GIOVANA CECIM

**SÍNTESE DE PROTEÍNAS DO SISTEMA COMPLEMENTO
POR CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE
MONÓCITOS NA PRESENÇA DE SOBRENADANTE TUMORAL**

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

São Paulo
2010

GIOVANA CECIM

**SÍNTESE DE PROTEÍNAS DO SISTEMA COMPLEMENTO
POR CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE
MONÓCITOS NA PRESENÇA DE SOBRENADANTE TUMORAL**

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

Área de concentração: Imunologia
Orientador: Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto
Versão Original

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Cechim, Giovana.

Síntese de proteínas do sistema complemento por células dendríticas derivadas de monócitos na presença de sobrenadante tumoral / Giovana Cechim. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Jose Alexandre Marzagão Barbuto.

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

Versão do título para o inglês: Synthesis of complement proteins by monocyte-derived dendritic cells develops in the presence of tumor supernatants

Descritores: 1. Células dendríticas 2. Sistema Complemento 3. Neoplasias do sistema nervoso I. Barbuto, Jose Alexandre Marzagão II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0221/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Giovana Cechim.

Título da Dissertação: Síntese de proteínas do sistema complemento por células dendríticas derivadas de monócitos na presença de sobrenadante tumoral.

Orientador(a): Jose Alexandre Marzagão Barbuto.

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

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

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

Presidente: Assinatura:
Nome completo:
Instituição:

São Paulo 26 de agosto de 2010

AUTORIZAÇÃO

Em nome do Instituto HOC de Hemoterapia, autorizo a **Sra. Giovana Cechim** a utilizar as câmaras LRS, peças integrantes dos kits descartáveis utilizados para a coleta de plaquetas por aférese leucorreduzidas, em pesquisa denominada "Síntese de proteínas do sistema complemento por células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes portadores de câncer". As referidas câmaras contêm sangue residual com elevada quantidade de leucócitos e são removidas do kit imediatamente após sua utilização, com o consentimento escrito do doador de plaquetas para a utilização de seu conteúdo em pesquisas institucionais.

Atenciosamente.

Dr. Joselito B. Brandão, diretor médico

Instituto HOC de Hemoterapia

Hospital Alemão Oswaldo Cruz

**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, 23 de setembro de 2010.

PARECER 959/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão de 21.09.2010, **APROVOU** o projeto intitulado: *"Síntese de Proteínas do Sistema Complemento por Células Dendríticas Derivadas de Monócitos de Pacientes Portadores de Câncer"* sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. JOSÉ ALEXANDRE MAZARGÃO BARBUTO e a aluna GIOVANA CECHIM, ***condicionado à retirada da palavra "apenas" do item III do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por se contrapor ao item IX do mesmo termo. Os Pesquisadores deverão apresentar a aprovação do Comitê de Ética do Hospital Beneficência Portuguesa assim que for obtida.***

Cabe à 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 **21.09.2011**

Atenciosamente,

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

**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) (011) 3091 7733 - telefax: (55) (011) 3091 8405

Decl. CEP SH. 042.11

D E C L A R A Ç Ã O

Em adendo ao PARECER 959/CEP 21.09.10, informo que o título do Projeto foi alterado para "*Síntese de proteínas do sistema complemento por células dendríticas derivadas de monócitos na presença de sobrenadante tumoral*" não apresentando restrições quanto às modificações do projeto, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 10 de agosto de 2011.

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

A minha família Ademar, Libana e Cláudia
pelo exemplo de trabalho e integridade e
pelo amor incondicional a mim dedicados.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ademar e Libana e irmã, Cláudia, por todo amor e incentivo dedicados a mim de forma incondicional.

Aos meus avôs Aloísio e José pelo exemplo de vida e inesquecíveis conselhos.

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

À Prof^a Dra. Lourdes que me ajudou e orientou de forma sábia e carinhosa nas horas mais complicadas.

Ao Prof. Dr. Guido Lenz e a Prof^a Dra. Cristina Bonorino por todos ensinamentos que me trouxeram até aqui.

Aos meus amigos Elisandra e Márcio pela amizade que ultrapassa fronteiras.

À Prof^a Dra. Ana Lepique pela colaboração intelectual e experimental.

A todos os professores do departamento pela contribuição na minha formação profissional.

Aos colegas e amigos de laboratório de Imunologia de Tumores Ana Carolina, Ana Paula, Bruna, Cristiano, Giovana, Graziela, Isabella, Karen, Lilian, Lucila, Maria, Murilo, Patrícia Bergami, Patrícia, Roberta, Roberto e Rodrigo pelos momentos inesquecíveis dentro e fora do laboratório.

A Célia pelos ensinamentos de laboratório e pela divertida e carinhosa companhia.

As minhas mais que colegas de laboratório Bru, Bella, Grá, Karen e Pati que tornaram esses dois anos especiais.

Aos meus amigos Rodrigo e Roberto pelas esclarecedoras conversas imunológicas.

A minha grande amiga Lorena pela companhia, atenção, carinho e ajuda permanentes.

As meninas “complementares” Adriana, Tatiana, Mônica e Daniella pelas divertidas conversas e grande ajuda.

As minhas queridas colegas e ex-vizinhas Camila e Suzana por todo apoio, carinho e amizade.

Aos meus amigos de departamento Otávio, Zé, Angela, Paulo, Walmir, Stefanie, Francisco, Marianna e Michele Barros que me apoiaram e sempre me ajudaram com meus incessantes pedidos de empréstimos.

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

Aos amigos da portaria Milton, Otacílio e Delman que sempre nos recebem com um Bom Dia amigo e bem humorado.

Ao pessoal da noite e final de semana Ailton de Oliveira, Geraldo de Souza, Nelson e Roberto pelas conversas e apoio nas inúmeras noites e finais de semana de trabalho.

Ao pessoal da biblioteca do ICB em especial para Maria do Socorro, Valéria, Eva e Márcia, muito obrigada pela enorme ajuda, gentileza e ótimo trabalho.

A todo pessoal do departamento pela amizade, discussões imunológicas, festas e conselhos.

Ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro.

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

Muito Obrigada a todos!

“Não se deve dar ouvidos aqueles que aconselham ao homem, por ser mortal, que se limite a pensar coisas humanas e mortais; ao contrário, porém, na medida do possível, precisamos nos comportar como imortais e tudo fazer para viver segundo a parte mais nobre que há em nós.”

Aristóteles

RESUMO

CECHIM, G. **Síntese de proteínas do sistema complement por células dendríticas derivadas de monócitos na presença de sobrenadante tumoral.** 2011. 117f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

O processo de apresentação antigênica realizado pelas células dendríticas (DC) aos linfócitos T constitui o passo inicial da geração da resposta imune anti-tumoral. As neoplasias interferem nesse processo alterando funcionalmente as DCs. Entre os fatores que influenciam a função das DCs, está a proteína C3 do sistema complemento. Assim, este trabalho investigou a influência de fatores solúveis dos sobrenadantes tumorais das linhagens de glioblastoma humano A172 e U87MG sobre a síntese de C3 pelas DCs derivadas de doadores saudáveis *in vitro*. A fenotipagem indicou que os sobrenadantes, especialmente da linhagem U87MG, parece estar modulando a expressão das moléculas CD14, CD80, CD86, CD83, CD274 e CD11b. Já a expressão do gene C3 parece sofrer uma modulação geralmente negativa pelo sobrenadante da linhagem U87MG enquanto a linhagem A172 tende a exercer o efeito inverso.

Palavras-chave: Células Dendríticas. Sistema Complemento. Glioma.

ABSTRACT

CECHIM, G. **Synthesis of complement proteins by monocyte-derived dendritic cells developed in the presence of tumor supernatants.** 2011. 117p. Master thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Antigen presentation by dendritic cells (DC) to T cells is the first step to generate an antitumor immune response. Tumors interfere in this process, affecting DCs function. One of the factors that affect DCs's function is the complement system protein C3, which is produced by these cells. In this work, we investigated the influence of tumor supernatants derived from human glioma cells lines U87MG and A172 in the production of complement protein C3 by monocyte-derived dendritic cells from healthy donors *in vitro*. DC phenotyping indicated that the supernatants seem to modulate the expression of CD14,CD80,CD86, CD83, CD274 and CD11b. The expression of *C3* gene, was negatively modulated by U87MG supernatant while the A172 supernatant seemed to exert the reverse effect.

Key words: Dendritic cells. Complement protein C3. Glioma.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina Bovina do Soro
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
dNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfatado
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
DAF	<i>Decay Accelerating Factor</i>
DCs	Células Dendríticas
DEPC	Água Tratada com Dietil Dicarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfatado
DTT	Ditiotritol
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
FSC	<i>Foward Scattered</i>
Fc	Fragmento Constante das Imunoglobulinas
GBM	Glioblastoma Multiforme
GM-CSF	Fator de Crescimento de Colônia de Granulócito e Macrófago
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
iDC	Célula Dendrítica Imatura
IL	Interleucina
Ig	Imunoglobulina
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolissacarídeo
MAC	Complexo de Ataque a Membrana
MASP	<i>Mannose binding lectin-associated serine protease</i>

MBL	Lectina Ligadora de Manose
MFI	Intensidade Mediana de Fluorescência
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Tampão Fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido Ribonucleico
R10	RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino
RT	Transcrição Reversa
SC	Sistema Complemento
SI	Sistema Imune
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
SSC	<i>Side Scattered</i>
TCR	Receptor de Células T
TLR	Receptor do tipo <i>Toll</i>
Treg	Linfócito T regulador
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ilustração das vias de ativação do Sistema Complemento.....	32
Figura 2 - Ilustração da proteína C3 e seus fragmentos.....	34
Figura 3 - Detecção de contaminação por micoplasma.....	44
Figura 4 - Curva de crescimento das linhagens U87MG e A172.....	45
Figura 5 - Curva de dosagem proteica.....	46
Figura 6 - Curvas de dissociação dos <i>primers</i> para os genes C3 e GAPDH.....	52
Figura 7 – Esquema experimental das culturas tratadas a partir do dia zero.....	54
Figura 8 – Esquema experimental das culturas tratadas a partir do dia cinco.....	55
Figura 9 – Esquema experimental das culturas tratadas no dia seis.....	56
Figura 10 - Imagem da cultura de células da linhagem celular U87MG.....	59
Figura 11 - Gráficos pseudo-coloridos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise dos dados de citometria de fluxo.....	60
Figura 12 - Efeito do sobrenadante da linhagem U87MG sobre a expressão de CD14...	62
Figura 13 - Efeito do sobrenadante da linhagem A172 sobre a expressão de CD14.....	63
Figura 14 - Efeito do sobrenadante da linhagem U87MG sobre a expressão de CD80...	65
Figura 15 - Efeito do sobrenadante da linhagem A172 sobre a expressão de CD80.....	66
Figura 16 - Efeito do sobrenadante da linhagem U87MG sobre a expressão de CD86...	68
Figura 17 - Efeito do sobrenadante da linhagem A172 sobre a expressão de CD86.....	69
Figura 18 - Efeito do sobrenadante da linhagem U87MG sobre a expressão de CD83...	71
Figura 19 - Efeito do sobrenadante da linhagem A172 sobre a expressão de CD83.....	72
Figura 20 - Efeito do sobrenadante da linhagem U87MG sobre a expressão de CD274.	74
Figura 21 - Efeito do sobrenadante da linhagem A172 sobre a expressão de CD274.....	75
Figura 22 - Efeito do sobrenadante da linhagem U87MG sobre a expressão de CD11b.	77
Figura 23 - Efeito do sobrenadante da linhagem A172 sobre a expressão de CD11b.....	78
Figura 24 - Expressão relativa do gene C3 em células mononucleares aderentes diferenciadas <i>in vitro</i> por 7 dias e expostas ao sobrenadante proveniente da linhagem U87M a partir do dia zero da cultura celular.....	80
Figura 25 - Expressão relativa do gene C3 em células mononucleares aderentes diferenciadas <i>in vitro</i> por 7 dias e expostas ao sobrenadante proveniente da linhagem U87MG a partir do dia cinco da cultura.....	81
Figura 26 - Expressão relativa do gene C3 em células mononucleares aderentes diferenciadas <i>in vitro</i> por 7 dias e expostas ao sobrenadante proveniente da linhagem U87MG no dia seis da cultura.....	82
Figura 27 - Expressão relativa do gene C3 em células mononucleares aderentes diferenciadas <i>in vitro</i> por 7 dias e expostas ao sobrenadante proveniente da linhagem A172 desde o dia zero da cultura.....	83

Figura 28 - Expressão relativa do gene <i>C3</i> em células mononucleares aderentes diferenciadas <i>in vitro</i> por 7 dias e expostas ao sobrenadante proveniente da linhagem A172 no dia cinco da cultura.....	84
Figura 29 - Expressão relativa do gene <i>C3</i> em células mononucleares aderentes diferenciadas <i>in vitro</i> por 7 dias e expostas ao sobrenadante proveniente da linhagem A172 no dia seis da cultura.....	85
Figura 30 - Efeito dos sobrenadantes sobre a expressão de CD14.....	87
Figura 31 - Efeito dos sobrenadantes sobre a expressão de CD80.....	88
Figura 32 - Efeito dos sobrenadantes sobre a expressão de CD86.....	89
Figura 33 - Efeito dos sobrenadantes sobre a expressão de CD83.....	90
Figura 34 - Efeito dos sobrenadantes sobre a expressão de CD274.....	91
Figura 35 - Efeito dos sobrenadantes sobre a expressão de CD11b.....	92
Figura 36 - Expressão relativa do gene <i>C3</i> em células mononucleares aderentes diferenciadas <i>in vitro</i> por 7 dias e expostas a sobrenada.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração protéica de sobrenadantes de culturas de células tumorais e de monócitos.....	47
Tabela 2 - Anticorpos murinos utilizados para citometria de fluxo.....	48
Tabela 3 - Efeito do tratamento com sobrenadantes sobre C3 intracelular.....	95

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	20
1.1 <u>Câncer</u>	21
1.1.2 <u>Gliomas</u>	21
1.2 <u>Câncer e Sistema Imune</u>	23
1.3 <u>Células Dendríticas</u>	24
1.4 <u>Câncer e Células Dendríticas</u>	25
1.5 <u>Sistema Complemento</u>	27
1.5.1 <u>O Componente C3</u>	33
1.6 <u>Câncer e Sistema Complemento</u>	35
1.7 <u>Células Dendríticas e Sistema Complemento</u>	35
1.8 <u>Câncer, Células Dendríticas e Sistema Complemento</u>	36
2 OBJETIVOS	38
2.1 <u>Objetivo Geral</u>	39
2.2 <u>Objetivos Específicos</u>	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 <u>Casuística</u>	41
3.2 <u>Diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos <i>in vitro</i></u>	41
3.3 <u>Cultura de Células Tumorais</u>	42
3.4 <u>Determinação de contaminação das linhagens tumorais por micoplasma</u>	43
3.4.1 <u>Extração de DNA para detecção de contaminação por micoplasma</u>	43
3.4.2 <u>Reação em cadeia da polimerase para detecção de contaminação por micoplasma</u>	43
3.4.3 <u>Tratamento de Descontaminação para micoplasma</u>	44
3.5 <u>Obtenção dos sobrenadantes de células tumorais</u>	45
3.6 <u>Medição protéica</u>	46
3.7 <u>Avaliação do Fenótipo de Membrana das DCs por Citometria de Fluxo</u>	47
3.8 <u>Marcação para C3 intracelular</u>	49
3.9 <u>Extração de RNA total das células</u>	50
3.10 <u>Transcrição Reversa (RT-PCR)</u>	51
3.11 <u>PCR quantitativa em tempo real (qPCR)</u>	52
3.12 <u>Delineamento Experimental</u>	54
3.13 <u>Análise estatística</u>	57
4 RESULTADOS	58
4.1 <u>Cultura de linhagens tumorais</u>	59
4.2 <u>Efeito do tratamento com sobrenadante tumoral sobre o fenótipo de DCs diferenciadas <i>in vitro</i> a partir de monócitos de doadores saudáveis</u>	60
4.3 <u>Efeito do tratamento com sobrenadante tumoral sobre a expressão do gene C3 em células mononucleares aderentes diferenciadas <i>in vitro</i> a partir de monócitos de doadores saudáveis</u>	79
4.3.1 <u>Tratamento com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG desde o dia zero da cultura celular</u>	80

4.3.2 <u>Tratamento com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG no dia cinco da cultura celular</u>	81
4.3.3 <u>Tratamento com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG no dia seis da cultura celular</u>	82
4.3.4 <u>Tratamento com sobrenadante tumoral proveniente da linhagem A172 desde o dia zero da cultura celular</u>	83
4.3.5 <u>Tratamento com sobrenadante tumoral proveniente da linhagem A172 no dia cinco da cultura celular</u>	84
4.3.6 <u>Tratamento com sobrenadante tumoral proveniente da linhagem A172 no dia seis da cultura celular</u>	85
4.4 <u>Efeito do sobrenadante tumoral cultivado por 24h em meio sem SFB sobre o fenótipo de células mononucleares aderentes diferenciadas <i>in vitro</i></u>	86
4.5 <u>Efeito do tratamento com sobrenadantes sobre a expressão do gene C3 em células mononucleares aderentes diferenciadas <i>in vitro</i> a partir de monócitos de doadores saudáveis</u>	93
4.6 <u>Efeito do tratamento com sobrenadantes sobre C3 intracelular em DCs diferenciadas <i>in vitro</i> a partir de monócitos de doadores saudáveis</u>	95
5 DISCUSSÃO	96
6 CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 Câncer

Atualmente, o câncer é uma das principais causas de morte no mundo (WHO, 2011), não fazendo distinção de raça, idade ou classe social (BLEYER, 2008). Apesar das inúmeras pesquisas voltadas para o tratamento e cura dessa enfermidade (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011; AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, 2011), ainda há diversos tumores para os quais a chance de recuperação do paciente é muito pequena (WHO, 2011), isso se deve, em grande parte, à multifatorialidade dessa doença (DA COSTA, 2001; WEINBERG, 2008). No desenvolvimento dessa doença, é importante considerar tanto o fator hereditário quanto o ambiental. Enquanto em algumas neoplasias a carga hereditária parece ser decisiva (como exemplos clássicos, a deleções do gene pRB no caso de Retinoblastoma, ou o não menos conhecido, o gene BRCA1/2 em mulheres, ocasionando câncer de mama precoce) na maior parte das vezes, o fator ambiental é predominante devido ao nosso estilo de vida, que vem contribuindo consideravelmente para aumentar a incidência de diversos tipos de câncer (JEMAL et al., 2011; GLOBOCAN, 2008). Como ainda não há possibilidade de mudança de nossa herança genética, as campanhas preventivas ao câncer concentram seus esforços em informar a população sobre os fatores de risco e como evitá-los a fim de reduzir o número de pessoas afetadas por essa enfermidade.

