificidade para p50 desloca apenas parte da banda do complexo 1. Assim, pode-se inferir que nas mDCs controles há uma maior quantidade relativa de heterodímeros contendo p65, RelB e cRel que nas iDCs.

Já a análise dos ensaios realizados com as células de pacientes com câncer de mama indicou, na maioria dos pacientes analisados, um outro padrão. Enquanto as DCs de alguns pacientes possuem o mesmo comportamento descrito para os indivíduos controles (Figura 24, P17), os demais diferem. As iDCs já apresentam uma quantidade relativa de p50 inferior que as iDCs controles e, mediante ativação, não parece haver uma mudança nítida e consistente de padrão em relação as próprias iDCs (Figura 24, P25 e P15).

Em um caso (P25), por exemplo, observa-se que as iDCs possuem maior quantidade de NF- κ B ativo no núcleo que as próprias mDCs (a quantidade de NF- κ B do complexo C2 diminui após a ativação), observação esta corroborada pelos dados de densitometria das bandas. Ainda, apesar da grande quantidade de NF- κ B ativo no núcleo de iDCs, a participação relativa das subunidades p65 (indicada por *supershift* da banda) e cRel (indicada por clareamento da banda) parece ser pequena. Talvez a presença de RelB (indicada por deslocamento das bandas para baixo com concomitante aumento de intensidade das bandas) contribua de forma mais preponderante nesses dímeros de NF- κ B. Nas mDCs de P25, observa-se o mesmo padrão, talvez com contribuição maior de cRel, que em comparação com as respectivas iDCs, indicando uma falta de modulação semelhante à observada em controles.

Em outro exemplo de fenômeno similar ao descrito para P25, a paciente P15 demonstrou apenas pequeno aumento de quantidade de NF- κ B no núcleo após a ativação. Ainda, o padrão observado em iDCs de contribuição das subunidades se assemelha ao de mDCs controles, visto que a banda do complexo 1 desloca apenas parcialmente na presença de anticorpo com especificidade para p50, e não há uma

modulação ou diferença de padrão, até onde se pôde observar, após o estímulo de ativação.

Tomados em conjunto, estes resultados indicam que também com relação ao padrão de contribuição relativa das subunidades há diferenças entre pacientes e controles, particularmente com relação às iDCs, embora a constituição exata dos dímeros de NF- κ B, ou seja, quais subunidades estavam ligadas em cada momento avaliado, não tenha sido identificada nos ensaios.

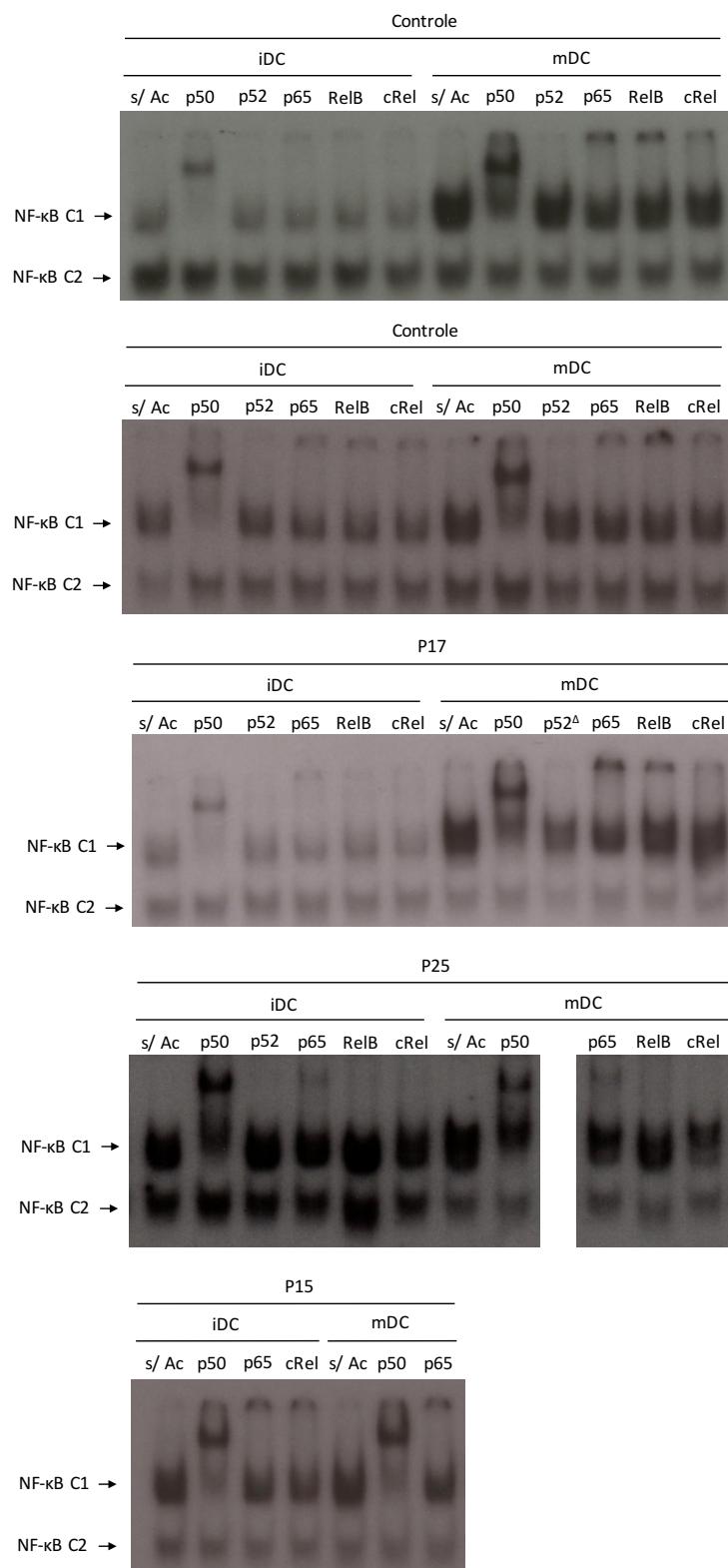


Figura 24 – DCs derivadas de pacientes com câncer de mama apresentam alterações no padrão de constituição de NF-κB no núcleo. A: Fotografias digitalizadas a partir dos filmes radiográficos obtidos após ensaios de *supershift*, indicando ou não a presença das subunidades de NF-κB (p50, p52, p65, RelB e cRel) em células dendríticas imaturas (iDCs), bem como em DC maduras (mDCs) após a ativação com TNF-α por 24 horas, de dois indivíduos controles e três pacientes (P17, P25 e P15). s/ Ac: sem anticorpo. ^ΔO clareamento da banda correspondente ao poço p52 em P17 não é indicativo de presença desta subunidade, visto que neste poço utilizou-se uma quantidade inferior de proteína.

4.6 Avaliação das citocinas no sobrenadante das culturas para diferenciação em DCs

Analisou-se por CBA as citocinas (IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-12p70 e IL-10) dos sobrenadantes de um total de 28 culturas para diferenciação em DCs, retirados no quinto dia da cultura (iDCs) e após 1, 24 e/ou 48 horas da ativação com TNF- α (Figuras 25 e 26).

Visto que durante a padronização dos experimentos iniciais algumas poucas culturas foram realizadas com quantidades diferentes de células por poço, em relação à maioria das culturas, em que se plaqueou uma quantidade fixa de células (1×10^6 monócitos), e visto que tal diferença pode influenciar na quantidade total de citocinas no sobrenadante das culturas, determinou-se a menor quantidade de células plaqueada por poço ($4,9 \times 10^5$) entre todos os experimentos e corrigiram-se todos os valores obtidos de acordo com a seguinte equação matemática: concentração normalizada = [concentração medida \times ($4,9 \times 10^5$)/concentração celular no experimento]. Após tal normalização dos resultados foi possível aproveitar os resultados de todas as culturas avaliadas.

De maneira geral, observou-se uma grande variação interexperimental, levando a oscilações de grandeza nas concentrações totais que influenciaram na análise estatística realizada. Ainda assim, considerando a concentração total normalizada (Figura 25, painel superior), foi possível observar uma tendência de aumento de concentração de IL-8 nos sobrenadantes das culturas para diferenciação em DCs no quinto dia (iDCs). Após 24 horas da ativação das DCs com TNF- α , tal tendência de aumento também pôde ser observada, ainda que discreta devido ao baixo número experimental de pacientes avaliados.

Já considerando o valor relativo, obtido pela divisão da concentração normalizada do paciente pelo seu controle experimental (Figura 25, painel inferior), foi possível observar que em cerca de 68% ($n = 15$) das culturas avaliadas, os sobrenadantes das culturas das pacientes possuíam maior concentração de IL-8 que seus respectivos controles, sendo que destas, cerca de 67% dos sobrenadantes das pacientes possuíam acima de 0,5 vez a concentração presente no respectivo controle. Tal fenômeno também foi observado após 1 e 24 horas do estímulo com TNF- α . Considerando 48 horas após o estímulo, tal fenômeno não foi mais observado.

Com relação à presença de IL-6 no sobrenadantes das culturas, a avaliação da concentração total normalizada (Figura 26, painel superior) não indicou diferenças ou tendências consistentes entre pacientes e controles nos tempos avaliados. Ainda, considerando o valor relativo (Figura 26, painel inferior), foi possível observar que em cerca de metade das culturas avaliadas, os sobrenadantes das das pacientes possuíram concentração de IL-6 acima daquela observada nos respectivos controles, e cerca de metade abaixo, independente do tempo avaliado.

Não houve detecção das citocinas IL-1 β , IL-12p70 e IL-10 nas culturas nas condições avaliadas, que esteve muito próxima ou abaixo do limiar de detecção do teste. Valores de TNF- α em iDCs também estiveram muito próximo ou abaixo do limiar de detecção do teste, e a concentração dessa citocina no sobrenadante de mDCs foi desconsiderada, por não ser possível distinguir nova produção do estímulo adicionado à cultura para a ativação das células.

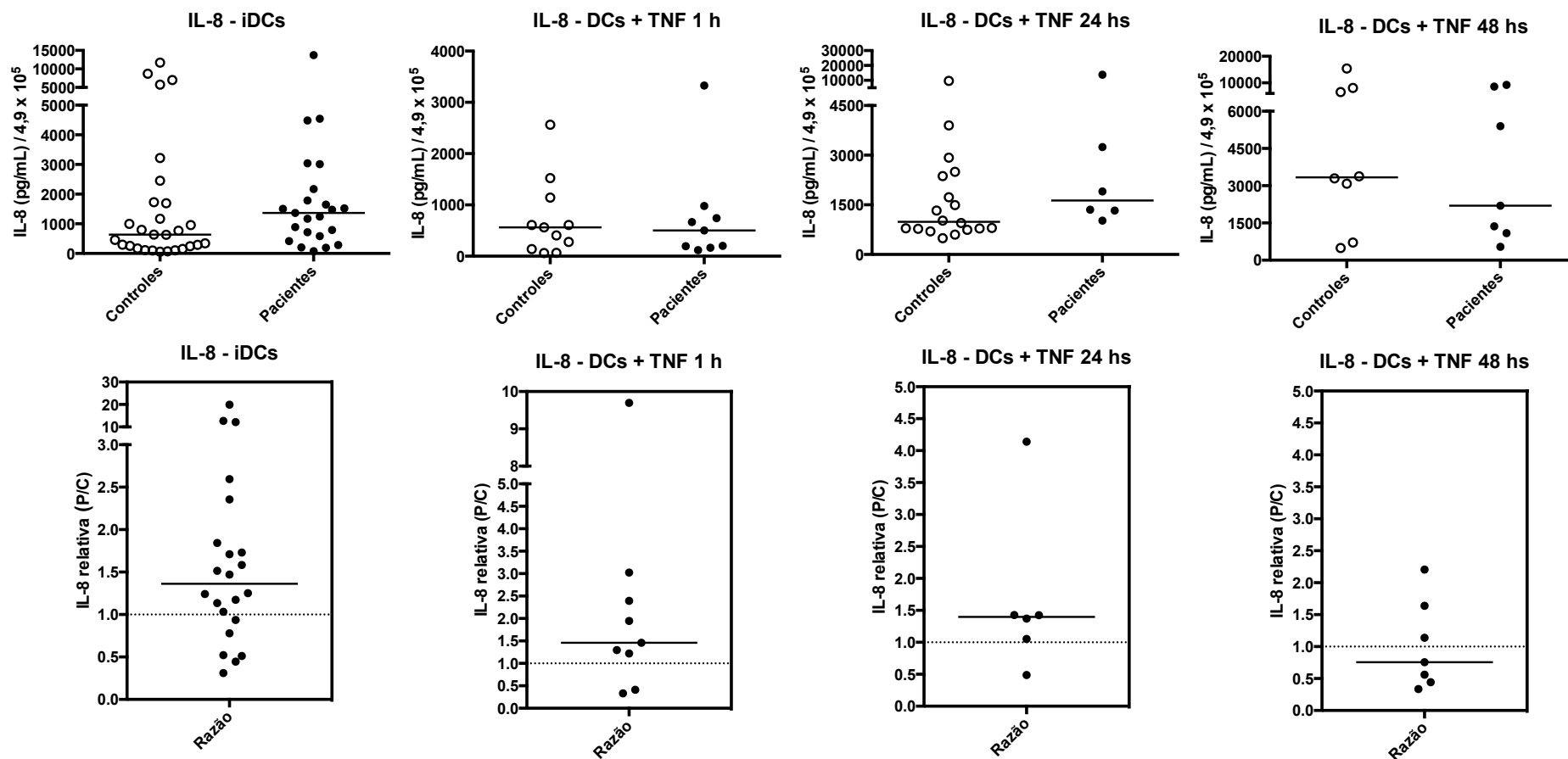


Figura 25 – Avaliação de IL-8 no sobrenadante das culturas para diferenciação em DCs. Gráficos de dispersão (painel superior) da concentração de IL-8 (pg/mL) normalizada por $4,9 \times 10^5$ células, bem como gráficos das curvas (painel inferior) da concentração relativa de IL-8 normalizada do paciente por seu respectivo controle experimental, obtidos por CBA a partir dos sobrenadantes de um total de 22 culturas para diferenciação em DCs, retirados no quinto dia da cultura (iDCs) e 1, 24 e/ou 48 horas da ativação com TNF- α .

