

**GRETEL RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ**

**Estudo do papel do eixo IL-6/STAT-3 e G-CSF  
no microambiente tumoral e a nível sistêmico**

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

São Paulo

2019

**GRETEL RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ**

**Estudo do papel do eixo IL-6/STAT-3 e G-CSF  
no microambiente tumoral e a nível sistêmico**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Lepique

Versão original

São Paulo

2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Rodríguez Rodríguez, Gretel

Estudo do papel do eixo IL-6/STAT-3 e G-CSF no microambiente tumoral e a nível sistêmico / Gretel Rodríguez Rodríguez; orientador Ana Paula Lepique. -- São Paulo, 2019.

93 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Câncer do colo do útero . 2. Papilomavírus Humano . 3. Microambiente tumoral. 4. Vias de sinalização . 5. STAT-3 e NF-kB. I. Lepique, Ana Paula , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Gretel Rodríguez Rodríguez.

Título da Tese: Estudo do papel do eixo IL-6/STAT-3 e G-CSF no microambiente tumoral e a nível sistêmico.

Orientador(a): Profa. Dra. 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: .....

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

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Estudo do papel de citocinas produzidas no microambiente tumoral sobre leucocitose e progressão tumoral*", registrado sob o protocolo nº **5/2015-E**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **10/02/2015** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Ana Paula Lepique**  
- Membros da Equipe: *Carolina Lopes Quina, Gretel Rodriguez Rodriguez*

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

## CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Study of the role of cytokines produced in the tumor microenvironment on leukocytosis and tumor progression*", protocol nº **5/2015-E**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **2/10/2015** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Ana Paula Lepique**  
- Team members:

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C57Black/6 IL-6 CD126 STAT 3 Koi, STAT3-loxP Cre-ER	Macho/male	5 semanas/weeks	105
	C57Black/6 IL-6 CD126 STAT 3 Koi, STAT3-loxP Cre-ER	Fêmea/female	5 semanas/weeks	105



Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes  
Coordenador CEUA-ICB/USP



Eliane Aparecida G. M. Nascimento  
Secretária CEUA-ICB/USP

*“Dedicado à minha família que mesmo na distância sempre foi a estrela que  
iluminou meu caminho”*

## **AGRADECIMENTOS:**

A Deus que guia meus passos e os guarda.

A Profa. Ana Paula Lepique por ser minha orientadora, por ajudar na minha formação como profissional e como pessoa. Pela paciência, dedicação e conselhos.

Aos professores e pesquisadores que aceitaram participar da banca examinadora, pela disponibilidade, pelas sugestões e correções para a melhora da tese.

Aos professores e pesquisadores que aceitaram participar da banca do exame de qualificação, contribuindo com os seus conhecimentos na correção e melhora do trabalho.

A minha família que mesmo na distância sempre se manteve presente em todos os momentos para oferecer seu apoio e amor.

A meu companheiro e amigo na vida pessoal Javier Ricardo por estar sempre presente e por me apoiar de forma incondicional.

Aos meus amigos Ildelfonso Alves da Silva Junior e Marcella Cipelli por estarem junto a mim em cada experimento dando seu suporte e pela disponibilidade em ajudar sempre que preciso.

Aos meus amigos que fazem parte do laboratório Flavia Sardela de Miranda, Sandra Alexandre Alves, Victor Yamada e Mariana Carmezim Beldi por todo seu apoio, conselhos e ajuda nos experimentos.

Aos meus amigos que foram parte do laboratório e já não estão nele, mas que foram importantes para mim Caio Silveira, Karla Alvarez, Simone Stone.

Aos meus amigos de outros laboratórios: Lazara Elena Santiesteban Lores e Omar Alberto Domínguez pelos momentos vividos.

Aos meus amigos e colegas de outros laboratórios: Carolina Manganeli Polonio, Nagela Ghabdan Zanluqui, Ester Wilma Pacheco Gonzales, João Pedro Tôrres Guimarães, Josiane Betim de Assis, Lilian Gomes de Oliveira, Marília Garcia de Oliveira, Thaís Akemi Amamura,

Theresa Raquel de Oliveira Ramalho, Rafael Moysés Salgado, Tiago Francisco, Nayara Pereira, Ana Carolina Chiacetti Rodrigues, Jaqueline Marques e Mirian Krystel de Siqueira pelas alegrias vividas dentro e fora do instituto.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação: Maria Eni Sacramento e João Pinheiro pela disponibilidade de sempre me ajudar com os assuntos referentes ao programa de pós-graduação e pela amizade.

Aos funcionários que me ajudaram sempre e que também me ofereceram sua amizade: Marlise Montes, Claudia Cunha, Maria Áurea de Alvarenga, Silvana Silva.

Aos funcionários do biotério: Adilamar Leopoldo, Sandra Ribeiro, Luciano, Silvia Massironi.

Ao Programa de pós-graduação em Imunologia pela contribuição na minha formação profissional.

As agências de fomento CNPq, CAPES, FAPESP pelo apoio financeiro.



Trabalho realizado no Laboratório de Imunomodulação do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – (Processo: 141672/2016-1) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

*“El conocimiento es la virtud, solo si se sabe se puede divisar el bien”*

*Sócrates*

RESUMO

## RESUMO

Rodríguez, G.R. **Estudo do papel do eixo IL-6/STAT-3 e G-CSF no microambiente tumoral e a nível sistêmico.** 2019. 93 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A infecção por Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco oncogênico é o principal fator etiológico do câncer cervical e uma porcentagem de outros cânceres anogenitais e orofaríngeos. Grupos de pesquisa mostraram que as células transformadas por HPV secretam IL-6 e G-CSF. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o papel da IL-6 e G-CSF e a sinalização por STAT-3 em um modelo experimental associado ao HPV observando o microambiente tumoral e os efeitos sistêmicos do tumor sobre o sistema imune. Para isso, utilizamos a linhagem celular TC-1 que expressa os oncogenes E6 e E7 de HPV16 e Ha-ras. Este modelo experimental de tumor reproduz várias características do câncer do colo do útero. Animais C57BL/6 foram inoculados com células tumorais TC-1 por via subcutânea. Quando os tumores ficaram palpáveis, os camundongos foram tratados com anticorpos neutralizantes anti-G-CSF e/ou anti-IL-6 a cada 3 dias. Observamos que cada anticorpo neutralizante, de maneira independente, inibiu significativamente o crescimento do tumor, enquanto que a combinação de ambos foi ainda mais eficiente. Também, o anti-G-CSF ou combinação dos anticorpos reduziu a frequência das células mielóides na medula óssea e no baço. Houve um aumento na frequência de células T CD8<sup>+</sup> nos tumores de camundongos tratados com anticorpos anti-IL-6 ou combinados. Observamos que a via NF-κB apresentou maior fosforilação de p65 nas células apresentadoras de antígenos (APCs) e células T do baço dos camundongos tratados. Portanto, nós hipotetizamos que a via STAT-3 poderia interferir na sinalização de NF-κB, de modo que após induzir os tumores, os animais foram tratados ou não com NSC 74859 (inibidor farmacológico de STAT-3) diariamente. Observamos que a inibição da STAT-3 reduziu significativamente o crescimento tumoral, reduziu a frequência de células mielóides no baço e houve o aumento dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> no infiltrado tumoral e promoveu um aumento na expressão de p65 NF-κB nos tumores e no baço. Além disso, promoveu um aumento na proliferação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> *in vitro*. Em seguida, após induzir os tumores em camundongos C57BL/6 foram tratados com NSC 74859 ou com o veículo ou com a combinação de NSC 74859 e JSH-23 (inibidor de NF-κB). Observamos que o efeito do tratamento com NSC74859 de diminuição do crescimento do tumor foi parcialmente perdido nos animais tratados simultaneamente com o inibidor de NF-κB. Finalmente, reconstituímos camundongos RAG1<sup>-/-</sup> que apresentaram tumor com linfócitos de doadores com tumor C57BL/6 tratados com inibidor STAT-3 ou controles. Observamos que os linfócitos transferidos adotivamente de doadores com tumor tratados com NSC 74859 protegiam os receptores contra o crescimento do tumor. Os linfócitos de ambos os doadores foram capazes de colonizar os linfonodos, e os dos doadores tratados pareciam ser mais eficientes na infiltração no tumor. Nossos dados indicam que IL-6 e G-CSF expressos no microambiente tumoral possuem efeitos locais e sistêmicos que promovem o aumento nas populações de células mielóides com potencial fenótipo imunossupressor contribuindo com a diminuição de infiltrado de linfócitos T e a inibição de NF-κB, provavelmente através da interferência da via STAT-3, fatores que em conjunto podem estar favorecendo a evasão imune tumoral.