Entretanto, para algumas neoplasias, como é o caso dos gliomas, essas medidas não têm sido suficientes, visto que os fatores de risco ainda não são bem conhecidos e exames preventivos ainda não são viáveis devido à sua complexidade e alto custo. Como consequência, a realidade desses pacientes é uma gama limitada de opções terapêuticas.

1.1.2 Gliomas

Os gliomas são neoplasias que atingem os diferentes tipos celulares que compõem a glia tais como astrócitos, oligodendrócitos e microglia - e seus precursores - e constituem o tipo mais comum de tumor primário no cérebro (DE ANGELIS, 2002; SIEBZEHR, 2011). A maioria dos gliomas se desenvolve esporadicamente, sendo que geralmente tais pacientes já apresentam um histórico de algum tipo de câncer na

família (HOLLAND, 2001). Devido a sua localização no sistema nervoso central, pacientes portadores desses tumores, freqüentemente desenvolvem sintomas como dores de cabeça, convulsões e alterações neurológicas locais que variam desde fraqueza até distúrbios de linguagem, dependendo da localização do tumor (DE ANGELIS, 2002).

Conforme a Organização Mundial da Saúde - WHO, os gliomas podem ser classificados em quatro diferentes tipos conforme suas características histopatológicas - o que reflete o seu grau de malignidade. Assim, tem-se os gliomas de grau 1 como o astrocitoma pilocítico, que pode ser curado cirurgicamente, os de grau 2 como os oligodendrogliomas, que apresentam sobrevida média de 10 – 15 anos, os gliomas de grau 3 como o astrocitoma anaplásico que apresenta uma sobrevida média de 2-3 anos e o glioblastoma multiforme (GBM) que é classificado como um glioma de grau quatro por ser o de maior malignidade. O GBM é uma das neoplasias humanas mais agressivas apresentando um sobrevida média de menos de um ano após o diagnóstico (ACS, 2011; ASCO, 2011) e apesar dos avanços em neurocirurgia, radio e quimioterapia, os principais tratamentos para o GBM (ACS, 2011; ASCO, 2011), as estatísticas não têm se modificado significativamente nas últimas duas décadas (WHO, 2011; ACS, 2011; ASCO, 2011). O GBM pode derivar da progressão de tumores cerebrais de menor grau de malignidade como os astrocitomas ou pode surgir como tumor primário originário de células mutadas (ZHU; PARADA, 2002).

Recentemente, uma nova hipótese para a gliomagenese vem sendo considerada. A caracterização e a identificação no SNC das chamadas células tronco tumorais tem lançado uma nova luz aos conceitos sobre a formação desses tumores. As células tronco de glioma compartilham várias características com as células tronco neuronais e suas progenitoras, como por exemplo, a capacidade de migrar por todo o sistema nervoso central (SNC), (ZHU; PARADA, 2002), além das habilidades de proliferação e diferenciação (ZHU; PARADA, 2002). Devido a essas características, tem sido aceita a hipótese que as células tronco neurais são o nicho no qual as células de glioma se originam (LUI et al., 2011; SIEBZEHN RUBL, 2011; WESTPHAL; LAMSZUS, 2011).

Entretanto, apesar das novas descobertas, as possibilidades de tratamento para o GBM, permanecem restritas. Assim, a imunoterapia desponta como uma promissora forma de tratamento.

1.2 Câncer e Sistema Imune

A constatação da existência de uma interrelação entre câncer e sistema imune (SI) é antiga. Essa intersecção foi primeiramente considerada por Paul Ehrlich em 1909, ao enunciar que o SI seria capaz de impedir o crescimento de uma neoplasia. Entretanto, somente após algumas descobertas como a existência de antígenos tumorais específicos (KLEIN, 1966), que a conceituação dessa relação começou a surgir. Burnet em 1957 formulou a hipótese chamada teoria da vigilância imunológica. Para Burnet (BURNET, 1957):

It is by no means inconceivable that small accumulations of tumour cells may develop and because of their possession of new antigenic potentialities provoke an effective immunological reaction with regression of the tumour and no clinical hint of its existence.

Devido a tais pensamentos, a hipótese foi definida como segue (BURNET, 1970):

[...] large, long-lived animals, like most of the warm-blooded vertebrates, inheritable genetic changes must be common in somatic cells and a proportion of these changes will represent a step toward malignancy. It is an evolutionary necessity that there should be some mechanism for elimination or inactivation such potentially dangerous mutant cells and it is postulated that this mechanism is of immunological character[...]

Entretanto, com o avanço das pesquisas na área do câncer, cada vez mais trabalhos demonstravam que o SI, em muitas situações, atuava como um promotor da neoplasia (SHANKARAN et al., 2001; ZOU, 2006; REIMAN et al., 2007; FACCIABENE et al., 2011) ao colaborar para a seleção de células tumorais de baixa imunogenicidade capazes de se evadir do SI. Devido a tais constatações, atualmente, a teoria mais aceita para explicar a interrelação entre câncer e SI é a teoria da imunoedição (SCHREIBER; DUNN; OLD, 2004a, b) que abrange três diferentes fases de interação. Primeiramente, tem-se a fase da eliminação de células transformadas, promovendo, assim, uma proteção ao organismo; entretanto, algumas células transformadas com características de baixa imunogenicidade ou com potencial tolerogênico escapam da eliminação promovida pelo SI e por meio de diversos mecanismos, alcançam um equilíbrio com

ele conseguindo dessa maneira se desenvolver até um ponto em que o SI não é mais capaz de contê-lo (ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006).

Como o anseio terapêutico é conseguir tratar a neoplasia antes que ela estabeleça esse equilíbrio e consiga crescer livremente, os esforços atuais da pesquisa se concentram em desvendar os processos pelos quais o tumor estabelece essa tolerância e se evade do SI.

Um dos diversos processos nos quais a neoplasia exerce sua influência sobre o SI, é no processo de apresentação antigênica, especialmente sobre a principal célula efetora - a célula dendrítica (DC).

1.3 Células Dendríticas

As DCs são as principais células apresentadoras de antígenos, demonstrando uma capacidade única de ativar linfócitos T *naïve* (STEINMAN; WITMER, 1978). Elas originam-se a partir de precursores hematopoéticos linfóides e mielóides (BANCHEREAU et al., 2000; GUERMONPREZ et al., 2002) e se distribuem por todo o organismo, concentrando-se principalmente na interface entre o meio externo e interno, isto é, nas mucosas e na pele (STEINMAN 1991; UENO et al., 2007). De modo geral, estas células encontram-se nos tecidos em um estado muitas vezes chamado de “imaturo” (LI; YOUN-JUN, 2007) que se caracteriza pela grande capacidade de capturar e processar antígenos, porém pequena habilidade para estimular células T visto que a expressão das moléculas co-estimuladoras - CD80 e CD86 - é baixa. Com a presença, no tecido, de agentes infecciosos ou outras perturbações, as DCs sofrem alterações funcionais conhecidas como “maturação”, caracterizadas pela redução da capacidade endocítica, aumento da expressão de moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade e das moléculas co-estimulatórias (CAUX et al., 1994; BANCHEREAU et al., 2000). No seguimento desse processo, essas células migram para os órgãos linfóides secundários e lá, irão apresentar os antígenos processados aos linfócitos T, iniciando a resposta adaptativa (GUERMONPREZ et al., 2002). Entretanto, somente após sua maturação fenotípica e funcional, as DCs são competentes para promover a ativação de linfócitos T (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; BANCHEREAU et al., 2000), visto que em um estado imaturo, as DCs induzem linfócitos T à anergia ou a

um estado funcional supressor (MAHNKE et al., 2002; STEINMAN; HAWIGER; NUSSENZWEIG, 2003).

Apesar de sua grande heterogeneidade fenotípica e funcional (NAIK, 2008), este tipo celular pode ser classificado, ao menos, em dois subtipos principais no ser humano: as DCs mielóides e as DCs plasmocitóides (MATSUI et al., 2009). Enquanto as DCs mielóides parecem assumir o papel principal na apresentação antigênica (CHAKRABORTY et al., 2000), etapa inicial das respostas adaptativas (MATSUI et al., 2009), às DCs plasmocitóides é atribuído um papel essencial na produção de interferons do tipo alfa (GILLIET; CAO; LIU, 2008) – uma resposta tipicamente inata e essencial frente às infecções virais (JEGALIAN; FACCHETTI; JAFFE, 2009).

Além dessa dicotomia, dependente do subtipo celular, que aponta para a participação das DCs tanto na resposta adaptativa quanto na resposta inata, o envolvimento das DCs na resposta imune é ainda mais complexo. As DCs mielóides ao interagirem com o microambiente, por meio de receptores para padrões moleculares (KANAZAWA, 2007, GRANUCCI; ZANONI; RICCIARDI-CASTAGNOLI, 2008), são capazes de “avaliar” o estado funcional do mesmo e, assim, influenciar de maneira significativa o padrão da resposta adaptativa aos antígenos por ela apresentados a partir daquele microambiente (STEINMAN, 1991; ITANO et al., 2003). Esta “localização funcional” das DCs na interface do sistema imune com o microambiente, as tornam alvos importantes tanto para a modulação por parte do próprio sistema imune, quanto para processos patológicos (NESTLE et al., 2009) que acabam contribuindo para o estabelecimento de desequilíbrios no organismo, isto é, de doenças. Embora infecções sejam ocorrências onde estes desequilíbrios funcionais das DCs sejam mais facilmente identificados e compreendidos, outras situações, como o câncer, também afetam, nitidamente, este tipo celular.

1.4 Câncer e Células Dendríticas

As DCs encontradas em tecidos neoplásicos apresentam diversas alterações fenotípicas, quando comparadas às DCs obtidas de tecidos não-neoplásicos (GABRILOVICH et al., 1997; BALEEIRO et al., 2008). É relevante notar que, de maneira condizente com a presença da neoplasia em um indivíduo imunocompetente, estas

alterações não correspondem àquelas que se esperaria encontrar em tecidos onde a ativação funcional das DCs estivesse dando origem a uma resposta adaptativa específica contra antígenos daquele microambiente, mas sim a alterações associadas ao estabelecimento de estados de tolerância aos mesmos antígenos (NAGARAJ et al., 2009). Ainda mais intrigante é a observação de que não só as DCs de pacientes com câncer apresentam alterações, mas também DCs geradas *in vitro* a partir de monócitos do sangue dos mesmos pacientes têm fenótipo e função alterados (DELLA BELLA et al., 2003; HASEBE et al., 2005; NEVES et al., 2005; AZEVEDO-SANTOS, 2010; RAMOS, 2011).

Em pacientes portadores de gliomas, especialmente GBM, o estado de imunossupressão induzido por esses tumores está diretamente associado a ação desse sobre os monócitos do sangue periférico. Na literatura (DIDENKO 2002; RODRIGUES 2010), é possível encontrar a descrição de diversos mecanismos pelos quais os gliomas suprimem a ação do SI. Os monócitos do sangue periférico, são afetados de maneira quase permanente pela ação dos fatores secretados pelo tumor, que, ao promoverem uma permeação/ruptura da barreira hemato-encefálica, promovem uma ação sistêmica (ZOU et al., 1999). Assim, o decréscimo da expressão de moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade, bem como de moléculas co-estimuladoras CD80/CD86, implicam na indução de anergia das células T que interagem com tais DCs, provocando assim uma paralisia da resposta anti-tumoral.

Sabe-se que tumores são capazes de promover desde redução no pH do seu microambiente, até a secreção de fatores capazes de promover crescimento e angiogênese como o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), (TAKAHASHI et al 2004) e o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), (GABRILOVICH, 2004; GOTTFRIED; KREUTZ; MACKENSEN, 2008). Citocinas também são secretadas pelo tumor em seu microambiente (DRANOFF, 2004). A interleucina (IL) 10 (KAWAMURA, 2002), por exemplo, atua não só inibindo a função das células apresentadoras de antígeno (APCs) como também promove uma regulação negativa da função dos linfócitos T citotóxicos, levando-os a um estado de anergia *in vitro*. Já o TGF- β , fator de crescimento polipeptídico conhecido por atuar sobre a proliferação e a diferenciação de diversos tipos celulares, age sobre as DCs promovendo uma ação imobilizadora inibindo a

migração destas células para os linfonodos (RODECK et al., 1994; WAHL; WEN; MOUTSOPOULOS, 2006). Recentemente, descreveu-se a liberação de exossomos (SKOG et al., 2008; IERO et al., 2008; ROMAGNOLI et al., 2010) pelo tumor como mais um dos fatores secretados pelo tumor. Essas nanovesículas podem conter desde proteínas angiogênicas até mRNAs implicados com proliferação celular e resposta imune, entre outros. Como a ação imunossupressora desses fatores também pode ser observada também no soro e no fluido cérebro-espinhal dos portadores (ZOU et al., 1999), e considerando a grande importância dos fatores do sistema complemento (SC) para a maturação e diferenciação dos monócitos em DCs (REIS et al., 2007b; PENG et al., 2009; SACKS, 2010), a questão a respeito de quais fatores estariam promovendo tal ação, recaiu também sobre as proteínas que compõem o SC.

1.5 Sistema Complemento

O sistema complemento (SC) é composto por mais de 30 diferentes proteínas, solúveis e de membrana, que têm importante papel tanto na resposta inata (GROS; MILDER; JANSSEN, 2008) quanto na adaptativa (HAWLISCH; KÖHL, 2006; KÖHL 2006). No plasma, tais proteínas constituem aproximadamente 15% da fração de globulina e somam mais de três gramas por litro (WALPORT, 2001a). As proteínas do sistema complemento podem ser tanto integrais da membrana em diversos tipos celulares, como monócitos e macrófagos, quanto solúveis. Os componentes efetores solúveis no plasma são capazes de ativação enzimática, originando uma série de mecanismos com papel crucial na resposta inata contra diversos microorganismos (COTENA et al., 2007). Esta ativação (revista em ZIPFEL; SKERKA, 2009) pode ocorrer por três diferentes vias: a via clássica, a via alternativa e a via das lectinas.

A primeira via a ser descrita, a clássica, inicia-se quando ocorre a ligação da proteína C1q ao domínio CH₂ de anticorpos da classe IgG (IgG1, IgG2 e IgG3) ou ao domínio CH₃ de anticorpos da classe IgM, quando estes estão ligados especificamente a antígenos. Para que uma interação estável ocorra, C1q deve se ligar a pelo menos dois Fcs. A molécula C1 faz parte de um complexo multiprotéico em conjunção com

duas unidades de C1r e duas unidades de C1s que se associam de maneira dependente de Ca^{++} .

A ligação C1q-imunoglobulina induz modificações conformacionais em C1q que acabam por ativar a serino-protease C1r que por sua vez cliva C1s convertendo-o em uma serino-protease ativa. C1s pode atuar sobre diferentes substratos, entre eles C2 e C4. A molécula C4 é uma glicoproteína composta por 3 cadeias polipeptídicas α , β e γ , sendo que ao ser clivada por C1s, na porção aminoterminal da cadeia α , forma um fragmento pequeno chamado C4a e um fragmento maior chamado de C4b. Esse fragmento maior liga-se à superfície alvo e a pró-enzima C2 liga-se ao sítio exposto de C4b, onde sofre clivagem por C1s formando o complexo C4b2a ou C3 convertase “clássica” e um fragmento menor C2b é liberado. Essa C3 convertase, promove a clivagem de C3, gerando novamente dois fragmentos: C3a e C3b. Nessa etapa, é válido notar que uma única C3 convertase é capaz de produzir mais de 200 fragmentos de C3, promovendo assim uma amplificação da cascata enzimática, visto que C3b vai ligar-se a C4b2a formando o complexo C4b2a3b ou C5 convertase que irá clivar o componente C5 em C5a e C5b. (MORGAN et al., 2005; VAN KOOTEN et al., 2008; ZIPFEL; SKERKA, 2009).

Porém a via mais utilizada para ativação do SC pelo nosso organismo é a via alternativa. Essa rota se inicia a partir da molécula $\text{C3(H}_2\text{O)}$ formada após a hidrólise espontânea da ligação intramolecular tiol-éster da cadeia α do componente C3. Tal molécula exibe um sítio de ligação para a proteína plasmática chamada Fator B (FB). O complexo formado $\text{C3(H}_2\text{O)B}$ sofre clivagem de outra proteína sérica conhecida como Fator D que vai originar o fragmento Ba e o fragmento Bb. Esse último fragmento permanece ligado a $\text{C3(H}_2\text{O)}$ formando $\text{C3(H}_2\text{O)Bb}$ que, na presença de cátions Mg^{+2} , atua como uma C3 convertase de maneira análoga à C4b2a. O fragmento C3b recém gerado pode também se ligar a FB formando o complexo C3bBb que possui uma meia-vida de aproximadamente 5 minutos, porém com a ligação da proteína reguladora Properdina essa meia-vida se estende para aproximadamente 30 minutos. Ao complexo C3bBb pode se ligar ainda mais um fragmento de C3b formando a C5 convertase da via alternativa C3bBb3b que é capaz de clivar C5 em C5a e C5b.

A última via de ativação a ser descrita é a chamada via das lectinas. Essa via ganhou este nome devido ao fato de que a sua ativação ocorre principalmente e por

meio da ligação da lectina ligadora de manose (MBL) com resíduos de manose ou outros açúcares, seja na forma de glicoproteínas ou na forma de carboidratos, presentes na superfície de microrganismos (mo). A MBL é uma proteína de fase aguda, produzida principalmente durante as respostas inflamatórias que se encontra associada às serino-proteases MASP-1, MASP-2 e MASP-3 e se liga a superfície do patógeno/célula. Assim, MASP-2 clivará C4 em C4a e C4b e de C2 em C2a e C2b promovendo assim a formação de uma C3- e uma C5- convertases.

Embora as três vias sejam ativadas por mecanismos diferentes, todas convergem para a formação do complexo de ataque à membrana (MAC). Esse complexo forma um grande canal transmembrana que acaba desestruturando a superfície celular na medida em que permite a difusão livre de íons e pequenas moléculas ocasionando um desequilíbrio osmótico.