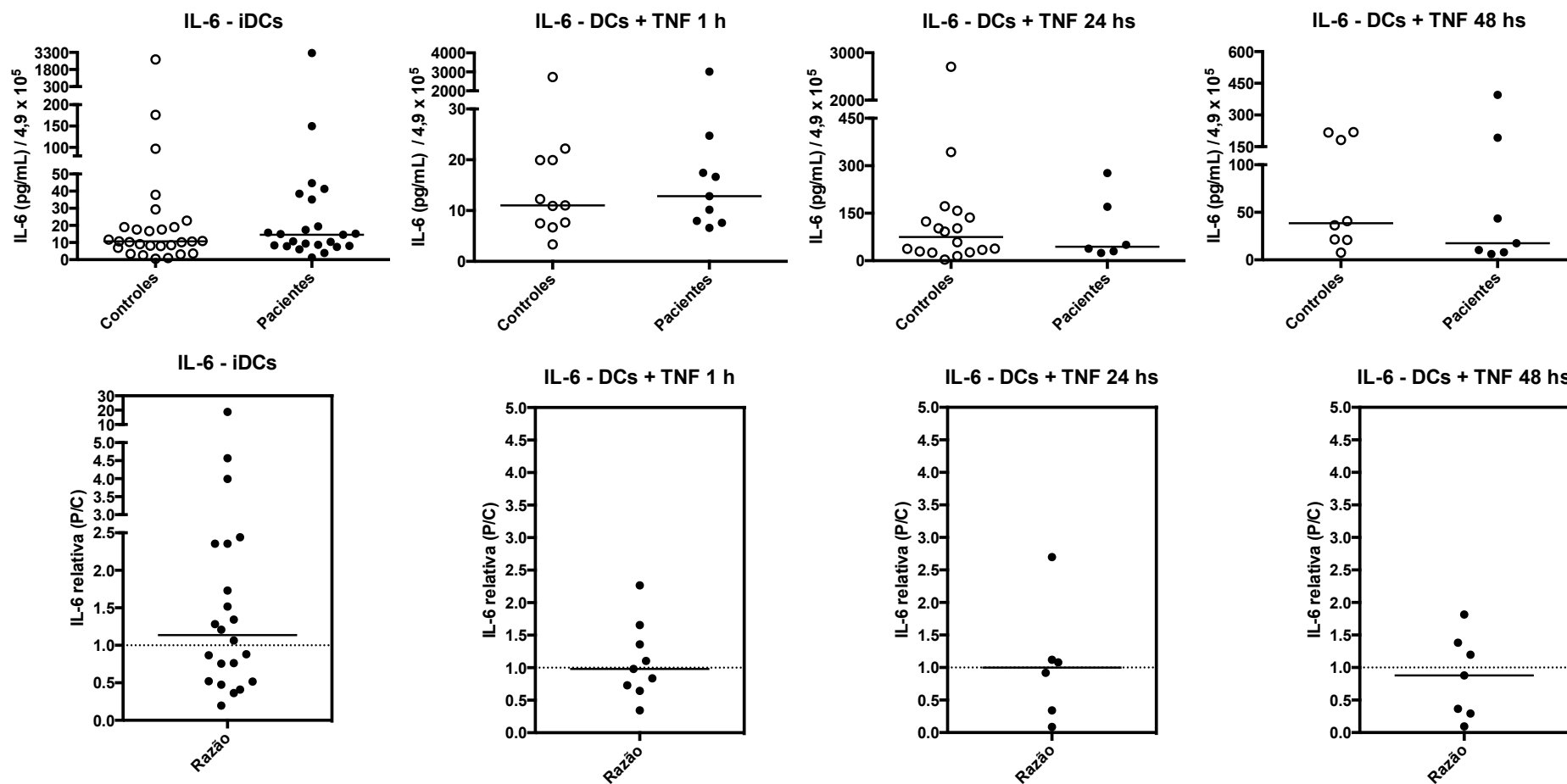


Figura 26 – Avaliação de IL-6 no sobrenadante das culturas para diferenciação em DCs. Gráficos de dispersão (painel superior) da concentração de IL-6 (pg/mL) normalizada por $4,9 \times 10^5$ células, bem como gráficos das curvas (painel inferior) da concentração relativa de IL-6 normalizada do paciente por seu respectivo controle experimental, obtidos por CBA a partir dos sobrenadantes de um total de 22 culturas para diferenciação em DCs, retirados no quinto dia da cultura (iDCs) e 1, 24 e/ou 48 horas da ativação com TNF- α .

4.7 Análise da expressão de genes selecionados

Considerando que muitas das moléculas envolvidas na aquisição da capacidade imunoestimuladora das DCs são oriundas de genes regulados por NF- κ B, e tendo sido observadas diferenças neste fator de transcrição bem como algumas diferenças ou tendências de diferença no fenótipo de membrana das DCs entre pacientes e controles, investigou-se a expressão de alguns desses genes por PCR em tempo real (CD80, CD86, CD40, CD83 e HLA-DR), bem como a expressão da quimiocina IL-8 em iDCs e 1 h após a ativação dessas células com TNF- α . De maneira geral, observou-se que expressão gênica em iDCs foi relativamente homogênea em controles para todos os genes avaliados. Já em iDCs de pacientes, enquanto tal homogeneidade foi observada para CD83, HLA-DR e IL-8, a expressão das moléculas CD80, CD86 e CD40 variou bastante entre as pacientes avaliadas. Por outro lado, a ativação promoveu uma maior variabilidade no grau de transcrição dos genes avaliados, tanto em pacientes quanto em controles.

Inicialmente, chama a atenção que a expressão de três genes avaliados CD80, CD40 e HLA-DR está aumentada em iDCs de pacientes em relação a controles, ainda que em menor grau neste último gene. Mediante ativação, há um aumento na expressão desses genes nas DCs controles, enquanto observa-se pouco ou nenhum aumento na expressão desses genes nas DCs das pacientes. Em outras palavras, as DCs controles que expressavam baixos níveis de transcritos para esses genes, mediante ativação, responderam com um aumento importante na transcrição gênica. Já as DCs das pacientes, que possuíam expressão maior, responderam pouco ou quase não responderam ao estímulo no tempo avaliado, considerando a mediana dos casos.

Já a avaliação da transcrição de CD83 em iDCs parece ter indicado padrão oposto, ou seja, iDCs de controles aparentaram maior transcrição gênica que iDCs de pacientes. Mediante ativação, a transcrição gênica de CD83 em DCs tanto de pacientes quanto de controles atingiu medianas semelhantes, sendo a variação menor em controles, portanto. O padrão de transcrição de CD86 e IL-8 foi semelhante em DCs de pacientes e controles, sendo a primeira diminuída e a segunda aumentada após a ativação em ambos os grupos avaliados.

Já a análise da transcrição gênica das subunidades que compõem o NF- κ B indicou, de maneira geral, que após a ativação, maior variabilidade entre indivíduos

do mesmo grupo foi observada para NF- κ B1 e NF- κ B2, sendo que p65, RelB e cRel aparentaram comportamento mais homogêneo. Em iDCs, a transcrição gênica de p65 aparentou ser inferior em pacientes, enquanto que o oposto foi observado para NF- κ B1 e cRel. Já a transcrição gênica de NF- κ B2 e RelB foi semelhante em iDCs de pacientes e controles. Porém, mediante ativação das DCs, a transcrição de gênica de NF- κ B1 e cRel, ainda que em menor proporção no último caso, foi maior em pacientes, e a transcrição das demais subunidades, NF- κ B2, p65 e RelB foi maior em controles.

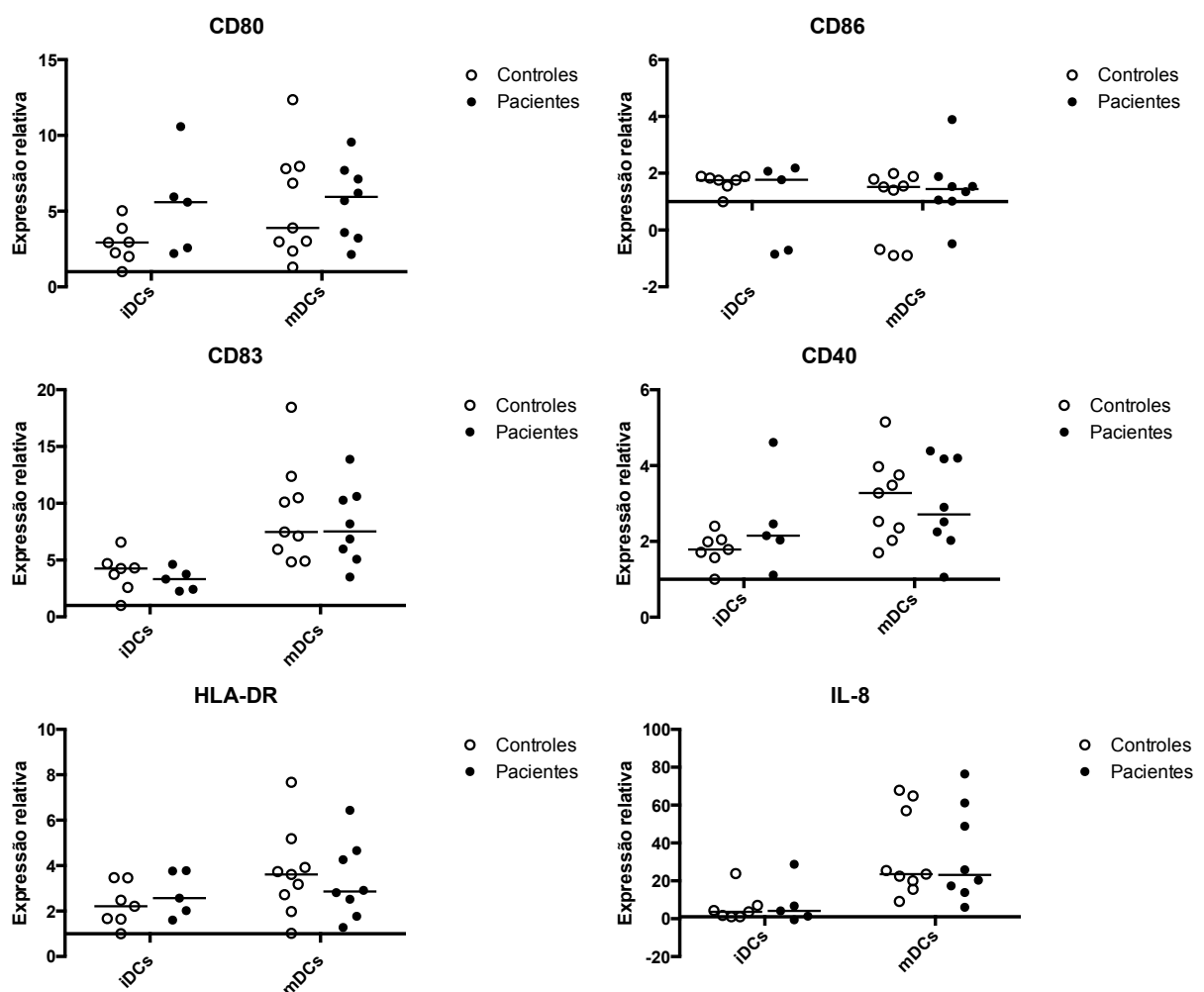


Figura 27 – Avaliação da expressão de genes selecionados. Gráficos de dispersão dos resultados da análise de transcrição dos genes CD80, CD86, CD83, CD40, HLA-DR e IL-8 por PCR em tempo real, avaliada em células dendríticas imaturas (iDCs) e DCs após 1 hora da ativação com TNF- α (mDCs), derivadas de monócitos de pacientes com câncer de mama e voluntárias saudáveis (controles).

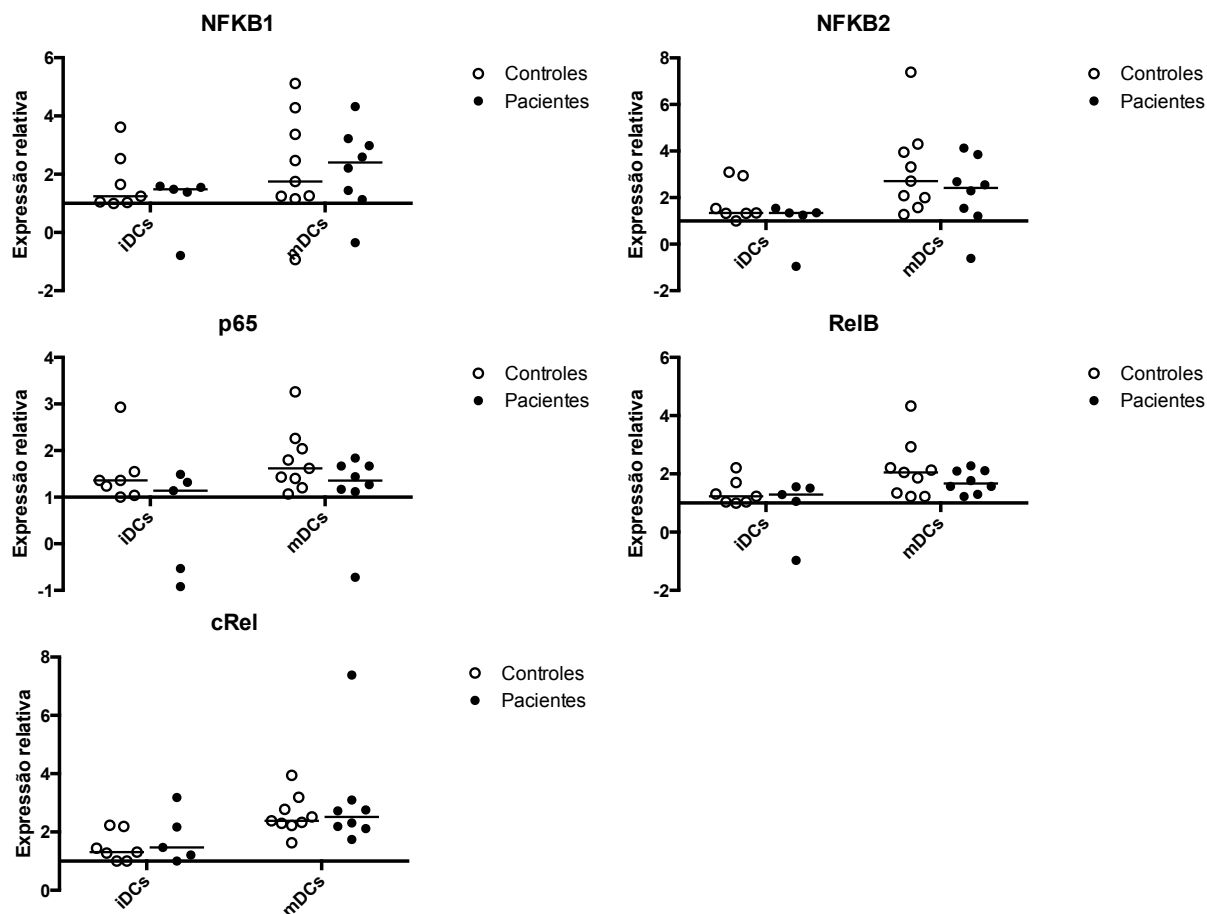


Figura 28 – Avaliação da expressão de genes que codificam as subunidades de NF-κB. Gráficos de dispersão dos resultados da análise de transcrição dos genes NFKB1, NFKB2, p65, RelB e cRel por PCR em tempo real, avaliada em células dendríticas imaturas (iDCs) e DCs após 1 hora da ativação com TNF- α (mDCs), derivadas de monócitos de pacientes com câncer de mama e voluntárias saudáveis (controles).

