

**ISABELLA KATZ MIGLIORI LEÃO DE MOURA**

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE NF- $\kappa$ 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

## RESUMO

MIGLIORI-LEÃO DE MOURA, I. K. **Avaliação funcional de NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B). Este fator é uma combinação de dímeros de membros da família Rel (p65/RelA, c-Rel, RelB, p50/NF- $\kappa$ B1, e p52/NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup> e HLA-DR<sup>+</sup> 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- $\kappa$ B, nas culturas de pacientes do quinto dia (iDCs), 1 e 24 horas após estímulo de ativação com TNF- $\alpha$ , em comparação com as de controles, embora estas diferenças não tenham atingido significância estatística. Ainda, a análise da presença de NF- $\kappa$ B no núcleo de Mos (recém selecionados), iDCs (quinto dia da cultura) e mDCs (24 horas após ativação com TNF- $\alpha$ ) 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- $\kappa$ B no núcleo de iDCs de pacientes, e numa ausência de aumento significativo de translocação de NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B) pathway. This transcription factor is actually a combination of dimers of Rel family members (p65/RelA, c-Rel, RelB, p50/NF- $\kappa$ B1 and p52/NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B. Thus, considering that crucial processes of differentiation and maturation of dendritic cells (DCs) are regulated by NF- $\kappa$ 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<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup> and HLA-DR<sup>+</sup> 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- $\kappa$ B, in cultures from patients from fifth day (iDCs), 1 and 24 hours after activation of DCs with TNF- $\alpha$  stimulation, compared to controls, although these differences did not reach statistical significance. Furthermore, analysis of the presence of NF- $\kappa$ B in the nucleus of monocytes (newly selected) iDCs (fifth day of culture) and mDCs (24 hours after activation with TNF- $\alpha$ ) 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- $\kappa$ B in the nucleus of iDCs from patients and in an absence of significant increase in the translocation of NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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.

# **1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA**

## *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,

## *Introdução e Justificativa*

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- $\gamma$  (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;

## *Introdução e Justificativa*

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 $\alpha$  e aumento da produção de IFN- $\gamma$  (CLAVIJO-SALOMON et al., 2015). Essas observações sugerem não apenas que a

## *Introdução e Justificativa*

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- $\kappa$ B; do inglês, *nuclear fator kappa B*) em DCs diferenciadas a partir de monócitos de pacientes com diversos tipos 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 saudáveis com relação à composição das subunidades que compõem os dímeros de NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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  $\kappa$ 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- $\kappa$ 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



## Introdução e Justificativa

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

O NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B, as I $\kappa$ Bs (do inglês, *inhibitors of NF- $\kappa$ B*), e ligação de NF- $\kappa$ B ao DNA. As proteínas que podem dar origem ao NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B1 (ou p50 e sua forma precursora p105) e NF- $\kappa$ B2 (ou p52 e sua forma precursora p100), respectivamente. As proteínas precursoras p105 e p100 são parcialmente proteolisadas pelo proteossoma (processamento), resultando na produção de suas formas maduras p50 e p52, respectivamente (DOLCET et al., 2005; PERKINS; GILMORE, 2006).

A ativação de NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B ao seu estado inativo, cessando por sua vez tal estímulo (revisto por LAWRENCE, 2009).

Na maioria dos tipos celulares os dímeros de NF- $\kappa$ B se encontram predominantemente no citoplasma, onde se mantêm na sua forma inativa pela interação com as I $\kappa$ Bs (ou com as formas precursoras p105 e p100), as quais impedem a translocação dos dímeros para o núcleo. As I $\kappa$ 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 $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  e I $\kappa$ B $\epsilon$  são as mais bem caracterizadas. Contêm dois resíduos conservados de serina que podem ser fosforilados pelas I $\kappa$ B-quinases, as IKKs, sinalizando para a degradação dependente de ubiquitina pelo proteossoma. Uma vez que as proteínas inibidoras são degradadas, o NF- $\kappa$ B pode ser translocado