**Palavras-chave:** Câncer do colo do útero. Papilomavírus Humano. Microambiente tumoral. Vias de sinalização. STAT-3. NF-κB.

# ABSTRACT

## ABSTRACT

Rodríguez, G.R. **Study of the role of IL-6/STAT-3 and G-CSF axis in the tumor microenvironment and systemic effect.** 2019. 93 f. PhD Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

High-risk oncogenic human papillomavirus (HPV) infection is the main etiological factor of cervical cancer and a percentage of other anogenital and oropharyngeal cancers. Research groups showed that HPV-transformed cells secrete IL-6 and G-CSF. The objective of this work was to characterize the role of IL-6 and G-CSF and STAT-3 signaling in an HPV-associated experimental model observing the tumor microenvironment and the systemic effects of the tumor on the immune system. For this, we used the TC-1 cell line that expresses HPV16 and Ha-ras oncogenes E6 and E7. This experimental tumor model reproduces several characteristics of cervical cancer. C57BL/6 animals were inoculated with TC-1 tumor cells subcutaneously. When the tumors were palpable, mice were treated with neutralizing anti-G-CSF and/or anti-IL-6 antibodies every 3 days. We observed that each independently neutralizing antibody significantly prevented tumor growth, while the combination of both was even more efficient. In addition, anti-G-CSF or antibody combination reduced the frequency of myeloid cells in the bone marrow and in the spleen. There was an increase in CD8<sup>+</sup>T cell frequency in mouse tumors treated with anti-IL-6 antibodies or in combination. We observed that the NF-κB pathway showed higher p65 phosphorylation in antigen presenting cells (APCs) and spleen T cells of the treated mice. Therefore, we hypothesized that the STAT-3 pathway could interfere with NF-κB signaling, so that after inducing tumors, mice they were treated or not with NSC 74859 (STAT-3 pharmacological inhibitor) daily. We observed that STAT-3 inhibition significantly reduced tumor growth, reduced myeloid cell frequency in the spleen and increased CD8<sup>+</sup>T lymphocytes in the tumor infiltrate and promoted an increase in p65 NF-κB expression in tumors and spleen. Moreover, promotes an increase in CD8<sup>+</sup>T lymphocyte proliferation *in vitro*. Then, after inducing tumors in C57BL/6 mice they were treated with either NSC 74859 or the vehicle or the combination of NSC 74859 and JSH-23 (inhibitor of NF-κB). We observed that the effect of NSC74859 treatment of tumor growth reduction was partially lost in animals treated simultaneously with the NF-κB inhibitor. Finally, we reconstituted RAG1<sup>-/-</sup> mice that presented tumor with lymphocytes from STAT-3 inhibitor-treated C57BL/6 donors or controls. We observed that adoptively transferred lymphocytes from NSC 74859-treated tumor donors protected the receptors against tumor growth. Lymphocytes from both donors were able to colonize lymph nodes, and those from treated donors appeared to be more efficient at infiltrating the tumor. Our data indicate that IL-6 and G-CSF expressed in the tumor microenvironment have local and systemic effects that promote an increase in myeloid cell populations with potential suppressive phenotype contributing to decreased T lymphocyte infiltrate and NF-κB inhibition. probably through the interference of the STAT-3 pathway, factors that together may be favoring tumor immune evasion.

Keywords: Cervical cancer. Human papillomavirus. Tumor microenvironment. Signaling pathways. STAT-3. NF-κB.

# LISTA DE FIGURAS

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Organização do genoma do HPV16.....	26
<b>Figura 2.</b> Vias de ativação de NF- $\kappa$ B.....	28
<b>Figura 3.</b> Vias de sinalização ativadas por IL-6.....	30
<b>Figura 4.</b> Via de sinalização iniciada por G-CSF.....	31
<b>Figura 5.</b> <i>Dot plots</i> representativos da análise da imunofenotipagem dos tumores.....	39
<b>Figura 6.</b> <i>Dot plots</i> representativos da análise da imunofenotipagem dos baços.....	40
<b>Figura 7.</b> Esquema geral dos procedimentos no experimento <i>in vivo</i> de tratamento com os anticorpos neutralizantes.....	45
<b>Figura 8.</b> A neutralização de IL-6 e G-CSF inibe o crescimento do tumor TC-1.....	46
<b>Figura 9.</b> Ausência de IL-6 promove a redução do crescimento do tumor TC-1.....	47
<b>Figura 10.</b> A neutralização combinada das citocinas promove o aumento de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> no tumor.....	48
<b>Figura 11.</b> O bloqueio de IL-6 e G-CSF reduz a frequência de células mielóides e dos monócitos na medula óssea.....	49
<b>Figura 12.</b> A neutralização de IL-6 e G-CSF favorece a redução da frequência das células de origem mielóide Ly6G <sup>+</sup> Ly6C <sup>+</sup> no baço.....	50
<b>Figura 13.</b> Vias de sinalização no baço de animais tratados com neutralizantes de IL-6 e G-CSF.....	52
<b>Figura 14.</b> A neutralização de IL-6 e G-CSF promove a fosforilação de NF- $\kappa$ B no baço.....	53
<b>Figura 15.</b> Esquema geral dos procedimentos no experimento <i>in vivo</i> de tratamento com o inibidor farmacológico de STAT-3.....	54
<b>Figura 16.</b> Inibição de STAT-3 previne o crescimento tumoral.....	54
<b>Figura 17.</b> Bloqueio de STAT-3 promove o aumento de infiltração de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> no tumor.....	56
<b>Figura 18.</b> A inibição de STAT-3 reduz a frequência dos neutrófilos, de células de origem mielóide Ly6G <sup>+</sup> Ly6C <sup>+</sup> e dos monócitos no baço.....	58
<b>Figura 19.</b> O bloqueio de STAT-3 promove a fosforilação da via de sinalização de NF- $\kappa$ B e promove a infiltração de células T CD8 <sup>+</sup> no tumor.....	60
<b>Figura 20.</b> A inibição de STAT-3 induz a ativação de NF- $\kappa$ B no baço.....	61
<b>Figura 21.</b> Vias de sinalização no baço de animais tratados com o inibidor de STAT-3.....	62
<b>Figura 22.</b> A inibição de STAT-3 promove a proliferação dos linfócitos T <i>in vitro</i> .....	64
<b>Figura 23.</b> Esquema geral dos procedimentos no experimento <i>in vivo</i> de tratamento com o inibidor farmacológico de NF- $\kappa$ B.....	65
<b>Figura 24.</b> Inibição de NF- $\kappa$ B reverte o efeito no crescimento tumoral.....	66



