CARLOS DZIK

**Resposta imune contra HERV-K em pacientes
com câncer de próstata localizado e metastático**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

*Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Dzik, Carlos

Resposta imune contra HERV-K em pacientes com câncer de próstata localizado e metastático / Carlos Dzik -- São Paulo, 2017.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Esper Georges Kallás.

Descritores: 1.Neoplasias da próstata 2.Imunidade 3.Biblioteca genômica
4.Biologia computacional 5.ELISPOT 6.Retroviridae 7.Linfócitos T 8.Imunidade
ativa 9.Interferon gama

USP/FM/DBD-303/17

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a quem é responsável por eu estar aqui neste momento, nesta vida... sem os quais nada existiria...

Aos meus pais...

Dedico esta tese a quem outrora, sem perceber, quase como num acaso, me forneceu um certo amálgama de identificação... quase imperceptível e sem palavras ou intenções claras... de que tanto precisei para um dia querer me tornar médico.

A meu pai...

Dedico esta tese aos tantos pacientes, que espero ter ajudado algum dia, graças aos meus (e deles) anjos da guarda e mestres pelo caminho... e para quem espero ter me comportado com honestidade e um mínimo de conflito de interesses, como aprendemos ao sair da escola de medicina... onde juramos de acordo com o paradigma... de servir aos pacientes.

Pena que na atualidade muitas vezes vemos este paradigma tão importante ter os seus vetores invertidos...

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiríssimo lugar à minha esposa – Berta – com sua preocupação constante e visceral nestes últimos quase 30 anos e em particular nestes últimos 4 anos, com o seu sofrimento cúmplice... e apoio cego, generoso e amoroso...

Quem a conhece sabe do que estou falando...

...e aos meus filhos Rony, André e Milena... pela paciência comigo ... e aceitação de minhas tantas imperfeições como pai.

Agradeço ao meu amigo e orientador, o Prof. Dr. Esper G. Kallás, a quem chamo Esper, que provavelmente depositou muito mais confiança em mim do que devia...

...basicamente por me dar a oportunidade de voltar para o banco da escola... depois de um diálogo rápido e objetivo às portas da estação do metrô Clínicas, numa tarde ensolarada do verão do ano de 2013.
... espero que ele se lembre disso !!!... e não se arrependa !!

Agradeço e MUITO à Dra Priscilla Ramos Costa, minha co-orientadora, que foi responsável maior pela realização dos protocolos de Citometria de Fluxo e pelas orientações tão preciosas nas análises dos dados. Sem ela eu estaria em sérios apuros !!!

Agradeço à Helena Tomyiana pela orientação na realização dos ensaios de Elispot. Espero que ela não tenha ficado chateada comigo por todas as minhas indagações e questionamentos cheios de ignorância durante parte daquele processo.

Agradeço a disponibilidade, interesse, atenção e competência do Dr. Pedro Galante, um tremendo especialista em bioinformática genômica do Centro de Oncologia Molecular do Hospital Sírio-Libanês, a quem fui apresentado há pouco tempo, e que de certa forma me deslumbrou com estes meandros da genômica humana, a Biologia de nosso século, campo este não mais possível para leigos como eu.

Normatização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação d dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L.Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação;2011.

Abreviaturas e títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas	viii
Lista de tabelas.....	x
Lista de gráficos.....	xii
Lista de figuras.....	xiii
Resumo	xiv
Abstract.....	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1-Epidemiologia do câncer de próstata	2
1.2-Tratamento do câncer de próstata localizado.....	3
1.3-Tratamento do câncer de próstata metastático	3
1.4- Câncer de próstata e imunidade	4
1.5- Retrovírus endógenos	7
1.6 Retro-elementos endógenos humanos (HERE) no câncer	8
1.7-HERV e androgênios	10
2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	12
3 HIPÓTESE.....	15
4 OBJETIVOS	17
4.1 Objetivo geral.....	18
4.2- Objetivos específicos	18
5 MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1-Material	20
5.1.1-Casuística e considerações éticas	20
5.2-Métodos	21
5.2.1 Análise genômica - dados públicos (TCGA)	21
5.2.2 Separação de CMSP (Células Mononucleares de Sangue Periférico)	22
5.2.3 Avaliação de Resposta Imune Celular por ELISPOT	23
5.2.4 Citometria de Fluxo-Imunofenotipagem-Perfil de Ativação e Senescência celular	25
5.2.4.1 Marcação de Superfície Celular.....	26
5.2.4.2 Estratégias de Análise dos Dados de Citometria de Fluxo	27

5.2.4.3 Análise Estatística	29
6 RESULTADOS	34
6.1 Análise demográfica e clínica das coortes pesquisadas	35
6.2 Resultados de Análise genômica da expressão gênica de HERV-K.....	36
6.3 Resultado de ELISPOT-Interferon gama contra peptídeos de HERV-K.....	37
6.4 Resultado de avaliação de ativação e senescência linfocitária por citometria de fluxo	40
6.4.1 Perfil de Diferenciação dos Linfócitos T CD4+	41
6.4.1.1 Perfil de Ativação de Linfócitos T CD4+	43
6.4.1.2 Perfil de Senescência/Exaustão de Linfócitos T CD4+	46
6.4.2 Perfil de Diferenciação dos Linfócitos T CD8+.....	53
6.4.2.1 Perfil de Ativação dos Linfócitos T CD8+	55
6.4.2.2 Perfil de Senescência/Exaustão de Linfócitos T CD8+	59
7 DISCUSSÃO	64
8 CONCLUSÃO	73
9 ANEXOS	75
10 REFERÊNCIAS.....	86
11 APÊNDICES	99

LISTAS

ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	<i>Androgen Receptor</i>
ARE	<i>Androgen Response Elements</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CMSP	Células Mononucleares de Sangue Periférico
CTA	<i>Cancer Testis Antigen</i>
CTSP-1	Um tipo específico de CTA, associado a tumores
ELISPOT	<i>Enzyme-Linked Immuno Spot</i>
ENCODE	<i>Encyclopedia of DNA Elements</i>
HER2- <i>neu</i>	<i>Human Epidermal Receptor</i>
HERV	<i>Human Endogenous RetroVirus</i>
HERV-K	<i>Human Endogenous RetroVirus da família</i>
FoxP3	<i>Forckheadbox P3</i> (Fator de transcrição da família Fox)
GENCODE	<i>Genome of the ENCODE</i>
GRE	<i>Glucocorticoid Response Elements</i>
LINE	<i>Long Interspersed Nuclear Elements</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> (Sequências repetidas de nucleotídeos localizados nas pontas dos retrovírus endógenos.
MDSC	<i>Myeloid Derived Suppressor Cells</i>
MMTV	<i>Mouse mammary Tumor Virus</i>
NY-BR-1	Antígeno da classe dos Cancer Testis Antigen
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAP	<i>Prostatic Acid Phosphatase</i>
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i>
PSMA	<i>Prostatic Specific Membrane Antigen</i>
RNAseq	<i>RNA sequencing</i>

Score de Gleason	Score de risco na patologia. Varia de 6 a 10, sendo 10 o mais grave.
SEREX	<i>SErological Recombinant cDNA EXpression cloning</i>
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TDA	Terapia de Deprivação Androgênica
TZFP	<i>Testicular Zinc Finger Protein</i>
UCSC	<i>University California-Santa Cruz</i>

TABELAS

Tabela 1 -	Informações descrevendo a função e a finalidade de cada molécula caracterizada através dos painéis de citometria de fluxo	32
Tabela 2 -	Informações dos anticorpos e reagentes utilizados no painel de citometria de fluxo.....	33
Tabela 3 -	Características Demográficas dos pacientes e Grupo Controle	35
Tabela 4 -	Distribuição dos diferentes imunofenótipos entre as coortes	41
Tabela 5 -	Comparação das medianas das porcentagens de linfócitos T CD4 selecionados para marcadores de senescência e exaustão, isoladamente.	41
Tabela 6 -	Imunofenótipo selecionado isoladamente para CD38 na população global de CD4	44
Tabela 7 -	Comparação das medianas das porcentagens de linfócitos T CD4 selecionados para marcadores de senescência e exaustão, isoladamente	47
Tabela 8 -	Diferenças entre as sub-populações linfocitárias de CD4, quando selecionado isoladamente para CD28.....	48
Tabela 9 -	Diferenças entre as sub-populações linfocitárias de CD4, quando selecionado isoladamente para CD57	49
Tabela 10 -	Diferenças entre as sub-populações linfocitárias de CD4, quando selecionado isoladamente para CD28.....	50
Tabela 11 -	Diferenças entre as sub-populações linfocitárias de CD4, quando selecionado isoladamente para PD1	51
Tabela 12 -	Distribuição dos diferentes imunofenótipos entre as coortes, na população global de CD8	54
Tabela 13 -	Perfil de CD8 total, quando selecionado isoladamente por marcadores de ativação celular, na comparação entre as coortes.....	56
Tabela 14 -	Medianas da porcentagem dos linfócitos T CD8 marcados por CD38, distribuídos pelas sub-populações ontogenéticas.....	57
Tabela 15 -	Comparação das medianas das porcentagens de linfócitos T CD8 selecionados para marcadores de senescência e exaustão, isoladamente.	60

Tabela 16 - Dados da comparação entre a mediana das porcentagens dos linfócitos T CD8, selecionados para marcação de CD95.....	61
Tabela 17 - Comparação entre as coortes quando selecionadas apenas para PD-L1 nas populações de linfócitos T CD4, CD8 e nas APCs	63

GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Mediana da porcentagem de células com os marcadores isoladamente analisados na população total de linfócitos T CD4+	43
Gráfico 2 -	Imunofenótipo selecionado isoladamente para CD38 na população global de CD4	44
Gráfico 3 -	Perfil de CD4 total, quando selecionado isoladamente por marcadores de senescência e exaustão, na comparação entre as coortes	46
Gráfico 4 -	Diferenças entre as sub-populações linfocitárias de CD4, quando selecionado isoladamente para CD28	48
Gráfico 5 -	Diferenças entre as sub-populações linfocitárias de CD4, quando selecionado isoladamente para CD57	49
Gráfico 6 -	Diferenças entre as sub-populações linfocitárias de CD4, quando selecionado isoladamente para CD95	50
Gráfico 7 -	Diferenças entre as sub-populações linfocitárias de CD4, quando selecionado isoladamente para PD1	51
Gráfico 8 -	Perfil de CD8 total, quando selecionado isoladamente por marcadores de ativação celular, na comparação entre as coortes ...	55
Gráfico 9 -	Perfil de CD8 total, quando selecionado isoladamente por marcadores de ativação celular, na comparação entre as coortes ...	56
Gráfico 10 -	Diferenças entre as sub-populações linfocitárias de CD8, quando selecionado isoladamente para CD38	57
Gráfico 11 -	Perfil de CD8 total, quando selecionado isoladamente por marcadores de senescência e exaustão, na comparação entre as coortes	59
Gráfico 12 -	Comparação entre a mediana das porcentagens dos linfócitos T CD8, selecionados para marcação de CD95.	61
Gráfico 13 -	Comparação entre as coortes quando selecionadas apenas para PD-L1 nas populações de linfócitos T CD4, CD8 e nas APCs.....	63

FIGURAS

Figura 1 -	Desenho esquemático de um gene de um retrovírus endógeno.....	8
Figura 2 -	Esquema mostrando pareamento de leituras de RNA-seq expressas diretamente com o DNA.	22
Figura 3 -	Estratégia de análise de células TCD4+ e CD8+.....	28
Figura 4 -	Eixo Y=No de spots. Eixo X= pacientes. Neste gráfico encontramos contagens de 50 spots em 2 pacientes, apenas. Um com doença localizada para gag (#15) e outro do grupo controle para env (#S3G6006).	38
Figura 5 -	Eixo Y=No de spots. Eixo X= pacientes. Neste gráfico encontramos contagens acima do limiar de positividade -80 spots- contra env em um paciente com doença localizada.....	39
Figura 6 -	Distribuição dos diferentes imunofenótipos entre as coortes	41
Figura 7 -	Distribuição dos diferentes imunofenótipos entre as coortes, na população global de CD8	53

RESUMO

Dzik C. *Resposta imune contra HERV-K em pacientes com câncer de próstata localizado e metastático* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2017.

Objetivo: Retrovirus Endógeno Humano (HERV) compreende ao redor de 8% do genoma humano. Apesar do fato de que em sua maioria são genes não-funcionais devido a processos de mutação ou perda de material genético no processo de retrotransposição, existem evidências do aumento da expressão de HERVs em tecido de câncer de próstata. Nós estudamos e comparamos a imunogenicidade de peptídeos da família HERV em 2 coortes de pacientes com câncer de próstata. Posteriormente examinamos o estado de ativação e senescência linfocitária nestas coortes. **Desenho Experimental:** Células Mononucleares de Sangue Periférico (CMSP) de 65 pacientes com câncer localizado da próstata em situação de hormônio-sensibilidade e de 24 pacientes com câncer de próstata metastático e em situação de resistência à castração, comparados a um grupo controle de 12 indivíduos normais foram avaliados em relação ao seu estado de resposta imune pela técnica de ELISPOT contra um conjunto de peptídeos derivados dos exons *gag* e *env* do gene da família HERV-K HML-2. Como parte de nosso estudo, foi realizado de forma preliminar uma análise genômica *in silico* de 500 pacientes com câncer de próstata sequenciados e disponíveis para análise pública do banco de dados TCGA, com o objetivo de reforçar o racional de nossa interrogação científica. Além disso, como estudo de correlação, fizemos uma análise por citometria de fluxo da ativação celular de linfócitos T de nossas coortes para determinarmos a imunofenotipagem e ontogenia linfocitária em nossos indivíduos investigados, no momento de nossa pesquisa de sua resposta imune. **Resultados:** Nossa análise da resposta imune contra peptídeos de HERV-K HML-2 por ELISPOT-Interferon Gama não mostrou nenhum resultado significativo. Nenhum paciente apresentou dados significativos de resposta de acordo com nossos critérios, apesar de nossos dados preliminares de expressão gênica terem mostrado expressão gênica em torno de 17% em pacientes com doença localizada. Nossos dados de ativação linfocitária mostraram maior ativação e senescência nos pacientes com doença disseminada e resistente à castração. **Conclusões:** Este parece ser o primeiro estudo a interrogar a presença de resposta celular imune contra peptídeos de HERV-K em pacientes com câncer de próstata. Nosso achados não mostraram resposta imune relevante em doença localizada ou disseminada e em diferentes estados de ativação linfocitária ou *status* de integridade hormonal. Apesar destes resultados, pesquisa posterior poderia utilizar diferente metodologia, como por exemplo a utilização de citometria de fluxo bem como a busca de diferentes citocinas envolvidas, tais como as relacionadas a resposta Th2, ao invés de Th1.

Descritores: neoplasias da próstata; imunidade; biblioteca genômica; biologia computacional; ELISPOT; retroviridae; linfócitos T; imunidade ativa; interferon gama

ABSTRACT

Dzik C. *Immune response against HERV-K in patients with localized and metastatic prostate cancer* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2017.

Purpose: Human Endogenous Retrovirus (HERV) comprises 8% of human genome. Despite the fact that most of it is non-functional due to mutations or loss of genetic material in the process of retrotransposition, there are some evidence of increased expression of HERV in prostate cancer tissue. We studied the cellular immunogenicity of peptides from HERV-K family in 2 cohorts of prostate cancer patients. **Experimental Design:** PBMCs from 65 patients with hormone-intact localized prostate cancer and 24 patients with castrate-metastatic disease, matched with 12 normal controls were evaluated for cellular immune response by ELLISPOT against a pool of *gag* and *env* peptides from HERV-K family of HML-2 type. As an independent supportive study we did *in silico* genomic analysis of 500 prostate cancer patients from TCGA database to give another evidence of the prevalence of HERV-K gene expression in prostate cancer genome, reinforcing the rational of our questions. **Results:** Our analysis of cellular immune response against HERV-K HML-2 peptides by Interferon-gama ELISPOT did not show any meaningful results. No patient showed any minimal criteria of response, despite the fact that in our preliminary genomic analysis we obtained HERV expression in about 17% of a cohort of 500 patients with localized prostate cancer. In regards to the flow cytometry data of the lymphocytes we showed stronger activation and senescence status in the cohort of patients with castration sensitive and resistant disseminated disease, compared to the localized disease cohort. **Conclusions:** To the authors’s knowledge this is the first study to look for cellular immune response against peptides derived from coding HERV-K transcripts in prostate cancer patients. Our findings did not show relevant immune response in neither localized nor metastatic castrate prostate cancer patients. Despite those results, further research could continue using different methodology, like flow cytometry as well as looking for different cytokines involved, such as those related to a Th2 response, instead of Th1.

Descriptors: prostatic neoplasms; immunity; genomic library; computational biology; enzyme-linked immunospot assay; retroviridae; T-lymphocytes; immunity, active; interferon-gamma.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer de próstata

O câncer de próstata é a neoplasia maligna mais prevalente na população masculina em todo o mundo. Os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento da doença são: idade, história familiar e cor da pele. A raça negra apresenta um risco maior de ocorrência deste câncer com prognóstico pior, seja em função de biologia tumoral mais grave ou relacionado a aspectos sócio-econômicos e culturais como será mencionado mais adiante ⁽¹⁾. Em relação à idade, a maioria dos homens é diagnosticada após os 65 anos de idade, com probabilidade muito pequena de ocorrer descoberta clínica da doença em indivíduos com menos de 50 anos. A literatura descreve um aumento vertiginoso nas taxas de diagnóstico a partir dos anos 80, provavelmente graças à melhoria do atendimento à saúde básica, incrementada pelo advento da dosagem do antígeno prostático específico (PSA) ⁽²⁻⁷⁾.

A história familiar também é importante, pois o risco de diagnóstico em homens com pai ou irmão previamente diagnosticados com câncer de próstata aumenta em 2 a 3 vezes. Este risco é quase 11 vezes maior, se o pai ou irmão tiverem sido diagnosticados antes dos 40 anos de idade, caracterizando uma predisposição genético-hereditária importante. Estima-se que tenham ocorrido cerca de 1 milhão de casos novos no ano de 2012 e aproximadamente 70% destes casos novos ocorreram em países desenvolvidos. Existe uma variação internacional na incidência e nas taxas de mortalidade do câncer de próstata a depender das políticas de rastreamento, tratamento, estilo de vida e fatores sócio-econômicos e genéticos. De forma geral a

incidência do câncer de próstata tende a ser maior nas regiões mais abastadas, ou seja na América do Norte, Oceania e Europa. Por sua vez as taxas de mortalidade tendem a ser maiores nas regiões menos desenvolvidas, incluindo partes da América do Sul, Caribe e África Sub-Saariana ^(4, 8-10). As taxas de incidência de câncer de próstata são muito menores nos países asiáticos, tais como China e Japão (50 a 60 vezes menor em comparação com as taxas dos Estados Unidos), embora também tenham se elevado, possivelmente em parte como decorrência da ocidentalização dos costumes nestas regiões ^(2, 11).