A formação do MAC se inicia pela ligação de C5b à C6 formando C5b6 que, ao ligar-se a C7, sofre uma modificação estrutural que expõe as regiões hidrofóbicas desse complexo que servirão como sítios de ligação para fosfolípidos de membrana. Assim, na membrana os sítios de ligação hidrofóbicos permitem que o complexo C5b67 se insira dentro da bicamada lipídica. Posteriormente, a ligação de C8 a esse complexo resulta novamente em mudança conformacional que terá como resultado a formação de um poro na membrana do patógeno/célula de aproximadamente 10 Å de diâmetro que é responsável por sua lise. Por fim, ocorre a ligação e a polimerização de cerca de 10 a 18 moléculas de C9 ao complexo C5b678. O MAC completo apresenta-se como um poro de tamanho de 70 – 100 Å, que promove uma completa desestabilização osmótica, resultando em morte celular (KINDT; GOLDSBY; GOLDSBY, 2007; GROS; MILDNER; JANSSEN, 2008).

É válido ressaltar que, além da geração do MAC, alguns fragmentos intermediários apresentam funções muito relevantes para a resposta imune como os fragmentos C3b, C4b e iC3b que atuam como opsoninas, e também C3a, C4a e C5a que agem como anafilotoxinas.

Ao lado dos componentes ativadores, o plasma também contém muitas proteínas reguladoras da ativação desse sistema, com função essencial para a manutenção do seu equilíbrio e proteção das células do próprio hospedeiro .

Os reguladores da ativação do SC podem ser classificados em duas categorias: proteínas reguladoras solúveis e proteínas presentes na membrana celular. Dentre as proteínas solúveis tem-se o inibidor de C1, que bloqueia irreversivelmente o sítio catalítico das proteases C1r e C1s. Em condições fisiológicas, este inibidor encontra-se constantemente ligado a C1 desfavorecendo sua ativação. Já o Fator I é responsável pela clivagem de C4b em iC4b e C4c e C4d e C3b em iC3b e C3c e C3d. Tal ação depende dos seus co-fatores Fator H e C4b *binding protein* que também atuam acelerando o decaimento da enzima C3 convertase nas três vias. As proteínas vitronectina e clusterina atuam de maneira competitiva com o componente C8. Enquanto a properdina, atua regulando positivamente a via alternativa. Dentre as proteínas de membrana, é válido citar a proteína CD46 ou MCP (*Membrane co-factor protein*) que também atua como co-fator do Fator I e CD55 ou DAF (*Decay accelerating factor*) que age acelerando o decaimento das convertases C3 e C5. Já CR1 agrega as funções de MCP e de DAF. Enquanto que HRF (*Homologous restriction factor*) e CD59 atuam de maneira a bloquear a formação do MAC (KEMPER; ATKINSON, 2007; ZIPFEL; SKERKA, 2009).

A grande maioria tanto das proteínas efetoras quanto das reguladoras é sintetizada pelo fígado. Entretanto, alguns componentes como o Fator D é sintetizado pelo tecido adiposo, assim como a Properdina é originada por monócitos, linfócitos T e granulócitos e C3 apresenta a DC como fonte de síntese (BOTTO et al., 1992; REIS; BARBUTO; ISAAC, 2006; 2007a).

Além dos papéis claros do complemento na resistência inata a uma série de microorganismos, evidenciados nos portadores de deficiências de componentes do sistema (PETTIGREW; TEUBER; GERSHWIN, 2009), o complemento tem, também, papel na regulação da resposta adaptativa.

Na resposta dependente de linfócitos B, o complemento participa desde a facilitação da localização e retenção do antígeno em células folicular dendríticas (NIELSEN; FISCHER; LESLIE, 2000), até como adjuvante natural no processo de ativação de linfócitos B (DEMPSEY et al., 1996). Também na promoção da proliferação de linfócitos B e produção de imunoglobulinas (C3d), a participação desse sistema é notada, além de contribuir para o desenvolvimento de linfócitos B de memória (BARRINGTON et al., 2002; CARROL et al., 2004). De maneira semelhante, no processo

de apresentação antigênica as proteínas do complemento facilitam a captura e localização dos antígenos pelas DCs (PENG et al., 2009), otimizando o processo de apresentação e, portanto, a resposta dos linfócitos T (CARROLL et al., 2004; KEMPER; ATKINSON, 2007; NAKAYAMA et al., 2009). CD35, também conhecido por CR1, uma das proteína integrais de membrana de monócitos, DCs, linfócitos e polimorfonucleares, atua inibindo a proliferação de linfócitos T e a produção de IL-2 por meio da sua superexpressão durante a ativação dessas células no sangue periférico (KEMPER; ATKINSON, 2007).

FIGURA 1 - Ilustração das vias de ativação do Sistema Complemento.

Ilustração da ativação do sistema complemento através da via clássica, da via das Lectinas e da via alternativa.

FONTE: Walport (2001)

1.5.1 O Componente C3

O componente C3 humano é encontrado no plasma de indivíduos saudáveis na concentração de 1 - 2 mG/mL, constituindo, assim, a fração mais abundante das proteínas do SC. Tal componente é sintetizado principalmente por hepatócitos e em menor grau pelas células dendríticas, monócitos, macrófagos, polimorfonucleares, fibroblastos e células endoteliais (BOTTO et al., 1992; REIS; BARBUTO; ISAAC, 2006; 2007a).

O gene codificador da proteína C3 localiza-se no cromossomo 19p13.3 e é composto por 41 éxons, abrangendo 41 Kb ao todo. A cadeia β é codificada pelos 16 primeiros éxons (70 KDa) e os outros 25 éxons codificam a cadeia α (115KDa). Primeiramente, C3 é sintetizado como uma longa cadeia polipeptídica de 1641 resíduos de aminoácidos - Pró-C3. Antes de ser secretado, o Pró-C3 é processado resultando em uma molécula composta por uma cadeia α e uma cadeia β . A ligação tiol-éster responsável pela ligação covalente a superfícies alvos, se localiza na cadeia α e está protegida da hidrólise na molécula nativa. A clivagem promovida pelas C3 convertases ocorre entre a arginina 726 e a serina 727 removendo da cauda N-terminal 74-77 resíduos que originam a anafilotoxina C3a e C3b. A molécula C3b pode sofrer clivagem pelo Fator I originando os fragmentos iC3b e C3f. A posterior quebra do iC3b novamente pelo Fator I libera o fragmento C3c e C3d enquanto o outro fragmento formado C3dg, fica ligado à superfície receptora (revisado por GROS; MILDER; JANSSEN, 2008).

A todos os fragmentos de C3 há importantes funções associadas. Como já comentado, C3a atua como anafilotoxina, um poderoso mediador inflamatório que induz a desgranulação de mastócitos e basófilos promovendo a liberação de histamina e outros mediadores farmacologicamente ativos. Já C3b e iC3b são classificados como as principais opsoninas, ou seja, possuem a capacidade de se ligar aos receptores do complemento (CR1, CR3 e CR4) em células fagocíticas aumentando a capacidade fagocitária dessas sobre os antígenos recobertos por tais fragmentos (GORGANI et al., 2008), C3b contribui ainda para a solubilização de imunocomplexos e para o processo de hemocaterese .

Ao fragmento iC3b, além da função de anafilotoxina, também é creditada a função de induzir tolerância em DCs imaturas (SOHN et al., 2003, SCHMIDT et al., 2006). Os fragmentos C3d e C3dg atuam como adjuvantes uma vez que estimulam a síntese de imunoglobulinas ao ligarem-se aos receptores CR2 em linfócitos B (MASTELLOS; LAMBRIS, 2002; MORGAN et al., 2005). A molécula C3c, contribui para a liberação de neutrófilos da medula óssea (HONCZARENKO et al., 2005).

FIGURA 2- Ilustração da proteína C3 e seus fragmentos.

Ilustração da proteína C3 e seus fragmentos com seus respectivos tamanhos.

FONTE: Calich e Vaz (2009)

1.6 Câncer e Sistema Complemento

As células tumorais, de diversos tipos histológicos, encontram-se, freqüentemente recobertas por proteínas do sistema complemento (IRIE; IRIE; MORTON, 1974; GANCZ; FISHELSON, 2009), mostrando tanto o reconhecimento dessas células pelo sistema, quanto a resistência das mesmas, ao menos a esses componentes, muito relevantes, da resposta imune. Na verdade, é muito provável que a adaptação/resistência das células tumorais aos mecanismos da resposta inata represente o passo inicial e mais eficaz de seu escape à resposta imune anti-tumoral. Tal adaptação pode ser induzida, entre outros, pela super-expressão da proteína CD59 (BRASOVEANU et al., 1996, VARSANO et al., 1999) CD46, (WIECHENTHAL et al., 1999) e CD55, que por prevenirem a formação do MAC, as protegem da lise promovida pelo SC (FISHELSON et al., 2003). Além de atuar sobre as proteínas reguladoras do sistema complemento, a secreção de inibidores solúveis como o inibidor de C1q, Fator H e seus correlatos (JUNNIKKALA et al., 2000) e Fator I (OKROJ et al., 2008) também impedem a continuidade da ativação das cascatas. Ora, estes fenômenos contribuem para a resistência destas células à lise pelo sistema complemento, novamente chamando a atenção para este sistema para a Biologia das neoplasias.

1.7 Células Dendríticas e Sistema Complemento

Um ponto de convergência intrigante é a observação de que células dendríticas sintetizam componentes do complemento (REIS; BARBUTO; ISAAC, 2006, 2007a; ZHOU et al., 2007; VAN KOOTEN et al., 2008) e são por eles influenciadas em sua capacidade de diferenciação e maturação, como foi observado pelo nosso grupo (REIS et al., 2007b). Constatou-se, na verdade, que a presença do componente C3 parece necessária para a diferenciação e maturação *in vitro* de monócitos humanos (REIS et al., 2007b). Quando estas células foram cultivadas em meio suplementado com soro deficiente de C3, observamos diminuição da expressão de DC-SIGN, HLA-DR, CD1a, CD80 e CD86 pelas DCs resultantes destas culturas. Além disto, quando as DCs imaturas foram estimuladas a maturar por um desafio com LPS, nota-se, novamente, diminuição da expressão de moléculas de classe II do complexo principal de

histocompatibilidade, de moléculas co-estimuladoras e de sua capacidade de produção de IL-12 e TNF-alfa (REIS et al., 2007b).

É interessante notar que este tipo de alterações fenotípico-funcionais, detectadas em DCs diferenciadas/maturadas em meio deficiente de C3 são semelhantes às observadas em células derivadas de monócitos de pacientes com câncer (NEVES et al., 2005; AZEVEDO-SANTOS, 2010; RAMOS, 2011). Embora a deficiência sérica de C3 não seja característica de portadores de câncer (GOUSIAS et al., 2010), pode-se especular que níveis séricos levemente alterados (que se poderiam aceitar presentes em pacientes onde houvesse o consumo deste fator por deposição sobre as células tumorais, como descrito por Irie et al., em 1974), aliados a uma deficiência de produção autócrina destes fatores, contribuiriam para as alterações fenotípicas das DCs derivadas dos pacientes.

1.8 Câncer, Células Dendríticas e Sistema Complemento

Dentre as diversas formas terapêuticas de manipulação do SI, a vacinação de pacientes com células dendríticas mostra-se como uma das melhores opções de tratamento contra o câncer. Tal estratégia, pode ser empregada, virtualmente, para todos os diferentes tipos de tumores, e é dirigida contra um dos mais relevantes mecanismos de escape tumoral (DE VLEESCHOUWER et al., 2006). Apesar da desregulação do SI na ocasião da neoplasia, diversos grupos vêm demonstrando que a recuperação do estado de homeostasia e o conseqüente combate a neoplasia é possível através de intervenções imunoterápicas (FECCL et al., 2003; BARBUTO et al., 2004; NEVES et al., 2005). Assim, para que tal prática se torne verdadeiramente uma opção clínica e não seja só mais um procedimento experimental, é de crucial importância o entendimento do funcionamento do SI tanto no seu estado natural quanto em situações de doença, e, principalmente, o conhecimento da biologia das células dendríticas, principal instrumento dessa terapia. Conforme estudos encontrados na literatura, inclusive de nosso grupo, uma das grandes influências sobre a biologia e o funcionamento das DC é exercido pelas proteínas do sistema complemento, em especial o componente C3. Recentes trabalhos (TAKAHARA et al., 2003; REIS et al., 2007b), sugerem uma importante participação desse componente no

processo de maturação das células dendríticas, processo este que, na ocasião de uma neoplasia, estaria sendo corrompido pelo tumor. Como a influência do microambiente se mostra crucial para a perfeita diferenciação e maturação dos monócitos/DCs, a presença de células tumorais, bem como de seus produtos solúveis, poderiam ser responsáveis pelas alterações observadas nas DCs de portadores de neoplasia por meio da promoção de um desbalanço dos níveis das proteínas do complemento, em especial de C3.

Sendo assim, a questão que procuramos investigar com o desenvolvimento do presente projeto é se monócitos e as DCs deles derivadas através de diferenciação *in vitro* na presença de sobrenadante tumoral apresentam deficiência em sua capacidade de produção de C3. A identificação de uma possível deficiência poderia dar suporte a abordagens corretivas das mesmas que otimizassem estratégias de geração *in vitro* de DCs de portadores de câncer com perspectivas de aplicação terapêutica das mesmas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar se há alteração na produção do componente C3 do sistema complemento por células mononucleares aderentes provenientes de doadores saudáveis diferenciados *in vitro* na presença do sobrenadante tumoral.

2.2 Específicos

- ❖ Obter e caracterizar o fenótipo de membrana de células dendríticas diferenciadas *in vitro* a partir de células mononucleares aderentes do sangue de doadores saudáveis.
- ❖ Obter e caracterizar o fenótipo de membrana de células dendríticas diferenciadas *in vitro* a partir de células mononucleares aderentes do sangue de doadores saudáveis tratadas com sobrenadante tumoral.
- ❖ Avaliar a expressão do gene C3 através de PCR em tempo real das células mononucleares aderentes diferenciadas *in vitro* na presença de sobrenadantes tumorais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Este trabalho conta com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (Parecer 959/CEP). As amostras de sangue de doadores saudáveis utilizadas nos experimentos foram obtidas no Hospital Oswaldo Cruz, São Paulo capital, a partir de câmaras de leucorredução de plaquetaferese de doadores saudáveis, após o consentimento expresso através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

As linhagens tumorais U87MG e A172 derivada de glioblastoma multiforme humano foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Ana Lepique e Profa. Dra. Ana Campa, respectivamente.

3.2 Diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos *in vitro*

A fração mononuclear foi separada das demais frações presentes no sangue obtido das câmaras de leucorredução, por meio de centrifugação em gradiente de densidade. Para purificação das células mononucleares, o sangue foi diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS) na proporção de 1:1 e colocado em tubo plástico cônico de 50 mL sobre 12 mL de Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). O material foi centrifugado a uma velocidade de 900 *g* à temperatura de 18 °C por 30 min. A camada de células mononucleares formada foi retirada e colocada em novo tubo cônico de 50 mL para que o procedimento de lavagem fosse efetuado. Foram efetuadas 3 lavagens que se processaram nas velocidades de 600, 300 e 200 *g* por 10 min cada, em meio de cultura RPMI-1640 (GIBCO). O sedimento resultante foi coletado, quantificado por contagem em câmara de Neubauer, ressuspensionado em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (GIBCO) e colocado em cultura em placas de 6 poços em uma concentração final de 3×10^7 células/mL. As células foram mantidas em estufa com atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ e saturada com água à temperatura de 37 °C para aderência das células por 2 h. Após esse período, as células não aderentes foram removidas e descartadas, ou quantificadas e congeladas em SFB e dimetilsulfóxido (DMSO) na proporção de 9:1 em uma concentração final aproximada de 2×10^6 células/mL. A fração aderente foi mantida em cultura por mais 7 dias em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (R-10)

acrescido da citocina IL-4 (PEPROTEC) na concentração final de 50 ng/mL e de Fator Estimulador de colônia de granulócito-macrófago - GM-CSF - (PEPROTEC) na mesma concentração para a diferenciação dos monócitos em DCs. No quinto dia de cultura as células foram ativadas pela adição de 500 ng/mL de LPS (SIGMA). No sétimo dia, as células foram coletadas da placa de cultura com o auxílio de RPMI-1640 gelado, e sua viabilidade avaliada após teste de exclusão realizado com azul de Trypan 0,4% (SIGMA). As células viáveis foram contadas e ressuspensas em volume de meio de cultura adequado para os ensaios subseqüentes.

3.3 Cultura de Células Tumorais

Para a execução deste projeto foram utilizadas as linhagens tumorais originada de glioblastoma de humanos U87MG e A172. As células foram cultivadas, primeiramente, em meio de cultura DMEM (baixa glicose) (GIBCO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (R-10) e 1% de antibiótico-antimicótico (10 000 U/mL de penicilina, 10 000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B) (GIBCO). Posteriormente, as células foram condicionadas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (R-10) e 1% de antibiótico-antimicótico (10.000 U/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B (GIBCO). Para o repique das células, primeiramente, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS 1x. Após esse procedimento, uma solução à 10% de tripsina-EDTA (GIBCO) foi adicionada e permaneceu em ação sobre as células por aproximadamente 5 min; em seguida foi adicionado o dobro do volume da solução de tripsina-EDTA em R-10, para que, dessa maneira, o SFB contido no meio de cultura inibisse a ação da enzima. O volume então foi dividido em diferentes garrafas de cultura conforme a quantidade de células contidas na garrafa mãe. As células foram mantidas em estufa com atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ e saturada com água a temperatura de 37 °C.

3.4 Determinação de contaminação das linhagens tumorais por micoplasma

Este protocolo visa a amplificação do gene para a subunidade 16S do RNA ribossomal de micoplasma, ureaplasma e spiroplasma (VANKUPPEVELD et al., 1992). Visto que a sequência é bastante conservada, esta reação em cadeia da polimerase – PCR – permite amplificar o DNA das espécies mais comuns de micoplasma.

3.4.1 Extração de DNA para detecção de contaminação por micoplasma

A quantidade de 1×10^6 células a serem testadas foi coletada em microtubo de 1,5 mL e submetidas a uma centrifugação de 18000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado resultante foi submetido a duas lavagens com 100 μ L de PBS 1x e novamente centrifugado a 18000 g durante 5 minutos. Após as lavagens, as células foram incubadas em bloco térmico a 100 °C por 10 minutos, novamente centrifugadas a 18000 g durante 5 minutos e o sobrenadante resultante contendo o DNA de interesse foi estocado em microtubos de 0,5 mL em freezer a 4 °C.