4.8 Avaliação da expressão de genes relacionados com a via de NF-κB

Visando também avaliar, de modo global, a via de NF-κB, selecionaram-se 3 amostras de RNA total extraído de DCs do quinto dia de cultura após 1 h de ativação com TNF- α , e seus respectivos controles experimentais, para posterior transcrição reversa e quantificação relativa da expressão gênica por meio de placas de arranjo de PCR em tempo real. As pacientes selecionadas para este ensaio foram: P40, P43 e P36, cujos sobrenadantes das culturas para diferenciação em DCs apresentaram aumentos crescentes de concentração de IL-8 em relação aos sobrenadantes das culturas dos respectivos controles experimentais, de 1,3, 1,5 e 2,4 vezes, respectivamente.

Na Tabela 8 abaixo encontram-se os resultados da expressão relativa de cada gene testado (*fold regulation*) nas pacientes em relação aos seus respectivos controles experimentais, considerando-se 1,5 vezes para cima ou para baixo o limite de corte (*fold regulation threshold*) para a variação (aumentos de expressão gênica – valores positivos – em vermelho, e diminuição de expressão gênica – valores negativos – em verde). Células pintadas em cinza indicam que a expressão gênica é relativamente baixa ($Ct > 30$) ou não detectada em pelo menos uma amostra do par, devendo este resultado ser avaliado com precaução, e idealmente confirmado. Os resultados gerais da tabela estão demonstrados na Figura 29 (*Heat Maps*), e os resultados acima ou abaixo do limite de corte estão demonstrados na Figura 30.

Inicialmente, vale pontuar algumas alterações consideradas interessantes. Na Tabela 8 abaixo, vale chamar a atenção à expressão de alguns genes, os quais independentemente do valor em relação a seu controle experimental, encontraram-se aumentados (CASP8, IL1R1 e IKBKB (IKK-2)) ou diminuídos (BCL3, CCL5 (RANTES), CD40, ICAM1, NFKBIA ($I\kappa B\alpha$), CD40, IL-8 e CD83) em todas as amostras testadas. Em seguida, na Figura 30, painel inferior, chamam a atenção as alterações observadas em alguns genes, as quais estariam 1,5 vezes acima ou abaixo do limite de corte. Por exemplo NFKBIA ($I\kappa B\alpha$) e BCL3, cuja expressão estaria diminuída em P40 e NFKBIE ($I\kappa B\epsilon$), a qual estaria diminuída em P43. Outros genes, por exemplo, encontraram-se diminuídos no mesmo sentido em duas das três amostras, como por exemplo FOS (aumentado em P36 e P40). Por sua vez, o mesmo gene demonstrou alteração na expressão gênica em duas das três amostras, mas em sentido opostos, como por exemplo BCL2A1 (aumentado em P43 e diminuído em P40).

Tabela 8 – Resultado da expressão de genes relacionados com a via de NF- κ B por arranjo de PCR em tempo real. Resultados da expressão relativa de cada gene testado (*fold regulation*) por arranjo de PCR em tempo real nas pacientes P36, P43 e P40 em relação aos seus respectivos controlos experimentais. Considerando-se 1,5 vezes para cima ou para baixo o limite de corte (*fold regulation threshold*) para a variação, os aumentos de expressão gênica – valores positivos – estão demonstrados em vermelho, e as diminuições de expressão gênica – valores negativos – estão demonstradas em verde). Células pintadas em cinza indicam que a expressão gênica é relativamente baixa ($Ct > 30$) ou não detectada em pelo menos uma amostra do par.

Posição	Gene	P36	P43	P40
A01	AGT	1,1408	-1,1027	2,1369
A02	AKT1	1,1479	-1,1157	1,1038
A03	ATF1	1,1958	-1,0837	1,0235
A04	BCL2A1	1,0973	2,0878	-2,1016
A05	BCL2L1	1,0049	-1,0353	-1,1046
A06	BCL3	-1,1761	-2,2926	-1,2436
A07	BIRC2	1,0973	-1,1266	-1,1937
A08	CARD11	2,0364	1,5476	-1,9126
A09	CASP1	1,1274	-1,06	-1,3713
A10	CASP8	1,2932	1,0578	1,1038
A11	CCL2	2,6722	-3,8825	1,8474
A12	CCL5	-5,1946	-1,7363	-1,9827
B01	CD40	-1,5189	-1,3689	-1,2214
B02	CFLAR	1,014	-1,3168	1,1814
B03	CHUK	1,1933	-1,0534	-1,3798
B04	CSF1	1,59	1,279	-1,0864
B05	CSF2	1,5757	-1,0548	6,1454
B06	CSF3	3,8611	-1,3632	2,295
B07	EGFR	1,1408	-1,1027	2,1369
B08	EGR1	-1,6033	-2,6299	1,5236
B09	ELK1	1,089	-1,2016	-1,1278
B10	FADD	1,1942	-1,0703	-1,2839
B11	FASLG	-16,5757	16,291	37,3361
B12	FOS	1,6865	-1,3232	2,0698
C01	HMOX1	1,1503	1,0056	-1,2071
C02	IFNA1	1,1408	1,883	2,0441
C03	IFNG	-1,9643	-1,108	2,0399
C04	IKBKB	1,036	1,0238	1,0192
C05	IKBKG	1,2016	-1,1297	-1,0545
C06	IL10	-1,1769	-1,2728	1,7526
C07	IL1A	-1,9159	-1,0461	1,0392
C08	IL1B	-1,9239	-1,4722	1,1364
C09	IL1R1	1,9079	1,0345	1,1216
C10	IRAK1	1,1876	1,0468	-1,0335
C11	IRAK2	1,3679	-1,08	-1,3172
C12	JUN	1,2808	-1,0288	-1,2444
D01	LTA	1,1352	-1,2346	2,1369
D02	LTBR	1,3519	1,0822	-1,0385
D03	MALT1	1,2414	1,1251	-1,188
D04	MAP3K1	-1,2614	1,2915	1,0066
D05	MYD88	1,0882	1,2277	-1,1708
D06	NFKB2	1,0607	1,3104	1,0751
D07	NOD1	1,0867	-1,083	1,1798
D08	PSIP1	1,0703	-1,325	1,2548
D09	RAF1	1,0913	1,0762	-1,0486
D10	REL	-1,129	1,279	-1,0818
D11	RELA	1,0541	-1,1337	-1,1404
D12	RELB	1,0331	-1,426	1,2054
E01	RHOA	1,0168	-1,1392	-1,2376

Posição	Gene	P36	P43	P40
E02	RIPK1	1,0182	-1,0381	-1,0378
E03	STAT1	1,2294	1,2397	1,0818
E04	TBK1	-1,007	-1,0792	-1,3145
E05	TICAM1	1,1591	-1,1057	-1,229
E06	TIMP1	-2,2145	-2,3424	-1,2479
E07	TLR1	-1,1423	-1,0295	-1,3468
E08	TLR2	-1,0189	-1,5147	1,0143
E09	TLR3	-1,08	-1,425	-1,7393
E10	TLR4	-1,0007	-1,1591	1,1979
E11	TLR6	1,2092	-1,0882	1,0059
E12	TLR9	-1,5401	-1,5241	1,5058
F01	TNFRSF10A	-1,0673	-1,0636	-1,0328
F02	TNFRSF10B	-1,1157	-1,0785	1,0278
F03	TNFRSF1A	1,0497	-1,2941	-1,1216
F04	TNFSF10	-3,2671	1,0943	-1,6251
F05	TRADD	-1,2176	-1,1583	-1,1161
F06	TRAF2	1,1736	-1,0644	1,183
F07	TRAF3	1,4399	-1,0417	1,0985
F08	TRAF6	1,0454	-1,0563	-1,1676
F09	BIRC3	1,1011	1,2924	-1,0479
F10	CCL20	1,4044	-1,0807	-2,6973
F11	CD83	-1,1835	-1,0042	-1,113
F12	CXCL2	-1,1728	-2,9343	-1,1539
G01	CXCL3	1,3938	-4,2369	1,4434
G02	ICAM1	-1,3594	-1,6725	-1,1475
G03	IL8	-1,257	-1,5168	-1,1333
G04	IRF1	-1,2728	-1,4712	1,1749
G05	NFKB1	1,0673	-1,1647	1,0378
G06	NFKBIA	-1,1455	-1,6234	-1,0729
G07	NFKBIE	1,3333	-1,0563	-1,868
G08	STX11	1,0396	-1,1057	-1,2812
G09	TIFA	1,4449	-1,1487	-1,1563
G10	TNF	1,1696	-1,883	1,1015
G11	TNFAIP2	1,0882	1,3444	-1,1107
G12	TNFAIP3	-1,0563	-1,2675	-1,1475

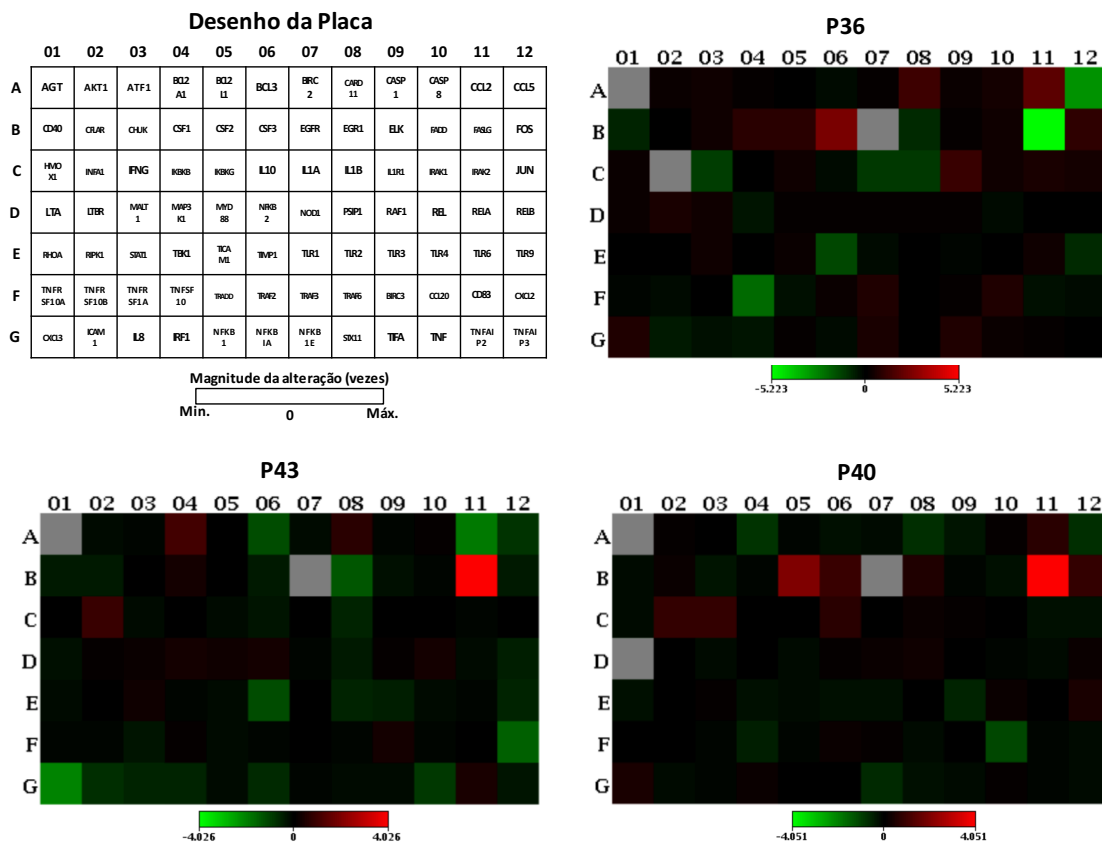


Figura 29 – Heat maps dos resultados de expressão gênica por arranjo de PCR em tempo real. Heat maps dos resultados de expressão gênica por arranjo de PCR em tempo real das pacientes relacionadas (P40, P43 e P36) em relação a seus respectivos controles experimentais.