<b>Figura 25.</b> Bloqueio de NF- $\kappa$ B reduz a infiltração de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> no tumor .....	68
<b>Figura 26.</b> Esquema geral dos procedimentos no experimento <i>in vivo</i> de transferência adotiva de linfócitos provenientes de C57BL/6 tratados ou não com inibidor de STAT-3.....	69
<b>Figura 27.</b> Transferência adotiva de linfócitos provenientes de animais tratados com inibidor de STAT-3 previne o crescimento tumoral .....	71
<b>Figura 28.</b> Transferência adotiva de linfócitos foi capaz de reconstituir os animais RAG1 <sup>-/-</sup> .....	72
<b>Figura 29.</b> Transferência adotiva de linfócitos provenientes de animais tratados com inibidor de STAT-3 são mais eficientes na infiltração de linfócitos T no tumor.....	74

# ABREVIATURAS E SIGLAS

## ABREVIATURAS E SIGLAS

- APCs- Células apresentadoras de antígenos
- BSA- Albumina de soro bovino
- CaCl<sub>2</sub>- Cloreto de cálcio
- MgCl<sub>2</sub>- Cloreto de magnésio
- CO<sub>2</sub>- Dióxido de carbono
- dpi- Dias pós-inoculação das células tumorais
- EDTA- do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*
- G-CSF- Fator estimulador de colônias de granulócitos, do inglês, *Granulocyte-colony stimulating factor*
- gp130- Glicoproteína 130
- HPV- Papilomavírus Humano
- HRP- do inglês, *horseradish peroxidase*
- IL- Interleucina
- i.p- Intraperitoneal
- JAKs- do inglês, *Janus Kinases*
- Kg- Quilograma
- LRC- do inglês, *Long Control Region*
- MAPK- do inglês, *Mitogen-Activated Protein Kinase*
- MDSC- Células mielóides supressoras, do inglês, *myeloid derived suppressor cells*
- µg- Micrograma
- µl- Microlitro
- Mg- Miligrama
- MFI- Intensidade média de fluorescência, do inglês, *Mean Fluorescence Intensity*
- mL- Mililitro
- mm- Milímetro
- mM- Milimolar
- NaCl- Cloreto de sódio
- NF-κB- do inglês, *Nuclear Factor-kappa B*
- nm- Nanômetro
- PBS- Tampão salina fosfato, do inglês, *Phosphate Buffered Saline*
- PI3K- do inglês, *Phosphatidylinositol 3-Kinase*

PVDF- Polifluoruro de vinilideno

SBF- Soro bovino fetal

s.c- Subcutânea

SDS- Dodecilsulfato de sódio, do inglês, *sodium dodecyl sulfate*

SPF- do inglês, *specific pathogen free*

STAT-3- do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

TAM- Macrófagos associados a tumor, do inglês, *tumor-associated macrophages*

TLR9- do inglês, *Toll-like Receptor 9*

U- Unidades

VEGF- Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês, *Vascular endothelial growth factor*

# SUMÁRIO

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	25
2. OBJETIVO.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	36
3.1. Animais experimentais .....	36
3.2. Linhagem celular .....	36
3.3. Modelo de indução de tumor e tratamento de camundongos .....	37
3.4. Processamento das amostras.....	37
3.5. Imunofenotipagem e estudo das vias de sinalização .....	38
3.6. Ensaio de ativação de linfócitos T .....	40
3.7. Imuofluorescência .....	41
3.8. Western Blot.....	41
3.8.1. Extração de proteínas.....	41
3.8.2. Quantificação de proteínas .....	42
3.8.3. Estudo de expressão de proteínas .....	42
3.9. Análise estatística .....	43
4. RESULTADOS.....	45
4.1. As citocinas IL-6 e G-CSF contribuem em conjunto no crescimento do tumor TC-1 ...	45
4.1.1. A citocina IL-6 é importante para o crescimento do tumor TC-1 .....	46
4.1.2. Neutralização de IL-6 e G-CSF promove o aumento de infiltração de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> no microambiente tumoral.....	47
4.1.3. Ausência de IL-6 e G-CSF promove a redução da frequência de células mielóides e dos monócitos na medula óssea .....	48
4.1.4. O bloqueio de IL-6 e G-CSF reduz a frequência das células de origem mielóide Ly6G <sup>+</sup> Ly6C <sup>+</sup> no baço.....	49
4.1.5. Deficiência de IL-6 e G-CSF promove aumento da expressão de p65 fosforilada na via de sinalização de NF-κB no baço .....	51

4.2. Inibição de STAT-3 previne o crescimento do tumor .....	53
4.2.1. Neutralização de STAT-3 promove o aumento de infiltração de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> no microambiente tumoral.....	55
4.2.2. A inibição de STAT-3 reduz a frequência dos neutrófilos, de células de origem mielóide Ly6G <sup>+</sup> Ly6C <sup>+</sup> e dos monócitos no baço .....	57
4.2.3. Inibição de STAT-3 reduz a ativação da via no microambiente tumoral e promove a ativação da via de sinalização de NF-κB.....	59
4.2.4. A inibição de STAT-3 reduz a fosforilação desta via no baço induz a ativação de NF-κB	60
4.2.5. Inibição de STAT-3 promove a proliferação dos linfócitos T.....	63
4.3. Inibição de NF-κB promove o crescimento do tumor .....	65
4.3.1. Neutralização de NF-κB reduz a infiltração de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> no microambiente tumoral	66
4.4. Transferência adotiva de linfócitos provenientes de animais tratados com inibidor de STAT-3 previne o crescimento tumoral .....	69
4.4.1. Transferência adotiva de linfócitos foi capaz de reconstituir os animais RAG1 <sup>-/-</sup> .....	71
4.4.2. Transferência adotiva de linfócitos provenientes de animais tratados com inibidor de STAT-3 foi mais eficiente na infiltração de linfócitos T no tumor .....	73
5. DISCUSSÃO.....	77
6. CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84
APÊNDICE .....	91
(Trabalhos submetidos ou Publicações realizadas durante o período do Doutorado).....	91

# INTRODUÇÃO



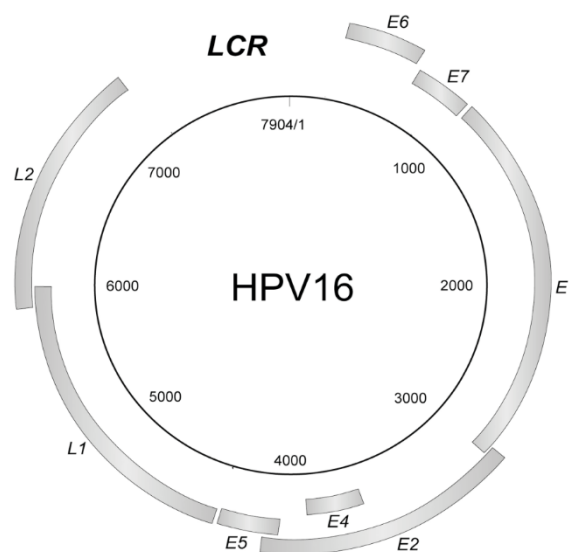
## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo. As causas de câncer podem ser genéticas ou ambientais, resultando em alteração da programação genética que afeta os sistemas controlados para a regulação da proliferação, crescimento e diferenciação de células normais (PIETRAS; OSTMAN, 2010). O câncer do colo do útero representa quarto câncer mais prevalente em mulheres, com 570000 casos e 311000 mortes em todo o mundo em 2018, acontecendo as maiores taxas de incidência em áreas com menores níveis de desenvolvimento humano. (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM; SIEGEL *et al.*, 2018). Estudos realizados, mostraram uma estimativa de 16370 novos casos de câncer do colo do útero no Brasil para cada ano do biênio 2018-2019, ocupando a terceira posição câncer mais prevalente na população feminina no país (INCA, 2017).