1.2 Tratamento do câncer de próstata localizado

Pacientes com câncer de próstata têm modernamente sido estratificados em 3 diferentes grupos de risco: baixo, intermediário e alto risco. Estes grupos se definem a partir de 3 parâmetros: score de Gleason, valor do PSA e estadiamento clínico ⁽¹²⁾. Os pacientes que têm risco baixo e intermediário são em geral tratados com prostatectomia radical ou radioterapia. Pacientes com doença de alto risco podem ser tratados por prostatectomia radical, porém são preferencialmente tratados com radioterapia externa em associação com supressão androgênica por 3 anos ^(13, 14). Nestes tratamentos com intenção curativa, os índices de cura estão ao redor de 60 a 80%.

1.3 Tratamento do câncer de próstata metastático

O câncer de próstata apresenta uma relação íntima com os hormônios sexuais masculinos. Tanto as células sadias da glândula prostática como as tumorais têm o crescimento estimulado por androgênios. A descrição do importante papel que a estimulação androgênica desempenhava no crescimento do câncer de próstata, em 1941, permitiu estabelecer a terapia de privação androgênica (TDA) como o principal tratamento para o câncer de próstata avançado ⁽¹⁵⁾ sendo que 77 a 90% dos pacientes respondem a TDA inicial, com controle de sintomas, aumento de sobrevida e melhora na qualidade de vida, incluindo diminuição de dor óssea e complicações (redução de fraturas patológicas e compressão medular) ⁽¹⁶⁾. A hormonioterapia se tornou um dos principais focos de estudo no tratamento da doença metastática, com o desenvolvimento de várias drogas. Dentre elas temos a abiraterona e a enzalutamida, que na atualidade são os tratamentos padrão para os pacientes que apresentam piora da doença após um período mais ou menos prolongado de TODA ^(17, 18). Além destes tratamentos, os pacientes podem também ser tratados com quimioterapia (Docetaxel-⁽¹⁹⁾, Cabazitaxel ⁽²⁰⁾), radiofármacos ⁽²¹⁾ ou mesmo imunoterapia ⁽²²⁾.

1.4 Câncer de próstata e imunidade

Há anos investiga-se sobre o inter-relacionamento entre câncer e imunidade. Sabe-se que tanto as formas inatas como as adquiridas, da imunidade, são capazes de prover atividade antitumoral competente. Assim como a maioria dos tumores em geral, o câncer de próstata é capaz de desenvolver-se em meio ambiente imuno-

competente. Esta tolerância imunológica à presença dos tumores no organismo ocorre por uma variedade de mecanismos, incluindo a indução de linfócitos T supressores reguladores, e algumas vezes até oriundos de linfócitos T efetores ⁽²³⁾. Esta mesma característica de imunossupressão no câncer de próstata pode ser evidenciada, por exemplo, pelo achado de aumento no número de linfócitos T reguladores CD4+Foxp3+ no sangue periférico e em tumores de pacientes com câncer de próstata, corroborando em parte a atividade imunossupressora antitumoral ⁽²⁴⁾.

Várias são as razões que tornam o câncer de próstata um modelo interessante para as estratégias de imunomodulação. Em primeiro lugar o câncer de próstata é em geral uma neoplasia de crescimento lento e com uma longa história natural, de tal maneira a ser um modelo ideal no qual há tempo suficiente para que possa ser gerada uma resposta imune ótima ⁽²⁵⁾. Em segundo lugar o câncer da próstata expressa vários antígenos-associados ao tumor relativamente órgão-específicos tais como PSA, PAP e PSMA. Outros antígenos importantes relacionados a vários tipos de câncer e também ao câncer da próstata são os antígenos chamados *cancer/testis antigen* (CTA) ⁽²⁶⁾. Os CTAs são antígenos tipicamente restritos ao tecido testicular normal do homem adulto e expressam-se de forma aberrante em diversos tipos de câncer ⁽²⁷⁾. Existem tumores que são fortemente expressores de CTAs como, por exemplo, câncer de bexiga, pulmão não-pequenas células e melanoma ⁽²⁸⁻³⁰⁾. Nestes tumores a presença de transcriptos identificados por RT-PCR comparece em 55%, 51% e 53% das vezes, respectivamente. Esta gradação é dada quando pelo menos 20% dos espécimes analisados possuem a expressão dos CTAs. O adenocarcinoma usual da próstata e o câncer da mama podem ser considerados expressores

moderados ^(31, 32). Trabalhos identificam a presença de transcriptos de CTAs em 37% e 30%, respectivamente, nestes tumores. Outro CTA que se mostrou altamente restrito e prevalente em amostras de melanoma (59%), câncer de próstata (58%) e câncer de pulmão (57%) é o CTSP-1 ⁽³³⁾. CTSP-1 é na verdade parte de uma família de genes, sendo que os membros desta família mostram-se bastante restritos tanto em sua expressão, bem como na similaridade de sua estrutura proteica. Quando foram checados títulos de anticorpos anti-CTSP-1 em pacientes com câncer de próstata se encontrou presença de anticorpos em 20% dos casos. Este mesmo grupo de trabalho veio posteriormente demonstrar num estudo envolvendo 147 pacientes com câncer de próstata localizado, que a resposta humoral contra este antígeno poderia ser usada como marcador prognóstico especialmente nos pacientes com escore de Gleason elevado. Anticorpos anti-CTSP-1 foram detectados em 25% dos pacientes ⁽³⁴⁾.

Estas evidências colocam, de certa forma, o câncer de próstata como um modelo oncológico válido para tratamentos que envolvam imunomodulação ^(35, 36). Talvez o primeiro desafio seja a busca de antígenos associados ao câncer de próstata que sejam suficientemente imunogênicos, de tal maneira a serem explorados como alvos de imunomodulação ⁽³⁷⁾. Outro aspecto fundamental é justamente a necessidade de suprimir mecanismos de tolerância que limitam a resposta imune contra os antígenos tumorais. Neste sentido, antígenos virais podem ser mais adequados para desencadear melhores respostas de células T antitumorais devido a sua natureza “*non-self*” ^(38, 39). No entanto apenas alguns cânceres humanos são associados até o momento a uma etiologia viral. Evidências recentes indicam que retrovírus endógenos silenciados sob condições normais ao longo de nossa evolução, são induzidos em células cancerígenas e podem ser uma nova fonte de antígenos de

tumores com características de antígenos virais (40). Este é o escopo onde se insere nossa proposta de pesquisa.

1.5 Retrovírus endógenos

Os cromossomos de todos os mamíferos e da maioria dos vertebrados estão repletos de retrovírus ancestrais que inicialmente se inseriram no genoma como retrovírus exógenos ⁽⁴¹⁾. A colonização de células germinativas fizeram com que estes fragmentos retrovirais passassem a ser transmitidos pelas gerações subsequentes obedecendo em grande parte a forma de herança mendeliana. Esse é um processo extremamente longo, de tal maneira que após dezenas de milhões de anos, 8% do genoma humano consiste dos chamados retroelementos (partículas virais que se inseriram no genoma através da enzima *transcriptase reversa*). Estes são compostos de LTRs (*Long Terminal Repeats*), ou seja as partes terminais não-codificantes dos retrovírus endógenos que foram inseridas de forma fragmentada em diferentes partes do genoma e que também contém o restante do gene que consiste no retrovírus endógeno ^(42, 43). Durante todo este período, desde a inserção cromossômica, houve extensas mutações/deleções e fragmentações diversas, fazendo com que a maior parte deste material genético não seja capaz de transcrever proteínas. Todavia existem especulações e evidências de que estas partículas virais podem exercer função reguladora de partes do genoma, impedindo ou facilitando a expressão de certos genes ⁽⁴⁴⁻⁴⁸⁾. Estes genes são compostos por 2 LTRs e 3 exons melhor definidos, a exemplo dos retrovírus exógenos, sendo o mais famoso deles o

vírus do HIV. O desenho esquemático dos retrovírus pode ser visto na Figura 1 abaixo:

Figura 1 - Desenho esquemático de um gene de um retrovírus endógeno. Os elementos essenciais de interesse são as extremidades designadas por LTR (long terminal repeat), que podem estar isoladamente copiadas no genoma e quando rastreadas são identificadas como pertencentes a genes tipo retrovírus endógenos. Os exons de interesse são aqui representados por *gag*, *pol* e *env*. São os 3 exons principais dos retrovírus tanto exógenos como endógenos e responsáveis pela transcrição de genes relacionados com a formação da matrix viral, cápside/nucleocápside e envelope viral, respectivamente.

1.6 Retro-elementos endógenos humanos (HERE) no câncer

HERE inclui Retrovírus Endógenos Humanos (HERV) e Elementos Nucleares Longos Intercalados (LINE). HERVs são remanescentes de antigas infecções retrovirais que infectaram a linhagem germinativa de nossos ancestrais e se tornaram fixas na população ⁽⁴²⁾. Retrovírus são tradicionalmente divididos em transmitidos entre hospedeiros (exógenos) e nos transmitidos pela linhagem germinativa (endógenos). Eles compõem aproximadamente 8% do genoma humano. LINE são retrotransposons. Esta importante categoria genômica compõem 3% do genoma humano. São sequências gênicas que se “movem” pelo DNA por um mecanismo de “*cut and paste*” envolvendo a transcrição reversa de um intermediário de RNA e a inserção de sua cópia de DNA complementar em um sítio diferente no

genoma. Eles têm o promotor de RNA polimerase II e codificam uma transcriptase reversa e uma endonuclease que lhes permitem se “mover” no genoma, através da cópia de si próprios. Eles representam aproximadamente 20% do genoma humano. Diferentes estudos têm demonstrado a hipometilação de elementos LINE1 em diferentes cânceres ⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾, sugerindo um aumento em sua expressão. Um estudo recente mostrou que a hipometilação de LINE1 ocorre em câncer de próstata primário (quando comparado a tecidos normais) e é significativamente mais pronunciado em câncer de próstata metastático ⁽⁵¹⁾.

Sequências retrovirais endógenas são expressas em cânceres humanos. Por exemplo, a expressão aumentada de transcritos de *env* HERV-K foi demonstrada em melanoma ⁽⁵²⁾ em câncer de mama ⁽⁵³⁾ e de ovário ⁽⁵⁴⁾ quando comparada à expressão em tecidos normais. A antigenicidade de elementos HERV foi demonstrada séricamente e pelo reconhecimento de células T CD8+. Anticorpos contra HERV-K *gag* e *env* foram detectados em pacientes portadores de tumor de células germinativas ⁽⁵⁵⁾ e câncer de mama ⁽⁵⁶⁾.

A associação entre resposta de anticorpo e melhor prognóstico foi constatada em análise exploratória neste trabalho em pacientes com tumores germinativos. Utilizando-se clones da expressão de cDNA recombinantes séricos (SEREX), um antígeno HERV-K *gag* e sua imunogenicidade foi identificado em câncer de próstata ⁽⁵⁷⁾. Isso sugere que os produtos do gene retroviral são capazes de atuar como antígenos associados ao tumor, ativando respostas tanto de células T quanto B, como visto com o HER2/neu ⁽⁵⁸⁾ ou NY-BR-1 ⁽⁵⁹⁾. Esta propriedade pode também ser demonstrada em relação à imunidade celular a partir de alguns estudos em humanos com diferentes tipos de câncer epitelial, como citaremos a seguir. Mullins e cols

estudaram sequências de retrovírus endógenos da família HERV-H em um grupo de cânceres do aparelho digestivo. Nestes tumores houve evidência de forte expressão gênica. Os autores demonstraram sensibilidade para resposta celular medida por ensaio ELISPOT-Interferon-Gama. Além disso procederam à expansão destes linfócitos sensibilizados e demonstraram capacidade citolítica em 40% de linhagens celulares de carcinoma coloretal endogenamente expressores de HERV-H Xp22.3 ORF ⁽⁶⁰⁾. Rakoff-Nahoum e cols também encontraram linfócitos T sensibilizados para peptídeos de família HERV-K em pacientes com antecedentes de seminoma, utilizando ensaio ELISPOT interferon-gama. Estes achados foram encontrados também em uma minoria de indivíduos sem antecedente de câncer ⁽⁶¹⁾. Um último exemplo da reatividade imune foi demonstrado em pacientes com câncer de ovário. Rycaj e cols estudaram resposta humoral e celular contra peptídeos de HERV-K *env*, e compararam com mulheres portadoras de patologia ovariana benigna e mulheres sem neoplasias. Neste estudo pode-se demonstrar aumento de transcrição gênica de HERV-K nas pacientes com câncer de ovário, bem como presença de anticorpos contra proteína de HERV-K-*env* e presença de linfócitos sensibilizado contra estas mesmas proteínas, por ensaio de ELISPOT-interferon gama. Demonstrou-se também que estes linfócitos sensibilizados mostraram atividade citolítica aumentada ⁽⁶²⁾.

1.7 HERV e androgênios

O genoma HERV-K é homólogo ao vírus do tumor de mama em camundongos (MMTV) ⁽⁶³⁾. A transcrição do genoma HERV é mediada por elementos da região U3 da repetição terminal longa 5' (LTR). Muitos retrovírus

contêm elementos que respondem a glicocorticóides (GRE-Glucocorticoids Response Elements) na região U3, incluindo HERV e outros gama-retrovírus como o MMTV ^(64, 65). GREs virais são geralmente homólogos ao clássico Elemento Responsivo a Andrógeno (ARE), um sítio de ligação para dímeros do receptor de andrógeno ⁽⁶⁶⁾. Há homologia entre esses GREs virais e os AREs em alguns genes de mamíferos. Por exemplo, no câncer de mama, a expressão de HERV-K é aumentada pelos hormônios esteróides femininos ⁽⁶⁷⁾. Recentemente, *Rec*, uma proteína HERV-K, demonstrou formar um complexo trimérico com a proteína testicular “Zinc Finger” (TZFP) e com o AR. *Rec* é capaz de aliviar a repressão mediada por TZFP da transativação induzida por AR (receptor de androgênio), sugerindo que isso pode funcionar como uma oncoproteína por “des-reprimir” fatores de transcrição oncogênicos como os AREs ⁽⁶⁸⁾. Baseado nestas observações é possível especularmos que a expressão de HEREs pode ser aumentada por androgênio, no caso dos pacientes com câncer de próstata e eventualmente tornar estes transcritos “visíveis” ao sistema imune, constituindo possíveis alvos para imunomodulação em pacientes recém-diagnosticados com câncer de próstata.

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Este estudo se insere no escopo geral da pesquisa de antígenos associados ao câncer, no caso o câncer da próstata. Este tipo de investigação pode ter como fruto a maior compreensão dos aspectos inerentes à imunogenicidade do câncer, ou seja a capacidade do organismo reagir à presença de antígenos produzidos pelo genoma tumoral. No caso específico da próstata, existe a peculiaridade de haver interação entre o sistema imunológico e o sistema hormonal em suas diversas facetas e complexidades, como sugerido anteriormente. Hodiernamente a imunomodulação é uma das estratégias mais promissoras no tratamento de câncer através de utilização de drogas capazes de estimular a imunidade dos pacientes, fazendo com que estes passem a reagir de forma competente contra o tumor, através de linfócitos T citotóxicos. A imunomodulação tem sido explorada com medicamentos que têm por intuito amplificar o combate imunológico, reduzindo os mecanismos de “desligamento” do sistema imune, tornando-o assim mais “atento” e vigilante ^(24, 69). São tratamentos que reduzem a ação de células do sistema imune que funcionam como contra-reguladores negativos da atividade inflamatória, de tal maneira a controlar reações exacerbadas ou mesmo impedir mecanismos de auto-imunidade ⁽⁷⁰⁻⁷²⁾. Estas células ao serem “desligadas” podem permitir ação citotóxica mais eficiente e continuada sobre as células tumorais. Neste sentido, a busca de antígenos associados ao câncer pode ajudar a fornecer instrumentos adicionais na confecção de vacinas que podem se aliar a estas medicações imuno-potencializadoras.

Em relação aos retrovírus endógenos, há muito pouco estudo sobre sua expressão dentro do genoma do câncer de próstata, embora existam algumas

evidências de que eles se expressam com formação de proteínas e que podem até estimular a formação de anticorpos específicos, pela ativação da imunidade humoral ⁽⁵⁷⁾. Em relação à imunidade celular, fenômeno este que inicia a resposta imune através do primeiro encontro entre um antígeno e seu linfócito T-*naïve* respectivo, há quase nada estudado até agora. Há motivos bastante racionais para que este tipo de antígeno seja estudado, seja por ser originalmente viral e portanto exógeno e vindo do *lado-de-lá*, do “estrangeiro” e por conseguinte com qualidades de *non-self*, e também por poder ser estimulado através de hormônios sexuais como já mencionado anteriormente, característica tão específica e para nós oportuna no caso do câncer da próstata, um exemplo máximo de uma biologia hormônio-modulável ⁽⁷³⁾. À semelhança do modelo de investigação citado anteriormente, referente ao trabalho de Mullins e cols em câncer gastrointestinal ⁽⁶⁰⁾, entendemos que nosso trabalho pode trazer adição e colaboração para aumentar o repertório de antígenos-associados ao câncer de próstata, que poderão eventualmente ser explorados para fins terapêuticos.

3 HIPÓTESE

3 HIPÓTESE

A hipótese deste projeto é que pacientes com câncer de próstata teriam expressão aumentada de retrovirus endógenos e que neste sentido possuiriam dentro de si repertório de linfócitos T citotóxicos sensibilizados por peptídeos oriundos desta expressão. E também temos por hipótese de que, se isto é verdade, a resposta imune seria diferente ao compararmos pacientes com doença localizada e pacientes com doença disseminada.

4 OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta celular contra peptídeos de retrovírus endógenos em pacientes com câncer de próstata localizado e metastático à luz de sua expressão gênica e perfil de ativação celular em sangue periférico.