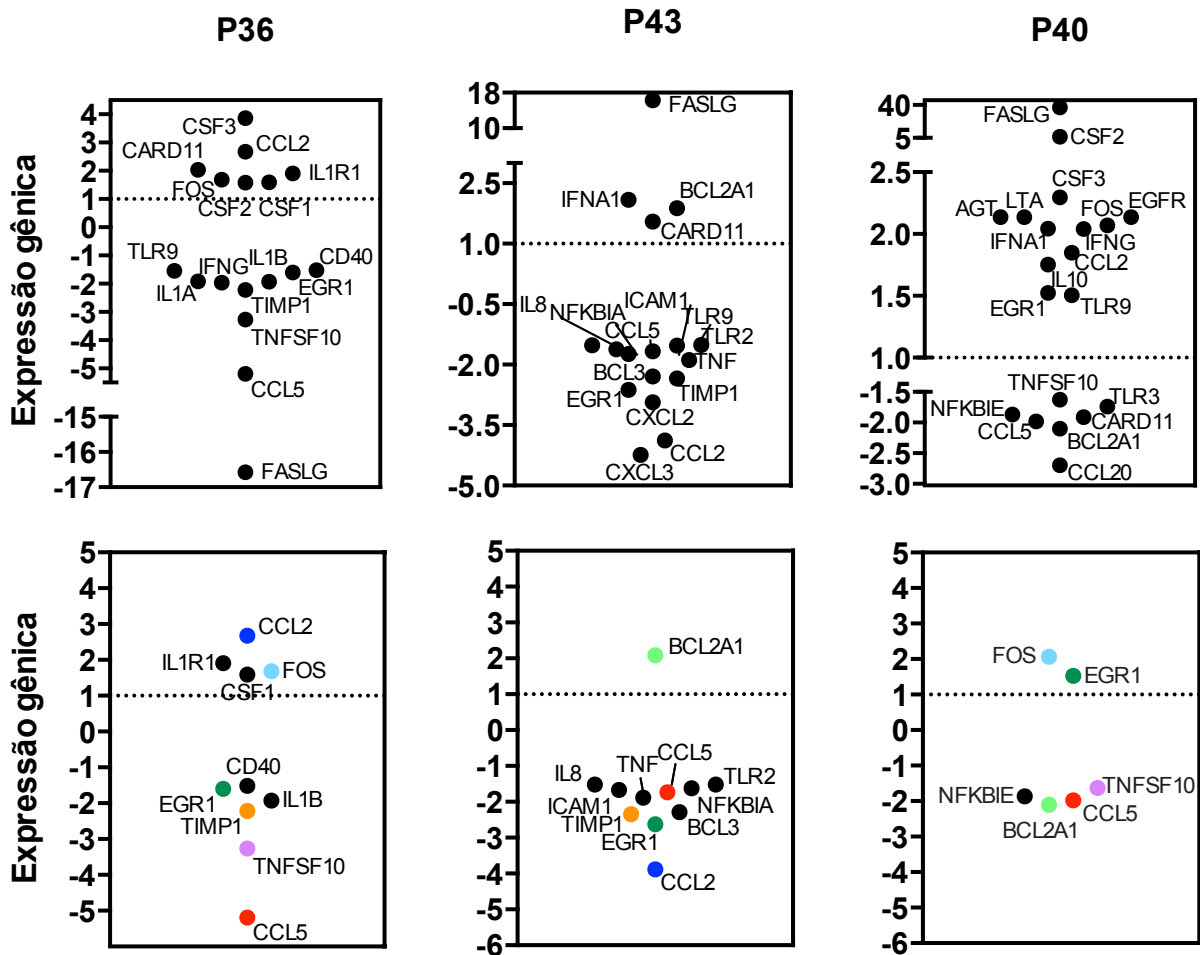


Figura 30 – Relação de genes cuja expressão gênica por arranjo de PCR em tempo real está possivelmente alterada em pacientes com câncer de mama. Gráficos de dispersão indicando os genes cuja expressão relativa (*fold regulation*) por arranjo de PCR em tempo real nas pacientes em relação aos seus respectivos controles experimentais variou 1,5 vezes para cima ou para baixo do limite de corte (*fold regulation threshold*).

5 DISCUSSÃO

Enquanto são bem relatadas as alterações fenotípicas e funcionais das células dendríticas de pacientes com câncer, alterações estas que são mantidas quando da sua diferenciação *in vitro* a partir de monócitos de sangue periférico, menos é sabido sobre os mecanismos pelos quais isso ocorra. Visto que os os processos cruciais de diferenciação e maturação das DCs são regulados pelo fator de transcrição nuclear *kappa* B, nos propusemos a estudar esta via em células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com câncer de mama, partindo da hipótese de que alterações desta via contribuam, nesses indivíduos, para a geração de DCs com fenótipo alterado, levando ao escape tumoral.

No presente estudo, foi possível identificar que há alterações da presença de NF- κ B no núcleo de monócitos e DCs derivadas de monócitos de pacientes com câncer de mama em comparação com doadoras sadias (controles). De forma surpreendente, e até onde se pode determinar, ainda não relatada na literatura, a análise da presença de NF- κ B no núcleo de Mos (recém selecionados), iDCs (quinto dia da cultura) e mDCs (24 horas após ativação com TNF- α) indica que as pacientes falham em modular tal fator de transcrição, isto é, sua presença não distingue estes estágios de maturação, ao contrário do que ocorre em células de doadoras sadias. Enquanto há diminuição significativa de NF- κ B no núcleo de iDCs diferenciadas de Mos provenientes de sangue periférico de controles, seguido por um aumento significativo de NF- κ B no núcleo de DCs após 24 h de estímulo de ativação com TNF- α , as células das pacientes não diferem significativamente em quantidade de NF- κ B no núcleo nos três momentos avaliados. Isto se reflete numa quantidade inferior deste fator no núcleo de monócitos de pacientes, que, no entanto, não decai com a diferenciação, passando, portanto, a superar os níveis das iDCs controle, que voltam a aumentar seus níveis nucleares de NF- κ B com a maturação, o que, mais uma vez, não ocorre nas células de pacientes. Uma explicação possível para esta falta de modulação do NF- κ B em células de pacientes seria a de que os monócitos e conseqüentemente as DCs deles derivadas, já estariam alterados, resistindo, portanto à modulação funcional induzida *in vitro*, conforme será discutido abaixo.

Inicialmente, procurou-se estabelecer o fenótipo das DCs derivadas de monócitos de pacientes com câncer de mama, bem como dos próprios monócitos, a fim de confirmar a presença de defeitos decorrentes da diferenciação nestas células, reportados em estudos anteriores do nosso grupo, bem como em outros

da literatura. Conforme esperado, os monócitos das pacientes com câncer de mama apresentaram reduzida capacidade de diferenciação em DCs, havendo uma menor quantidade de células capaz de adquirir marcadores típicos dessas APCs, mediante estímulo de ativação. Nosso grupo, em particular, já demonstrou que células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com câncer de mama, diferenciadas em condições semelhantes ou não às do presente estudo, geraram células com alterações fenotípicas, tais como a diminuição significativa na frequência de células HLA-DR⁺, CD86⁺ e CD11c⁺, redução significativa na capacidade de indução de proliferação de linfócitos T alogênêicos (AZEVEDO-SANTOS, 2010), e maior capacidade de indução células T reguladoras Foxp3⁺ *in vitro* (RAMOS, 2015). Defeitos fenotípicos e funcionais das DCs também foram observados quando diferenciadas a partir de monócitos de pacientes portadores de tumores hematológicos, como leucemia linfocítica crônica (TONIOLO, 2014). Ainda, as falhas dos monócitos de pacientes com câncer de mama parecem persistir também quando da sua diferenciação em outro tipo celular, macrófagos M1, na presença de GM-CSF/IFN- γ , os quais adquiriram fenótipo alterado e com características imunossupressoras (RAMOS, 2015). Tais dados do laboratório, em conjunto, são corroborados por estudos da literatura, que reportam que DCs derivadas de pacientes com câncer são menos sensíveis aos estímulos que induzem a sua maturação, levando a células pouco eficientes (PEDERSEN et al., 2005). No presente estudo, observou-se que o estímulo de ativação com TNF- α foi insuficiente para induzir, nas células das pacientes, uma frequência de células positivas para a molécula coestimuladora CD86, HLA-DR, e do marcador de ativação CD83, em níveis comparáveis aos das doadoras saudáveis. Este fenômeno, associado à liberação de citocinas pró-inflamatórias, é necessário para maturação fenotípica e funcional das DCs (BANCHEREAU et al., 2000; CAUX et al., 1994). Embora tanto as culturas oriundas de indivíduos saudáveis quanto às de pacientes com câncer de mama tenham apresentado diminuição na frequência de células CD14, compatível com a diferenciação em DCs, as iDCs das pacientes já indicam uma tendência à diminuição em frequência de células positivas para diversos marcadores, acompanhada de um aumento de intensidade de tais moléculas na membrana, embora não de forma significativa. No entanto, após a ativação, enquanto que, de modo geral, as culturas oriundas de indivíduos controles tenham aumentado ou mantido altas frequências de células

positivas para moléculas importantes na ativação de linfócitos (CD80, CD86, HLA-DR e CD83), as culturas das pacientes diminuíram ou mantiveram níveis inferiores de células positivas para estes marcadores, acompanhada por rMFIs variáveis dependendo da molécula, indicando de modo geral falhas na capacidade de diferenciação dos monócitos de pacientes com câncer de mama em DCs.

Neste ponto, cabe ressaltar a intensa variação observada na frequência e na intensidade mediana de fluorescência relativa dos ensaios de citometria entre os indivíduos avaliados e entre experimentos, tanto em controles quanto em pacientes. A heterogeneidade das DCs entre indivíduos é, na realidade, um fenômeno bastante observado. DCs cultivadas em meio AIM-V e ativadas com TNF- α diferem das células cultivadas em meio RPMI-1640 e diferem, ainda, entre si, dependendo de fatores nem sempre controláveis (NEVES, 2003). Essas variações entre os fenótipos das células dendríticas humanas diferenciadas *in vitro*, mais evidentes em algumas moléculas do que em outras, também podem ser explicadas pela grande heterogeneidade das células dendríticas, já que nenhum modelo completo de vias de desenvolvimento foi estabelecido para estas células (KAH-WAI et al., 2006). Soma-se a isso a variação natural existente entre os doadores, tanto genética quanto ambiental. Na verdade, nosso laboratório já mostrou que, ao menos em modelo murino, até mesmo o nível de estresse do animal é capaz de alterar fenotipicamente as células dendríticas e a capacidade de diferenciação de precursores neste tipo celular (TOMIYOSHI et al., 2009).

Por fim, não se pode deixar de mencionar que, ainda que no presente estudo tenha se observado alterações na quantidade de NF- κ B no núcleo de monócitos de pacientes, os quais falharam em se diferenciarem totalmente em DCs, o fenótipo de membrana de monócitos quanto às moléculas avaliadas não revelou diferenças significativas em comparação com as células de indivíduos saudáveis, nem na análise da frequência de células positivas para os marcadores avaliados, nem na análise da intensidade mediana de fluorescência relativa destes marcadores. A partir destes resultados, pode-se sugerir que o comprometimento observado destas células na diferenciação em DCs (e macrófagos) alterados não se reflita na expressão basal das moléculas avaliadas na membrana. De fato, há um relato recente da literatura que, de maneira semelhante à observada em nosso estudo, não verificou alterações fenotípicas

em monócitos de sangue periférico de pacientes com câncer primário de células não pequenas de pulmão, dentre as moléculas avaliadas, CD11c e HLA-DR, em comparação com monócitos provenientes de indivíduos saudáveis (ALMATROODI et al., 2014). Por outro lado, resultados contrastantes também foram observados em monócitos de pacientes com outros tipos de neoplasias (BROOKS et al., 2012), indicando que outras moléculas e fatores devem ser considerados na avaliação dos monócitos.

Tal heterogeneidade entre indivíduos e entre experimentos também pôde ser observada na análise do sobrenadante das culturas para diferenciação em DCs, avaliada com o intuito de melhor compreender o fenótipo/função das DCs geradas *in vitro* a partir de monócitos de pacientes e indivíduos saudáveis. Devido a tal heterogeneidade, analisou-se não apenas a concentração total da citocina IL-6 e da quimiocina IL-8 detectadas nas culturas de pacientes e controles, mas também a concentração relativa normalizada. Esta indicou que a maioria das culturas para diferenciação em DCs provenientes de pacientes com câncer de mama apresentou maior concentração de IL-8 no sobrenadante que as culturas provenientes das células controles. Nos sobrenadantes das culturas do quinto dia (iDCs), já há uma tendência de aumento de concentração de IL-8 no sobrenadante das culturas de pacientes. Tal tendência é mantida após 24 horas do estímulo de ativação por TNF- α , caindo após 48 horas. Visto que o promotor gênico desta quimiocina é regulado por NF- κ B, entre outros, e a associação da inflamação com câncer é bem estabelecida na literatura (revisto por VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012), sendo a desregulação da expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias, tais como a interleucina-8 (IL-8), em câncer de mama reconhecida há anos (revisto por TODOROVIC-RAKOVIC; MILOVANOVIC; 2013), estes resultados nos parecerem interessantes. Isto porque apesar do extenso relato da literatura descrevendo o aumento de IL-8 em uma variedade de tumores sólidos (BREW et al., 1996; FERRER et al., 1998; MASUYA et al., 2001), está principalmente reportada a contribuição de outras células, que não as DCs, como responsáveis pela produção desta quimiocina pró-inflamatória neste contexto, incluindo fibroblastos, linfócitos, neutrófilos, células endoteliais e uma variedade de células epiteliais normais e malignas (revisto por SINGH et al., 2013).

Não estão totalmente esclarecidos os mecanismos pelos quais a IL-8 contribua para a progressão tumoral. Acredita-se que a IL-8 promova a invasão e a metástase (LUCA et al., 1997), a angiogênese (KOCH et al., 1992) e a resistência ao tratamento (revisto por SINGH et al., 2013). Particularmente, em câncer de mama, o aumento de IL-8 foi correlacionado com tumores negativos para receptor de estrógeno (CHAVEY et al., 2008; FREUND et al., 2003), bem como associado a tumores que superexpressam Her-2/*neu* (ACETO et al., 2012), dois tipos tumorais com piores prognósticos. Ainda, há diferentes relatos que apontam que a IL-8 atue sobre as DCs, no contexto do microambiente tumoral, de modo a prejudicar a migração destas células para os órgãos linfoides secundários, onde a resposta imune adaptativa, importante na defesa contra tumores, tem início, sendo este um possível mecanismo de evasão tumoral (ALFARO et al., 2011; FEIJOÓ et al., 2005).

Neste sentido, tendo sido observado pelo presente estudo que as DCs derivadas de monócitos de pacientes com câncer de mama possuem alterações na capacidade de modulação de NF- κ B, um dos fatores de transcrição mais importantes na regulação da expressão gênica de IL-8 (FREUND et al., 2004), e considerando que os sobrenadantes das culturas das pacientes possuem uma tendência de aumento desta quimiocina, a qual possui um papel pró-tumoral bem estabelecido na patogênese desta neoplasia, sugere-se que as alterações observadas no NF- κ B das pacientes possam estar associadas ao aumento de IL-8 nos sobrenadantes das culturas das pacientes, adicionando assim, mais um possível fator de contribuição das DCs de pacientes com câncer de mama para o escape tumoral.