O principal agente etiológico associado ao câncer do colo do útero é a infecção por Papilomavírus Humano (HPV). Os tipos de HPV que são transmitidos por contato sexual e infectam o trato genital humano são classificados como “alto” ou “baixo” risco com base no potencial oncogênico (BERNARD; PONS-SALORT; FAVRE; HEARD *et al.*, 2013). Especificamente, a infecção por HPV de alto risco oncogênico sendo os mais frequentes o HPV16 e HPV18, representam o principal fator etiológico do câncer cervical (MUNOZ; BOSCH; DE SANJOSE; HERRERO *et al.*, 2003; WALBOOMERS; JACOBS; MANOS; BOSCH *et al.*, 1999) e uma porcentagem de outros cânceres anogenitais e orofaríngeos (CHATURVEDI; ENGELS; PFEIFFER; HERNANDEZ *et al.*, 2011; MILLER; PURICELLI; STACK, 2012). A maioria das infecções por HPV de alto risco é eliminada pelo sistema imunológico em menos de dois anos e é assintomática. No entanto, a infecção persistente com HPV de alto risco pode induzir alterações celulares e progredir para o câncer em um período de décadas (MOSCICKI; SCHIFFMAN; KJAER; VILLA, 2006).

Os Papilomavírus Humanos são vírus pequenos com um diâmetro de 50 a 55 nm, não envelopados, contém DNA circular de dupla fita e são epiteliotrópicos (MUNOZ; CASTELLSAGUE; DE GONZALEZ; GISSMANN, 2006). A infecção por HPV se inicia com a replicação das partículas virais nos queratinócitos da camada basal do epitélio cervical, frequentemente expostos a uma microlesão ou ferimento para acesso dos vírus, causando anormalidades citológicas. Os HPVs codificam oito genes, existem seis genes precoces (E1-E7) relacionados com a replicação do DNA viral e dois genes tardios (L1 e L2) que codificam

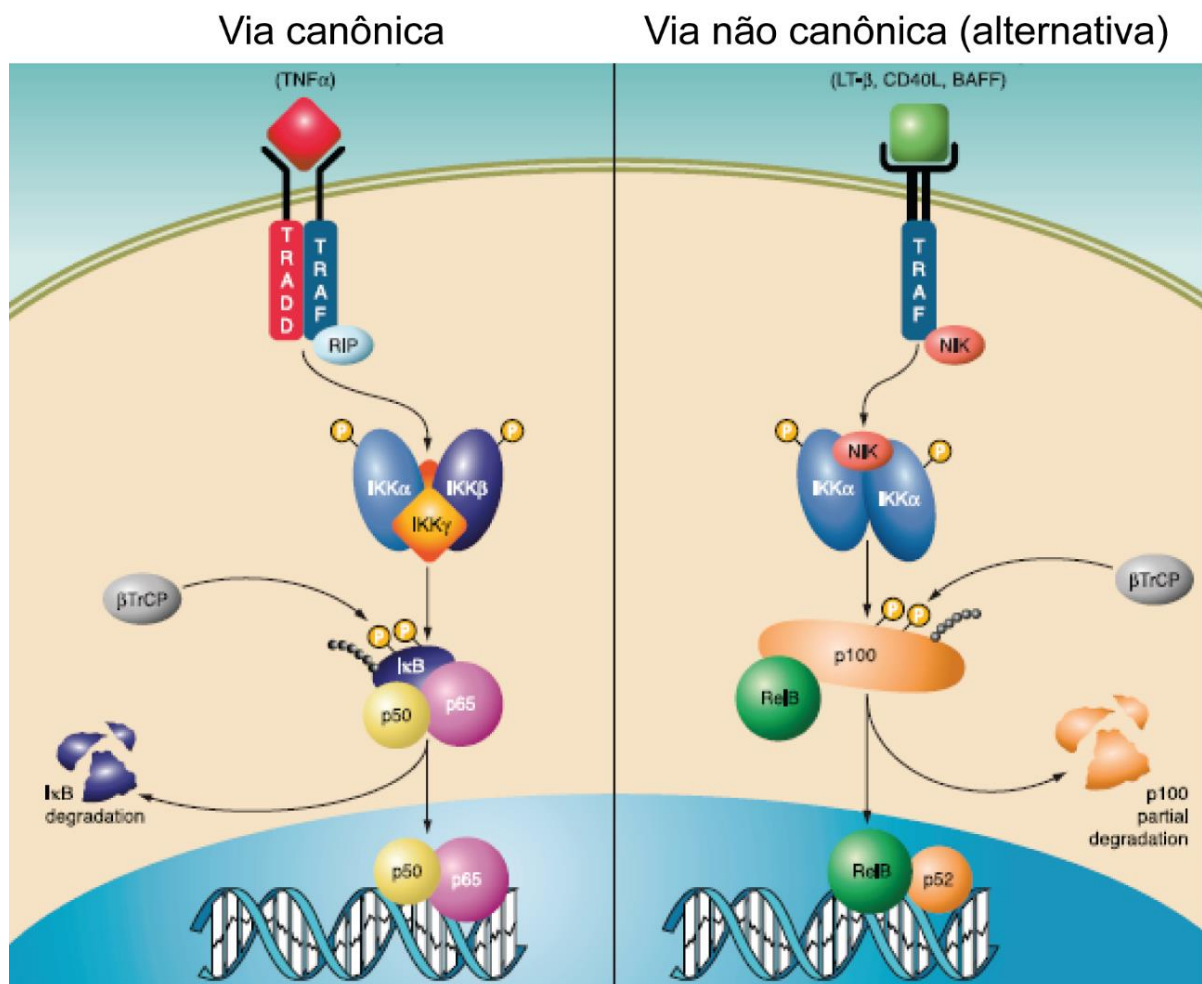
as proteínas do capsídeo, necessárias para a montagem e liberação de vírions, assim como uma região controladora LRC (do inglês, *Long Control Region*) que regula a transcrição e a replicação do genoma do vírus (MUNOZ; CASTELLSAGUE; DE GONZALEZ; GISSMANN, 2006). A persistência da infecção com os subtipos de HPV de alto risco oncogênico, leva a integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro (JEON; ALLEN-HOFFMANN; LAMBERT, 1995). Estudos sugerem que este processo acontece mediante a ruptura da região do gene E2 viral, causando a perda de um regulador negativo do promotor viral o que favorece expressão preferencial dos oncogenes E6 e E7 nas células do hospedeiro infectadas (DOWHANICK; MCBRIDE; HOWLEY, 1995; JEON; ALLEN-HOFFMANN; LAMBERT, 1995; ROMANCZUK; THIERRY; HOWLEY, 1990). A transcrição dos oncogenes virais E6 e E7 nas células hospedeiras promove a degradação dos supressores tumorais p53 e retinoblastoma (Rb) respectivamente, provocando instabilidade genômica, além de modificar a atividade das proteínas que regulam o ciclo celular, levando à imortalização das células infectadas (MUNGER; BASILE; DUENSING; EICHTEN *et al.*, 2001; SCHEFFNER; WERNESS; HUIBREGTSE; LEVINE *et al.*, 1990).



