RENATA ARIZA MARQUES ROSSETTI

ESTUDO DO ESTADO DE ATIVAÇÃO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO NO MICROABIENTE TUMORAL E LEUCÓCITOS CIRCULANTES EM PACIENTES COM TUMOR DO COLO DO ÚTERO

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

São Paulo
2016

RENATA ARIZA MARQUES ROSSETTI

ESTUDO DO ESTADO DE ATIVAÇÃO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO NO MICROABIENTE TUMORAL E LEUCÓCITOS CIRCULANTES EM PACIENTES COM TUMOR DO COLO DO ÚTERO

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Lepique

Versão original

São Paulo
2016

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

reprodução não autorizada pelo autor

Rossetti, Renata Ariza Marques.
Estudo do estado de ativação de vias de sinalização no microambiente tumoral e leucócitos circulantes em pacientes com tumor de colo de útero / Renata Ariza Marques Rossetti. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Ana Paula Lepique.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Estudo das vias de sinalização no microambiente tumoral e em leucócitos circulantes.

Versão do título para o inglês: Signaling pathways characterization in tumor microenvironment and peripheral blood mononuclear cells in cervical cancer patients.

1. Câncer cervical 2. Papilomavírus humano 3. Vias de sinalização 4. NFêB 5. STAT3 6. Akt I. Lepique, Prof. Dr. Ana Paula II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB066/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Renata Ariza Marques Rossetti.

Título da Tese: Estudo do estado de ativação de vias de sinalização no microambiente tumoral e leucócitos circulantes em pacientes com tumor de colo de útero.

Orientador(a): Prof. Dr. Ana Paula Lepique.

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

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

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

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

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

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

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

São Paulo, 19 de abril de 2012.

PARECER 1045/CEP

A Comissão de *Ética em Pesquisas com Seres Humanos* do ICB, na sessão realizada no dia 18.04.2012, **APROVOU** o projeto intitulado: *"Estudo das vias de sinalização disparadas por CD40 em tumores do colo uterino e seus efeitos biológicos"* dos autores Profa. **ANA PAULA LEPIQUE** e a aluna **RENATA ARIZA MARQUES ROSSETTI**, *com a recomendação de que seja acrescentado no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido o item: " Resolução 196/96 - Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido"* bem como garantia de que os dados obtidos possam ser divulgados em publicações científicas mediante manutenção de sigilo quanto aos dados pessoais do voluntário.

Informa ainda, que seu projeto será regularizado junto a Plataforma Brasil, assim que a CONEP liberar o acesso ao sistema.

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

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **18.03.2013.**

Atenciosamente,

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

Ao meu melhor amigo, Rodrigo, que sempre esteve ao meu lado até mesmo quando tudo que eu mais precisava era silêncio.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Ana Paula Lepique, pelos inúmeros ensinamentos e, principalmente, por me ensinar a pensar como cientista.

À todos os membros da banca por aceitarem participar da conclusão dessa etapa tão importante da minha vida.

À Simone pelo companheirismo de todo momento. Seu acolhimento desde que cheguei ao laboratório fez-me sentir em casa.

À Karla companheira nas horas de desespero com as amostras humanas.

À Sandra por todo o suporte técnico e emocional.

Aos médicos que possibilitaram a realização desse projeto. Agradeço em especial a Dra. Noely, pelos inúmeros ensinamentos nos ambulatórios de quarta-feira no HU.

À toda equipe do Biobanco que me acudiu em um momento crítico do projeto, especialmente ao Prof. Roger Chammas que possibilitou essa colaboração.

Aos laboratórios da Profa. Luisa Villa por manter sempre as portas abertas e por todo suporte técnico.

Aos meus amigos que mesmo sendo de áreas tão diferentes da minha estavam sempre ao meu lado, prontos para me apoiar ou distrair a mente.

À FAPESP (projeto número 2011/11121-8) e CNPq pelo apoio financeiro concedido.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Martin Luther King)

RESUMO

ROSSETTI, R. A. M. **Estudo do estado de ativação de vias de sinalização no microambiente tumoral e leucócitos circulantes em pacientes com tumor do colo do útero.** 2016. 125 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Segundo estimativas mundiais, o câncer do colo do útero é o quarto tipo de câncer mais frequente em mulheres, sendo o sétimo tipo mais comum na população em geral. O principal fator etiológico destes tumores é a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV). Os tumores associados ao HPV apresentam microambiente complexo, onde células do sistema imune reconhecem e podem montar respostas antitumorais, ao mesmo tempo em que mecanismos de evasão tumoral modulam o fenótipo das células recrutadas para o tumor, suprimindo a atividade antitumoral. As interações bioquímicas entre os diferentes elementos do microambiente tumoral são complexas e crônicas. A forma como as células presentes no microambiente tumoral integram todos os sinais gerados ao longo do tempo, reflete-se na ativação de vias de sinalização, controle de expressão gênica e finalmente na atividade das células. Por exemplo, células apresentadoras de antígenos influenciadas pelo ambiente tumoral podem apresentar redução da ativação de NFκB o que tem sido associado, em modelos experimentais, a perfil tolerogênico e falha na ativação de linfócitos T. O objetivo deste projeto foi avaliar o estado de ativação de vias de sinalização nos compartimentos inflamatório e tumoral no local da lesão e sistemicamente, em leucócitos circulantes. Para tanto, avaliamos biópsias e células mononucleares do sangue periférico de pacientes com lesão de alto grau e câncer. Comparando lesões de alto grau (precursoras) e de câncer invasivo, nós investigamos as vias NFκB, STAT3 e Akt, e observamos que enquanto há tendência de aumento da sinalização de NFκB no microambiente tumoral, há redução significativa da ativação dessa via em leucócitos circulantes, tanto nas células apresentadoras de antígenos como nos linfócitos T. Já a via de STAT3 não apresenta variação clara de ativação entre os diferentes graus de lesão nas biópsias, mas sim aumento de atividade em leucócitos circulantes. Finalmente, a via de PI3K/Akt, apresenta aumento consistente de ativação, conforme o grau da lesão, tanto em biópsias como em células circulantes. Com a ideia de testar a hipótese de que há possibilidade de modular as respostas imunes antitumorais através da modulação de vias de sinalização, nós decidimos tratar linfócitos B, que podem ativar respostas secundárias de linfócitos T, com agonista de CD40, a fim de ativar a via de NFκB e buscar melhorar seu potencial antigênico. O estímulo dos linfócitos B de pacientes com lesão de alto grau e câncer com 10 µg/ml de sCD40L e 20 ng/ml de IL-4 por 24 horas, foi eficiente em aumentar o número de células $CD80^{+}CD86^{+}$, moléculas estas co-estimuladoras, cuja expressão é controlada por NFκB. Nossos resultados, mostram pela primeira vez um panorama do estado de ativação de vias de sinalização chave para a progressão tumoral, tanto localmente como sistemicamente, e também trazem a possibilidade de uma ferramenta imunomoduladora.

Palavras-Chaves: Câncer cervical. Papilomavírus Humano. Vias de sinalização. NFκB. STAT3. Akt. Linfócitos B.

ABSTRACT

ROSSETTI, R. A. M. **Signaling pathways characterization in tumor microenvironment and peripheral blood mononuclear cells in cervical cancer patients.** 2016. 125 p. PhD Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Cervical cancer is the forth most frequent cancer in women worldwide, and it is the seventh more common in general population. The main factor for developing these tumors is the infection with human papillomavirus (HPV). HPV tumors recruit leucocytes and change their phenotype as an evasion mechanism. The inflammatory infiltrate modulation has been studied as a possible anti tumor therapy; however, the tumor mechanisms that influence the immune cells phenotype are not complete characterized. It is important to understand the tumor chronic signs effects responsible for alterations in signaling pathways that may be beneficial to the tumor growth. In this study, we tried to understand how the tumor might influence the immune cells behavior, analyzing signaling pathways related to proliferation, survival and immune response. Biopsy and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with high-grade lesion and cancer were analyzed, together with PBMC from health woman, as control. There was an increase in the biopsy inflammatory infiltrate from patients with cancer when compared with the high-grade lesions ones. Most of the inflammatory infiltrate is non-activated T lymphocytes. The inflammatory infiltrate has a higher total NFκB expression than the tumor cells in both patients. The total NFκB expression in both patients is similar, but the biopsy immune cells from patients with cancer have a higher phospho p65 expression than the patients with high-grade lesions. We could not find any difference in the STAT3 proteins expression in the biopsy cells. Meanwhile the total and phospho Akt expression was higher in the biopsy cells from cancer patients than the high-grade lesions ones. When the systemic effect was evaluated, we found a small percentage of T lymphocytes in cancer patients than in control group. We could observe a decrease in the total and phospho p65 expression in the total PBMC from patients compared with the control group. The cancer patients had an even more accentuated decreased than the high-grade lesions patients. On the other hand, the total PBMC from cancer patients had an increase in the STAT3 activation when compared with the control group; this increase was observed in the T lymphocytes, but not in the antigen presenting cells (APC). A similar response between cancer patients and the control group was observed related to the activation of Akt signaling pathway; but the augment observed in this signaling pathways was identified in the APC as well in the T lymphocytes. In an attempt to identify a better immune response against the tumor effect in the APC from PBMC, as an immune therapy, we stimulated B lymphocytes from patients with 10 µg/ml of sCD40L and 20 ng/ml of IL-4 for 24 hours. The stimuli increase the number of $CD80^{+}CD86^{+}$ cells. Our results demonstrate a tumor effect over the immune cells, with an important systemic effect. However, the approach used in this study to stimulate B lymphocytes from patients present us with a possible strategy to scape from the tumor influence.

Keywords: Cervical cancer. Human papillomavirus. Signaling pathways. NFκB. STAT3. Akt. B lymphocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração do genoma do HPV 16.....20

Figura 2 – Avaliação da ativação das vias de sinalização analisadas através da fosforilação das proteínas nos sítios identificados pelos anticorpos utilizados no estudo.....39

Figura 3 – Figura representativa da estratégia de análise dos dados obtidos por citometria de fluxo das biópsias das pacientes.....46

Figura 4 – Identificação das populações encontradas nas biópsias das pacientes diagnosticadas com lesão de alto grau e câncer.....47

Figura 5 – Figura representativa da estratégia de análise dos dados obtidos por citometria de fluxo das células mononucleares do sangue periférico das pacientes.....49

Figura 6 – Identificação das células mononucleares no sangue periférico de pacientes diagnosticadas com lesão de alto grau e câncer e um grupo controle de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino.....50

Figura 7 – Avaliação da expressão das proteínas NFκB total e p65 fosforilada nas amostras de biópsias de pacientes diagnosticadas com lesão de alto grau e câncer do colo do útero.....52

Figura 8 – Avaliação da expressão das proteínas NFκB total e p65 fosforilada nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes diagnosticadas com lesão de alto grau e câncer e um grupo controle de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino.....54

Figura 9 – Avaliação da expressão das proteínas STAT3 total e fosforilada nas amostras de biópsias de pacientes diagnosticadas com lesão de alto grau e câncer do colo do útero.....56

Figura 10 – Avaliação da expressão das proteínas STAT3 total e fosforilada nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes diagnosticadas com lesão de alto grau e câncer e um grupo controle de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino.....58

Figura 11 – Avaliação da expressão das proteínas Akt total e fosforilada nas amostras de biópsias de pacientes diagnosticadas com lesão de alto grau e câncer do colo do útero.....60

Figura 12 – Avaliação da expressão das proteínas Akt total e fosforilada nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes diagnosticadas com lesão de alto grau e câncer e um grupo controle de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino.....62

Figura 13 – Figura representativa demonstrando o enriquecimento dos linfócitos B.....64

Figura 14 – Curva dose resposta do estímulo com sCD40L nos linfócitos B de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino.....65

Figura 15 – Adição da citocina IL-4 ao estímulo com sCD40L nos linfócitos B de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino.....67

Figura 16 – Efeito do estímulo com 10 μg/ml de sCD40L e 20 ng/ml de IL-4 por 24 horas nos linfócitos B de pacientes com lesão de alto grau e câncer no colo uterino.....69

Figura 17 – Desenho esquemático do estado de ativação das vias de sinalização no microambiente tumoral e em leucócitos circulantes.....76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conjunto de anticorpos utilizados para a marcação de superfície das biópsias e células mononucleares do sangue periférico.....37

Tabela 2 – Anticorpos utilizados para a identificação das proteínas intracelulares nas biópsias e células mononucleares do sangue periférico.....38

Tabela 3 – Anticorpos utilizados para a análise do estímulo com agonista de CD40 nos linfócitos B.....41

Tabela 4 – Característica das pacientes.....44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC – célula apresentadora de antígeno
CBP – proteína de ligação a CREB
CD – do inglês **"**cluster of differentiation"
DNA – ácido desoxirribonucleico
EGF – fator de crescimento epidermal
FIGO – Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia
FSC – do inglês "Forward Scatter"
HIV – vírus da imunodeficência humana
HLA – antígeno leucocitário humano
HPV – papilomavírus humano
hTERT – transcriptase reversa da telomerase
HU-USP – Hospital Universitário da Universidade de São Paulo
ICESP – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IFN – Interferon
IKK – quinase de IκB
IL – Interleucina
iNOS – forma induzida da sintase do óxido nítrico
IRF – fator regulador do Interferon
JAK – Janus quinase
LCR – do inglês "Long Control Region"
M1/M2 – macrófagos tipo 1 e 2
MFI – intensidade mediana de fluorescência
MHC-II – complexo principal de histocompatibilidade classe II
MTH – do inglês "mouse tonic hank"
mTOR – proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NFκB – fator nuclear κB
NIC – neoplasia intraepitelial cervical
PBS – salina tamponada com fosfato
PDK – quinase dependente de fosfatidilinositol
PI3K – fosfatidilinositol-3-quinase
PIP2 – fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3 – fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PKB – proteína quinase B
PTEN – fosfatase homóloga a tensina
SBF – soro bovino fetal
sCD40L – CD40 ligante solúvel
SOCS – supressor de sinalização de citocinas
SSC – do inglês "Side Scatter"
STAT3 – transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TGF-β – fator de crescimento e transformação beta
TNF-α – fator de necrose tumoral alpha
VEGF – fator de crescimento endotelial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....17
1.1 Câncer cervical.....17
1.2 Papilomavírus Humano.....19
1.3 Sistema Imune e HPV.....22
1.4 Inflamação crônica e Câncer.....24
1.5 Vias de Sinalização.....26
1.5.1 NFκB.....26
1.5.2 STAT3.....28
1.5.3 Akt.....30
2 OBJETIVOS.....33
2.1 Objetivo Geral.....33
2.2 Objetivos Específicos.....33
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....35
3.1 Casuística.....35
3.2 Processamento das biópsias.....36
3.3 Processamento do sangue periférico.....36
3.4 Avaliação da expressão de proteínas de vias de sinalização por citometria de fluxo.....37
3.5 Genotipagem do HPV nas biópsias.....39
3.5.1 Extração de DNA das biópsias.....39
3.5.2 Linear Array® HPV Genotyping Test.....40
3.6 Isolamento dos linfócitos B.....40
3.7 Ativação dos linfócitos B com sCD40L.....41
3.8 Análise Estatística.....41
4 RESULTADOS.....43
4.1 Características das pacientes.....43
4.2 Identificação das subpopulações do microambiente tumoral das biópsias do colo uterino e das células mononucleares do sangue periférico.....44
4.3 Caracterização da via de NFκB em biópsias do colo uterino e células mononucleares do sangue periférico de pacientes com lesão de alto grau e câncer.....50

4.4 Caracterização da via de STAT3 em biópsias do colo uterino e células mononucleares do sangue periférico de pacientes com lesão de alto grau e câncer.....55
4.5 Caracterização da via de Akt em biópsias do colo uterino e células mononucleares do sangue periférico de pacientes com lesão de alto grau e câncer.....59
4.6 Efeito do tratamento com CD40L solúvel nos linfócitos B de mulheres saudáveis e pacientes com lesão de alto grau e câncer.....63
5 DISCUSSÃO.....71
6 CONCLUSÕES.....79
REFERÊNCIAS.....82
APÊNDICE
A - Manuscrito ROSSETTI, 2016.....91

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer cervical

O câncer cervical é uma importante enfermidade que acomete milhares de mulheres anualmente. Segundo estimativas mundiais, o câncer do colo do útero é o quarto tipo de câncer mais frequente em mulheres, sendo o sétimo tipo mais comum na população em geral. Oitenta e cinco por cento dos casos estão em países em desenvolvimento, causando grande impacto nos programas de saúde pública devido ao alto grau de morbidade associado a essa doença e a necessidade de tratamento cirúrgico da mesma (GLOBOCAN, 2012). No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, o carcinoma do colo uterino é o terceiro mais frequente na população feminina, e a quarta causa de morte de mulheres por câncer (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2016).

O principal fator etiológico associado ao câncer cervical é a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco oncogênico. Assim, o HPV é associado a virtualmente todas as ocorrências de câncer cervical, sendo detectado em 99,7% dos casos (WALBOOMERS et al., 1999). Os HPV 16 e 18 juntos são responsáveis por 70% dos casos de câncer cervical, sendo também os dois tipos mais frequentes nas infecções assintomáticas (BRUNI et al., 2010; STANLEY, 2008). A infecção pelo HPV também é fator etiológico de uma porcentagem dos tumores anogenitas e orofaríngeos em homens e mulheres (CHATURVEDI et al., 2011).

Embora a infecção pelo vírus seja o principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer, a maior parte das mulheres infectadas elimina a infecção espontaneamente. O sistema imune tem importante papel na eliminação do vírus e das lesões precursoras de câncer, uma vez que pacientes imunodeficientes, como portadores de HIV, apresentam maior risco de desenvolvimento de lesões de alto grau e câncer (DUERR et al., 2001; PALEFSKY et al., 2001). Há também fatores relacionados ao comportamento que podem influenciar o desenvolvimento tumoral, como o número de parceiros sexuais, o uso de anticoncepcional oral por um longo período de tempo, o número de partos e uso de álcool e/ou tabaco (PARKIN; BRAY, 2006; SCHLECHT et al., 2001).

As lesões precursoras são classificadas pelo sistema Bethesda, através da análise citológica cérvico-vaginal que tem como objetivo facilitar a interpretação dos resultados tornando os termos menos ambíguos, além de aproximá-los do vocabulário das pacientes. Tal sistema define como lesões de baixo grau as alterações celulares devidas ao HPV como a displasia leve (Neoplasia Intraepitelial Cevical-I, ou seja, NIC-I), e unifica sob o termo de lesão de alto grau a displasia moderada (NIC-II), a displasia acentuada (NIC-III) e o carcinoma *in situ* (NIC-III) (APGAR; ZOSCHNICK; WRIGHT, 2003; SOLOMON et al., 2002).

O estadiamento dos carcinomas cervicais são classificados pelo sistema FIGO, do Italiano, *Fesddration Internationale des Gynaecologistes et Obstetristes*. O estadiamento é uma forma de descrever o câncer, identificando sua localização, se está disseminado, e se está afetando as funções de outros órgãos, possibilitando assim, a melhor decisão sobre o tratamento de cada paciente. Há 5 estágios no câncer cervical:

- Estágio 0, o tumor encontra-se apenas na superfície do colo uterino, equivale ao carcinoma *in situ*.
- Estágio I, o tumor ainda se encontra localizado no colo uterino, mas não apenas na superfície, não há invasão a outros tecidos e não há disseminação para os linfonodos vizinhos.
- Estágio II, o tumor já ultrapassa o colo uterino, mas não se disseminou para as paredes da pelve ou parte inferior da vagina, não há comprometimento dos linfonodos vizinhos.
- Estágio III, o tumor se disseminou para a parte inferior da vagina e/ou paredes da pelve, podendo bloquear os ureteres. Na subclassificação em Estágio IIIB já há comprometimento dos linfonodos da pélvis.
- Estágio IV, o tumor se encontra disseminado podendo estar mais localizado nas regiões próximas, como bexiga e reto (Estágio IVA) ou com comprometimento de órgãos distantes da região pélvica, como pulmão e fígado (Estágio IVB).

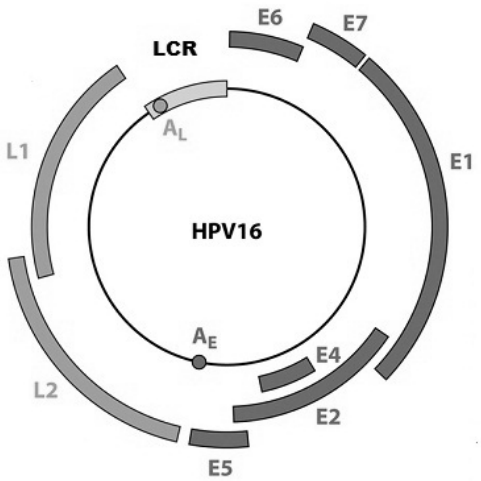
Das mulheres infectadas pelo vírus 12% desenvolvem lesão de baixo grau, sendo que dessas apenas 10% progridem para lesão de alto grau. Das mulheres com lesão de alto grau, apenas 10% irão progredir para o desenvolvimento do câncer cervical, dessa forma, apenas 0,1% das mulheres infectadas pelo HPV

desenvolvem o tumor (SCHLECHT et al., 2001). Embora a porcentagem de mulheres que desenvolvem o tumor seja pequena, o valor absoluto é alto devido ao grande número de mulheres infectadas pelo vírus. A taxa de infecção pelo vírus é em torno de 20 a 40% em mulheres sexualmente ativas na faixa dos 20 anos. Essa taxa vai diminuindo conforme o aumento da idade das mulheres (BASEMAN; KOUTSKY, 2005).

1.2 Papilomavírus Humano

Os Papilomavírus são uma família de pequenos vírus de DNA circular dupla-fita não envelopado com genoma de aproximadamente 7.9 kb, que codifica dependendo do tipo viral até 8 genes, envolvido em um capsídeo icosaédrico. O genoma do HPV é composto por três regiões (Figura 1), uma região reguladora, denominada LCR (do inglês, Long Control Region), uma região de genes que codificam proteínas precoces, E1 a E7, e uma região de genes que codificam proteínas consideradas tardias no ciclo viral, L1 e L2. As proteínas tardias são proteínas estruturais do capsídeo do vírus, já as proteínas precoces estão envolvidas com diversas funções virais, inclusive mecanismos de evasão do sistema imune. As proteínas E6 e E7 são classificadas como oncoproteínas (BOCCARDO; LEPIQUE; VILLA, 2010; DOORBAR et al., 2012).

Figura 1 - Ilustração do genoma do HPV 16.



Representação do genoma do HPV16. Esse genoma contém uma região precoce, composta pelos genes E1 a E7, que codificam proteínas envolvidas nas funções virais; e uma região tardia, composta pelos genes L1 e L2, que codificam proteínas virais estruturais do capsídeo. O controle da transcrição e replicação dos genes precoces é conferido pela região LCR. Figura modificada de Quint et al, 2012.

Os HPVs infectam pele ou mucosas de forma específica, sendo subdivididos em genêros. O genêro *Betapapillomavirus* compreende os tipos de HPV prevalentes em lesões cutâneas, que em alguns casos, podem contribuir para o desenvolvimento de câncer de pele não-melanômico. Já os do gênero *Alphapapillomavirus*, são principalmente associados a infecções do trato anogenital e orofaríngeo e ainda são subdivididos em tipos de baixo e alto risco de acordo com seu potencial oncogênico. Os de baixo risco oncogênico geram lesões benignas, como verrugas, papilomas anogenitais e papilomas orofaríngeos, enquanto os tipos virais de alto risco apresentam os mais eficientes mecanismos de evasão do sistema imune e de imortalização de queratinócitos, levando o desenvolvimento de lesões malignas (DOORBAR, 2005; VILLIERS et al., 2004). Os HPV de baixo risco mais comuns nas lesões anogenitais são os tipos 6 e 11, enquanto que os HPV de alto risco mais frequentemente encontrados em lesões malignas são tipos 16 e 18.

O ciclo viral do HPV não é citolítico. O vírus infecta os queratinócitos da camada basal, e tem seu ciclo de vida intimamente associado ao processo de diferenciação natural para sua replicação. As principais proteínas virais envolvidas diretamente na replicação viral são E1 e E2, sendo que E2 também controla a transcrição dos genes precoces virais (DOORBAR et al., 2012; FRATTINI; LAIMINST, 1994; GOODWIN et

al., 1998). Durante a fase inicial do ciclo, o DNA viral se mantém epissomal e a proteína E2 mantem uma baixa expressão dos oncogenes E6 e E7 (JEON; LAMBERT, 1995; ROMANCZUK; HOWLEY, 1992). Conforme os queratinócitos vão se diferenciando o vírus vai se replicando lentamente, aumentando sua replicação em até 10 vezes assim que os queratinócitos alcançam a camada supra-basal, nessa fase há expressão aumentada dos genes E6 e E7, além da expressão dos genes tardios, para então ocorrer a liberação de novas partículas virais (DOORBAR et al., 2012).

Enquanto em infecções produtivas o genoma viral se mantem epissomal, em infecções persistentes existe o risco da integração do genoma viral ao genoma da células hospedeira. A integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro ocorre ao acaso, sem preferência por um sítio específico do DNA, entretanto dependendo do local da integração do genoma viral a célula infectada tem vantagens adaptativas sobre as outras (ZIEGERT et al., 2003). A imortalização da células pode ocorrer quando, durante a integração do genoma viral, há preservação da região reguladora e dos oncogenes E6 e E7, com quebra ou perda de parte do gene E2. Dessa forma, a expressão de E6 e E7 torna-se constitutiva (DOORBAR et al., 2012).

Nos tumores associados ao HPV, as proteínas codificadas pelos oncogenes virais E6 e E7 do HPV de alto risco têm papel essencial na manutenção do fenótipo transformado das células (GOODWIN; DIMAIO, 2000). As proteínas E6 e E7 são as principais responsáveis pela imortalização dos queratinócitos infectados, evento inicial no processo de transformação tumoral, e pelos principais mecanismos de evasão do sistema imune (TINDLE, 2002). A oncoproteína E6 é responsável pela inativação e degradação de p53 através da ligação com a proteína E6AP, uma subunidade E3 do sistema proteassoma (SCHEFFNER et al., 1990). Além disso, a proteína E6 aumenta a transcrição de hTERT, subunidade catalítica da telomerase com função de manter a integridade dos telômeros durante a replicação de genoma celular, possibilitando assim a imortalização da célula infectada (BRANCA et al., 2006; KLINGELHUTZ; FOSTER; MCDOUGALL, 1996). Já a oncoproteína E7 é capaz de se associar com proteínas hipofosforiladas da família retinoblastoma (pRB), levando a degradação de p105, p107 e p130, e aumentando a concentração de fatores E2F livres, que por sua vez, induzem a expressão de genes que controlam a progressão do ciclo celular (JOHUNG; GOODWIN; DIMAIO, 2007).

Assim, devido ao papel conjunto de E6 e E7 há continuidade do ciclo celular, mesmo com acúmulo de mutações.

1.3 Sistema Imune e HPV

A importância do sistema imune tanto na resposta frente a infecção pelo HPV quanto em relação a progressão da doença pode ser evidenciada em estudos epidemiológicos, uma vez que pacientes imunodeficientes apresentam maior risco de infecção pelo vírus e também de desenvolver lesões de alto grau e câncer (DUERR et al., 2001; PALEFSKY et al., 2001).

Nas lesões associadas ao HPV observa-se um aumento crescente do número de macrófagos conforme a progressão da doença. A presença de macrófagos tipo 1 (M1) é um indicador de bom prognóstico para a paciente (MAZIBRADA et al., 2008). Os macrófagos M1 são caracterizados pela secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1, IL-6, IL-12), além da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Entretanto estudos indicam que os macrófagos tumorais geralmente não expressam iNOS (MUNN; MELLOR, 2007), assemelhando-se ao fenótipo tipo 2 (M2). Os macrófagos M2 são caracterizados pela secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, TGF-β) e expressão de Arginase 1. Nosso laboratório demonstrou, em modelo murinho de tumor associado ao HPV, a ausência da expressão de iNOS e a atividade constitutiva de Arginase 1 nos macrófagos que infiltram o tumor. Tais macrófagos expressam IL-10 e TGF-β, e induzem fenótipo regulador em linfócitos T (LEPIQUE et al., 2009). A depleção dos macrófagos ou a deficiência de IL-10 inibem o crescimento tumoral (BOLPETTI et al., 2010).

Observa-se também a redução do número de células dendríticas nas lesões associadas ao HPV, devido, principalmente, à redução da expressão de E-Caderina em queratinócitos infectados (HUBERT et al., 2005). Além disso, as células dendríticas tumorais expressam Indoleamina 2,3 dioxigenase (MUNN; MELLOR, 2007), sabidamente um indutor de fenótipo regulador em células T.

A exposição das células apresentadoras de antígenos ao vírus ou as células tumorais influenciam o tipo de fenótipo das células T a ser desenvolvido. Demonstrou-se que linfócitos T $CD4^+$ de mulheres positivas para DNA de HPV, porém assintomáticas, respondem a antígenos de HPV proliferando e secretando

IFN-γ, IL-2, IL-5, TNF-α, IL-10 (JONG et al., 2004; WELTERS et al., 2006). Já linfócitos de mulheres com câncer proliferam pouco em resposta a antígenos de HPV, produzindo apenas IL-10. Além disso células T reguladoras específicas aos antígenos do HPV inibem a resposta de células T efetoras específicas (BURG et al., 2007). O desenvolvimento da resposta citotóxica é fundamental no combate tanto das células infectadas pelo vírus, como também das células tumorais, entretanto, a resposta de linfócitos T $CD8^+$ é muitas vezes deficiente nas pacientes com lesões de alto grau do colo uterino (TRIMBLE et al., 2010). Um dos mecanismos responsáveis por essa fraca resposta dos linfócitos T citotóxicos é a diminuição da expressão do MHC de classe I nas células infectadas pelo vírus. A proteína viral E5 leva a retenção das proteínas do HLA A, B e C no complexo de Golgi, impedindo assim, o seu transporte para a membrana celular, evitando assim a apresentação de antígenos virais para linfócitos T $CD8^+$ (ASHRAFI et al., 2005). Já os complexos E e G não são impedidos de chegar à membrana das células infectadas, evitando a resposta citotóxica de células NK. O importante papel dos linfócitos T foi demonstrado em um estudo que avaliou pacientes quanto ao risco de metástase no linfonodo drenante. As pacientes que não apresentavam metástase no linfonodo, um fator relacionado a um melhor prognóstico, apresentavam uma associação com um maior número de linfócitos T $CD8^+$ infiltrantes no tumor, além de apresentarem maiores razões entre T $CD8^+$/T $CD4^+$ e T $CD8^+$/T reguladora, também, no tumor (PIERSMA et al., 2007).

A resposta humoral no câncer cervical não se encontra associada com o prognóstico da paciente. Durante a infecção viral, há uma baixa e demorada produção de anticorpos contra as proteínas do capsídeo viral. Embora esses anticorpos não tenham papel na eliminação da infecção em curso, eles são capaz de proteger da doença em uma futura infecção (PATEL; CHIPLUNKAR, 2009; STANLEY, 2010). Foi demostrando que os anticorpos contra a proteína L1, do capsídeo viral, são capazes de permanecer no organismo por até 10 anos (GEIJERSSTAM et al., 1998). A resposta humoral contra as oncoproteínas E6 e E7, ocorre em apenas 50% das pacientes com câncer cervical, sendo o título dessa resposta bastante baixo (SILINS et al., 2002).