Elegante trabalho de CHAVEY e colaboradores (2008) mostrou a direta relação da expressão de IL-8 com a acetilacao do sítio de ligação do NF- κ B na região promotora do gene da IL-8 e consenquente maior atividade desse fator de transcrição. Vale observar então que não só a quantidade de um fator de transcrição mas também a disponibilidade dos sítios reguladores dos genes podem influenciar nos níveis de expressão genica. Esse parâmetro não foi diretamente avaliado no presente estudo mas alterações epigeneticas podem ser mecanismos pelos quais tumores afetam a diferenciação celular.

Em nossa avaliação da expressão genica de IL8, não foi possível observar nenhuma diferença entre indivíduos controle e pacientes. Os resultados das

análises de expressão gênica, nem sempre corroboraram os estudos que avaliaram a presença proteica nas DCs. Muitas poderiam ser as explicações para tais aparentes discrepâncias. Primeiramente, há que se considerar que apenas dois pontos no tempo foram avaliados quanto à transcrição gênica – fenômeno geralmente mais fugaz de ser avaliado do que o fenótipo de membrana – um momento posterior às alterações fenotípicas já presentes na membrana das iDCs do quinto dia, visto que já se apresentaram diferenciadas quando da extração do RNA total das células, e outro imediatamente posterior ao estímulo de ativação com TNF- α (1 hora). Assim, não se pode descartar a hipótese de que possíveis diferenças nos níveis transcricionais já tenham ocorrido quando os monócitos foram estimulados, no dia zero da cultura, à diferenciação em DCs com GM-CSF e IL-4. Ainda, mesmo nos casos em que observamos diferenças aparentes na transcrição gênica (por exemplo, no caso de CD40 e HLA-DR, que poderiam, à princípio, se correlacionar com o fenótipo), não se pode afastar por completo a hipótese de existência de possíveis alterações de cinética de transcrição gênica entre pacientes e controles, de modo que o um ponto avaliado não representa o resultado coletivo quando este é considerado no tempo, podendo levar a conclusões precipitadas. Entende-se, portanto, que para a correta avaliação da transcrição desses genes, o ideal seria o delineamento experimental que considerasse a realização de cinética com diferentes pontos, e partindo dos monócitos recém selecionados e pós estímulo para diferenciação. No entanto, também deve ser levado em consideração que, neste caso, as células das pacientes possivelmente seriam o fator limitante, se não impeditivo, para a adequada realização deste ensaio.

Assim, na realidade, considerando o conjunto de resultados obtidos, parece que enquanto alguns genes regulados por NF- κ B não parecem alterados, como o de IL-6, por exemplo, nas condições avaliadas, outros aparentam estar alterados, como o de CD86, quando se considera a falha de aquisição desta molécula da membrana durante a diferenciação, e outros ainda parecem estar aumentados, como o de IL-8, contribuindo para um fenótipo geral de DCs defeituosas e possivelmente comprometidas funcionalmente sob diversos aspectos, como já demonstrado por nosso grupo, e que poderia ser resultado dos defeitos de modulação de NF- κ B observados neste estudo.

É interessante notar que, em outro projeto de nosso laboratório, observamos que DCs-*like* diferenciadas a partir de cultura de células da linhagem monocítica THP-1, na presença de sobrenadante tumoral de linhagem MCF-7, demonstram, também, aumento da translocação de NF- κ B para o núcleo (Ana Carolina Franco Ferreira, comunicação pessoal). Ainda, fenômeno semelhante ao observado foi relatado por Kiertscher e cols. (2000), que determinaram a quantidade de RelB em iDCs diferenciadas de monócitos na presença de sobrenadante tumoral. Neste estudo, os autores observaram maior quantidade de RelB (única subunidade avaliada) no núcleo de células dendríticas imaturas expostas a sobrenadante tumoral do que em células expostas a sobrenadante controle. Ainda, tal aumento foi acompanhado por um aumento de expressão na superfície de marcadores de membrana das DCs, como CD83, CD80, CD86, CD40 e HLA-DR, por exemplo. Kiertscher e cols. (2000) interpretaram tal fenômeno como uma aquisição precoce de fenótipo maduro pelas iDCs cultivadas na presença do sobrenadante, baseado no papel conhecido do RelB na maturação e/ou função das DCs. Ainda, relataram que tais células apresentavam apoptose precoce, e produção prejudicada de citocinas, o que poderia no conjunto levar à apresentação antigênica prejudicada pelas DCs. Esses dados, até onde possamos avaliar, são compatíveis com nossos resultados, visto que também observamos para alguns marcadores uma tendência de aumento de rMFI de algumas moléculas em iDCs, como CD83 e CD86, por exemplo. Entretanto, nossos dados sugerem que não só esta subunidade, RelB, estaria afetada em células de pacientes, mas que este seria um fenômeno mais amplo e, portanto, possivelmente capaz de afetar outras funções celulares, como, por exemplo a própria diferenciação dos monócitos em iDCs, como nosso e outros grupos têm observado.

A avaliação das subunidades por *supershift* indicou, que tanto iDCs quanto mDCs de pacientes com câncer e indivíduos saudáveis possuem as subunidades p50, p65, RelB e cRel no núcleo. No entanto, o padrão relativo observado para tais subunidades difere em iDC de pacientes e controles. As iDCs das pacientes possuem padrão semelhante de composição de subunidades que as mDCs controles, pelo menos considerando aquelas que puderam ser avaliadas em mDCs. Observamos que em iDCs controles há um aumento relativo de p50 em relação às outras subunidades, indicando que há predominância de homodímeros

de p50 nas iDCs controles. Visto que esse conjunto não possui TADs, seriam considerados repressores transcricionais, de modo que necessitariam de coativadores, tais como BCL3, para incentivarem a transcrição gênica. Isto parece compatível com dados da literatura que apontam para a importância de NF- κ B1 na manutenção de um estado tolerogênico pelas DCs (DISSANAYAKE et al., 2011). Mediante ativação, as DCs controles aumentam não apenas em quantidade, mas de forma relativa, a participação das demais subunidades encontradas em relação à p50, o que poderia contribuir para uma maior formação de heterodímeros nas mDCs em particular com RelB, e que seria compatível com a aquisição pelas DCs de um fenótipo maduro e com capacidade de aquisição de atividade aloestimulatória (PETTIT et al., 1997; RESCIGNO et al., 1999). Já as iDCs de pacientes com câncer, cuja presença de NF- κ B no núcleo já estaria aumentada em relação às iDCs controles, possuem esse mesmo padrão de contribuição das subunidades que as mDCs controles, com diminuição relativa de p50.

Ainda que possuam um padrão “ativado” quanto à constituição das subunidades no núcleo, o que poderia ser compatível com a observada tendência de aumento na membrana de expressão de algumas moléculas, condizentes com as observações de Kiertscher e cols. (2000) e, em menor escala, com as nossas próprias, sabe-se que tais células possuem alterações funcionais, como já mencionado extensivamente. Ainda, esse aumento precoce pode ser responsável pela irresponsividade *in vitro* mediante estímulo de ativação. Vale mencionar a interessante observação do nosso estudo de que as mDCs das pacientes parecem não conseguir atingir níveis de NF- κ B compatíveis com os observados em mDCs controles, sendo modulados até um limite máximo de ativação. Pode-se hipotetizar que o aumento de NF- κ B já em iDCs tenha alterado já o padrão de expressão gênica e epigenética, de forma que as mDCs passam a não responder ou responder de forma limitada ao mesmo estímulo.

Outra hipótese, cuja avaliação tenha talvez sido a inicialmente pretendida pelo presente estudo, mas que não foi possível visualizar nos ensaios realizados, é de que ainda que o padrão de a composição das subunidades nas células de pacientes e controles seja aparentemente a mesma – ao menos em mDCs –, a composição relativa de cada dímero possível pode variar, tendo em vista a quantidade de cada subunidade presente, por exemplo. Também, podem varia a

afinidade dos dímeros a cada sítio do DNA, a presença maior ou menor de coativadores, a maior ou menor exposição de sítios devido a alterações epigenéticas, entre outros. São muitas e complexas as possibilidades a serem melhor avaliadas em estudos futuros, as quais poderão, de fato revelar quais fatores estariam contribuindo para as alterações das DCs, e como. É mais importante, qual seria a melhor maneira de corrigi-las.

Adicionando um grau a mais de complexidade nessa linha de raciocínio, vale chamar a atenção para um relato da literatura, que avaliou o efeito de sobrenadante tumoral sobre a diferenciação em DCs a partir de células CD34⁺ (células tronco hematopoéticas), com resultados diferentes quanto à quantidade de NF- κ B no núcleo. Ainda que as DCs também tenham se apresentado defeituosas fenotipicamente, conforme demonstrado por diminuição de CD80, CD86 e HLA-DR, e com capacidade funcional incompleta (GABRILOVICH et al., 1996; MENETRIER-CAUX et al., 1998), as DCs sob influência de sobrenadante tumoral, apresentaram inibição de NF- κ B no núcleo (OYAMA et al., 1998), diferente dos estudos do nosso laboratório e do aqui relatado (KIERTSCHER et al., 2000). Neste sentido, torna-se evidente que independente do padrão observado da alteração no núcleo, a modulação de NF- κ B pelo tumor é um dos mecanismos de escape que gera, de forma recorrente, independente de metodologia e outras variáveis possíveis, DCs com alterações fenotípicas e funcionais, incapazes de combater o tumor.

De volta às subunidades, o que conseguiu-se avaliar neste estudo nesse sentido, de forma quantitativa, foram os resultados de PCR em tempo real, cujas maiores tendências de diferenças estavam na transcrição de NF κ B1, maior em pacientes após estímulo de ativação, e em p65 e RelB, pouco diminuídos em pacientes após a ativação. A diminuição de RelB, chama atenção particular, e poderia ser interpretada como uma possível causa para a não sustentação ou diminuição das moléculas de membrana observadas em mDCs de pacientes, o que estaria alinhado com entendimento geral da literatura sobre a importância desta subunidade na maturação das DCs (PETTIT et al., 1997). No entanto, a melhor forma para estudo desta hipótese seria pela realização um ensaio que avaliasse a própria proteína. Nos *supershifts* realizados, visto que para este anticorpo o padrão típico de presença da subunidade não se deu pelo *supershift* clássico, com surgimento de uma banda de maior peso molecular, não foi

possível avaliar a sua contribuição relativa nas células, nem possíveis diferenças entre pacientes e controles.

NF- κ B2, apesar de transcrito em pacientes e controles, quase não foi identificado no núcleo na forma de p52, o que parece ser compatível com um estudo, em que tal subunidade também não foi observada em DCs nas condições avaliadas. No entanto, não se pode descartar a hipótese que esteja alterada nas mDCs de pacientes, visto que quase não foi avaliada em pacientes com câncer de mama ductal invasivo, mas que foi observada em um caso, curiosamente, em mDCs de paciente com carcinoma ductal *in situ*, conforme já apontado.

Por fim, visando aprofundar o estudo sobre via de NF- κ B em DCs derivadas de pacientes com câncer de mama, que observamos estar alterada, optamos pela realização de uma abordagem ampla, que poderia tanto auxiliar a compreender melhor alguns dos fenômenos observados, quanto abrir questões a ser melhor investigadas. Para tanto, optamos pela realização da avaliação da expressão de genes relacionados com a via de NF- κ B por meio de placas de arranjo de PCR em tempo real. Um desafio inicial foi justamente selecionar as pacientes que seriam investigadas. Assim, acreditamos que seria interessante partir dos resultados já obtidos de análise de citocinas no sobrenadante, considerando que esta medida seria forma indireta de avaliação de alteração da via de NF- κ B nessas pacientes. Cabe neste momento apontar que uma limitação técnica com relação justamente ao número de células de pacientes impossibilitou que do mesmo indivíduo pudéssemos obter resultados quanto à quantidade e constituição de NF- κ B do núcleo, caracterização fenotípica de suas moléculas de membrana e expressão do mRNA antes e depois do estímulo. Desta maneira, os diferentes experimentos foram realizados em blocos.

Assim, o critério de seleção se baseou em pacientes cujos sobrenadantes das culturas para diferenciação em DCs apresentassem aumentos crescentes de concentração de IL-8 em relação aos sobrenadantes das culturas dos respectivos controles experimentais, de modo que as pacientes P40, P43 e P36, cujos sobrenadantes tinham resultado em 1,3, 1,5 e 2,4 vezes de aumento, respectivamente, em relação ao próprio controle experimental, foram selecionadas. Ao final da análise desse ensaio, no entanto, observamos que, na comparação dos seis indivíduos testados, o critério de seleção não foi bom. Isto porque, no agrupamento de indivíduos por padrão de expressão gênica, a

paciente P36, que inicialmente havia sido classificada como “alta produtora de IL-8 em relação ao controle”, foi a que mais se assemelhou aos outros indivíduos controles, assim como a paciente P40, que foi inicialmente classificada como “baixa produtora de IL-8 em relação ao controle”, foi a paciente que mais se distanciou das duas pacientes e dos controles, indicando que na análise do padrão de expressão gênica de 86 genes, houve inversão da classificação adotada inicialmente, de acordo com o critério baseado na produção de IL-8. De maneira curiosa, a classificação indicada pelo padrão de expressão gênica se alinhou com a “gravidade tumoral” dos prontuário das pacientes (Tabela 1), indicando que, talvez, extrapolando estas observações, piores tumores poderiam induzir à diferenciação de DCs com características mais alteradas.

Sem desejar entrar profundamente nesta discussão, e considerando que as ressalvas anteriormente pontuadas para os ensaios de PCR em tempo real também valem aqui, os resultados serão interpretados em conjunto, partindo do entendimento de que três amostras de pacientes com câncer de mama foram comparadas respectivamente a seus controles experimentais. Inicialmente, é interessante notar que a expressão de proteínas inibidoras do NF- κ B está diminuída nas DCs recém estimuladas das pacientes. NFKBIA (I κ B α) em todas as amostras, sendo que maiores diminuições foram observadas em P43 (-1,62 vez), e NFKBIE (I κ B ϵ), cuja diminuição em P40 foi de -1,87 vez. Tais proteínas são responsáveis por manter o NF- κ B inativo no citoplasma. Assim, se pudermos assumir que a menor expressão se correlaciona, neste caso, com menor quantidade de proteínas inibidoras no citoplasma, isso poderia auxiliar a explicar a maior quantidade de NF- κ B presente no núcleo de iDCs das pacientes. Ainda, observamos que as pacientes possuem maior expressão de IKBKB (IKK-2), ainda que de forma muito discreta. Poderia-se também supor que um aumento da quinase que faz parte do complexo que fosforila as proteínas inibidoras de NF- κ B, culminaria com aumento de liberação de NF- κ B para translocar ao núcleo, o que também poderia ser um mecanismo envolvido no fenômeno observado de aumento de NF- κ B no núcleo de iDCs. Ainda, observou-se que a expressão de BCL3 também está diminuída nas DCs recém estimuladas de pacientes. Esta molécula atua coativadora da transcrição gênica junto a homodímeros que não possuem TAD. Logo, poderia-se assumir que a diminuição deste cofator, em

associação ao resultado obtido de aumento de expressão de NF- κ B1 em DCs estimuladas de pacientes, levaria homodímeros de p50 que atuariam como repressores da transcrição gênica nas DCs das pacientes.