**Figura 1. Organização do genoma do HPV16.** O genoma contém oito genes, existem seis genes precoces (E1, E2, E4, E5, E6, E7) relacionados com a replicação do DNA viral e dois genes tardios (L1 e L2) que codificam as proteínas do capsídeo, necessárias para a montagem e liberação de vírions, assim como uma região controladora LRC (do inglês, *Long Control Region*) que regula a transcrição e a replicação do genoma do vírus. Modificado da fonte (KAJITANI; SATSUKA; KAWATE; SAKAI, 2012).

Em mulheres com sistemas imunológicos normais, o desenvolvimento do câncer do colo do útero ocorre ao longo de um período de 15 a 20 anos. Em contraste, evidências clínicas mostraram um desenvolvimento acelerado da doença em mulheres com sistema imunológico debilitado pela infecção com o vírus da imunodeficiência humana (KRIEK; JAUMDALLY; MASSON; LITTLE *et al.*, 2016). Estudos realizados demonstraram que um dos mecanismos de evasão imune do vírus, é mediada por E5, uma das oncoproteínas codificada pelo genoma de HPV16, a qual causa a retenção de HLA-A e B no complexo de Golgi, escapando de linfócitos T CD8 citotóxicos (ASHRAFI; HAGHSHENAS; MARCHETTI; O'BRIEN *et al.*, 2005). Outro dos mecanismos de escape do sistema imune é mediado pelas oncoproteínas E6 e E7 do HPV16, as quais promovem a formação de um complexo nuclear que se liga ao promotor de TLR9 (do inglês, *Toll-like Receptor 9*), levando a inativação da transcrição de TLR9 afetando a resposta inata do hospedeiro (HASAN; BATES; TAKESHITA; BILIATO *et al.*, 2007; HASAN; ZANNETTI; PARROCHE; GOUTAGNY *et al.*, 2013). Embora existam mecanismos de evasão das proteínas virais, diversos estudos realizados têm demonstrado a relevância do sistema imune para o controle de lesões associadas ao HPV. A imunidade adaptativa mediada por linfócitos T constitui a principal resposta efetora contra o vírus (DINIZ; SALES; SILVA; FERREIRA, 2016; HEUSINKVELD; WELTERS; VAN POELGEEST; VAN DER HULST *et al.*, 2011; OVESTAD; GUDLAUGSSON; SKALAND; MALPICA *et al.*, 2010). Estudos realizados com antecedência por nosso grupo de pesquisa em modelos murinos, demonstraram que a depleção dos macrófagos presentes no microambiente tumoral (usando lipossomos contendo clodronato) induz o aumento das respostas de linfócitos T CD8 específicos contra o tumor o que leva a diminuição do crescimento tumoral (LEPIQUE; DAGHASTANLI; CUCCOVIA; VILLA, 2009). Entretanto, os macrófagos tumorais secretam diferentes citocinas, sendo uma das principais a IL-10, que promove o estabelecimento de tolerância aos antígenos tumorais, favorecendo a diferenciação de células T reguladoras e inibindo a apresentação de antígenos através da inibição parcial da sinalização por NF- $\kappa$ B (do inglês, *Nuclear Factor-kappa B*) (STONE; ROSSETTI; BOLPETTI; BOCCARDO *et al.*, 2014). Em modelos murinos tem sido mostrado que a ativação de NF- $\kappa$ B mediada por TLR9, em conjunto com a inibição do receptor de IL-10, potencializa a resposta imune inata e adaptativa contra o tumor (GUIDUCCI; VICARI; SANGALETTI; TRINCHIERI *et al.*, 2005). A sinalização por NF- $\kappa$ B pode ser ativada pela via canônica mediante a ligação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 a seu receptor levando a formação do dímero p65/p50 ou pela via não canônica (alternativa) que leva a formação do dímero RelB/p52 (HAYDEN; GHOSH, 2008). Entretanto, na literatura

existem evidências mostrando que ativação da via canônica de NF- $\kappa$ B (p65/p50) resulta importante no desenvolvimento das funções efetoras dos linfócitos T citotóxicos (MONDOR; SCHMITT-VERHULST; GUERDER, 2005). Em contraste, a ativação de via não canônica tem sido relacionada com a ativação de STAT-3 (do inglês, *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) em das células mielóides supressoras (MDSC do inglês, *myeloid derived suppressor cells*) no contexto de tumoral (YU; WANG; YAN; ZHANG *et al.*, 2014). Em outros estudos desenvolvidos em nosso laboratório, em amostras de pacientes com câncer do colo uterino, a via de sinalização de NF- $\kappa$ B se encontra parcialmente inibida em diferentes populações de células imunes como os leucócitos, APCs e nos linfócitos T.



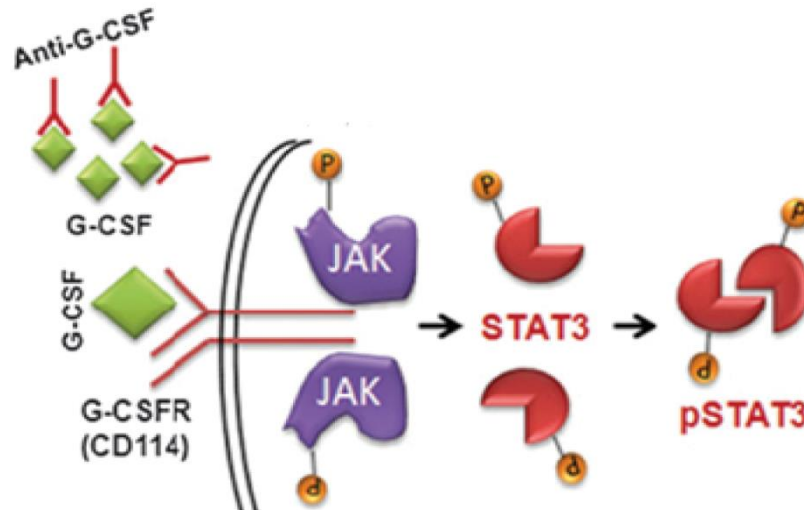
**Figura 2. Vias de ativação de NF- $\kappa$ B.** A sinalização por NF- $\kappa$ B pode ser ativada pela via canônica mediante a ligação de citocinas pró-inflamatórias a seu receptor levando a formação do dímero p65/p50 ou pela via não canônica (alternativa) que leva a formação do dímero RelB/p52. Modificado da fonte (BAKKAR; GUTTRIDGE, 2010).