O HPV apresenta diversos mecanismos de evasão do sistema imune impedindo, assim, o desenvolvimento de uma resposta efetora eficiente contra os antígenos

virais (BOCCARDO; LEPIQUE; VILLA, 2010). Em uma infecção, a entrada do capsídeo viral é percebida pelas células de Langerhans, com objetivo de montar uma resposta imunológica. Entretanto, estudos demonstram que o reconhecimento da proteína L1 do capsídeo viral pelas células de Langerhans não é capaz de levar uma ativação nessas células (FAUSCH et al., 2015). Outro mecanismo de evasão está relacionado a produção de Interferons do tipo I (IFN-α e IFN-β), que induzem respostas anti-virais (HERDMAN et al., 2006; PATEL; CHIPLUNKAR, 2009). As proteínas E6 e E7 interagem diretamente com componentes da via de sinalização que leva a expressão de genes alvos de Interferon tipo I. A proteína E7 interage com IRF-1 (*Interferon Regulatory Factor*-1) inibindo sua atividade e a proteína E6 inibe a atividade transcricional de IRF-3, tais ações levam à diminuição da expressão de IFN-β (ANTONSSON et al., 2006; RONCO et al., 1998; UM et al., 2002). O IFN-α também é inibido através da ligação da proteína E7 com IRF-9 (Antonsson, Payne et al. 2006). Outro mecanismo de evasão relacionado a via do Interferon foi identificado em um estudo com células epiteliais cervicais que contêm cópias epissomais do HPV-16. Demonstrou-se que o IFN-β ao eliminar as células com o DNA epissomal, acaba selecionando as células com o DNA viral integrado e alta expressão dos oncogens E6 e E7 (HERDMAN et al., 2006).

1.4 Inflamação crônica e Câncer

Tumores são estruturas complexas formadas por vários tipos celulares. A combinação de células tumorais, células endoteliais, fibroblastos, elementos acelulares e células do sistema imunes forma o microambiente tumoral. O tumor promove o condicionamento das células inflamatórias, e de todas as outras presentes no microambiente tumoral, criando um ambiente favorável à sua progressão (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Assim, a inflamação, antes uma resposta protetora fundamental para o organismo, tem no seu descontrole um importante cofator na patogenicidade de doenças crônicas como o câncer, sendo atualmente definida como a sétima marca do câncer (BEN-NERIAH; KARIN, 2011a; CAVALLO et al., 2011). Rudolf Virchow demonstrou, em 1858, a presença de leucócitos no tecido neoplásico, associando assim inflamação e câncer. Através da produção de citocinas e quimiocinas o tumor leva o recrutamento de células do

sistema imunológico, as quais serão influenciadas pelo tumor a produzirem fatores de crescimento, de sobrevivência e fatores pró-angiogênicos, resultando na amplificação da produção de citocinas e quimiocinas no microambiente tumoral (CHEN et al., 2006; COUSSENS; WERB, 2002). O infiltrado inflamatório torna-se um importante mediador da promoção e progressão tumoral (KARIN; GRETEN, 2005).

Há fortes evidências do papel da inflamação na susceptibilidade tumoral. Indivíduos que usam drogas anti-inflamatórias não esteroidais tem incidência reduzida de tumores, enquanto, pacientes obesos (inflamação gerada pelo tecido adiposo) apresentam maior incidência de câncer (TRINCHIERI, 2012). As doenças inflamatórias do intestino, como colite e doença de Crohn, apresentam forte associação com o câncer de intestino (BALKWILL; COUSSENS, 2004).

Atualmente acredita-se que aproximadamente 20% dos casos de câncer estão associados a infecção por patógenos. Embora alguns patógenos sejam capazes de induzir diretamente a transformação celular, outros favorecem a carcinogênese induzindo inflamação crônica no local. O câncer gástrico, por exemplo, está intimamente relacionado à inflamação resultante da infecção crônica por *Helicobacter pylori*. Já o câncer hepático está associado a infecção crônica pelos Vírus da Hepatite B e C.

O papel da inflamação crônica no desenvolvimento do câncer cervical ainda não está bem estabelecido. Há fortes evidências associando a inflamação na promoção e progressão tumoral. Em modelo murino verificou-se que a deposição de anticorpos no tecido tumoral leva o recrutamento de células inflamatórias, as quais são diretamente responsáveis pela progressão tumoral (VISSER; KORETS; COUSSENS, 2005). Os linfócitos B têm sido considerados, em diferentes estudos, pró-tumorais, em geral devido à expressão de citocinas reguladoras como IL-10 (TAN; COUSSENS, 2007). Entretanto, vale lembrar que linfócitos B são células apresentadoras de antígenos profissionais, incapazes de ativar linfócitos T *naive*, mas capazes de ativar respostas secundárias em linfócitos previamente ativados.

Sabe-se, também, que células HPV positivas secretam grandes quantidades de IL-6 e IL-8, importantes citocinas pró-inflamatórias (STONE et al., 2014a). Em contra partida, o microambiente tumoral tem grande quantidade de IL-10, uma citocina supressora da resposta imune (BOLPETTI et al., 2010).

1.5 Vias de Sinalização

Câncer é uma doença crônica caracterizada por alterações genéticas e epigenéticas que desencadeiam um crescimento celular descontrolado, escapando de mecanismos de controle da sobrevivência e migração celular (SEVER; BRUGGE, 2015). Durante a progressão da doença, as células tumorais adquirem características como a capacidade de proliferação independente de fatores de crescimento externos, de invadir tecidos adjacentes e de migrar para sítios distantes (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Todas essas novas características refletem alterações nas vias de sinalização que em células normais controlariam a proliferação, sobrevivência e motilidade celular. O microambiente tumoral é complexo, composto não apenas por células tumorais como também, por células do sistema imune, células endoteliais e fibroblastos. Citocinas produzidas por um tipo celular são percebidas pelas outras células participantes desse ambiente desencadeando uma possível resposta pró ou antitumoral. O acúmulo de sinais durante anos do desenvolvimento tumoral leva uma subversão das vias de sinalização em todas as células do microambiente tumoral (MARTIN, 2003). Nosso estudo foca-se na avaliação de três vias de sinalização, importantes no desenvolvimento da resposta imune e no controle da proliferação e sobrevivência celular.

1.5.1 NFκB

NFκB é um fator de transcrição responsável pela regulação de muitos genes envolvidos na resposta imunológica e inflamatória. A ativação clássica de NFκB é induzida por citocinas pró-inflamatórias, como TNF-α e IL-1, e também pelo reconhecimento de patógenos por receptores de padrões moleculares. A via alternativa da ativação de NFκB está envolvida com o desenvolvimento de órgãos linfoides, sendo fundamental para o desenvolvimento de respostas adaptativas pelo organismo (BONIZZI; KARIN, 2004). A família de NFκB é composta por cinco membros: p65 (também conhecida por RelA), RelB, c-Rel, p50 (que tem como precursor a proteína p105) e p52 (que tem como precursor a proteína p100). A proteína NFκB é formada pela combinação dos membros da família, podendo ser

encontrada como heterodímeros, ou menos frequentemente, como homodímeros. A função de NFκB é determinada pela composição do dímero. Cada dímero se liga a um sítio específico de transcrição. A maioria dos dímeros são ativadores da transcrição, entretanto os homodímeros de p50 e p52, atuam como repressores da transcrição (GHOSH; KARIN; HAVEN, 2002).

O complexo NFκB é mantido no citoplasma da célula pelo seu inibidor IκB. Após um sinal de ativação, o complexo IKK fosforila a proteína IκB que se encontra ligado ao complexo NFκB. A proteína IκB torna-se, então, um alvo para a ubiquitinização, e consequentemente é degradada pelo complexo proteassoma. A degradação do IκB, expõe uma sequencia de localização nuclear no complexo NFκB, resultando na sua translocação para o núcleo (CHEN; GREENE, 2004; GHOSH; HAYDEN, 2012). A translocação do complexo NFκB para o núcleo não é suficiente para promover a máxima função do complexo, modificações pós-traducionais são necessárias. A modificação pós-traducional mais estudada é a fosforilação de p65 na serina 536. Além dessa modificação ser importante para o aumento da capacidade de ligação do complexo com o DNA, ela também é responsável por criar um sítio de interação da proteína p65 com o co-ativador transcricional CBP/p300 (ZHONG; VOLL; GHOSH, 1998).

A ativação de NFκB tem sido encontrada em diversos tumores sólidos. Acredita-se que NFκB tenha importante papel na tumorigênese aumentando a inflamação local, tornando o microambiente tumoral favorável a progressão da doença (BEN-NERIAH; KARIN, 2011b; KARIN; GRETEN, 2005). Além disso, o aumento na ativação da via de NFκB tem sido associada a resistência ao tratamento com quimioterápicos (KARIN; GRETEN, 2005; SHEHATA, 2005). O fator de transcrição NFκB também está associado a homeostase epidermal, agindo como um regulador negativo da proliferação e promotor da diferenciação celular (SEITZ et al., 1998). A superexpressão do inibidor IκB na pele de camundongos levou um aumento na quantidade de células apoptóticas e o desenvolvimento espontâneo de carcinoma (HOGERLINDEN et al., 1999). Tal mecanismo também foi observado em culturas de células epidermais humanas (DAJEE et al., 2003).

O papel da via de NFkB nos leucócitos durante a progressão tumoral não está bem descrito. A via de NFkB é essencial na ativação da expressão de moléculas co-estimuladoras, importantes para ativação de linfócitos T, e de citocinas que induzem

fenótipo citotóxico, por exemplo, IL-12 (FONG; WU; KIPPS, 1996; MURPHY et al., 1995; YOSHIMURA et al., 2001; ZOU; HU, 2005). Em modelo experimental, nosso laboratório demonstrou que o tumor associado ao HPV 16 é capaz de inibir a via de NFkB, em um mecanismo dependente da citocina IL-10 (STONE et al., 2014b). Uma das formas de ativação da via de NFkB é a utilização do ligante ou agonista do receptor CD40. CD40 é um receptor da família do TNF-α, expresso por células apresentadoras de antígenos profissionais, e seu ligante, CD40L, é expresso por linfócitos T ativados. A interação entre os linfócitos T e células apresentadoras de antígenos leva tanto ao estímulo do linfócito T, como ao da célula apresentadora, induzindo nestas a expressão de moléculas co-estimuladoras e citocinas. Nosso laboratório identificou uma melhora no potencial de apresentação antigênica em linfócitos B de camundongos com tumores associados ao HPV 16 estimulados com agonista de CD40, revertendo, assim, o efeito do tumor sobre essas células (manuscrito em anexo).

1.5.2 STAT3

A maioria dos tumores tem elevado nível de STAT3 constitutivamente ativado no núcleo tanto de células tumorais, como no de células inflamatórias presentes no microambiente tumoral. A ativação de STAT3 leva a transcrição de genes que bloqueiam a apoptose, favorecem a proliferação e sobrevivência celular, além de promoverem a angiogênese e metástase tumoral (JOHNSTON; GRANDIS, 2011; TRINCHIERI, 2012). Além disso, os genes alvos de STAT3 tem importante papel na supressão do sistema imune. A ativação de STA3 leva a uma diminuição na produção de IL-12 e TNF-α e um aumento da produção de IL-6, IL-10 e TGF-β. Importantes moléculas da apresentação de antígenos, CD80, CD86 e MHC-II, também são moduladas negativamente pelos genes alvos de STAT3 (CARPENTER; LO, 2014).

A ativação de STAT3 ocorre através de receptores de citocinas, como a IL-6 e de fatores de crescimento, como o EGF. A dimerização dos receptores induzidos pelo reconhecimento do seu ligante leva a fosforilação de resíduos tirosina na glicoproteína 130, adjacente ao complexo, pelas quinases JAK1 e JAK2. Esse recentes sítios de fosforilação permitem o ancoramento da proteína STAT3 através

do domínio SH2 (WANG et al., 2013). A ligação da proteína STAT3 com o complexo do receptor de citocina, leva à fosforilação do resíduo de tirosina 705 na região C-terminal da proteína STAT3, promovendo a sua homodimerização. Na forma homodimérica, STAT3 se transloca para o núcleo onde se ligará a sítios específicos do DNA, levando assim, à transcrição de seus genes alvos (JOHNSTON; GRANDIS, 2011). Uma segunda fosforilação, no resíduo de serina 727, já no núcleo, irá modular a atividade transcicional de STAT3 (YANG et al., 2005). A ativação de STAT3 é transiente, pois é rapidamente regulada negativamente pelas proteínas SOCS (do inglês, *Supressor of Cytokine Signaling*) (YU; KORTYLEWSKI; PARDOLL, 2007). As proteínas SOCS também são induzidas por citocinas e fatores de crescimento, em um clássico mecanismo de feed-back negativo. O próprio fator de transcrição STAT3 induz a produção de proteínas SOCS (WANG et al., 2013).

A proteína STAT3 é encontrada ativa e superexpressa em diversos tipos de tumores (CHEN et al., 2007), no câncer cervical está relacionada a um pior prognóstico da paciente (TAKEMOTO et al., 2009). A citocina IL-6, encontrada em abundância no microambiente tumoral, é importante na patogenicidade do câncer cervical, sendo associada com a severidade da doença. A ativação de STAT3 pela citocina IL-6 é responsável pelo aumento da atividade angiogênica local através do aumento na produção de VEGF (WEI et al., 2003). STAT3 também é responsável por regular a expressão de fatores de transcrição relacionados a transição epitélio-mesênquima, como Twist e Snail. O fator de transcrição Twist tem como um dos genes alvos a citocina IL-6, formando assim um interessante feed-back positivo nas células tumorais: a citocina IL-6 leva a ativação de STAT3, que induz a expressão de Twist, que leva a um aumento na produção de IL-6 (MURRAY, 2016).

A análise de linhagens positivas para HPV 16 e lâminas de biópsias de câncer no colo uterino observou uma correlação positiva entre a proteína STAT3 ativada e a expressão das proteínas E6 e E7 do HPV. Observou também, uma correlação negativa com a expressão das proteínas p53 e pRb. A inibição da fosforilação na tirosina 705 em STAT3 nas linhagens celulares resultou em um acúmulo de p53 e pRb e uma diminuição na expressão de E6 e E7 (SHUKLA et al., 2013).

1.5.3 Akt

A quinase serina/treonina Akt, também conhecida por proteína quinase B (PKB), tem um importante papel na sinalização celular de citocinas, fatores de transcrição e outros estímulos celulares. Alterações na ativação desta via são comumente encontradas em doenças como o câncer. A formação de PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato) a partir de PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato) pela enzima PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase), recruta a proteína Akt para a membrana celular. Na membrana celular a quinase PDK1 fosforila Akt no resíduo de treonina 308, levando a uma ativação de Akt. Para a máxima ativação de Akt ocorrer, é necessário uma segunda fosforilação no resíduo serina 473, dessa vez pela quinase PDK2 (CANTLEY, 2002; VIVANCO; SAWYERS, 2002). A proteína PTEN irá desfosforilar PIP3, impedindo o ancoramento da proteína Akt na membrana celular, funcionando como um regulador negativo da via. As principais consequências da ativação de Akt estão relacionadas ao crescimento, sobrevivência e proliferação celular. O controle da sobrevivência celular é realizado principalmente através da inibição da apoptose. Entretanto, a proteína Akt também pode agir diretamente no controle do ciclo celular. A proteína Akt impede a degradação da ciclina D1, responsável pela progressão do ciclo celular da fase G1 para a S. A quinase mTOR responsável por regular a síntese proteica de nutrientes, regulando assim o crescimento celular, é um alvo direto de Akt (VIVANCO; SAWYERS, 2002).

A hipóxia é um stress no microambiente tumoral, influenciando a sinalização e funções celulares. Em tumores sólidos a hipóxia está associada ao pior prognóstico da paciente após o tratamento com radioterapia (STEGEMAN et al., 2012). Estudos demonstram que a hipóxia tumoral induz a ativação de Akt via PI3K, levando a uma maior resistência a apoptose nas células tumorais. A inibição da ativação de Akt leva a um aumento da morte celular nas células tumorais hipotóxicas, mas não nas células tumorais em normóxia (ALVAREZ-TEJADO et al., 2001). A via PI3K/Akt induz a expressão do fator de transcrição HIF-1α (PORE et al., 2006).

Diversos trabalhos mostram a relação desta via com o câncer do colo uterino, demonstrando uma correlação positiva entre sua ativação e o desenvolvimento tumoral (HENKEN et al., 2011; MA et al., 2000). Em culturas organotípicas, a oncoproteína E7 do HPV leva a um aumento na ativação de Akt, via pRb (MENGES

et al., 2006). Além disso, a via PI3K/Akt está associada a maior resistência ao tratamento com quimioterapia e radioterapia. Estudos iniciais utilizando inibidores de Akt em conjunto com os tratamentos convencionais têm apresentado resultados bastante promissores (GAIKWAD; RAY, 2012). O tratamento com o inibidor da PI3K, LY294002, não leva a diminuição da sobrevivência das células tumorais, entretanto, ele as torna mais sensíveis ao tratamento com radiação (LEE et al., 2006).

OBJETIVO

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Dado que pouco se conhece sobre o efeito do estímulo crônico do tumor nas células do microambiente tumoral e seu efeito sistêmico, este trabalho foi formulado com o intuito de identificar alterações em vias de sinalização tanto em biópsias de lesões do colo uterino como no sangue periférico de pacientes com lesão de alto grau e câncer. A metodologia utilizada nos permite avaliar as vias de sinalização ao mesmo tempo em diferentes células do microambiente tumoral, não somente nas células tumorais, como também, nas subpopulações do infiltrado inflamatório.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a expressão de proteínas chaves em três importantes vias de sinalização (NFκB, Akt e STAT3) em biópsias do colo uterino de pacientes com lesão de alto grau e câncer.
- ✓ Avaliar o efeito sistêmico das células tumorais através da expressão de proteínas chaves em três importantes vias de sinalização (NFκB, Akt e STAT3) no sangue periférico de pacientes com lesão de alto grau e câncer e mulheres sem a doença em questão.
- ✓ Avaliar a possível reversão da influência tumoral nas células apresentadoras de antígeno, especificamente nos linfócitos B.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

Pacientes com alterações citológicas e/ou colposcópicas indicativas de lesão de alto grau ou tumor do colo uterino foram selecionadas para este estudo. As pacientes selecionadas são provenientes do serviço de ginecologia do “Hospital Universitário da Universidade de São Paulo - USP”, com colaboração dos médicos Dra. Noely Cristina Paula Lorenzi, Dra. Kaori Yokochi, Dr. Paulo Margarido e Dr. Edmund Chada Baracat e do ambulatório de ginecologia do “Instituto do Câncer do Estado de São Paulo”, coordenado pelo Dr. Jesus Paula Carvalho e em colaboração com o Biobanco desta instituição, coordenado pelo Professor Roger Chammas.

Com ajuda de uma pinça de biópsia, retirou-se fragmentos da lesão para o diagnóstico das pacientes e também para o projeto em questão. Os fragmentos utilizados para esta pesquisa eram dispensáveis para o diagnóstico das pacientes, sendo esta avaliação realizada pelo médico responsável. Os fragmentos colhidos foram armazenados em tubo cônico com meio de cultura RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) contendo antibióticos e anti-micótico assim que retirado do colo uterino. Além disso, também foram coletados em torno de 10 ml de sangue das pacientes em tubos com heparina por punção venosa do membro superior.

Também foram selecionadas 10 mulheres sem lesão aparente no colo uterino como grupo controle. Coletou-se aproximadamente 20 ml de sangue em tubos com heparina por punção venosa do membro superior.

Critérios de exclusão: gravidez, imunodeficiência de qualquer tipo, uso de medicamentos que possam alterar vias de sinalização de forma crônica, não concordância da assinatura do termo de consentimento informado, intervalo da biópsia anterior menor que um mês.

Critérios de inclusão: pacientes com lesão de alto grau ou carcinoma do colo uterino, positividade para HPV.

O projeto está identificado pelo parecer 1045 na Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas/USP.

3.2 Processamento das biópsias

As biópsias foram divididas em duas partes, um pequeno fragmento foi congelado a -20 ^{o}C para a extração de DNA, utilizado para a genotipagem de HPV; e o restante foi finamente cortado com auxílio de bisturi e pinça e em seguida digerido com 1 mg/ml Colagenase I e IV (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, Estados Unidos) em tampão MTH (1 X HBSS, 15 mM HEPES pH 7,4,) suplementado com 5% Soro Bovino Fetal (SBF) e 0,5 U/ml DNase I (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, Estados Unidos) por aproximadamente 45 minutos a 37 ºC a 1250 rpm. Ao fim da digestão, as células foram filtradas, sedimentadas, e ressuspendidas em MTH suplementado para contagem e marcação com anticorpos. A viabilidade das células após tal procedimento é superior a 80%, avaliada através da contagem com azul de tripan.

3.3 Processamento do sangue periférico

As células mononucleares foram obtidas através do fracionamento por gradiente de densidade do sangue periférico com Ficoll-Paque PLUS 1,077 g/ml (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). O sangue periférico coletado foi diluído em PBS 1 X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4, 1,47 mM KH_2PO_4 - pH 7,4) na razão 1:1, e em seguida o sangue diluído foi adicionado lentamente a igual volume inicial de sangue de Ficoll-Paque. O gradiente de densidade foi formado por centrifugação à 400 g, por 40 min à 25 °C sem breque. As células mononucleares foram coletadas, transferidas para um tubo cônico estéril e lavadas duas vezes com RPMI 1640. Ao fim do processo as células foram contadas com azul de tripan, com viabilidade sempre superior a 90%.

3.4 Avaliação da expressão de proteínas de vias de sinalização por citometria de fluxo

A expressão de algumas proteínas chave das vias de sinalização de interesse foi avaliada tanto nas células obtidas após a digestão da biópsia como nas células mononucleares obtidas do sangue periférico. As suspensões celulares foram primeiramente incubadas com um bloqueador dos receptores Fc por 10 minutos à 4 ^{o}C. Em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos contra proteínas de superfície celular para imunofenotipagem (BD Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos) descritos na Tabela 1, em tampão MTH suplementado com 5% de SBF e 0,5 U/ml DNase I durante 20 minutos a 4 °C.

Tabela 1 – Conjunto de anticorpos utilizados para a marcação de superfície das biópsias e células mononucleares do sangue periférico.

FLUOROCROMO	BIÓSPIA	PBMC
Amcyan	CD45 (clone: HI30)	_
PerCP	CD19 (clone: HIB19)	CD19 (clone: HIB19)
APC	CD3 (clone: HIT3a)	CD3 (clone: HIT3a)
APC-H7	HLA-DR (clone: G46-6)	HLA-DR (clone: G46-6)

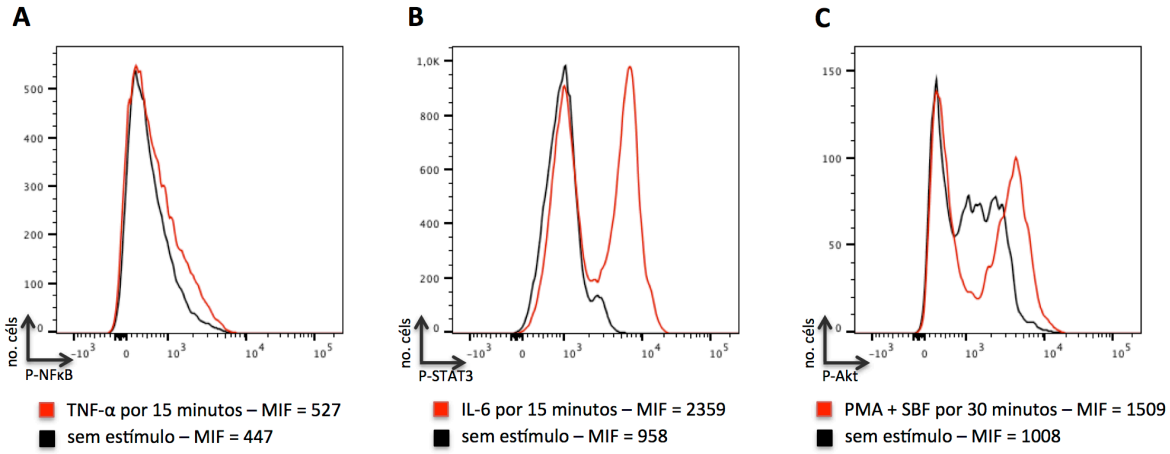
Terminada a marcação de superfície, as células foram lavadas com 10 volumes de MTH, e então fixadas com formaldeído 3,7% tamponado por 10 minutos à temperatura ambiente. A permeabilização das células foi realizada com metanol 90% à -20 ^{o}C por 10 minutos. Após lavagem e sedimentação das células com PBS 1 X, seguiu-se a marcação das proteínas intracelulares com anticorpos primários da Cell Signaling (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, Estados Unidos). A fluorescência foi obtida através da marcação com anticorpo secundário da Cell Signaling, sendo que em alguns casos, a marcação das proteínas intracelulares foi realizada com anticorpos já conjugados com fluorocromos, também da Cell Signaling. Todos os anticorpos utilizados na marcação intracelular são policlonais e estão descritos na Tabela 2. Foram adquiridos pelo menos 30.000 eventos no citômetro de fluxo e a análise foi realizada no *software* FlowJo (FlowJo LLC Data Analysis Software, Ashland, OR, Estados Unidos). A marcação intracelular das vias de sinalização foi baseada na metodologia desenvolvida por Montag e Lotze, 2006 (MONTAG; LOTZE, 2006).

Tabela 2 – Anticorpos utilizados para a identificação das proteínas intracelulares nas biópsias e células mononucleares do sangue periférico.

ANTICORPOS INTRACELULARES
anti-rabbit IgG conjugado com Alexa Fluor® 488
rabbit Phospho-Akt (Thr308)
rabbit Phospho-Akt (Thr308) conjugado com Alexa Fluor® 488
rabbit Akt pan
rabbit Akt pan conjugado com PE
rabbit NFκB p65 (Ser536)
rabbit NFκB p65 (Ser536) conjugado com Alexa Fluor® 488
rabbit NFκB p65
rabbit NFκB p65 conjugado com PE
rabbit Phospho-Stat3 (Tyr705)
rabbit Stat3

A Figura 2 apresenta estímulos positivos específicos de cada via avaliada, capazes de aumentar a expressão das proteínas fosforiladas nos sítios reconhecidos pelos anticorpos utilizados. A identificação da expressão da proteína p65 fosforilada no resíduo serina 536 e da proteína STAT3 fosforilada no resíduo tirosina 705 foram avaliadas em células mononucleares do sangue periférico de voluntárias sem indicação de lesão no colo uterino. A ativação da via de NFκB foi realizada através do estímulo com 20 ng/ml de TNF-α por 15 minutos e obteve um aumento de aproximadamente 20% na expressão da proteína p65 fosforilada (Figura 2 A). A ativação da via de STAT3 pode ser observada através do estímulo com 10 ng/ml de IL-6 por 15 minutos, levando ao aumento de aproximadamente 150% na expressão da proteína STAT3 fosforilada (Figura 2 B). O estímulo visando identificar a ativação da via de Akt foi realizada em células HeLa privadas de SBF por 24 horas. Após esse período adicionou-se 10% de SBF e 200nM de PMA por 30 minutos. Tal estímulo foi capaz de aumentar em aproximadamente 50% a expressão da proteína Akt fosforilada no resíduo treonina 308 (Figura 3 C).

Figura 2 – Avaliação da ativação das vias de sinalização analisadas através da fosforilação das proteínas nos sítios identificados pelos anticorpos utilizados no estudo.



A avaliação da ativação das vias de sinalização foi realizada por citometria de fluxo (pelo menos 30 mil eventos foram adquiridos no FACS Canto II e os dados foram analisados no programa FlowJo). **A.** A ativação da via de NFκB foi realizada através do estímulo com 20 ng/ml de TNF-α por 15 minutos em células mononucleares do sangue periférico de voluntárias sem indicação de lesão no colo uterino. O anticorpo utilizado reconhece a proteína p65 fosforilada no resíduo serina 536. **B.** A ativação da via de STAT3 foi realizada através do estímulo com 10 ng/ml de IL-6 por 15 minutos em células mononucleares do sangue periférico de voluntárias sem indicação de lesão no colo uterino. O anticorpo utilizado reconhece a proteína STAT3 fosforilada no resíduo tirosina 705. **C.** A ativação da via de Akt foi realizada em células HeLa privadas de SBF por 24 horas. Após esse período adicionou-se 10% de SBF e 200 nM de PMA por 30 minutos. O anticorpo utilizado reconhece a proteína Akt fosforilada no resíduo treonina 308.

3.5 Genotipagem do HPV nas biópsias

A genotipagem do HPV foi realizada através da identificação do DNA nas biópsias, sendo o primeiro passo para a detecção do DNA viral a extração do DNA do fragmento congelado da biópsia.

3.5.1 Extração de DNA das biópsias

O tecido congelado foi digerido em um tampão de digestão (50 mM de Tris-HCl pH 7,5; 1 mM de EDTA; 0,5% de Triton X-100) adicionado a um tampão contendo proteinase K (200 µg/ ml de Proteinase K; 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 1 mM de EDTA pH 8,0) por 24 horas a 55 ºC em banho seco com agitação. Após a completa digestão do tecido iniciou-se a extração do DNA pela adição de igual volume de

fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) seguido de centrifugação à 12.000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa contendo o DNA foi coletada, e armazenada por no mínimo 16 horas a -20 ºC com 10% do volume de acetado de sódio 3 M e 2,5 volume de etanol 100% gelado com o objetivo de precipitar o DNA. O sedimento de DNA precipitado foi então centrifugado e lavado duas vezes com etanol 70% gelado. O sedimento final de DNA foi ressuspendido em água milliQ (Millipore, Billerica, MA, Estados Unidos) e quantificado no NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) para posterior genotipagem.

3.5.2 Linear Array® HPV Genotyping Test

A genotipagem do HPV foi realizada através do kit Linear Array® HPV *Genotyping Test* da Roche (Roche Molecular Systems Inc, Pleasanton, CA, Estados Unidos), segundo instruções do fabricante. O kit Linear Array® HPV *Genotyping Test* é um teste qualitativo em que o DNA viral será amplificado por PCR (reação de polimerase em cadeia) utilizando iniciadores para uma região polimórfica de L1 e em seguida ocorre a hibridização desse produto amplificado com sondas oligonucléicas. A detecção dos produtos amplificados que se ligaram à sonda se dá por reação colorimétrica. O kit Linear Array® HPV *Genotyping Test* é capaz de detectar simultaneamente 37 tipos de HPV (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39 e CP6108). Tal procedimento foi realizado com a colaboração do laboratório da Profa. Dra. Luisa Lina Villa (Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo).

3.6 Isolamento dos linfócitos B

Para o isolamento de diferentes populações celulares foram utilizados kits da Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, North Rhine-Westphalia, Germany), de acordo com instruções do fabricante. Células mononucleares do sangue periférico foram utilizadas para o isolamento de linfócitos T e B, por seleção negativa com os kits Pan T Cell Isolation e Pan B Cell Isolation, respectivamente. Também separou-se células do infiltrado inflamatório de biópsias por seleção

positiva com esferas magnéticas anti-CD45. As populações de interesse são enriquecidas em mais de 80% após a separação celular e apresentam viabilidade celular superior a 95%.

3.7 Ativação dos linfócitos B com sCD40L

Os linfócitos B isolados do sangue periférico de pacientes e mulheres livres de lesões no colo uterino foram ativados com agonista solúvel de CD40 recombinante (sCD40L), adquirido da Peprotech (Peprotech, Rocky Hill, NJ, Estados Unidos) e da Life Technologies (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). Ambos agonistas demonstraram capacidade semelhante em ativar os linfócitos B, nas mesmas concentrações e condições experimentais. A concentração e o tempo de estímulo foram determinados de acordo com a expressão do MHC-II e moléculas co-estimuladoras (Tabela 3).

Tabela 3 – Anticorpos utilizados para a análise do estímulo com agonista de CD40 nos linfócitos B.