No entanto, de forma a confirmar o envolvimento desses fatores nas alterações observadas em nosso estudo, mais experimentos seriam necessários para que possamos tirar conclusões seguras acerca dos reais mecanismos responsáveis, ou que poderiam contribuir, para as alterações observadas nas DCs de pacientes com câncer de mama.

Tomados em conjunto, os resultados demonstraram que o NF- κ B está alterado em DCs derivadas de pacientes com câncer de mama, indicando que tais alterações possivelmente contribuam nesses indivíduos para a geração de DCs com fenótipo e função alterados, levando ao escape tumoral.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo indicam que:

- ✓ Células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com câncer de mama após estímulo de ativação com TNF- α possuem alterações fenotípicas significativas, com menor frequência de células CD86⁺, CD83⁺ e HLA-DR⁺, e com tendência maior à produção da quimiocina pró-inflamatória IL-8;
- ✓ Há alterações da presença de NF- κ B no núcleo de monócitos e DCs derivadas de monócitos de pacientes com câncer de mama;
 - Estímulo de diferenciação em DCs a partir de Mos de sangue periférico de indivíduos controles induz diminuição significativa na quantidade de NF- κ B ativo no núcleo, enquanto que tal modulação não é observada em células derivadas de pacientes com câncer de mama;
 - A ativação de DCs de indivíduos controles com TNF- α por 24 h induz aumento significativo na quantidade de NF- κ B no núcleo, enquanto que tal modulação não é observada em células derivadas de pacientes com câncer de mama;
- ✓ Há alterações no perfil das subunidades que constituem o NF- κ B no núcleo de DCs derivadas de monócitos de pacientes com câncer de mama;
 - iDCs controles possuem uma quantidade relativa maior de p50 e menor das demais subunidades, com diminuição na contribuição relativa de p50 após a ativação, enquanto as iDCs de pacientes, de modo geral, já apresentam o perfil das mDCs controles, e possível ausência de alteração deste perfil após a ativação.
- ✓ As alterações observadas no NF- κ B das DCs derivadas de monócitos de pacientes com câncer de mama podem estar relacionadas a alterações na expressão de genes que codificam proteínas inibidoras de NF- κ B, IKKs e co-ativadores transcricionais.

Propõem-se, pois, que as DCs de paciente com câncer de mama possuem alterações na capacidade de modulação de NF- κ B, que poderiam estar associadas aos defeitos fenotípicos observados nas células das pacientes, e ao aumento de produção de IL-8, sendo estes mecanismos de escape do tumor à resposta imune. Nossos dados, embora preliminares, indicam que tais alterações na capacidade de modulação

de NF- κ B poderiam ser consequência da desregulação na expressão das proteínas inibidoras, IKKs e co-ativadores transcripcionais.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

ACETO, N.; DUSS, S.; MACDONALD, G.; MEYER, D. S.; ROLOFF, T. C.; HYNES, N. E.; BENTIREN-ALJ, M. Co-expression of HER2 and HER3 receptor tyrosine kinases enhances invasion of breast cells via stimulation of interleukin-8 autocrine secretion. **Breast Cancer Res.**, v. 14, p. R131, 2012.

AGGARWAL, B. B. Nuclear factor-kappaB: the enemy within. **Cancer Cell**, v. 6, p. 203-208, 2004.

ALFARO, C.; SUÁREZ, N.; MARTÍNEZ-FORERO, I.; PALAZÓN, A.; ROUZAUT, A.; SOLANO, S.; FEIJOO, E.; GÚRPIDE, A.; BOLAÑOS, E.; ERRO, L.; DUBROT, J.; HERVÁS-STUBBS, S.; GONZALEZ, A.; PEREZ-GRACIA, J. L.; MELERO, I. Carcinoma-derived interleukin-8 disorients dendritic cell migration without impairing T-cell stimulation. **PLoS One**, v. 6, e17922, 2011.

ALMATROODI, S. A.; MCDONALD, C. F.; COLLINS, A. L.; DARBY, I. A.; POUNIOTIS, D. S. Blood classical monocytes phenotype is not altered in primary non-small cell lung cancer. **World J. Clin. Oncol.**, v. 5, p. 1078-1087, 2014.

ANTONIA, S. J.; EXTERMANN, M.; FLAVELL, R. A. Immunologic nonresponsiveness to tumors. **Crit. Rev. Oncog.**, v. 9, p. 35-41, 1998.

ARTEAGA, C. L.; MOULDER, S. L.; YAKES, F. M. HER (erbB) tyrosine kinase inhibitors in the treatment of breast cancer. **Semin. Oncol.**, v. 29, p. 4-10, 2002.

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

BAAK, J. P.; VAN DOP, H.; KURVER, P. H.; HERMANS, J. The value of morphometry to classic prognosticators in breast cancer. **Cancer**, v. 56, p. 374-382, 1985.

BAAK, J. P.; VAN DIEST, P. J.; VOORHORST, F. J.; VAN DER WALL, E.; BEEH, L. V.; VERMORKEN, J. B.; JANSSEN, E. A. Prospective multicenter validation of the independent prognostic value of the mitotic activity index in lymph node-negative breast cancer patients younger than 55 years. **J. Clin. Oncol.**, v. 23, p. 5993-6001, 2005.

BALEEIRO, R. B.; ANSELMO, L. B.; SOARES, F. A.; PINTO, C. A.; RAMOS, O.; GROSS, J. L.; HADDAD, F.; YOUNES, R. N.; TOMIYOSHI, M. Y.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; BARBUTO, J. A. 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, p. 1335-1345, 2008a.

BALEEIRO, R. B.; BARBUTO, J. A. Local secretion/shedding of tumor-derived CD83

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação de documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

molecules as a novel tumor escape mechanism. **Mol. Immunol.** v. 45, p. 3502-3504, 2008.

BALEEIRO, R. B.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; TOMIYOSHI, M. Y.; GROSS, J. L.; HADDAD, F.; PINTO, C. A.; SOARES, F. A.; YOUNES, R. N.; BARBUTO, J. A. Expression of a dendritic cell maturation marker CD83 on tumor cells from lung cancer patients and several human tumor cell lines: is there a biological meaning behind it? **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 57, p. 265-270, 2008b.

BANCHEREAU; J. PALUCKA, A. K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, p. 296–306, 2005.

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

BANSAL, C.; PUJANI, M.; SHARMA, K. L.; SRIVASTAVA, A. N.; SINGH, U. S. Grading systems in the cytological diagnosis of breast cancer: a review. **J. Cancer Res. Ther.**, v. 10, p. 839-845, 2014.

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

BRAUN, T.; CARVALHO, G.; FABRE, C.; GROSJEAN, J.; FENAUX, P.; KROEMER, G. Targeting NF- κ B in hematologic malignancies. **Cell Death Differ.**, v. 13, p. 748-758, 2006.

BREW, R.; SOUTHERN, S. A.; FLANAGAN, B. F.; MCDICKEN, I. W.; CHRISTMAS, S. E. Detection of interleukin-8 mRNA and protein in human colorectal carcinoma cells. **Eur. J. Cancer.**, v. 32, p. 2142-2147, 1996.

BROOKS, N.; STOJANOVSKA, L.; GRANT, P.; APOSTOLOPOULOS, V.; MCDONALD, C. F.; POUNIOTIS, D. S. Characterization of blood monocyte phenotype in patients with endometrial cancer. **Int. J. Gynecol. Cancer**, v. 22, p. 1500-1508, 2012.

BOMBONATI, A.; SGROI, D. C. The molecular pathology of breast cancer progression. **J. Pathol.**, v. 223, p. 307-317, 2011.

BONIZZI, G.; KARIN, M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends Immunol.**, v. 25, p. 280–288, 2004.

BOTTERO, V.; WITHOFF, S.; VERMA, I. M. NF- κ B and the regulation of hematopoiesis. **Cell Death Differ.**, v. 13, p. 785-97, 2006.

BOTTI, C.; SEREGNI, E.; FERRARI, L.; MARTINETTI, A.; BOMBARDIERI, E. Immunosuppressive factors: role in cancer development and progression. **Int. J. Biol. Markers**, v. 13, p. 51-69, 1998.

CAUX, C.; DEZUTTER-DAMBUYANT, C.; SCHMITT, D.; BANCHEREAU, J. GM-CSF

and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. **Nature**, v. 360, p. 258-261, 1992.

CHABOT, V.; REVERDIAU, P.; IOCHMANN, S.; RICO, A.; SÉNÉCAL, D.; GOUPILLE, C.; SIZARET, P. Y.; SENSEBÉ, L. CCL5-enhanced human immature dendritic cell migration through the basement membrane in vitro depends on matrix metalloproteinase-9. **J. Leukoc. Biol.**, v. 79, p. 767-778, 2006.

CHAUX, P.; MOUTET, M.; FAIVRE, J.; MARTIN, F.; MARTIN, M. Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation. **Lab. Invest.**, v. 74, p. 975-83, 1996.

CHAUX, P.; FAVRE, N.; MARTIN, M.; MARTIN, F. Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression in rats. **Int. J. Cancer**, v. 72, p. 619-624, 1997.

HAVEY, C.; MÜHLBAUER, M.; BOSSARD, C.; FREUND, A.; DURAND, S.; JORGENSEN, C.; JOBIN, C.; LAZENNEC, G. Interleukin-8 expression is regulated by histone deacetylases through the nuclear factor-kappaB pathway in breast cancer. **Mol. Pharmacol.**, v. 74, p. 1359-1366, 2008.

CHEN, Y. Y.; SCHNITT, S. J. Prognostic factors for patients with breast cancers 1 cm and smaller. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 51, p. 209-225, 1998.

CHOUAIB, S.; ASSELIN-PATUREL, C.; MAMI-CHOUAIB, F.; CAIGNARD, A.; BLAY, J. Y. The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. **Immunol. Today**, v. 18, p. 493-497, 1997.

CIANFROCCA, M.; GOLDSTEIN, L. J. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. **Oncologist**, v. 9, p. 606-616, 2004.

CLAVIJO-SALOMON, M. A.; RAMOS, R. N.; CRIPPA, A.; PIZZO, C. R.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; BARBUTO, J. A. Monocyte-derived dendritic cells reflect the immune functional status of a chromophobe renal cell carcinoma patient: could it be a general phenomenon? **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 64, p. 161-171, 2015.

COURTOIS, G.; GILMORE, T. D. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. **Oncogene**, v. 25, p. 6831-6843, 2006.

CYSTER, J. G. Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. **J. Exp. Med.**, v. 189, p. 447-450, 1999.

DANTAS, K. A. N.; SANTOS, G. C.; GIANNOTTI FILHO, O. Sistemas de graduação para carcinoma de mama: estudo comparativo da concordância cito-histológica. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 25, p. 87-92, 2003.

DALL'OGGIO, M.; SROUGI, M.; BARBUTO, J. A. Complete response of metastatic renal cancer with dendritic cell vaccine. **Int. Braz. J. Urol.**, v. 29, p. 517-519, 2003.

DE ABREU, F. B.; WELLS, W. A.; TSONGALIS, G. J. The emerging role of the

molecular diagnostics laboratory in breast cancer personalized medicine. **Am. J. Pathol.**, v. 183, p. 1075-1083, 2013.

DE AZAMBUJA, E.; CARDOSO, F.; DE CASTRO, G. JR.; COLOZZA, M.; MANO, M. S.; DURBECQ, V.; SOTIRIOU, C.; LARSIMONT, D.; PICCART-GEBHART, M. J.; PAESMANS, M. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. **Br. J. Cancer**, v. 96, p. 1504-1513, 2007.

DELLA BELLA, S.; GENNARO, M.; VACCARI, M.; FERRARIS, C.; NICOLA, S.; RIVA, A.; CLERICI, M.; GRECO, M.; VILLA, M. L. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. **Br. J. Cancer**, v. 89, p. 1463-1472, 2003.

DISSANAYAKE, D.; HALL, H.; BERG-BROWN, N.; ELFORD, A. R.; HAMILTON, S. R.; MURAKAMI, K.; DELUCA, L. S.; GOMMERMAN, J. L.; OHASHI, P. S. Nuclear factor- κ B1 controls the functional maturation of dendritic cells and prevents the activation of autoreactive T cells. **Nat. Med.** v. 17, p. 1663-1667, 2011.

DOLCET, X.; LLOBET, D.; PALLARES, J.; MATIAS-GUIU, X. NF- κ B in development and progression of human cancer. **Virchows Arch.**, v. 446, p. 475-482, 2005.

DOWSETT, M.; SMITH, I. E.; EBBS, S. R.; DIXON, J. M.; SKENE, A.; A'HERN, R.; SALTER, J.; DETRE, S.; HILLS, M.; WALSH, G. Prognostic value of Ki67 expression after short-term presurgical endocrine therapy for primary breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 99, p. 167-170, 2007.

EISENBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão de literatura). **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 47, 377-388, 2001.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, p. 403-410, 1991.

FEIJOÓ, E.; ALFARO, C.; MAZZOLINI, G.; SERRA, P.; PEÑUELAS, I.; ARINA, A.; HUARTE, E.; TIRAPU, I.; PALENCIA, B.; MURILLO, O.; RUIZ, J.; SANGRO, B.; RICHTER, J. A.; PRIETO, J.; MELERO, I. Dendritic cells delivered inside human carcinomas are sequestered by interleukin-8. **Int. J. Cancer**, v. 116, p. 275-281, 2005.