Adicionalmente, o microambiente tumoral é complexo, composto por células tumorais, estromais, inflamatórias, além de uma variedade de células associadas ao tecido e vasos sanguíneos (WHITESIDE, 2008). Existe uma forte associação entre o câncer e a inflamação (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A inflamação crônica resulta na remodelação do tecido e angiogênese, levando a invasão e metástase assim como na liberação moléculas solúveis como fatores de crescimento que sustentam a sinalização proliferativa, fatores de sobrevivência que limitam a morte celular e citocinas (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010). Uma das citocinas inflamatórias descritas que desempenha um papel essencial na progressão tumoral é a interleucina-6 (IL-6) (LI; GRIVENNIKOV; KARIN, 2011). Essa citocina é pleiotrópica e embora tenha sido descrita como anti-inflamatória em alguns locais, ela também desempenha um papel essencial na promoção de inflamação (ROSE-JOHN, 2012; SILVER; HUNTER, 2010). A sinalização de IL-6 pode acontecer mediante a via clássica que se inicia com a ligação desta citocina a seu receptor de membrana (IL-6R) ou pode acontecer a trans-sinalização na qual a IL-6 se liga a subunidade  $\alpha$  do receptor que constitui a forma solúvel (sIL-6R $\alpha$ ). A sinalização por ambas vias converge na fosforilação de resíduos de tirosina na glicoproteína 130 (gp130), que é crítica para a transdução de sinais (SILVER; HUNTER, 2010). A ativação de gp130 induz o recrutamento das proteínas JAK (do inglês, *Janus Kinases*) e consequentemente a fosforilação de STAT-3 que em forma de dímero se transloca para o núcleo, promovendo a transcrição de genes alvo (HIRANO; ISHIHARA; HIBI, 2000). Existem outras cascatas de sinalização intracelular que podem estar sendo ativadas mediante a fosforilação de gp130 como a das MAPK (do inglês, *Mitogen-Activated Protein Kinase*) e também a via de PI3K (do inglês, *Phosphatidylinositol 3-Kinase*) (HIRANO; ISHIHARA; HIBI, 2000). Os genes alvos, das vias de sinalização mencionadas, são importantes para proliferação e sobrevivência.



**Figura 3. Vias de sinalização ativadas por IL-6.** A ligação de IL-6 ao seu receptor induz a ativação de gp130, que transmite o sinal ativando diferentes vias como STAT-3, a via das proteínas MAPK ou a via de PI3K. Modificado da fonte (JUNK; BRYSON; JACKSON, 2014).

Por outro lado, além da IL-6, existem outras citocinas como o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF do inglês, *Granulocyte-colony stimulating factor*) que podem desempenhar um papel essencial na progressão tumoral. O G-CSF pode ser secretado no contexto tumoral pelas próprias células tumorais e promover a expansão das células mielóides supressoras na circulação e no microambiente tumoral (SHOJAEI; WU; QU; KOWANETZ *et al.*, 2009). Evidências experimentais recentes, usando modelos murinos de neuroblastoma, demonstraram que o receptor do G-CSF (CD114) ativa a via de STAT-3 nas células tumorais, promovendo sua expansão *in vitro* e *in vivo* (AGARWAL; LAKOMA; CHEN; HICKS *et al.*, 2015). Entretanto, estudos realizados em amostras de pacientes com câncer do colo do útero mostraram uma elevada expressão de G-CSF correlacionada a uma rápida progressão da doença bem como recorrência do tumor (MABUCHI; MATSUMOTO; KAWANO; MINAMI *et al.*, 2014). Evidências na literatura demonstraram que a elevada expressão de G-CSF e o aumento da infiltração de MDSC em pacientes com câncer de colo do útero se encontra associado a existência dos tumores ao tratamento com quimioterápicos (KAWANO; MABUCHI; MATSUMOTO; SASANO *et al.*, 2015).



**Figura 4. Via de sinalização iniciada por G-CSF.** A ligação de G-CSF ao seu receptor induz a ativação de receptor do G-CSF (CD114) ativa seletivamente a via de STAT-3 no tumor. Modificado da fonte (AGARWAL; LAKOMA; CHEN; HICKS *et al.*, 2015).

A sinalização intracelular por STAT-3 promove a proliferação celular, sobrevivência, imunossupressão, angiogênese e invasão no câncer. Estudos em diversos tipos de tumor, tem mostrado que a ativação de STAT-3 mediada por gp130, promove a progressão do ciclo celular e induz resistência à apoptose (AGARWAL; LAKOMA; CHEN; HICKS *et al.*, 2015). Outras evidências mostraram que a ativação desta via de sinalização se correlaciona com a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *Vascular endothelial growth factor*) em diferentes linhagens tumorais e o processo de angiogênese promovido por VEGF fornece os nutrientes necessários para o crescimento e progressão dos tumores (NIU; WRIGHT; HUANG; SONG *et al.*, 2002).

Especificamente, em tumores do colo uterino, nosso laboratório tem contribuído com estudos do microambiente de tumores associados ao HPV utilizando modelos murinos assim como amostras de pacientes, mostrando que as células transformadas por HPV expressam IL-6 e G-CSF (ALVAREZ; BELDI; SARMANHO; ROSSETTI *et al.*, 2017; STONE; ROSSETTI; BOLPETTI; BOCCARDO *et al.*, 2014). Estes estudos mostraram que tumores associados ao HPV16 controlam a homeostase de células mielóides em órgãos linfóides gerando um ambiente supressor para células T (STONE; ROSSETTI; BOLPETTI; BOCCARDO *et al.*, 2014). Em pacientes com câncer de colo uterino, observou-se um aumento no infiltrado inflamatório nas lesões, caracterizado por um acúmulo de macrófagos de perfil M2 e de neutrófilos acompanhado de uma correlação negativa entre a frequência de neutrófilos e de linfócitos T (ALVAREZ;

BELDI; SARMANHO; ROSSETTI *et al.*, 2017). Nesse trabalho, nos proporemos compreender melhor o papel da IL-6 e G-CSF na sinalização por STAT-3 durante o desenvolvimento de tumores associados ao HPV assim como os efeitos sistêmicos do tumor sobre o sistema imune.



# OBJETIVO

## **2. OBJETIVO**

Caracterizar o papel de IL-6 e G-CSF e da sinalização por STAT-3 em um modelo experimental associado ao HPV16, observando o microambiente tumoral e os efeitos sistêmicos do tumor sobre o sistema imune.

# MATERIAIS E MÉTODOS

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais experimentais

Os camundongos da linhagem C57BL/6, animais geneticamente deficientes de IL-6 (IL-6<sup>-/-</sup>) e animais geneticamente deficientes de linfócitos T e B (RAG1<sup>-/-</sup>), fêmeas de 4 semanas de idade, foram utilizados para a indução de tumor. Os camundongos da linhagem C57BL/6 foram obtidos do Biotério de criação de animais isogênicos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, os animais IL-6<sup>-/-</sup> foram obtidos do Biotério de criação de animais isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP-USP e os animais RAG1<sup>-/-</sup> (B6.129S7-Rag1<sup>tm1Mom/J</sup>) foram obtidos do The Jackson Laboratory, Maine, EUA. Os animais foram mantidos no Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas - ICB-USP, em condições SPF (do inglês, *specific pathogen free*) com água e ração autoclavadas e consumo *ad libidum* e ciclos de claro e escuro de 12 horas. Os experimentos foram realizados utilizando de 3 a 5 camundongos por grupo experimental. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP) n° 5/2015-E.

#### 3.2. Linhagem celular

A linhagem de células tumorais TC-1 derivada de epitélio pulmonar, transformada com vetor retroviral contendo os oncogenes E6 e E7 de HPV16 e Ha-ras (LIN; GUARNIERI; STAVELEY-O'CARROLL; LEVITSKY *et al.*, 1996) foi mantida em meio de cultura RPMI-1640 (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 5 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 1% de penicilina-streptomina (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) e 1% de L-glutamina (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA). As células foram mantidas em cultura a uma temperatura de 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Para realizar os experimentos *in vivo*, quando as células chegaram a 90% de confluência foram lavadas com 0,5 mM de PBS/EDTA, dissociadas com 0,1% de tripsina (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) e lavadas duas vezes com PBS<sup>++</sup> (1mM de CaCl<sub>2</sub> e 0,5

mM de MgCl<sub>2</sub>). A viabilidade celular foi determinada utilizando azul de Trypan. Foram utilizadas somente as suspensões celulares com viabilidade acima de 95%.