FLUOROCROMO	ANTICORPOS	CLONES
PerCP	CD19	HIB19
PE	CD80	L307
PECy7	CD86	FUN-1
FITC	HLA-DR	TU39

3.8 Análise Estatística

Grupos experimentais foram comparados em pares através do teste T de Student. Já situações em que foram necessárias a comparação em conjunto, o teste ANOVA foi utilizado seguido do pós-teste de Tukey. Foram consideradas significantes as diferenças cujas probabilidades de erro foram menores que 5% ($p<0,05$). Os testes estatísticos foram realizados no programa GraphPrism (GraphPad Software, La Jolla, CA, Estados Unidos).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Características das pacientes

Os dados demográficos das pacientes abordadas no estudo estão apresentadas na Tabela 4. As pacientes foram recrutadas através do serviço de ginecologia do "Hospital Universitário da Universidade de São Paulo – HU-USP" e do ambulatório de ginecologia do "Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – ICESP". Foram selecionadas pacientes com alterações citológicas e/ou colposcópicas indicativas de lesão de alto grau ou tumor do colo uterino. A maioria das amostras das pacientes com lesão de alto grau foram provenientes do HU-USP, enquanto as de câncer foram provenientes do ICESP. Apenas os dados referentes às amostras de câncer do ICESP foram avaliadas quanto a classificação FIGO, pois como o HU-USP é um hospital secundário, as pacientes diagnosticadas com câncer foram encaminhadas para outros hospitais, mais especializados, o que impossibilitou o acompanhamento da paciente.

O HPV 16 foi detectado em 54% das biópsias analisadas, como esperado. Os outros subtipos encontrados são todos de alto risco oncogênico. Das 23 amostras negativas para HPV 16, quatro biópsias foram identificadas com o HPV 18, três com o HPV 31, duas com o HPV 33 e duas com o HPV 35. Duas amostras apresentaram infecção múltipla, HPV 18 e 31 em um caso, e HPV 18 e 62 em outro. Os subtipos 45, 51, 52 e 58 também foram identificados em uma biópsia cada um. Em seis biópsias não foi possível a identificação de nenhum subtipo viral, o que não é incomum com a metodologia utilizada. A genotipagem do HPV é realizada em um pequeno fragmento da biópsia colhida, o qual pode não conter a sequencia viral, o que não significa que na massa tumoral a sequencia viral não esteja presente. Estudos que detalham a presença do vírus nas lesões e câncer do colo uterino identificam que virtualmente em todos os casos há presença do HPV (ref. 1 quali).

Como grupo controle foram abordadas 10 voluntárias sem indicação de lesão no colo uterino. Esse grupo foi avaliado apenas quanto a expressão das proteínas intracelulares nas células mononucleares do sangue periférico. A idade média das pacientes foi de 53,2 anos, com idade mínima de 49 anos e máxima de 57 anos.

Tabela 4 – Característica das pacientes.

CARACTERÍSTICAS DAS PACIENTES	
Número de Pacientes	50
Idade (anos)	
mediana	45
mínima-máxima	22-88
Estadio Clínico	
lesão de alto grau	24
câncer	26
escamoso	19
adenocarcinoma	7
classificação FIGO (amostras ICESP)	
I	8
II	3
III	3
IV	3
Tipo HPV	
HPV 16+	27
HPV 16-	23

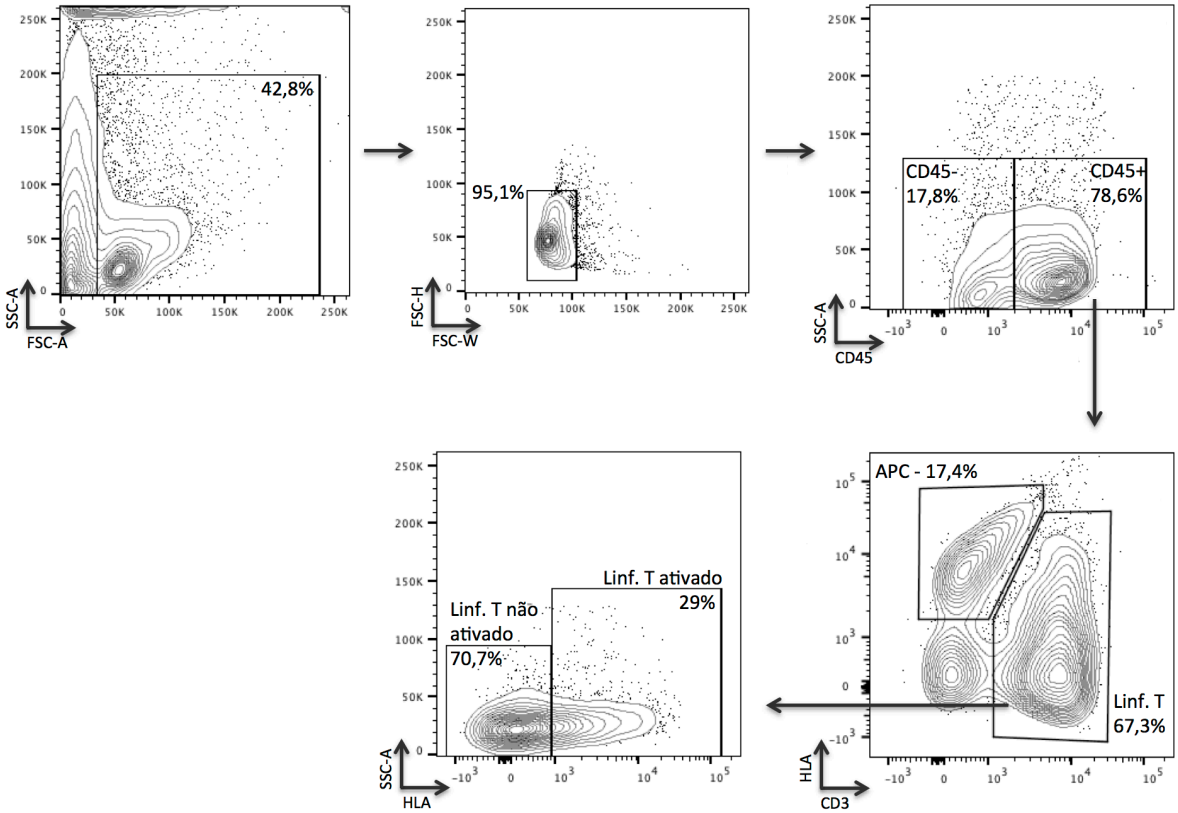
São apresentadas informações referentes a idade e estádio clínico das pacientes. A genotipagem do HPV é apresentada separando-se as amostras em HPV 16^+ e HPV 16^- facilitando a compreensão dos resultados. Há grande variedade de subtipos virais encontrados nas biópsias das pacientes HPV 16^-. A classificação FIGO foi indicada apenas nas amostras de câncer provenientes do ICESP.

4.2 Identificação das subpopulações do microambiente tumoral das biópsias do colo uterino e das células mononucleares do sangue periférico

O estudo em questão avalia o estado de ativação das vias de sinalização nas biópsias do colo uterino e no sangue periférico das pacientes. A Figura 3 é uma análise representativa dos dados obtidos por citometria de fluxo das biópsias do colo uterino das pacientes. Analisamos as células quanto ao seu tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), excluindo-se os “debris” da análise. Em seguida, é realizada a seleção apenas das células que passaram isoladamente pelo laser (gráfico FSC-W x FSC-H). A identificação da proteína CD45 nos permite avaliar as duas principais populações da biópsia, as células do infiltrado inflamatório (células $CD45^+$) e as células tumorais (células $CD45^-$). A marcação das proteínas CD3 e HLA-DR, nos

permite diferenciar no infiltrado inflamatório (células $CD45^+$), células T ($CD3^+$ HLA-$DR^{+/-}$) e células apresentadoras de antígeno ($CD3^-$ HLA-DR^+). Além disso, também podemos identificar através da marcação da proteína HLA-DR nas células $CD3^+$, os linfócitos T ativados (HLA-DR^+) e não ativados (HLA-DR^-). A identificação das proteínas das vias de sinalização foram avaliadas em todas as subpopulações identificadas por essa estratégia de análise.

Figura 3 – Figura representativa da estratégia de análise dos dados obtidos por citometria de fluxo das biópsias das pacientes.

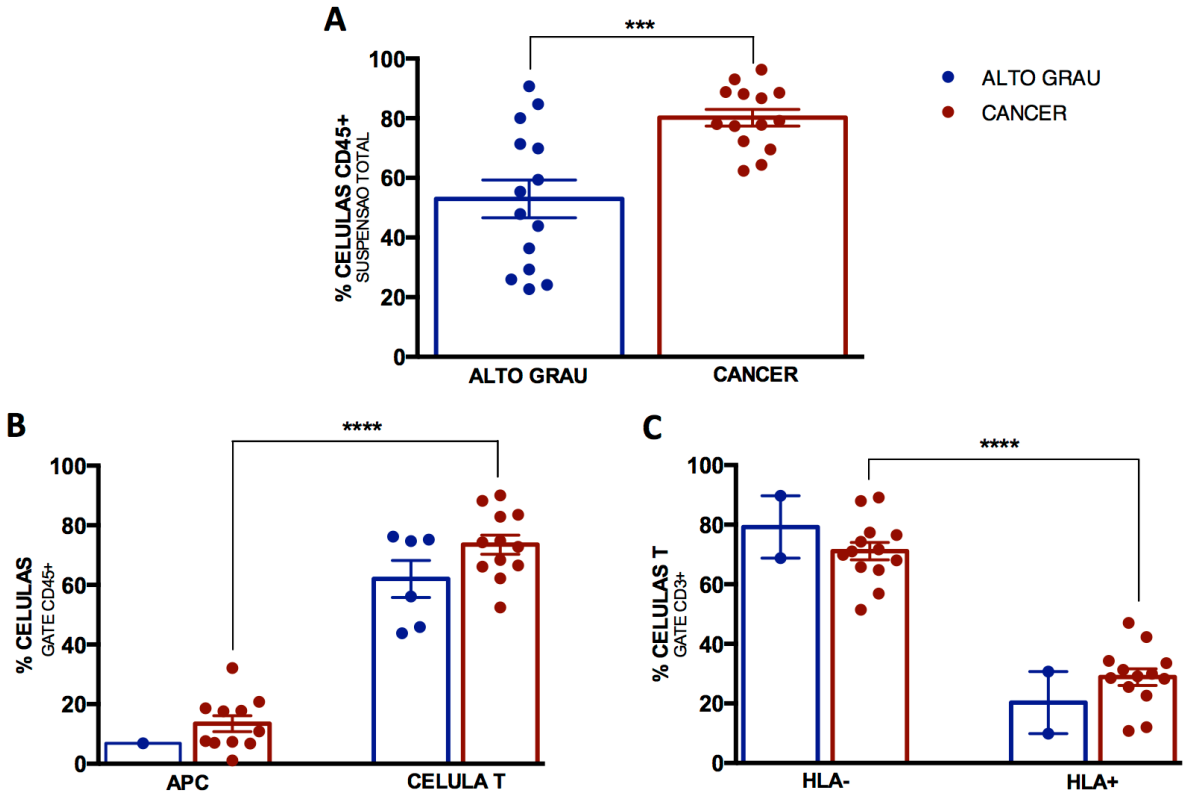


Todas as amostras de biópsias das pacientes foram analisadas segundo a estratégia apresentada acima. O primeiro gráfico identifica a população principal de células, de acordo com o tamanho e granulosidade, dentro dessa população foram selecionadas as células que passaram isoladamente pelo laser. Em seguida analisou-se as células em relação ao marcador de superfície celular CD45. Dentro da população $CD45^+$ analisou-se as diferentes populações do infiltrado inflamatório através da identificação das proteínas de superfície celular, CD3 e HLA-DR. Os linfócitos T (células $CD3^+$) também foram analisados quanto a expressão da proteína HLA-DR, possibilitando a identificação de duas subpopulações de linfócitos T, não ativados ($HLA\text{-}DR^-$) e ativados ($HLA\text{-}DR^+$). As vias de sinalização foram avaliadas nas diferentes populações identificadas pelos marcadores contra as proteínas CD45, CD3 e HLA-DR. A análise dos dados foi realizada no programa FlowJo e pelo menos 30.000 eventos foram adquiridos no FACS Canto II.

Antes da análise das vias de sinalização em cada população da biópsia, avaliamos a qualidade de tais populações em cada fase da doença. Como pode ser observado na Figura 4 A, as amostras de câncer apresentam um aumento no número de células $CD45^+$ nas biópsias, quando comparadas com as amostras de lesão de alto grau, indicando, assim, um aumento no infiltrado inflamatório em uma fase mais avançada da doença. A Figura 4 B identifica que há uma maior quantidade de linfócitos T do que células apresentadoras de antígenos (APC) nas amostras

avaliadas, e que a maioria desses linfócitos T não estão ativados (dado observado na Figura 4 C, avaliado através da expressão negativa de HLA-DR).

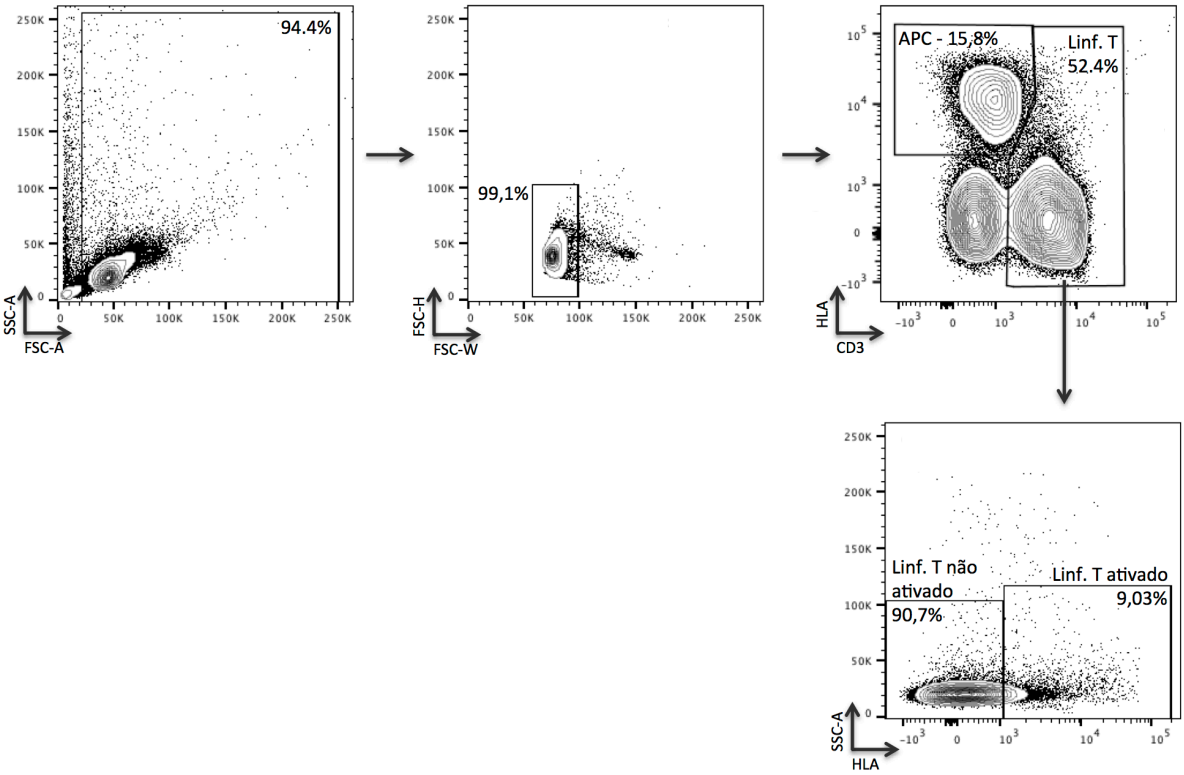
Figura 4 – Identificação das populações encontradas nas biópsias das pacientes diagnosticadas com lesão de alto grau e câncer.



Comparou-se as populações encontradas nas amostras de pacientes com lesão de alto grau e pacientes com câncer. As análises estatísticas apresentadas foram realizadas utilizando-se o programa Graph Pad Prism. **A.** A porcentagem do infiltrado inflamatório foi avaliada tanto nas amostras de lesão de alto grau (n=14), quanto nas amostras de câncer (n=14) através da identificação da proteína de superfície celular CD45. O teste T de Student foi utilizado para a análise estatística (p=0,0006). **B.** Avaliação da qualidade do infiltrado inflamatório, identificando dois diferentes tipos celulares: células apresentadoras de antígeno (APC) e linfócitos T. As amostras de lesão de alto grau tiveram um n=1 na avaliação quanto a quantidade de células apresentadoras de antígeno na biópsia e n=6 quanto a quantidade de linfócitos T. Já as amostras de câncer, tiveram n=11 na avaliação das células apresentadoras de antígeno e n=12, quando se analisou os linfócitos T. Devido ao n no grupo da célula apresentadora de antígeno das amostras de lesão de alto grau, tal grupo foi excluído na análise estatística. Foi realizado o teste estatístico ANOVA, seguido do pós teste de Tukey (p<0,0001). **C.** Identificação da quantidade de linfócitos T ativados (HLA-DR^{+}) ou não (HLA-DR^{-}). As amostras das pacientes de lesão de alto grau tiveram um n=2, enquanto que as amostras de câncer tiveram um n=13. Devido ao n das amostras de lesão de alto grau, apenas realizou-se a análise estatística nas amostras das pacientes com câncer (teste T de Student, p<0,0001).

As células mononucleares do sangue periférico também foram avaliadas quanto ao perfil de expressão das proteínas intracelulares em diferentes subpopulações celulares. A Figura 5 é uma análise representativa dos dados obtidos por citometria de fluxo das células mononucleares do sangue periférico das pacientes. A análise inicial é semelhante a realizada com as células obtidas da biópsia (Figura 3). Primeiramente analisamos as células quanto ao seu tamanho (FSC-A) e granulosidade (SSC-A), excluindo-se os “debris”. Em seguida, selecionou-se apenas as células que passaram isoladamente pelo laser (gráfico FSC-W x FSC-H). A marcação das proteínas CD3 e HLA-DR, nos permite diferenciar as duas populações majoritárias nas células mononucleares do sangue periférico, os linfócitos T ($CD3^+$ $HLA\text{-}DR^{+/-}$) e as células apresentadoras de antígeno ($CD3^-$ $HLA\text{-}DR^+$). Além disso, também podemos identificar através da marcação da proteína HLA-DR nas células $CD3^+$, os linfócitos T ativados ($HLA\text{-}DR^+$) e não ativados ($HLA\text{-}DR^-$). A identificação das proteínas das vias de sinalização foram avaliadas em todas as subpopulações identificadas por essa estratégia de análise.

Figura 5 – Figura representativa da estratégia de análise dos dados obtidos por citometria de fluxo das células mononucleares do sangue periférico das pacientes.

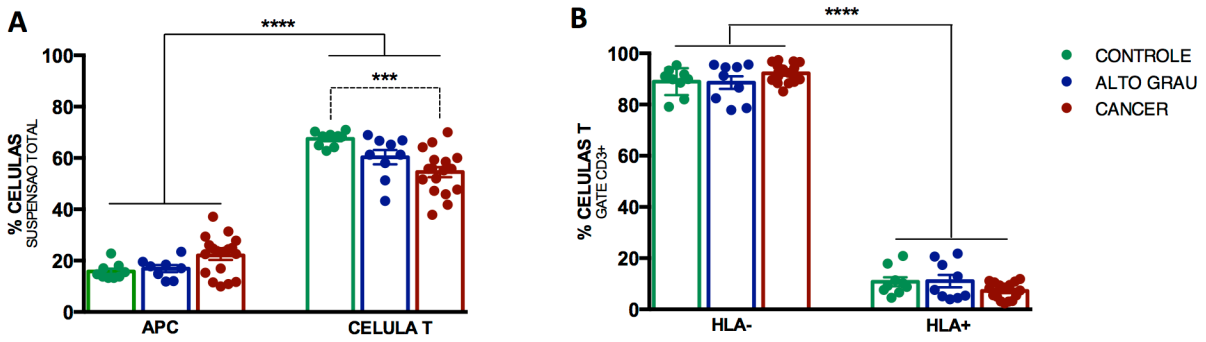


As células mononucleares do sangue periférico das pacientes foram analisadas segundo a estratégia apresentada. O primeiro gráfico identifica a população principal de células, de acordo com o tamanho e granulosidade, dentro dessa população foram selecionadas as células que passaram isoladamente pelo laser. Em seguida analisou-se diferentes populações através da identificação das proteínas de superfície celular, CD3 e HLA-DR. Os linfócitos T (células $CD3^+$) também foram analisados quanto a expressão da proteína HLA-DR, possibilitando a identificação de duas subpopulações de linfócitos T, não ativados ($HLA\text{-}DR^-$) e ativados ($HLA\text{-}DR^+$). As vias de sinalização foram avaliadas nas diferentes populações identificadas pelos marcadores contra as proteínas CD3 e HLA-DR. As vias de sinalização também foram avaliadas na população geral, identificada pela seleção das células que passaram isoladamente pelo laser (segundo gráfico). A análise dos dados foi realizada no *software* FlowJo e pelo menos 30.000 eventos foram adquiridos no FACS Canto II.

Antes da análise da expressão das proteínas intracelulares, avaliamos o perfil das populações encontradas nas células mononucleares do sangue periférico. Além de analisarmos as células provenientes de pacientes com lesão de alto grau e câncer, também avaliamos as células de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino (grupo controle). Como pode ser observado na Figura 6 os três grupos analisados apresentam um perfil semelhante, com maior quantidade de linfócitos T do que células apresentadoras de antígeno (APC) no sangue periférico, como esperado. Entretanto, uma diferença importante entre o grupo controle e as

pacientes com câncer foi encontrada, há uma diminuição na proporção de linfócitos T circulantes no sangue periférico nas pacientes com câncer.

Figura 6 – Identificação das células mononucleares no sangue periférico de pacientes diagnosticadas com lesão de alto grau e câncer e um grupo controle de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino.



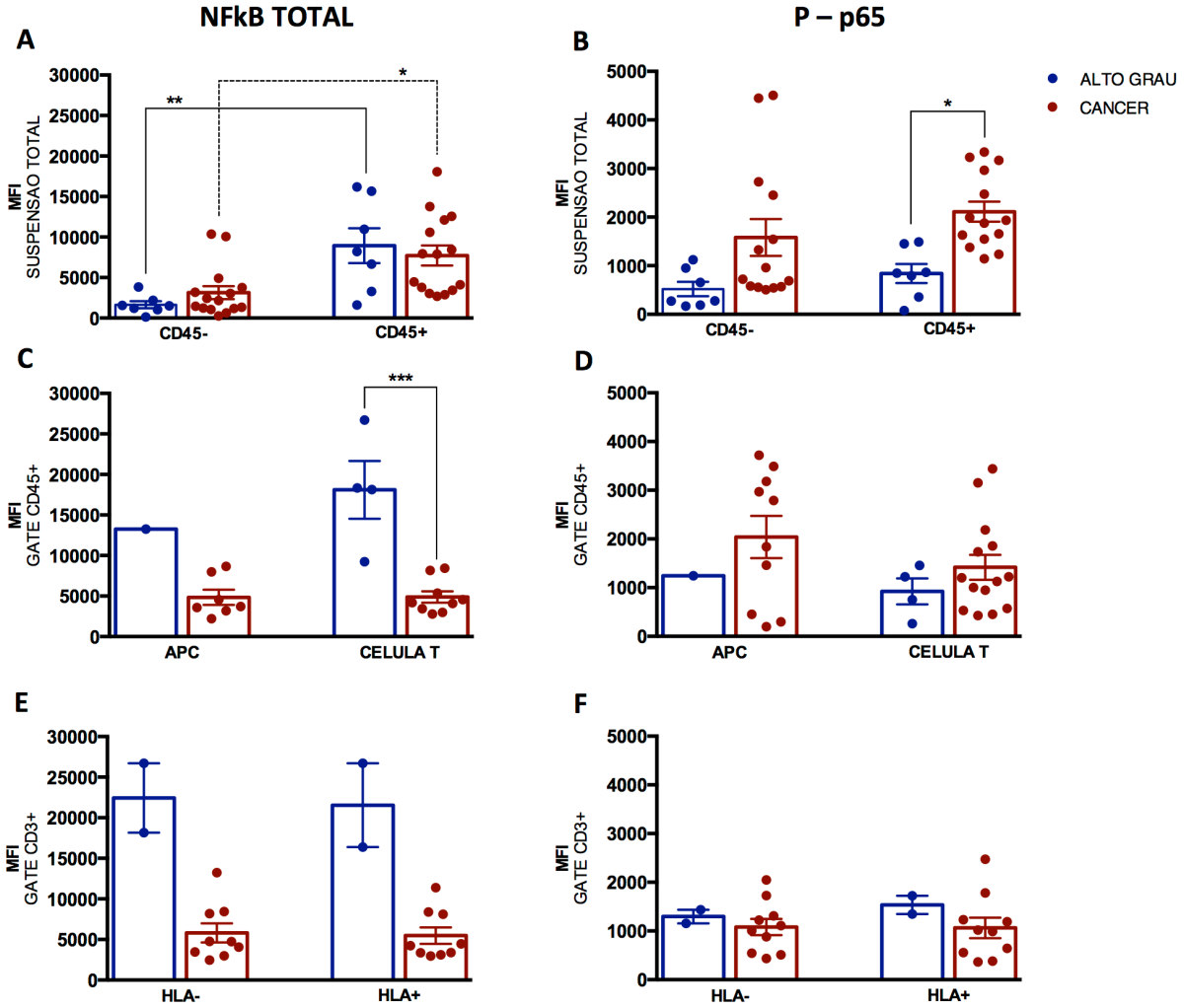
Comparou-se as populações encontradas nas amostras de pacientes com lesão de alto grau e câncer e mulheres sem aparente lesão no colo uterino (grupo controle). As análises estatísticas apresentadas foram realizadas utilizando-se o *software* Graph Pad Prism. **A.** Identificação das duas populações majoritárias nas células mononucleares do sangue periférico: as células apresentadora de antígeno (APC) e os linfócitos T. O grupo controle tem um n=9 nas duas populações analisadas; o grupo das pacientes com lesão de alto grau tem um n=8 na análise das células apresentadoras de antígeno e um n=9 na análise dos linfócitos T; o grupo das pacientes com câncer tem n=19 quanto as células apresentadoras de antígeno e n=18 quanto os linfócitos T. Foi realizado o teste estatístico ANOVA, seguido do pós teste de Tukey **** $p<0,0001$; *** $0,0001<p<0,002$. **B.** Identificação da quantidade de linfócitos T ativados (HLA-DR$^+$) ou não (HLA-DR$^-$). As amostras do grupo controle e das pacientes de lesão de alto grau tiveram um n=9, enquanto que as amostras de câncer tiveram um n=16. Foi realizado o teste estatístico ANOVA, seguido do pós teste de Tukey ($p<0,0001$).

4.3 Caracterização da via de NFκB em biópsias do colo uterino e células mononucleares do sangue periférico de pacientes com lesão de alto grau e câncer

A primeira via de sinalização a ser apresentada é a via de NFκB. A caracterização do estado de ativação dessa via foi realizada através da expressão da subunidade p65 utilizando-se anticorpo contra sua forma fosforilada no resíduo de serina 536 ou anticorpo anti-p65 que reconhece p65 total. A fosforilação de p65 no resíduo serina 536 é fundamental para a ativação da proteína NFκB logo após sua translocação para o núcleo da célula. A Figura 7 apresenta os dados referentes à expressão de p65 em biópsias de pacientes com lesão de alto grau e câncer. Observa-se que as células do infiltrado inflamatório (CD45$^+$), tanto nas amostras das

pacientes com lesão de alto grau, como nas de pacientes com câncer têm maior expressão da proteína total de NFκB do que as células $CD45^-$ (Figura 7 A). Embora as células $CD45^+$ das amostras das pacientes com lesão de alto grau e câncer tenham a mesma expressão da proteína NFκB total (Figura 7 A), há um aumento na expressão da proteína p65 fosforilada nessas células nas amostras das pacientes com câncer quando comparadas com as amostras das pacientes com lesão de alto grau (Figura 7 B), indicando assim, uma maior ativação da via de NFκB nas células do infiltrado inflamatório nas pacientes com câncer. Ao se analisar as diferentes populações do infiltrado inflamatório, observa-se que há uma diminuição na expressão da proteína NFκB total nos linfócitos T de amostras das pacientes com câncer quando comparadas com amostras de pacientes com lesão de alto grau (Figura 7 C). Entretanto, não há diferença na expressão da proteína p65 fosforilada em nenhuma situação avaliada (Figura 7 D). As subpopulações de linfócitos T não apresentam diferença entre elas na expressão das proteínas avaliadas, tanto nas amostras de alto grau quanto nas de câncer. Além disso, as subpopulações de linfócitos T também não apresentam diferença quando avaliadas em relação às diferentes fases da doença (Figura 7 E e F).

Figura 7 – Avaliação da expressão das proteínas NFκB total e p65 fosforilada nas amostras de biópsias de pacientes diagnosticadas com lesão de alto grau e câncer do colo do útero.



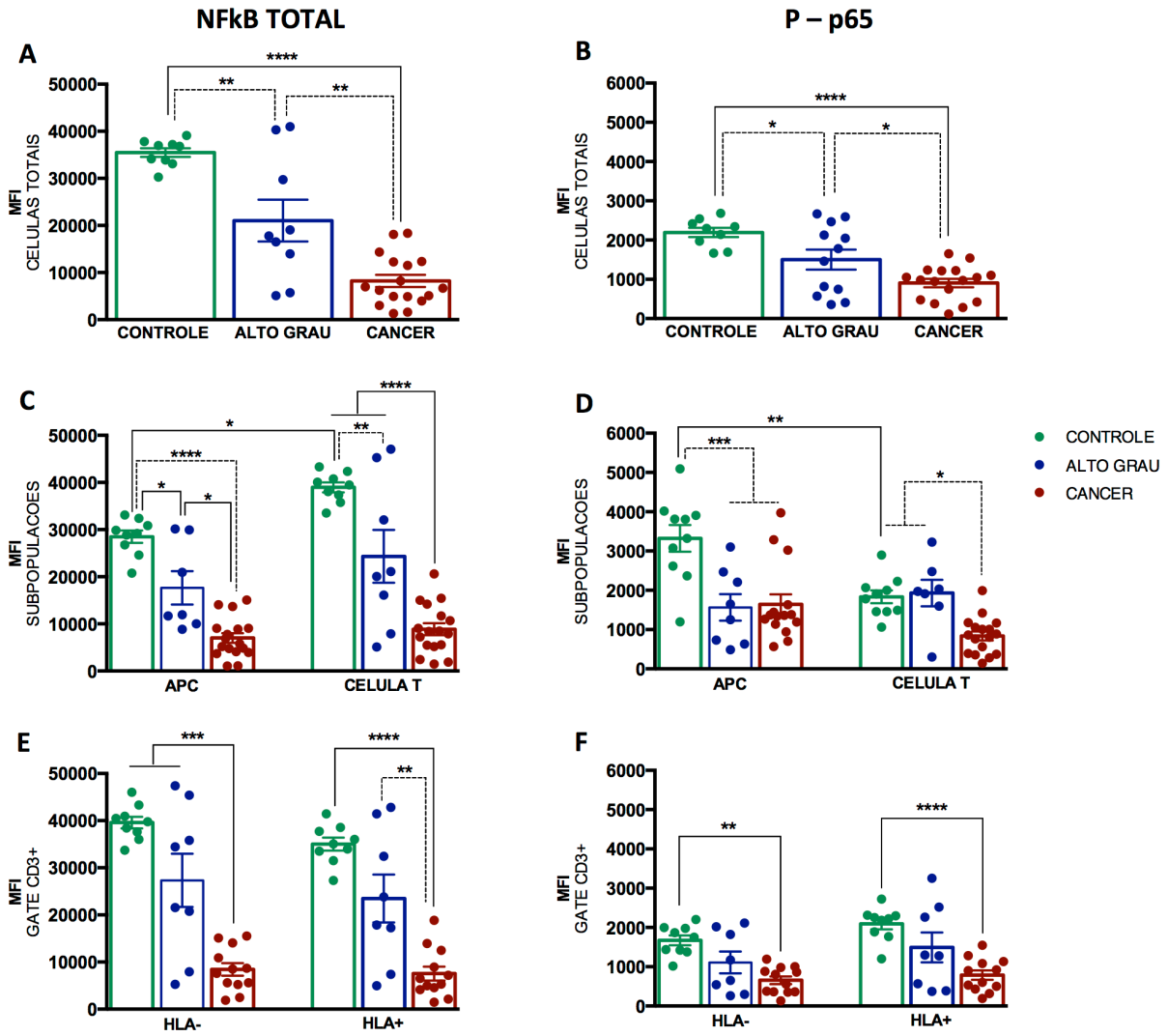
A expressão da proteína NFκB total é apresentada na coluna da esquerda (Gráficos **A**, **C** e **E**) e a expressão da proteína p65 fosforilada é apresentada na coluna da direita (Gráficos **B**, **D** e **F**). As análises estatísticas apresentadas foram realizadas no *software* Graph Pad Prism, utilizando-se ANOVA seguido do pós teste de Tukey nos Gráficos **A**, **B**, **C** e **D**. As análises estatísticas dos Gráficos **E** e **F** foram realizadas com o teste T de Student apenas no grupo de amostras das pacientes com câncer (*** 0,0001<p<0,002; ** 0,002<p<0,016; * 0,016<p<0,05). **A.** Avaliação da proteína NFκB total nas células $CD45^-$ e no infiltrado inflamatório ($CD45^+$) nas amostras de pacientes com lesão de alto grau (n=7) e de pacientes com câncer (n=15). **B.** Avaliação da proteína p65 fosforilada nas células $CD45^-$ e no infiltrado inflamatório ($CD45^+$) nas amostras de pacientes com lesão de alto grau (n=7) e pacientes com câncer (n=14). **C.** Avaliação da proteína NFκB total nas diferentes subpopulações do infiltrado inflamatório: células apresentadoras de antígeno (APC) e linfócitos T. As amostras de lesão de alto grau têm um n=1 quando avaliadas nas células apresentadoras de antígeno e n=4 na avaliação nos linfócitos T. Já as amostras de câncer, têm n=7 na avaliação da expressão da proteína nas células apresentadoras de antígeno e n=11 nos linfócitos T. **D.** Avaliação da proteína p65 fosforilada nas diferentes subpopulações do infiltrado inflamatório. As amostras de lesão de alto grau têm um n=1 na avaliação da expressão da proteína nas células apresentadoras de antígeno (APC) e n=4 na avaliação nos linfócitos T.