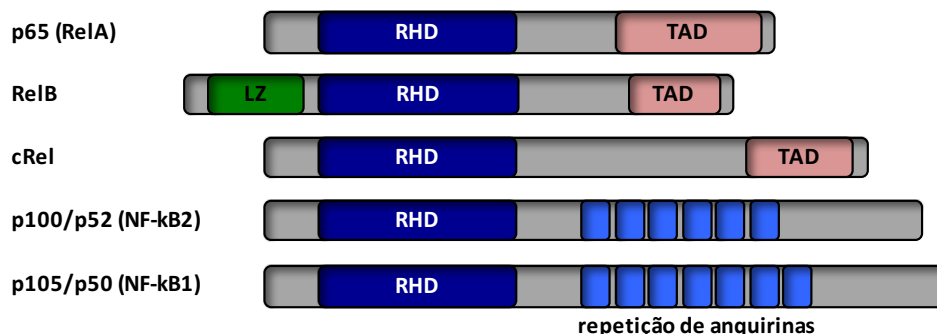
## *Introdução e Justificativa*

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 $\kappa$ 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 $\kappa$ Bs na porção C-terminal. Nesse sentido, assim como as I $\kappa$ Bs, p105 e p100 se ligam ao NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ B e ser completamente degradada pelo proteassomo, liberando o NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B pode ser observada na Figura 1.

### Família do NF- $\kappa$ B



**Figura 1 – Subunidades que compõem o NF- $\kappa$ B.** Representação esquemática simplificada das subunidades de proteínas que compõem a família do NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B essential modulator*). A ativação desta cascata conta com a participação do adaptador TAK-1 (do inglês, *transforming growth factor  $\beta$  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 $\kappa$ B $\alpha$ , desencadeando a poliubiquitinação e a degradação mediada pelo proteossoma desta proteína inibidora, permitindo a libertação então das subunidades associadas de NF- $\kappa$ B, que translocam para o