FERRER, F. A.; MILLER, L. J.; ANDRAWIS, R. I.; KURTZMAN, S. H.; ALBERTSEN, P. C.; LAUDONE, V. P.; KREUTZER, D. L. Angiogenesis and prostate cancer: in vivo and in vitro expression of angiogenesis factors by prostate cancer cells. **Urology**, v. 51, p. 161-167, 1998.

FISHER, B.; REDMOND, C.; FISHER, E. R.; CAPLAN, R. Relative worth of estrogen or progesterone receptor and pathologic characteristics of differentiation as indicators of prognosis in node-negative breast cancer patients. Findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-06. **J. Clin. Oncol.**, v. 6, p. 1076-1087, 1988.

FISHER, E. R.; REDMOND, C.; FISHER, B. Histologic grading of breast cancer. **Pathol. Annu.**, v. 15, p. 239-251, 1980.

FITZGIBBONS, P. L.; PAGE, D. L.; WEAVER, D.; THOR, A. D.; ALLRED, D. C.; CLARK, G. M. et al. Prognostic factors in breast cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 124, p. 966-978, 2000.

FREUND, A.; CHAUVEAU, C.; BROUILLET, J. P.; LUCAS, A.; LACROIX, M.; LICZNAR, A.; VIGNON, F.; LAZENNEC, G. IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells. **Oncogene**, v. 22, p. 256-265, 2003.

FREUND, A.; JOLIVEL, V.; DURAND, S.; KERSUAL, N.; CHALBOS, D.; CHAVEY, C.; VIGNON, F.; LAZENNEC, G. Mechanisms underlying differential expression of interleukin-8 in breast cancer cells. **Oncogene**, v. 23, p. 6105-6114, 2004.

FRIDMAN, W. H.; DIEU-NOSJEAN, M. C.; PAGÈS, F.; CREMER, I.; DAMOTTE, D.; SAUTÈS-FRIDMAN, C.; GALON, J. The immune microenvironment of human tumors: general significance and clinical impact. **Cancer Microenviron.**, v. 6, p. 117-122, 2013.

GABRILOVICH, D. I.; CHEN, H. L.; GIRGIS, K. R.; CUNNINGHAM, H. T.; MENY, G. M.; NADAF, S.; KAVANAUGH, D.; CARBONE, D. P. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. **Nat. Med.**, v. 2, p. 1096-103, 1996.

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

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

GALON, J.; COSTES, A.; SANCHEZ-CABO, F.; KIRILOVSKY, A.; MLECNIK, B.; LAGORCE-PAGÈS, C.; TOSOLINI, M.; CAMUS, M.; BERGER, A.; WIND, P.; ZINZINDOHOUE, F.; BRUNEVAL, P.; CUGNENC, P. H.; TRAJANOSKI, Z.; FRIDMAN, W. H.; PAGÈS, F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. **Science**, v. 313, p. 1960-1964, 2006.

GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; STEIN, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int. J. Cancer**, v. 31, p. 13-20, 1983.

GERONDAKIS, S.; GROSSMAN, M.; NAKAMURA, Y.; POHL, T.; GRUMONT, R. Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts. **Oncogene**, v. 18, p. 6888-6895, 1999.

GERONDAKIS, S.; SIEBENLIST, U. Roles of the NF-kappaB pathway in lymphocyte development and function. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 2, p. a000182, 2010.

GIANNOUKAKIS, N.; BONHAM, C. A.; QIAN, S.; CHEN, Z.; PENG, L.; HARNAHA, J.; LI, W.; THOMSON, A. W.; FUNG, J. J.; ROBBINS, P. D.; LU, L. Prolongation of cardiac

allograft survival using dendritic cells treated with NF-kappaB decoy oligodeoxyribonucleotides. **Mol. Ther.**, v. 1, p. 430-437, 2000.

GILMORE, T. D. Introduction to NFkB: players, pathways, perspectives. **Oncogene**, v. 25, p. 6680-6684, 2006.

GHOSH, S.; HAYDEN, M. S. New regulators of NF-kappaB in inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 837-848, 2008.

GOLDMINZ, A. M.; AU, S. C.; KIM, N.; GOTTLIEB, A. B.; LIZZUL, P. F. NF- κ B: an essential transcription factor in psoriasis. **J. Dermatol. Sci.**, v. 69, n. 2, p. 89-94, 2013.

HAGEMANN, T.; LAWRENCE, T.; MCNEISH, I.; CHARLES, K. A.; KULBE, H.; THOMPSON, R. G.; ROBINSON, S. C.; BALKWILL, F. R. "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. **J. Exp. Med.**, v. 205, p. 1261-1268, 2008.

HART, D. N. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. **Blood**, v. 90, p. 3245-3287, 1997.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Signaling to NF-kappaB. **Genes Dev.**, v. 18, p. 2195-2224, 2004.

HENSON, D. E.; RIES, L.; FREEDMAN, L. S.; CARRIAGA, M. Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer: the basis for a prognostic index. **Cancer**, v. 68, p. 2142-2149, 1991.

HERSCHKOWITZ, J. I.; SIMIN, K.; WEIGMAN, V. J.; MIKAELIAN, I.; USARY, J.; HU, Z.; RASMUSSEN, K. E.; JONES, L. P.; ASSEFNIA, S.; CHANDRASEKHARAN, S.; BACKLUND, M. G.; YIN, Y.; KHRAMTSOV, A. I.; BASTEIN, R.; QUACKENBUSH, J.; GLAZER, R. I.; BROWN, P. H.; GREEN, J. E.; KOPELOVICH, L.; FURTH, P. A.; PALAZZO, J. P.; OLOPADE, O. I.; BERNARD, P. S.; CHURCHILL, G. A.; VAN DYKE, T.; PEROU, C. M. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol.**, v. 8, p. R76, 2007.

HOFER, S.; RESCIGNO, M.; GRANUCCI, F.; CITTERIO, S.; FRANCOLINI, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Differential activation of NF-kappa B subunits in dendritic cells in response to Gram-negative bacteria and to lipopolysaccharide. **Microbes Infect.**, v. 3, p. 259-265, 2001.

HOFF, P. M. G.; KATZ, A.; CHAMMAS, R.; ODOE FILHO, V.; NOVIS, Y. S. **Tratado de oncologia**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2013. v. 2.

HU, Z.; FAN, C.; OH, D. S.; MARRON, J. S.; HE, X.; QAQISH, B. F.; LIVASY, C.; CAREY, L. A.; REYNOLDS, E.; DRESSLER, L.; NOBEL, A.; PARKER, J.; EWEND, M. G.; SAWYER, L. R.; WU, J.; LIU, Y.; NANDA, R.; TRETIAKOVA, M.; RUIZ ORRICO, A.; DREHER, D.; PALAZZO, J. P.; PERREARD, L.; NELSON, E.; MONE, M.; HANSEN, H.; MULLINS, M.; QUACKENBUSH, J. F.; ELLIS, M. J.; OLOPADE, O. I.; BERNARD, P. S.; PEROU, C. M. The molecular portraits of breast tumors are conserved across

microarray platforms. **BMC Genomics**, v. 78, p. 96, 2006.

INABA, K., INABA, M., ROMANI, N., AYA, H., DEGUCHI, M., IKEHARA, S., MURAMATSU, S., STEINMAN, R. M. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **J. Exp. Med.**, v. 176, p. 1693-1702, 1992.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (Brasil). **Estimativa 2014**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124 p.

ITANO, A. A.; JENKINS, M. K. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. **Nature Immunol.**, v. 4, p. 733-739, 2003.

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

KAH-WAI, L.; JACEK, T.; JACEK, R. Dendritic cells heterogeneity and its role in cancer immunity. **J. Cancer Res. Ther.**, v. 2, p. 35-40, 2006.

KARIN, M. How NFκB is activated: the role of the IκB kinase (IKK) complex. **Oncogene**, v. 18, p. 6867-6874, 1999.

KARIN, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. **Nature**, v. 441, p. 431-436, 2006.

KOCH, A. E.; POLVERINI, P. J.; KUNKEL, S. L.; HARLOW, L. A.; DIPIETRO, L. A.; ELNER, V. M.; ELNER, S. G.; STRIETER, R. M. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. **Science**, v. 258, p. 1798-1801, 1992.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harb. Perspect. Biol.**, v. 1, p. a001651, 2009.

LENARDO, M. J.; BALTIMORE, D. NF-kappa B: a pleiotropic mediator of inducible and tissue-specific gene control. **Cell**, v. 58, p. 227-229, 1989.

LENARDO, M. J.; FANB, C. M.; MANIATIS, T.; BALTIMORE, D. The involvement of NF-κB in β-interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. **Cell**, v. 57, p. 287-294, 1989.

LEONG, A. S.; ZHUANG, Z. The changing role of pathology in breast cancer diagnosis and treatment. **Pathobiology**, v. 78, p. 99-114, 2011.

LI, Q.; VERMA, I. M. NF-κB regulation in the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 725-734, 2002.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

- LOPES, L. A. F.; LINHARES, J. J.; FERRARO, O.; LOPES, R. G. C.; BARACAT, F. F. Valor prognóstico do grau histológico (GH), grau nuclear (GN) e índice mitótico (IM) para pacientes com carcinoma da mama estádios II e III com linfonodos axilares comprometidos. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 52, p. 245-251, 2006.
- LUCA, M.; HUANG, S.; GERSHENWALD, J. E.; SINGH, R. K.; REICH, R.; BAR-ELI, M. Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. **Am. J. Pathol.**, v. 151, p. 1105-1113, 1997.
- LUTZ, M. B.; SCHULER, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? **Trends Immunol.**, v. 23, p. 445-449, 2002.
- LYONS, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. **J. Immunol. Methods**, v. 243, p. 147-154, 2000.
- MCDONALD, D.; CARRERO, G.; ANDRIN, C.; DE VRIES, G.; HENDZEL, M. J. Nucleoplasmic β -actin exists in a dynamic equilibrium between low-mobility polymeric species and rapidly diffusing populations. **J. Cell Biol.**, v. 172, p. 541-552, 2006.
- MALDONADO-LÓPEZ, R.; DE SMEDT, T.; MICHEL, P.; GODFROID, J.; PAJAK, B.; HEIRMAN, C.; THIELEMANS, K.; LEO, O.; URBAIN, J.; MOSER, M. CD8 α ⁺ and CD8 α ⁻ subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. **J. Exp. Med.**, v. 189, p. 587-592, 1999.
- MANN, J.; OAKLEY, F.; JOHNSON, P. W.; MANN, D. A. CD40 induces interleukin-6 gene transcription in dendritic cells: regulation by TRAF2, AP-1, NF-kappa B, AND CBF1. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 17125-17138, 2002.
- MARTÍNEZ-ARRIBAS, F.; MARTÍN-GARABATO, E.; LAFUENTE, P.; TEJERINA, A.; LUCAS, R.; SÁNCHEZ, J.; SCHNEIDER, J. Proliferation measurement in breast cancer by two different methods. **Anticancer Res.**, v. 26, p. 199-202, 2006.
- MASUYA, D.; HUANG, C.; LIU, D.; KAMEYAMA, K.; HAYASHI, E.; YAMAUCHI, A.; KOBAYASHI, S.; HABA, R.; YOKOMISE, H. The intratumoral expression of vascular endothelial growth factor and interleukin-8 associated with angiogenesis in nonsmall cell lung carcinoma patients. **Cancer**, v. 92, p. 2628-2638, 2001.
- MENETRIER-CAUX, C.; MONTMAIN, G.; DIEU, M. C.; BAIN, C.; FAVROT, M. C.; CAUX, C.; BLAY, J. Y. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. **Blood**, v. 92, p. 4778-4791, 1998.
- MILLET, P.; MCCALL, C.; YOZA, B. RelB: an outlier in leukocyte biology. **J. Leukoc. Biol.**, v. 94, p. 941-951, 2013.
- MUKHOPADHYAY, T.; ROTH, J. A.; MAXWELL, S. A. Altered expression of the p50 subunit of the NF-kappa B transcription factor complex in non-small cell lung carcinoma. **Oncogene**, v. 11, p. 999-1003, 1995.
- NAPOLITANI, G.; RINALDI, A.; BERTONI, F.; SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A.

Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. **Nat. Immunol.**, v. 6, p. 769-776, 2005.

NEUMANN, M.; FRIES, H.; SCHEICHER, C.; KEIKAVOUSSI, P.; KOLB-MÄURER, A.; BRÖCKER, E.; SERFLING, E.; KÄMPGEN, E. Differential expression of Rel/NF-kappaB and octamer factors is a hallmark of the generation and maturation of dendritic cells. **Blood**, v. 95, p. 277-285, 2000.

NEVES, A. R. **Estudo da diferenciação in vitro de células dendríticas derivadas de monócitos sanguíneos: análise dos efeitos de diferentes condições de cultura no fenótipo imunestimulador das células.** 2003. 95 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

O'NEILL, H. C. Dendritic cell therapy for tolerance induction to stem cell transplants. **Curr. Stem Cell Res. Ther.**, v. 1, p. 121-125, 2006.

O'NEILL, L. A. J.; KALTSCHMIDT, C. NF-κB: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **Trends Neurosci.**, v. 20, p. 252-258, 1997.

OSHIRO, T. M.; ALMEIDA, A.; SILVA-DUARTE, A. J. Dendritic cell immunotherapy for HIV infection: from theory to reality. **Immunotherapy**, v. 1, p. 1039-1051, 2009.

OUAZ, F.; ARRON, J.; ZHENG, Y.; CHOI, Y.; BEG, A. A. Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. **Immunity**, v. 16, p. 257-270, 2002.

OYAMA, T.; RAN, S.; ISHIDA, T.; NADAF, S.; KERR, L.; CARBONE, D. P.; GABRILOVICH, D. I. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. **J. Immunol.**, v. 160, p. 1224-1232, 1998.

PALUCKA, K.; UENO, H.; ROBERTS, L.; FAY, J.; BANCHEREAU, J. Dendritic cells: are they clinically relevant? **Cancer J.**, v. 16, p. 318-324, 2010.

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

PERKINS, N. D. Achieving transcriptional specificity with NF-kappa B. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 29, p. 1433-1448, 1997.

PEROU, C. M.; SØRLIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; REES,

C. A.; POLLACK, J. R.; ROSS, D. T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L. A.; FLUGE, O.; PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S. X.; LØNNING, P. E.; BØRRESEN-DALE, A. L.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, p. 747-752, 2000.