4.2 Objetivos específicos

- a) Extrair através de análise genômica *in silico* no banco de dados do TCGA dados de expressão gênica de retrovirus endógenos da família HERV-K HML-2 (análise de RNAseq).
- b) Caracterizar resposta imune celular contra peptídeos de HERV-K em amostras de sangue periférico de pacientes com câncer de próstata localizado e pacientes com doença disseminada submetidos à castração.
- c) Caracterizar perfil de ativação celular (análise de linfócitos T) em sangue periférico de pacientes com câncer de próstata localizado e pacientes com doença disseminada submetidos à castração. Esta análise permite fornecer um pano de fundo do estado imunológico atual destes pacientes em relação às células envolvidas nos estágios mais importantes da resposta imune dos pacientes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material

5.1.1 Casuística e considerações éticas

No serviço de cirurgia urológica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo são operados aproximadamente de 360 a 480 casos novos por ano. Sessenta e cinco pacientes com câncer de próstata localizado e normais em seu estado hormonal e 24 pacientes com câncer de próstata metastático e com estado hormonal de supressão androgênica tratados e em seguimento nesta instituição foram convidados para participar deste estudo. Amostras de sangue foram coletadas, no período de janeiro de 2015 a outubro de 2016, e encaminhadas imediatamente para o laboratório (Laboratório de Investigação Médica, LIM-60. Departamento de Alergia e Imunopatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob a supervisão do Prof. Dr. Esper Georges Kallás) para centrifugação, separação de Células Mononucleares Periféricas e devida criopreservação. Os pacientes com doença localizada foram coletados na noite anterior de sua operação de vesiculoprostatectomia radical. Os pacientes com câncer metastático foram coletados no ambulatório de Oncologia Clínica do Aparelho Geniturinário. Para controle foram aproveitados amostras de células mononucleares de 12 indivíduos normais. Todos consentiram antes da coleta do material mediante leitura e assinatura de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de São Paulo (Nº Processo CAPPesq#0525/10).

5.2 Métodos

5.2.1- Análise genômica - Dados Públicos (TCGA)

Para identificar expressão de retrovírus endógenos humanos (HERVs) da família K do banco público TCGA, utilizou-se uma plataforma pública: i) referência de Genoma Humano (versão hg19,GRCh37) obtida de UCSC (Universidade da Califórnia-Santa Cruz) [Genome Res. 2002 Jun;12(6):996-1006]; ii) informação obtida de transcriptoma humano do GENCODE (the reference human genome annotation for The ENCODE Project-v19)[Genome Res. 2012 Sep;22(9):1760-74]. iii) localização genômica (versão hg19/GRCh37) de HERV-K definido por RepeatMasker (www.repeatmasker.org), informação obtida a partir da página da UCSC. Apenas as sequências de HERV-K e/ou seus respectivos LTRs (Long Terminal Repeats) foram usados nesta triagem de expressão gênica. Baseado nos dados de RepeatMasker , foram obtidos 107 HERV-K (e LTRs-solo) localizados no cromossomo 22. Em seguida foi construída uma *pipeline* bioinformática baseada em escritos de *samtools*, *shell* e *Perl* (www.perl.org) de tal maneira a poder fazer a checagem da localização genômica de HERV-Ks/LTRs no mapeamento genômico de todos os dados de RNAseq (RNA sequenciado) das amostras de próstata. Os achados (*reads*) mapeados exatamente na posição genômica de HERV-K/LTRs foram filtrados de tal maneira a se evitar alinhamentos falso-positivos. Apenas os achados únicos mapeados e com controle de qualidade superior a 20 ($Q>20$) foram considerados (Figura 2). Esta pesquisa foi realizada para todas as 496 amostras de tumor de próstata do TCGA. Foi considerado positivo o achado de expressão de

HERV-K (ou LTR) quando houvesse mais de 1 achado em mais de uma amostra, como esquematizado na Figura 2.

Figura 2 - Esquema mostrando pareamento de leituras de RNA-seq expressas diretamente com o DNA

5.2.2 Separação de CMSP (Células Mononucleares de Sangue Periférico)

As CMSP foram separadas através do processo de diferença de gradiente de densidade por solução de *Ficoll-Paque Plus* (GE Healthcare). Em resumo, amostras de sangue total coletado em tubos de EDTA, Heparina ou ACD foram transferidas para tubos Falcon de 50 ml e diluídas em solução de HANK'S na proporção 1:1. Os homogeneizados foram transferidos para tubos Falcon contendo solução de Ficoll na proporção 1:3 de forma lenta e com a inclinação do tubo contendo solução de Ficoll em um ângulo de 30°. Em seguida os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 2.300 rpm em temperatura de 18 a 23 °C com aceleração e desaceleração 1. Após a centrifugação, a fase intermediária, contendo as CMSP, foi coletada e transferida

para um único tubo cônico de 50 ml. Ao conteúdo do tubo foi diluído em solução de HANK'S (q.s.p. 45 ml) e centrifugados por 10 min a 1700 rpm com aceleração e desaceleração 9. O sobrenadante foi descartado e o botão celular ressuspensionado em 45 ml de HANK'S para lavagem. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi submetido à lise das hemácias pela adição de 3 ml de solução de ACK, e incubação de 2 min à temperatura ambiente. Em seguida, a lise foi bloqueada pela adição de solução de HANK'S (q.s.p. 45 ml) e o tubo novamente centrifugado. Após o descarte, o botão celular foi ressuspensionado em 5 ml de HANK'S, para a contagem de células. Uma alíquota de 10 microlitros da suspensão celular foi misturada em 90 microlitros de solução de Azul de Tripán 0,4%; 10 microlitros dessa mistura foi transferida para a Câmara de *Newbauer*, e 4 quadrantes foram contados. Após o cálculo [(Total de células/nº quadrantes) x vol. suspensão x fator de diluição (10) x fator de correção da câmara (10^4)] obteve-se a quantidade de células viáveis totais. O tubo contendo as células foi centrifugado novamente, o sobrenadante desprezado e o botão celular ressuspensionado em solução de congelamento em uma concentração de 10×10^6 de células/ml. Cada alíquota de 1 ml foi armazenada no *freezer* -80°C dentro de um suporte de resfriamento progressivo (*stratacooler*) e após 24 horas foram transferidos para o tanque de nitrogênio líquido.

5.2.3 Avaliação de Resposta Imune Celular por ELISPOT

Quinze peptídeos sobrepostos por 11 aminoácidos correspondentes a respectivos consensos de proteínas da estrutura *gag* e *env* HERV-K foram usados na concentração final de 10 mcg/ml (fornecidos pela Divisão de Imunologia do

Departamento de medicina da Universidade de Toronto - vide sequência dos peptídeos no apêndice). Placas de nitrocelulose com 96 poços de base plana (Multiscreen, Milipore, Bedford, MA) foram semeadas com 0,5 mcg de anticorpo monoclonal anti-Interferon-Gama (Mabtech, Nacka, Suécia) incubados durante 1 hora a 4° C. As placas foram lavadas com PBS x 1 e então receberam 1.0×10^5 CMSP suspensas em meio RPMI 1640 suplementadas com penicilina, streptomina e adicionadas de 10% de soro fetal bovino (R10), dentro dos poços. O R10 também continha peptídeos *gag* e *env* p24, Ionomicina 1 mg/ml (controle positivo) e, 2,0 microlitros de 100% de DMSO em 5,0 microlitros (controle negativo). As placas foram incubadas por 16 horas na temperatura de 37° C em CO₂ 5%. Após este processo as células foram desprezadas fora. Pós 5 processos de lavagem das placas com PBST (1x PBS contendo 0,05% de Tween 20), 0,05 microgramas de anticorpo monoclonal biotilado anti Interferon-Gama (Mabtech) foi adicionado e as placas foram incubadas por posterior 2 horas em temperatura ambiente. Após 5 novas lavagens com PBST, 0,07 microgramas de fosfatase alcalina por poço (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) em 50 microlitros de PBS foi adicionado por 1 hora em temperatura ambiente. Após 5 lavagens adicionais com PBST, 50 microlitros de BCIP/NBT (%-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphato/Nitro Blue tetrazolium) de solução por poço foi adicionado e as placas foram reveladas por aproximadamente 30 minutos. Após este tempo se processou à contagem de pontos (spots) utilizando-se um leitor AID (AID, Alemanha), de tal maneira que as respostas específicas contra peptídeos de HERV-K foram consideradas como sendo o número de unidades formadoras de ponto (UFP)/ 1.0×10^6 células após subtração da quantidade residual de Interferon-Gama. As respostas foram consideradas positivas

quando o número de UFP excedesse 50 UFP por 1.0×10^6 células e fosse pelo menos 4 vezes o nível dos poços sem peptídeo HERV-K.

5.2.4 Citometria de Fluxo-Imunofenotipagem-Perfil de Ativação e Senescência celular

Para garantir a qualidade e bom controle dos experimentos, cada lote de experimento foi composto das três coortes pré-planejadas de pacientes com câncer de próstata localizado, câncer de próstata disseminado e grupo controle de indivíduos saudáveis, sendo que todo o experimento foi realizado no mesmo dia em todos estes coortes. Os painéis de anticorpos utilizados nestas análises foram definidos considerando as propriedades de cada molécula de anticorpo (Tabela 1). As populações linfocitárias foram selecionadas imunofenotipicamente com base na expressão das moléculas CD3, CD4 e CD8. O perfil ontogênico dos linfócitos foi determinado pela presença ou ausência de moléculas CD27, CD45RA e CCR7 e a ativação definida com base na expressão das moléculas CD38, CCR5 e HLA-DR na superfície celular dos linfócitos T CD4 e CD8 (Figura 3 A, B e C; e Tabela 2). O perfil de Senescência e Exaustão dos linfócitos T foram definidos com base na expressão das moléculas de superfície CD28, CD57, CD95 e PD1. Foi também examinado o perfil de células que expressam PD-L1 como um elemento muito importante de contra-regulação da inflamação e que na atualidade tem sido bastante explorado como agente de desligamento do sistema imune nas situações de escape tumoral e imunomodulação. O perfil de ontogenia linfocitária, ou seja o estudo das sub-populações envolvidas no processo de resposta imune, foi realizado com a

expressão combinada dos marcadores CD45RA+CD27+CCR7+, ficando as seguintes classificações: **células naïve** (CD45RA+CD27+CCR7+); **células de memória central** (CD45RA-CD27+CCR7+); **células de memória efetora** (CD45RA-CD27-CCR7-); **células de memória transitória** (CD45RA-CD27+CCR7-); **células de memória intermediária** (CD45RA+CD27+CCR7-) e **células efectoras terminais** (CD45RA+CD27-CCR7-). A avaliação do status de ativação e senescência foi avaliada em cada um destes estágios de ontogenia celular, tanto na população de células CD4+ como CD8+. Ou seja, cada fenótipo foi sobreposto na análise isoladamente e em combinação, de tal maneira a examinar-se a participação de cada um destes elementos no processo imune em relação à sua situação de ativação (processo agudo, resposta inflamatória em curso, local de trânsito dentro do processo, etc) bem como à sua situação de senescência (término da resposta imune, instalação de estado crônico de inflamação, desligamento da resposta imune, apoptose linfocitária, estado de tolerância, etc).

5.2.4.1 Marcação de Superfície Celular

As CMSP criopreservadas em nitrogênio líquido foram descongeladas em banho-maria a 37° C e transferidas para tubos de 15 ml contendo 9 ml de meio RPMI enriquecido (10% de Soro fetal Bovino, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 1 mM de penicilina/estreptomicina, 55 microM de 2-Mercaptoetanol, e 10 mM da solução de HEPES); estes foram centrifugados a 1700 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em 2 ml de RPMI enriquecido para contagem em *azul de tripan* 0,4% (10 microlítros de

amostra+10 microlítros do reagente). Após a contagem, foram separadas 1×10^6 células de cada paciente para cada painel de imunofenotipagem em alíquotas de 100 microlitros que foram distribuídas em uma placa de 96 poços com fundo “V”. A suspensão celular foi submetida a duas etapas de lavagem pela adição de 100 microl de solução tampão *MACS* [solução de PBS 1x contendo albumina de soro bovino (0,5%) e EDTA (2mM)] seguida de centrifugação a 1.700 rpm por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o botão de células foi homogeneizado com 100 microlitros da mistura de anticorpos monoclonais referente ao painel de ativação celular (Tabela 3) e de senescência (Tabela 4) e incubado a 4°C por 30 minutos, protegido da luz. Após incubação, foram realizadas duas etapas de lavagem com solução Tampão *MACS*, conforme descrito anteriormente. As amostras do painel de ativação celular foram fixadas com 200 microl de paraformaldeído (PFA) 1% e armazenadas no escuro a 4°C. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD LSRII Fortessa (*Becton Dickinson Immunodiagnostic Systems*, San Jose, CA, EUA). A compensação foi realizada com *beads* positiva e negativas (BD Biosciences), em que as *beads* positivas foram marcadas individualmente para cada fluorcromo utilizado.

5.2.4.2 Estratégias de Análise dos Dados de Citometria de Fluxo

Os dados gerados da aquisição no citômetro de fluxo foram analisados no programa *Flowjo* (TreeStar, San Carlos, California, USA). A definição dos *gates* foi baseada na análise dos tubos de FMO. Para o painel de ativação foram utilizados 6 tubos de FMO (CD27, CD38, CD45RA, HLA-DR, CCR5 e CCR7). Para o painel de

senescência foram utilizados 4 tubos de FMO (CD28, CD57, CD95 e PD1). As estratégias de análise utilizadas para o painel de ativação, senescência e diferenciação ontogênica dos linfócitos T estão apresentadas na Figura 3.

Figura 3 - Estratégia de análise de células TCD4+ e CD8+. Os dados foram analisados em gráficos *pseudocolor plot*, baseados nos seguintes parâmetros: **A)** parâmetros de qualidade-Time, Singlets, Vivos, Linfócitos T (CD3+), CD4 e CD8; **B)** o perfil de ontogenia, foi definido através da combinação booleana da expressão de CD27, CD45RA e CCR7 para identificar as diferentes subpopulações; **C)** o perfil de ativação foi analisado através da expressão de CD38, CCR5 e HLA-DR; **D)** o perfil de exaustão/ senescência através da expressão de CD28, CD57, CD95, PD1; **E)** a expressão de PD-L1 foi observada nas células apresentadoras de antígenos identificadas por HLA-DR x SSC-A, células T CD4+ e CD8+

5.2.4.3 Análise Estatística

O objetivo principal deste estudo foi determinar a resposta imune celular de pacientes com câncer de próstata contra peptídeos de retrovírus endógenos da família HERV-K comparando 3 coortes: 1-câncer de próstata localizado e sensível à castração; 2-câncer de próstata disseminado e resistente à castração e 3-grupo controle composto de indivíduos saudáveis e sem diagnóstico de câncer de próstata.

Como estudo auxiliar foi feita análise genômica da expressão de retrovírus endógeno da família HERV-K por bioinformática.

Como estudo correlato foi também analisado o estado de ativação celular e senescência celular de forma comparativa entre as diferentes coortes, com a hipótese de que haveria alguma diferença na resposta imune de HERV-K entre as diferentes coortes e que de alguma forma isso poderia estar correlacionado com possíveis diferenças nos estados de ativação ou senescência. Uma hipótese inicial seria a de encontrar correlação entre estados de maior ativação, menor senescência e maior probabilidade de se encontrar resposta imune celular, de tal maneira a compor um quadro coerente. Para tanto seriam feitas análises não-pareadas e pareadas entre os grupos em relação aos diferentes perfis de ativação e senescência de acordo com os agrupamentos ontogenéticos (designados posteriormente como sub-populações), segundo os marcadores de superfície celular analisados na citometria de fluxo, já descritos anteriormente. Para tanto utilizou-se o teste U de MannWhitney/Wilcoxon bi-caudal para a análise de significância estatística na comparação entre os 3 grupos, em análise não-paramétrica. A regressão logística univariada estava planejada para que se houvesse positividade relevante e significativa na resposta imune, esta seria

correlacionada com as diferenças entre as populações linfocitárias nas 3 diferentes coortes de pacientes.

Esta análise tinha por objetivo obter dados para geração de novas hipóteses, por entendermos que este estudo ainda teria caráter exploratório e porque o desfecho de análise mais importante em relação aos pacientes com doença localizada seria a sobrevida-livre de elevação do PSA. Com esta premissa consideramos ter estudado pacientes em número suficiente. No entanto este desfecho é relacionado ao tempo de seguimento, queneste momento ainda é, e portanto seria precoce qualquer outro estudo de correlação prognóstica. Neste sentido temos planejado no futuro reanalisar prospectivamente os achados de ativação e senescência linfocitárias como possíveis biomarcadores de sobrevida. Nesta ocasião tentaremos uma análise multivariada, levando-se em conta outros aspectos potencialmente confundidores dentro da equação, sobretudo as características prognósticas clássicas no câncer de próstata localizado, tais como grau de Gleason e estadiamento cirúrgico ⁽⁷⁴⁾. Em relação aos pacientes com doença disseminada, julgamos ser uma coorte pequena para análises multivariadas já que o desfecho mais importante aqui seria sobrevida global. No momento desta análise, a maioria destes pacientes ainda está viva. Também num futuro próximo, quando o desfecho de sobrevida estiver maduro, vamos arriscar uma análise de fatores prognósticos baseada no estado de ativação e senescência linfocitárias em sua correlação com a eficácia do tratamento de supressão androgênica, tempo para atingimento do estado de resistência à castração, benefício clínico e tempo de sobrevida destes pacientes.

Na análise realizada, então, diferenças intra e inter-grupos foi considerada estatisticamente significante quando $p < 0,05$. As análises seriam feitas utilizando

programa Stata versão 12 (StataCorp, College Station, TX) , Graph Pad Prism7.0 e SPICE. A construção das tabelas e gráficos foi feita pelos programas Graph Pad Prism 7.0 e SPICE.