Já as amostras de câncer, têm n=10 na avaliação da expressão da proteína nas células apresentadoras de antígeno e n=14 nos linfócitos T. **E.** Avaliação da proteína NFκB total nos linfócitos T não ativados (HLA-DR$^-$) e ativados (HLA-DR$^+$), nas amostras de pacientes com lesão de alto grau (n=2) e de pacientes com câncer (n=9). **F.** Avaliação da proteína p65 fosforilada nos linfócitos T não ativados (HLA-DR$^-$) e ativados (HLA-DR$^+$), nas amostras de pacientes com lesão de alto grau (n=2) e de pacientes com câncer (n=10).

A Figura 8 apresenta os dados sobre a expressão das proteínas relacionadas à via de sinalização NFκB nas células mononucleares do sangue periférico das pacientes com lesão de alto grau e câncer. Nesse caso, foi possível adicionar ao estudo um grupo controle, composto por voluntárias sem indicação de lesão no colo uterino. Ao avaliar a expressão da proteína NFκB total e da proteína p65 fosforilada nas células totais obtidas pela separação do sangue periférico por gradiente de densidade identificou-se uma diminuição na expressão de ambas proteínas nas amostras das pacientes quando comparadas com o grupo controle (Figura 8 A e B). Também observa-se uma diminuição na expressão das duas proteínas avaliadas nas amostras das pacientes com câncer quando comparadas com as amostras das pacientes com lesão de alto grau (Figura 8 A e B). Ao analisar as diferentes subpopulações do sangue periférico, nota-se uma diminuição na expressão das duas proteínas avaliadas, tanto nas células apresentadoras de antígeno (APC), quanto nos linfócitos T, nas amostras das pacientes com câncer quando comparadas com o grupo controle (Figura 8 C e D). As amostras das pacientes com lesão de alto grau apresentam diminuição na expressão da proteína NFκB total nas duas subpopulações avaliadas quando comparadas com o grupo controle (Figura 8 C), entretanto, a diminuição na expressão da proteína p65 fosforilada só é observada nas células apresentadoras de antígeno (Figura 8 D). A comparação entre os grupos das pacientes, identifica uma diminuição na expressão da proteína NFκB total nas amostras das pacientes com câncer quando comparadas com as amostras das pacientes com lesão de alto grau (Figura 8 C), tal diminuição apenas ocorre quanto a expressão da proteína p65 fosforilada nos linfócitos T (Figura 8 D). Além disso, observa-se no grupo controle uma menor expressão da proteína NFκB total e uma maior expressão da proteína p65 fosforilada nas células apresentadoras de antígeno quando comparadas com os linfócitos T (Figura 8 C e D). Ao avaliar os linfócitos T quanto ao seu estado de ativação, nota-se que apenas as subpopulações das pacientes com câncer apresentam uma redução na expressão

da proteína NFκB total e da proteína p65 fosforilada quando comparadas com o grupo controle (Figura 8 E e F).

Figura 8 – Avaliação da expressão das proteínas NFκB total e p65 fosforilada nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes diagnosticadas com lesão de alto grau e câncer e um grupo controle de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino.



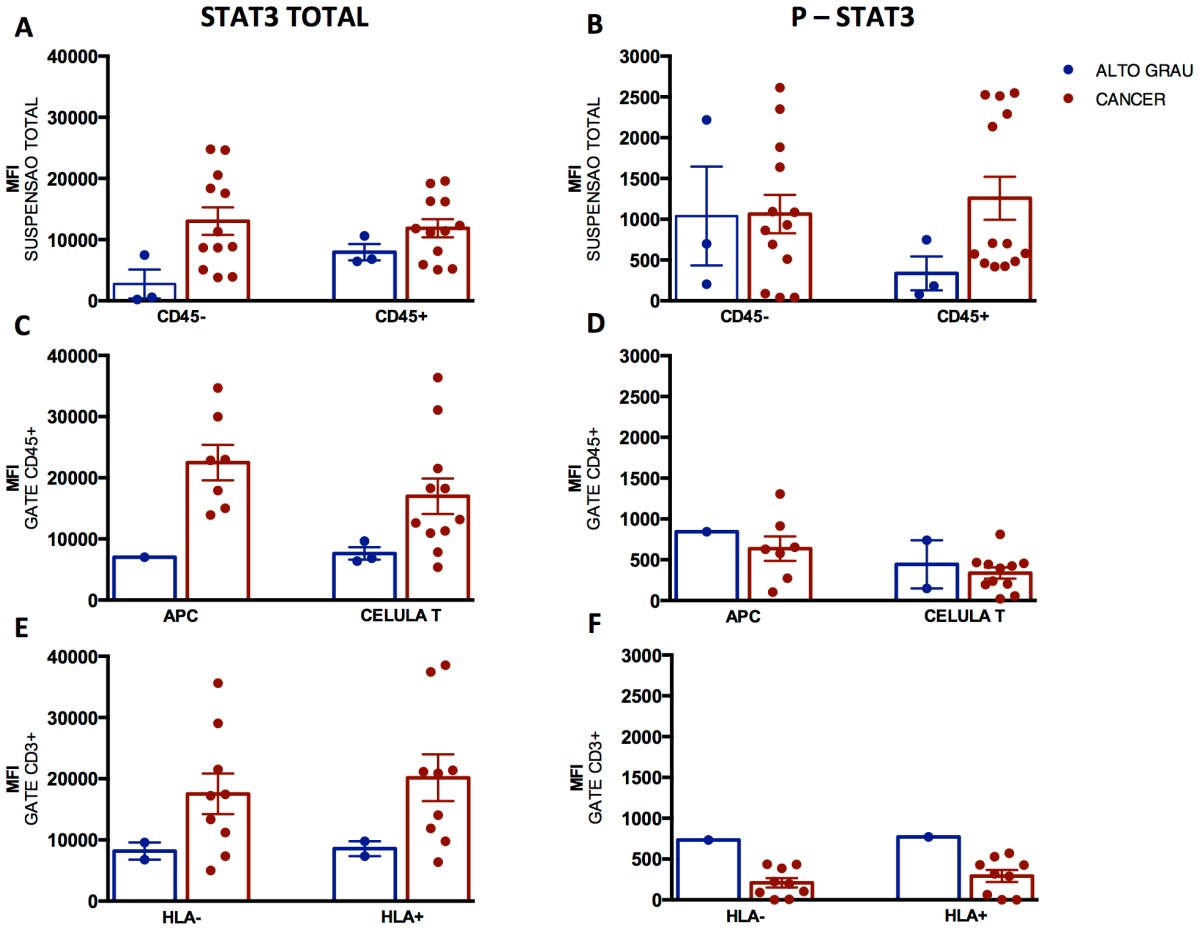
A expressão da proteína NFκB total é apresentada na coluna da esquerda (Gráficos **A**, **C** e **E**) e a expressão da proteína p65 fosforilada é apresentada na coluna da direita (Gráficos **B**, **D** e **F**). As análises estatísticas apresentadas foram realizadas com o programa Graph Pad Prism, utilizando-se ANOVA seguido do pós teste de Tukey (**** p<0,0001; *** 0,0001<p<0,002; ** 0,002<p<0,016; * 0,016<p<0,05). **A.** Avaliação da proteína NFκB total em todas as células mononucleares do sangue periférico de pacientes com lesão de alto grau (n=9) e com câncer (n=17), e um grupo controle de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino (n=9). **B.** Avaliação da proteína p65 fosforilada em todas as células mononucleares do sangue periférico de pacientes com lesão de alto grau (n=12) e com câncer (n=17), e um grupo controle de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino (n=9). **C.** Avaliação da proteína NFκB total nas diferentes populações das células

mononucleares do sangue periférico: células apresentadoras de antígeno (APC) e linfócitos T. As amostras de lesão de alto grau têm um n=7 quando avaliadas nas células apresentadoras de antígeno e n=8 na avaliação nos linfócitos T. Já as amostras de câncer, têm n=17 na avaliação da expressão da proteína em ambas populações. O grupo controle conta com um n=9 na avaliação das duas subpopulações. **D.** Avaliação da proteína p65 fosforilada nas diferentes populações das células mononucleares do sangue periférico. As amostras de lesão de alto grau têm um n=8 na avaliação da expressão da proteína nas células apresentadoras de antígeno e n=7 na avaliação nos linfócitos T. Já as amostras de câncer, têm n=15 na avaliação da expressão da proteína nas células apresentadoras de antígeno e n=17 nos linfócitos T. O grupo controle conta com um n=10 na avaliação das duas populações. **E.** Avaliação da proteína NFκB total nos linfócitos T não ativados (HLA-DR$^-$) e ativados (HLA-DR$^+$), nas amostras de pacientes com lesão de alto grau (n=8) e com câncer (n=12), e nas amostras de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino (n=9). **F.** Avaliação da proteína p65 fosforilada nos linfócitos T não ativados (HLA-DR$^-$) e ativados (HLA-DR$^+$), nas amostras de pacientes com lesão de alto grau (n=8) e com câncer (n=12), e nas amostras de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino (n=9).

4.4 Caracterização da via de STAT3 em biópsias do colo uterino e células mononucleares do sangue periférico de pacientes com lesão de alto grau e câncer

A caracterização da via de STAT3 será apresentada pela expressão da proteína STAT3 total e da proteína STAT3 fosforilada no resíduo de tirosina 705. Esse sítio de fosforilação é responsável pela ativação da via de sinalização de STAT3, pois induz a homodimerização dessa proteína e sua translocação para o núcleo celular, onde, então, atuará como um importante fator de transcrição. Na Figura 9 estão representados os dados referentes às biópsias das pacientes com lesão de alto grau e câncer. A avaliação da expressão dessas duas formas de STAT3 nas células da biópsia das pacientes com lesão de alto grau e câncer não foi capaz de identificar nenhuma alteração entre os grupos avaliados, em nenhuma das população do microambiente tumoral. Entretanto observa-se a formação de dois grupos nas amostras das pacientes, um grupo com uma alta expressão das proteínas e outro com uma expressão menor. Nota-se essa formação em todos os gráficos da Figura 9, sendo mais facilmente visualizado nos gráficos A e B.

Figura 9 – Avaliação da expressão das proteínas STAT3 total e fosforilada nas amostras de biópsias de pacientes diagnosticadas com lesão de alto grau e câncer do colo do útero.

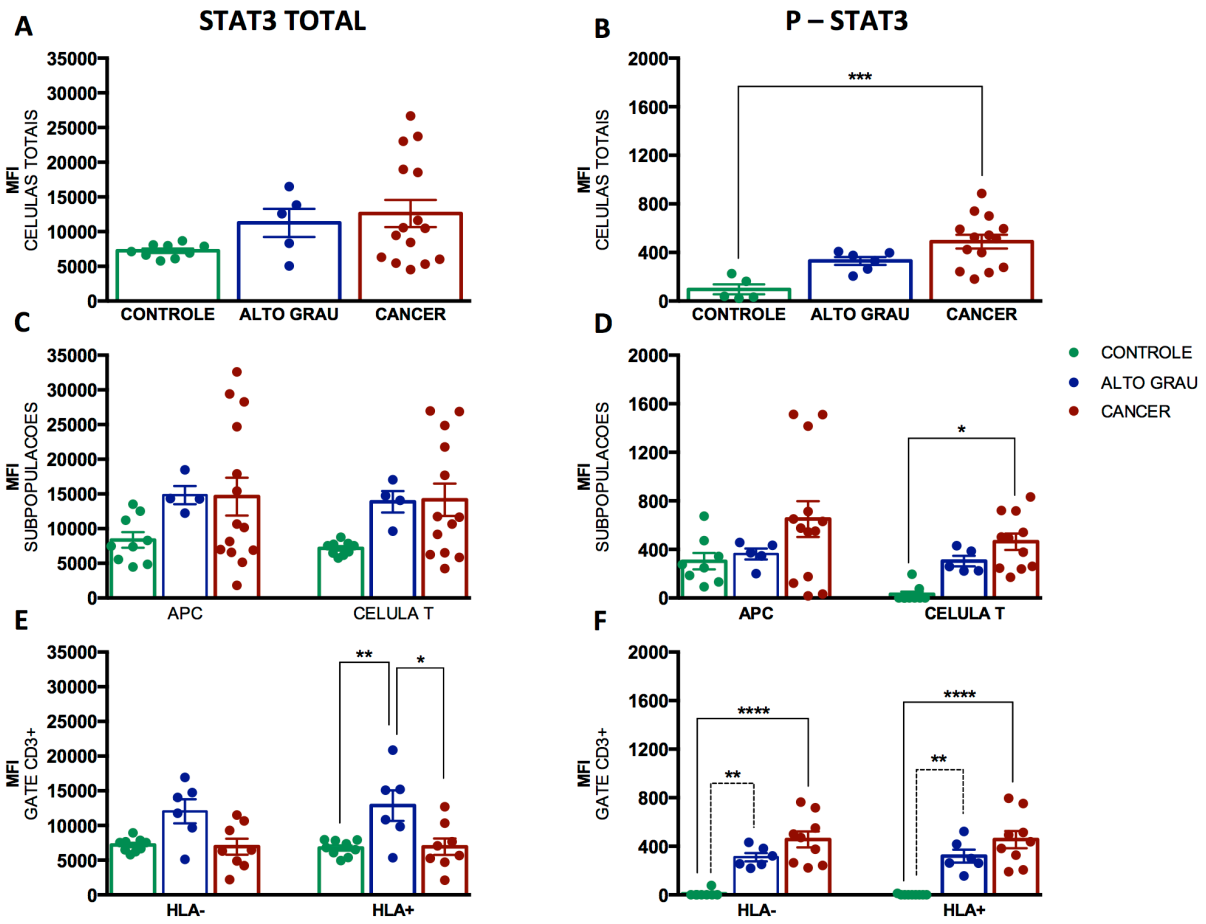


A expressão da proteína STAT3 total é apresentada na coluna da esquerda (Gráficos **A**, **C** e **E**) e a expressão da proteína STAT3 fosforilada é apresentada na coluna da direita (Gráficos **B**, **D** e **F**). As análises estatísticas apresentadas foram realizadas com o programa Graph Pad Prism, utilizando-se ANOVA seguido do pós teste de Tukey nos Gráficos **A**, **B** e **C**. Utilizou-se o teste T de Student para análise estatística dos Gráficos **D**, **E** e **F**, comparando apenas as amostras das pacientes com câncer. **A.** Avaliação da proteína STAT3 total nas células $CD45^-$ e no infiltrado inflamatório ($CD45^+$) nas amostras de pacientes com lesão de alto grau (n=3) e de pacientes com câncer (n=13). **B.** Avaliação da proteína STAT3 fosforilada nas células $CD45^-$ e no infiltrado inflamatório ($CD45^+$) nas amostras de pacientes com lesão de alto grau (n=3) e pacientes com câncer (n=13). **C.** Avaliação da proteína STAT3 total nas diferentes subpopulações do infiltrado inflamatório: células apresentadoras de antígeno (APC) e linfócitos T. As amostras de lesão de alto grau têm um n=1 quando avaliadas nas células apresentadoras de antígeno e n=3 na avaliação nos linfócitos T. Já as amostras de câncer, têm n=7 na avaliação da expressão da proteína nas células apresentadoras de antígeno e n=11 nos linfócitos T. **D.** Avaliação da proteína STAT3 fosforilada nas diferentes subpopulações do infiltrado inflamatório. As amostras de lesão de alto grau têm um n=1 na avaliação da expressão da proteína nas células apresentadoras de antígeno e n=2 na avaliação nos linfócitos T. Já as amostras de câncer, têm n=7 na avaliação da expressão da proteína nas células apresentadoras de antígeno e n=11 nos linfócitos T. **E.** Avaliação da proteína STAT3 total nos linfócitos T não ativados ($HLA\text{-}DR^-$) e ativados ($HLA\text{-}DR^+$), nas amostras de pacientes com lesão de alto grau (n=2) e de pacientes

com câncer (n=9). **F.** Avaliação da proteína STAT3 fosforilada nos linfócitos T não ativados (HLA-DR$^-$) e ativados (HLA-DR$^+$), nas amostras de pacientes com lesão de alto grau (n=1) e de pacientes com câncer (n=9).

A Figura 10 apresenta os dados relacionados à expressão das proteínas STAT3 total e fosforilada nas células mononucleares do sangue periférico das pacientes com lesão de alto grau e câncer. Também foi adicionado um grupo controle, composto por mulheres sem indicação de lesão no colo uterino. Embora a expressão da proteína STAT3 total se encontre inalterada nos três grupos avaliados (Figura 10 A), há um aumento da expressão da proteína STAT3 fosforilada nas amostras das pacientes com câncer quando comparadas com o grupo controle (Figura 10 B). Tal comportamento é semelhante quando se analisa a expressão das proteínas nas subpopulações das células do sangue periférico (Figura 10 C e D). Não há diferença na expressão da proteína STAT3 total em nenhuma das duas subpopulações (células apresentadoras de antígeno e linfócitos T) em nenhum dos grupos avaliados (Figura 10 C). Entretanto, há um aumento na expressão da proteína STAT3 fosforilada nos linfócitos T das amostras de pacientes com câncer quando comparadas com o grupo controle (Figura 10 D). Analisando-se os linfócitos T quanto ao seu estado de ativação, nota-se que os linfócitos T ativados (HLA-DR$^+$) das amostras das pacientes com lesão de alto grau têm uma maior expressão da proteína STAT3 total quando comparada com os outros dois grupos, pacientes com câncer e mulheres controles (Figura 10 E). A avaliação da expressão da proteína STAT3 fosforilada demonstra um aumento na expressão dessa proteína, tanto nos linfocitos T ativados (HLA-DR$^+$) como nos não ativados (HLA-DR$^-$), nas amostras das pacientes quando comparadas com o grupo controle (Figura 10 F).

Figura 10 – Avaliação da expressão das proteínas STAT3 total e fosforilada nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes diagnosticadas com lesão de alto grau e câncer e um grupo controle de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino.



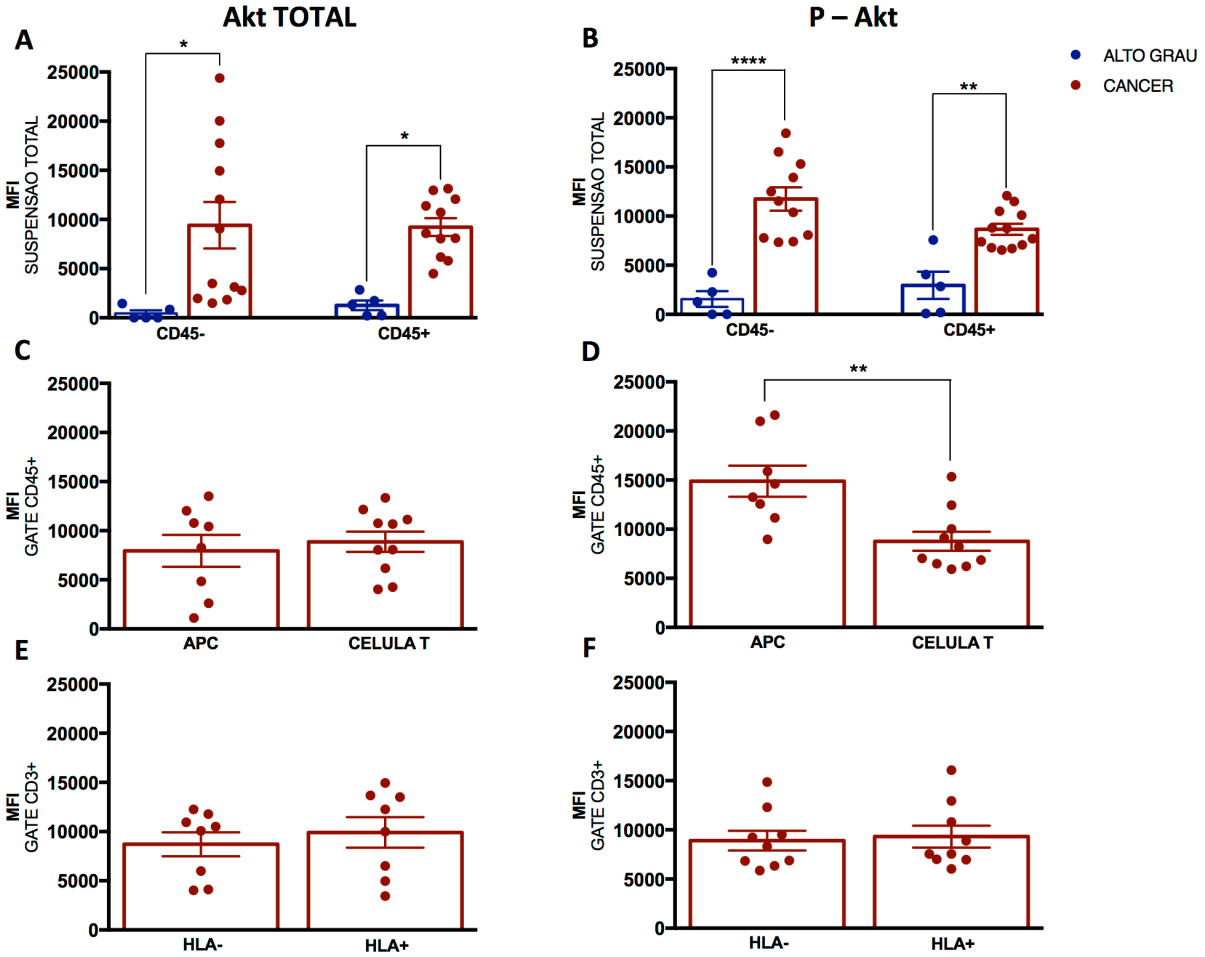
A expressão da proteína STAT3 total é apresentada na coluna da esquerda (Gráficos **A**, **C** e **E**) e a expressão da proteína STAT3 fosforilada é apresentada na coluna da direita (Gráficos **B**, **D** e **F**). As análises estatísticas apresentadas foram realizadas com o programa Graph Pad Prism, utilizando-se ANOVA seguido do pós teste de Tukey (**** p<0,0001; *** 0,0001<p<0,002; ** 0,002<p<0,016; * 0,016<p<0,05). **A.** Avaliação da proteína STAT3 total em todas as células mononucleares do sangue periférico de pacientes com lesão de alto grau (n=5) e com câncer (n=15), e um grupo controle de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino (n=9). **B.** Avaliação da proteína STAT3 fosforilada em todas as células mononucleares do sangue periférico de pacientes com lesão de alto grau (n=7) e com câncer (n=14), e um grupo controle de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino (n=5). **C.** Avaliação da proteína STAT3 total nas diferentes populações das células mononucleares do sangue periférico: células apresentadoras de antígeno (APC) e linfócitos T. Foram avaliadas amostras de pacientes com lesão de alto grau (n=4), amostras de pacientes com câncer (n=13) e um grupo controle (n=9) **D.** Avaliação da proteína STAT3 fosforilada nas diferentes populações das células mononucleares do sangue periférico. As amostras das pacientes com lesão de alto grau têm um n=5 na avaliação da expressão da proteína em ambas subpopulações. Já as amostras das pacientes com câncer, têm n=13 na avaliação da expressão da proteína nas células apresentadoras de antígeno e n=11 nos linfócitos T. O grupo controle conta com um n=8 na avaliação da expressão da proteína nas células apresentadoras de antígeno e n=9 nos linfócitos T. **E.** Avaliação da proteína STAT3

total nos linfócitos T não ativados (HLA-DR$^-$) e ativados (HLA-DR$^+$), nas amostras de pacientes com lesão de alto grau (n=6) e com câncer (n=8), e nas amostras de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino (n=9). **F.** Avaliação da proteína STAT3 fosforilada nos linfócitos T não ativados (HLA-DR$^-$) e ativados (HLA-DR$^+$), nas amostras de pacientes com lesão de alto grau (n=6) e com câncer (n=9), e nas amostras de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino (n=9).

4.5 Caracterização da via de Akt em biópsias do colo uterino e células mononucleares do sangue periférico de pacientes com lesão de alto grau e câncer

Por último, caracterizamos a via de sinalização Akt, representada pela expressão da proteína Akt total e da proteína Akt fosforilada no resíduo de treonina 308. Esse sítio é fosforilado pela enzima PDK1, sendo a primeira fosforilação necessária para a ativação de Akt. A Figura 11 apresenta os dados referentes as biópsias das pacientes com lesão de alto grau e câncer. Observa-se que há um aumento na expressão das proteínas Akt total e Akt fosforilada nas células CD45$^+$ quando comparadas com as células CD45$^-$. Esse aumento é observado tanto nas amostras das pacientes com lesão de alto grau quanto nas amostras de pacientes com câncer (Figura 11 A e B). Infelizmente nenhuma amostra de lesão de alto grau foi caracterizada quanto a expressão das proteínas nas subpopulações do infiltrado inflamatório. Dessa forma, a expressão das proteínas Akt total e Akt foforilada nas subpopulações do infiltrado inflamatório foram apenas analisadas nas amostras das pacientes com câncer (Figura 11 C, D, E e F). Podemos observar que embora não haja diferença na expressão da proteína Akt total nas diferentes células do infiltrado inflamatório (Figura 11 C), há um aumento na expressão da proteína Akt fosforilada nas células apresentadoras de antígeno (APC) quando comparadas com os linfócitos T (Figura 11 D). Em relação ao estado de ativação dos linfócitos T, não há diferença entre as células ativadas (HLA-DR$^+$) e não ativadas (HLA-DR$^-$) quanto a expressão das proteínas Akt total e fosforilada (Figura 11 E e F).

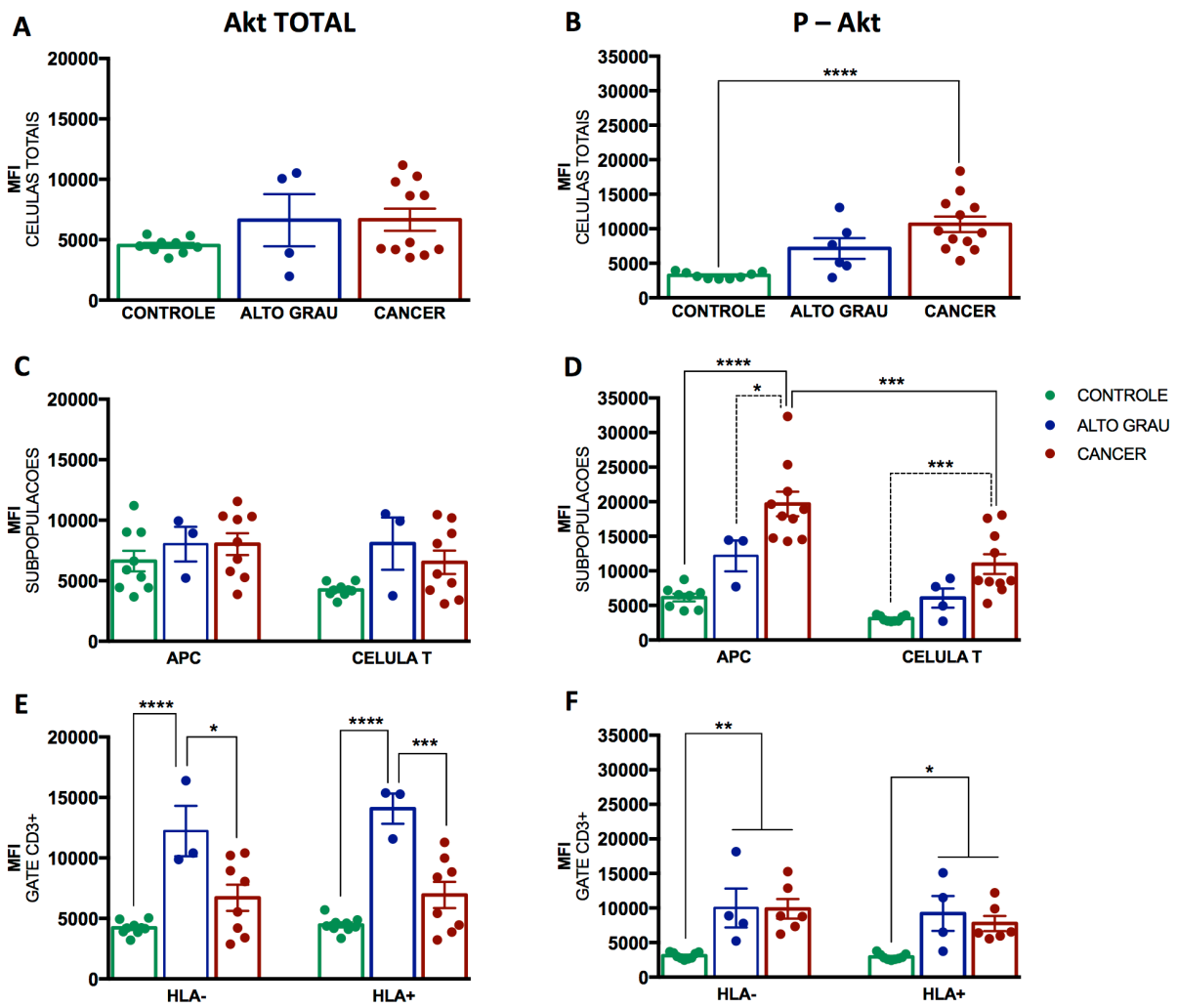
Figura 11 – Avaliação da expressão das proteínas Akt total e fosforilada nas amostras de biópsias de pacientes diagnosticadas com lesão de alto grau e câncer do colo do útero.