3.4.2 Reação em cadeia da polimerase para detecção de contaminação por micoplasma

O DNA foi amplificado pela adição de 0,5 μ L do produto da extração descrita no item acima 3.4.1 em 25 μ L de volume final da PCR contendo 10 pmols dos seguintes primers: GPO3 (5'- GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T - 3') e MGSO (5'- TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC -3'). Como controle positivo utiliza-se o DNA de uma cultura sabidamente contaminada, assim como no controle negativo, o DNA não é adicionado. A reação acima, adicionou-se 0,2 μ L da enzima *Taq DNA polimerase* 5 U/ μ L (Invitrogen, San Diego, U.S.A) juntamente com 2,5 μ L do seu tampão 10x, 0,5 μ L de dNTP mix a 10 mM (Invitrogen), 0,75 μ L de $MgCl_2$ 50mM (Invitrogen) e água DEPC para a complementação do volume. O termocilador já deve estar equilibrado a 94 °C quando da colocação das amostras. As condições do ciclo foram as seguintes: 45 segundos de desnaturação inicial a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos para desnaturação, 30 segundos a 55 °C para anelamento e por fim 30 segundos a 72 °C para extensão e mais 5 minutos a 72 °C para extensão final.

A confirmação da síntese foi avaliada após visualização da banda correspondente ao produto amplificado na região de 270 pb, após eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium).

Figura 3 – Detecção de contaminação por micoplasma.

Fotografia da eletroforese em gel de agarose 1% realizadas a partir dos produtos de PCR resultantes da detecção de contaminação por micoplasma. Foto A - Perfil da linhagem tumoral U87MG antes do procedimento de descontaminação. Foto B - Perfil da linhagem tumoral U87MG antes do procedimento de descontaminação. M : marcador de peso molecular. Canaletas 1: controle positivo. Canaletas 2: linhagem tumoral U87MG testada. Canaletas 3: Controle negativo da reação.

FONTE: CECHIM (2011)

3.4.3 Tratamento de descontaminação para micoplasma

Para o tratamento da linhagem celular U87MG contra micoplasma, utilizou-se o kit *Plasmocure* (InvivoGen) com adaptações. Para o início do tratamento, $2 \cdot 10^6$ células foram plaqueadas em garrafa de cultura de 25 cm². Adicionou-se 5 mL de meio de cultura R-10 contendo 50 µg/mL de *plasmocure* e 15 µg/mL de ciprofloxacino. A cada 3 – 4 dias as células eram tripsinizadas e o meio de cultura trocado. O tratamento se manteve durante 20 dias, visto que, após 15 dias de tratamento, as células foram testadas através de PCR e somente após a confirmação da descontaminação, as células foram colocadas em meio de cultura sem tratamento.

3.5 Obtenção do sobrenadante de células tumorais

O sobrenadante tumoral foi obtido da cultura de U87MG, 48h após o repique das mesmas. O sobrenadante foi retirado e colocado em tubo plástico cônico de 50 mL e o pH ajustado para 7,3 – 7,4. Após a aferição do pH, o meio de cultura na quantidade requerida (25, 37 ou 50% do volume total da cultura), foi então adicionado à cultura de células mononucleares em processo de diferenciação.

Figura 4 – Curva de crescimento das linhagens U87MG e A172.

Gráficos representativos das curvas de crescimento das linhagens tumorais U87MG e A172. As células (5×10^3 , 10^4 e $1,5 \times 10^4$) foram plaqueadas em placas de 96 poços e mantidas em cultura durante 96h. Em intervalos de 24h, as células eram tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer.

FONTE: CECHIM (2011)

3.6 Medição protéica

A medição da quantidade de proteína contida no sobrenadante das culturas foi feita através do kit *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific) conforme descrito abaixo. Primeiramente, uma solução de BCA a 2 mg/mL foi preparada utilizando a solução padrão contida no kit e PBS 1X estéril. A curva padrão de BCA com 8 diferentes concentrações foi pipetada (30µL/poço) em placa de 96 poços de poliestireno (Costar) sempre em duplicata. As amostras puras e diluídas também foram pipetadas (30µL/poço) na mesma placa também em duplicata. A solução de revelação composta pelos reagentes A e B foi preparada na proporção de 50:1 e 200µL desta solução foi adicionado em cada poço. A placa foi então incubada em estufa a 37°C por 30 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro com filtro de 562nm.

Figura 5 – Curva de dosagem protéica.

Gráfico representativo da curva padrão de BSA.

FONTE: CECHIM (2011)

Tabela 1 – Concentração protéica de sobrenadantes de culturas de células tumorais e de monócitos.

Absorbância U87MG	Conc. Proteica (µG/mL)	Absorbância Monócito	Conc. Proteica (µG/mL)
1,0817	0,18528	1,07795	0,18528
0,04705	0,18415	0,04735	0,18415
0,04735	0,184152	0,0467	0,18415
0,04675	0,184151	0,0467	0,18415
0,04715	0,1841	0,0466	0,18415

A tabela indica o valor da absorbância medido em espectrofotômetro e a respectiva concentração de proteína correspondente. As colunas da esquerda correspondem às medidas do sobrenadante proveniente das culturas de U87MG. As duas colunas da direita correspondem às medidas do sobrenadante proveniente da cultura primária de monócitos.

FONTE: CECHIM (2011)

3.7 Avaliação do Fenótipo de Membrana das DCs por Citometria de Fluxo

Para avaliação do fenótipo, as células submetidas ao processo de diferenciação, foram marcadas com anticorpos monoclonais comerciais contra as seguintes moléculas de membrana: CD3 (marcador de linfócito T), CD11c (marcador de DCs mielóides), CD11b (subunidade do receptor para complemento 3 – CR3), CD14 (marcador de linhagem monocítica mielóide), CD19 (marcador de linfócito B), CD40 (molécula co-estimulatória), CD56 (marcador de célula Natural Killer), CD80 e CD86 (B7-1 e B7-2, moléculas co-estimulatórias), CD83 (marcador de DCs maduras/ativas), CD274 (molécula reguladora negativa), HLA-ABC (molécula do MHC – classe I, virtualmente expressa em quase todas as células do organismo) e HLA-DR (molécula do MHC – classe II, expressa em APCs profissionais).

Tabela 2 – Anticorpos murinos utilizados para citometria de fluxo.

Molécula	Clone	Isotipo	Fluorocromo
CD3	UCHT1	IgG1,κ	FITC
CD11c	B-ly6	IgG1,κ	PE-CY5
CD11c	N418	IgG	Alexa Fluor® 488
CD11c	B-ly6	IgG1,κ	PE
CD14	M5E2	IgG2a,κ	PE
CD14	M5E2	IgG2a,κ	FITC
CD19	HIB19	IgG1,κ	FITC
CD56	NCAM16.2	IgG2b,κ	FITC
CD56	B159	IgG1,κ	Alexa Fluor 488
CD80	L307.4	IgG1,κ	PE-CY5
CD83	HB15e	IgG1,κ	APC
CD86	2331(FUN-1)	IgG1,κ	APC
CD274	MIH1	IgG1,κ	PE
HLA ABC	G46-2.6	IgG1,κ	FITC
HLA ABC	G46-2.6	IgG1,κ	PE-CY5
HLA ABC	G46-2.6	IgG1,κ	PE
HLA ABC	G46-2.6	IgG1,κ	APC
HLA-DR	G46-6	IgG2a,κ	APC
HLA-DR	G46-6	IgG2a,κ	HORIZON

Tabela de anticorpos monoclonais, indicando a especificidade do anticorpo (molécula), o clone, o isotipo e o fluorocromo, utilizados nos experimentos de citometria de fluxo. Os anticorpos foram adquiridos da BD Biosciences e da E-Bioscience.

FONTE: CECHIM (2011)

As células em cultura foram retiradas das placas de cultura, conforme descrito acima, lavadas e contadas em câmara de Neubauer; alíquotas de 1 a 2×10^5 células foram colocadas em tubos plásticos de 1,5mL e lavadas por 3 vezes em 250 µL de tampão para citometria PBS-BSA (PBS 1X suplementado com 0,5% de soroalbumina bovina e 0,02% de azida sódica) a 15294 g à temperatura de 4 °C durante 20 s. Ao sedimento obtido foram adicionados os anticorpos correspondentes aos marcadores de interesse. As células, então, foram

incubadas durante 20 min. ao abrigo da luz sob a temperatura de 4 °C. Após o período de incubação, foram adicionados 250 µL de tampão para citometria PBS-BSA, repetindo-se mais uma vez nas mesmas condições anteriores. Por fim, as células marcadas foram ressuspensas em 300 µL de PBS-BSA contendo 2% de formaldeído para a fixação das mesmas. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (FACSCANTO II) com o auxílio do *software* DIVA e os dados obtidos foram analisados por meio do *software* Flowjo 7.2.5 (Tree Stars Inc.).

3.8 Marcação para C3 intracelular

As células dendríticas co-cultivadas em meio tumoral condicionado, foram acondicionadas em tubos plásticos de 1,5mL e lavadas em tampão para citometria PBS-BSA (PBS 1X suplementado com 0,5% de soroalbumina bovina e 0,02% de azida sódica) por duas vezes. A marcação extracelular convencional (descrita no item acima) foi realizada. Iniciou-se, então a marcação intracelular utilizando-se para tanto, o kit PE Anti-Human Foxp3 Staining Set (eBioscience). Assim, as células foram lavadas em tampão de citometria. Realizou-se, então, a permeabilização das células utilizando para tanto, 500 µL /tubo da solução permfix durante 30-40 minutos. Após esse procedimento, as células foram lavadas duas vezes consecutivas em tampão de permeabilização. As amostras foram incubadas com 30 µL /tubo de uma solução de bloqueio (5% de soro humano AB em tampão de citometria) durante 10 – 15 minutos e foram novamente lavadas em tampão de permeabilização. O anticorpo primário foi incubado por 20 minutos (C3: Goat Anti-Human C3 – Comp Tech – na diluição de 1:4). As células foram lavadas em tampão de citometria e o anticorpo secundário foi incubado durante 20 minutos (anti-goat FITC – diluição de 1:200). As células foram lavadas e a leitura no citômetro de fluxo (FACSCANTO II) foi feita com o auxílio do *software* DIVA e os dados obtidos foram analisados por meio do *software* Flowjo 7.2.5 (Tree Stars Inc.).

3.9 Extração de RNA total das células

Aproximadamente 1×10^5 células foram colocadas em 1 mL de Trizol (GIBCO) em tubo de 1,5 mL que se seguiu de uma vigorosa ressuspensão com o auxílio da pipeta durante 1 minuto. As amostras foram então incubadas à temperatura ambiente (TA) pelo período de 5 min para que houvesse a completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Seguiu-se com a adição de 0,2 mL de clorofórmio, com a agitação manual vigorosa durante 1 min e com a incubação por 3 min à TA. As amostras foram centrifugadas a 12000 *g* por 15 min a 4°C. Do produto da centrifugação, somente a fase superior foi coletada, sendo esta a fase aquosa incolor que contém o RNA. Em um novo tubo eppendorf de 1,5 mL contendo a fase de interesse, seguiu-se a adição de 0,5 mL álcool isopropílico que promoveu a precipitação do RNA sendo este incubado à TA por 10 min. Novamente, as amostras foram centrifugadas a 12000 *g* por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 1 mL de etanol gelado a 75% em água DEPC (água tratada com o reagente dietil pirocarbonato). Após agitação, as amostras foram centrifugadas a 7500 *g* durante 5 min a 4 °C; o sobrenadante foi removido e o sedimento seco à TA. Após a secagem, o RNA foi dissolvido em um volume de 20 µL de água DEPC (Gibco) e congelado a -20 °C.

A quantificação do RNA extraído foi determinada empregando-se o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 a 260 nm.

A integridade do RNA foi avaliada após visualização de duas bandas fortes, correspondentes aos RNAs das subunidades ribossomais 18S e 28S, após eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium).

3.10 Transcrição Reversa (RT-PCR)

Para a obtenção do cDNA, 1µg do RNA total foi submetido à transcrição reversa, em um volume final de 20 µL. Ao RNA foram acrescentados 1 µL do primer Oligo-dT 50 µM (Invitrogen), 1µL de dNTP a 10mM (Invitrogen) e água DEPC para complementação do volume até 13 µL. A amostra foi incubada a 65 °C por 5 min e em seguida refrigerada à temperatura de 4 °C durante 2 min. A reação foi mantida a 25 °C por 10 min. Nessa etapa foram adicionados 1 µL de DTT 0,1M (Invitrogen), 1 µL da enzima para transcrição reversa SuperScript III 1000 U (Invitrogen) com 4 µL do seu tampão 5x e 1 µL da enzima RNase OUT 40 U/ µL (Invitrogen). A reação foi mantida por mais 1 h a 50 °C e a 70° C por 15 min para inativação da reação.

O cDNA foi amplificado pela adição de 1 µL do produto da reação de transcrição reversa em 25 µL de volume final da reação de PCR contendo 10 pmol dos seguintes *primers*: C3 (F: AAG CTC TGC CGT GAT GAAC R: CAA TGG CCA TGA TGT ACTC) ou C5 (F: CTA TTG AAG CCC GAG AGA AC R: AGG GAA AGA GCA TAC GCA GA) ou FB (F: CTG GAG CAC CCT GAA GAC TC R: CCG GAG AGT GTA ACC GTC AT) sendo utilizados os seguintes *primers* como controles de reação: β-actina (F:CAG GCA CCA GGG CGT GAT GG R: CGA TGC CGT GCT CGA TGG GG) e/ou GAPDH (F: AGG CTG GGG CTC ATT TGC AGG R: TGA CCT TGG CCA GGG GTG CT). Adicionou-se 0,4 µL da enzima Taq DNA polymerase 5 U/ µL (Invitrogen) juntamente com 2,5 µL do seu tampão 10x (Invitrogen), 0,5 µL de dNTP a 10 mM (Invitrogen), 0,75 µL de MgCl₂ 50mM (Invitrogen) e água DEPC para a complementação do volume. A condição do ciclo é descrita a seguir: 3 minutos de desnaturação inicial a 94 °C, seguido de 34 ciclos de 94 °C por 30 s para desnaturação, 30 s a 62 °C para anelamento e por fim 3 min a 68 °C para extensão.

A confirmação da síntese foi avaliada pela visualização da banda correspondente ao produto amplificado, após eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium).

3.11 PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR)

Para avaliar a expressão do RNAm da proteína do sistema complemento C3, pelas células mononucleares diferenciadas *in vitro* na presença do sobrenadante tumoral, utilizou-se a técnica de PCR em tempo real com o *kit* SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), utilizando-se o aparelho Stratagene Mx3000P QPCR System.

A reação foi feita com 6,25 µL de SYBR, 300mM de mix de *primers* do gene de interesse, 1 µL de cDNA diluído na proporção de 1:10 e água ultrapura autoclavada (Invitrogen) suficiente para que o volume final de 12,5 µL fosse atingido em cada microtubo. As reações seguiram as seguintes condições: 95 °C durante 10 min para ativação da enzima presente no *kit* (AmpliTaq Gold DNA Polimerase) seguidos de 40 ciclos de desnaturação por 15 s a 95 °C e anelamento e extensão a 62 °C durante 1 min. A isso seguiu-se a curva de dissociação a 95 °C durante 1 min, 55 °C por 30 s e 95 °C durante 30 s.

Para avaliação dos resultados adquiridos utilizou-se o *software* MxPro™ 3.0.

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores exômicos (*primers*) para o gene C3 foi desenhado com base em seqüências de referência encontradas no NCBI com o auxílio do *software* PRIMER 3. A curva de dissociação referente a padronização para os *primers* podem ser observadas na figura 4.

Figura 6 - Curvas de dissociação dos *primers* para os genes C3 e GAPDH.

Curva de dissociação obtidas por PCR em tempo real, a partir de RNA extraído de células dendríticas maduras. A presença de um pico único de dissociação corresponde à amplificação de um produto específico. A direita gráfico de GAPDH. A esquerda gráfico de C3.

FONTE: CECHIM (2011)

A expressão relativa do gene alvo foi analisada pelo método do $2^{-\Delta\Delta CT}$ descrito por LIVAK e SCHMITTGEN (2001). Conforme este método, subtrai-se o Ct (*Threshold cycle*) da amostra de interesse pelo Ct do gene constitutivo da mesma amostra, no caso, GAPDH,

originando o valor de ΔCt . Em seguida, calcula-se o $\Delta\Delta Ct$, que trata da diferença entre o valor de ΔCt de uma amostra em questão e o ΔCt de uma amostra calibradora, a partir da qual todas as amostras farão referência. Por fim, calculou-se o valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, obtendo-se, assim, a expressão relativa do gene de interesse. Esse método considera 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%, tornou-se possível eleger esse método de análise.

3.12 Delineamento Experimental

Figura 7 – Esquema experimental das culturas tratadas a partir do dia zero.

FONTE: CECHIM (2011)

Figura 8 – Esquema experimental das culturas tratadas a partir do dia cinco.

FONTE: CECHIM (2011)

Figura 9 – Esquema experimental das culturas tratadas no dia seis.

FONTE: CECHIM (2011)

3.13 Análises Estatísticas

Os dados obtidos quanto à fenotipagem das células diferenciadas *in vitro* foram analisadas através dos testes *two-way* ANOVA para análise entre os grupos e *one-way* ANOVA com pós teste de Turkey para os dados no mesmo grupo. Já os dados referentes à expressão por meio dos genes codificantes das proteínas do sistema complemento obtidos por de PCR em tempo real foram avaliados através de teste T não paramétrico. As análises estatísticas dos resultados foram feitas empregando-se o software GraphPad Prisma (GraphPad Software Inc,USA).

4 RESULTADOS

4.1 Cultura de linhagens tumorais

As células da linhagem derivada de glioblastoma humano U87MG e A172, foram cultivadas, primeiramente, em meio de cultura DMEM baixa glicose suplementado com 10% de SFB e antibiótico-antimicótico. Posteriormente, as células foram condicionadas ao meio de cultura RPMI-1640 suplementado com SFB e antibiótico-antimicótico. Para que fosse possível o tratamento das culturas de DCs com sobrenadante tumoral, era necessário uma unificação dos meios de cultura desses dois tipos celulares. Visto que já havia uma padronização das culturas de DCs humanas e tal cultura por ser primária apresentava uma maior sensibilidade a variações, decidiu-se que seria mais apropriado mudar o meio de cultura das linhagens tumorais ao invés das DCs. Assim, efetuou-se o condicionamento das linhagens tumorais ao meio de cultura R-10, conforme descrito.