Tabela 1 - Informações descrevendo a função e a finalidade de cada molécula caracterizada através dos painéis de citometria de fluxo

Marcadores de membrana	Funções	Finalidade
CD3	Proteína de superfície associadas ao Receptor de Células T (TCR).	Caracterização de linfócitos T
CD4	Proteína que participa da sinalização e adesão celular sendo um co-receptor de MHC de classe II.	Caracterização de linfócitos T CD4 auxiliares
CD8	Proteína que participa da sinalização e adesão celular sendo um co-receptor de MHC de classe I	Caracterização de linfócitos T CD8 citotóxicos
CD27	Proteína ligante do CD70, atua como co-estimulador para ativação de células T e B	Diferenciação ontogênica
CD45RA	Isoforma de CD45. Contém o exon A, que é uma tirosina fosfatase que participa do processo de sinalização celular	Diferenciação ontogênica
CCR7	Receptor das quimiocinas CCL19 e CCL21, participando do processo de migração das células para órgãos linfoides secundários	Diferenciação ontogênica
CD38	Ectoenzima multifuncional, glico-hidrolase NAD onde catalisa a Nicotinamida-adenina-dinucleotideo. Participa no processo de adesão celular, transdução de sinais e vias de sinalização	Ativação celular
HLA-DR	Molécula do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) Classe II. Se liga a peptídeos antigênicos de forma estável e apresenta-os na superfície celular	Ativação celular
CCR5	Proteína expressa em linfócitos T. Está associado a mecanismos mais gerais de ativação celular	Ativação celular
CD57	Rotineiramente usado para identificar células senescentes com reduzida capacidade proliferativa	Senescência e Exaustão
CD28	Receptor de membrana responsável pelo desligamento da resposta imune celular. Neste sentido é um receptor inibitório associado com perfis de exaustão celular	Senescência e Exaustão
CD95	Receptor da superfamília do TNF. Recebe o ligante de FAS e inicia apoptose celular	Senescência e Exaustão-apoptose
PD1	Um receptor do tipo <i>check-point</i> que atua inibindo a resposta celular continuada nas inflamações em geral. Importante nos mecanismos de redução da intensidade das respostas imunológicas anti-tumorais. Presente em populações de linfócitos T citotóxicos.	Senescência e Exaustão-apoptose
PD-L1	Ligante de PD1. Receptor de superfície que pode estar expresso em linfócitos e em células tumorais de vários tipos de tumores incluindo o câncer de próstata	Senescência e Exaustão-apoptose

*Fonte: Janeway 2002
Abbas 2007

Tabela 2 - Informações dos anticorpos e reagentes utilizados no painel de citometria de fluxo

	Fluorcromo	Clone	Catalogo	Empresa
CD3	PE CF594	UCHT1	562280	BD
CD4	APC H7	RPA-T4	560158	BD
CD8	BV 510	SK1	563919	BD
CD27	PE	M-T271	340425	BD
CD38	PerCP Cy 5.5	HIT2	551400	BD
CD45RA	FITC	HI100	555488	BD
CCR7	PE Cy7 3D12	3D12	557648	BD
HLA-DR	Alexa fluor 700	G46-6	560743	BD
CCR5	BV 711	2D7/CCR5	563395	BD
CD57	BV 605	NK-1	563895	BD
CD28	APC	CD28.2	559770	BD
CD95	PE Cy5	DX2	559773	BD
PD1				
PD-L1				
Viabilidade	UV	-	L34957	Invitrogen

6 RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 Análise demográfica e clínica das coortes pesquisadas

Tabela 3 - Características Demográficas dos pacientes e Grupo Controle

	Doença Localizada n=65	Doença Disseminada N=24	Grupo Controle N=12
Idade (mediana)	64 (45-81)	68 (52-80)	68(51-79)
Estadiamento			
pT3apN0	44%		
pT3bpN1	16%	-	-
pT2cpN0	20%		
pT3apN1	8%		
pT3bpN0	8%		
pT3bpNx	2%		
pT2apN0	2%		
PSA	14,9(3-99)	12 (0,002-343)	-
Grupos Étnicos			
Afro-descendentes	11,7%	8,3%	-
Caucasianos	60%	75%	100%
Mestiços	27,4%	12,5%	-
Asiáticos	-	4,17%	-

***Nota:** Pacientes com doença disseminada apresentam predominantemente metástases ósseas e linfonodais

6.2 Resultados de Análise genômica da expressão gênica de HERV-K

Para identificar os *loci* potencialmente ativos de HERV-K (transcritos), foi utilizada uma lista dos retrovírus endógenos mais recentemente integrados (e fixos) no genoma humano. HERV-K e *solo*-LTRs (LTR5_Hs). Através de um *pipeline* computacional atravessando coordenadas *RepeatMasker* no genoma de referência humano (GRCh37) e sequência de dados de RNAseq, foi possível identificar um grupo HERVs potencialmente transcritos: aproximadamente 17% da coorte de câncer de próstata localizado, analisados do TCGA (257 no total), apresentou pelo menos 2 ou mais achados de RNAseq provenientes de regiões contendo genes de HERV-K, sugerindo fortemente sua transcrição ou atividade. Para se evitar candidatos falso-positivos, apenas resultados positivos em elementos exclusivamente em HERV-K/LTR5_Hs foram utilizados.

6.3 Resultado de ELISPOT-Interferon gama contra peptídeos de HERV-K

Todos os pacientes e participantes do Grupo Controle foram analisados para ELISPOT-interferon Gama. Quase nenhuma resposta foi vista, dentro de nossos critérios de mais de 50 *spots* por paciente tanto em relação aos peptídeos relacionados ao exon *gag* ou *env*, da família de HERV-K, utilizando controles positivos e negativos. Este quadro está mostrado nas figuras 4 e 5. Pode-se notar apenas a presença de 50 *spots* em 2 pacientes para peptídeo de *gag* e *env* e 1 paciente com 80 *spots* para *env*. Estes achados em meio à maioria daqueles que atingiram menos de 20 *spots*, caracterizam um resultado negativo, ou pelo menos muito baixa responsividade ou ainda nenhuma responsividade podendo ser atribuídos os resultados apenas a achados falso-positivos, provavelmente.

Figura 4 - Eixo Y=Nº de spots. Eixo X= pacientes. Neste gráfico encontramos contagens de 50 *spots* em 2 pacientes, apenas. Um com doença localizada para *gag* (#15) e outro do grupo controle para *env* (#S3G6006)

Figura 5 - Eixo Y=Nº de spots. Eixo X= pacientes. Neste gráfico encontramos contagens acima do limiar de positividade -80 *spots*- contra *env* em um paciente com doença localizada

6.4 Resultado de avaliação de ativação e senescência linfocitária por citometria de fluxo

***Nota explicativa:**

1- Foi realizada análise em toda a população de linfócitos T CD4 e CD8 de forma regradada na seguinte sequência:

- i-* Prevalência das células com os diferentes marcadores isoladamente, em relação à ativação (CD38, CCR5 e HLA-DR) em toda a população de linfócitos. Posteriormente a mesma análise analisando co-expressão entre os diferentes marcadores.
- ii-* Prevalência das células com os diferentes marcadores isoladamente, em relação ao perfil de senescência/exaustão (CD28, CD57, CD95 e PD-1) em toda a população de linfócitos. Posteriormente a mesma análise analisando co-expressão entre os diferentes marcadores.
- iii-* Distribuição de cada grupamento de células com os marcadores específicos (isolados e em combinação) em relação às sub-populações de linfócitos em relação à sua ontogenia (Naïve, Memória Central, Memória transitória, Memória Intermediária, Memória Efetora e Memória Terminal Efetora) nas diferentes coortes estudadas.

2- Nesta sessão inicial estarão relatados apenas os achados estatisticamente significantes. O restante das tabelas e gráficos estarão dispostos no apêndice final.

6.4.1 Perfil de Diferenciação dos Linfócitos T CD4+

Figura 6 - Distribuição dos diferentes imunofenótipos entre as coortes , na população global de CD4

Tabela 4 - Distribuição dos diferentes imunofenótipos entre as coortes na população global de CD4

	Controle	Localizada	Disseminada	Valor P entre Localizada e Disseminada
Naïve	20,7	11,7	10,6	0,75
M.Central	13,6	12,8	17,4	0,046
M.Transitória	37	43,3	42,8	0,36
M.Intermediária	9,63	12,1	9,5	0,0079
M.Efetora	9,71	11,3	14,7	0,12
M.T.Efetora	0,33	0,42	0,42	0,44

Figura 6 e Tabela 4: Distribuição dos diferentes imunofenótipos em cada coorte analisada, mostrando que há diferença na participação de cada sub-população na ontogenia linfocitária, entre as diferentes coortes, sendo estas diferenças atribuíveis às diferenças nas sub-populações de **Memória Central** e **Memória Intermediária**. A comparação mostrou diferença estatisticamente significativa na comparação entre Controle e Localizada ($p=0,04$). Comparação entre Controle e Disseminada ($p=0,01$) e comparação entre Localizada e Disseminada ($p=0,001$). Uma análise inicial para examinarmos os diferentes estados de ativação nas diferentes coortes. Mann-Whitney U test, bicaudal.

6.4.1.1 Perfil de Ativação de Linfócitos T CD4+

A- Presença de maior ativação nas coortes de doença localizada versus doença disseminada para a marcação isolada de CD38 analisados na expressão individual dos marcadores CD38, CCR5 e HLA-DR

Gráfico 1 - Perfil de CD4 total, quando selecionado isoladamente por marcadores de ativação celular, na comparação entre as coortes

Tabela 5 - Comparação das medianas das porcentagens de linfócitos T CD4 selecionados para marcadores de senescência e exaustão, isoladamente.

	CD38+	CCR5+	HLA-DR+
Controle	3,8	4,9	2,39
Localizado	3,6	4,8	1,9
Disseminado	5,53	5,21	2,54
Valor p entre Local. e dissem.	0,0001	0,77	0,09

Gráfico 1 e Tabela 5: Mediana da porcentagem de células com os marcadores isoladamente analisados na população total de linfócitos T CD4+. Mann-Whitney U test bicaudal. Mostrando significância estatística com $p < 0,0015$ para os grupos de marcação isolada de CD38+

B- Maior prevalência de ativação linfocitária baseada em CD38 em todas as sub-populações linfocitárias, no grupo de doença disseminada

Gráfico 2 – Imunofenótipo selecionado isoladamente para CD38 na população global de CD4

Tabela 6 - Imunofenótipo selecionado isoladamente para CD38 na população global de CD4

	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	5,5	5,69	10,15	0,0015
M. Central	7,09	5,57	7,13	0,035
M. Transitória	2,65	2,3	3,99	<0,0001
M. Intermed.	5,16	6,11	10,45	0,0008
M. Efetora	1,33	0,98	2,70	<0,0001
M. Term. Efetora	3,61	2,0	4,61	0,0004

Gráfico 2 e Tabela 6: Diferenças estatisticamente significantes, mostrando aumento de ativação na coorte de doença disseminada quando examinadas pela marcação individual de CD38 em praticamente todas as sub-populações. Isoladamente, as coortes de Controle e Doença Localizada são muito parecidas e iguais do ponto de vista estatístico. Mann-Whitney U test bicaudal.

Quando examinamos a concomitância de CD38 com outros marcadores de ativação testadas (CCR5+HLA-DR; CD38+HLA-DR e CD38+CCR5), vemos o mesmo padrão de maior ativação nas coortes de doença disseminada, com significância estatística na maioria das sub-populações testadas, como mostrados nas figuras e tabelas colocadas no apêndice.

6.4.1.2 Perfil de Senescência/Exaustão de Linfócitos T CD4+

A- Presença de predominância de linfócitos T em perfil de senescência na coorte de doença disseminada, com significância estatística nos perfis que marcam CD57 e PD1. Expressão individual dos marcadores CD28, CD57, CD95 e PD-1

Gráfico 3 – Perfil de CD4 total, quando selecionado isoladamente por marcadores de senescência e exaustão, na comparação entre as coortes

Tabela 7 - Comparação das medianas das porcentagens de linfócitos T CD4 selecionados para marcadores de senescência e exaustão, isoladamente

	CD28+	CD57+	CD95+	PD1+
Controle	96,45	2,52	47,85	23,5
Localizada	97,6	2,24	54,8	24,3
Valor <i>p</i>	0,15	0,91	0,34	0,42
Controle	96,45	2,52	47,85	23,5
Disseminada	94,65	4,86	63,85	33
Valor <i>p</i>	0,34	0,053	0,14	0,07
Localizada	97,6	2,24	54,8	24,3
Disseminada	94,6	4,86	63,85	33
Valor <i>p</i>	0,0063	0,0047	0,06	0,042

Gráfico 3 e Tabela 7: Mediana da porcentagem de células com os marcadores isoladamente na população total de linfócitos T CD4+, mostrando significância estatística com $p < 0,05$ para a maioria dos marcadores de superfície com fenótipo de senescência e exaustão, também privilegiando a coorte de doença disseminada. Mann-Whitney U test bicaudal.

B- Estudo baseado em CD28 isoladamente mostrou maior senescência e exaustão na coorte de doença localizada em comparação com a doença disseminada

Gráfico 4 - Diferenças entre as sub-populações linfocitárias de CD4, quando selecionado isoladamente para CD28

Tabela 8 - Diferenças entre as sub-populações linfocitárias de CD4, quando selecionado isoladamente para CD28

	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	98,6	99,1	98,7	0,66
M. Central	99,2	99,6	99,6	0,39
M. Transitória	97,4	98,4	97,4	0,016
M. Intermed.	95,9	97,3	95,8	0,009
M. Efetora	85,9	91,6	75,4	0,0004
M. Term. Efetora	49,1	62	30,4	0,0028

Gráfico 4 e Tabela 8: Comparação das medianas em todas as sub-populações mostra maior porcentagem de linfócitos T CD4+CD28+ na coorte de doença localizada em comparação com a doença disseminada. Mann-Whitney U test, bicaudal para significância estatística de $p < 0,05$.

C- Estudo baseado em CD57 isoladamente mostrou maior senescência e exaustão na coorte de doença disseminada em comparação com a doença localizada

Gráfico 5 – Diferenças entre as sub-populações linfocitárias de CD4, quando selecionado isoladamente para CD57

Tabela 9 - Diferenças entre as sub-populações linfocitárias de CD4, quando selecionado isoladamente para CD57

	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	0,12	0,21	0,33	0,07
M. Central	0,24	0,30	0,38	0,21
M. Transitória	1,19	1,25	2,48	0,0014
M. Intermed.	0,52	0,52	2,31	<0,0001
M. Efetora	10,7	10,2	24,6	0,0017
M. Term. Efetora	42,9	35,2	74	0,021

Gráfico 5 e Tabela 9: Comparação das medianas em todas as sub-populações mostra maior porcentagem de linfócitos T CD4+CD57+ na coorte de doença disseminada em comparação com a doença localizada. Mann-Whitney U test, bicaudal para significância estatística de $p<0,05$.

D- Estudo baseado em CD95 isoladamente mostrou maior senescência e exaustão na coorte de doença disseminada em comparação com a doença localizada

Gráfico 6 - Diferenças entre as sub-populações linfocitárias de CD4, quando selecionado isoladamente para CD95

Tabela 10 - Diferenças entre as sub-populações linfocitárias de CD4, quando selecionado isoladamente para CD95

	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	1,53	1,68	2,86	0,0002
M. Central	55,3	55,7	68,7	0,0008
M. Transitória	81,4	77,5	84,6	0,0012
M. Intermed.	6,32	5,24	11,25	<0,0001
M. Efetora	67,8	65,6	69,1	0,91
M. Term. Efetora	42,3	33,5	39,2	0,32

Gráfico 6 e Tabela 10: Comparação das medianas em todas as sub-populações mostra maior porcentagem de linfócitos T CD4+CD95+ na coorte de doença disseminada em comparação com a doença localizada. Mann-Whitney U test, bicaudal para significância estatística de $p < 0,05$

E- Estudo baseado em PD1 isoladamente mostrou maior senescência e exaustão na coorte de doença disseminada em comparação com a doença localizada

Gráfico 7 – Diferenças entre as sub-populações linfocitárias de CD4, quando selecionado isoladamente para PD1

Tabela 11- Diferenças entre as sub-populações linfocitárias de CD4, quando selecionado isoladamente para PD1

	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	1,38	1,43	1,57	0,19
M. Central	10,5	10,7	12,3	0,11
M. Transitória	41,2	34,9	39	0,18
M. Intermed.	3,22	2,85	5,45	0,0021
M. Efetora	50,9	52,9	54	0,65
M. Term. Efetora	26,4	24	28	0,59

Gráfico 7 e Tabela 11: Comparação das medianas em todas as sub-populações mostra maior porcentagem de linfócitos T CD4+PD1+ na coorte de doença disseminada em comparação com a doença localizada. Mann-Whitney U test, bicaudal para significância estatística de $p < 0,05$. Nota-se, contudo, que somente houve significância estatística na sub-população de Memória Intermediária. No restante das sub-populações houve também a mesma tendência mas em escala bem menor se comparamos com os marcadores CD57 e CD95. Mann-Whitney U test bi-caudal para significância de $p < 0,05$.

Também na análise das sub-populações com co-expressão dos diferentes marcadores de senescência e exaustão, CD28, CD57, CD95 e PD1, houve basicamente manutenção dos padrões de maior porcentagem na coorte de doença disseminada e poucas alterações na comparação entre controle e doença localizada. Estes diferentes gráficos e tabelas podem ser encontrados na sessão de apêndice.

6.4.2 Perfil de Diferenciação dos Linfócitos T CD8+

Figura 7 – Distribuição dos diferentes imunofenótipos entre as coortes, na população global de CD8

Tabela 12 - Distribuição dos diferentes imunofenótipos entre as coortes, na população global de CD8

	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	7,54	9,01	8,4	0,74
M. Central	1,75	1,94	2,3	0,82
M. Transitória	25	24	20	0,49
M. Intermed.	7,92	10,3	10,2	0,37
M. Efetora	26,4	21,3	23,5	0,43
M. Term. Efetora	20,1	24,3	27,9	0,53

Figura 7 e Tabela 12: Distribuição dos diferentes imunofenótipos em cada coorte analisada, mostrando que há diferença na participação de cada sub-população na ontogenia linfocitária, entre as diferentes coortes. No entanto na análise estatística não houve diferença significativa em nenhuma sub-população que poderia explicar melhor esta distribuição distinta entre as coortes, como mostra a tabela acima. Uma análise inicial para examinarmos os diferentes estados de ativação nas diferentes coortes. Mann-Whitney U test, bicaudal.

6.4.2.1 Perfil de Ativação dos Linfócitos T CD8+

A- Maior ativação linfocitária na coorte de doença disseminada quando selecionados os linfócitos T CD8 isoladamente para CD38

Gráfico 8 – Perfil de CD8 total, quando selecionado isoladamente por marcadores de ativação celular, na comparação entre as coortes

Gráfico 9 - Perfil de CD8 total, quando selecionado isoladamente por marcadores de ativação celular, na comparação entre as coortes

Tabela 13 - Perfil de CD8 total, quando selecionado isoladamente por marcadores de ativação celular, na comparação entre as coortes

	CD38+	CCR5+	HLA-DR+
Localizada	2,01	24,3	4,97
Disseminada	4,95	22,5	6,34
Valor <i>p</i>	<0,0001	0,50	0,16

Gráfico 8, Gráfico 9 e Tabela 13: Comparação entre as medianas de porcentagem de linfócitos T CD8 selecionados para marcadores individuais de ativação, mostrando significância estatística favorecendo maior ativação na coorte de doença disseminada. Mann-Whitney U test bicaudal para significância de $p < 0,05$.