A expressão da proteína Akt total é apresentada na coluna da esquerda (Gráficos **A**, **C** e **E**) e a expressão da proteína Akt fosforilada é apresentada na coluna da direita (Gráficos **B**, **D** e **F**). As análises estatísticas apresentadas foram realizadas com o programa Graph Pad Prism, utilizando-se ANOVA seguido do pós teste de Tukey nos Gráficos **A** e **B**. Utilizou-se o teste T de Student para análise estatística dos Gráficos **C**, **D**, **E** e **F**, comparando apenas as amostras das pacientes com câncer (**** $p<0,0001$; ** $0,002<p<0,016$; * $0,016<p<0,05$) **A.** Avaliação da proteína Akt total nas células $CD45^-$ e no infiltrado inflamatório ($CD45^+$) nas amostras de pacientes com lesão de alto grau (n=5) e de pacientes com câncer (n=12). **B.** Avaliação da proteína Akt fosforilada nas células $CD45^-$ e no infiltrado inflamatório ($CD45^+$) nas amostras de pacientes com lesão de alto grau (n=5) e pacientes com câncer (n=12). **C.** Avaliação da proteína Akt total nas diferentes subpopulações do infiltrado inflamatório nas amostras das pacientes com câncer. A avaliação da expressão da proteína nas células apresentadoras de antígeno têm um n=8 e um n=10 nos linfócitos T. **D.** Avaliação da proteína Akt fosforilada nas diferentes subpopulações do infiltrado inflamatório nas amostras das pacientes com câncer. A avaliação da expressão da proteína nas células apresentadoras de antígeno têm um n=8 e um n=10 nos linfócitos T. **E.** Avaliação da proteína Akt total nos linfócitos T não ativados ($HLA\text{-}DR^-$) e ativados ($HLA\text{-}DR^+$) nas amostras de pacientes com câncer (n=8). **F.** Avaliação da proteína Akt fosforilada nos linfócitos T não ativados ($HLA\text{-}DR^-$) e ativados ($HLA\text{-}DR^+$), nas amostras de pacientes câncer (n=9).

A Figura 12 apresenta os dados relacionados à expressão das proteínas Akt total e fosforilada nas células mononucleares do sangue periférico das pacientes com lesão de alto grau e câncer. Também foi adicionado um grupo controle, composto por mulheres sem indicação de lesão no colo uterino. Embora a expressão da proteína Akt total encontre-se inalterada nos três grupos avaliados (Figura 12 A), a expressão da proteína Akt fosforilada tem um aumento nas amostras das pacientes com câncer quando comparadas com o grupo controle (Figura 12 B). Tal comportamento é semelhante quando se analisa a expressão das proteínas nas subpopulações das células do sangue periférico (Figura 12 C e D). Não há diferença na expressão da proteína Akt total em nenhuma das duas subpopulações (células apresentadoras de antígeno e linfócitos T) em nenhum dos grupos avaliados (Figura 12 C). Entretanto, há um aumento na expressão da proteína Akt fosforilada nas células apresentadoras de antígenos e nos linfócitos T das amostras de pacientes com câncer quando comparadas com o grupo controle (Figura 12 D). Também há um aumento na expressão da proteínas Akt fosforilada nas células apresentadoras de antígeno das amostras de pacientes com câncer, quando comparadas com as células das amostras das pacientes com lesão de alto grau (Figura 12 D). Observa-se ainda, na Figura 12 D, o aumento na expressão da proteína Akt fosforilada na subopopulação de células apresentadoras de antígeno das pacientes com câncer, quando comparadas com os linfócitos T do mesmo grupo. Analisando-se os linfócitos T quanto ao seu estado de ativação, nota-se que tanto as células ativadas (HLA-DR^{+}) quanto as células não ativadas (HLA-DR^{-}) das amostras das pacientes com lesão de alto grau tem uma maior expressão da proteína Akt total quando comparada com os outros dois grupos, pacientes com câncer e mulheres controles (Figura 12 E). A avaliação da expressão da proteína Akt fosforilada demonstra um aumento na expressão dessa proteína nos linfócitos T ativados (HLA-DR^{+}) e não ativados (HLA-DR^{-}), nas amostras das pacientes quando comparadas com o grupo controle (Figura 12 F).

Figura 12 – Avaliação da expressão das proteínas Akt total e fosforilada nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes diagnosticadas com lesão de alto grau e câncer e um grupo controle de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino.



A expressão da proteína Akt total é apresentada na coluna da esquerda (Gráficos **A**, **C** e **E**) e a expressão da proteína Akt fosforilada é apresentada na coluna da direita (Gráficos **B**, **D** e **F**). As análises estatísticas apresentadas foram realizadas com o programa Graph Pad Prism, utilizando-se ANOVA seguido do pós teste de Tukey (**** p<0,0001; *** 0,0001<p<0,002; ** 0,002<p<0,016; * 0,016<p<0,05). **A.** Avaliação da proteína Akt total em todas as células mononucleares do sangue periférico de pacientes com lesão de alto grau (n=9) e com câncer (n=11), e um grupo controle de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino (n=9). **B.** Avaliação da proteína Akt fosforilada em todas as células mononucleares do sangue periférico de pacientes com lesão de alto grau (n=9) e com câncer (n=12), e um grupo controle de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino (n=9). **C.** Avaliação da proteína Akt total nas diferentes populações das células mononucleares do sangue periférico: células apresentadoras de antígeno (APC) e linfócitos T. Foram avaliadas amostras de pacientes com lesão de alto grau (n=3), de pacientes com câncer (n=9) e um grupo controle (n=9) **D.** Avaliação da proteína Akt fosforilada nas diferentes populações das células mononucleares do sangue periférico. As amostras de lesão de alto grau têm um n=3 na avaliação da expressão da proteína nas células apresentadoras de antígeno e um n=4 na avaliação nos linfócitos T. Já as amostras de

câncer, têm n=10 na avaliação da expressão da proteína nas duas subpopulações. O grupo controle conta com um n=8 na avaliação da expressão da proteína nas células apresentadoras de antígeno e um n=9 nos linfócitos T. **E.** Avaliação da proteína Akt total nos linfócitos T não ativados (HLA-DR$^-$) e ativados (HLA-DR$^+$), nas amostras de pacientes com lesão de alto grau (n=3) e câncer (n=8), e nas amostras de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino (n=9). **F.** Avaliação da proteína Akt fosforilada nos linfócitos T não ativados (HLA-DR$^-$) e ativados (HLA-DR$^+$), nas amostras de pacientes com lesão de alto grau (n=4) e câncer (n=6), e nas amostras de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino (n=9).

4.6 Efeito do tratamento com CD40L solúvel nos linfócitos B de mulheres saudáveis e pacientes com lesão de alto grau e câncer

Os dados anteriores mostram um efeito do tumor sobre as células do sistema imune. Não só as células presentes no microambiente tumoral são afetadas, como também as células circulantes. A manipulação das células do sistema imune visando o desenvolvimento de uma melhor resposta antitumoral tem sido uma busca constante por vários grupos de pesquisa. Utilizando modelo experimental, nosso laboratório vem demonstrando que é possível melhorar o potencial de apresentação de antígenos de linfócitos B com tratamento com agonista de CD40, induzindo respostas antitumorais secundárias em linfócitos T. O mesmo não tem sido observado com o tratamento de células dendríticas, que parecem exacerbar seu fenótipo tolerogênico com o tratamento (manuscrito em anexo).

Com isso, decidimos avaliar se as células B das pacientes também responderiam positivamente a um estímulo por agonista de CD40. Uma das vias ativadas por CD40 é NFkB, portanto esse tratamento poderia estar revertendo o efeito do tumor sobre essas células. Os ensaios realizados para identificar a eficácia do estímulo com CD40L solúvel (sCD40L) foram feitos primeiramente em linfócitos B isolados do sangue periférico de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino, visando identificar a melhor dosagem e tempo de estímulo. O isolamento dos linfócitos B das células mononucleares do sangue periférico, possui uma alta taxa de enriquecimento da população de interesse, como pode ser observado na Figura 13.

Figura 13 – Figura representativa demonstrando o enriquecimento dos linfócitos B.

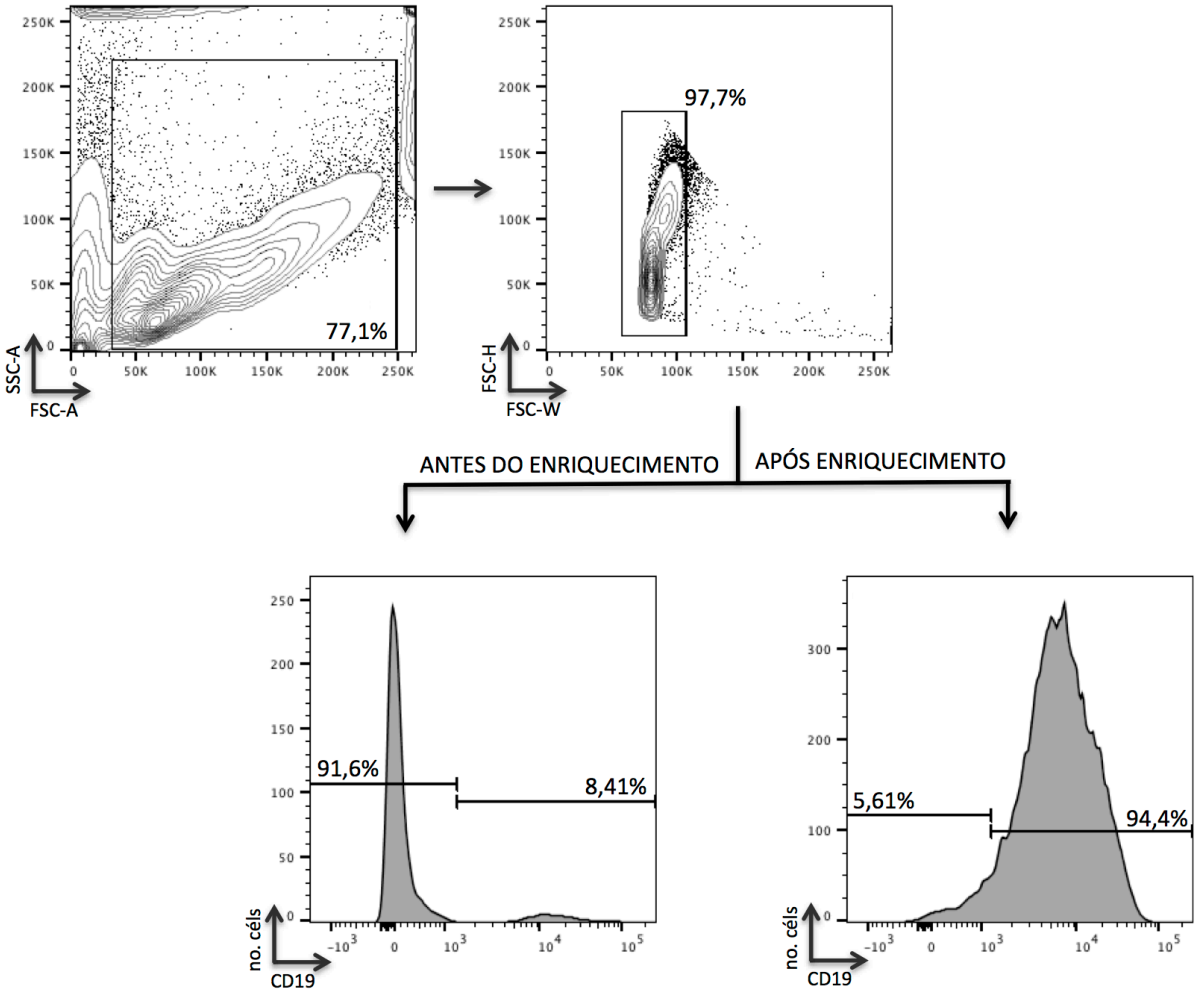
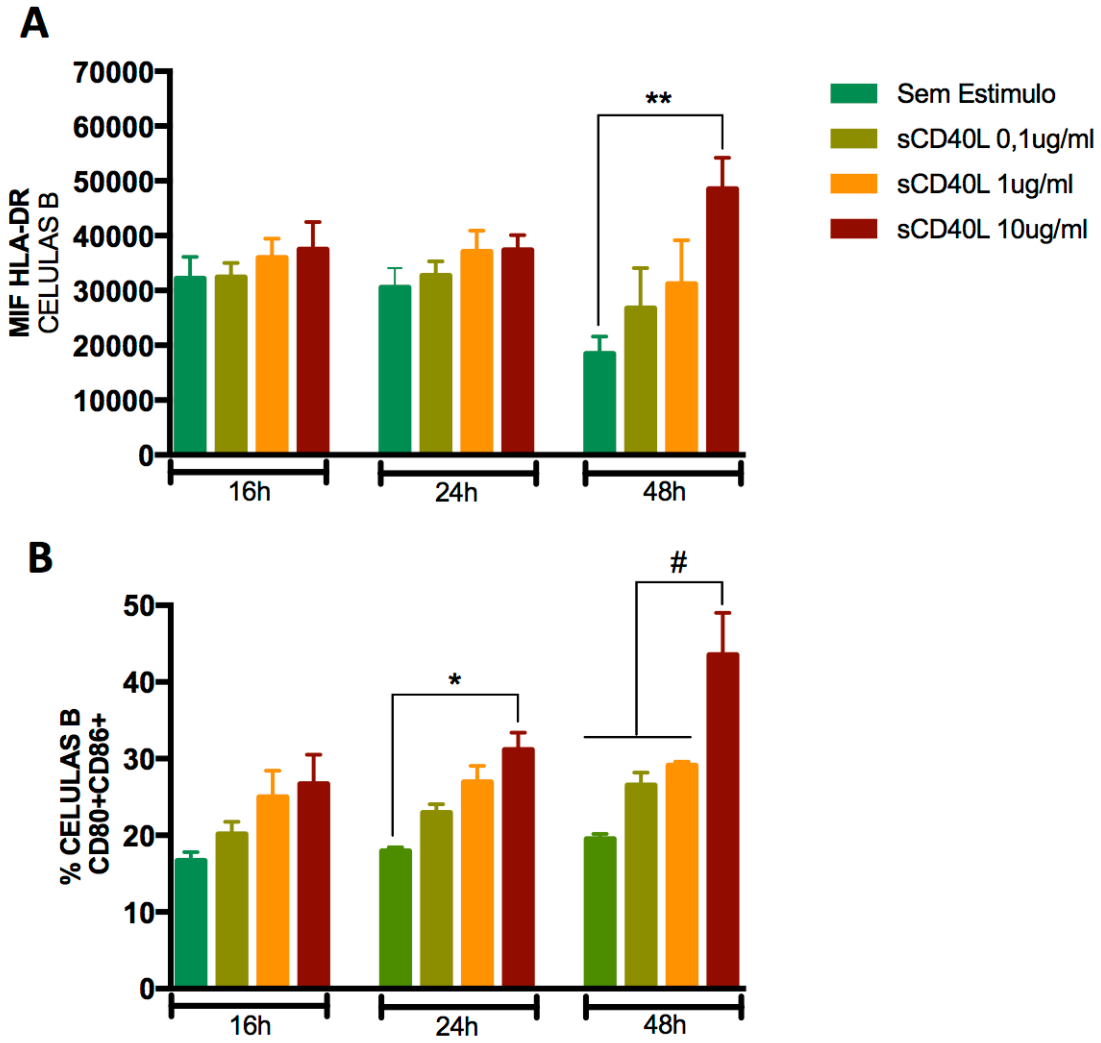


Figura representativa da pureza obtida após o enriquecimento dos linfócitos B das células mononucleares do sangue periférico. A população de interesse foi identificada pela expressão da proteína de superfície celular CD19. Após o enriquecimento a viabilidade celular era superior a 90%. Pelo menos trinta mil eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo. O programa FlowJo foi utilizado para a análise dos dados.

No modelo murino foi utilizado o estímulo com 0,1 µg/ml de anti-CD40 por aproximadamente 16 horas. Entretanto como pode ser observado na Figura 14, esse tipo de estímulo não foi eficiente em ativar os linfócitos B humanos de mulheres sem lesão aparente no colo uterino. Apenas o estímulo com 10 µg/ml de sCD40L por 48 horas foi capaz de aumentar tanto a expressão da molécula HLA-DR (Figura 14 A), quanto o número de células duplo positivas para as moléculas co-estimuladoras, CD80 e CD86 (Figura 14 B).

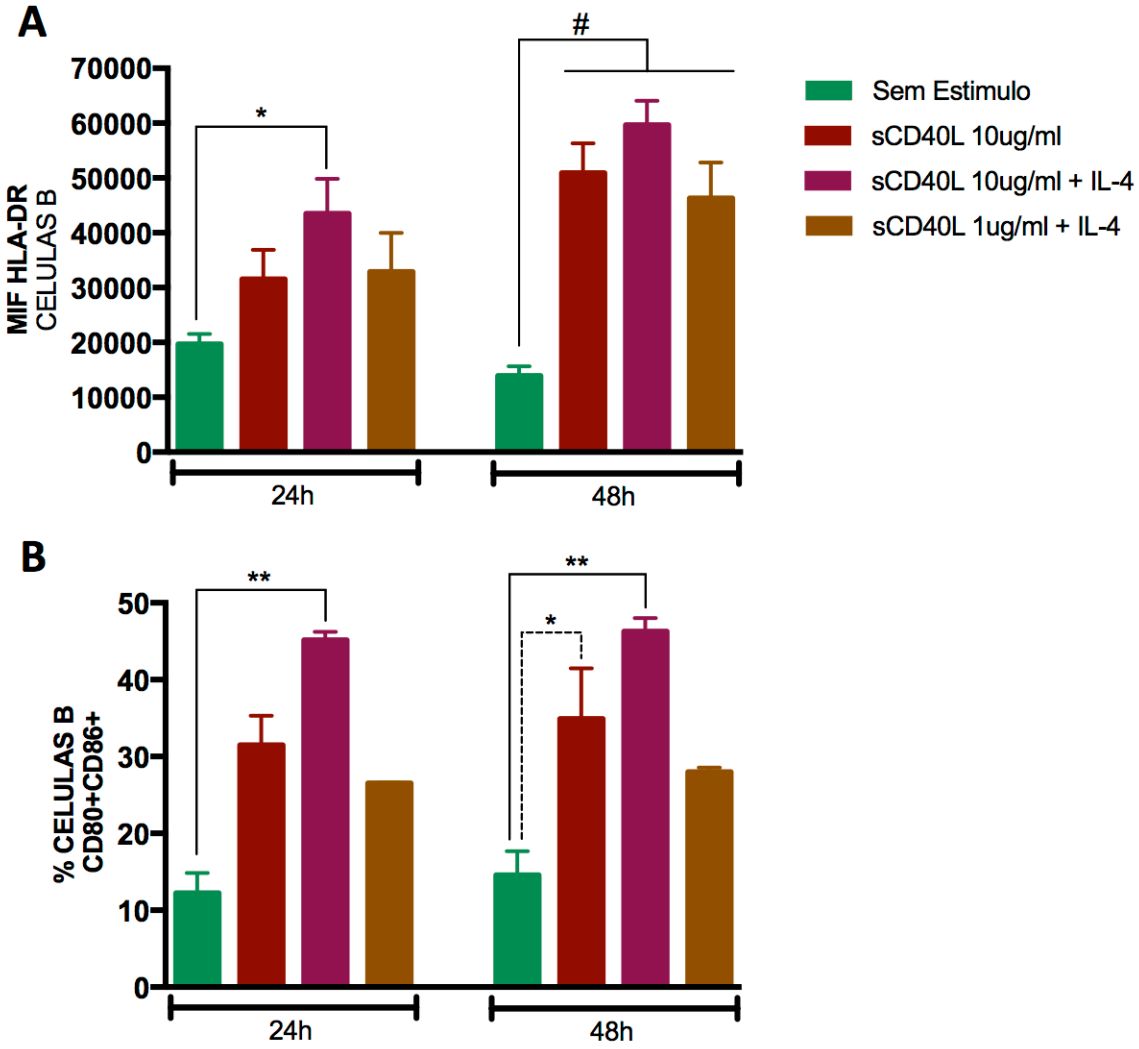
Figura 14 – Curva dose resposta do estímulo com sCD40L nos linfócitos B de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino.



A eficácia do estímulo utilizado foi avaliada pela expressão da molécula HLA-DR e pela dupla positividade na expressão de CD80 e CD86 nos linfócitos B isolados do sangue periférico de mulheres sem lesão aparente no colo uterino. A leitura das amostras foi realizada no FACS Canto II e a análise no programa FlowJo. Pelo menos trinta mil eventos foram adquiridos por amostra. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Graph Pad Prism, através do teste ANOVA seguido do pós teste de Tukey. **A.** Avaliação da expressão da molécula HLA-DR nos linfócitos B isolados. Os grupos avaliados foram: sem estímulo (n=4 nos tempos de 16 e 24 horas, e n=3 no de 48 horas), 0,1 µg/ml de sCD40L (n= 4 nos tempos de 16 e 24 horas, e n=2 no de 48 horas), 1 µg/ml de sCD40L (n= 4 nos tempos de 16 e 24 horas, e n=2 no de 48 horas) e 10 µg/ml de sCD40L (n= 3 nos três tempos avaliados). ** 0,002<p<0,016 **B.** Avaliação das células duplo positivas para CD80 e CD86. Os grupos avaliados foram: sem estímulo (n=3 nos tempos de 16 e 24 horas, e n=2 no de 48 horas), 0,1 µg/ml de sCD40L (n= 3 nos tempos de 16 e 24 horas, e n=2 no de 48 horas), 1 µg/ml de sCD40L (n= 3 nos tempos de 16 e 24 horas, e n=2 no de 48 horas) e 10 µg/ml de sCD40L (n= 2 nos três tempos avaliados). * 0,016<p<0,05. #: *** 0,0001<p<0,002 na comparação do grupo sem estímulo com o grupo 10 µg/ml de sCD40L ; ** 0,002<p<0,016 na comparação do grupo 10 µg/ml de sCD40L com o grupo 0,1 µg/ml de sCD40L; * na comparação do grupo 10 µg/ml de sCD40L com o grupo 1 µg/ml de sCD40L.

Embora o estímulo de 10 μg/ml de sCD40L por 48h (Figura 14) tenha sido eficiente em ativar os linfócitos B, a duração de 48 horas do estímulo leva a um aumento no número de células mortas ao fim do período (dado observado na contagem com azul de tripan). Visando essa abordagem como possível terapia, é fundamental que os linfócitos B estejam viáveis quando em contato com o linfócito T. Segundo a literatura o linfócito B humano necessita de um estímulo a mais além da ativação por CD40 para o bom desempenho como célula apresentadora de antígeno (BISHOP, 2015). Os estímulos por citocinas nos linfócitos B não apenas levam a troca de classe dos anticorpos, como também desencadeiam sinais visando aumentar a viabilidade e proliferação celular (RUSH; HODGKIN, 2001). A eficácia da utilização da citocina IL-4 em manter a viabilidade celular, além de estimular a proliferação dessas células foi observada em diversos estudos. Sendo superior a utilização de outras citocinas, como IL-2 e IL-10 (HSU et al., 2000; LARSON; LEBIEN, 1994). Decidiu-se, então, adicionar 20 ng/ml da citocina IL-4 ao estímulo com 10 μg/ml de sCD40L. A Figura 15 mostra que apenas o estímulo conjunto com 10 μg/ml de sCD40L e 20 ng/ml de IL-4 foi capaz de aumentar a expressão da molécula HLA-DR e o número de células duplo positivas para as moléculas co-estimuladoras, CD80 e CD86. Como desejado, a adição da citocina IL-4 foi capaz de reduzir o tempo de estímulo para 24 horas nos linfócitos B de mulheres sem lesão aparente no colo uterino.

Figura 15 – Adição da citocina IL-4 ao estímulo com sCD40L nos linfócitos B de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino.

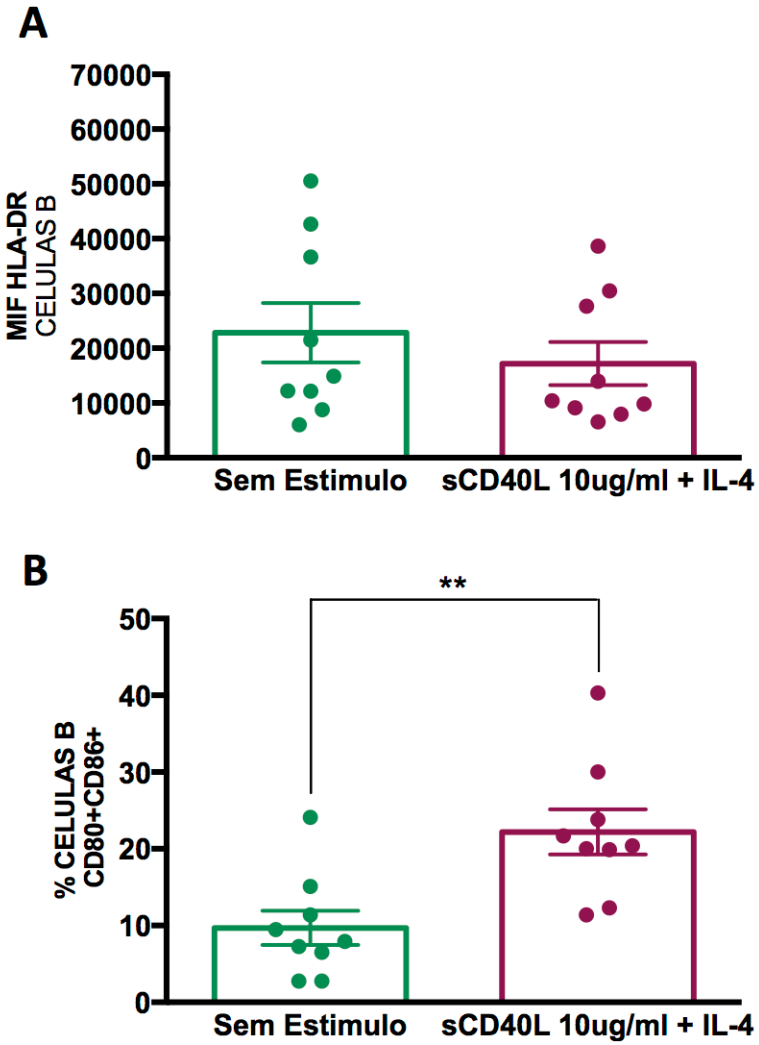


A eficácia do estímulo utilizado foi avaliada pela expressão da molécula HLA-DR e pela dupla positividade na expressão de CD80 e CD86 nos linfócitos B isolados do sangue periférico de mulheres sem lesão aparente no colo uterino. A leitura das amostras foi realizada no FACS Canto II e a análise no programa FlowJo. Pelo menos trinta mil eventos foram adquiridos por amostra. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Graph Pad Prism, através do teste ANOVA seguido do pós teste de Tukey. **A.** Avaliação da expressão da molécula HLA-DR nos linfócitos B isolados. Foram avaliados dois tempos de estímulo: 24 horas (n=4 nos grupos sem estímulo e 10 µg/ml de sCD40L + 20 ng/ml da citocina IL-4, n=3 no grupo 10 µg/ml de sCD40L, e n=2 no grupo 1 µg/ml de sCD40L + 20 ng/ml da citocina IL-4) e 48 horas (todos os grupos têm um n=2). * 0,016<p<0,05; #: ** 0,002<p<0,016 na comparação do grupo 10 µg/ml de sCD40L + 20 ng/ml da citocina IL-4 com o grupo sem estímulo; * na comparação dos grupos 10 µg/ml de sCD40L e 1 µg/ml de sCD40L + 20 ng/ml da citocina IL-4 com o grupo sem estímulo. **B.** Avaliação das células duplo positivas para CD80 e CD86. Foram avaliados dois tempos de estímulo: 24 horas (n=3 nos grupos sem estímulo e 10 µg/ml de sCD40L + 20 ng/ml da citocina IL-4, e n=2 nos grupos 10 µg/ml de sCD40L e 1 µg/ml de sCD40L + 20 ng/ml da citocina IL-4) e 48 horas

(n=4 nos grupos sem estímulo e 10 µg/ml de sCD40L, e n=2 nos outros grupos restantes). * 0,016<p<0,05. ** 0,002<p<0,016.

Como próximo passo avaliamos o estímulo com 10 µg/ml de sCD40L e 20 ng/ml de IL-4 por 24 horas em linfócitos B de pacientes com lesão de alto grau e câncer. A Figura 16 demonstra que tal estímulo foi capaz de aumentar a porcentagem das células duplamente positivas para as moléculas co-estimuladoras, CD80 e CD86 (Figura 16 B) nos linfócitos B das pacientes. Entretanto não houve um aumento na expressão da molécula HLA-DR (Figura 16 A). Mesmo somente com o aumento na porcentagem das células duplo positivas para as moléculas co-estimuladoras, os dados apresentados sugerem uma possível reversão do efeito do tumor nos linfócitos B das pacientes.

Figura 16 – Efeito do estímulo com 10 μg/ml de sCD40L e 20 ng/ml de IL-4 por 24 horas nos linfócitos B de pacientes com lesão de alto grau e câncer no colo uterino.



A eficácia do estímulo utilizado foi avaliada pela expressão da molécula HLA-DR e pela dupla positividade na expressão de CD80 e CD86 nos linfócitos B isolados do sangue periférico de pacientes com lesão de alto grau e câncer no colo uterino. A leitura das amostras foi realizada no FACS Canto II e a análise com o programa FlowJo. Pelo menos trinta mil eventos foram adquiridos por amostra. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Graph Pad Prism, através do teste T de Student. **A.** Avaliação da expressão da molécula HLA-DR nos linfócitos B isolados. Ambos grupos têm um n=9. **B.** Avaliação das células duplo positivas para CD80 e CD86. Ambos grupos têm um n=9. ** $0{,}002<p<0{,}016$.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Tumores recrutam e modulam a atividade de células do sistema imune. Isso é verdade para diversos tipos de tumores, inclusive os do colo uterino (KOBAYASHI et al., 2008; LEPIQUE et al., 2009). A modulação do infiltrado inflamatório tem sido investigada na terapia antitumoral com graus variados de sucesso, sendo que muitos dos testes que mostraram eficiência foram feitos *in vitro*, com pouca relação com o microambiente tumoral real (HAGEMANN et al., 2008; RYAN et al., 2015). Para real eficácia de tal abordagem é fundamental compreender o efeito do microambiente tumoral que gera sinais crônicos ao organismo, levando alterações na sinalização celular que atuam beneficiando o crescimento tumoral. As células presentes no microambiente tumoral estão expostas, cronicamente, a citocinas, quimiocinas, anticorpos, mediadores lipídicos, metabólitos, hipóxia e carência de nutrientes em algumas áreas; a integração desses sinais, juntamente com características intrínsecas dos diferentes tipos celulares presentes no microambiente tumoral, levam à progressão ou regressão do tumor. Os resultados aqui apresentados mostram que o tumor influencia as células do sistema imune, não só no local da lesão como também sistemicamente, alterando o estado de ativação de importantes vias de sinalização que podem contribuir para a progressão tumoral. Por outro lado, conseguimos mostrar que a influência tumoral nas células apresentadoras de antígeno, mais especificamente nos linfócitos B, podem ser revertida através do estímulo com agonista de CD40, aumentando, assim, seu potencial antigênico.

Nós observamos aumento da frequência de células inflamatórias no microambiente tumoral de acordo com o aumento do grau da lesão, indicando assim a ação do tumor em recrutar células do sistema imune. Um outro estudo em andamento no nosso laboratório, mostra resultados semelhantes, em uma outra cohorte de pacientes. Há uma preocupação do laboratório em relação à frequência de células infiltrantes observadas, que chegou a aproximadamente 90% em algumas amostras de câncer. A metodologia que nós utilizamos pode favorecer a liberação de células infiltrantes presentes na lesão. É possível que uma parte das células epiteliais continuem ligadas umas às outras, após a digestão com Colagenase, ficando posteriormente retidas na filtragem e sendo portanto excluídas da análise.