O condicionamento foi feito através da adição gradual do meio de cultura R-10 da seguinte maneira: na primeira troca de meio executada foi adicionado 25% do volume total do meio de cultura em R-10; após dois repiques foi adicionado 50% do volume total do meio de cultura em R-10 e novamente, após dois repiques, foi então adicionado somente o meio de cultura R-10. As culturas submetidas a esse condicionamento, não apresentaram diferenças morfológicas perceptíveis, embora a linhagem U87GM, tenha apresentado um aumento na quantidade de neuroesferas normalmente formadas na cultura, figura 7 A.

Figura 10 – Imagem da cultura de células da linhagem celular U87MG.

Imagem da cultura de células U87MG após condicionamento para meio de cultura R-10. (A) Imagem da cultura com pequenas neuroesferas. (B) Imagem da cultura com uma neuroesfera aderente.

FONTE: CECHIM (2011)

4.2 Efeito do tratamento com sobrenadante tumoral sobre o fenótipo de DCs diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos de doadores saudáveis.

As células mononucleares aderentes das amostras sanguíneas de doadores saudáveis foram diferenciadas *in vitro* durante 7 dias em meio de cultura R-10 na presença de IL- 4 e GM-CSF. As culturas foram tratadas com sobrenadante tumoral proveniente da linhagem U87MG ou A172 desde o dia zero da cultura ou a partir do dia 5 ou ainda a partir do dia 6 da cultura em duas diferentes proporções: 25 ou 50% do volume total. No quinto dia, determinadas culturas receberam LPS a fim de promover a ativação das DCs. No sétimo dia, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais contra as moléculas CD14, CD80, CD86, CD83, CD274 e CD11b. As análises dos marcadores foram feitas considerando as células que apresentaram tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) característicos de DCs humanas (figura 6 A) e não expressavam CD3, CD19 e CD56 (figura 6 B) visando desta maneira eliminar da análise possíveis contaminantes da cultura de DC. Os gráficos demonstram a porcentagem de células positivas para os marcadores bem como a intensidade de fluorescência mediana das células. Os resultados correspondem a 3 experimentos executados com amostras de doadores diferentes.

Figura 11 - Gráficos pseudo-coloridos ilustrando os *gates* utilizados para a análise dos dados de citometria de fluxo.

O gráfico A representa o *gate* correspondente a células com tamanho e granulosidade correspondentes a de DCs. O gráfico B mostra a seleção de células negativas para os marcadores CD3, CD19 e CD56 dentro do *gate* de DCs.

FONTE: CECHIM (2011)

O efeito do tratamento com sobrenadantes tumorais sobre a expressão da molécula CD14 foi analisada tendo em vista que monócitos apresentam uma alta expressão dessa molécula que tende a diminuir com a diferenciação destes em DCs.

É possível observar nos gráficos de porcentagem de células positivas que o sobrenadante tumoral da linhagem U87MG parece ter afetado positivamente a expressão da molécula CD14, especialmente nas culturas que receberam este no dia zero, embora as culturas tratadas a partir do dia 5 também apresentem uma elevação deste marcador quando comparado com as células não tratadas com o sobrenadante (figura 9 A e B). As células tratadas no dia 6 não parecem ter sofrido alteração. Já a intensidade mediana de fluorescência parece ter sido alterada somente nas células tratadas desde o dia zero, sem ativação por LPS (figura 9 C).

Já o efeito do tratamento com o sobrenadante da linhagem A172, em culturas que não receberam ativação por LPS, parece provocar um discreto aumento na porcentagem de células positivas e também no MFI quando comparado com as células não submetidas ao sobrenadante tumoral (figura 10 A e C).

As tendências descritas não foram estatisticamente significativas.

Figura 12 – Efeito do sobrenadante da linhagem U87MG sobre a expressão de CD14.

(A) Frequência de células positivas para CD14 que não foram ativadas com LPS. (B) Frequência de células positivas para CD14 que foram ativadas com LPS. (C) Intensidade mediana de fluorescência de CD14 em células não ativadas com LPS. (D) Intensidade mediana de fluorescência de CD14 em células ativadas com LPS. ST- sobrenadante tumoral.

FONTE: CECHIM (2011)

Figura 13 – Efeito do sobrenadante da linhagem A172 sobre a expressão de CD14.

(A) Frequência de células positivas para CD14 que não foram ativadas com LPS. (B) Frequência de células positivas para CD14 que foram ativadas com LPS. (C) Intensidade mediana de fluorescência de CD14 em células não ativadas com LPS. (D) Intensidade mediana de fluorescência de CD14 em células ativadas com LPS. ST- sobrenadante tumoral.

FONTE: CECHIM (2011)

A expressão da molécula CD80 foi analisada considerando a sua função de molécula co-estimuladora no processo de linfoestimulação. Sabe-se que a sua expressão é baixa em DCs imaturas e aumenta com a maturação dessas células.

Nas culturas tratadas com o sobrenadante da linhagem U87MG, a variação da expressão do marcador em termos de porcentagem de células positivas pode ser notada nas culturas que receberam o sobrenadante desde o dia zero (figura 10 A) e nas culturas tratadas no dia 6 que receberam também ativação por LPS, tanto em termos de porcentagem de células positivas quanto em relação a intensidade mediana de fluorescência (figura 10 B e D).

Nas culturas tratadas com sobrenadante da linhagem A172 a variação da expressão de CD80 não ter sido afetada com o tratamento (figura 11).

As variações descritas não atingiram significância estatística.

Figura 14 – Efeito do sobrenadante da linhagem U87MG sobre a expressão de CD80.

(A) Frequência de células positivas para CD80 que não foram ativadas com LPS. (B) Frequência de células positivas para CD80 que foram ativadas com LPS. (C) Intensidade mediana de fluorescência de CD80 em células não ativadas com LPS. (D) Intensidade mediana de fluorescência de CD80 em células ativadas com LPS no dia 5 da cultura. ST- sobrenadante tumoral.

FONTE: CECHIM (2011)

Figura 15 – Efeito do sobrenadante da linhagem A172 sobre a expressão de CD80 .

(A) Frequência de células positivas para CD80 que não foram ativadas com LPS. (B) Frequência de células positivas para CD80 que foram ativadas com LPS. (C) Intensidade mediana de fluorescência de CD80 em células não ativadas com LPS. (D) Intensidade mediana de fluorescência de CD80 em células ativadas com LPS no dia 5 da cultura. ST- sobrenadante tumoral.

FONTE: CECHIM (2011)

Já a expressão de CD86 outra molécula co-estimuladora assim como CD80 teve seu comportamento avaliado.

CD86 parece ter sido afetado de maneira semelhante, tanto pelo sobrenadante de U87MG quanto de A172, tanto em termos de porcentagem de células positivas quanto em relação a MFI nas culturas tratadas a partir do dia zero e não ativadas por LPS (figura 12 A e C; figura 13 A e C). Ainda nas culturas não ativadas com LPS e tratadas com sobrenadante de U87MG a partir do dia 5 da cultura, é possível observar uma discreta modulação negativa de CD86 (figura 12 A e C), enquanto que nas culturas ativadas com LPS, é possível observar o efeito oposto (figura 12 B e D). Nas culturas tratadas no dia 6 essa modulação parece ocorrer de maneira negativa (figura 12 A e C) quando não há ativação por LPS, porém quando há ativação parece ocorrer uma modulação negativa na molécula (figura 12 B e D).

Nas culturas tratadas com sobrenadante da linhagem A172 desde o dia zero e ativadas com LPS, é possível notar uma discreta diminuição no MFI das culturas tratadas, figura 13 D.

As variações observadas não são estatisticamente significativas.

Figura 16 – Efeito do sobrenadante da linhagem U87MG sobre a expressão de CD86.

(A) Frequência de células positivas para CD86 que não foram ativadas com LPS. (B) Frequência de células positivas para CD86 que foram ativadas com LPS. (C) Intensidade mediana de fluorescência de CD86 em células não ativadas com LPS. (D) Intensidade mediana de fluorescência de CD86 em células ativadas com LPS no dia 5 da cultura. ST- sobrenadante tumoral.

FONTE: CECHIM (2011)

Figura 17 – Efeito do sobrenadante da linhagem A172 sobre a expressão de CD86.

(A) Frequência de células positivas para CD86 que não foram ativadas com LPS. (B) Frequência de células positivas para CD86 que foram ativadas com LPS. (C) Intensidade mediana de fluorescência de CD86 em células não ativadas com LPS. (D) Intensidade mediana de fluorescência de CD86 em células ativadas com LPS no dia 5 da cultura. ST- sobrenadante tumoral.

FONTE: CECHIM (2011)

A avaliação da molécula CD83 após o tratamento com o sobrenadante tumoral da linhagem U87MG, demonstrou que, em pequena proporção, tanto em termos de porcentagem de células positivas quanto em relação ao MFI parece ocorrer uma discreta modulação negativa nas culturas tratadas a partir do dia zero e ativadas com LPS (figura 14 B e D). Ainda nas culturas ativadas, é possível verificar uma pequena elevação da porcentagem de células positivas quando o tratamento foi adicionado no dia 5 da cultura, figura 14 B. Já nas culturas que receberam o sobrenadante no dia 6 apresentam uma tendência a diminuição na porcentagem de células enquanto o MFI apresente uma tendência ao aumento (figura 14 B e D).

Nas culturas que não receberam LPS no quinto dia, é possível notar pequenos aumentos na porcentagem de células positivas nas culturas tratadas nos dias 5 e 6, (figura 14 A).

Quando as culturas foram tratadas com o sobrenadante tumoral da linhagem A172, a expressão da molécula CD83 parece sofrer uma regulação negativa em pequena proporção tanto em termos de porcentagem de células positivas quanto em relação a MFI nas culturas tratadas no dia seis independente de ativação (figura 15 A e B). O MFI das culturas tratadas no dia seis que receberam ativação também parece seguir essa tendência (figura 15 D). Nas culturas ativadas com LPS e tratadas com o sobrenadante a partir do dia zero, é possível notar uma tendência ao aumento desse marcador com relação as células não tratadas (figura 15 B e D).

O s testes estatísticos aplicados não alcançaram significância.

Figura 18 – Efeito do sobrenadante da linhagem U87MG sobre a expressão de CD83.

(A) Frequência de células positivas para CD83 que não foram ativadas com LPS. (B) Frequência de células positivas para CD83 que foram ativadas com LPS. (C) Intensidade mediana de fluorescência de CD83 em células não ativadas com LPS. (D) Intensidade mediana de fluorescência de CD83 em células ativadas com LPS no dia 5 da cultura. ST- sobrenadante tumoral.

FONTE: CECHIM (2011)

Figura 19 – Efeito do sobrenadante da linhagem A172 sobre a expressão de CD83.

(A) Frequência de células positivas para CD83 que não foram ativadas com LPS. (B) Frequência de células positivas para CD83 que foram ativadas com LPS. (C) Intensidade mediana de fluorescência de CD83 em células não ativadas com LPS. (D) Intensidade mediana de fluorescência de CD83 em células ativadas com LPS no dia 5 da cultura. ST- sobrenadante tumoral.

FONTE: CECHIM (2011)

A possível influência do tratamento com o sobrenadante tumoral sobre a expressão da molécula CD274 ou PD-L1, foi analisada.

Nos experimentos é possível notar apenas uma pequena tendência de elevação da expressão de CD274 em termos de MFI das culturas que foram ativadas com LPS e expostas ao sobrenadante de U87MG desde o dia zero (figura 16 D). Uma discreta tendência a elevação do marcador também pode ser notada, no MFI das culturas tratadas com sobrenadante em todos os tempos e não ativadas com LPS (figura 16 C).

Já nas culturas expostas ao sobrenadante da linhagem A172, é possível notar uma propensão ao declínio da porcentagem de células que expressam CD274.

Os testes estatísticos aplicados as amostras não apresentam significância.

Figura 20 – Efeito do sobrenadante da linhagem U87MG sobre a expressão de CD274.

(A) Frequência de células positivas para CD274 que não foram ativadas com LPS. (B) Frequência de células positivas para CD274 que foram ativadas com LPS. (C) Intensidade mediana de fluorescência de CD274 em células não ativadas com LPS. (D) Intensidade mediana de fluorescência de CD274 em células ativadas com LPS no dia 5 da cultura. ST- sobrenadante tumoral.

FONTE: CECHIM (2011)

Figura 21 – Efeito do sobrenadante da linhagem A172 sobre a expressão de CD274

(A) Frequência de células positivas para CD274 que não foram ativadas com LPS. (B) Frequência de células positivas para CD274 que foram ativadas com LPS. (C) Intensidade mediana de fluorescência de CD274 em células não ativadas com LPS. (D) Intensidade mediana de fluorescência de CD274 em células ativadas com LPS no dia 5 da cultura. ST- sobrenadante tumoral.

FONTE: CECHIM (2011)

Na avaliação da expressão da molécula CD11b nas culturas tratadas com o sobrenadante da linhagem U87MG, é possível observar uma tendência a modulação negativa na porcentagem de células nas culturas tratadas desde o dia zero e no dia 6 e não ativadas com LPS (figura 18 A). Tal efeito também pode ser notado no MFI dessas culturas em todos os tempos (figura 18 C). Já nas culturas ativadas com LPS, nota-se uma tendência a diminuição da porcentagem de células positivas de maneira dose dependente (figura 18 B). Em relação ao MFI, uma propensão a regulação negativa da molécula pode ser notada nas culturas tratadas a partir do dia 5 enquanto nas culturas tratadas no dia 6 é possível observar o efeito oposto (figura 18 D).

Quando as culturas foram expostas ao sobrenadante da linhagem A172 é possível observar uma discreta propensão ao decréscimo no MFI das culturas tratadas a partir do dia zero e não ativadas por LPS (figura 19 C). Com relação as culturas que receberam ativação de LPS, é válido notar um modesto aumento na porcentagem de células positivas para esse marcador nas culturas tratadas a partir do dia zero (figura 19 B), enquanto nas culturas tratadas no dia 6, tanto a porcentagem de células quanto o MFI parecem ter sido influenciados negativamente pelo sobrenadante (figura 19 D).

As variações descritas não foram significantes estatisticamente.

Figura 22 – Efeito do sobrenadante da linhagem U87MG sobre a expressão de CD11b.

(A) Frequência de células positivas para CD11b que não foram ativadas com LPS. (B) Frequência de células positivas para CD11b que foram ativadas com LPS. (C) Intensidade mediana de fluorescência de CD11b em células não ativadas com LPS. (D) Intensidade mediana de fluorescência de CD11b em células ativadas com LPS no dia 5 da cultura. ST- sobrenadante tumoral.

FONTE: CECHIM (2011)

Figura 23 – Efeito do sobrenadante da linhagem A172 sobre a expressão de CD11b.

(A) Frequência de células positivas para CD11b que não foram ativadas com LPS. (B) Frequência de células positivas para CD11b que foram ativadas com LPS. (C) Intensidade mediana de fluorescência de CD11b em células não ativadas com LPS. (D) Intensidade mediana de fluorescência de CD11b em células ativadas com LPS no dia 5 da cultura. ST- sobrenadante tumoral.

FONTE: CECHIM (2011)

4.3 – Efeito do tratamento com sobrenadante tumoral sobre a expressão do gene C3 em células mononucleares aderentes diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos de doadores saudáveis.

Células mononucleares aderentes de doadores saudáveis foram diferenciadas *in vitro* durante 7 dias na presença de IL-4 e GM-CSF. O sobrenadante tumoral das linhagens de glioblastoma multiforme humano U87MG ou A172 foi adicionado a partir do dia zero, no dia cinco ou seis da cultura em duas diferentes proporções: 25 ou 50% do volume total do poço da placa de cultura de seis poços. No quinto dia, determinadas culturas receberam LPS a fim de promover a ativação das DCs. No dia 7 da cultura celular, as células foram retiradas da placa e a extração do RNA total foi executada através da utilização de Trizol. Após a quantificação do RNA, o cDNA correspondente foi sintetizado e por fim a reação de PCR em Tempo Real foi executada.

4.3.1 Tratamento com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG desde o dia zero da cultura celular.

É possível observar que o tratamento com o sobrenadante tumoral parece promover um aumento na expressão do gene C3 quando comparado com as células não expostas ao sobrenadante (figura 20 A e B). Nas culturas não ativadas com LPS, o aumento parece ser proporcional a quantidade de sobrenadante adicionado (figura 20 A). As variações não apresentam significância estatística.

Figura 24 – Expressão relativa do gene C3 em células mononucleares aderentes diferenciadas *in vitro* por 7 dias e expostas ao sobrenadante proveniente da linhagem U87M a partir do dia zero da cultura celular.

(A) Cultura não ativada com LPS no dia 5. (B) Cultura ativada com LPS no dia 5. Os resultados correspondem a 3 experimentos executados com sangue proveniente de diferentes doadores. A linha tracejada corresponde à expressão de células não expostas ao sobrenadante tumoral. ST- sobrenadante tumoral.

FONTE: CECHIM (2011)

4.3.2 Tratamento com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG no dia cinco da cultura celular.

Quando o sobrenadante foi adicionado nas culturas a partir do dia cinco, foi possível observar uma queda, não significativa, nos níveis de expressão de C3 quando comparado com as culturas não tratadas (figura 21 A e B).

Figura 25 - Expressão relativa do gene C3 em células mononucleares aderentes diferenciadas *in vitro* por 7 dias e expostas ao sobrenadante proveniente da linhagem U87MG a partir do dia cinco da cultura.

(A) Cultura não ativada com LPS no dia 5. (B) Cultura ativada com LPS no dia 5. Os resultados correspondem a 3 experimentos executados com sangue proveniente de diferentes doadores. A linha tracejada corresponde à expressão de células não expostas ao sobrenadante tumoral. ST-sobrenadante tumoral.

FONTE: CECHIM (2011)

4.3.3 Tratamento com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG no dia seis da cultura celular.

A expressão do gene *C3* parece ter sido negativamente regulada, mas de maneira não significativa, pelo tratamento de 25% de sobrenadante tumoral tanto nas culturas ativadas com LPS quanto naquelas em que não ocorreu a ativação (figura 22 A e B). Já com o tratamento de 50% de sobrenadante, a cultura ativada com LPS parece ter tido sua expressão afetada positivamente, enquanto que a cultura não ativada apresentou uma redução na expressão de *C3* (figura 22 A e B). As variações apresentadas não atingiram significância estatística

Figura 26 - Expressão relativa do gene *C3* em células mononucleares aderentes diferenciadas *in vitro* por 7 dias e expostas ao sobrenadante proveniente da linhagem U87MG no dia seis da cultura.