### 3.3. Modelo de indução de tumor e tratamento de camundongos

Os camundongos C57BL/6 e IL-6<sup>-/-</sup> foram previamente anestesiados por via intraperitoneal (*i.p*) com Cloridato de Xilazina (30 mg/Kg) e Cloridato de Cetamina (300 mg/Kg) diluídos em PBS, sendo inoculados com 100 µl de uma suspensão de 1x10<sup>5</sup> células tumorais TC-1 por via subcutânea (*s.c*) no dorso superior direito. O tamanho dos tumores foi mensurado a partir do 7º dia pós-inoculação (dpi) das células tumorais utilizando um paquímetro analítico. O volume do tumor foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:  $V = D \times d^2/2$ , onde D representa o diâmetro maior do tumor (mm) e d representa o diâmetro menor do tumor. Adicionalmente, camundongos C57BL/6 foram submetidos ao mesmo protocolo de indução tumoral previamente descrito e assim que os tumores foram palpáveis (aproximadamente de 3 mm), os camundongos foram tratados com 50 µg de anticorpo neutralizante anti-G-CSF e/ou 50 µg de anti-IL-6 a cada 3 dias por via *i.p*. Além disso, tratamento por via *i.p* com inibidor farmacológico de STAT-3 (NSC 74859 – 5 mg/kg) ou com veículo (PBS 1x + 2% DMSO) ou com 5 mg/kg de NSC 74859 junto ao inibidor farmacológico de p65 NF-κB (JSH-23 – 3 mg/kg) também foi realizado diariamente do sétimo ao décimo sexto dpi (ambos inibidores da Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, EUA). Adicionalmente, os linfonodos dos camundongos com tumor tratados ou não com 5 mg/kg de NSC 74859 foram extraídos e as suspensões foram preparadas (5x10<sup>6</sup> células) em PBS<sup>++</sup> sendo injetadas as células por via *i.p* em animais RAG1<sup>-/-</sup> os quais previamente foram inoculados com 1x10<sup>5</sup> células tumorais TC-1 por via *s.c* no dorso superior direito.

Em todos os casos os animais foram eutanasiados antes que os tumores atingiram o diâmetro máximo de 1 cm e foram coletados tanto os tecidos linfoides, quanto os tumores, sendo acondicionados de maneira diferente dependendo do destino final.

### 3.4. Processamento das amostras

Tecidos dos animais dos diferentes grupos experimentais foram processados e preparadas as suspensões celulares em MTH (do inglês, *Mouse Tonic Hanks*) (Hanks 1X com 15 mM de HEPES pH 7,4) suplementado com 5% de SBF e 0,5 U/mL de DNase I (Worthington

Biochemical, Lakewood, NJ, EUA). Para a obtenção de células dos tumores, os mesmos foram fragmentados em pequenos pedaços e incubados em MTH contendo 10 mg/mL de Colagenase I/IV (Worthington Biochemical Corporation, NJ, EUA) sendo agitados a 1300 rpm no equipamento *Thermomixer* (Eppendorf, Alemanha) durante 40 minutos a uma temperatura de 37°C para a digestão enzimática. Subsequentemente, as suspensões celulares foram coletadas e filtradas utilizando *cell strainer* de 70 µm (BD Biosciences).

Os linfonodos e baços foram processados mecanicamente e a crista ilíaca, o fêmur e a tíbia das patas traseiras dos animais foram macerados para a obtenção da medula óssea. As suspensões de células foram filtradas e lavadas com MTH e especificamente, as células provenientes dos baços e da medula óssea foram incubadas em tampão hipotônico para lise de eritrócitos e lavadas novamente com MTH. A viabilidade das células obtidas foi determinada utilizando azul de Trypan e câmara de Neubauer.

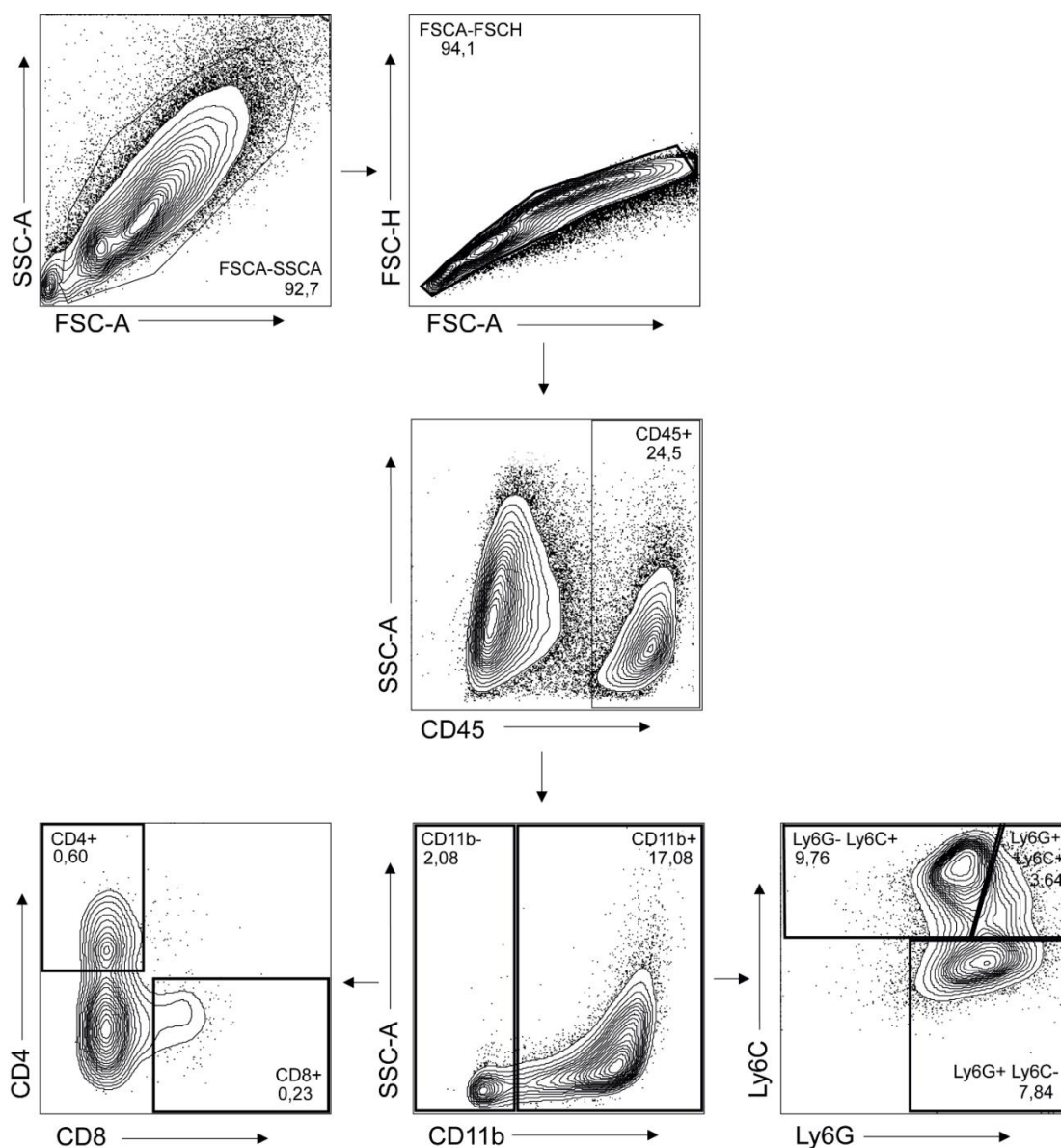
### 3.5. Imunofenotipagem e estudo das vias de sinalização