B- Distribuição da ativação linfocitária por marcador individual dentro das sub-populações

Gráfico 10 – Diferenças entre as sub-populações linfocitárias de CD8, quando selecionado isoladamente para CD38

Tabela 14 - Medianas da porcentagem dos linfócitos T CD8 marcados por CD38, distribuídos pelas sub-populações ontogenéticas

CD38	Controle	Localizada	Disseminada	Valor p entre local. e disseminada
Naive	1,6	1,6	3,2	<0,0001
M. Central	2,9	2,9	5,5	0,005
M. Transitória	1,6	1,5	3,7	0,0008
M. Intermed.	2,3	2,1	4,3	<0,0001
M. Efetora	2,6	1,5	5,3	<0,0001
M. Term. Efetora	3,5	2,3	4,4	0,0002

Gráfico 10 e Tabela 14: Dados mostrando que a maior ativação celular na coorte de doença disseminada apenas selecionados por CD38 se distribui por todos os imunofenótipos com significância estatística. Mann-Whitney U test bicaudal com $p<0,005$

*No restante das avaliações das diferenças entre as medianas das porcentagens dos linfócitos T CD8 das diferentes coortes selecionados por co-expressão dos marcadores de ativação, apareceram mais evidências de maior ativação na coorte de pacientes com doença disseminada. Estes gráficos e tabelas também podem ser vistos em seus detalhes na parte de apêndice.

6.4.2.2 Perfil de Senescência/Exaustão de Linfócitos T CD8+

A- Maior perfil de senescência e exaustão na coorte de doença disseminada, quando selecionamos a análise por marcação apenas de CD95

Gráfico 11 - Perfil de CD8 total, quando selecionado isoladamente por marcadores de senescência e exaustão, na comparação entre as coortes

Tabela 15 - Comparação das medianas das porcentagens de linfócitos T CD8 selecionados para marcadores de senescência e exaustão, isoladamente

	CD28+	CD57+	CD95+	PD1+
Controle	56	33	52	23
Localizada	56	35	53	24
Valor <i>p</i>	0,97	0,66	0,41	0,65
Controle	56	33	53	23
Disseminada	39	44	64	24
Valor <i>p</i>	0,47	0,68	0,24	0,67
Localizada	56	35	52	24
Disseminada	39	44	64	24
Valor <i>p</i>	0,18	0,11	0,007	0,92

Gráfico 11 e Tabela 15: Mediana da porcentagem de células com os marcadores isoladamente na população total de linfócitos T CD8+ mostrando significância estatística com $p < 0,05$ para apenas CD95, privilegiando a coorte de doença disseminada. Mann-Whitney U test bicaudal.

Gráfico 12 - Comparação entre a mediana das porcentagens dos linfócitos T CD8, selecionados para marcação de CD95

Tabela 16 - Dados da comparação entre a mediana das porcentagens dos linfócitos T CD8, selecionados para marcação de CD95

CD95	Controle	Localizada	Disseminada	Valor p entre local. e disseminada
Naive	2,33	2,04	2,46	0,12
M. Central	73,50	71,70	81,90	0,0035
M. Transitória	78,60	78,50	85,20	0,0006
M. Intermed.	66,60	51,20	62,0	0,041
M. Efetora	58,90	62,60	71,0	0,019
M. Term. Efetora	48,70	44,70	66,10	0,006

Gráfico 12 e Tabela 16: Os dados mostram que na comparação das medianas há evidência de maiores índices de senescência e exaustão para a coorte de doença disseminada em praticamente todas as sub-populações linfocitárias, exceto as células naive. Mann-Whitney U test, com significância para $p < 0,05$.

Na análise de co-expressão dos marcadores de senescência e exaustão na população de linfócitos CD8+ não houve a mesma regularidade em termos de predominância na corte disseminada ou localizada. Na verdade houve um padrão misto onde conforme a co-expressão estudada houve predomínio na coorte localizada e às vezes juntamente predomínio na coorte disseminada em diferentes subpopulações. Novamente estas tabelas e gráficos estão dispostos na sessão de apêndice.

6.4.3 PDL-1 está mais expresso nas coortes de Linfócitos T CD4 e em CD8 mas não em APCs e ocorrem em maior quantidade na coorte de doença disseminada

Gráfico 13 – Comparação entre as coortes quando selecionadas apenas para PD-L1 nas populações de linfócitos T CD4, CD8 e nas APCs

Tabela 17 - Comparação entre as coortes quando selecionadas apenas para PD-L1 nas populações de linfócitos T CD4, CD8 e nas APCs

	CD8	CD4	APC
Controle	0.41	0.009	0.46
Localizada	0.18	0.05	0.39
valor p	0.002	0.04	0.89
Controle	0.41	0.09	0.46
Disseminada	0.44	0.166	0.36
valor p	0.908	0.053	0.45
Localizada	0.18	0.05	0.39
Disseminada	0.44	0.166	0.36
valor p	<0.001	<0.001	0.24

Valor $\text{significante de } p < 0,05$. Teste de Mann-Whitney bicaudal

7 DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo foi interrogar se o sistema imune é capaz de reconhecer peptídeos de HERV-K em pacientes com câncer de próstata tanto em estágios precoces como em estágios avançados da doença, se de fato aceitarmos as evidências existentes de que há alguma expressão do gene da família HML-2 de HERV-K em linhagens celulares de câncer de próstata como sugerido pela literatura ⁽⁷⁵⁾ e de alguma forma corroborado por nosso estudo preliminar de análise genômica computacional de pacientes com câncer de próstata sequenciados e colocados no banco de dados publico do TCGA. Existe pesquisa que mostra haver sítios de ligação hormonal nos LTRs de retrovírus endógenos em vários LTRs de HERV-K em tumor de próstata bem como em linhagem celular de LNCaP ^(76, 77). Pesquisa estudando retroelementos em linhagem celular de câncer de próstata e em tecido tumoral de câncer de próstata encontrou expressão de HERV-K17 e HERV-K_22q11.23 especialmente restritos às linhagens celulares hormônio-sensíveis. Estes autores demonstraram que a expressão e a regulação androgênica requeria um segmento em seus Elementos Responsivos a Esteróides em seus LTRs. Nestes casos a ligação dos dímeros de receptor de androgênio com seu ligante nesta região fazia com que a expressão destes genes fosse androgênio-dependente. O mesmo fenômeno, aliás, acontece com câncer de mama ⁽⁵³⁾ e pode explicar os achados de maior expressão de HERV nestes tumores hormônio-sensíveis. Este aspecto tem especial relevância em nosso estudo porque tivemos a oportunidade de checar a resposta imune em duas coortes diferentes no que diz respeito à sensibilidade hormonal.

A coorte de pacientes com doença localizada tem seu status hormonal intacto com níveis normais de testosterona, ao passo que no grupo de pacientes com doença disseminada ocorre o contrário, ou seja, a supressão androgênica, exatamente como característica fundamental de seu tratamento. Teoricamente teríamos maior interação dos dímeros de androgênio com seus respectivos AREs (Androgen Responsive Elements) tanto nos genes relacionados à proliferação celular e todos os outros aspectos de funcionamento da célula prostática tumoral, assim como em relação aos promotores de HERV ao nível nuclear, como explicado anteriormente.

Um outro aspecto que necessita ser lembrado é que as mudanças do estado androgênico podem ter impacto diferencial na capacidade de resposta imune anti-HERV. Esta questão tem óbvia implicação conceitual em nosso estudo já que nosso objetivo principal é justamente testar a resposta imune. Mercader e cols.⁽⁷⁸⁾ mostraram em um estudo prospectivo e randomizado que pacientes com câncer de próstata sendo tratados com supressão androgênica antes da prostatectomia radical, tinham infiltração pronunciada de linfócitos T na próstata, principalmente na contagem de células CD4+ quando comparado com pacientes não-castrados. Este mesmo estudo mostrou que esta população de linfócitos T não parece ser inespecífica. Estudos de restrição de TCR (T Cell Receptor) mostrou tratar-se de infiltração oligoclonal, sugestiva de ser direcionada a antígenos associados ao câncer de próstata. Tem também sido demonstrado que mesmo na supressão androgênica de longo-prazo antes da prostatectomia radical, ocorria infiltração linfocitária, após supressão androgênica de até 9 meses de duração^(79, 80). Estudos mostram que em até 29% dos pacientes com câncer de próstata há comprovação de resposta imune contra vários antígenos-associados ao câncer após supressão hormonal⁽⁸¹⁾. Respostas imune

humoral e celular contra receptor de androgênio têm sido também encontradas em 13 a 18% de pacientes com câncer de próstata independente do estadiamento e do status hormonal ⁽⁸²⁾, trazendo inclusive o conceito de que mesmo o receptor de androgênio pode ser um antígeno a ser explorado em protocolos de imunoterapia. Encontramos também outras evidências de acionamento de resposta imune específica após radioterapia, com ou sem supressão androgênica associada ^(81, 83).

Portanto há evidência suficiente que dê suporte ao conceito do câncer de próstata como sendo um modelo a ser explorado em relação à imunomodulação na medida em que pacientes são capazes de desencadear resposta humoral e celular contra antígenos-associados ao câncer. Com a intenção de testar o mesmo fenômeno contra peptídeos associados ao HERV-K-HML-2, realizamos nosso estudo testando imunidade celular pelo método de medir a secreção de interferon-gama através de ELISPOT. Nossos resultados foram negativos em todas as coortes, o que então significa que neste experimento não há resposta imune contra os peptídeos de HERV-K, ou seja, mesmo que HERV-K tenha algum grau de expressão em câncer de próstata, nesta análise exploratória não houve reconhecimento imunológico, sendo improvável que HERV-K seja um bom candidato para exploração de medidas de imunomodulação. Uma conclusão equivalente a isso seria dizer que na realidade trata-se de um antígeno pouco imunogênico, ou pouco sensível para desencadear resposta imune. Uma outra consideração seria indagar se haveria necessidade de seleção de pacientes com determinadas classes restritas de HLA de classe I, exigindo conformação de moléculas MHC específicas. Em nosso estudo não fizemos restrição de HLA. Dos poucos estudos que levantamos, nominalmente em tumores germinativo ⁽⁶¹⁾, câncer de mama ⁽⁵⁶⁾, câncer de ovário ⁽⁶²⁾ e mesmo câncer de

próstata ⁽⁵⁷⁾, o único que selecionou pacientes por restrição de HLA foi o estudo em câncer germinativo. Mesmo assim selecionou pacientes com fenótipos HLA bastante prevalentes. Portanto neste sentido não tínhamos percebido nenhuma necessidade de fazermos nenhum tipo de restrição para HLA/Sistema MHC.

Alguns comentários críticos devem ser feitos em relação a estes resultados, a começar pelo método escolhido-ELISPOT. ELISPOT juntamente com o método de coloração intracitoplasmática de citoquinas com análise por Citometria de Fluxo, são os dois métodos mais importantes para medir a presença de citoquinas em linfócitos T ou qualquer outra célula que participe da resposta imune, após exposição a um determinado antígeno. Em ambos os métodos, a ativação induzida pelo antígeno e posterior diferenciação das células T ocorre supostamente *in vivo*. CMSP destes indivíduos é re-estimulado na presença destes antígenos e testado para a produção de citoquinas *in vitro*. No caso de ELISPOT, estas CMSP são isoladas de sangue fresco, cultivadas em poços de plástico preenchidos por anticorpo específico contra a citoquina que se quer medir. Posteriormente submete-se a um segundo cultivo com anticorpo marcado para haver então a contagem dos *spots* ^(84, 85). Algumas premissas importantes devem constar. Quando se estuda a citoquina interferon-gama, assume-se que o tipo de resposta imune seja do tipo Th1, ou seja aquela resposta que justamente depende da secreção de Interferon-gama pelo linfócito T. Este fenômeno ocorre, de acordo com o conhecimento da imunologia básica, justamente no processo imune contra patógenos intracelulares, sobretudo partículas virais e também tumores. Na literatura é o ensaio que se utiliza no seguimento de resposta após vacinação contra infecções virais (influenza, p.ex.) ou mesmo na investigação de vacinas contra o HIV ⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾. Em estudos com animais as citoquinas Th1 parecem promover resposta

celular anti-tumoral ⁽⁸⁹⁾. Este tipo de estudo corrobora seguir nesta linha e pesquisar secreção de interferon-gama como evidência de resposta imune anti-tumoral, sobretudo porque se tratam de peptídeos de retrovírus endógenos, que guardam semelhança com HIV, uma infecção viral passível de ser avaliada em sua resposta por INF-Gama-ELISPOT. No entanto há uma série de estudos em humanos que mostram que a resposta imune antitumoral ocorre via perfil Th2 com secreção de outras citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13) ⁽⁹⁰⁾. Este fenômeno tem sido estudado em tumores de pâncreas e tumores renais, com predominância de resposta Th2 no sangue periférico destes pacientes ^(91, 92). Estudos como este apontam para o fato de que este viés em direção à resposta Th2 pode tornar avaliação com ELISPOT-Interferon gama indetectável ou frustrado em certas circunstâncias. Não sabemos se esta seria uma possível explicação para termos obtido resultado praticamente desprezível em nossas coortes. Uma hipótese nestes casos é que há participação de TGF-beta, que consegue desviar para Th2 através de IL-10 como citocina intermediária e que talvez em uma situação de menor estímulo, seria uma citocina mais importante. Isto é parte, inclusive do mecanismo imunossupressor de TGF-beta ^(89, 93). Existem vários mecanismos pelos quais o câncer da próstata pode evadir-se do sistema imunológico. Pode haver perda gradual de antígenos, promoção de apoptose linfocitária precoce através da ação de células Treguladoras ou mesmo acúmulo de células que expressam PD-L1 ⁽⁹⁴⁾. Uma outra consideração muito atual deve ser cogitada como uma das explicações de nossa falta de resposta imune celular. Trata-se do fenômeno conhecido como o de maior expressão de checkpoints (CTLA-4 e PD-L1) nas células imunológicas. Estas moléculas de superfície são responsáveis pelo freio da resposta imune. Miller e cols. mostraram que o câncer da próstata se

associa com acúmulo de linfócitos T reguladores no sangue e no ambiente tumoral e este fato se correlaciona inversamente aos estádios mais avançados do câncer bem como a sobrevida dos pacientes ⁽²⁴⁾. Outras células potencialmente responsáveis pelo fenômeno de escape tumoral do sistema imune são as MDSC (myeloid-derived suppressor cells), que estão aumentadas nas situações de tumores de próstata mais avançados e que podem tornar os tumores não-responsivos aos antígenos que são pertinentes ⁽⁹⁵⁾. Todos estes elementos podem estar por trás desta espécie de anergia linfocitária contra os antígenos de HERV-K. Em relação ao nosso estudo de ativação celular, não pudemos fazer nenhuma correlação com o resultado da resposta imune, na medida em que esta foi praticamente irrelevante. Mas mesmo assim pudemos observar um aspecto interessante quando comparamos as diferentes coortes. As subpopulações linfocitárias referem-se aos diferentes estágios dentro do espectro da resposta imune, começando pelo linfócito T naíve, como sendo a célula que habita preferencialmente os órgãos linfóides onde faz o primeiro contato com seu antígeno cognato ⁽⁹⁶⁾. A partir deste contato, os linfócitos se diferenciam em células efetoras, quando há o antígeno presente a ser “combatido”, ou então em células de memória, que mantêm a capacidade de expandir rapidamente quando entram em contato novamente com o seu antígeno que a sensibilizou ⁽⁹⁷⁾. As diferentes fases deste processo podem ser identificadas pela presença dos diferentes marcadores celulares de superfície, que foram estudados por citometria de fluxo, de tal maneira a didaticamente poderem ser classificados nas células de memória central, memória transitória, memória intermediária e mais tardiamente nas células de memória efetora e terminal efetora, já nas fases finais de execução dos fenômenos responsáveis pelo êxito desta resposta imune ^(98, 99). Em nosso experimento de imunofenotipagem

linfocitária encontramos aumento dos marcadores de ativação, incluindo células de memória transitória e intermediária, assim como memória efetora e terminal efetora, caracterizada por um ambiente de ativação imunológica geral, maior na coorte de doença disseminada, caracterizando bem a situação de grande oferta antigênica associada ao câncer de próstata nesta situação como ilustrada na Figura 6, no caso da população de linfócitos T CD4. No caso dos fenótipos de senescência e exaustão caracterizados pela marcação individual de CD57, CD95, CD28 e PD1, observamos um quadro mais misto embora ainda com maior porcentagem destes imunofenótipos também na coorte de doença disseminada. Neste caso o raciocínio seria de que estas células após período de constante ativação caminariam para fenótipos de exaustão, marcando o final da resposta imune, com células entrando em apoptose ou em estado já de senescência com reduzida ativação, ou seja reduzida atividade imunológica, a exemplo do que encontramos em infecções crônicas. A verdade é que a presença de células em estado de exaustão contribuem para a tolerância periférica e moderam a resposta imune. São mecanismos fisiológicos importantes contra a auto-imunidade⁽¹⁰⁰⁾ e que também podem contribuir para a insensibilidade linfocitária contra antígenos associados a tumor em geral, e que também poderia incluir insensibilidade às proteínas e retrovírus endógenos. Neste sentido, no contexto de câncer disseminado as células T se tornam exaustas/disfuncionais, com capacidade de proliferação defeituosa bem como redução na produção de citocinas^(101, 102).

Como não houve em nossas análises praticamente nenhuma resposta imune contra proteínas de HERV-K, não pudemos estabelecer nenhuma correlação entre resposta imune e os diferentes estados de ativação celular. Um aspecto muito importante deve ser ressaltado, no entanto, a partir de nossos dados, e que se refere à

maior expressão de PD-L1 na coorte de doença disseminada em comparação com a doença localizada. Este fenômeno de maior concentração de células que expressam PD-L1 nas fases avançadas podem também ajudar a entender a condição de tolerância ao antígeno de HERV-K e justificar a utilização de metodologias de imunomodulação bloqueadoras de PD-L1 justamente nos pacientes com doença avançada. Neste sentido seria importante fazer-se a análise diferencial dentro da coorte de doença avançada entre os pacientes com situação castração sensível daqueles com castração resistente. Talvez o interesse de utilizar este tipo de imunomodulação pode mudar se houver diferença nesta expressão entre um grupo e outro. Este aspecto permanece para ser melhor elucidado em coortes maiores. Mas tem importante implicação prática na clínica. Uma observação importante que podemos fazer é o fato de vermos maior senescência na doença disseminada. Uma interrogação imediata decorrente desta observação é relacionar uma coisa à outra. Ou seja, será que o status de senescência é parcialmente responsável pela disseminação ? Será que há algum elo causal nisso, ou seja, quanto maior a senescência, maior a tolerância anti-tumoral e maior a chance de disseminação ? Uma forma de seguirmos nesta indagação será examinarmos este aspecto naqueles pacientes com doença localizada que venham a recair com elevação do PSA. A comparação do grau de senescência na população que recidiva em comparação com a população que não recidiva poderia dar pistas adicionais nesta linha de pesquisa.