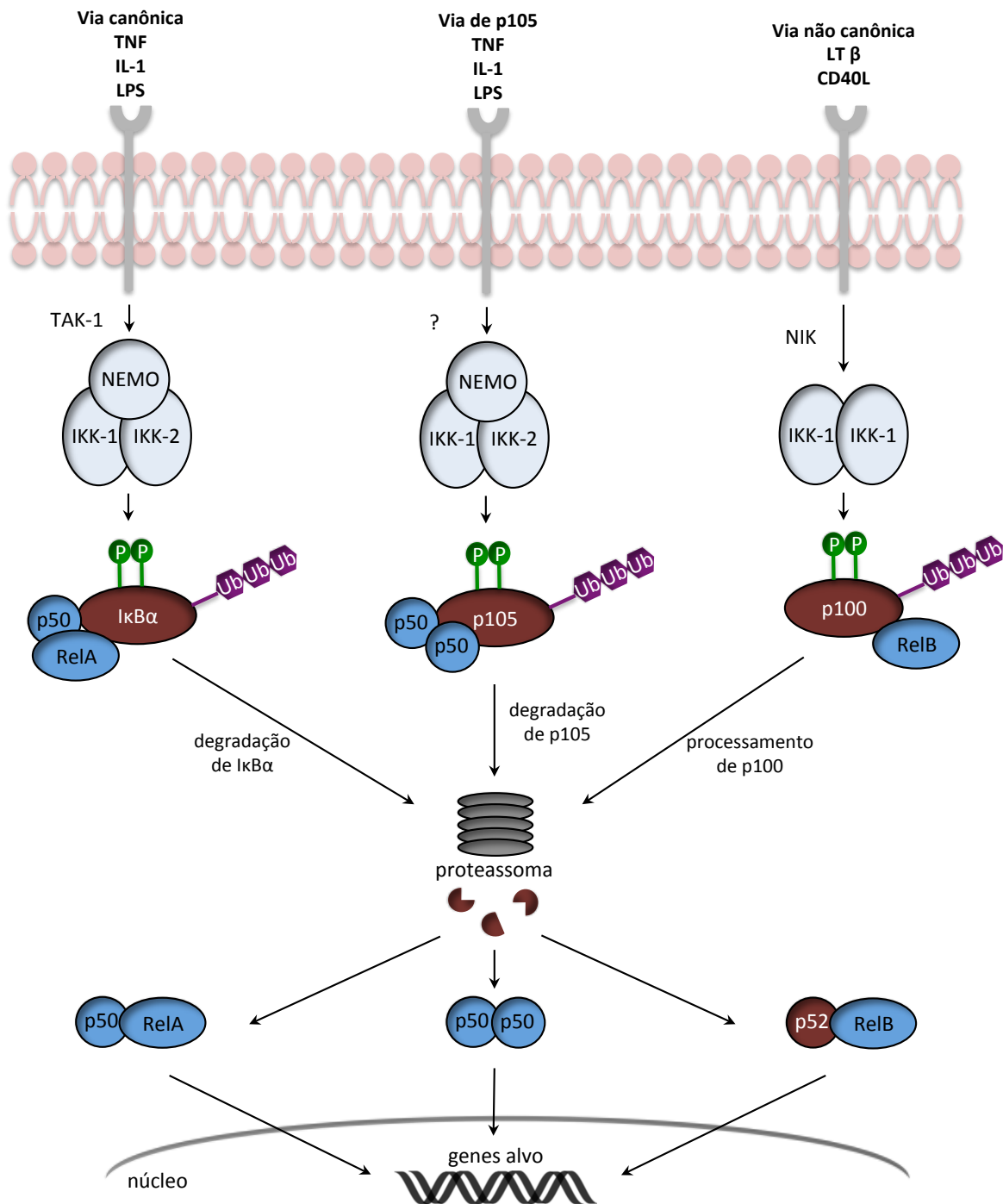
## *Introdução e Justificativa*

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

A via alternativa de sinalização do NF- $\kappa$ B, ou não canônica, por outro lado, é estimulada por receptores tais como LT $\beta$ R (receptor  $\beta$  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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B (canônica, não canônica e de p105) pode ser observada na Figura 2.

## Introdução e Justificativa



**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 transcritora 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

## *Introdução e Justificativa*

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

Em particular, em DCs, vale citar a importância do NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B, tanto por superexpressão de I $\kappa$ B $\alpha$  (YOSHIMURA et al., 2001b), quanto por inibição competitiva do NF- $\kappa$ 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- $\alpha$  (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- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-6 (WANG et al., 2007).

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

## *Introdução e Justificativa*

também chamam a atenção para a função diferencial desempenhada pelas subunidades que compõem os dímeros de NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B, ou a relação entre a expressão diferencial das subunidades de NF- $\kappa$ 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

## *Introdução e Justificativa*

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



## *Introdução e Justificativa*

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).

## *Introdução e Justificativa*

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

## *Introdução e Justificativa*

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 consequente 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

## Introdução e Justificativa

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<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> e CD11c<sup>+</sup>, além

## *Introdução e Justificativa*

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- $\kappa$ 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.

---

## **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- $\alpha$  possuem alterações fenotípicas significativas, com menor frequência de células CD86<sup>+</sup>, CD83<sup>+</sup> e HLA-DR<sup>+</sup>, e com tendência maior à produção da quimiocina pró-inflamatória IL-8;
- ✓ Há alterações da presença de NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\alpha$  por 24 h induz aumento significativo na quantidade de NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ B poderiam ser consequência da desregulação na expressão das proteínas inibidoras, IKKs e co-ativadores transcricionais.



## **REFERÊNCIAS**

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- 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.

---

<sup>1</sup> De acordo com:

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

BALEEIRO, R. B.; BARBUTO, J. A. Local secretion/shedding of tumor-derived CD83 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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-kB: 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<sup>+</sup> 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<sup>-ΔΔCt</sup> 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  $\beta$ -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 $\alpha$ <sup>+</sup> and CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> 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 sangüíneos: análise dos efeitos de diferentes condições de cultura no fenótipo imunostimulador 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.; GOLDHIRSCH, 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.; GREATOREX, 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 $\kappa$ B kinase complexes: gateways to NF $\kappa$ 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- $\kappa$ 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.; TRAISH, 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- $\kappa$ B, 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<sup>+</sup> blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83<sup>+</sup> 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.