PETTIT, A. R.; QUINN, C.; MACDONALD, K. P.; CAVANAGH, L. L.; THOMAS, G.; TOWNSEND, W.; HANDEL, M.; THOMAS, R. Nuclear localization of RelB is associated with effective antigen-presenting cell function. **J. Immunol.**, v. 159, p. 3681-3691, 1997.

PICCART-GEBHART, M. J.; PROCTER, M.; LEYLAND-JONES, B.; GOLDBIRTSCH, A.; UNTCH, M.; SMITH, I.; GIANNI, L.; BASELGA, J.; BELL, R.; JACKISCH, C.; CAMERON, D.; DOWSETT, M.; BARRIOS, C. H.; STEGER, G.; HUANG, C. S.; ANDERSSON, M.; INBAR, M.; LICHINITSER, M.; LÁNG, I.; NITZ, U.; IWATA, H.; THOMSEN, C.; LOHRISCH, C.; SUTER, T. M.; RÜSCHOFF, J.; SUTO, T.; GRETOREX, V.; WARD, C.; STRAEHLE, C.; MCFADDEN, E.; DOLCI, M. S.; GELBER, R. D.; HERCEPTIN ADJUVANT (HERA) TRIAL STUDY TEAM. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. **N. Engl. J. Med.**; v. 353, p. 1659-1672, 2005.

PINHO, M. P.; MIGLIORI, I. K.; FLATOW, E. A.; BARBUTO, J. A. Dendritic cell membrane CD83 enhances immune responses by boosting intracellular calcium release in T lymphocytes. **J. Leukoc. Biol.**, 2014 Jan 16. [Epub ahead of print]

PHILLIPS, B.; GIANNOUKAKIS, N.; TRUCCO, M. Dendritic cell-based therapy in Type 1 diabetes mellitus. **Expert Rev. Clin. Immunol.**, v. 5, p. 325-339, 2009.

PULENDRAN, B.; SMITH, J. L.; CASPARY, G.; BRASEL, K.; PETTIT, D.; MARASKOVSKY, E.; MALISZEWSKI, C. R. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 96, p. 1036-1041, 1999.

RAMOS, R. N.; CHIN, L. S.; AZEVEDO, A. P. S.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; LAGINHA, F.; BARBUTO, J. A. M. Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 92, p. 673-682, 2012.

RAMOS, R. N. **O microambiente supressor no câncer: efeitos locais e sistêmicos em monócitos de pacientes.** 2015. 196 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

RANDOLPH, G. J.; ANGELI, V.; SWARTZ, M. A. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. **Nature Rev. Immunol.**, v. 5, p. 617-628, 2005.

RAYET, B.; GÉLINAS, C. Aberrant *rel/nfkb* genes and activity in human cancer. **Oncogene**, v. 18, p. 6938-6947, 1999.

RESCIGNO, M.; MARTINO, M.; SUTHERLAND, C. L.; GOLD, M. R.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. **J Exp Med.**, v. 188, p. 2175-2180, 1998.

ROMAGNOLI, G. G.; TONIOLO, P. A.; MIGLIORI, I. K.; CALDINI, E. G.; FERREIRA, M. A.; PIZZO, C. R.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; BARBUTO, J. A. M. Tumour cells incorporate exosomes derived from Dendritic Cells through a mechanism involving the tetraspanin CD9. **Exosomes and Microvesicles**, v. 4, p. 21-32, 2013.

ROMAGNOLI, G. G.; ZELANTE, B. B.; TONIOLO, P.A.; MIGLIORI, I. K.; BARBUTO, J. A. Dendritic cell-derived exosomes may be a tool for cancer immunotherapy by converting tumor cells into immunogenic targets. **Front. Immunol.**, v. 5, p. 692, 2015.

ROMANI, N.; GRUNER, S.; BRANG, D.; KÄMPGEN, E.; LENZ, A.; TROCKENBACHER, B.; KONWALINKA, G.; FRITSCH, P. O.; STEINMAN, R. M.; SCHULER, G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 83-93, 1994.

ROMANI, N.; REIDER, D.; HEUER, M.; EBNER, S.; KAMPGEN, E.; EIBL, B.; NIEDERWIESER, D.; SCHULER, G. Generation of mature dendritic cells from human blood: an improved method with special regard to clinical applicability. **J. Immunol. Methods**, v. 196, p. 137-151, 1996.

ROMOND, E. H.; PEREZ, E. A.; BRYANT, J.; SUMAN, V. J.; GEYER, C. E. JR.; DAVIDSON, N. E.; TAN-CHIU, E.; MARTINO, S.; PAIK, S.; KAUFMAN, P. A.; SWAIN, S. M.; PISANSKY, T. M.; FEHRENBACHER, L.; KUTTEH, L. A.; VOGEL, V. G.; VISSCHER, D. W.; YOTHERS, G.; JENKINS, R. B.; BROWN, A. M.; DAKHIL, S. R.; MAMOUNAS, E. P.; LINGLE, W. L.; KLEIN, P. M.; INGLE, J. N.; WOLMARK, N. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 353, p. 1673-1684, 2005.

SACCANI, S.; PANTANO, S.; NATOLI, G. Modulation of NF-kappaB activity by exchange of dimers. **Mol. Cell**, v. 11, p. 1563-1574, 2003.

SALLUSTO, F.; PALERMO, B.; LENIG, D.; MIETTINEN, M.; MATIKAINEN, S.; JULKUNEN, I.; FORSTER, R.; BURGSTAHLER, R.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 1617-1625, 1999.

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

SCHEIDEREIT, C. I κ B kinase complexes: gateways to NF κ B activation and transcription. **Oncogene**, v. 25, p. 6685-6705, 2006.

SCHREIBER, E.; MATTHIAS, P.; MÜLLER, M. M.; SCHAFFNER, W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. **Nucleic Acids Res.**, v. 17, p. 6419, 1989.

SCHULER, G.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. **J. Exp. Med.**, v. 186, p. 1183-1187, 1997.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell**, v. 46, p. 705–716, 1986a.

SEN R, BALTIMORE D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. **Cell**, v. 47, p. 921–928, 1986.

SERRA, K. P.; RAMALHO, S.; TORRESAN, R.; VASSALLO, J.; SARIAN, L. O.; SILVA, G. R.; DERCHAIN, S. Nova classificação dos carcinomas da mama: procurando o luminal A. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 36, p. 575-580, 2014.

SLAMON, D. J.; LEYLAND-JONES, B.; SHAK, S.; FUCHS, H.; PATON, V.; BAJAMONDE, A.; FLEMING, T.; EIERMANN, W.; WOLTER, J.; PEGRAM, M.; BASELGA, J.; NORTON, L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, p. 783-792, 2001.

SOARES, F. A.; ANDRADE, V. P. Assinaturas genéticas: subtipos genéticos intrínsecos: Classificação Molecular do Câncer de Mama. [Editorial] **Boletim da Associação Brasileira de Mastologia Regional São Paulo**, n. 97, jan. 2012.

SOVAK, M. A.; BELLAS, R. E.; KIM, D. W.; ZANIESKI, G. J.; ROGERS, A. E.; TRASH, A. M.; SONENSHEIN, G. E. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. **J. Clin. Invest.**, v. 100, p. 2952-2960, 1997.

STEINMAN, R. M. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. **Pathol. Biol.**, v. 51, p. 59-60, 2003.

STEINMAN, R. M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 30, p. 1-22, 2012.

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

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J. Exp. Med.** v. 137, p. 1142-1162, 1973.

SUN S. C.; LEY, S. C. New insights into NF-kappaB regulation and function. **Trends Immunol.**, v. 29, p. 469-478, 2008.

TAVASSOLI, F. A.; DEVILEE, P. (Ed.); WORLD HEALTH ORGANIZATION CLASSIFICATION OF TUMOURS. **Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs**. Lyon: IARC Press, 2003. 432 p.

TODOROVIĆ-RAKOVIĆ, N.; MILOVANOVIĆ, J. Interleukin-8 in breast cancer progression. **J. Interferon Cytokine Res.**, v. 33, p. 563-570, 2013.

TOMIYOSHI, M. Y.; SAKAI, M.; BALEEIRO, R. B.; STANKEVICIUS, D.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J.; BARBUTO, J. A. Cohabitation with a B16F10 melanoma-bearer cage mate influences behavior and dendritic cell phenotype in mice. **Brain**

Behav. Immun., v. 23, p. 558-567, 2009.

TONIOLO, P. A. **Stat e socs na modulação funcional de células dendríticas derivadas de doadores saudáveis e pacientes com câncer**. 2015. 118 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

VENDRAMINI-COSTA, D. B.; CARVALHO, J. E. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. **Curr. Pharm. Des.**, v. 18, p. 3831-3852, 2012.

VOGEL, C. F.; MATSUMURA, F. A new cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and RelB, a member of the NF-kappaB family. **Biochem. Pharmacol.**, v. 77, p. 734-745, 2009.

VALLABHAPURAPU, S.; KARIN, M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 27, p. 693-733, 2009.

WANG, S.; LIU, Z.; WANG, L; ZHANG, X. NF-kappaB signaling pathway, inflammation and colorectal cancer. **Cell. Mol. Immunol.**, v. 6, p. 327-334, 2009.

WANG, J.; WANG, X.; HUSSAIN, S.; ZHENG, Y.; SANJABI, S.; OUAZ, F.; BEG, A. A. Distinct roles of different NF-kappa B subunits in regulating inflammatory and T cell stimulatory gene expression in dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 178, p. 6777-6788, 2007.

XIA, Y; SHEN, S.; VERMA, I. M. NF-κB, an active player in human cancers. **Cancer Immunol. Res.**, v. 2, p. 823–830, 2014.

YANG, Q.; MORI, I.; SAKURAI, T.; YOSHIMURA, G.; SUZUMA, T.; NAKAMURA, Y.; NAKAMURA, M.; TANIGUCHI, E.; TAMAKI, T.; UMEMURA, T.; KAKUDO, K. Correlation between nuclear grade and biological prognostic variables in invasive breast cancer. **Breast Cancer**, v. 8, p. 105-110, 2001.

YOSHIMURA, S.; BONDESON, J.; BRENNAN, F. M.; FOXWELL, B. M.; FELDMANN, M. Role of NF-kappaB in antigen presentation and development of regulatory T cells elucidated by treatment of dendritic cells with the proteasome inhibitor PSI. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 1883-1893, 2001a.

YOSHIMURA, S.; BONDESON, J.; FOXWELL, B. M.; BRENNAN, F. M.; FELDMANN, M. Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. **Int. Immunol.**, v. 13, p. 675-683, 2001b.

ZANETTI, M.; CASTIGLIONI, P.; SCHOENBERGER, S.; GERLONI, M. The role of relB in regulating the adaptive immune response. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 987, p. 249-257, 2003.

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

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

ANEXOS

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Doador Saudável)**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

ESTUDO: “AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE NF- κ B EM CÉLULAS DENDRÍTICAS DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA”

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

Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto e Isabella Katz Migliori (fone: 3091-7375).

Eu, (inserir o nome, profissão, residente e domiciliado na)
.....
....., portador da Cédula de identidade, RG
....., e inscrito no CPF/MF nascido(a)
em ____/____/____, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade
em participar como voluntário(a) do estudo “*Avaliação funcional de NF- κ B em
células dendríticas de pacientes com câncer de mama*”. Declaro que obtive todas as
informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às
dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) No sangue existem células que se destinam a defender nosso organismo de doenças. O presente estudo busca entender melhor o funcionamento dessas células e possíveis falhas que ocorrem nelas que permitem o desenvolvimento de câncer.
- II) Minha participação neste estudo como doador saudável implica apenas na doação única de cerca de 30 mL de sangue; para a coleta de sangue sentirei a picada da agulha e o local dessa picada poderá ficar roxo por algum tempo.
- III) A participação neste projeto não tem o objetivo de me submeter a qualquer tipo de tratamento, bem como não me acarretará qualquer despesa;
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- V) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico;

- VI) Os resultados obtidos durante este projeto de pesquisa serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa;
- Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- VIII) Concordo que o material poderá ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa;
- IX) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP – no Fone 3091-7733 ou o Pesquisador Responsável no fone 3091-7375 para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.
- X) Resolução 196/96 – Estou recebendo uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

São Paulo, de de 20 .

Doador/ Responsável

.....

Testemunha 1: _____
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2: _____
Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: Isabella Katz Migliori
Dr(a). Responsável

Telefone para contato:

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Paciente)**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

ESTUDO: “AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE NF- κ B EM CÉLULAS DENDRÍTICAS DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA”

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

Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto e Isabella Katz Migliori (fone: 3091-7375).

Eu, (inserir o nome, profissão, residente e domiciliado na)
.....
....., portador da Cédula de identidade, RG
....., e inscrito no CPF/MF nascido(a)
em ____/____/____, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade
em participar como voluntário(a) do estudo “*Avaliação funcional de NF- κ B em
células dendríticas de pacientes com câncer de mama*”. Declaro que obtive todas as
informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às
dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) No sangue existem células que se destinam a defender nosso organismo de doenças. O presente estudo busca entender melhor o funcionamento dessas células e possíveis falhas que ocorrem nelas que permitem o desenvolvimento de câncer.
- II) Minha participação neste estudo como paciente implica apenas na doação de cerca de 30 mL de sangue; havendo necessidade, nova coleta de mesmo volume de sangue será requisitada. A doação inicial não me obriga a concordar com a nova coleta. Para a coleta de sangue sentirei a picada da agulha e o local dessa picada poderá ficar roxo por algum tempo.
- III) A participação neste projeto não tem o objetivo de me submeter a qualquer tipo de tratamento, bem como não me acarretará qualquer despesa;
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no

- momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- V) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico, bem como não interferirá no atendimento ou tratamento médico em andamento ou futuros;
- VI) Os resultados obtidos durante este projeto de pesquisa serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa;
- Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- VIII) Concordo que o material poderá ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa;
- IX) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP – no Fone 3091-7733 ou o Pesquisador Responsável no fone 3091-7375 para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.
- X) Resolução 196/96 – Estou recebendo uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

São Paulo, de de 20 .

Doador Responsável

.....

Testemunha 1: _____
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2: _____
Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: Isabella Katz Migliori
Dr(a). Responsável

Telefone para contato:

ANEXO C – Fotografia digitalizada de filme radiográfico obtido após EMSA