Outro potencial problema seria hemorragia, o que poderia levar à inclusão de células de sangue à suspensão celular final. A avaliação histológica do nosso outro estudo demonstrou que há áreas de hemorragia principalmente em carcinomas invasivos, mas que há detecção clara de células inflamatórias nas lesões, em padrão similar ao observado por citometria de fluxo, indicando que os resultados da avaliação de amostras digeridas com Colagenase refletem o que se observa em análise histológica das lesões.

O tumor também é capaz de influenciar as células do sistema imune sistemicamente. Segundo a literatura, pacientes com tumores sólidos, inclusive uma porcentagem das pacientes com tumores do colo uterino podem apresentar o fenômeno de leucocitose (MABUCHI et al., 2011). Isso ocorre em resposta a citocinas produzidas no microambiente tumoral, que sinalizam para a medula óssea, que por sua vez, libera mais células na circulação. Resultados ainda não publicados do nosso laboratório mostram um aumento significativo de população de células polimorfonucleares imaturas em sangue de pacientes com câncer, quando comparamos com amostras de sangue de pacientes com lesões precursoras. Além disso, o grupo de Mabuchi e colaboradores, têm demonstrado que aumento da concentração sérica de G-CSF, está relacionada, ao aumento de células polimorfonucleares e pior prognóstico de pacientes com câncer recorrente do colo uterino. Até o momento, nós observamos apenas a proporção entre linfócitos T e células apresentadoras de antígeno presentes nas células mononucleares do sangue periférico. Há uma diminuição na frequência de células T circulantes nas pacientes com câncer, quando comparadas com as mulheres sem indicação de lesão no colo uterino (grupo controle). Embora tenhamos observado apenas uma tendência no aumento da quantidade das células apresentadoras de antígeno nas pacientes com câncer (que não incluem todas as células mielóides, por exemplo as polimorfonucleares), dados na literatura indicam que a diminuição na proporção de linfócitos T no sangue periférico deve-se à maior mobilização de células mielóides pela medula óssea (MATSUMOTO et al., 2010).

Ao avaliar o estado de ativação de vias de sinalização de acordo com o grau da lesão, no microambiente tumoral e em leucócitos circulantes, encontramos diferentes padrões dependendo da via analisada. A via de NFκB tem maior ativação nas células do infiltrado inflamatório nas biópsias das pacientes com câncer do que

nas biópsias das pacientes com lesão precursora. A ativação dessa via pode estar envolvida com o aumento no recrutamento de células do sistema imune para o local da lesão. O fator de transcrição NFκB tem como genes alvos a citocina IL-6, além dos fatores de crescimento G-CSF e GM-CSF (BUNTING, et al., 2007; NISHIZAWA; NAGATA, 1990; SON, et al., 2008). Ao avaliar as alterações sistêmicas, observamos uma diminuição na expressão das proteínas da via de NFκB nas células mononucleares do sangue periférico. Há uma diminuição não apenas da proteína p65 fosforilada, como também da proteína total. O complexo NFκB, quando no núcleo, possui atividade transcricional mesmo sem a fosforilação no resíduo serina 536 (GHOSH; HAYDEN, 2012), portanto, a diminuição em ambas as proteínas indica uma forte inibição dessa via nas células circulantes, provavelmente causada pelo tumor. É interessante observar que as células das pacientes com lesões precursoras já possuem a via inibida, demonstrando que mesmo uma pequena massa tumoral, ainda contida no sítio anatômico, é capaz de influenciar as células circulantes do sistema imune. O mesmo padrão foi observado em modelo experimental em nosso laboratório. Observamos, inibição da via de NFkB em células inflamatórias e apresentadoras de antígeno no baço dos animais com tumor associado ao HPV 16, em um mecanismo dependente da expressão de IL-10 (STONE et al., 2014b). Nossos resultados podem indicar não apenas um mecanismo de escape dos tumores como também, potencialmente um marcador de progressão tumoral.

Embora não tenhamos identificado nenhuma alteração na via de STAT3 nas biópsias das pacientes de acordo com o grau da lesão, é possível identificar dois grupos de pacientes em relação a expressão das proteínas STAT3 total e fosforilada. Nossos dados não permitem afirmar se a maior ou menor expressão das proteínas estão relacionadas com o estadiamento da doença. Dados na literatura sugerem uma associação entre a ativação de STAT3 em células tumorais com o pior prognóstico da paciente (TAKEMOTO et al., 2009). Nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes com câncer, foi observada uma ativação da via de STAT3 em linfócitos T e linfócitos T HLA-DR+ em relação às células das pacientes com lesão precursora ou controles. As células tumorais expressam IL-6 e G-CSF, ambas citocinas ativam a via de STAT3 (STONE et al., 2014a). Com isso, não nos surpreendemos com o resultado obtido sobre a expressão desse fator. O fator de

transcrição STAT3 também está envolvido com a manutenção do fenótipo regulador em linfócitos T (PALLANDRE et al., 2007). De fato, recentemente, células CD4+ Th17 reguladoras foram descritas (Treg17) em doenças crônicas (BELLEMORE et al., 2015). O papel de células CD4+ Th17 em câncer tem sido amplamente discutido, podendo ser anti- ou pró-tumoral (BAILEY et al., 2014) Nossos resultados não permitem, por hora, identificar exatamente as subpopulações de linfócitos T circulantes, mas STAT3 pode ter potencial papel nesse sistema.

Ao analisarmos o estado de ativação da via PI3K/Akt, observamos um aumento na expressão da proteína Akt total e na sua forma fosforilada, nas células tumorais e no infiltrado inflamatório de acordo com o aumento do grau da lesão. Essa via está relacionada, entre outras coisas, com a sobrevivência celular em ambientes de hipóxia (ALVAREZ-TEJADO et al., 2001; STEGEMAN et al., 2012). Estudos demonstram que o aumento nos transportadores monocarboxílicos (MCT) 1 e 4 no tecido cervical de pacientes com câncer invasivo, está relacionado a metástase no linfonodo drenante e em sítios distantes (PINHEIRO et al., 2009). A expressão de MCTs é relacionada ao metabolismo tumoral, uma vez que esses transportadores são responsáveis pela excreção de lactato pelas células. A via PI3K/Akt também encontra-se ativada nas células mononucleares do sangue periférico das pacientes com câncer, ativada tanto nos linfócitos T como nas células apresentadoras de antígeno. Observando as subpopulações de linfócitos T, nota-se que mesmo os linfócitos T das pacientes com lesão precursora apresentam alteração nessa via.

Nossos resultados apontam diversas alterações nas vias de sinalização, provavelmente determinadas pela presença tumoral. O efeito tumoral sobre células apresentadoras de antígenos circulantes mais óbvio foi a redução da expressão de NFκB. Como mencionado anteriormente, a atividade desse fator é importante para o processo de apresentação antigênica. De forma, que seja possível, e de fato, nosso laboratório tem evidências sólidas disso, que as pacientes com câncer do colo uterino tenham redução do potencial de apresentação antigênica. Muitos grupos de pesquisa buscam melhorar a resposta antitumoral modulando células do sistema imune de forma a reverter a influência tumoral. A maioria dos trabalhos tentam utilizar as células dendríticas (ANGUILE, et al., 2014; ROMAGNOLI, et al., 2015) e os linfócitos T (CORRIGAN-CURAY, et al., 2014) como ferramentas para imunoterapia. Na literatura, tem-se mostrado evidências de que linfócitos B são

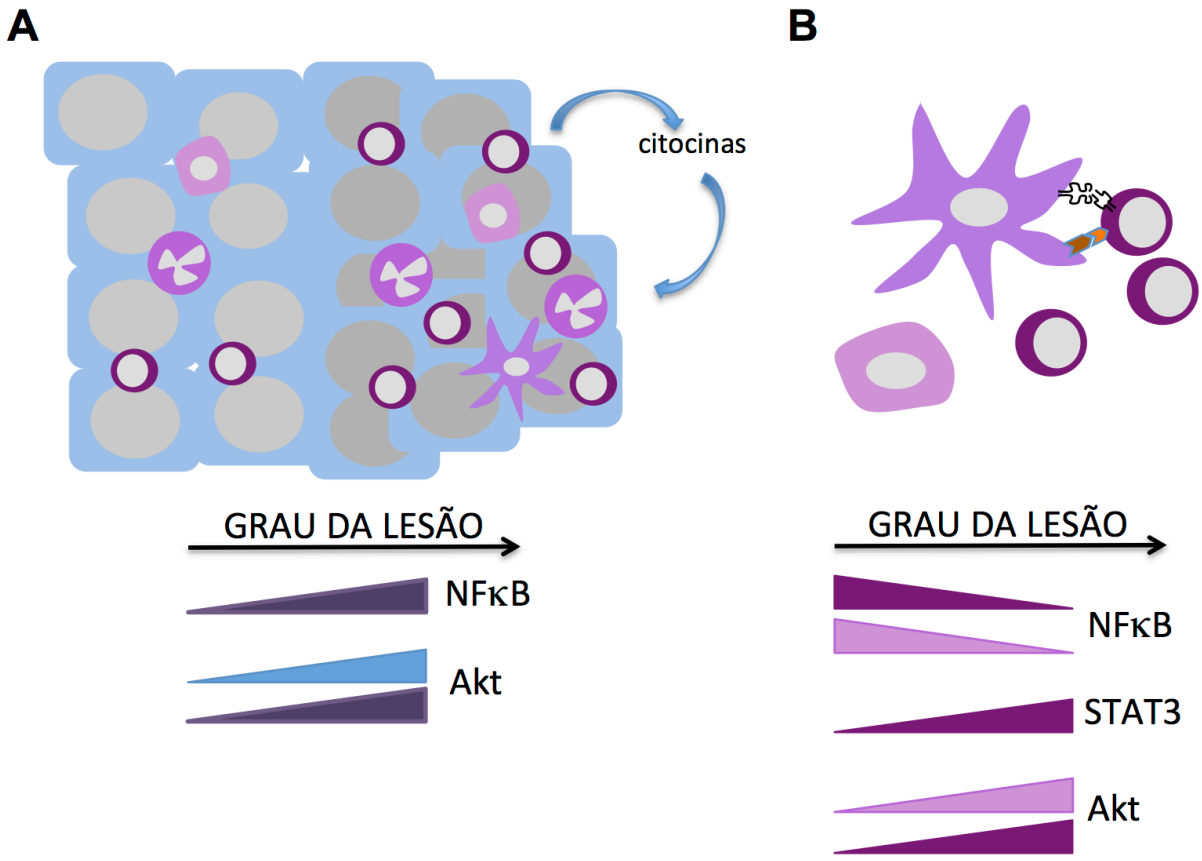
células pró-tumorais, podendo intermediar inflamação crônica local por meio de anticorpos, ou supressão de células T, pela secreção de citocinas como IL-10 (MONACH, et al., 1993; QIN, et al., 1998). Outros demonstram que a depleção dos linfócitos B é prejudicial à resposta antitumoral, sendo esta célula fundamental para o desenvolvimento da resposta de linfócitos T, tanto $CD4^+$ como $CD8^+$, de memória efetora e também para a produção de citocinas benéficas a rejeição tumoral (DILILLO; YANABA; TEDDER, 2016). A utilização dos linfócitos B não deve ser negligenciada. Essas são células apresentadoras de antígeno, capazes de estimular respostas secundárias em linfócitos T, entretanto, não necessitam de diferenciação *in vitro* para serem utilizadas. Mais ainda, há diversas evidências na literatura, dos efeitos tolerogênicos de tumores sobre as células dendríticas, que são muito susceptíveis ao microambiente tumoral. Resultados em modelo experimental, apresentados como manuscrito em anexo, sugerem que embora os linfócitos B, aparentemente, desempenham um papel prejudicial à resposta antitumoral, tal característica pode ser revertida estimulando-os com agonista de CD40. Os linfócitos B de animais com tumor estimulados com agonista de CD40 foram capazes de ativar eficientemente linfócitos T, levando a inibição do crescimento tumoral. O resultado apresentado evidencia que o papel protetor desempenhado pelo linfócito B está relacionado à apresentação de antígenos, pois a ausência da molécula MHC-II reverte seu papel protetor, mesmo após o estímulo com o agonista de CD40.

A dosagem do agonista de CD40 utilizada no modelo experimental mostrou-se ineficiente em estimular os linfócitos B humanos de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino. A dosagem de 10 µg/ml do sCD40L foi eficiente em levar a ativação dos linfócitos B apenas com 48 horas do estímulo, o que acarreta em uma quantidade de células mortas não desejável. Visando diminuir o tempo de estímulo para 24 horas e, assim, aumentar a quantidade de células viáveis, decidimos adicionar um co-estímulo. Dados na literatura mostram a necessidade do linfócito B humano em ter um co-estímulo junto à ligação na molécula CD40 (BISHOP, 2012). A citocina IL-4 foi escolhida, pois diversos trabalhos apontam esta citocina como melhor escolha, sendo capaz não apenas de manter a viabilidade celular como também de melhorar a resposta proliferativa dessa células (BANCHEREAU, et al., 1991; LARSON; LEBIEN, 1994; RUSH; HODGIN, 2001). O estímulo conjunto do

agonista de CD40 com a citocina IL-4 estimulou eficientemente linfócitos B de pacientes com lesão precursora e câncer invasivo, aumentando o seu potencial de apresentação antigênica. As moléculas co-estimuladoras, CD80 e CD86, são moduladas pela via de NFκB, e em resultados preliminares observamos um aumento na ativação dessa via nos linfócitos B estimulados de pacientes, além de observar um aumento na ativação da via PI3K/Akt (dados não mostrados).

Nosso trabalho apresenta um panorama geral do estado de ativação de três importantes vias na progressão tumoral e, além disso, introduz uma possível ferramenta imunomoduladora.

Figura 17 – Desenho esquemático do estado de ativação das vias de sinalização no microambiente tumoral e em leucócitos circulantes.



A. Estado de ativação das vias de sinalização no microambiente tumoral de acordo com o grau da lesão. Na figura: as células em azuis representam as células tumorais, com a cor do núcleo representando o grau da lesão, a cor cinza clara representa as células tumorais nas lesões precursoras e a cor cinza escuro as células tumorais no câncer invasivo; as células em roxo escuro representam os linfócitos T e as células em roxo claro as células apresentadoras de antígeno. No diagrama: a barra em roxo representa o estado de ativação das vias de sinalização em questão nas células do infiltrado inflamatório; a barra em azul

representa o estado de ativação das vias de sinalização nas células tumorais. **B.** Estado de ativação das vias de sinalização em leucócitos circulantes. Na figura: as células em roxo escuro representam os linfócitos T e as células em roxo claro as células apresentadoras de antígeno. No diagrama: a cor da barra representa o estado de ativação da via de sinalização em questão na célula de mesma cor, linfócitos T em roxo escuro e células apresentadoras de antígeno em roxo claro.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- ✓ Há acúmulo do infiltrado inflamatório nas biópsias das pacientes com câncer quando comparadas com as biópsias das pacientes com lesão de alto grau. A maioria das células do infiltrado inflamatório encontradas nas biópsias são linfócitos T não ativados.

- ✓ Há diminuição na proporção de linfócitos T circulantes nas pacientes com câncer quando comparadas com as mulheres sem indicação de lesão no colo uterino. Essa alteração pode ser devida ao aumento de células mielóides circulantes induzido por citocinas secretadas pelo tumor.

- ✓ O infiltrado inflamatório das biópsias das pacientes tem maior expressão da proteína NFκB total do que as células $CD45^-$. Embora a expressão da proteína total seja semelhante entre as amostras das pacientes com lesão de alto grau e câncer, o infiltrado inflamatório das biópsias das pacientes com câncer tem aumento na expressão da proteína p65 em relação ao infiltrado inflamatório das biópsias das pacientes com lesão de alto grau.

- ✓ Há uma diminuição nas expressões das proteínas NFκB total e p65 fosforilada nas células mononucleares das pacientes quando comparadas com o grupo controle. Essa diminuição é ainda mais acentuada nas células mononucleares das pacientes com câncer do que nas pacientes com lesão de alto grau. Essa diminuição é refletida nas dois tipos celulares analisados, as células apresentadoras de antígeno e os linfócitos T.

- ✓ Embora não haja diferença na expressão de STAT3 nas biópsias das pacientes com lesão de alto grau e câncer, observa-se a formação de grupos bem definidos com maior e menor expressão das proteínas. Devido ao pequeno número de pacientes, nós não conseguimos relacionar o nível de expressão de STAT3 e o estadiamento do tumor.

- ✓ As células mononucleares das pacientes com câncer tem maior expressão da proteína STAT3 fosforilada do que as mulheres sem indicação de lesão no colo uterino. Ao analisar as subpopulações das células mononucleares dessas pacientes, observa-se esse mesmo aumento nos linfócitos T, mas não nas células apresentadoras de antígeno.

- ✓ Tanto o infiltrado inflamatório, quanto as células tumorais das biópsias das pacientes com câncer tem aumento na expressão das proteínas Akt total e fosforilada em relação as células das biópsias das pacientes com lesão de alto grau.

- ✓ As células mononucleares do sangue periférico das pacientes com câncer tem maior expressão da proteína Akt fosforilada do que as células do grupo controle. Esse aumento é observado tanto nas células apresentadoras de antígeno, quanto nos linfócitos T.

- ✓ O estímulo com 10 μg/ml de sCD40L e 20 ng/ml de IL-4 por 24 horas aumentou a expressão da molécula HLA-DR e o número de células duplo positivas para CD80 e CD86 em linfócitos B de mulheres sem indicação de lesão no colo uterino. Esse mesmo estímulo foi capaz de aumentar o número de células duplo positivas para CD80 e CD86 em linfócitos B de pacientes com lesão de alto grau e câncer.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

ALVAREZ-TEJADO, M. et al. Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-Kinase / Akt cell survival pathway in PC12 cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 25, p. 22368–22374, 2001.

ANGUILLE, S. et al. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. **The Lancet Oncology,** v. 15, n. 7, p. 257-267, 2014.

ANTONSSON, A. et al. The human papillomavirus type 16 E7 protein binds human interferon regulatory factor-9 via a novel PEST domain required for transformation. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 461, p. 455–461, 2006.

APGAR, B. S.; ZOSCHNICK, L.; WRIGHT, T. C. The 2001 Bethesda system terminology. **American Family Physician**, v. 68, n. 10, p. 1992–1998, 2003.

ASHRAFI, G. H. et al. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. **International Journal of Cancer**, v. 283, p. 276–283, 2005.

BAILEY, S. R. et al. Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. **Frontiers in Immunology,** v. 5, n. 276, p 1-13, 2014.

BALKWILL, F.; COUSSENS, L. M. An inflammatory link. **Nature**, v. 431, n. September, p. 405–406, 2004.

BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 16–24, 2005.

BANCHEREAU, J. et al. Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. **Science,** v. 251, n. 4989, p. 70-72, 1991.

BELLEMORE, S. M. et al. Preventative role of interleukin-17 producing regulatory T helper type 17 (Treg 17) cells in type 1 diabetes in non-obese diabetic mice. **Clinical Experimental Immunology,** v. 182, n. 3, p. 261-269, 2015.

BEN-NERIAH, Y.; KARIN, M. Inflammation meets cancer , with NF-KB as the matchmaker. **Nature Immunology**, v. 12, n. 8, p. 715–723, 2011a.

BOCCARDO, E.; LEPIQUE, A. P.; VILLA, L. L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 11, p. 1905–1912, 2010.

BOLPETTI, A. et al. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth **BMC Immunology**, v. 11, n. 27, 2010.

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

BONIZZI, G.; KARIN, M. The two NF- kB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **TRENDS in Immunology**, v. 25, n. 6, p. 280–288, 2004.

BRANCA, M. et al. Upregulation of telomerase (hTERT) is related to the grade of cervical intraepithelial neoplasia , but is not an independent predictor of high-risk human papillomavirus virus persistence, or disease outcome in cervical cancer. **Diagnostic Cytopathology**, v. 34, n. 11, p. 739–748, 2006.

BISHOP, G. A. The power of monoclonal antibodies as agents of discovery: CD40 revealed as a B lymphocyte costimulator. **The Journal of Immunology**, v. 188, p. 4127–4129, 2012.

BRUNI, L. et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents : meta-analysis of 1 Million women with normal cytological findings. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 12, p. 1789–1799, 2010.

BUNTING, K. et al. Genome-wide analysis of gene expression in T cells to identify targets of the NF-κB transcription factor c-rel. **The Journal of Immunology,** v. 178, p. 7097-7109, 2007.

BURG, S. H. VAN DER et al. Association of cervical cancer with the presence of CD4+ regulatory T cells specific for human papillomavirus antigens. **Proceeding of the National Academy Science U.S.A**, v. 104, n. 29, p. 12087–12092, 2007.

CANTLEY, L. C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science**, v. 296, n. May, p. 1655–1658, 2002.

CARPENTER, R. L.; LO, H. STAT3 target genes relevant to human cancers. **Cancers**, v. 6, p. 897–925, 2014.

CAVALLO, F. et al. 2011: The immune hallmarks of cancer. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 60(3), p. 319-326, 2011.

CHATURVEDI, A. K. et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 32, p. 4294–4301, 2011.

CHEN, C. et al. Stat3 activation in human endometrial and cervical cancers. **British Journal of Cancer**, v. 96, p. 591–599, 2007.

CHEN, L.; GREENE, W. C. Shaping the nuclear action of NF-κB. **Nature Reviews Molecular Biology**, v. 5, n. May, p. 392–401, 2004.

CHEN, R. et al. Inflammation, cancer and chemoresistance : taking advantage of the toll-Like receptor signaling pathway. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, p. 93–107, 2006.

CORRIGAN-CURAY, J. et al. T-cell immunotherapy: looking forward. **The American Society of Gene and Cell Therapy,** v. 22, n. 9, p. 1564-1574, 2014.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. December, p. 860–867, 2002.

DILILLO, D. J.; YANABA, K.; TEDDER, T. F. B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. **The Journal of Immunology**, v. 184, p. 4006–4016, 2016.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, p. 7–15, 2005.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, p. F55–F70, 2012.

DUERR, A. et al. Human papillomavirus – associated cervical cytologic abnormalities among women with or at risk of infection with human immunodeficiency virus. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 184, p. 584–590, 2001.

DYSON, N. et al. The human papilloma virus-16 E7 oncoproteins is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, v. 243, p. 934-937, 1989.

FAUSCH, S. C. et al. Human papillomavirus virus-like particles do not activate langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses. **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 3242–3249, 2015.

FONG, T. C.; WU, Y.; KIPPS, T. J. Identification of a promoter element that regulates tissue-specific expression of the human CD80 (B7.1) gene. **The Journal of Immunology**, v. 80, n. 157, p. 4442–4450, 1996.

FRATTINI, M. G.; LAIMINST, L. A. Binding of the human papillomavirus El origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. **Proceeding of the National Academy Science U.S.A**, v. 91, n. December, p. 12398–12402, 1994.

GAIKWAD, S. M.; RAY, P. Non-invasive imaging of PI3K / Akt / mTOR signalling in cancer. **American Jornal of Nuclear Medice Molecular Imaging**, v. 2, n. 4, p. 418–431, 2012.

GEIJERSSTAM, V. et al. Stability over time of serum antibody levels to human papillomavirus type 16. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 1710–1714, 1998.

GHOSH, S.; HAYDEN, M. Celebrating 25 years of NF-kB Research. **immunology Review**, v. 246, n. 1, p. 5–13, 2012.

GHOSH, S.; KARIN, M.; HAVEN, N. Missing Pieces in the NF-kB Puzzle. **Cell**, v. 109, p. 81–96, 2002.

GOODWIN, E. C. et al. Transactivation-competent bovine papillomavirus E2 protein is specifically required for efficient repression of human papillomavirus oncogene

expression and for acute growth inhibition of cervical carcinoma cell lines. **Journal of Virology**, v. 72, n. 5, p. 3925–3934, 1998.

GOODWIN, E. C.; DIMAIO, D. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. **Proceeding of the National Academy Science U.S.A.**, v. 97, n. 23, p. 12513–12518, 2000.

HAGEMANN, T. et al. "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. **Journal of Experimental Medicine,** v. 205, n. 6, p. 1261-1268, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n.5 , p. 646-674, 2011.

HENKEN, F. E. et al. PIK3CA-mediated PI3-kinase signalling is essential for HPV-induced transformation in vitro. **Molecular Cancer**, v. 10, n. 1, p. 71, 2011.

HERDMAN, M. T. et al. Interferon-beta treatment of cervical keratinocytes naturally infected with human papillomavirus 16 episomes promotes rapid reduction in episome numbers and emergence of latent integrants. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 11, p. 2341–2353, 2006.

HOGERLINDEN, M. VAN et al. Squamous Cell Carcinomas and Increased Apoptosis in Skin with Inhibited Rel / Nuclear Factor- κ B Signaling. **Cancer Research**, v. 59, p. 3299–3303, 1999.

HSU, D. et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. **Proceeding of the National Academy Science U.S.A**., v. 89, n. March 1992, p. 1890–1893, 2000.

HUBERT, P. et al. E-cadherin-dependent adhesion of dendritic and Langerhans cells to keratinocytes is defective in cervical human papillomavirus-associated (pre) neoplastic lesions. **Journal of Pathology**, v. 206, n. April, p. 346–355, 2005.

JEON, S.; LAMBERT, P. F. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome to increase stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. **Proceeding of the National Academy Science U.S.A**,, v. 92, n. February, p. 1654–1658, 1995.

JOHNSTON, P. A.; GRANDIS, J. R. Stat3 signaling. **Molecular Intervention**, v. 11, n. 1, p. 18–26, 2011.

JOHUNG, K.; GOODWIN, E. C.; DIMAIO, D. Human papillomavirus E7 repression in cervical carcinoma cells initiates a transcriptional cascade driven by the retinoblastoma family, resulting in senescence. **Journal of Virology**, v. 81, n. 5, p. 2102–2116, 2007.

JONG, A. DE et al. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. **Cancer Research**, v. 64, n. 25, p. 5449–5455, 2004.

KARIN, M.; GRETEN, F. R. NFκB : Linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. September, p. 749–759, 2005.

KLINGELHUTZ, A. J.; FOSTER, S. A.; MCDOUGALL, J. K. Telomerase acttivation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. **Nature**, v. 380, p. 79–82, 1996.

KOBAYASHI, A. et al. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. **Nature**, v. 1, n. 5, 2008.

LARSON, A. W.; LEBIEN, T. W. Cross-linking CD40 on human B cell precursors inhibits or enhances growth depending on the stage of development and the IL costimulus. **The Journal of Immunology**, v. 40, n. 153, p. 584–594, 1994.

LEE, C. M. et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition by LY294002 radiosensitizes human cervical cancer cell lines. **Clinical Cancer Research**, v. 12, p. 250–256, 2006.

LEPIQUE, A. P. et al. HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 13, p. 4391–4401, 2009.
MA, Y. et al. PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. **Oncogene**, v. 19, n. 2739-2744, 2000.

MABUCHI, S. et al. Pretreatment leukocytosis is an indicator of poor prognosis in patients with cervical cancer. **Gynecologic Oncology,** v. 122, n. 1, p. 25-32, 2011.

MARTIN, G. S. Cell signaling and cancer. **Cancer Cell**, v. 4, n. September, p. 167–174, 2003.

MATSUMOTO, Y. et al. Squamous cell carcinoma of the uterine cervix producing granulocyte colony-stimulating factor: a report of 4 cases and a review of the literature. **International Journal of Gynecologic Cancer,** v. 20, n. 3, p. 417-421, 2010.

MAZIBRADA, J. et al. Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis. **Gynecologic Oncology**, v. 108, p. 112–120, 2008.

MENGES, C. W. et al. Human papillomavirus type 16 E7 up-regulates AKT activity through the retinoblastoma protein. **Cancer Research**, v. 66, p. 5555–5559, 2006.

MONACH, P. A. et al. CD4+ and B lymphocytes in transplantation immunity. II. Augmented rejection of tumor allografts by mice lacking B cells. **Transplantation,** v. 55, n. 6, p. 1356-1361, 1993.

MONTAG, D. T.; LOTZE, M. T. Rapid flow cytometric measurement of cytokine-induced phosphorylation pathways [CIPP] in human peripheral blood leukocytes. **Clinical Immunology**, v. 121, p. 215–226, 2006.

MUNN, D. H.; MELLOR, A. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 5, p. 1147–1154, 2007.

MURPHY, T. L. et al. Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kB half-site. **Molecular and Cell Biology**, v. 15, n. 10, p. 5258–5267, 1995.

MURRAY, P. J. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 2623–2629, 2016.

NISHIZAWA, M.; NAGATA, S. Regulatory elements responsible for inducible expression of the granulocyte colony-stimulating factor gene in macrophages. **Molecular and Cellular Biology,** v. 10, n. 5, p. 2002-2011, 1990.

PALLANDRE, J. R. et al. Role of STAT3 in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory lymphocyte generation: implications in graft-versus-host disease and antitumor immunity. **The Journal of Immunology,** v. 179, p. 7593-7604, 2007.

PALEFSKY, J. M. et al. Prevalence and risk factors for anal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus (HIV) – positive and high-risk HIV-negative women. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. February, p. 383–391, 2001.

PARKIN, D. M.; BRAY, F. Chapter 2 : The burden of HPV-related cancers. **Vaccine**, v. 3, n. 24, p. 11–25, 2006.

PATEL, S.; CHIPLUNKAR, S. Host immune responses to cervical cancer. **Gynecologic Cancer**, v. 21, p. 54–59, 2009.

PIERSMA, S. J. et al. High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer. **Cancer Research**, v. 67, n. 1, p. 354–362, 2007.

PINHEIRO, C. et al. Monocarboxylate transporters 1 and 4 are associated with CD147 in cervical carcinoma. **Disease Markers,** v. 26, p. 97-103, 2009.

PORE, N. et al. Akt1 activation can augment hypoxia-inducible factor-1 A expression by increasing protein translation through a mammalian target of rapamycin – independent pathway. **Molecular Cancer Research**, v. 4, n. July, p. 471–480, 2006.

QIN, Z. et al. B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. **Nature Medicine,** v. 5, n. 6, p. 627-630, 1998.

ROMAGNOLI, G. G. et al. Dendritic cell-drived exosomes may be a tool for cancer immunotherapy by converting tumor cells into immunogenic targets. **Frontiers in Immunology,** v. 5, p. 1-5, 2015.

ROMANCZUK, H.; HOWLEY, P. M. Disruption of either the EI or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. **Proceeding of the National Academy Science U.S.A**,, v. 89, n. April, p. 3159–

3163, 1992.

RONCO, L. V et al. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes and Development**, v. 12, p. 2061–2072, 1998.

RUSH, J. S.; HODGKIN, P. D. B cells activated via CD40 and IL-4 undergo a division burst but require continued stimulation to maintain division , survival and differentiation. **European Journal of Immunology**, v. 31, p. 1150–1159, 2001.

RYAN, A. E. et al. Targeting colon cancer cell NF-κB promotes an anti-tumor M1-like macrophage phenotype and inhibits peritoneal metastasis. **Oncogene,** v. 34, n. 12, p. 1563-1574, 2015.

SCHEFFNER, M.; WERNESS, B. A.; HUIBREGTSE, J. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, v. 63, n. December, p. 1129–1136, 1990.

SCHLECHT, N. F. et al. Persistent human Papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of American Medical Association**, v. 286, n. 24, p. 3106–3114, 2001.

SEITZ, C. S. et al. Alterations in NF-kB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kB. **Proceeding of the National Academy Science U.S.A**,, v. 95, n. March, p. 2307–2312, 1998.

SEVER, R.; BRUGGE, J. S. Signal transduction in cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, 2015.

SHEHATA, M. F. Rel/Nucelar factor-kappa B apoptosis pathways in human cervical cancer cells. **Cancer Cell International**, v. 5, n. 10, p. 1–13, 2005.

SHUKLA, S. et al. Functional Regulatory Role of STAT3 in HPV16-mediated cervical carcinogenesis. **PLOS One**, v. 8, n. 7, 2013.