8 CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

- 1- Existe expressão gênica de HERV-K em genoma de câncer de próstata, como já demonstrado na literatura e por nós corroborado em estudo de análise genômica.
- 2- Esta expressão gênica, em nossa avaliação não foi suficiente para eliciar resposta célula imune contra proteínas de HERV da família K-HML-2. Neste sentido se há alguma resposta celular citotóxica, esta é fraca seja por mecanismos de imunossupressão mediados por maior expressão de PD-L1 pelas células tumorais ou por células imunes mononucleares, assim como quaisquer dos mecanismos mencionados anteriormente que podem explicar não-responsividade imunológica contra antígenos tumorais.
- 3- O câncer de próstata se caracteriza, do ponto de vista imunológico periférico, como tendo maior ativação e maior estado de exaustão nas fases mais avançadas de doença. Isso pode ter implicações práticas importantes em função dos mecanismos de ativação e sobretudo de exaustão, se forem baseados em mecanismos que podem ser modulados com imunoterapia, como é o caso da expressão de PD1 e PD-L1, mais pronunciada nas fases avançadas.
- 4- Interessante será acompanharmos a evolução da doença na coorte de pacientes com doença localizada para vermos se haverá correlação entre senescência e recidiva bioquímica (elevação do PSA).

9 ANEXOS

9 ANEXOS

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO- HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: “Resposta imune ao HERE em pacientes com câncer de próstata”

Pesquisador Principal: DR. ESPER GEORGES KALLÁS, CRM/SP 67395

Pesquisador Executante: Dr. Carlos Dzik

Departamento de Clínica Médica/Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia:
LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO MÉDICA LIM-60

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐ RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA :

1 – Desenho do Estudo e Objetivo

O câncer de próstata é a segunda maior causa de mortalidade relacionada a tumor no homem. Muitos pacientes não se curam pela retirada da próstata por cirurgia ou radioterapia, e seus cânceres voltam ou só são diagnosticados após espalharem pelo corpo. O crescimento tumoral é inicialmente dependente de hormônios masculinos (andrógenos) e o bloqueio desses hormônios causa sua regressão. Contudo, muitos homens não obtêm sucesso com esse tratamento e morrem de câncer de próstata.

Alguns estudos têm demonstrado que alguns elementos virais, chamados de retro-elementos endógenos humanos (HEREs) são expressos em cânceres, e mais recentemente, foi verificada sua relação com alguns cânceres de próstata.

Baseado em nossos dados preliminares que demonstraram que HEREs são expressos em alguns casos de câncer de próstata e que existe resposta de defesa ao HERE nesses pacientes, pretendemos avaliar a resposta ao HERE (resposta imune) no sangue de pacientes com câncer de próstata e comparando a homens sem câncer de próstata. Desta forma, esperamos encontrar uma maior frequência de resposta imune ao HERE nos pacientes que não respondem ao tratamento.

Nós acreditamos que o estudo aqui proposto contribuirá para uma melhor compreensão dos aspectos imunológicos relacionados com o câncer de próstata contra o HERE com o potencial de ajudar no tratamento.

Para a realização deste estudo precisamos analisar as células imunológicas do sangue periférico bem como o tecido da próstata de pessoas que tem câncer de próstata e comparar com pessoas que não tem câncer de próstata.

Se você é portador de um câncer de próstata, a sua operação será apenas a da retirada da próstata e o seu caso será analisado no grupo de pacientes com câncer de próstata.

2 – Procedimentos de Pesquisa

Após ter sido esclarecido sobre o estudo, você poderá decidir se deseja ou não participar. Se decidir participar, você será solicitado a assinar o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** ou colocar suas impressões digitais em frente a uma testemunha de sua confiança. Uma cópia deste documento lhe será fornecida. Sua participação consistirá de uma visita médica no dia anterior à sua cirurgia quando você for internado, onde será realizada uma consulta médica para obter dados clínicos a serem analisados conjuntamente com os resultados dos testes laboratoriais de sangue realizados com 80 ml de sangue (equivalente a um terço de um copo de requeijão) coletados por uma agulha esterilizada descartável que será introduzida na veia no braço (procedimento rotineiro).

Você está sendo convidado porque seu médico indicou que será submetido a uma cirurgia onde será retirada a sua próstata. Iremos avaliar um pequeno fragmento da próstata que será retirada e uma amostra de sangue que será colhida se concordar em participar deste estudo, após a assinatura deste **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**.

3 – Relação dos Procedimentos

Assinatura do **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** para coleta de 90 ml de sangue periférico com auxílio de agulha descartável e tubos a vácuo. Também será obtido um fragmento da próstata, logo após a retirada através da cirurgia prevista. A retirada deste pequeno fragmento será realizada por patologista experimentado em técnicas de congelamento para assegurar que o fragmento de interesse tenha tecido tumoral que vai ser analisado e ao mesmo tempo para assegurar que não vai haver nenhum prejuízo para a análise final da patologia.

4 - Desconfortos e Riscos Esperados

Os riscos relacionados com sua participação são mínimos. Algumas pessoas referem dor no local da punção venosa e sensação de desmaio e raramente ocorrem complicações como formação de hematomas ou infecções locais.

5 - Benefícios para o Participante

Não existe nenhum benefício direto a você por participar neste estudo, mas as informações obtidas de sua participação poderão beneficiar no futuro outras pessoas dependendo das conclusões do estudo. Você não terá despesas pessoais incluindo exames e consultas. Despesas adicionais serão absorvidas pelo orçamento da pesquisa. Não haverá compensação financeira.

6 – Procedimentos Alternativos e/ou Experimentais^[1]_{SEP} Você não será submetido a nenhum procedimento experimental neste estudo. Como não se trata de estudo relacionado a possíveis tratamentos, não existem procedimentos alternativos a serem descritos.

7 – Garantia de Acesso aos Pesquisadores

Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O pesquisador do estudo é Esper Georges Kallás, que pode ser encontrado na Rua Dr Arnaldo, 455 3o andar, SP. Tel: 3061-8314 e 3061-8315. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225-5º andar, tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX 2661 6442 ramal 26 São Paulo - SP

e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br .

8 – Voluntariedade

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

9 – Direito de Confidencialidade

A confidencialidade das informações obtidas nesse estudo será garantida e os dados obtidos serão analisados em conjunto com os de outros voluntários, não sendo divulgada a identificação do voluntário. Sua participação neste estudo é confidencial e sigilosa. A menos que seja exigido por lei, somente a equipe de estudo, Comitês de Ética em Pesquisa e Investigadores das agências regulatórias governamentais poderão ter acesso direto aos registros médicos para verificar as informações do estudo. O material e os dados coletados durante este projeto só serão utilizados para esta pesquisa.

10 – Direito de ser mantido atualizado quanto aos resultados da pesquisa Os dados obtidos com a realização deste estudo estarão à disposição dos voluntários sem que o sigilo de cada participante seja prejudicado.

11 – Despesas e Compensações

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dano pessoal com nexos causal comprovado, o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu discuti com o médico responsável sobre minha decisão em participar nesse estudo.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos pertinentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Nome completo do voluntário/representante legal

Assinatura do voluntário/representante legal

Nome completo da testemunha

Assinatura da testemunha para casos de voluntário analfabetos, semi-analfabetos ou portadores.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o **Termo de** deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Prof. Dr. Esper Georges Kallás/Dr. Carlos Dzik

Assinatura do responsável pelo estudo

_____ Data

_____ Data

_____ Data

_____ Data

De deficiência auditiva ou visual.

Consentimento Livre e Esclarecido _____ Data

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL 1.

NOME.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE No : SEXO : M ☐ F ☐ ^[L]_[SEP]

DATA NASCIMENTO:/...../..... ^[L]_[SEP]

ENDEREÇO No APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:.....TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:..... No..... APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP:.....TELEFONE: DDD ().....

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO- HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: “Resposta imune ao HERE em pacientes com câncer de próstata”

Pesquisador Principal: DR. ESPER GEORGES KALLÁS, CRM/SP 67395

Pesquisador Executante: Dr. Carlos Dzik

Departamento de Clínica Médica/Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia:

LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO MÉDICA LIM-60

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐ RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA:

1 – Desenho do Estudo e Objetivo

O câncer de próstata é a segunda maior causa de mortalidade relacionada a tumor no homem. Muitos pacientes não se curam pela retirada da próstata por cirurgia ou radioterapia, e seus cânceres voltam ou só são diagnosticados após espalharem pelo corpo. O crescimento tumoral é inicialmente dependente de hormônios masculinos (andrógenos) e o bloqueio desses hormônios causa sua regressão. Contudo, muitos homens não obtêm sucesso com esse tratamento e morrem de câncer de próstata.

Alguns estudos têm demonstrado que alguns elementos virais, chamados de retro-elementos endógenos humanos (HEREs) são expressos em cânceres, e mais recentemente, foi verificada sua relação com alguns cânceres de próstata.

Baseado em nossos dados preliminares que demonstraram que HEREs são expressos em alguns casos de câncer de próstata e que existe resposta de defesa ao HERE nesses pacientes, pretendemos avaliar a resposta ao HERE (resposta imune) no sangue de pacientes com câncer de próstata e comparando a homens sem câncer de próstata. Desta forma, esperamos encontrar uma maior frequência de resposta imune ao HERE nos pacientes que não respondem ao tratamento.

Nós acreditamos que o estudo aqui proposto contribuirá para uma melhor compreensão dos aspectos imunológicos relacionados com o câncer de próstata contra o HERE com o potencial de ajudar no tratamento.

Para a realização deste estudo precisamos analisar as células imunológicas do sangue periférico bem como o tecido da próstata de pessoas que tem câncer de próstata disseminado pelo corpo e que está recebendo tratamento hormonal.

2 – Procedimentos de Pesquisa

Após ter sido esclarecido sobre o estudo, você poderá decidir se deseja ou não participar. Se decidir participar, você será solicitado a assinar o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** ou colocar suas impressões digitais em frente a uma testemunha de sua confiança. Uma cópia deste documento lhe será fornecida. Sua participação consistirá de uma visita médica no dia anterior à sua cirurgia quando você for internado, onde será

realizada uma consulta médica para obter dados clínicos a serem analisados conjuntamente com os resultados dos testes laboratoriais de sangue realizados com 80 ml de sangue (equivalente a um terço de um copo de requeijão) coletados por uma agulha esterilizada descartável que será introduzida na veia no braço (procedimento rotineiro).

Você está sendo convidado porque seu médico indicou que você tem câncer de próstata que se disseminou pelo seu organismo e por esta razão você está recebendo tratamento hormonal. Uma amostra de sangue será colhida se você concordar em participar deste estudo, após a assinatura deste **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**.

3 – Relação dos Procedimentos

Assinatura do **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** para coleta de 90 ml de sangue periférico com auxílio de agulha descartável e tubos a vácuo.

4 - Desconfortos e Riscos Esperados

Os riscos relacionados com sua participação são mínimos. Algumas pessoas referem dor no local da punção venosa e sensação de desmaio e raramente ocorrem complicações como formação de hematomas ou infecções locais.

5 - Benefícios para o Participante

Não existe nenhum benefício direto a você por participar neste estudo, mas as informações obtidas de sua participação poderão beneficiar no futuro outras pessoas dependendo das conclusões do estudo. Você não terá despesas pessoais incluindo exames e consultas. Despesas adicionais serão absorvidas pelo orçamento da pesquisa. Não haverá compensação financeira.

6 – Procedimentos Alternativos e/ou Experimentais^[1] Você não será submetido a nenhum procedimento experimental neste estudo. Como não se trata de estudo relacionado a possíveis tratamentos, não existem procedimentos alternativos a serem descritos.

7 – Garantia de Acesso aos Pesquisadores

Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O pesquisador do estudo é Esper Georges Kallás, que pode ser encontrado na Rua Dr Arnaldo, 455 3o andar, SP. Tel: 3061-8314 e 3061-8315. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225-5º andar, tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX 2661 6442 ramal 26 São Paulo - SP

e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br .

8 – Voluntariedade

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

9 – Direito de Confidencialidade

A confidencialidade das informações obtidas nesse estudo será garantida e os dados obtidos serão analisados em conjunto com os de outros voluntários, não sendo divulgada a identificação do voluntário. Sua participação neste estudo é confidencial e sigilosa. A menos que seja exigido por lei, somente a equipe de estudo, Comitês de Ética em Pesquisa e Investigadores das agências regulatórias governamentais poderão ter acesso direto aos registros médicos para verificar as informações do estudo. O material e os dados coletados durante este projeto só serão utilizados para esta pesquisa.

10 – Direito de ser mantido atualizado quanto aos resultados da pesquisa Os dados obtidos com a realização deste estudo estarão à disposição dos voluntários sem que o sigilo de cada participante seja prejudicado.

11 – Despesas e Compensações

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dano pessoal com nexos causal comprovado, o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu discuti com o médico responsável sobre minha decisão em participar nesse estudo.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos pertinentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Nome completo do voluntário/representante legal

Assinatura do voluntário/representante legal

Nome completo da testemunha

Assinatura da testemunha para casos de voluntário analfabetos, semi-analfabetos ou portadores.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o **Termo de** deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Prof. Dr. Esper Georges Kallás/Dr. Carlos Dzik

Assinatura do responsável pelo estudo

_____ Data

_____ Data

_____ Data

_____ Data

De deficiência auditiva ou visual.

Consentimento Livre e Esclarecido _____ Data

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL 1.

NOME.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE No : SEXO : M ☐ F ☐ ^[1]_{SEP}

DATA NASCIMENTO:/...../..... ^[1]_{SEP}

ENDEREÇO No APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:.....TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐ ^[1]_{SEP}

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO:..... No..... APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP:.....TELEFONE: DDD ().....

Anexo B - APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0525/10

Título: Resposta Imune ao HERE em pacientes com câncer de próstata

Pesquisador Responsável: Esper Georges Kallás

Pesquisador Executante: Esper Georges Kallás

Disciplina: Imunologia Clínica e Alergia

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 06/04/2016, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

- Carta datada de 16/03/2016 - Relatório parcial.
- Carta datada 17/03/2016 - Protocolo versão 3.1 de 16/03/2016 - termo de consentimento livre e esclarecido de 16/03/2016 para doença disseminada.

CAPPesq, 06 de Abril de 2016

Prof. Dr. Alfredo José Mansur
Coordenador

Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Anexo C - APROVAÇÃO DE EMENDA PELA COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0525/10

Título: Resposta Imune ao HERE em pacientes com câncer de próstata

Pesquisador Responsável: Esper Georges Kallás

Pesquisador Executante: Esper Georges Kallás

Disciplina: Imunologia Clínica e Alergia

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 16/09/2015, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

- Carta datada de 02.09.15 - Protocolo versão 3.1 de 01.09.15; Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão de 01.09.15 e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Biobanco versão de 29.05.15.

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)** apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

CAPPesq, 16 de Setembro de 2015

Prof. Dr. Joel Faintuch
Vice-Coordenador

**Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq**

10 REFERÊNCIAS

10 REFERÊNCIAS

1. Rebbeck TR, Devesa SS, Chang BL, Bunker CH, Cheng I, Cooney K, et al. Global patterns of prostate cancer incidence, aggressiveness, and mortality in men of african descent. *Prostate Cancer*. 2013;2013:560857.
2. Hsing AW, Tsao L, Devesa SS. International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer*. 2000;85(1):60-7.
3. Kvåle R, Auvinen A, Adami HO, Klint A, Hernes E, Møller B, et al. Interpreting trends in prostate cancer incidence and mortality in the five Nordic countries. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(24):1881-7.
4. Zhou CK, Check DP, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Ferlay J, et al. Prostate cancer incidence in 43 populations worldwide: An analysis of time trends overall and by age group. *Int J Cancer*. 2016;138(6):1388-400.
5. Neppl-Huber C, Zappa M, Coebergh JW, Rapiti E, Rachtan J, Holleczeck B, et al. Changes in incidence, survival and mortality of prostate cancer in Europe and the United States in the PSA era: additional diagnoses and avoided deaths. *Ann Oncol*. 2012;23(5):1325-34.
6. Bray F, Lortet-Tieulent J, Ferlay J, Forman D, Auvinen A. Prostate cancer incidence and mortality trends in 37 European countries: an overview. *Eur J Cancer*. 2010;46(17):3040-52.
7. Litwin MS, Tan HJ. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA*. 2017;317(24):2532-42.
8. Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, Ward E, Ferlay J, Brawley O, et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol*. 2012;61(6):1079-92.

9. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int.* 2002;90(2):162-73.
10. Baade PD, Youlden DR, Krnjacki LJ. International epidemiology of prostate cancer: geographical distribution and secular trends. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53(2):171-84.
11. Nakata S, Sato J, Imai K, Yamanaka H, Ichinose Y. Epidemiological characteristics of prostate cancer in Gunma Prefecture, Japan. Gunma University Urological Oncology Study Group. *Int J Urol.* 1995;2(3):191-7.
12. Boorjian SA, Karnes RJ, Rangel LJ, Bergstralh EJ, Blute ML. Mayo Clinic validation of the D'amico risk group classification for predicting survival following radical prostatectomy. *J Urol.* 2008;179(4):1354-60; discussion 60-1.
13. Bolla M, de Reijke TM, Van Tienhoven G, Van den Bergh AC, Oddens J, Poortmans PM, et al. Duration of androgen suppression in the treatment of prostate cancer. *N Engl J Med.* 2009;360(24):2516-27.
14. Bolla M, Collette L, Blank L, Warde P, Dubois JB, Mirimanoff RO, et al. Long-term results with immediate androgen suppression and external irradiation in patients with locally advanced prostate cancer (an EORTC study): a phase III randomised trial. *Lancet.* 2002;360(9327):103-6.
15. Huggins C. Prostatic cancer treated by orchiectomy; the five year results. *J Am Med Assoc.* 1946;131:576-81.
16. Seidenfeld J, Samson DJ, Hasselblad V, Aronson N, Albertsen PC, Bennett CL, et al. Single-therapy androgen suppression in men with advanced prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2000;132(7):566-77.

17. de Bono JS, Logothetis CJ, Molina A, Fizazi K, North S, Chu L, et al. Abiraterone and increased survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*. 2011;364(21):1995-2005.
18. Scher HI, Fizazi K, Saad F, Taplin ME, Sternberg CN, Miller K, et al. Increased survival with enzalutamide in prostate cancer after chemotherapy. *N Engl J Med*. 2012;367(13):1187-97.
19. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(15):1502-12.
20. de Bono JS, Oudard S, Ozguroglu M, Hansen S, Machiels JP, Kocak I, et al. Prednisone plus cabazitaxel or mitoxantrone for metastatic castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel treatment: a randomised open-label trial. *Lancet*. 2010;376(9747):1147-54.
21. Parker C, Nilsson S, Heinrich D, Helle SI, O'Sullivan JM, Fosså SD, et al. Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med*. 2013;369(3):213-23.
22. Small EJ, Schellhammer PF, Higano CS, Redfern CH, Nemunaitis JJ, Valone FH, et al. Placebo-controlled phase III trial of immunologic therapy with sipuleucel-T (APC8015) in patients with metastatic, asymptomatic hormone refractory prostate cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(19):3089-94.
23. Shafer-Weaver KA, Anderson MJ, Stagliano K, Malyguine A, Greenberg NM, Hurwitz AA. Cutting Edge: Tumor-specific CD8+ T cells infiltrating prostatic tumors are induced to become suppressor cells. *J Immunol*. 2009;183(8):4848-52.
24. Miller AM, Lundberg K, Ozenci V, Banham AH, Hellström M, Egevad L, et al. CD4+CD25high T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients. *J Immunol*. 2006;177(10):7398-405.