(A) Cultura não ativada com LPS no dia 5. (B) Cultura ativada com LPS no dia 5. Os resultados correspondem a 3 experimentos executados com sangue proveniente de diferentes doadores. A linha tracejada corresponde à expressão de células não expostas ao sobrenadante tumoral.

FONTE: CECHIM (2011)

4.3.4 Tratamento com sobrenadante tumoral proveniente da linhagem A172 desde o dia zero da cultura celular.

O tratamento com o sobrenadante tumoral, nas duas proporções, nas culturas não ativadas por LPS, pareceu promover uma redução na expressão do gene *C3* quando comparado com as células não expostas ao sobrenadante (figura 23 A). Já nas culturas que receberam ativação por LPS, o tratamento com 25% de sobrenadante mostrou um efeito semelhante ao observado nas culturas não ativadas com LPS. Já a proporção de 50% parece ter promovido um aumento na expressão do gene *C3*. Os testes estatísticos aplicados não mostraram significância estatística.

Figura 27 - Expressão relativa do gene *C3* em células mononucleares aderentes diferenciadas *in vitro* por 7 dias e expostas ao sobrenadante proveniente da linhagem A172 desde o dia zero da cultura.

(A) Cultura não ativada com LPS no dia 5. (B) Cultura ativada com LPS no dia 5. Os resultados correspondem a 2 experimentos executados com sangue proveniente de diferentes doadores. A linha tracejada corresponde à expressão de células não expostas ao sobrenadante tumoral.

FONTE: CECHIM (2011)

4.3.5 Tratamento com sobrenadante tumoral proveniente da linhagem A172 no dia cinco da cultura celular.

É possível observar nos gráficos que o tratamento com o sobrenadante tumoral nas culturas não ativadas por LPS, parece promover uma redução na expressão do gene *C3* quando comparado com as células não expostas ao sobrenadante, independente da quantidade de sobrenadante (figura 24 A). Nas culturas que receberam ativação por LPS, o tratamento com 25% de sobrenadante mostrou um efeito oposto ao observado nas culturas não ativadas com LPS (figura 24 B). Já a proporção de 50% de sobrenadante nas culturas ativadas com LPS, parece ter afetado a expressão do gene *C3* da mesma maneira que nas culturas não ativadas (figura 24 B). As análises estatísticas não apresentaram significância.

Figura 28 - Expressão relativa do gene *C3* em células mononucleares aderentes diferenciadas *in vitro* por 7 dias e expostas ao sobrenadante proveniente da linhagem A172 no dia cinco da cultura.

(A) Cultura não ativada com LPS no dia 5. (B) Cultura ativada com LPS no dia 5. Os resultados correspondem a 2 e 3 experimentos, respectivamente, executados com sangue proveniente de diferentes doadores. A linha tracejada corresponde à expressão de células não expostas ao sobrenadante tumoral.

FONTE: CECHIM (2011)

4.3.6 Tratamento com sobrenadante tumoral proveniente da linhagem A172 no dia seis da cultura celular.

A expressão do gene *C3* não parece ter sido modificada pelo tratamento de 25% de sobrenadante tumoral nas culturas não ativadas com LPS (figura 25 A). A adição de 50% de sobrenadante nessas culturas parece ter um discreto efeito modulatório negativo na expressão de *C3* (figura 25 A). Nas culturas ativadas com LPS, o tratamento parece ter afetado positivamente a expressão do gene (figura 25 B).

Figura 29 - Expressão relativa do gene *C3* em células mononucleares aderentes diferenciadas *in vitro* por 7 dias e expostas ao sobrenadante proveniente da linhagem A172 no dia seis da cultura.

(A) Cultura não ativada com LPS no dia 5. (B) Cultura ativada com LPS no dia 5. Os resultados correspondem a um experimento. A linha tracejada corresponde à expressão de células não expostas ao sobrenadante tumoral.

FONTE: CECHIM (2011)

4.4 Efeito do sobrenadante tumoral cultivado por 24h em meio sem SFB sobre o fenótipo de células mononucleares aderentes diferenciadas *in vitro*.

Os experimentos que seguem, foram executados com o objetivo de testar uma possível influência dos componentes do SFB sobre os resultados de expressão do gene *C3*. Para tanto, as culturas de U87MG, após entrar em confluência, e de monócitos, após seis dias, permaneceram por 24h em meio de cultura RPMI-1640 sem SFB, e após esse período os sobrenadantes foram colhidos para os experimentos de tratamento. O sobrenadante de cultura primária de monócito foi utilizado como controle de especificidade do sobrenadante tumoral. Os experimentos foram executados conforme descrição do item 4.2.

Os tratamentos com o sobrenadante tumoral parecem exercer um efeito modulatório positivo sobre a porcentagem de células que expressam CD14 (figura 26 A); já em termos de MFI, observa-se uma discreta diminuição (figura 26 B). Quando as culturas foram expostas ao sobrenadante não tumoral houve um aumento significativo ($P < 0,05$) na porcentagem de células positivas para o marcador em ambos os tempos de tratamento (figura 26 C). O MFI parece seguir uma discreta tendência ao decréscimo (figura 26 D).

Figura 30 – Efeito dos sobrenadantes sobre a expressão de CD14.

(A) Frequência de células positivas para CD14 que foram tratadas com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG. (B) Intensidade mediana de fluorescência de CD14 em células que foram tratadas com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG. (C) Frequência de células positivas para CD14 que foram tratadas com sobrenadante proveniente de cultura primária de monócitos. (D) Intensidade mediana de fluorescência de CD14 em células que foram tratadas com sobrenadante proveniente de cultura primária de monócitos. ST- sobrenadante tumoral. SM – sobrenadante de monócito.

FONTE: CECHIM (2011)

É possível verificar na figura 27 A, B, C e D que os tratamentos com os diferentes sobrenadantes parecem não ter afetado a expressão da molécula CD80.

Figura 31 – Efeito dos sobrenadantes sobre a expressão de CD80

(A) Frequência de células positivas para CD80 que foram tratadas com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG. (B) Intensidade mediana de fluorescência de CD80 em células que foram tratadas com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG. (C) Frequência de células positivas para CD80 que foram tratadas com sobrenadante proveniente de cultura primária de monócitos. (D) Intensidade mediana de fluorescência de CD80 em células que foram tratadas com sobrenadante proveniente de cultura primária de monócitos. ST- sobrenadante tumoral. SM – sobrenadante de monócito.

FONTE: CECHIM (2011)

É possível notar uma propensão das culturas expostas aos sobrenadantes de diminuição do MFI quando comparadas com as células não tratadas. As análises estatísticas não indicaram significância.

Figura 32 – Efeito dos sobrenadantes sobre a expressão de CD86.

(A) Frequência de células positivas para CD86 que foram tratadas com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG. (B) Intensidade mediana de fluorescência de CD86 em células que foram tratadas com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG. (C) Frequência de células positivas para CD86 que foram tratadas com sobrenadante proveniente de cultura primária de monócitos. (D) Intensidade mediana de fluorescência de CD86 em células que foram tratadas com sobrenadante proveniente de cultura primária de monócitos. ST- sobrenadante tumoral. SM – sobrenadante de monócito.

FONTE: CECHIM (2011)

No gráfico A da figura 29 é possível observar que o tratamento desde o dia zero com o sobrenadante tumoral, parece ter exercido um discreto efeito negativo sobre a porcentagem de células positivas para o marcador, enquanto que a intensidade mediana de fluorescência parece ter sido afetada, também de maneira negativa, em ambos os tempos e tratamentos, também de maneira discreta (figura 29 B e D). Já a exposição ao sobrenadante não tumoral parece ter afetado, sutilmente, e de maneira negativa, o MFI das culturas.

Figura 33 – Efeito dos sobrenadantes sobre a expressão de CD83.

(A) Frequência de células positivas para CD83 que foram tratadas com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG. (B) Intensidade mediana de fluorescência de CD83 em células que foram tratadas com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG. (C) Frequência de células positivas para CD83 que foram tratadas com sobrenadante proveniente de cultura primária de monócitos. (D) Intensidade mediana de fluorescência de CD83 em células que foram tratadas com sobrenadante proveniente de cultura primária de monócitos. ST- sobrenadante tumoral. SM – sobrenadante de monócito.

FONTE: CECHIM (2011)

Após os tratamentos com os sobrenadantes, a expressão da molécula CD274, foi analisada. Nos experimentos não é possível notar variações nem quanto a porcentagem de células positivas nem com relação ao MFI.

Figura 34 – Efeito dos sobrenadantes sobre a expressão de CD274.

A) Frequência de células positivas para CD274 que foram tratadas com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG. (B) Intensidade mediana de fluorescência de CD274 em células que foram tratadas com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG. (C) Frequência de células positivas para CD274 que foram tratadas com sobrenadante proveniente de cultura primária de monócitos. (D) Intensidade mediana de fluorescência de CD274 em células que foram tratadas com sobrenadante proveniente de cultura primária de monócitos. ST- sobrenadante tumoral. SM – sobrenadante de monócito.

FONTE: CECHIM (2011)

Não é possível observar variações nas culturas tratadas seja com sobrenadante tumoral, seja com sobrenadante controle.

Figura 35 – Efeito dos sobrenadantes sobre a expressão de CD11b.

(A) Frequência de células positivas para CD11b que foram tratadas com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG. (B) Intensidade mediana de fluorescência de CD11b em células que foram tratadas com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG. (C) Frequência de células positivas para CD11b que foram tratadas com sobrenadante proveniente de cultura primária de monócitos. (D) Intensidade mediana de fluorescência de CD11b em células que foram tratadas com sobrenadante proveniente de cultura primária de monócitos. ST- sobrenadante tumoral. SM – sobrenadante de monócito.

FONTE: CECHIM (2011)

4.5 Efeito do tratamento com sobrenadantes sobre a expressão do gene C3 em células mononucleares aderentes diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos de doadores saudáveis.

É possível observar que os tratamentos sejam com o sobrenadante tumoral ou com sobrenadante de monócito, exerceram efeitos muito semelhantes sobre a expressão do gene C3 (figura 32 A, B, C e D). Nas culturas tratadas desde o dia zero com 37% de sobrenadante, observa-se um efeito similar independente da origem do sobrenadante (figura 32 A, B e C). Quando adicionou-se 25% de sobrenadante, observa-se efeitos opostos: o sobrenadante tumoral promove um discreto aumento enquanto o sobrenadante não tumoral promove um decréscimo da expressão de C3 (figura 32 A, B e D). Quando 25% dos sobrenadantes foram adicionados as culturas no dia 5, é possível observar um efeito não específico de aumento da expressão do gene (figura 32 B e D), enquanto que 37% de sobrenadante promove um discreto aumento – sobrenadante tumoral - e também, uma pequena redução – sobrenadante controle. As variações apresentadas não apresentam significância estatística.

Figura 36 – Expressão relativa do gene *C3* em células mononucleares aderentes diferenciadas *in vitro* por 7 dias e expostas a sobrenadantes.

(A) Culturas tratada com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG, desde o dia zero. (B) Culturas tratada com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG desde o dia cinco. (C) Culturas tratadas com sobrenadante de cultura primária de monócito, desde o dia zero. (D) Culturas tratadas com sobrenadante de cultura primária de monócito, desde o dia cinco. A linha tracejada corresponde à expressão de células não expostas à sobrenadantes.

FONTE: CECHIM (2011)

4.6 Efeito do tratamento com sobrenadantes sobre C3 intracelular em DCs diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos de doadores saudáveis.

Células mononucleares aderentes de doadores saudáveis foram diferenciadas *in vitro* durante 7 dias na presença de IL-4 e GM-CSF. As culturas foram tratadas com sobrenadante tumoral ou de cultura primária de monócito nos dias zero ou cinco em duas diferentes proporções: 25 ou 37% do volume total. No sétimo dia, as células foram marcadas intracelularmente para C3. A tabela representa o resultado de um experimento.

Tabela 3 – Efeito do tratamento com sobrenadantes sobre C3 intracelular.

	Dia zero			Dia cinco		
	S/tratamento	25%	37%	S/tratamento	25%	37%
Sobrenadante tumoral	12,20 %	2,51%	0,68%	12,20%	2,95%	0,98%
	1290,75	891,95	786,31	1290,75	822,33	902,31
Sobrenadante não tumoral	12,20%	0,82%	0,26%	12,20%	0,78%	1,59%
	1290,75	869,27	697,15	1290,75	914,31	957,33

Porcentagem de células positivas e MFI, das células expostas ou não a sobrenadantes a partir do dia zero ou no dia cinco da cultura celular.

FONTE: CECHIM (2011)

A análise da tabela 3 permite observar que os tratamentos com sobrenadantes, independentemente de sua origem, quantidade ou tempo em que foram adicionados, promoveram uma diminuição de C3 intracelular.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliou-se a influência de fatores solúveis do sobrenadante das culturas das linhagens tumorais dos gliomas humanos, A172 e U87MG, sobre DCs humanas diferenciadas *in vitro*. Nestas células foi avaliada a síntese da proteína do sistema complemento C3 e o fenótipo de membrana. Para tanto, foram utilizadas as técnicas de PCR em Tempo Real e citometria de fluxo. Na fenotipagem destas células observou-se a expressão tanto de marcadores associados à diferenciação – CD14 - bem como de marcadores relacionados ao sistema complemento – CD11b - e ao estado de maturação/ativação de células dendríticas – CD80, CD86, CD83 e CD274.

A hipótese de investigação era de que fatores solúveis secretados por tumores poderiam prejudicar o processo de diferenciação e maturação de DCs a partir de monócitos do sangue periférico. Considerando diversos estudos (PENG et al., 2006; PENG et al., 2009; SACKS, 2010) inclusive do nosso grupo (REIS et al., 2007b) que apontam a necessidade da proteína C3 para que os processos de diferenciação e maturação ocorram normalmente e que, frequentemente, tem sido relatadas alterações fenotípicas e funcionais de DCs associadas a neoplasias (BALEEIRO et al., 2008), hipotetizou-se que a oferta de C3 no microambiente tumoral poderia contribuir para o fenômeno. Embora a situação ideal fosse um estudo *in vivo* ou *ex vivo*, numa etapa inicial, verificou-se, *in vitro*, se os fatores solúveis contidos nos sobrenadantes das linhagens de GBM, mimetizariam as condições geradas *in vivo* no microambiente tumoral, afetando o fenótipo das DCs diferenciadas em sua presença e se, esta possível alteração estaria associada à diminuição da oferta de C3 para as células durante sua diferenciação e maturação.

Os resultados obtidos, apesar de preliminares, indicam que nas condições experimentais utilizadas, a hipótese não se confirma. Embora a exposição das células aos sobrenadantes tumorais durante seu processo de diferenciação tenha afetado o fenótipo de membrana das células e também afetado a síntese de C3 pelas mesmas, estas alterações não seguiram um padrão que leve à confirmação da hipótese, tendo sido muito variável o efeito observado.

Através da avaliação da expressão de marcadores de membrana por citometria de fluxo, foi possível verificar que ocorreu a diferenciação das células mononucleares aderentes em DCs. As células obtidas apresentam fenótipo compatível com o descrito na literatura (INABA et al., 1992; CAUX et al., 1994) apresentando alta expressão de marcadores como HLA-DR (>80%), HLA-ABC (>90%) e CD11c (>90%) – dados não mostrados.

Desde a primeira descrição das DCs feita por Steinman e Cohn (STEINMAN; COHN, 1973) até a possibilidade de geração de DCs *in vitro* através da cultura de células sanguíneas com GM-CSF e IL-4 (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994) esse tipo celular pode ser definido por sua morfologia típica (semelhante a uma estrela) e pela expressão de marcadores específicos que remetem a sua função de célula apresentadora de antígenos, como níveis elevados de moléculas de classe I e classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC), baixos níveis de CD14 e alta atividade estimuladora de linfócitos graças a expressão de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 (BANCHEREAU et al., 2000; THÉRY; AMIGORENA, 2001).

Como a cultura de células se inicia pelo processamento de sangue periférico em gradiente de ficoll e como o resultado desse processo é a obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), que após o processo de aderência, são enriquecidas para monócitos, células CD14+ (AUFFRAY et al., 2009), é possível utilizar como indicador de diferenciação dos mesmos em DCs, a queda na expressão da molécula CD14. Como esperado, nos experimentos realizados, esse marcador apresentou alta expressão nos dias iniciais da cultura e ao término da cultura, tem sua expressão bastante diminuída, indicando que tais células se diferenciaram em DCs.

Por outro lado, foi possível observar nas culturas tratadas com sobrenadante tumoral da linhagem U87MG, que a porcentagem das células positivas para CD14, apresentava-se elevada em relação à porcentagem de células positivas presente nas culturas controle. Isto ocorreu tanto nas culturas expostas ao ST desde o dia zero, quanto naquelas expostas apenas após o 5º dia, independentemente de ativação por LPS. Já quando o tratamento foi realizado com o sobrenadante da linhagem A172, o aumento na porcentagem de células positivas para CD14 também ocorreu, porém em proporções menores, e restrito às culturas não ativadas com LPS. Intrigantemente, este aumento da expressão de CD14 foi também observado em células diferenciadas na presença de sobrenadante de cultura de monócitos mantidos por 24h em meio de cultura sem SFB. Esta observação poderia ser interpretada como indicativa da presença de fatores capazes de afetar a expressão desta molécula em sobrenadantes de células “estressadas” (tumerais mantidas em meio padrão ou normais submetidas a uma deprivação de sinais de crescimento/nutrientes). Uma especulação possível neste ponto poderia levar em consideração o papel do CD14 na resposta imune inata (SAHA; GEISSMANN, 2011), cuja atividade “deveria” ser exacerbada, portanto, em

situações de estresse celular. Faltam, obviamente, porém, dados experimentais mais específicos que dêem suporte a esta especulação.

Uma explicação alternativa para o aumento da expressão de CD14 por células diferenciadas na presença do sobrenadante seria a de um bloqueio efetivo da diferenciação dos monócitos em DCs. Fenômeno semelhante foi observado pelo nosso grupo em pacientes com câncer de mama, cujos monócitos apresentam um déficit de diferenciação, associado a diminuição da expressão do receptor para IL-4 – CD124 (AZEVEDO-SANTOS, 2010). Assim, pode-se, novamente, especular que os ST seriam capazes de provocar esta diminuição de CD124 nas células a eles expostas ou, por outro lado, conteriam fatores capazes de antagonizar o efeito da IL-4.