SILINS, I. et al. Evaluation of antibodies to human papillomavirus as prognostic markers in cervical cancer patients. **Gynecologic Oncology**, v. 85, p. 333–338, 2002.

SOLOMON, D. et al. The 2001 Bethesda system terminology for reporting results of cervical cytology. **Journal of American Medical Association**, v. 287, n. 16, p. 2114–2119, 2002.

SON, Y.H. et al. Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. **Journal of Cardiovascular Pharmacology,** v. 51, n. 1, p. 71-77, 2008.

STANLEY, M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. **Gynecologic Oncology**, v. 109, n. 2 SUPPL., p. 15–21, 2008.

STANLEY, M. HPV - immune response to infection and vaccination. **Infectious Agents and Cancer**, v. 5, n. 1, p. 19, 2010.

STEGEMAN, H. et al. Activation of AKT by hypoxia : a potential target for hypoxic tumors of the head and neck. **BMC Cancer**, v. 12, p. 2–10, 2012.

STONE, S. C. et al. HPV associated tumor cells control tumor microenvironment and leukocytosis in experimental models. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 2, n. 2, p. 63–75, 2014a.

STONE, S. C. et al. HPV16-associated tumors control myeloid cell homeostasis in lymphoid organs , generating a suppressor environment for T cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 96, n. October, p. 619–631, 2014b.

TAKEMOTO, S. et al. Expression of activated signal transducer and activator of transcription-3 predicts poor prognosis in cervical squamous-cell carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 6, p. 967–972, 2009.

TAN, T.; COUSSENS, L. M. Humoral immunity, inflammation and cancer. **Current Opnion in Immunology**, v. 19, p. 209–216, 2007.

TINDLE, R. W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nature Reviews Cancer** v. 2, n. January, p. 59-64, 2002.

TRIMBLE, C. L. et al. Human papillomavirus 16-associated cervical intraepithelial neoplasia in humans excludes CD8 T cells from dysplastic epithelium. **The Journal of Immunology**, v. 185, p. 7107–7114, 2010.

TRINCHIERI, G. Cancer and inflammation : An old intuition with rapidly evolving new concepts. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 677–706, 2012.

UM, S. et al. Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. **Cancer Letters**, v. 179, p. 205–212, 2002.

VILLIERS, E. DE et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, p. 17–27, 2004.

VISSER, K. E. DE; KORETS, L. V; COUSSENS, L. M. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. **Cancer Cell**, v. 7, n. May, p. 411–423, 2005.

VIVANCO, I.; SAWYERS, C. L. The Phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT Pathway in human cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. July, p. 489–501, 2002.

WALBOOMERS, J. M. M. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worlwide. **Journal of Pathology**, v. 189, n. May, p. 12–19, 1999.

WANG, Y. et al. STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor. **Proceeding of the National Academy Science U.S.A.**, v. 2, n. 22, p. 16975–16980, 2013.

WEI, L. et al. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. **Oncogene**, v. 22, n. 7, p. 1517–1527, 2003.

WELTERS, M. J. P. et al. Detection of human papillomavirus type 18 E6 and E7-specific CD4 1 T-helper 1 immunity in relation to health versus disease. **International Jounal of Cancer**, v. 956, n. September, p. 950–956, 2006.

WILLIAMS, N. L. et al. Adenocarcinoma of the cervix: should we treat it differently? **Current Oncology Reports**, v. 17, n. 4, p. 17, 2015.

WU, M. Y.; KUO, T. Y.; HO, H. N. Tumor-infiltrating lymphocytes contain a higher proportion of FOXP3+ T lymphocytes in cervical cancer. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 110, p. 580-586, 2011.

YANG, S. et al. The role of p-STAT3 (ser727) revealed by its association with Ki-67 in cervical intraepithelial neoplasia. **Gynecologic Oncology**, v. 98, p. 446–452, 2005.

YOSHIMURA, S. et al. Effective antigen presentation by dendritic cells is NF- κ B dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. **International Immunology**, v. 13, n. 5, p. 675–683, 2001.

YU, H.; KORTYLEWSKI, M.; PARDOLL, D. Crosstalk between cancer and immune cells : role of STAT3 in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 41–51, 2007.

ZHONG, H.; VOLL, R. E.; GHOSH, S. Phosphorylation of NF-kB p65 by PKA Stimulates Transcriptional Activity by Promoting a Novel Bivalent Interaction with the Coactivator CBP / p300. **Molecular Cell**, v. 1, p. 661–671, 1998.

ZIEGERT, C. et al. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. **Oncogene**, v. 22, n. April, p. 3977–3984, 2003.

ZOU, G.; HU, W. LIGHT Regulates CD86 Expression on Dendritic Cells Through NF-k B , but not JNK / AP-1 Signal Transduction Pathway. **Journal of Cellular Physiology**, v. 205, n. February, p. 437–443, 2005.

APÊNDICE

A - Manuscrito ROSSETTI, 2016

B lymphocytes as antigen presenting cells: a novel possibility for anti-tumor therapy.

Renata Ariza Marques Rossetti[1], Luciana Benevides[2], Luisa Lina Villa[3], Ana Paula Lepique[1§]

[1]Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 1730, room 136, São Paulo, 05508-900, Brazil.

2 Department of Immunology and Biochemistry, School of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo. Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirao Preto, 14049-900, Brazil.

3 Cancer Institute of Sao Paulo State, School of Medicine, University of Sao Paulo. Av. Dr. Arnaldo, 251, 8th floor, São Paulo, 01246-000, Brazil.

§**Corresponding author**: Ana Paula Lepique

Av. Prof. Lineu Prestes, 1730, room 136, São Paulo, 05508-900, Brazil, email alepique@icb.usp.br, phone +5511-30917376, fax +5511-30917224.

Running title: B lymphocytes as therapeutic tool against cancer.

Keywords: mouse tumor model, anti-CD40, B lymphocytes, T lymphocytes, anti-tumor immune responses.

Financial support: this work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) funded this work, through processes 04/00749-2 and 2010/20010-4, coordinated by APL. RAMR has a Sao Paulo Research Foundation graduate fellowship, 11/11121-8. LLV and APL were supported by intramural funds from Ludwig Institute for Cancer Research, Sao Paulo branch, where this project was initiated.

Conflict of interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Word count: 4714; **Figures**: 7

ABSTRACT

Virtually all leukocytes have a described role in tumor immunology. Among them, B lymphocytes are one of the least understood. Most of the researchers studying the role of this population in cancer agree that these cells display a pro-tumoral effect, and depletion of these cells should be beneficial to tumor hosts.

We have previously shown, using the TC-1 tumor model, an increase in B cell frequency in the peripheral lymph nodes of tumor bearing mice, in an IL-10 dependent mechanism. Here we show a new therapeutic possibility, where B lymphocytes were activated *ex vivo* with agonist anti-CD40 antibody and infused, together with T lymphocytes from tumor bearing donors, into tumor bearing recipients. In the recipients, they significantly inhibited tumor growth, in a MHC-II dependent mechanism. Interestingly, B lymphocytes did not need to be pre-loaded with tumor antigens, but T lymphocytes had to be previously exposed to tumor antigens in order to mount anti-tumor responses. Our model used RAG1$^{-/-}$ mice, taking advantage of lymphocyte homeostatic proliferation post lymphocyte transplant. A situation that may be translated to cancer patients exposed to chemo or radiotherapy.

B lymphocytes are easy to isolate, do not need to be differentiated from a precursor population *ex vivo*, and, are less resistant to activation than tumor associated macrophages. Therefore, we suggest that B lymphocytes could be used as a tool for immunomodulation of T cell responses toward tumor antigens.

INTRODUCTION

Interactions between tumor cells and the host have been under intense investigation in the last decades. Researchers have been trying to understand how tumor cells escape the immune system and how to boost or modulate immune responses against tumors. Dendritic cells and T lymphocytes are the main targets in the current efforts against tumors and cancer. Methods vary from *ex vivo* activation and cell transfer to vaccines [1,2,3]. Depletion of suppressive or regulatory populations has also been explored, as well as the use of immunomodulatory drugs as Ipilimumab, a neutralizing antibody against CTLA-4 [4].

B lymphocytes are usually regarded as a pro-tumoral population. These cells can promote tumor progression through IgG secretion and activation of inflammatory cells, causing chronic inflammation [5,6]. B cells can also secrete cytokines to inhibit T cell activity, promote angiogenesis and cell survival within the tumor microenvironment or present tumor antigens generating regulatory responses [7]. Indeed, depletion of B lymphocytes enhances anti-E7 vaccine efficiency in the TC-1 experimental model [8], and inhibits a breast murine tumor model, inhibiting regulatory T cell expansion [9]. In this sense, most anti-tumor therapies involving B lymphocytes predict depletion or inhibition of this population. Drugs like Rituximab, a humanized anti-CD20 antibody and Ibrutinib, an inhibitor of Btk (Bruton's tyrosine kinase), are possible candidates for such therapies [7,10,11].

Our laboratory has been investigating local and systemic tumor effects on the immune system. The TC-1 cell line has been used as model for immunotherapy against HPV16 antigens, once it expresses E6 and E7 oncoproteins from HPV16 [12,13,14]. Using TC-1 cells, we have previously described the presence of M2-like tumor associated macrophages, TAM, as the main tumor infiltrating inflammatory population [15], a significant increase in the frequency of myeloid cells in the spleen [16] and a significant increase in the frequency and absolute numbers of B lymphocytes in the peripheral lymph nodes of tumor bearing mice

[17]. Some of these effects, including accumulation of B lymphocytes in the peripheral lymph nodes, were mediated by IL-10, a cytokine expressed mainly by TAM [15,17].

As we had previously observed that TAM were resistant to treatment with LPS and IFNγ [15], we decided to investigate the possibility of modulating B lymphocytes in tumor bearing mice, raising the hypothesis that these cells could be used as antigen presenting cells to activate anti-tumor T cell responses. We had several reasons to pursue this venue: a) dendritic cells, which are the best activators of naïve T cells, are also targets of the tumor environment, displaying reduction in maturation and antigen presentation efficiency [18] and up regulation of molecules as Indoleamine 2,3 oxigenase (IDO), which induces regulatory phenotype in T cells [19], moreover, for therapy, these cells are usually obtained from differentiated monocytes in long and high cost procedures; b) B lymphocytes are easy to obtain from peripheral blood and do not need any maturation steps; c) there is high probability of the co-existence of T cells that recognize tumor antigens presented by B lymphocytes, generating secondary T cell responses; d) B lymphocytes, as other cells in the immune system, are malleable and can be activated under certain conditions, for example, with CD40 agonists, which can increase their antigen presentation potential [20].

We have taken B lymphocytes from tumor bearing donors, activated *ex vivo* with agonist anti-CD40, mixed with T lymphocytes also from tumor bearing donors and transplanted into RAG1$^{-/-}$ mice previously injected with tumor cells. We found that treated B cells up regulated MHC-II and co-stimulatory molecules expression, activated T cells and inhibited, together with T cells, tumor growth *in vivo*, in a MHC-II dependent mechanism.

Our work shows a new strategy in anti-cancer immunotherapy, possibly cheaper and easier to achieve than other protocols currently in test.

MATERIAL AND METHODS

Antibodies: the same clones were used for all types of experiments. From BD Biosciences (Carlsbad, CA): anti-CD45 (clone 30-F11), anti-CD4 (clone GK1.5), anti-CD8 (clone 53-6.7), anti-CD40 (clone HM40-3), CD80 (clone 16-10A1), CD86 (clone GL1), anti-CD19 (clone 1D3), anti-CD137 (clone 1AH2), anti-CD154 (clone MR1), anti-Granzyme B (clone 1666), anti-IL10 (clone JES5-16E3); from eBiosciences (San Diego, CA): anti-FoxP3 (clone FJK-16s) and anti-MHC-II (clone M5/114.15.2). When the available antibody was conjugated with biotin, instead of a fluorophore, we used streptavidin conjugated with Alexa 488 or Alexa 594 (Life Techologies, Carlsbad, CA). Antibodies against signaling proteins were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA), they were used with the secondary anti-rabbit antibody conjugated with FITC or APC for flow cytometry (Cell Signaling, Danvers, MA) or with horseradish peroxidase for Western blottings (GE Healthcare, UK).

Cell lines: TC-1 cell line was generated by transduction of primary epithelial cells from C57BL/6 mice with Human Papillomavirus type 16, HPV16, E6 and E7 oncogenes and Ej-ras [12]. These cells have been kindly donated by Prof. Wu (John Hopkins Hospital, Baltimore, MA) and have been maintained in our laboratory in RPMI supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 400 μg/ml Neomycin, the resistance marker for the retroviral vector used for oncogene transduction. TC-1 cells were used to challenge mice immunized with HPV16 E6 and E7 peptides, as described bellow. As in all cases, vaccine protected against TC-1 growth in mice, by which, we assume the cells maintain the HPV antigens. Moreover, these cells have been previously tested by Western blotting against E7 and RT-PCR with primers for HPV16 E6 and E7.

For tumor cell injections, TC-1 cells were detached from the substrate with trypsin, counted and cell numbers were adjusted for 10^5 or $5x10^4$ cells to be injected per mouse. Cells to be injected were washed twice in Phosphate Buffered Saline, PBS^{++} (PBS supplemented with

1mM $CaCl_2$, 0.5mM $MgCl_2$), and ressuspended in PBS^{++} to be injected in a final volume of 100 μl/mouse.

HeLa cell line was obtained from American Culture Type Collection (Manassasm VA) in 2013 by the laboratory of Prof. Villa, at the Cancer Institute of Sao Paulo State. These cells were maintained in 10% FBS, RMPI in Prof. Lepique's laboratory at the University of São Paulo.

Mice: Female C57BL/6, $RAG1^{-/-}$ (B6.129S7-$Rag1^{tm1Mom}$/J, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) and BKO (B6.129S2-$Ighm^{tm1Cgn}$, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) were maintained under specific free pathogen conditions, SPF, in the mouse facility of the Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo. MHC-$II^{-/-}$ mice (B6.129S2-$Ciita^{tm1Ccum}$/J) were kept under SPF conditions in the mouse facility at the School of Medicine of Ribeirao Preto. Mice received water and food *ad libidum*, and were kept in light cycles of 12 hours. Protocols involving animal experimentation were approved by the institutional Committee for Animal Use, under the process number 2010/151.

Immunization: 5 weeks female C57BL/6 mice were treated with two intraperitoneal injections of 10 μg of a mix of peptides $E6_{48-57}$ and $E7_{43-77}$ (Genscript, Piscataway, NJ) combined with 100μg of ODN1826 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) spaced by 15 days. As control, for every immunization, at least one mouse was challenged with TC-1 cells. In all cases, there was 100% protection, indicating that immunization was effective and that TC-1 cells maintained through the years the E6 and E7 antigens.

Cell and tissue preparations: lymph nodes, spleens and tumors were harvested directly into sterile ice cold buffer 1X HBSS, 15 mM HEPES pH 7.4, 5% FBS, 0.5U/ml DNAse 1 (MTH). Lymph nodes and spleens were mechanically dissociated. Spleen red cells were lysed in hypotonic buffer. Tumors were split, one fragment frozen in TissueTek OCT compound

(Sakura Finetek, NL), and the other fragment digested in 1mg/ml Collagenase I and IV for 30 to 45 min at 37°C, at 1300 rpm.

Cell sorting: B lymphocytes were isolated from peripheral lymph nodes of naïve or tumor bearing donors by negative selection using pan-B cell isolation kit and LS columns (Miltenyi Biotec, DE). T lymphocytes were isolated from peripheral lymph nodes and spleens from naïve, tumor bearing or immunized donors by negative selection using the pan-T cell isolation kit and LS columns (Miltenyi Biotec, DE). TAM were enriched from tumors by positive selection with anti-CD45 Miltenyi Biotec beads and LS columns. In all cases, we were able to obtain 98% cell purity after sorting.

Anti-CD40 treatment: isolated B lymphocytes or TAM from donors were ressuspended in 10% FBS RPMI to a final concentration of 10^6 cells/100 ml of medium containing or not 0.1 μg/ml anti-CD40 (HM40-3, functional grade, BD Bioscience, Carlsbad, CA). Cells were incubated in these conditions for approximately 14h at 37°C, then washed twice with PBS and ressuspended in PBS^{++} at a concentration of 1 to 3 million cells per mouse. We have done intravenous and intraperitoneal lymphocyte transplants with similar results.

Chimera set up: B and T lymphocytes, or TAM and T lymphocytes, were mixed in groups of anti-CD40 stimulated or control B cells from naïve or tumor bearing donors and T cells from naïve or tumor bearing donors. T cells from immunized donors were used only as positive controls for tumor growth inhibition. Lymphocytes were transferred into 5 week old female $RAG1^{-/-}$ mice injected five days before transfer with $5x10^4$ TC-1 cells. The protocol for these experiments is shown in **Fig. 1a**. Recipient mice were observed every 2 to 3 days for tumor measurements with a caliper. The largest and smallest tumor diameter were taken and tumor volume was calculated with the formula $v=(d^2*D)/2$, where v is the volume, d the smallest tumor diameter and D the largest tumor diameter. When any of the mice reached a maximum tumor diameter of 1.2 cm, we stopped the tumor growth kinetics and harvested tumors,

lymph nodes and spleen for evaluation of the tumor inflammatory infiltrate and presence of B and T lymphocytes in secondary lymphoid organs.

Immunofluoresce: 5 μm tumor cryo-sections were fixed in acetone/methanol (2:1) solution, at room temperature, for 5 min, air dried and rehydrated in 3 washes of PBS, 2 min each. Tissue sections were then blocked with 0.1 μg/ml FcBlock in 5% FBS/PBS solution for 30 min, room temperature. The blocking solution was replaced by antibodies against surface markers conjugated to Alexa 488 or 594 in 5%FBS/PBS and incubated for 30 min, room temperature. In some cases, primary antibodies were biotinylated, and an extra staining step with Alexa conjugated streptavidin was performed. Intracellular staining followed the same procedure, except for the addition of 0.5% Tween 20 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) to 5% FBS/PBS. Slides were mounted with Vectashield mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Images were acquired with a BX61 Olympus microscope, using the software provided with the camera (Olympus, JP).

T cell activation assay: T cells from tumor bearing mice were labeled with CellTrace Violet (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA), according to the manufacturer's instructions. T cells we incubated in a 1:1 ratio with activated or control B lymphocytes or with TAM for 4 days. By the end of this period, cells were harvested and stained with antibodies against markers for T cell activation and analyzed by flow cytometry.

Flow cytometry analyzes: for cell surface antigens, single cell suspensions were incubated with previously titrated antibodies in MTH for 20 min, washed and ressuspended in MTH for analyzes. For intracellular antibody staining, cells were fixed in 2% buffered formaldehyde for 10 min at room temperature, washed with PBS, permeabilized with 90% methanol for 10 min at -20°C, washed with PBS and incubated with antibodies against intracellular antigens in MTH for 20 min, washed with 0.05% Tween 20 in PBS and ressupended in PBS for

analyzes [21]. Labeled cells were analyzed in a FACSCalibur or FACSCanto (BD Biosciences, Carlsbad, CA), at least 30000 events were acquired per sample.

Western blotting: cell lysates were prepared with RIPA buffer, 50 μg/sample for sorted cells and 25 μg/sample for HeLa cells, and were fractioned by SDS-Page and transferred to a PVDF Nylon membrane (GE Healthcare, UK). Membranes were briefly activated with methanol, blocked in 5% skim milk in 0.5% Tween 20/PBS (PBS-T) for one hour, before incubation overnight at 4°C in a rocking platform with specific antibodies in 5% skim milk in PBS-T. Membranes were then washed 3 times in PBS-T and incubated with anti-rabbit secondary antibody (GE Healthcare, UK) for one hour. After washing, membranes were incubated with ECL chemiluminescence reagent (GE Healthcare, UK) to detect antigen/antibody complexes. X-ray films were exposed to the membranes for different time periods to guarantee at least one exposition within linear detection range. Membranes were first incubated with anti-phosphorylated protein antibodies, then striped and incubated with antibodies that recognized all forms of the target proteins. Images were acquired from the exposed X-ray films using a HP PSC1500 scanner. RIPA lysis buffer: 25mM Tris HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, supplemented with cocktails of protease and phosphatase inhibitors (Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

Statistical analysis: tumor growth kinetics between different experimental groups were compared by the non-parametric Mann-Whitney U test; comparison of B cell phenotype, cell signaling expression or T cell activation between control and anti-CD40 treated cells was tested by Student's t-test. In all cases, we considered $p<0.05$ as indicative that differences between groups were statistically significant.

RESULTS

T lymphocytes from tumor bearing mice can partially inhibit tumor growth.

The importance of the immune system in controlling tumor growth is well documented [22,23]. C57BL/6 mice bearing TC-1 tumors mount anti-tumor responses. We observed evidence of this response comparing TC-1 tumor growth in C57BL/6 and RAG1$^{-/-}$ mice injected with $5x10^3$ TC-1 cells. In both cases, tumors grew and eventually we had to sacrifice all mice. However, in C57BL/6 mice, tumor growth was delayed by a 2.7±0.4 week interval compared to RAG1$^{-/-}$ mice, indicating that although not efficient, there was immune response against TC-1 cells in immunocompetent mice. Several factors may suppress anti-tumor T cell responses, among them myeloid derived suppressor cells, macrophages and regulatory T cells. In the TC-1 model, we have described an immunosuppressive role for macrophages that infiltrate the tumors [15], as well as myeloid antigen presenting cells in the spleen [16]. However, we were intrigued with the increase in B lymphocyte cell numbers in the peripheral lymph nodes of tumor bearing mice [17]. Therefore, we sorted T cells from peripheral lymph node suspensions from naïve, tumor bearing and immunized donors to investigate their potential in inhibiting tumor growth. As shown in **Fig. 1b**, T cells from tumor bearing donors, T(T), are significantly more efficient than T cells from naïve mice, T(N), to inhibit tumor growth. On the other hand, when compared to T cells from immunized donors, T(I), T cells from tumor donors, T(T), we significantly less efficient to protect the recipient mice against tumor growth. This result indicated that indeed T cells in the tumor host could recognize and respond to tumor antigens, even if in a limited fashion.

TC-1 tumors do not induce regulatory B cell responses in the host.

As B lymphocytes are the most abundant cells in the lymph nodes of tumor bearing mice, we decided to investigate if they displayed a regulatory phenotype, which could influence anti-tumor T cell responses. We observed that a negligible percentage of the B lymphocytes in the

peripheral lymph nodes of tumor bearing mice expressed IL-10, similar to what we observed in B lymphocytes from naïve mice (**Fig. 1c**). The same was observed regarding Foxp3 expression. This observation was also true, for cells treated with agonist anti-CD40 (**Fig. 1c, middle panels**). As controls, we showed expression of Foxp3 and IL-10 in the CD4 T cell population and myeloid antigen presenting cells in the lymph nodes (**Fig. 1c**, right panels, top and bottom, respectively).

B lymphocytes may be immunomodulated to activate T lymphocytes.

Experimental evidence suggests that B lymphocytes favor tumor progression, through promotion of chronic inflammation, for example [7]. In our model, B lymphocytes were the most frequent population in the lymph nodes of TC-1 tumor bearing mice [17]. Interestingly, total lymph node cell suspensions from naïve or tumor bearing mice had the same effect on tumor growth in the recipients (data not shown). In both cases, tumors grew similarly to the tumors in recipients transplanted with isolated T cells from naïve donors. To test whether B lymphocytes could impair anti-tumor T cell activity, we performed experiments in BKO mice in parallel with C57BL/6 mice, where we injected 10^5 TC-1 cells. Growth kinetics were the same in both mouse strains (data not shown), indicating that in these conditions, B lymphocytes had no significant effect on tumor growth or T cell activity.

As B lymphocytes were abundant in our model [17], displayed no indication of regulatory phenotype, and are professional antigen presenting cells and can activated secondary responses in T lymphocytes, we decided to modulate their phenotype aiming to activate T lymphocyte responses. In order to do that, we treated sorted B lymphocytes from naïve, B(N), and tumor bearing donors, B(T), with agonist anti-CD40 for 14 to 16 hours *ex vivo* and then transplanted these cells together with T lymphocytes from tumor bearing donors, T(T), into $RAG1^{-/-}$ mice previously injected with TC-1 tumor cells, according to the protocol shown in **Fig. 1a**. In **Fig. 2a-b**, we show the tumor growth kinetics in these recipient mice.

We displayed, in all graphs, the tumor growth curve from recipients transplanted with tumor bearing donor T cells, T(T), for comparison (**Fig 1b**). In both cases, transplant of mice with anti-CD40 treated B lymphocytes together with T cells, significantly inhibited tumor growth in comparison with recipients transplanted with only T cells or T cells together with untreated B lymphocytes. Interestingly, the reconstitution of recipients with untreated B lymphocytes from tumor bearing mice with T cells, did not enhance tumor growth in comparison with T cells alone, (**Fig. 2b**), supporting our previous data indicating that, in this model, B lymphocytes do not interfere with anti-tumor T cell activity.

As other antigen presenting cells can be activated by anti-CD40, we tested the effect of this agonist directly in the recipient mice. In **Fig. 2c**, one can observe that a single intraperitoneal injection of anti-CD40 alone, had no effect whatsoever on tumor growth in RAG1$^{-/-}$ mice, but when combined with T(T) transplant, it significantly inhibited tumor growth, T(T)aCD40 (gray solid curve). B lymphocytes alone, treated, B+(T), or control B-(T), did not affect tumor growth. Hence, T lymphocytes were necessary for tumor growth control.

MHC-II and antigen previous exposure are necessary for protection against tumor growth.

As demonstrated in **Fig. 2a-b**, activated B lymphocytes from naïve mice B+(N), were more efficient than activated B lymphocytes from tumor bearing donors, B+(T), in the way that the transplant of the first ones together with T lymphocytes delayed tumor detection in 5 days compared to the second (detection of tumors in day 19 and 14, respectively). On the other hand, naïve T lymphocytes could not control tumor growth, even when transplanted together with anti-CD40 treated B lymphocytes (**Fig. 3a**). In fact the opposite was true, we observed an acceleration in tumor growth in chimeras that were transplanted with activated B lymphocytes and T cells from naïve donors, T(N)B+(T). This result suggests that activated B lymphocytes may be working as antigen presenting cells to T lymphocytes, triggering secondary T cell responses. To test this hypothesis, we used B lymphocytes from MHC-II$^{-/-}$

(**Fig. 3b**), which would be unable to present antigens to CD4 T cells. Indeed, transplant of activated MHC-II$^{-/-}$ B lymphocytes (IIKO B+), together with T lymphocytes from tumor bearing donors, did not protect recipients from tumor growth. Together these results indicate that CD40 activation increased B lymphocyte capacity to trigger secondary T cell responses to inhibit tumor growth.

Anti-CD40 triggers cell signaling and induces expression of antigen presenting proteins in B lymphocytes and activates T cell responses.

CD40 signaling is essential for B lymphocyte activation leading to immunoglobulin isotype switch, cell proliferation, cell survival, expression of co-stimulatory molecules and cytokines [20]. Several signaling pathways are triggered by this receptor, including NFκB, STAT3, Erk, PI3K. In **Fig. 4a**, we show, that B lymphocytes from naïve and tumor bearing mice displayed no basal levels of Akt phosphorylation (PI3K effector protein), and very low basal levels of Erk phosphorylation. Anti-CD40 treatment increase Akt phosphorylation in B lymphocytes from tumor bearing mice (**Fig. 4a**, arrow), but not in B lymphocytes from naïve donors. We could confirm the increase of Akt phosphorylation in this population by anti-CD40 treatment by flow cytometry (**Fig. 4b**, middle plot). Anti-CD40 treatment increased Erk phosphorylation in both sets of cells, again, confirmed by flow cytometry (**Fig. 4b**, right plot). STAT3 however, displayed higher expression and phosphorylation levels in B lymphocytes from naïve mice than from tumor bearing mice. Anti-CD40 treatment did not alter the status of STAT3 expression or activation in both cases. We used HeLa and PMA treated HeLa cells as positive controls for the reactions with the antibodies used in the Western blottings shown in **Fig. 4a**. Although we were not successful in detecting NFκB by Western blotting, we observed increased NFκB phosphorylation upon anti-CD40 treatment in B lymphocytes from tumor bearing mice (**Fig. 4b**). Moreover, we observed a significant increment in the percentage of B lymphocytes with high expression of CD86 and MHC-II in

anti-CD40 treated cells (**Fig. 5a**). Accordingly, in co-cultures with T lymphocytes from tumor bearing donors, anti-CD40 treated B lymphocytes stimulated T cell proliferation in response to specific tumor antigens (HPV16 peptides E6 and E7) and activation of T cells (**Fig. 5b**), measured through expression of CD137 and CD154 (**Fig. 5c**).

Accordingly, we found activated CD4 T lymphocytes (CD4+CD154+), Granzyme B secreting cells, CD4, CD8 and regulatory T lymphocytes in the tumor microenvironment of recipients transplanted with activated B lymphocytes and T lymphocytes from tumor bearing donors, T(T)B+(T). Interestingly, although these experiments were not quantitative, we could observe that there was a higher frequency of activated T cells, $CD154^{+}$ and Granzyme B^{+} than regulatory T cells in these tumors (**Fig. 6**).

TAM cannot be modulated by anti-CD40 to activate T cells.

As shown in **Fig. 2b**, treatment of recipient mice with one dose of anti-CD40 together with T cell transplant had significant impact on tumor growth. We wondered whether TAM could be modulated by anti-CD40 treatment. In TAM ($CD45^{+}$), we observed constitutive phosphorylation of STAT3, Akt and Erk (**Fig. 4a**). On the other hand, we have previously shown that TAM displays low NFκB phosphorylation levels [16]. TAM treated with anti-CD40 for 14 to 16 hours were not able to activate T cells *in vitro* (**Fig. 7**) or upregulate co-stimulatory molecules expression (data not shown). We did one experiment transplanting control or anti-CD40 treated TAM together with T lymphocytes from tumor bearing donors into $RAG1^{-/-}$ mice, and observed no differences in tumor growth between mice transplanted with control or treated TAM, or controls transplanted only with T lymphocytes from tumor bearing donors (data not shown).

DISCUSSION

This work brings a new possibility in cancer treatment. Instead of using cost and time consuming dendritic cells loaded with tumor antigens, we propose the use of B lymphocytes. There are advantages to this possibility, but also some potential limitations that should be taken into account. In terms of advantages, in humans, B lymphocytes and monocytes have similar frequencies in peripheral blood. However, B lymphocytes, according to our data, can be readily used, while monocytes must be differentiated into dendritic cells and these activated, in a process that lasts seven days, and require treatment with IL-4, GM-CSF, and TNFα or LPS, for activation [24]. Moreover, there is the necessity of loading dendritic cells with tumor antigens, if activation of naïve T cell responses are to be achieved. In our model, it seems that secondary activation of T cells could be enough for delaying tumor growth. It is important to emphasize that we transplanted lymphocytes to the recipient only once, without any antigen loading or immunization of donors. On the other hand, when we transplanted lymphocytes, tumor cells had been previously injected, but tumors were not yet detected, therefore, a very low tumor load was present in the system. In patients, multiple transplants would be possible, depending on the protocol to be adopted. This brings us to one of the requirements in our proposed system. We used RAG1$^{-/-}$ mice on our study. In this system, when lymphocytes are transplanted they enter the proliferation program known as homeostatic proliferation [25]. Patients that receive chemo or radiotherapy are, temporarily, immunosuppressed, presenting niches in secondary lymphoid organs, where lymphocytes can proliferate [26]. Ablative therapies also may deplete regulatory T cells or even suppressor myeloid cells [27,28]. Our idea would be to take advantage of these time windows to transplant B and T lymphocytes from the patient, after B activation *in vitro*. This strategy has been used for many years to transplant activated T lymphocytes into cancer patients [29]. We have not yet tested transplant into mice treated with radio or chemotherapy, because these

would obviously have a direct effect on tumor cells and we wanted to study lymphocyte effects specifically.