-
25. Becker JT, Olson BM, Johnson LE, Davies JG, Dunphy EJ, McNeel DG. DNA vaccine encoding prostatic acid phosphatase (PAP) elicits long-term T-cell responses in patients with recurrent prostate cancer. *J Immunother*. 2010;33(6):639-47.
26. Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun*. 2004;4:1.
27. Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(8):615-25.
28. Mengus C, Schultz-Thater E, Coulot J, Kastelan Z, Goluzza E, Coric M, et al. MAGE-A10 cancer/testis antigen is highly expressed in high-grade non-muscle-invasive bladder carcinomas. *Int J Cancer*. 2013;132(10):2459-63.
29. Grah JJ, Katalinic D, Juretic A, Santek F, Samarzija M. Clinical significance of immunohistochemical expression of cancer/testis tumor-associated antigens (MAGE-A1, MAGE-A3/4, NY-ESO-1) in patients with non-small cell lung cancer. *Tumori*. 2014;100(1):60-8.
30. Xiao J, Chen HS. Biological functions of melanoma-associated antigens. *World J Gastroenterol*. 2004;10(13):1849-53.
31. Kulkarni P, Uversky VN. Cancer/Testis Antigens: "Smart" Biomarkers for Diagnosis and Prognosis of Prostate and Other Cancers. *Int J Mol Sci*. 2017;18(4).
32. Ghafouri-Fard S, Shamsi R, Seifi-Alan M, Javaheri M, Tabarestani S. Cancer-testis genes as candidates for immunotherapy in breast cancer. *Immunotherapy*. 2014;6(2):165-79.

-
33. Parmigiani RB, Bettoni F, Vibranovski MD, Lopes MH, Martins WK, Cunha IW, et al. Characterization of a cancer/testis (CT) antigen gene family capable of eliciting humoral response in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(48):18066-71.
34. Parmigiani RB, Bettoni F, Grosso DM, Lopes A, Cunha IW, Soares FA, et al. Antibodies against the cancer-testis antigen CTSP-1 are frequently found in prostate cancer patients and are an independent prognostic factor for biochemical-recurrence. *Int J Cancer*. 2008;122(10):2385-90.
35. Drake CG. Prostate cancer as a model for tumour immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(8):580-93.
36. Gerritsen WR. The evolving role of immunotherapy in prostate cancer. *Ann Oncol*. 2012;23 Suppl 8:viii22-7.
37. Barve A, Jin W, Cheng K. Prostate cancer relevant antigens and enzymes for targeted drug delivery. *J Control Release*. 2014;187:118-32.
38. Sultan H, Fesenkova VI, Addis D, Fan AE, Kumai T, Wu J, et al. Designing therapeutic cancer vaccines by mimicking viral infections. *Cancer Immunol Immunother*. 2017;66(2):203-13.
39. Yang B, Jeang J, Yang A, Wu TC, Hung CF. DNA vaccine for cancer immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(11):3153-64.
40. Gonzalez-Cao M, Iduma P, Karachaliou N, Santarpia M, Blanco J, Rosell R. Human endogenous retroviruses and cancer. *Cancer Biol Med*. 2016;13(4):483-8.
41. Leib-Mösch C, Brack-Werner R, Werner T, Bachmann M, Faff O, Erfle V, et al. Endogenous retroviral elements in human DNA. *Cancer Res*. 1990;50(17 Suppl):5636S-42S.

-
42. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921.
43. Dewannieux M, Harper F, Richaud A, Letzelter C, Ribet D, Pierron G, et al. Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. *Genome Res*. 2006;16(12):1548-56.
44. van de Lagemaat LN, Landry JR, Mager DL, Medstrand P. Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions. *Trends Genet*. 2003;19(10):530-6.
45. Kurth R, Bannert N. Beneficial and detrimental effects of human endogenous retroviruses. *Int J Cancer*. 2010;126(2):306-14.
46. Cohen CJ, Lock WM, Mager DL. Endogenous retroviral LTRs as promoters for human genes: a critical assessment. *Gene*. 2009;448(2):105-14.
47. Isbel L, Whitelaw E. Endogenous retroviruses in mammals: an emerging picture of how ERVs modify expression of adjacent genes. *Bioessays*. 2012;34(9):734-8.
48. Feschotte C, Gilbert C. Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. *Nat Rev Genet*. 2012;13(4):283-96.
49. Takai D, Yagi Y, Habib N, Sugimura T, Ushijima T. Hypomethylation of LINE1 retrotransposon in human hepatocellular carcinomas, but not in surrounding liver cirrhosis. *Jpn J Clin Oncol*. 2000;30(7):306-9.
50. Wilhelm CS, Kelsey KT, Butler R, Plaza S, Gagne L, Zens MS, et al. Implications of LINE1 methylation for bladder cancer risk in women. *Clin Cancer Res*. 2010;16(5):1682-9.

-
51. Yegnasubramanian S, Haffner MC, Zhang Y, Gurel B, Cornish TC, Wu Z, et al. DNA hypomethylation arises later in prostate cancer progression than CpG island hypermethylation and contributes to metastatic tumor heterogeneity. *Cancer Res.* 2008;68(21):8954-67.
52. Büscher K, Trefzer U, Hofmann M, Sterry W, Kurth R, Denner J. Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res.* 2005;65(10):4172-80.
53. Wang-Johanning F, Frost AR, Johanning GL, Khazaeli MB, LoBuglio AF, Shaw DR, et al. Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2001;7(6):1553-60.
54. Wang-Johanning F, Liu J, Rycaj K, Huang M, Tsai K, Rosen DG, et al. Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer. *Int J Cancer.* 2007;120(1):81-90.
55. Kleiman A, Senyuta N, Tryakin A, Sauter M, Karseladze A, Tjulandin S, et al. HERV-K(HML-2) GAG/ENV antibodies as indicator for therapy effect in patients with germ cell tumors. *Int J Cancer.* 2004;110(3):459-61.
56. Wang-Johanning F, Radvanyi L, Rycaj K, Plummer JB, Yan P, Sastry KJ, et al. Human endogenous retrovirus K triggers an antigen-specific immune response in breast cancer patients. *Cancer Res.* 2008;68(14):5869-77.
57. Ishida T, Obata Y, Ohara N, Matsushita H, Sato S, Uenaka A, et al. Identification of the HERV-K gag antigen in prostate cancer by SEREX using autologous patient serum and its immunogenicity. *Cancer Immun.* 2008;8:15.
58. Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science.* 1985;230(4730):1132-9.

-
59. Seil I, Frei C, Sülthmann H, Knauer SK, Engels K, Jäger E, et al. The differentiation antigen NY-BR-1 is a potential target for antibody-based therapies in breast cancer. *Int J Cancer*. 2007;120(12):2635-42.
60. Mullins CS, Linnebacher M. Endogenous retrovirus sequences as a novel class of tumor-specific antigens: an example of HERV-H env encoding strong CTL epitopes. *Cancer Immunol Immunother*. 2012;61(7):1093-100.
61. Rakoff-Nahoum S, Kuebler PJ, Heymann JJ, E Sheehy M, Ortiz GM, S Ogg G, et al. Detection of T lymphocytes specific for human endogenous retrovirus K (HERV-K) in patients with seminoma. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006;22(1):52-6.
62. Rycaj K, Plummer JB, Yin B, Li M, Garza J, Radvanyi L, et al. Cytotoxicity of human endogenous retrovirus K-specific T cells toward autologous ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2015;21(2):471-83.
63. Ono M. Molecular cloning and long terminal repeat sequences of human endogenous retrovirus genes related to types A and B retrovirus genes. *J Virol*. 1986;58(3):937-44.
64. Belikov S, Astrand C, Wrangé O. Mechanism of histone H1-stimulated glucocorticoid receptor DNA binding in vivo. *Mol Cell Biol*. 2007;27(6):2398-410.
65. Shaffer PL, Jivan A, Dollins DE, Claessens F, Gewirth DT. Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(14):4758-63.
66. Ghosh D. Glucocorticoid receptor-binding site in the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *J Virol*. 1992;66(1):586-90.

-
67. Ono M, Kawakami M, Ushikubo H. Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D. *J Virol*. 1987;61(6):2059-62.
68. Kokontis JM, Hsu S, Chuu CP, Dang M, Fukuchi J, Hiipakka RA, et al. Role of androgen receptor in the progression of human prostate tumor cells to androgen independence and insensitivity. *Prostate*. 2005;65(4):287-98.
69. Kiniwa Y, Miyahara Y, Wang HY, Peng W, Peng G, Wheeler TM, et al. CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(23):6947-58.
70. Franklin C, Livingstone E, Roesch A, Schilling B, Schadendorf D. Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions. *Eur J Surg Oncol*. 2017;43(3):604-11.
71. Liu KG, Gupta S, Goel S. Immunotherapy: incorporation in the evolving paradigm of renal cancer management and future prospects. *Oncotarget*. 2017;8(10):17313-27.
72. Malhotra J, Jabbour SK, Aisner J. Current state of immunotherapy for non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*. 2017;6(2):196-211.
73. Ryan CJ, Tindall DJ. Androgen receptor rediscovered: the new biology and targeting the androgen receptor therapeutically. *J Clin Oncol*. 2011;29(27):3651-8.
74. Migowski A, Silva GA. Survival and prognostic factors of patients with clinically localized prostate cancer. *Rev Saude Publica*. 2010;44(2):344-52.
75. Agoni L, Guha C, Lenz J. Detection of Human Endogenous Retrovirus K (HERV-K) Transcripts in Human Prostate Cancer Cell Lines. *Front Oncol*. 2013;3:180.

-
76. Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, Helgeson BE, Cao X, Morris DS, et al. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature*. 2007;448(7153):595-9.
77. Goering W, Ribarska T, Schulz WA. Selective changes of retroelement expression in human prostate cancer. *Carcinogenesis*. 2011;32(10):1484-92.
78. Mercader M, Bodner BK, Moser MT, Kwon PS, Park ES, Manecke RG, et al. T cell infiltration of the prostate induced by androgen withdrawal in patients with prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(25):14565-70.
79. Armas OA, Aprikian AG, Melamed J, Cordon-Cardo C, Cohen DW, Erlandson R, et al. Clinical and pathobiological effects of neoadjuvant total androgen ablation therapy on clinically localized prostatic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1994;18(10):979-91.
80. Montironi R, Schulman CC. Pathological changes in prostate lesions after androgen manipulation. *J Clin Pathol*. 1998;51(1):5-12.
81. Nesslinger NJ, Sahota RA, Stone B, Johnson K, Chima N, King C, et al. Standard treatments induce antigen-specific immune responses in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(5):1493-502.
82. Olson BM, McNeel DG. Antibody and T-cell responses specific for the androgen receptor in patients with prostate cancer. *Prostate*. 2007;67(16):1729-39.
83. Johnke RM, Edwards JM, Kovacs CJ, Evans MJ, Daly BM, Karlsson UL, et al. Response of T lymphocyte populations in prostate cancer patients undergoing radiotherapy: influence of neoadjuvant total androgen suppression. *Anticancer Res*. 2005;25(4):3159-66.
84. Janetzki S, Britten CM. The impact of harmonization on ELISPOT assay performance. *Methods Mol Biol*. 2012;792:25-36.

-
85. Scheibenbogen C, Romero P, Rivoltini L, Herr W, Schmitt A, Cerottini JC, et al. Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFN γ -ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial. *J Immunol Methods*. 2000;244(1-2):81-9.
86. Lalvani A, Brookes R, Hambleton S, Britton WJ, Hill AV, McMichael AJ. Rapid effector function in CD8 $^{+}$ memory T cells. *J Exp Med*. 1997;186(6):859-65.
87. Streeck H, Frahm N, Walker BD. The role of IFN- γ Elispot assay in HIV vaccine research. *Nat Protoc*. 2009;4(4):461-9.
88. Lalvani A, Pareek M. Interferon gamma release assays: principles and practice. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010;28(4):245-52.
89. Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev*. 1996;9(4):532-62.
90. Paul WE, Zhu J. How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*. 2010;10(4):225-35.
91. Goto S, Sato M, Kaneko R, Itoh M, Sato S, Takeuchi S. Analysis of Th1 and Th2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells as a parameter of immunological dysfunction in advanced cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 1999;48(8):435-42.
92. Bellone G, Turletti A, Artusio E, Mareschi K, Carbone A, Tibaudi D, et al. Tumor-associated transforming growth factor- β and interleukin-10 contribute to a systemic Th2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients. *Am J Pathol*. 1999;155(2):537-47.
93. Cottrez F, Groux H. Regulation of TGF- β response during T cell activation is modulated by IL-10. *J Immunol*. 2001;167(2):773-8.

-
94. Miller AM, Pisa P. Tumor escape mechanisms in prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56(1):81-7.
95. Chi N, Tan Z, Ma K, Bao L, Yun Z. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with cancer stages, interleukin-8 and -6 in prostate cancer. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(10):3181-92.
96. Appay V, van Lier RA, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A.* 2008;73(11):975-83.
97. Mackay CR. Dual personality of memory T cells. *Nature.* 1999;401(6754):659-60.
98. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Pillars article: two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999. 401: 708-712. *J Immunol.* 2014;192(3):840-4.
99. Hamann D, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med.* 1997;186(9):1407-18.
100. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity.* 1999;11(2):141-51.
101. Zarour HM. Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016;22(8):1856-64.
102. Schietinger A, Greenberg PD. Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol.* 2014;35(2):51-60.

11 APÊNDICES

11 APÊNDICES

APÊNDICES REFERENTES À POPULAÇÃO DE CD4

Distribuição da Ativação por Marcador Individual dentro dos imunofenótipos de Linfócito T CD4

-CCR5-

Apêndice-Gráfico 1 Distribuição em histograma mostrando que não ocorre diferença estatisticamente significativa nas sub-populações de linfócitos para o marcador CCR5, exceto na sub-população de Memória Terminal Efetora, com redução significativa na quantidade de células CCR5+ na coorte de doença localizada, em comparação com a coorte de doença disseminada.

	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	8,13	7,36	6,79	0,57
M. Central	3,6	3,32	2,9	0,34
M. Transitória	5,08	4,96	4,64	0,88
M. Intermed.	3,45	3,12	2,65	0,32
M. Efetora	10,49	9,76	9,93	0,75
M. Term. Efetora	12,3	13,7	7,74	0,02

Tabela: Diferenças estatisticamente significantes, mostrando aumento de ativação na coorte de doença disseminada quando examinadas pela marcação individual de CD38, isoladamente. as coortes de Controle e Doença Localizada são muito parecidas e iguais do ponto de vista estatístico.

Distribuição da Ativação por Marcador Individual dentro dos imunofenótipos Linfócito T CD4

-HLA DR-

Tabela: Distribuição em histograma mostrando que não ocorre diferença estatisticamente significativa nas sub-populações de linfócitos para o marcador HLA DR isoladamente

	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	0,11	0,1	0,08	0,13
M. Central	1,23	0,95	0,9	0,88
M. Transitória	3,01	1,89	2,34	0,25
M. Intermed.	0,28	0,18	0,31	0,061
M. Efetora	8,97	7,61	8,93	0,43
M. Term. Efetora	5,97	6,99	5,91	0,81

Tabela: Não há diferença estatisticamente significativa nas sub-populações linfocitárias quando examinadas em sua marcação isolada de HLA-DR.

Distribuição da Ativação por Co-expressão dentro dos imunofenótipos linfócito T CD4.

CD38+ HLA-DR+

Tabela: Comparações das medianas das porcentagens na análise da co-expressão de CD38+HLA DR com aumento da ativação na coorte de doença disseminada em comparação com doença localizada. Mann-Whitney U test bicaudal

	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	0,014	0,021	0,21	0,91
M. Central	0,132	0,062	0,15	0,018
M. Transitória	0,15	0,07	0,21	<0,0001
M. Intermed.	0,04	0,02	0,09	0,0042
M. Efetora	0,29	0,19	0,47	<0,0001
M. Term. Efetora	0,49	0,25	0,57	0,14

Figura e Tabela: Na análise da co-expressão de CD38+HLA DR vemos aumento da ativação na coorte de doença disseminada em comparação com doença localizada em todas as sub-populações, testadas com quase todas apresentando significância estatística pelo teste de Mann-Whitney bicaudal para significância estatística de $p < 0,05$.

Distribuição da Ativação por Co-expressão dentro dos imunofenótipos linfócito T CD4.

CD38+ CCR5+

Figura: Na análise da co-expressão de CD38+ CCR5+ vemos aumento da ativação na coorte de doença disseminada em comparação com doença localizada em quase todas as sub-populações, testadas com quase todas apresentando significância estatística pelo teste de Mann-Whitney bicaudal para significância estatística de $p < 0,05$.

	Controle	Localizada	Disseminada	Valor p entre local. e disseminada
Naive	0,38	0,52	0,66	0,1
M. Central	0,52	0,57	0,48	0,67
M. Transitória	0,33	0,29	0,45	0,001
M. Intermed.	0,26	0,3	0,38	0,076
M. Efetora	0,44	0,29	0,47	0,005
M. Term. Efetora	0,49	0,46	0,72	0,39

Figura : Dados numéricos mostrando a mesma tendência de aumento na ativação, nesta co-expressão de CD38+CCR5+, também analisados em relação às diferenças de medianas pelo teste U de Mann-Whitney.

Distribuição da Ativação por Co-expressão dentro dos imunofenótipos linfócito T CD4.

CD38+ CCR5+ HLA-DR+

Figura e Tabela: Na análise da co-expressão de CD38+ CCR5+HLA-DR+ vemos aumento da ativação na coorte de doença disseminada em comparação com doença localizada em quase todas as sub-populações, testadas com quase todas apresentando significância estatística pelo teste de Mann-Whitney bicaudal para significância estatística de $p < 0,05$.