Uma observação, presente na avaliação da expressão da molécula CD14, mas também, de modo geral, em todas as moléculas avaliadas, foi a grande variação dos níveis de expressão de cada molécula observados. DCs constituem uma população heterogênea que pode ser subdividida em diversas subpopulações (ITANO et al., 2003) desempenhando diferentes papéis na resposta imune e sofrendo influência dos mais diversos fatores, tornando, assim, muito difícil uma definição absoluta das subpopulações (UENO et al., 2007; LI; YOUNG-JUN 2007; NAIK, 2008).

Neste trabalho, é válido ressaltar, que não houve seleção especial para os doadores(as) das amostras de sangue, visto que, as células utilizadas foram resultado de coleta de plaquetas em aparelho específico em hospital especializado. Portanto, uma heterogeneidade natural (GRAGE-GRIEBENOW et al., 2001) era esperada nas amostras, uma vez que, os critérios estabelecidos para selecionar os doadores eram os mesmos utilizados para selecionar doadores de sangue convencionais. Além do mais, os monócitos, precursores das DCs (AUFFRAY et al., 2009) no modelo aqui usado, não foram selecionados e também foram expostos a fatores potencialmente produzidos por outros tipos celulares presentes na cultura durante o processo da diferenciação, como TNF, IL-3, IL-6, IL-10, IFNs, e cujos níveis podem variar de doador para doador. Assim, tem-se uma situação em que uma célula cuja função é detectar alterações em seu microambiente, está exposta a microambientes potencialmente variados, de modo que não é surpreendente encontra a heterogeneidade que se encontrou aqui e que já foi relatada em outros estudos (PULENDRAN et al., 2000; ITO et al., 2001).

Ilustrando bem esta variação de expressão, pode-se avaliar a expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, que parecem sofrer alterações variadas conforme o momento, quantidade e procedência do sobrenadante. Apesar desta grande variação, essas moléculas parecem ter sido moduladas negativamente, quando o ST esteve presente desde o início do processo de diferenciação.

Diversos trabalhos publicados demonstram a ação supressora de tumores sobre a expressão das moléculas co-estimuladoras nas DCs (HASEBE et al., 2000; GABRILOVICH, 2004). Sob o ponto de vista tumoral, parece ser bastante vantajoso impedir que a interação entre APCs e linfócitos ocorra plenamente e promova uma ação anti-tumoral, ao invés disso, induzir uma interação que resultará em um linfócito anérgico ou com função regulatória (ZOU, 2006; SCHMIDT et al., 2006) beneficiará a expansão tumoral. Tais efeitos podem estar sendo induzidos pelos fatores solúveis contidos no sobrenadante proveniente das culturas de linhagens tumorais.

Já na expressão da molécula CD83 obteve-se resultado paradoxal. Sua expressão foi modulada negativamente pelo ST da linhagem A172, e, condizendo com o esperado para uma molécula cuja expressão ocorre durante o processo de maturação das DCs, o efeito foi mais intenso quando este foi adicionado às culturas após a diferenciação inicial, isto é, no 6º dia de cultura. Por outro lado, o ST da linhagem U87MG teve efeito inverso, principalmente após estímulo com LPS. Este fato é intrigante e sugere uma diferença essencial entre os dois sobrenadantes, cuja natureza não se pode ainda definir.

As linhagens tumorais usadas no estudo são, ambas, derivadas de GBM humano. Entretanto, a linhagem A172, é descrita (cell lines) como não tumorigênica enquanto que a linhagem U87MG é tumorigênica em *nude mice*, o que vem sendo correlacionado com sua capacidade de formação de neuroesferas (BAO et al., 2006).

Outra molécula analisada, CD274 ou PD-L1, foi recentemente descrita como membro da família B7 que ao interagir com seu ligante PD-1 (CD279) no linfócito, promove uma regulação negativa da produção de citocinas e da proliferação tanto de linfócitos T CD4⁺ quanto de linfócitos T CD8⁺. Tal molécula parece sofrer uma modulação positiva em células tratadas com o sobrenadante da linhagem U87MG no sexto dia da cultura, o que parece condizente com o aumento da expressão de CD83 induzido por este mesmo ST, no mesmo tempo de cultura. Este fato poderia indicar uma indução simultânea de ativação e regulação da resposta, o que seria condizente com a capacidade de IFN- γ de aumentar a expressão de

PD-L1 (DONG et al., 2002; BLANK; MACKENSEN 2007). Por outro lado, o ST de A172, que foi capaz de provocar a diminuição da expressão de CD83, não teve efeito sobre a expressão da molécula reguladora, PD-L1.

Na análise da expressão de CD11b, molécula que conjuntamente com CD18 forma um dos receptores de C3 (CR3), apenas o ST de U87MG mostrou alguma atividade, principalmente nas células não tratadas com LPS, provocando diminuição de sua expressão. É interessante observar que este mesmo ST foi o que provocou o aumento da expressão de CD14. Estas observações poderiam indicar que, de fato, a diminuição da sinalização pelo CR3 estivesse envolvida com “deficiência” da diferenciação das DCs (sinalizada pelo aumento de CD14), o que estaria de acordo com o trabalho anteriormente publicado pelo nosso grupo (Reis et al., 2007b), que mostrou o papel de C3 na diferenciação de DCs a partir de monócitos. Por outro lado, há dados na literatura que indicam que C3 regula positivamente a expressão de CD14 em leucócitos (LAPPEGARD et al., 2009), o que pareceria paradoxal frente às observações aqui apresentadas. Todavia, é preciso notar que o trabalho analisou a expressão por leucócitos totais do sangue periférico, não DCs. Finalmente, ainda seria possível especular que a diminuição observada do CR3 não representasse, de fato, uma diminuição da presença deste receptor nas células, mas sim um mascaramento do mesmo por um excesso de C3 ou análogo, no ST de U87MG (o que seria condizente com a produção de C3 por células desta linhagem, que se constatou por PCR – dados não mostrados).

Em conjunto, os efeitos dos STs sobre o fenótipo de membrana das DCs diferenciadas em sua presença, mesmo que apenas indicados por tendências de variação, poderiam ser interpretados como indicadores de que a linhagem U87MG tem perfil mais “inflamatório” do que a linhagem A172. Muito especulativamente, isto poderia ser usado como explicação para sua maior tumorigenicidade em camundongos “*nude*”.

Com relação aos resultados de expressão de C3 através de PCR em tempo real, observou-se diminuição da expressão do gene C3 (nem sempre significativa) por células expostas ao ST de U87MG no 5º e 6º dias de cultura. Este mesmo sobrenadante teve efeito inverso quando adicionado desde o início das culturas (sobre monócitos, portanto). Por outro lado, o ST de A172 teve efeito inverso sobre monócitos (aumentando a expressão relativa de C3), semelhante no dia 5 e, novamente tendendo à oposição, no 6º dia (quando parece ter aumentado novamente a expressão relativa de C3).

É interessante, mais uma vez, notar a diferença entre os efeitos das duas linhagens tumorais sobre as células imunes. Entretanto, neste ponto, a linhagem A172 é a que parece ter mais efeito “inflamatório” (considerando-se o aumento da expressão de C3 como tal). Apesar da aparente contradição, é possível tentar conciliar as observações, concentrando-se a observação nos efeitos dos STs sobre os monócitos. Novamente, sobre estas células, a linhagem U87MG parece ser a capaz de provocar a resposta com maior potencial inflamatório (aumento da expressão de C3), enquanto a linhagem A172 parece fazer o inverso. Se, de fato, a inflamação contribui para a implantação do tumor (YOSHIMURA, 2006), estes dados seriam, novamente, coerentes com as observações aqui apresentadas. Novamente é necessário ressaltar que esta discussão tem caráter especulativo, uma vez que os dados experimentais não atingem significância estatística na maior parte das observações.

A série de experimentos realizados com sobrenadantes de culturas de células privadas de soro fetal por 24 h, não conseguiu esclarecer melhor os fenômenos. Eles foram realizados na tentativa de evitar uma “diluição” ou “mascaramento” de possíveis fatores produzidos pelas células tumorais, por fatores de crescimento presentes no SFB. Entretanto, os resultados indicaram que a deprivação de soro foi um tratamento por demais agressivo, que modificou o padrão de resposta induzido pelos STs.

Quanto à expressão de C3, a exposição das DCs e monócitos ao sobrenadante de células privadas de SFB, teve efeito pouco nítido, tendendo ao aumento da expressão gênica. Considerando C3 como uma proteína de estresse, acredita-se que a falta do SFB, possa provocar efeitos devido ao estado causado às células de privação de nutrientes promovendo assim um aumento de C3 que estaria sinalizando um estado de estresse celular.

A respeito dos resultados das culturas tratadas com sobrenadante proveniente de cultura primária de monócitos, é válido ressaltar que tal sobrenadante foi utilizado com o intuito de estabelecer um controle e provar a especificidade do sobrenadante de origem tumoral. Entretanto, o controle verdadeiramente adequado, seria um sobrenadante originário de uma cultura de células primárias humanas de glia, o que não é viável; sendo assim, devido à facilidade de obtenção e proximidade com o sistema experimental, optou-se por utilizar o sobrenadante de cultura primária de monócito como controle.

Intrigantemente, o sobrenadante controle demonstrou ação equivalente ao do sobrenadante tumoral. Tal ação também se reproduziu em experimento realizado para medição de C3 intracelular, através de marcação intracelular para citometria de fluxo. Apesar das dificuldades técnicas, resultados preliminares (n=1), demonstraram uma redução na produção de C3 (em claro contraste com o resultado da análise da expressão gênica por PCR quantitativo) pelas células tratadas com ambos os sobrenadantes, sendo que o de origem não tumoral parece ter tido um efeito redutor de C3 maior que o sobrenadante tumoral.

O decréscimo da proteína C3 intracelular poderia ser atribuído a um mecanismo descrito até então somente macrófagos na ocasião de fagocitose de células apoptóticas. Tal mecanismo promove uma supressão de IL-12 através do contato célula-célula, no caso macrófago – célula apoptótica. Este mecanismo evita uma reação inflamatória em uma situação fisiológica como é o *clearance* de células apoptóticas (KIM; ELKON; MA, 2004). Em vista disso, poderia se supor que tal mecanismo também ocorre com DCs e que devido a privação de SFB nas culturas fragmentos de células apoptóticas e/ou fatores liberados por essas estariam induzindo tal supressão e assim sinalizando à DC a não-necessidade de síntese dessa proteína de estresse C3 (o que, no entanto, não foi exatamente o observado, uma vez que o que se notou foi a diminuição da proteína, mas não do mRNA de C3).

Em conclusão, portanto, os resultados aqui apresentados mostram que sobrenadantes de linhagens de gliomas humanos têm efeitos muito heterogêneos sobre monócitos e células dendríticas diferenciadas *in vitro* a partir destas células. A hipótese inicial do projeto, que pretendia encontrar uma correlação direta entre os efeitos destes sobrenadantes e a produção de C3 pelas células a eles expostas não se confirmou. Todavia, estes mesmos resultados não permitem que se exclua completamente a hipótese, havendo sugestão de que, em determinadas situações, há correlação entre o fenótipo de membrana das células e sua produção de C3. Além do mais, uma série de observações sugere que a capacidade “inflamatória” de uma das linhagens, avaliada indiretamente por seus efeitos sobre monócitos e DCs, possa estar correlacionada à tumorigenicidade a ela atribuída na literatura.

6 CONCLUSÕES

Embora os resultados obtidos não tenham atingido significância estatística eles indicam que:

- O tratamento de culturas de células mononucleares aderentes com sobrenadante tumoral influencia o fenótipo de membrana das células DCs delas derivadas.
- O sobrenadante tumoral de U87MG parece exercer uma ação modulatória tardia – a partir do dia 5 - e negativa sobre a expressão do gene C3 em cultura de células mononucleares aderentes diferenciadas *in vitro*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em: < <http://www.cancer.org> >. Acesso em: 07 out. 2011.

AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY. Disponível em: < <http://www.asco.org> >. Acesso em: 05 out. 2011.

AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GEISSMANN, F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v.27, p. 669-92, 2009.

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

BALEIRO, 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, 2008.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 19, p. 245-252, 1998.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y. J.; PULENDRA, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 767-811, 2000.

BAO, S.; WU, Q.; MCLENDON, R. E.; HAO, Y.; SHI, Q.; HJELMELAND, A.; DEWHIRST, M. W.; BIGNER, D. D.; RICH, J. N. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. **Nature**, p. 756–760, 2006.

BARBUTO, J. A.; ENSINA, L. F.; NEVES, A. R.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; 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.

BARRINGTON, R. A.; POZDNYAKOVA, O.; ZAFARI, M. R.; BENJAMIN, C. D.; CARROLL, M. C. B lymphocyte memory: role of stromal cell complement and FcγRIIB receptors. **J. Exp. Med.**, v. 196, p.1189–1199, 2002.

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

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

BLEYER, A.; BARR, R.; HAYES-LATTIN, B.; THOMAS, D.; ELLIS, C.; ANDERSON, B. Biology and Clinical Trials Subgroups of the US National Cancer Institute Progress Review Group in Adolescent and Young Adult Oncology. The distinctive biology of cancer in adolescents and young adults. **Nat. Rev. Cancer.**, v.8, p. 288-98, 2008.

BOTTO, M.; LISSANDRINI, D.; SORIO, C.; WALPORT, M. J. Biosynthesis and secretion of complement component (C3) by activated human polymorphonuclear leukocytes. **J. Immunol.**, v. 15, p.1348-55, 1992.

BRASOVEANU, L. I.; ALTOMONTE, M.; FONSATTI, E.; COLIZZI, F.; CORAL, S.; NICOTRA, M. R.; CATTAROSSO, I.; CATTELAN, A.; NATALI, P. G.; MAIO, M. Levels of cell membrane CD59 regulate the extent of complement-mediated lysis of human melanoma cells. **Lab. Invest.**, v. 74, p. 33-42, 1996.

BURNET, F. M. The concept of immunological surveillance. **Prog. Exp. Tumor. Res.**, v. 13, p. 1-27, 1970.

BURNET, F. M. Cancer - a biological approach. **British Medical Journal.**, p.841-847, 1957.

CALICH, V.; VAZ, C. Imunologia. 2009. 2ªed. Rio de Janeiro, Revinter. 323p.

CARROLL, M. C. The complement system in regulation of adaptive immunity. **Nat. Immunol.**, v. 5, p. 981-986, 2004.

CAUX, C.; MASSACRIER, C.; VANBERVLIET, B.; DUBOIS, B.; VAN KOOTEN, C.; DURAND, I.; BANCHEREAU, J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 1263-1272, 1994.

CELL LINES. Disponível em: < <http://www.cell-lines-service.de>>. Acesso em: 16 nov. 2011.

CHAKRABORTY, A.; LI, L.; CHAKRABORTY, N. G.; MUKHERJI, B. Stimulatory and inhibitory differentiation of human myeloid dendritic cells. **Clin. Immunol.**, v. 94, p. 88-98, 2000.

COTENA, A.; MAINA, V.; SIRONI, M.; BOTTAZZI, B.; JEANNIN, P.; VECCHI, A.; CORVAIA, N.; DAHA, M. R.; MANTOVANI, A.; GARLANDA, C. Complement dependent amplification of the innate response to a cognate microbial ligand by the long pentraxin PTX3. **J. Immunol.**, v. 179, p. 6311-6317, 2007.

DA COSTA, L. F. T. Return of de-differentiation: why cancer is a developmental disease. **Curr. Opinion Oncol.**, v. 13, p. 58–62, 2001.

DE ANGELIS, L. M.; GUTIN, P. H.; LEIBEL, S. A.; POSNER, J. B. **Intracranial tumors: diagnosis and treatment.** 2002. United Kingdom. Martin Dunitz. xxp.

DE VLEESCHOUWER, S.; RAPP, M.; SORG, R. V.; STEIGER, H. J.; STUMMER, W.; VAN GOOL, S.; SABEL, M. Dendritic cell vaccination in patients with malignant gliomas: current status and future directions. **Neurosurgery.** v. 59, p. 988-999, 2006.

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.

DEMPSEY, P.W.; ALLISON, M.E.; AKKARAJU, S.; GOODNOW, C.C.; FEARON, D.T. C3d of Complement as a Molecular Adjuvant: Bridging Innate and Acquired Immunity. **Science.** v. 271, p. 348-350, 1996.

DIDENKO, V. V.; NGO, H. N.; MINCHEW, C.; BASKIN, D. S. Apoptosis of T lymphocytes invading glioblastomas multiforme: a possible tumor defense mechanism. **J. Neurosurg.**, v. 96, p. 580-584, 2002.

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

DRANOFF G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 4, p. 11-22, 2004.

EHRlich, P. Über den jetzigen stand der karzinomforschung. **Ned. Tijdschr. Geneesk.**, v. 5, p. 273–290, 1909.

FACCIABENE, A.; PENG, X.; HAGEMANN, I.S.; BALINT, K.; BARCHETTI, A.; WANG, L.P.; GIMOTTY, P.A.; GILKS, C.B.; LAL, P.; ZHANG, L.; COUKOS, G. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. **Nature.** v. 13, p. 226-230, 2011.

FECCI, P. E.; MITCHELL, D. A.; ARCHER, G. E.; MORSE, M. A.; LYERLY, H. K.; BIGNER, D. D.; SAMPSON, J. H. The history, evolution, and clinical use of dendritic cell-based immunization strategies in the therapy of brain tumors. **J. Neurooncol.**, v. 64, p. 161-176, 2003.

FISHELSON, Z.; DONIN, N.; ZELL, S.; SCHULTZ, S.; KIRSCHFINK, M. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. **Mol. Immunol.**, v. 40, p. 109-23, 2003.

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.

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

GANCZ, D.; FISHELSON, Z. Cancer resistance to complement-dependent cytotoxicity (CDC): Problem-oriented research and development. **Mol. Immunol.**, v. 46, p. 2794-2800, 2009.

GILLIET, M.; CAO, W.; LIU, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 594-606, 2008.

GLOBOCAN. Disponível em: < [http:// www.globocan.iarc.fr](http://www.globocan.iarc.fr) >. Acesso em: 02 out. 2011.