An interesting observation in this study is that there was no necessity of addition of tumor antigens to promote T cell activation. As the TC-1 tumor model is well defined and carries known tumor antigens, it was easy to evaluate the generation of specific anti-tumor responses. We have used B lymphocytes from naïve and tumor bearing donors with similar results *in vivo*. This result indicated that the host had enough circulating antigens, that transplanted B lymphocytes could process and present these antigens to T cells in order to mount anti-tumor responses. However, T lymphocytes had to necessarily been previously exposed to tumor antigens. The combination of T lymphocytes from naïve donors with activated B lymphocytes, resulted in faster tumor growth, probably through suppression of the existent, although inefficient T cell response against TC-1 tumors. We did not investigate the mechanism behind this result.

We did observe that in our model, B cells act as antigen presenting cells, so that lack of MHC-II inhibits T cell activation. Indeed, we observed tumor infiltration by activated CD4 T cells and Granzyme B positive cells, indicating that both CD4 and CD8 T cells responses were activated in our system.

Our work does not contradict the work of other groups showing the role of B lymphocytes as tumor promoters. In some of these cases, the studies focus on tumor progression, where chronic inflammation has a clear role in the malignant lesion development [7], which is not our case. In our model, we injected already transformed tumor cells, aiming to mimic what would happen in a patient already with cancer. On the other hand, we did not try to titer down the number of TC-1 cells injected in BKO mice to reach a level where the presence of B cells could alter anti-tumor responses, as observed in other tumor models [30]. Accordingly, one of our observations was that, differently from other tumor models [31], the

B lymphocytes that accumulated in the lymph nodes of TC-1 tumor bearing mice did not express Foxp3 or IL-10 expression, indicating that these were not regulatory B cells, which might account to the malleability of these cells to the anti-CD40 stimulus. Together, these results indicated that the increase of B lymphocytes in our model is a secondary effect of tumor growth, instead of a causal effect. It was interesting to observe that B lymphocytes from naïve and tumor bearing mice had different signaling activation status. We expected to find STAT3 expression and phosphorylation in the lymphocytes from tumor bearing mice, due to the IL-6 expression by tumor cells [16]. It is possible that the chronic stimulus generated in the tumor microenvironment may have downregulated STAT3 expression, through for example, induction of miRNAs [32,33]. We do not know, at this point, if this is indeed happening in our model, However, this might be an explanation for differences in anti-tumor responses observed in mice transplanted with B lymphocytes from naïve and tumor bearing mice.

Finally, we observed that TAM are resistant to anti-CD40 treatment. However, other antigen presenting cells in the host responded to anti-CD40 in an efficient way. Clinical trials using agonist anti-CD40 have been reported, including the use of immunomodulators to increase the efficiency of B lymphocytes as antigen presenting cells, or in combination with chemotherapy [34,35].

This manuscript brings a new approach to be considered in tumor immunotherapy. It would be necessary to consider different types of tumor, tumor stage and other variants that may lead to different results. However, this protocol could be used together other ones, as vaccines, to potentiate immune responses against tumors.

REFERENCES

1. Rosenberg SA, Dudley ME. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Oct 5;101 Suppl 2:14639-45.

2. Kenter GG, Welters MJ, Valentijn AR, Lowik MJ, Berends-van der Meer DM, Vloon AP. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. N Engl J Med. 2009 Nov 5;361(19):1838-47.

3. Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, Melief CJ, Ildstad ST, Kast WM, Deleo AB, et al. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. Nat Med. 1995 Dec;1(12):1297-302.

4. Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Mar 2;107(9):4275-80.

5. de Visser KE1, Korets LV, Coussens LM. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. Cancer Cell. 2005 May;7(5):411-23.

6. Andreu P1, Johansson M, Affara NI, Pucci F, Tan T, Junankar S, Korets L, Lam J, Tawfik D, DeNardo DG, Naldini L, de Visser KE, De Palma M, Coussens LM. FcRgamma activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis.
Cancer Cell. 2010 Feb 17;17(2):121-34.

7. Gunderson AJ, Coussens LM. 2013. B cells and their mediators as targets for therapy in solid tumors. Exp Cell Res, 319: 1644-1649.

8. Kim S, Fridlender ZG, Dunn R, Kehry MR, Kapoor V, Blouin A, Kaiser LR, Albelda SM. B-cell Depletion Using an Anti-CD20 Antibody Augments Antitumor Immune Responses

and Immunotherapy in Nonhematopoetic Murine Tumor Models. J Immunother 2008;31:446–457.

9. Tadmor T, Zhang Y, Cho H, Podack ER, Rosenblatt JD. The absence of B lymphocytes reduces the number and function of T-regulatory cells and enhances the anti-tumor response in a murine tumor model. Cancer Immunol Immunother (2011) 60:609–619.

10. Advani RH1, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, Kolibaba KS, Furman RR, Rodriguez S, Chang BY, Sukbuntherng J, Izumi R, Hamdy A, Hedrick E, Fowler NH. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B Cell malignancies. J.Clin.Oncol.31(2013)88–94.

11. Thaunat O1, Morelon E, Defrance T. Am"B"valent: anti-CD20 antibodies unravel the dual role of B cells in immunopathogenesis. Blood. 2010 Jul 29;116(4):515-21. doi: 10.1182/blood-2010-01-266668.

12. Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, Pardoll DM, Wu TC. Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. Cancer Res. 1996 Jan 1;56(1):21-6.

13. Chen S, Wang X, Wu X, Wei MQ, Zhang B, Liu X, Wang Y. IL-10 signalling blockade at the time of immunization inhibits Human papillomavirus 16 E7 transformed TC-1 tumour cells growth in mice. Cell Immunol. 2014 Jun 18;290(1):145-151.

14. Zhu Y, Zheng Y, Mei L, Liu M, Li S, Xiao H, Zhu H, Wu S, Chen H, Huang L. Enhanced immunotherapeutic effect of modified HPV16 E7-pulsed dendritic cell vaccine by an adeno-shRNA-SOCS1 virus. Int J Oncol. 2013 Oct;43(4):1151-9.

15. Lepique AP, Daghastanli KR, Cuccovia IM, Villa LL. HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. Clin Cancer Res. 2009 Jul 1;15(13):4391-400.

16. Stone SC, Rossetti RA, Bolpetti A, Boccardo E, Souza PS, Lepique AP. HPV16-associated tumors control myeloid cell homeostasis in lymphoid organs, generating a suppressor environment for T cells. J Leukoc Biol. 2014 Jun 26.

17. Bolpetti A, Silva JS, Villa LL, Lepique AP. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. BMC Immunol. 2010 Jun 7;11:27.

18. Ramos RN, Chin LS, Dos Santos AP, Bergami-Santos PC, Laginha F, Barbuto JA. Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4+CD25+Foxp3+ regulatory cells. J Leukoc Biol. 2012 Sep;92(3):673-82.

19. Sharma MD, Hou DY, Liu Y, Koni PA, Metz R, Chandler P, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. Blood. 2009 Jun 11;113(24):6102-11.

20. Bishop GA, Hostager BS. The CD40–CD154 interaction in B cell–T cell liaisons. Cytokine & Growth Factor Reviews 14 (2003) 297–309.

21. Montag, D. T., Lotze, M. T. (2006) Rapid flow cytometric measurement of cytokine-induced phosphorylation pathways [CIPP] in human peripheral blood leukocytes. Clin Immunol. 121:215-226.

22. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schereiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurvaillance to tumor escape. Nat Imunol 2002, 3: 991-8.

23. Corthay A. Does the immune system naturally protect against cancer? Front Immunol. 2014 May 12;5:197. doi: 10.3389/fimmu.2014.00197. eCollection 2014.

24. Feuerstein B, Berger TG, Maczek C, Röder C, Schreiner D, Hirsch U, Haendle I, Leisgang W, Glaser A, Kuss O, Diepgen TL, Schuler G, Schuler-Thurner B. A method for the production of cryopreserved aliquots of antigen-preloaded, mature dendritic cells ready for clinical use. J Immunol Methods. 2000 Nov 1;245(1-2):15-29.

25. Gudmundsdottir H, Turka LA. A closer look at homeostatic proliferation of CD4+ T cells: costimulatory requirements and role in memory formation. J Immunol. 2001 Oct 1;167(7):3699-707.

26. Gattinoni L1, Finkelstein SE, Klebanoff CA, Antony PA, Palmer DC, Spiess PJ, Hwang LN, Yu Z, Wrzesinski C, Heimann DM, Surh CD, Rosenberg SA, Restifo NP. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. J Exp Med. 2005 Oct 3;202(7):907-12.

27. Berd D, Mastrangelo MJ. Effect of low dose cyclophosphamide on the immune system of cancer patients: reduction of T-suppressor function without depletion of the CD8+ subset. Cancer Res. 1987 Jun 15;47(12):3317-21.

28 Wrzesinski C1, Paulos CM, Kaiser A, Muranski P, Palmer DC, Gattinoni L, Yu Z, Rosenberg SA, Restifo NP. Increased intensity lymphodepletion enhances tumor treatment efficacy of adoptively transferred tumor-specific T cells. J Immunother. 2010 Jan;33(1):1-7.

29. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. Nat Rev Immunol. 2012 Mar 22;12(4):269-81.

30. Shah S, Divekar AA, Hilchey SP, Cho H, Newman CL, Shin S, Nechustan H, Challita-Eid PM, Segal BM, Yi KH, Rosenblatt JD. 2005. Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: Inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells. Int J Cancer, 117, 574–586.

31. He Y, Qian H, Liu Y, Duan L, Li Y, Shi G. 2014. The Roles of Regulatory B Cells in Cancer. J Immunol Res, 2014:215471.32.

32. Haneklaus M1, Gerlic M, O'Neill LA, Masters SL. miR-223: infection, inflammation and cancer. J Intern Med. 2013 Sep;274(3):215-26.

33. Qi Q, Yang Z. Regulation and function of signal transducer and activator of transcription 3. World J Biol Chem. 2014; 5(2): 231–239.

34. Carpenter EL, Mick R, Rüter J, Vonderheide RH. Activation of human B cells by the agonist CD40 antibody CP-870,893 and augmentation with simultaneous toll-like receptor 9 stimulation. Journal of Translational Medicine 2009, 7:93

35. Beatty GL, Torigian DA, Chiorean EG, Saboury B, Brothers A, Alavi A, Troxel AB, Sun W, Teitelbaum UR, Vonderheide RH, O'Dwyer PJ. A phase I study of an agonist CD40 monoclonal antibody (CP-870,893) in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. Clin Cancer Res. 2013 Nov 15;19(22):6286-95.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. (a) Chimera set up protocol. On day 0 donor mice, C57BL/6, were injected with 10^5 TC-1 cells, or immunized with HPV16 E6/E7 peptides. On day 16, recipients, RAG1$^{-/-}$ mice, were injected with $5x10^4$ TC-1 cells. Five days later, lymphocytes were harvested from donor mice, activated or nor in vitro for 14 to 16 hours, combined and transplanted into recipient mice. (b) Tumor growth kinetics in T lymphocyte chimeras. Isolated T lymphocytes from naïve, T(N), HPV16 E6 and E7 peptides immunized, T(I), or TC-1 tumor bearing, T(T) donors were used for transplant. As controls, RAG1$^{-/-}$ mice were injected with TC-1 cells, but not reconstituted with lymphocytes, nr. Lymphocytes isolated from C57BL/6 mice were transplanted into RAG1$^{-/-}$ mice previously injected with $5x10^4$ TC-1 cells. In all experiments, 1 to 3 million lymphocytes were transplanted. (c) B lymphocytes from tumor bearing mice do not display regulatory phenotype. Peripheral lymph node suspensions were treated or not with 0.1 mg/ml anti-CD40 for 12 hours, together with Golgi Stop. After this period, cells were washed stained with anti-CD19 and anti-MHC-II, fixed, permeabilized and stained with anti-Foxp3 and anti-IL-10. Cells were analyzed by flow cytometry. Plots displayed were gated in CD19+MHC-II+ cells. Positive controls were CD4 T cells (upper plot) and myeloid antigen presenting cells (lower plot) from lymph node suspensions treated with LPS.

Figure 2. Tumor growth kinetics in T and B lymphocyte chimeras. Lymphocytes isolated from C57BL/6 mice were transplanted into RAG1$^{-/-}$ mice previously injected with $5x10^4$ TC-1 cells. In all experiments, 1 to 3 million lymphocytes were transplanted. When mixed, B and T lymphocytes were transplanted in a 1:1 ratio. Tumor growth was followed every 2 or 3 days post tumor cell injection and plotted as tumor volume x time. (a) RAG1$^{-/-}$ mice were transplanted with a combination of T lymphocytes from tumor bearing donors, T(T), and B lymphocytes from naïve donors activated, B+(N), or not, B-(N), with anti-CD40. (b) Same as a, but B lymphocytes were obtained from tumor bearing donors B(T). (c) Chimera controls.

B lymphocytes from tumor bearing donors, activated, B+(T), or not with anti-CD40, B-(T) were transplanted into RAG1$^{-/-}$ mice without T lymphocytes, or T lymphocytes from tumor bearing donors were transplanted together with an injection of anti-CD40, T(T) a-CD40, as control anti-CD40 was injected into RAG1$^{-/-}$ mice alone, α-CD40. To facilitate comparison, we repeated in this graph the curves of tumor growth in chimeras transplanted with T lymphocytes from naïve donors, T(N) and tumor bearing donors, T(T). In all cases, the curves are the average of at least three independent experiments. Statistical significant differences are marked by *, where $p<0.05$.

Figure 3. MHC-II and antigen previous exposure are necessary for protection against tumor growth. (a) Tumor growth kinetics in lymphocyte chimeras with T lymphocytes from naïve donors, T(N) and B lymphocytes from tumor bearing donors, activated or not with anti-CD40, B+(T) and B-(T), respectively. (b) Tumor volume of chimeras with T lymphocytes from tumor bearing donors, T(T), and B lymphocytes from tumor bearing MHC-II$^{-/-}$ donors, IIKO, activated or not with anti-CD40, B+ and B-, respectively. As controls, we used B lymphocytes from tumor bearing wild type donors, WT. Results are the average of 4 mice per group. * indicates $p<0.05$, in A tested by the Mann-Whitney U test and in B tested by t-test, between WT and IIKO groups.

Figure 4. Activation of signaling pathways by anti-CD40 treatment. (a) Cell lysates from sorted B lymphocytes from naïve mice, B(N) or tumor bearing mice, B(T), treated or not with anti-CD40, + and -, respectively, 50 μg per sample; HeLa and 10ng/ml treated HeLa for 30 min (HeLa P), 25 μg/sample; sorted CD45^{+} and CD45^{-} tumor cells, 50 μg/sample, were fractioned in 10% polyacrylamide gel, transferred to PVDF membranes, which were incubated with the indicated antibodies. P – represents a phosphorylated isoform of the protein. Correspondent molecular weight is indicated in the left side of the autoradiograms. Experiment representative of two independent ones. (b) Intracellular staining and flow

cytometry analyses of sorted B lymphocytes from tumor bearing donors, treated (solid line) or not (dashed line) with anti-CD40 for 30 min. Antibodies against phosphorylated-proteins (protein symbol) are indicated in each plot. Experiment representative of three independent ones, the median fluorescence intensity averages of all three experiments are indicated on the top of each graph. Similar results were obtained with B lymphocytes from naïve donors.

Figure 5. B lymphocyte activity is modulated by anti-CD40 treatment. (a) Sorted B lymphocytes were treated with 0.1 mg/ml anti-CD40 for 14 to 16 hours, washed, labeled with the indicated antibodies and analyzed by flow cytometry. MHC-II^{hi}CD19^{hi} and CD86^{hi}CD19^{hi} populations are identified. Experiment representative of three independent ones; average of frequency of bright populations are indicated in each graph. (b) T cell proliferation in vitro. T lymphocytes from tumor bearing donors were labeled with CellTrace and incubated with B lymphocytes from tumor bearing donors treated or not with anti-CD40, as specified above, in a 1:1 ratio. Cells were treated with 1:100 phytoheamaglutinin (previously titrated), PHA, or 5 μg/ml HPV16 E6 and E7 peptides, pep, or left untreated. After four days of culture, cells were harvested labeled with anti-CD4 and anti-CD8 and analyzed by flow cytometry. The graph shows the ratio of the percentage of CellTrace dim cells from cultures with anti-CD40 treated and control B lymphocytes. (c) T cell activation. The same co-cultures described in B, were also labeled with anti-CD154 and anti-CD137 and analyzed by flow cytometry. Results represent the expression ratio of each of these markers between cultures with anti-CD40 treated and control B lymphocytes. Ratios of three independent experiments, each one in triplicates. In (b) and (c), dashed line indicates ratio value 1, where proliferation was the same in the two different conditions.

Figure 6. Leukocyte infiltrate in tumors from chimeras transplanted with anti-CD40 activated B and T lymphocytes from TC- tumor bearing donors. Tumor cryo-sections were blocked and incubated with antibodies against the indicated proteins. For Foxp3 and

Granzyme B, we added 0.5% Tween 20 in the incubation buffer. After washing, tissues were mounted with VectaShield with DAPI. 400X magnification. Insets show a 1000 X magnification of labeled cells to show the nuclear staining of Foxp3, secretion pattern of Granzyme B, co-localization of CD4 and CD154 and membrane localization of the other markers. Bar = 50 μm.

Supplementaty figure 1. TAM is resistant to anti-CD40 treatment. TAM isolated from TC-1 tumors were treated with 0.1 μg/ml anti-CD40 for 14 to 16 hours, washed and co-cultured with T lymphocytes from tumor bearing donors. The co-cultures were treated with 1:100 PHA (previously titrated), or 5 μg/ml HPV16 E6 and E7 peptides, or left untreated for four days. After this period, cells were harvested, labeled with anti-CD4, anti-CD8, anti-CD154 and anti-CD137 and analyzed by flow cytometry, where at least 50000 events were acquired. Data is represented as the ratio between the percentage T cell subpopulations in co-cultures with anti-CD40 treated TAM and control TAM. Dashed line indicates ratio value 1, where markers expression was the same in the two different conditions. Ratios of two independent experiments, each one in triplicates.

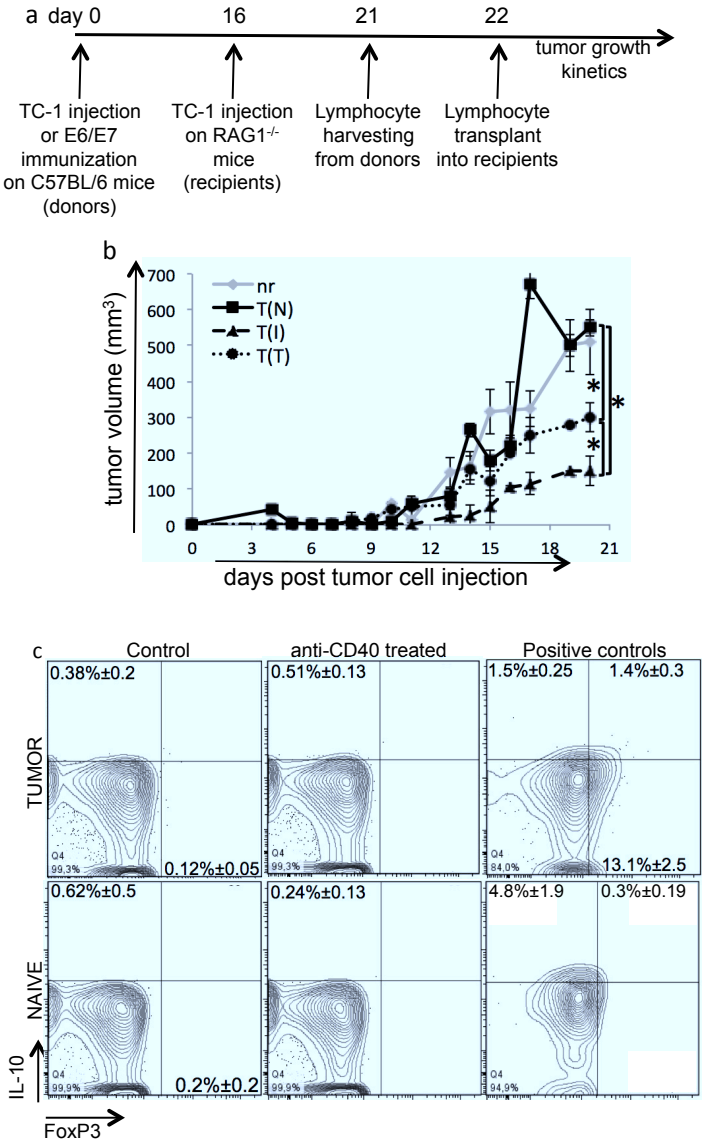


Figure 1
Rosseti et al, 2014

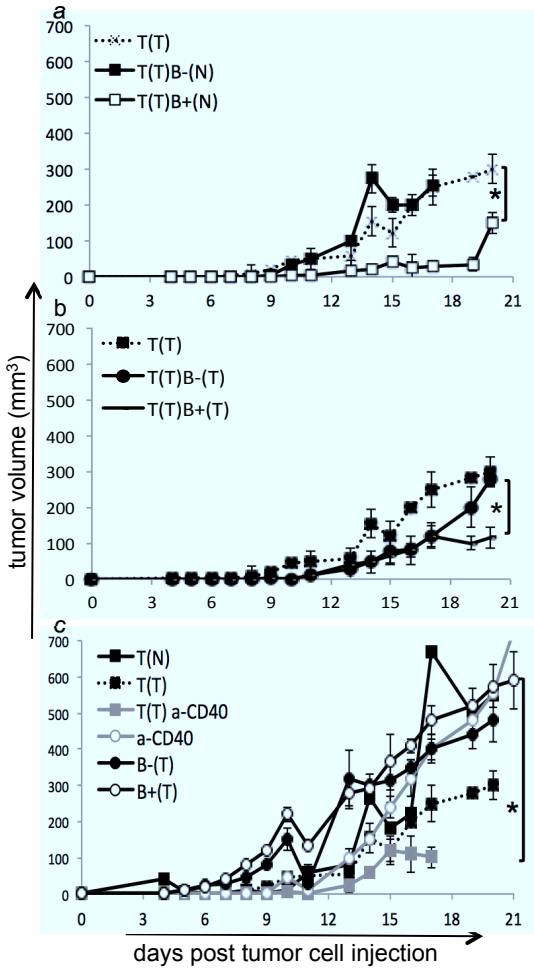


Figure 2
Rosseti et al, 2014

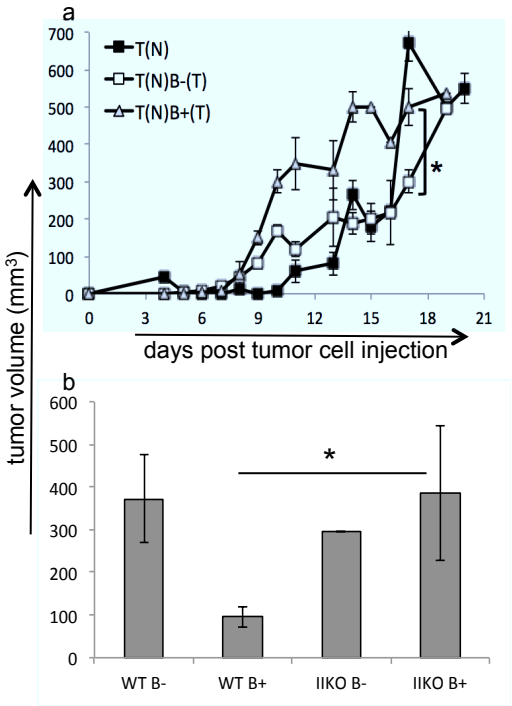


Figure 3
Rosseti et al, 2014

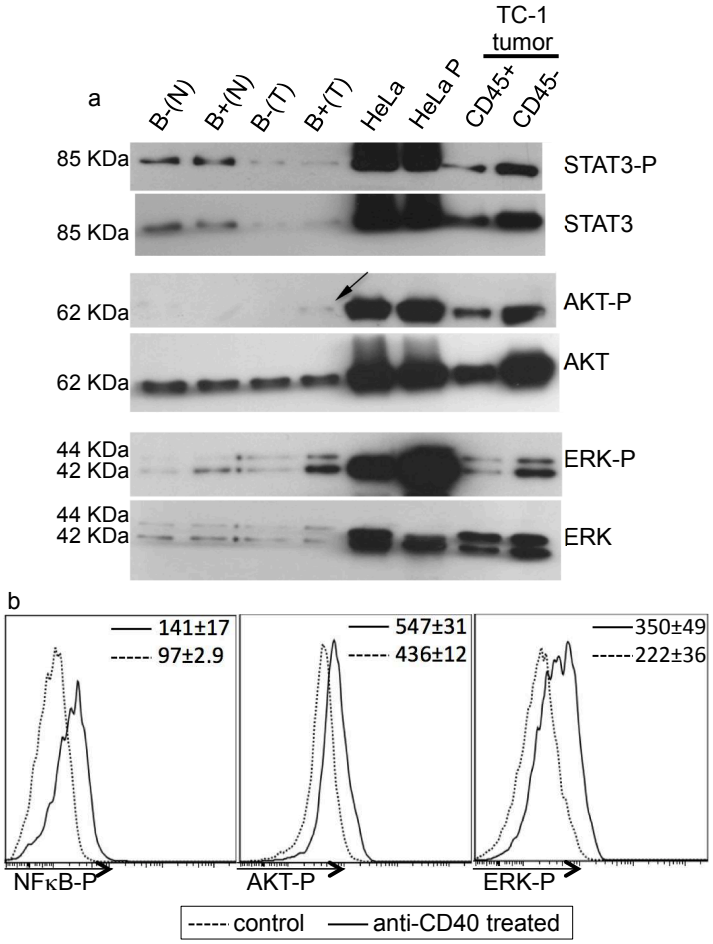


Figure 4
Rosseti et al, 2014

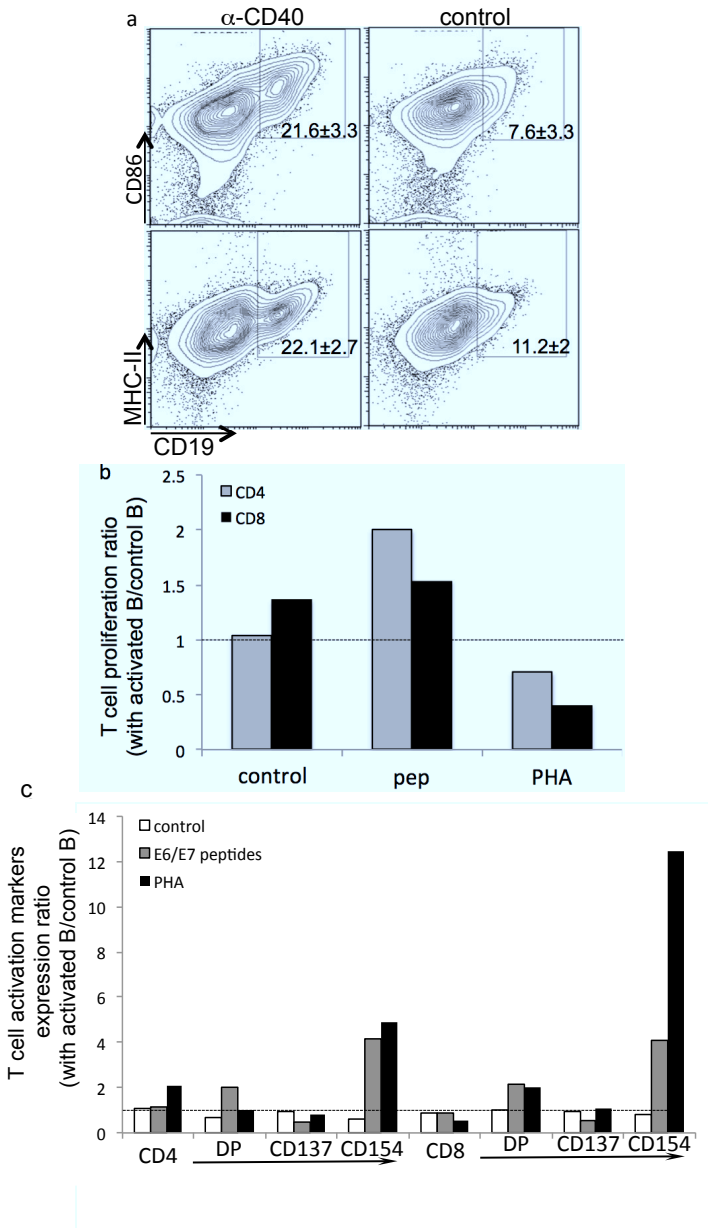


Figure 5
Rosseti et al, 2014

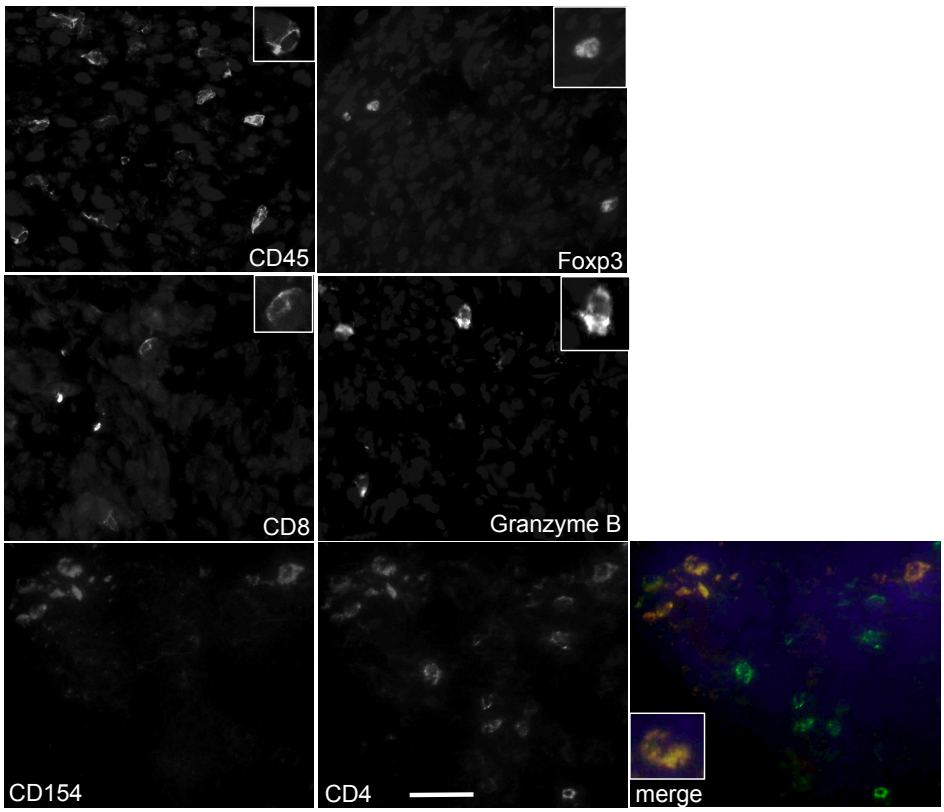


Figure 6
Rosseti et al, 2014

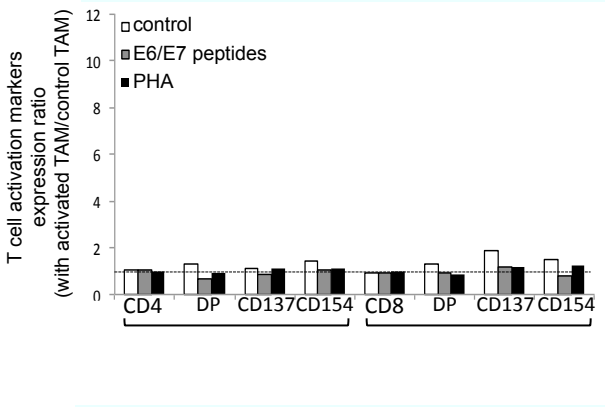


Figure 7
Rosseti et al, 2014