	Controle	Localizada	Disseminada	Valor p entre local. e disseminada
Naive	0,008	0,015	0,013	0,83
M.Central	0,03	0,02	0,05	0,2
M.Transitória	0,036	0,026	0,076	<0,0001
M.Intermed.	0,018	0,015	0,02	0,06
M.Efetora	0,1	0,06	0,14	0,0018
M.Term.Efetora	0,12	0,08	0,08	0,97

Figura e Tabela: Tanto a figura como a tabela mostram a mesma tendência de aumento na ativação, nesta co-expressão de CD38+CCR5+HLA-DR+, também analisados em relação às diferenças de medianas pelo teste U de Mann-Whitney.

Distribuição da Senescência/Exaustão por co-expressão dos marcadores dentro dos imunofenótipos de linfócito T CD4

	CD28/ PD1	CD28/ CD95	CD28/ CD57	PD1/C D57	PD1/C D95	CD57/ CD95	CD28/ PD1/ CD57	CD28/ PD1/ CD95	PD1/C D57/ CD95
Controle	21,15	44,95	0,66	1,83	22,25	1,8	0,49	20,35	1,23
Localizada	22,8	53,2	0,92	1,34	22,2	1,38	0,69	21,2	1,01
Valor <i>p</i>	0,38	0,33	0,23	0,89	0,53	0,65	0,28	0,45	0,74
Controle	21,15	44,95	0,66	1,83	22,25	1,8	0,49	20,35	1,23
Disseminada	24,35	56,4	1,32	3,32	28,85	2,88	0,95	23	2,06
Valor <i>p</i>	0,32	0,26	0,038	0,02	0,09	0,008	0,09	0,27	0,01
Localizada	22,8	53,2	0,92	1,34	22,2	1,38	0,69	21,2	1,01
Disseminada	24,35	56,4	1,32	3,32	28,85	2,88	0,95	23	2,06
Valor <i>p</i>	0,48	0,43	0,05	0,0051	0,07	0,0032	0,11	0,42	0,0032

Distribuição do perfil de Senescência e Exaustão por co-expressão de marcadores dentro dos imunofenótipos de Linfócito T CD4 PD1+CD57+

Gráfico

	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	0,095	0,143	0,163	0,19
M. Central	0,12	0,12	0,2	0,059
M. Transitória	0,89	0,97	1,58	0,005
M. Intermed.	0,26	0,24	0,83	0,0014
M. Efetora	8,06	7,63	19,05	0,006
M. Term. Efetora	15,3	12,2	16,35	0,2

Gráfico e Tabela: Na análise dos resultados na comparação das medianas para esta co-expressão de PD1+CD57, confirma-se a tendência de maior porcentagem na coorte de doença disseminada e neste caso as sub-populações que trazem significância estatística são os fenótipos de Memória Transitória, Memória Efetora e Memória Terminal Efetora. Mann-Whitney U test bi-caudal para significância de $p < 0,05$.

Distribuição do perfil de Senescência e Exaustão por co-expressão de marcadores dentro dos imunofenótipos de Linfócito T CD4

CD95+CD57+

	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	0,07	0,145	0,148	0,28
M. Central	0,23	0,27	0,36	0,16
M. Transitória	1,02	1,13	1,96	0,001
M. Intermed.	0,37	0,31	1,86	0,0001
M. Term. Efetora	10,13	5,56	14,85	0,0019

Gráfico e Tabela: Na análise dos resultados na comparação das medianas para esta co-expressão de CD95+CD57, confirma-se a tendência de maior porcentagem na coorte de doença disseminada e neste caso as sub-populações que trazem significância estatística são os fenótipos de Memória Transitória, Memória Efetora e Memória Terminal Efetora. Mann-Whitney U test bi-caudal para significância de $p < 0,05$.

Distribuição do perfil de Senescência e Exaustão por co-expressão de marcadores dentro dos imunofenótipos de Linfócito T CD4

PD1+CD57+CD95+

Tabela

	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	0,06	0,135	0,14	0,26
M. Central	0,11	0,12	0,19	0,05
M. Transitória	0,81	0,87	1,34	0,005
M. Intermed.	0,24	0,182	0,65	0,0008

Gráfico e Tabela: Na análise dos resultados na comparação das medianas para esta co-expressão de PD1+CD57+CD95, confirma-se a tendência de maior porcentagem na coorte de doença disseminada e neste caso as sub-populações que trazem significância estatística são os fenótipos de Memória Transitória. Mann-Whitney U test bi-caudal para significância de $p < 0,05$.

APÊNDICE DE LINFÓCITOS T CD8

Ativação de CD8 para marcadores individuais

CCR5+

Gráfico

Tabela:

CCR5	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	22,2	16,9	24,9	0,06
M. Central	19,3	18,6	20,9	0,87
M. Transitória	36,9	38,6	41,1	0,31
M. Intermed.	18,5	19,2	21,4	0,37
M. Efetora	26,5	32,0	24,9	0,023
M. Term .Efetora	11,4	12,5	9,25	0,01

Gráfico e Tabela: Mesmo sem atingir significância estatística na seleção isolada de CCR5, existe uma distribuição estatisticamente significativa que no caso mostra maior porcentagem de fenótipo CCR5 isolado na coorte de doença localizada. Mann-Whitney U test bicaudal para $p < 0,05$

Ativação de CD8 para marcadores individuais

HLA-DR+

Gráfico

Tabela:

HLA-DR	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	0,5	0,35	0,3	0,74
M. Central	4,9	4,0	5,4	0,56
M. Transitória	5,9	4,8	6,9	0,14
M. Intermed.	5,2	3,0	3,4	0,34
M. Efetora	9,0	8,7	10,8	0,16
M. Term. Efetora	11,7	7,3	8,6	0,53

Gráfico e Tabela. Tendência ao aumento da porcentagem de linfócitos T CD8 selecionados para HLA DR, sem significância estatística. Mann-Whitney U test bicaudal para $p < 0,05$

A ativação linfocitária dos linfócitos T CD8 selecionados para co-expressão dos marcadores de ativação mantém a mesma característica de aumento da ativação na coorte de doença disseminada

	CD38+HLA-DR+	CD38+CCR5+	CD38+CCR5+HLA-DR+
Controle	0,67	0,59	0,29
Localizada	0,63	0,60	0,27
Valor <i>p</i>	0,44	0,92	0,87
Controle	0,67	0,59	0,29
Disseminada	1,45	1,35	0,61
Valor <i>p</i>	0,035	0,0046	0,01
Localizada	0,63	0,60	0,27
Disseminada	1,45	1,35	0,61
Valor <i>p</i>	0,0003	0,0002	0,001

Tabela: Comparação das medianas das porcentagens nas coortes, em relação às diferentes co-expressões dos marcadores. Mann-Whitney U test, bicaudal, para significância de $p < 0,05$.

Distribuição da ativação linfocitária dentro das sub-populações para co-expressão de CD38+HLA DR+ mantém o mesmo padrão de maior ativação na doença disseminada

Gráfico: Comparação de medianas de porcentagem de linfócitos T CD8+ com co-expressão de CD38 e HLA-DR distribuídos nas diferentes sub-populações linfocitárias.

Tabela: Comparação de medianas de porcentagem de linfócitos T CD8+ com co-expressão de CD38 e HLA-DR distribuídos nas diferentes sub-populações linfocitárias.

CD38+HLA-DR+	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	0,14	0,062	0,17	0,006
M. Central	0,53	0,69	1,55	0,10
M. Transitória	0,59	0,72	1,5	0,02
M. Intermed.	0,33	0,41	0,88	0,01
M. Efetora	0,72	0,71	1,93	0,001
M. Term. Efetora	0,81	0,50	0,96	0,03

Gráfico e Tabela: Comparação das medianas das porcentagens nas coortes, em relação à co-expressão de CD38+HLA DR mostra maior porcentagem na coorte de doença disseminada, ainda que sejam uma proporção relativamente pequenas de células. Mann-Whitney U test, bicaudal, para significância de $p < 0,05$.

Distribuição da ativação linfocitária dentro das sub-populações para co-expressão de CD38+CCR5+ mantém o mesmo padrão de maior ativação na doença disseminada.

CD38+CCR5+

Gráfico:

Tabela:

CD38+CCR5+	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	-	-	-	-
M. Central	1,29	1,46	2,39	0,55
M. Transitória	0,82	0,84	2,18	0,004
M. Intermed.	0,76	0,67	1,17	0,01
M. Efetora	0,50	0,54	1,06	0,03
M. Term. Efetora	0,35	0,28	0,39	0,24

Gráfico e Tabela: Comparação das medianas das porcentagens nas coortes, em relação à co-expressão de CD38+CCR5 mostra também maior porcentagem na coorte de doença disseminada, ainda que sejam uma proporção relativamente pequenas de células. Mann-Whitney U test, bicaudal, para significância de $p < 0,05$.

F- Distribuição da ativação linfocitária dentro das sub-populações para co-expressão de CD38+CCR5+HLA DR mantém o mesmo padrão de maior ativação na doença disseminada.

CD38+CCR5+HLA-DR+

Gráfico:

Tabela:

CD38+CCR5+HLA-DR+	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	0,10	0,05	0,13	0,009
M. Central	0,44	0,56	1,34	0,08
M. Transitória	0,41	0,44	1,04	0,01
M. Intermed.	0,18	0,23	0,34	0,037
M. Efetora	0,29	0,32	0,70	0,03
M. Term. Efetora	0,19	0,13	0,23	0,32

Gráfico e Tabela: Comparação das medianas das porcentagens nas coortes, em relação à co-expressão de CD38+CCR5+HLA-DR mostra também maior porcentagem na coorte de doença disseminada, ainda que sejam uma proporção relativamente pequenas de células. Mann-Whitney U test, bicaudal, para significância de $p < 0,05$.

Distribuição dos marcadores de senescência e exaustão dos linfócitos T CD8+ dentro dos imunofenótipos. Análise por marcador individual.

CD28+

Gráfico:

Tabela:

CD28+	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	66,2	70,0	71	0,69
M. Central	91,1	93,7	95,2	0,35
M. Transitória	77,3	80,0	76,7	0,018
M. Intermed.	35,7	47,4	39,1	0,049
M. Efetora	24,8	42,7	24,6	0,002
M. Term. Efetora	3,7	4,79	3,36	0,009

Gráfico e Tabela: Os dados mostram que na comparação das medianas há evidência de maiores índices de senescência e exaustão para a coorte de doença localizada quando analisados de acordo com a ontogenia linfocitária. Mann-Whitney U test, com significância para $p < 0,05$.

Distribuição dos marcadores de senescência e exaustão dos linfócitos T CD8+ dentro dos imunofenótipos. Análise por marcador individual.

CD57+

Gráfico:

Tabela:

CD57+	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	0,47	0,32	0,31	0,99
M. Central	1,54	1,56	2,22	0,31
M. Transitória	10,25	9,29	14,75	0,009
M. Intermed.	39,25	23,8	29,05	0,20
M. Efetora	58,90	38,2	60,20	0,02
M. Term. Efetora	71,30	74,2	78,40	0,13

Gráfico e Tabela: Os dados mostram que na comparação das medianas há evidência de maiores índices de senescência e exaustão para a coorte de doença disseminada quando analisados de acordo com a ontogenia linfocitária, privilegiando as células e Memória Transitória e de memória Efetora . Mann-Whitney U test, com significância para $p < 0,05$.

Distribuição dos marcadores de senescência e exaustão dos linfócitos T CD8+ dentro dos imunofenótipos. Análise por marcador individual.

PD1

Gráfico:

Tabela:

PD1+	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	1,11	0,75	0,69	0,72
M. Central	15,85	15,40	14,95	0,92
M. Transitória	42,90	50,70	49,30	0,98
M. Intermed.	19,90	18,10	16,30	0,59
M. Efetora	30,70	38,90	40,30	0,56
M. Term. Efetora	13,30	15,40	11,50	0,58

Gráfico e Tabela: Os dados mostram que na comparação das medianas não há evidência de diferenças de senescência e exaustão em nenhuma das sub-populações linfocitárias. Mann-Whitney U test, com significância para $p < 0,05$.

Distribuição da Senescência/Exaustão por co-expressão de marcadores na população total de CD8

CD28+CD95

Gráfico:

Tabela:

CD28+CD95+	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	1,7	2,38	1,95	0,05
M. Central	64,50	68,90	79,70	0,005
M. Transitória	59,70	64,20	64,90	0,42
M. Intermed.	14,50	15,10	12,90	0,86
M. Efetora	18,55	29,95	21,50	0,01
M. Term. Efetora	2,44	3,03	2,28	0,15

Gráfico e Tabela: Os dados mostram que na comparação das medianas há evidência de maiores índices de senescência e exaustão para a coorte de doença localizada na maioria das sub-populações linfocitárias, embora na sub-população de células e memória central há maior porcentagem deste imunofenótipo na coorte de Doença Disseminada. Mann-Whitney U test, com significância para $p < 0,05$.

Distribuição da Senescência/Exaustão por co-expressão de marcadores na população total de CD8

CD28+ PD1+.

Gráfico:

Tabela:

CD28+PD1+	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	0,67	0,56	0,47	0,52
M. Central	14	14	12,6	0,78
M. Transitória	32,40	38,10	36,50	0,17
M. Intermed.	7,45	8,37	6,59	0,26
M. Efetora	9,45	14,45	9,88	0,005
M. Term. Efetora	0,82	1,38	0,86	0,04

Gráfico e Tabela: Os dados mostram que na comparação das medianas há evidência de maiores índices de senescência e exaustão para a coorte de doença localizada na maioria das sub-populações linfocitárias, com significância estatística apenas na sub-população de Memória Efetora. Mann-Whitney U test, com significância para $p < 0,05$.

Distribuição da Senescência/Exaustão por co-expressão de marcadores na população total de CD8

CD28+ CD57.

Gráfico:

Tabela:

CD28+CD57+	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	0,12	0,08	0,05	0,14
M. Central	0,74	0,83	1,39	0,32
M. Transitória	2,08	4,38	4,48	0,73
M. Intermed.	0,80	1,21	1,27	0,86
M. Efetora	1,80	2,64	2,63	0,23
M. Term. Efetora	0,84	1,39	1,10	0,09

Gráfico e Tabela: Os dados mostram que na comparação das medianas não há evidência de nenhuma diferença nas sub-populações ontogênicas. Mann-Whitney U test, com significância para $p < 0,05$.

Distribuição da Senescência/Exaustão por co-expressão de marcadores na população total de CD8

PD1+ CD57.

Gráfico:

Tabela: Dados da comparação entre a mediana das porcentagens dos linfócitos T CD8, selecionados para co-expressão de PD1+CD57+

PD1+CD57+	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	0,22	0,09	0,09	0,62
M. Central	0,91	0,77	0,99	0,50
M. Transitória	5,15	7,11	8,51	0,02
M. Intermed.	5,56	4,93	5,86	0,41
M. Efetora	11,8	14	24,25	0,008
M. Term. Efetora	9,63	9,66	9,69	0,87

Gráfico e Tabela: Os dados mostram que na comparação das medianas há evidências de maior senescência nesta co-expressão entre PD1+CD57 na coorte de doença disseminada. Mann-Whitney U test, com significância para $p < 0,05$.

Distribuição da Senescência/Exaustão por co-expressão de marcadores na população total de CD8

PD1+ CD95.

Gráfico:

Tabela:

PD1+CD95+	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	0,35	0,39	0,31	0,89
M. Central	13,7	12,5	13,05	0,64
M. Transitória	36,9	39,3	43,1	0,30
M. Intermed.	14,5	15,1	12,9	0,86
M. Efetora	21,3	23,6	28,2	0,14
M. Term. Efetora	9,20	6,74	6,96	0,54

Gráfico e Tabela: Os dados mostram que na comparação das medianas há evidências de maior senescência nesta co-expressão entre PD1+CD95 na coorte de doença disseminada. Mann-Whitney U test, com significância para $p < 0,05$.

Distribuição da Senescência/Exaustão por co-expressão de marcadores na população total de CD8

CD57+CD95+.

Gráfico:

Tabela:

CD57+CD95+	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	0,27	0,14	0,21	0,76
M. Central	1,15	1,39	1,82	0,37
M. Transitória	7,33	7,59	12,25	0,003
M. Intermed.	3,99	3,22	4,26	0,17
M. Efetora	21,7	16,5	34,5	<0,0001
M. Term. Efetora	29,2	27,3	40,45	0,001

Gráfico e Tabela: Os dados mostram que na comparação das medianas há evidências de maior senescência nesta co-expressão entre CD57+CD95 na coorte de doença disseminada. Mann-Whitney U test, com significância para $p < 0,05$.

Distribuição da Senescência/Exaustão por co-expressão de marcadores na população total de CD8

CD28+PD1+ CD57.

Gráfico:

Tabela:

CD28+PD1+CD57+	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	0,08	0,036	0,023	0,73
M. Central	0,47	0,49	0,69	0,43
M. Transitória	1,64	3,10	3,28	0,97
M. Intermed.	0,36	0,63	0,61	0,33
M. Efetora	0,91	1,44	1,21	0,36
M. Term. Efetora	0,20	0,27	0,19	0,15

Gráfico e Tabela: Os dados mostram que na comparação das medianas não há evidências de maior senescência nesta co-expressão entre CD28+PD1+ CD57 na coorte de doença disseminada. Mann-Whitney U test, com significância para $p < 0,05$.

Distribuição da Senescência/Exaustão por co-expressão de marcadores na população total de CD8

CD28+PD1+CD95+.

Gráfico:

Tabela:

CD28+PD1+CD95+	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	0,24	0,21	0,21	0,96
M. Central	12,1	12,2	11,45	0,74
M. Transitória	26,1	31,2	31,2	0,66
M. Intermed.	5,85	6,67	6,08	0,60
M. Efetora	7,69	11,1	8,47	0,015
M. Term. Efetora	0,61	0,90	0,62	0,30

Gráfico e Tabela: Os dados mostram que na comparação das medianas há evidências apenas de maior senescência nesta co-expressão entre CD28+PD1+ CD95+ na coorte de doença localizada. Mann-Whitney U test, com significância para $p < 0,05$.

Distribuição da Senescência/Exaustão por co-expressão de marcadores na população total de CD8

PD1+ CD57+CD95+.

Gráfico:

Tabela:

PD1+CD57+CD95+	Controle	Localizada	Disseminada	Valor <i>p</i> entre local. e disseminada
Naive	0,11	0,05	0,07	0,74
M. Central	0,71	0,69	0,76	0,52
M. Transitória	3,53	5,72	8,07	0,008
M. Intermed.	3,99	3,22	4,26	0,17
M. Efetora	4,93	6,77	17,15	0,0006
M. Term. Efetora	3,91	3,12	5,74	0,11

Gráfico e Tabela: Os dados mostram que na comparação das medianas há evidências apenas de maior senescência nesta co-expressão entre PD1+CD57+ CD95+ na coorte de doença disseminada. Mann-Whitney U test, com significância para $p < 0,05$.