GORGANI, N. N.; HE, J. Q.; KATSCHKE, K. J.; HELMY, K. Y.; XI, H.; STEFFEK, M.; HASS, P. E.; VAN LOOKEREN; CAMPAGNE, M. Complement receptor of the Ig superfamily enhances complement-mediated phagocytosis in a subpopulation of tissue resident macrophages. **J. Immunol.**, v. 181, p. 7902-7908, 2008.

GOTTFRIED, E.; KREUTZ, M.; MACKENSEN, A. Tumor-induced modulation of dendritic cell function. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 19, p. 65-77, 2008.

GOUSIAS, K.; MARKOU, M.; ARZOGLOU, V.; VOULGARIS, S.; VARTHOLOMATOS, G.; KOSTOULA, A.; VOULGARI, P.; POLYZOIDIS, K.; KYRITSIS, A. P. Frequent abnormalities of the immune system in gliomas and correlation with the WHO grading system of malignancy. **J. Neuroimmunol.**, v. 226, p. 136-42, 2010.

GRANUCCI, F.; ZANONI, I.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 65, p. 1683-1697, 2008.

GRAGE-GRIEBENOW E; FLAD H. D; ERNST M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. **J. Leukoc. Biol.**, v. 69, p. 11-20, 2001.

GROS, P.; MILDNER, F. J.; JANSSEN, B. J. Complement driven by conformational changes. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 48-58, 2008.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THÉRY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 621-667, 2002.

HASEBE, H.; NAGAYAMA, H.; SATO, K.; ENOMOTO, M.; TAKEDA, Y.; TAKAHASHI, T. A.; HASUMI, K.; ERIGUCHI, M. Dysfunctional regulation of the development of monocyte-derived dendritic cell in cancer patients. **Biomed. Pharmacother.**, v. 4, p. 291-298, 2005.

HAWLISCH, H.; KÖHL, J. Complement and Toll-like receptors: key regulators of adaptive immune responses. **Mol. Immunol.**, v. 43, p. 13-21, 2006.

HOLLAND, E. C. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. **Nat. Rev. Genet.**, v.2, p.120-129,2001.

HONCZARENKO, M.; RATAJCZAK, M. Z.; NICHOLSON-WELLER, A.; SILBERSTEIN, L. E. Complement C3a enhances CXCL12 (SDF-1)-mediated chemotaxis of bone marrow hematopoietic cells independently of C3a receptor. **J. Immunol.**, v. 175. p. 3698-3706, 2005

IERO, M.; VALENTI, R.; HUBER, V.; FILIPAZZI, P.; PARMIANI, G.; FAIS, S.; RIVOLTINI, L. Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. **Cell Death Differ.**, v. 15, p. 80-8, 2008.

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.

IRIE, K.; IRIE, R. F.; MORTON, D. L. Evidence for in vivo reaction of antibody and complement to surface antigens of human cancer cells. **Science**, v. 186, p. 454-456, 1974.

ITANO, A. A.; MCSORLEY, S. J.; REINHARDT, R. L.; EHST, B. D.; INGULLI, E.; RUDENSKY, A. Y.; JENKINS, M. K. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. **Immunity**, v. 19, p. 47-57, 2003.

ITO T.; AMAKAWA R.; INABA M.; IKEHARA S.; INABA K.; FUKUHARA S. Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. **J. Immunol.**, v. 1, p. 2961-2969, 2001.

JEGALIAN, A. G.; FACCHETTI, F.; JAFFE, E. S. Plasmacytoid Dendritic Cells Physiologic Roles and Pathologic States. **Adv. Anat. Pathol.**, v. 16, p. 392-404, 2009.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. **CA. Cancer J. Clin.**, v. 61,p. 69-90, 2011.

JUNNIKKALA, S.; JOKIRANTA, T. S.; FRIESE, M. A.; JARVA, H.; ZIPFEL, P. F.; MERI, S. Exceptional resistance of human H2 glioblastoma cells to complement-mediated killing by expression and utilization of factor H and factor H-like protein 1. **J. Immunol.** v. 164, p. 6075-81, 2000.

KANAZAWA, N. Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. **J. Dermatol. Sci.**, v. 45, p. 77-86, 2007.

KAWAMURA, K.; BAHAR, R.; NATSUME, W.; SAKIYAMA, S.; TAGAWA, M. Secretion of interleukin-10 from murine colon carcinoma cells suppresses systemic antitumor immunity and impairs protective immunity induced against the tumors. **Cancer Gene Ther.**, v. 9, p. 109-115, 2002.

KEMPER, C.; ATKINSON, J. P. T-cell regulation: with complements from innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 9-18, 2007.

KIM, S.; ELKON, K. B.; MA, X. Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. **Immunity**, v. 21, p. 643-53, 2004.

KINDT, T. J.; GOLDSBY, R. A.; GOLDSBY, R. A. **Kuby immunology**. 6. ed. 2007. New York : W.H. Freeman and Company. 704p.

KLEIN, G. Tumor antigens. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 20, p. 223-252, 1996.

KÖHL, J. The Role of Complement in Danger Sensing and Transmission. **Immunologic Research.**, v. 34, p. 157–176, 2006.

LAPPEGÅRD, K. T; CHRISTIANSEN, D; PHARO, A; THORGERSEN, E. B; HELLERUD, B. C; LINDSTAD, J; NIELSEN, E. W; BERGSETH, G; FADNES, D; ABRAHAMSEN, T. G; HØIBY, E. A; SCHEJBEL, L; GARRED, P; LAMBRIS, J. D; HARBOE, M; MOLLNES, T. E. Human genetic deficiencies reveal the roles of complement in the inflammatory network: lessons from nature. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**. v. 15, p. 15861-15866, 2009.

LI, W. U.; YONG-JUN, L. Development of Dendritic-Cell Lineages. **Immunity**, v. 26, p. 741-750, 2007.

LIU, C.; SAGE, J. C.; MILLER, M. R.; VERHAAK, R. G.; HIPPENMEYER, S.; VOGEL, H.; FOREMAN, O.; BRONSON, R. T.; NISHIYAMA, A.; LUO, L.; ZONG, H. Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. **Cell.**, v. 22, p. 209-221, 2011.

LIVAK, J. K., SCHMITTGEN, D.T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT. **Methods.**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MAHNKE, K.; SCHMITT, E.; BONIFAZ, L.; ENK, A. H.; JONULEIT, H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. **Immunol. Cell Biol.**, v. 80, p. 477-83, 2002.

MASTELLOS, D.; LAMBRIS, J. D. Complement: more than a 'guard' against invading pathogens? **Trends Immunol.**, v. 23, p. 485-91, 2002.

MATSUI, T.; CONNOLLY, J. E.; MICHNEVITZ, M.; CHAUSSABEL, D.; YU, C. I.; GLASER, C.; TINDLE, S.; PYPAERT, M.; FREITAS, H.; PIQUERAS, B.; BANCHEREAU, J.; PALUCKA A. K. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. **J. Immunol.**, v. 182, p. 6815-6823, 2009.

MORGAN, B. P.; MARCHBANK, K. J.; LONGHI, M. P.; HARRIS, C. L.; GALLIMORE, A. M. Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. **Immunol. Lett.**, v. 15, p. 171-179, 2005.

NAGARAJ, S.; COLLAZO, M.; CORZO, C. A.; JE-IN, Y.; ORTIZ, M.; QUICENO, D.; GABRILOVICH, D. I. Regulatory Myeloid Suppressor Cells in Health and Disease. **Cancer Research**, v.69, p.7503-7506, 2009.

NAIK, S. H. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. **Immunol. Cell Biol.**, v. 86, p. 439-452, 2008.

NAKAYAMA, Y.; KIM, S. I.; KIM, E. H.; LAMBRIS, J. D.; SANDOR, M.; SURESH, M. C3 promotes expansion of CD8+ and CD4+ T cells in a *Listeria monocytogenes* infection. **J Immunol.**, v. 183, p. 2921-2931, 2009.

NCBI. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> >. Acesso em: 30 nov. 2011.

NEVES, A. R.; ENSINA, L. F. C.; ANSELMO, L. B.; LEITE, K. R. M.; BUZAID, A. C.; CÂMARA-LOPES, L. H.; BARBUTO, J. A. M. 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.

NESTLE, F. O.; DI MEGLIO, P.; QIN, J. Z; NICKOLOFF, B. J. Skin immune sentinels in health and disease. **Nat. Rev. Immunol.** v. 9, p. 679-91,2009.

NIELSEN, C. H.; FISCHER, E. M.; LESLIE, R. G. The role of complement in the acquired immune response. **Immunology.**, v. 100, p. 4-12, 2000.

OKROJ, M.; HSU, Y. F.; AJONA, D.; PIO, R.; BLOM, A. M. Non-small cell lung cancer cells produce a functional set of complement factor I and its soluble cofactors. **Mol. Immunol.** v. 45, p. 169-179, 2008.

PENG, Q.; LI, K.; PATEL, H.; SACKS, S. H.; ZHOU, W. Dendritic cell synthesis of C3 is required for full T cell activation and development of a Th1 phenotype. **J. Immunol.**, v. 176, p. 3330-3341, 2006.

PENG, Q.; LI, K.; WANG, N.; LI, Q.; ASGARI, E.; LU, B.; WOODRUFF, T. M.; SACKS, S. H.; ZHOU, W. Dendritic cell function in allostimulation is modulated by C5aR signaling. **J. Immunol.**, v.183, p.6058-6068, 2009.

PETTIGREW, H. D.; TEUBER, S. S.; GERSHWIN, M. E. Clinical significance of complement deficiencies. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1173, p. 108-123, 2009.

PULENDRAN, B.; BANCHEREAU, J.; BURKEHOLDER, S.; KRAUS, E.; GUINET, E.; CHALOUNI, C.; CARON, D.; MALISZEWSKI, C.; DAVOUST, J.; FAY, J.; PALUCKA, K. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. **J. Immunol.**, v. 165, p. 566-572, 2000.

RAMOS, R. N. **Investigação de um possível viés imunossupressor em células dendríticas derivadas de indivíduos portadores de câncer**. 2011. 102f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

REIMAN, J. M.; KMIECIAK, M.; MANJILI, M. H.; KNUTSON, K. L. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. **Semin. Cancer Biol.**, v. 17, p. 275-87, 2007.

REIS, E. S.; BARBUTO, J. A. M.; ISAAC, L. Human monocyte-derived dendritic cells are a source of several complement proteins. **Inflamm. Res.**, v. 55, p. 179–184, 2006.

REIS, E. S.; BARBUTO, J. A. M.; ISAAC, L. Complement components, regulators and receptors are produced by human monocyte-derived dendritic cells. **Immunobiology**, v. 212, p. 151–157, 2007a.

REIS, E. S.; BARBUTO, J. A. M.; KOHL, J.; ISAAC, L. Impaired dendritic cell differentiation and maturation in the absence of C3. **Mol. Immunol.**, v. 45, p. 1-11, 2007b.

RODECK, U.; BOSSLER, A.; GRAEVEN, U.; FOX, F. E.; NOWELL, P. C.; KNABBE, C.; KARI, C. Transforming growth factor beta production and responsiveness in normal human melanocytes and melanoma cells. **Cancer Res.** v. 54, p. 575-81, 1994.

RODRIGUES, J. C; GONZALEZ, G. C; ZHANG, L; IBRAHIM, G; KELLY, J. J; GUSTAFSON, M. P; LIN, Y; DIETZ, A. B; FORSYTH, P. A; YONG, V. W; PARNEY, I. F. Normal human monocytes exposed to glioma cells acquire myeloid-derived suppressor cell-like properties. **Neuro Oncol.**, v. 12, p. 351-65, 2010.

ROMAGNOLI, G.G.; Bergami-Santos, P.C.; Barbuto, J. A. M. A new approach for a cancer immunotherapy: The use of nanovesicles from mature dendritic cells to make immunogenic tumor cells. In: **INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DENDRITIC CELLS IN FUNDAMENTAL AND CLINICAL IMMUNOLOGY – DC2010: FORUM ON VACCINE SCIENCE**, 11,2010, Lugano, Suíça. **Abstracts...** Lugano, Suíça: Institute for Research in Biomedicine and Swiss Vaccine Research Institute, 2010. res.P05-051.

SACKS, S. H. Complement fragments C3a and C5a: the salt and pepper of the immune response. **Eur. J. Immunol.**, v. 40, p. 668-670, 2010.

SAHA, P.; GEISSMANN, F. Toward a functional characterization of blood monocytes. **Immunol. Cell Biol.** v. 89, p. 2-4, 2011.

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. 1109-18, 1994.

SCHMIDT, J.; KLEMP, C.; BÜCHLER, M. W.; MÄRTEN, A. Release of iC3b from apoptotic tumor cells induces tolerance by binding to immature dendritic cells in vitro and in vivo. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 55, p. 31-38, 2006.

SCHREIBER, D. R.; DUNN, P. G.; OLD, J. L. The Three ES of Cancer Immunoediting. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 329–360, 2004a.

SCHREIBER, D. R.; DUNN, P. G.; OLD, J. L. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. **Immunity**, v. 21, p. 137–148, 2004b.

SHANKARAN, V.; IKEDA, H.; BRUCE, A. T.; WHITE, J. M.; SWANSON, P. E.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature**. v. 410, p. 1107-1111, 2001.

SIEBZEHNRL, F. A.; REYNOLDS, B. A.; VESCOVI, A.; STEINDLER, D. A.; DELEYROLLE, L. P. The origins of glioma: E Pluribus Unum? **Glia**. v. 59, p. 1135-1147, 2011.

SKOG, J.; WÜRDINGER, T.; VAN RIJN, S.; MEIJER, D. H.; GAINCHE, L.; SENA-ESTEVEZ, M.; CURRY, W. T.; CARTER, B. S.; KRICHEVSKY, A. M.; BREAKFIELD, X.O. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nat. Cell Biol.**, v. 10, p. 1470-1476, 2008.

SOHN, J. H.; BORA, P. S.; SUK, H. J.; MOLINA, H.; KAPLAN, H. J.; BORA, N. S. Tolerance is dependent on complement C3 fragment iC3b binding to antigen-presenting cells. **Nat. Med.**, v. 9, p. 206-212, 2003.

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. 1142-62, 1973.

STEINMAN, R. M.; WITMER, M. D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.75, p.5132-5136, 1978.

STEINMAN, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu Rev Immunol.**, v.9, p.271-96, 1991.

STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M. C. Tolerogenic dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**,v. 21, p. 685-711, 2003.

TAKAHARA, M.; KANG, K.; LIU, L.; YOSHIDA, Y.; MCCORMICK, T.S.; COOPER, K. D. iC3b arrests monocytic cell differentiation into CD1c-expressing dendritic cell precursors: a mechanism for transiently decreased dendritic cells in vivo after human skin injury by ultraviolet B. **J. Invest. Dermatol.**, v. 120, p. 802-809, 2003.

TAKAHASHI, A.; KONO, K.; ICHIHARA, F.; SUGAI, H.; FUJII, H.; MATSUMOTO, Y. Vascular endothelial growth factor inhibits maturation of dendritic cells induced by

lipopolysaccharide, but not by proinflammatory cytokines. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 53, p. 543–550, 2004.

THÉRY, C.; AMIGORENA, S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. **Curr. Opinion Immunol.**, v. 13, p. 45–51, 2001.

UENO, H.; KLECHEVSKY, E.; MORITA, R.; ASPORD, C.; CAO, T.; MATSUI, T.; DI PUCCHIO, T.; CONNOLLY, J.; FAY, J. W.; PASCUAL, V.; PALUCKA, A. K.; BANCHEREAU, J. Dendritic cell subsets in health and disease. **Immunol. Rev.**, v. 219, p. 118-142, 2007.

VAN KOOTEN, C.; FIORE, N.; TROUW, L. A.; CSOMOR, E.; XU, W.; CASTELLANO, G.; DAHA, M. R.; GELDERMAN, K. A. Complement production and regulation by dendritic cells: molecular switches between tolerance and immunity. **Mol. Immunol.**, v. 45, p. 4064-4072, 2008.

VAN KUPPEVELD, F. J.; VAN DER LOGT, J. T.; ÂNGULO, A. F.; VAN ZOEST, M. J.; QUINT, W. G.; NIESTERS, H. G.; GALAMA, J. M.; MELCHERS, W. J. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 2606-2615, 1992.

VARSANO, S.; RASHKOVSKY, L.; SHAPIRO, H.; RADNAY, J. Cytokines modulate expression of cell-membrane complement inhibitory proteins in human lung cancer cell lines. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** v. 19, p. 522-529, 1998.

WAHL, S. M.; WEN, J.; MOUTSOPOULOS, N. TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege. **Immunol. Rev.**, v. 213, p. 213-27, 2006.

WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, p. 1058-1066, 2001a.

WALPORT, M. J. Complement. Second of two parts. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, p.1140-1144, 2001b.

WEINBERG, R. A. **A biologia do câncer**. 2008. Porto Alegre: Artmed. 864p.

WEICHENTHAL, M.; SIEMANN, U.; NEUBER, K.; BREITBART, E. W. Expression of complement regulator proteins in primary and metastatic malignant melanoma. **J. Cutan. Pathol.** v. 26, p. 217-221, 1999.

WESTPHAL, M.; LAMSZUS, K. The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 12, p. 495-508, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION . Disponível em:
< <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> >. Acesso em 17 out. 2011.

-
- YOSHIMURA, A. Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. **Cancer Sci.** v. 97, p. 439-447, 2006.
- ZHOU, W.; PENG, Q.; LI, K.; SACKS, S. H. Role of dendritic cell synthesis of complement in the allospecific T cell response. **Mol. Immunol.**, v. 44, p. 57-63, 2007.
- ZHU, Y.; PARADA, L. F. The molecular and genetic basis of neurological tumours. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 2, p. 616-626, 2002.
- ZIPFEL, P. F.; SKERKA, C. Complement regulators and inhibitory proteins. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 729-740, 2009.
- ZITVOGEL, L.; TESNIERE, A.; KROEMER, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. **Nat. Rev. Immunol.**, v.6, p.715-727, 2006.
- ZOU, W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 295-307, 2006.
- ZOU, J. P.; MORFORD, L. A.; CHOUGNET, C.; DIX, A. R.; BROOKS, A. G.; TORRES, N.; SHUMAN, J. D.; COLIGAN, J. E.; BROOKS, W. H.; ROSZMAN, T. L.; SHEARER, G. M. Human glioma-induced immunosuppression involves soluble factor(s) that alters monocyte cytokine profile and surface markers. **J. Immunol.**, v. 162, p. 4882-4892, 1999.