Após a obtenção de suspensão de células do tumor, baço e medula óssea foram aliqüotadas em  $2 \times 10^6$  células para a imunofenotipagem utilizando a marcação de moléculas de superfície específicas de cada subtipo celular, pela técnica de citometria de fluxo. As suspensões do tumor foram incubadas com anticorpos monoclonais específicos conjugados com diferentes fluorocromos: anti-CD45 Alexa 647 (clone 30-F11), anti-CD4 FITC (clone GK 1.5), anti-CD8 PE (clone 53-6.7), anti-Ly6G PECy7 (clone 1A8), anti-Ly6C Pacific (clone AL-21) e anti-CD11b (clone M1/70) como representado na figura 5. As células do baço foram incubadas com anti-CD4 PECy5 (clone RM4-5), anti-CD8 PE (clone 53-6.7), anti-CD11b FITC (clone M1/70), anti-Ly6G PECy7 (clone 1A8) e anti-Ly6C Pacific (clone AL-21). Enquanto que as suspensões da medula óssea foram marcadas com anti-CD11b FITC (clone M1/70), anti-Ly6G PECy7 (clone 1A8) e anti-Ly6C PE (clone RB6-8C5). Os anticorpos foram incubados por 20 minutos a 4°C. Os anticorpos utilizados foram da Biolegend e da BD Biosciences.

Para estudo de vias de sinalização foram utilizadas  $5 \times 10^6$  células das suspensões de baço. Após a marcação de moléculas de superfície, foram fixadas com PBS/formol 2% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, foram permeabilizadas com metanol 90% gelado durante 10 minutos a uma temperatura de -20°C. Posteriormente, foi realizada a marcação intracelular com o anticorpo anti-p-NF-κB (clone Ser536 93H1) durante 20 minutos a 4°C. Após o período de incubação, as células do baço foram marcadas com o anticorpo

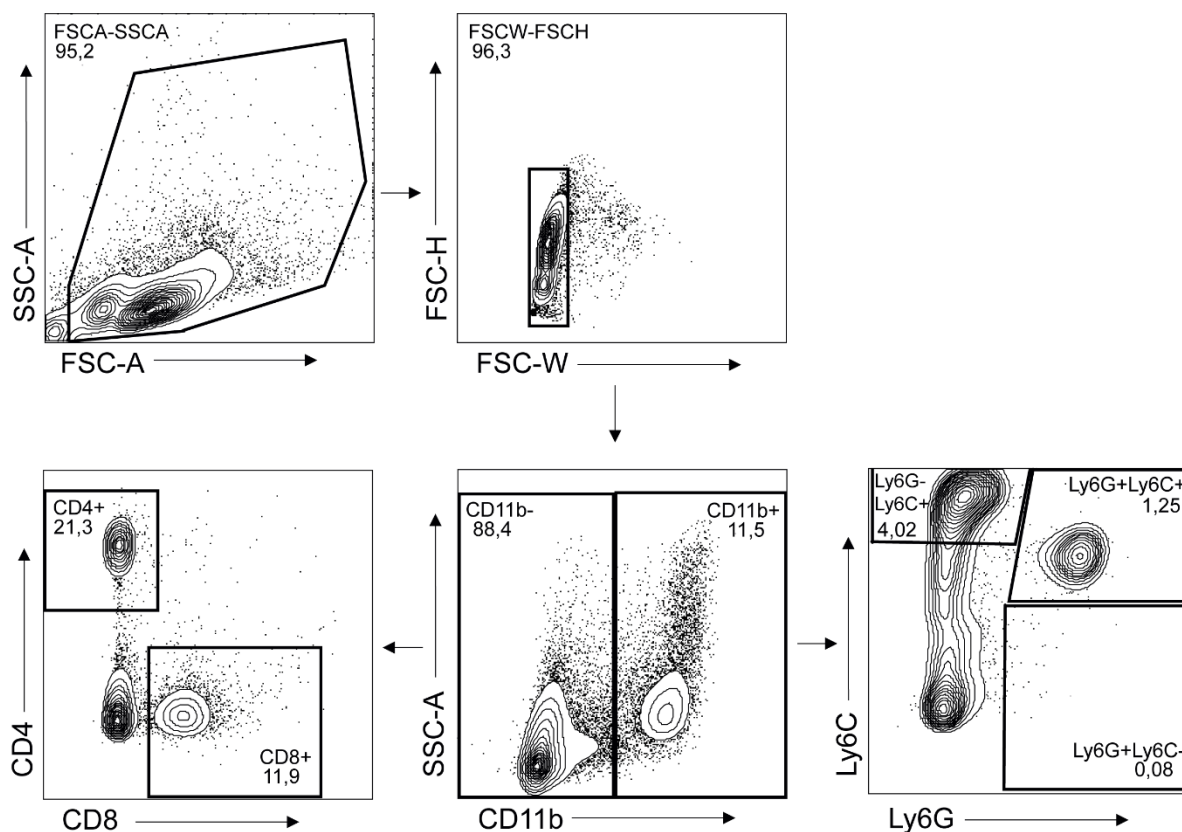
secundário anti-IgG Alexa Fluor 488 (clone A11006). Como controle, as células sofreram o mesmo procedimento e foram incubadas apenas com o anticorpo secundário. Os anticorpos utilizados foram da Cell Signaling. A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) e FACSaria II (BD Biosciences). Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo.

Na figura 5 mostramos *dot plots* representativos da análise da imunofenotipagem dos tumores. Enquanto que os *dot plots* mostrados na figura 6, são representativos da análise feita para a determinação das populações imunes infiltrantes de baço por citometria de fluxo.



**Figura 5.** *Dot plots* representativos da análise da imunofenotipagem dos tumores. As suspensões tumorais foram incubadas com anticorpos monoclonais indicados e analisadas por citometria de fluxo. As células do sistema imune foram avaliadas e determinada a população de leucócitos (CD45<sup>+</sup>). Dentro

da população de leucócitos foram identificadas as células mielóides (CD11b<sup>+</sup>) assim como linfócitos (CD11b<sup>-</sup>). Seguidamente foram analisadas as populações de neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>), os monócitos (Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>+</sup>) e das células de origem mielóide (Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>) dentro da população CD11b<sup>+</sup> enquanto que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> foram identificados na população CD11b<sup>-</sup>. Os valores nos *dot plots* representam a frequência das populações de células imunes em relação a população total de células tumorais.



**Figura 6.** *Dot plots* representativos da análise da imunofenotipagem dos baços. As suspensões de células de baço foram incubadas com anticorpos monoclonais indicados e analisadas por citometria de fluxo. As populações imunes avaliadas foram as células mielóides (CD11b<sup>+</sup>) e os linfócitos (CD11b<sup>-</sup>). Dentro da população de células CD11b<sup>+</sup> foram identificados os neutrófilos (Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>), os monócitos (Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>+</sup>) e as células de origem mielóide (Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>) que podem representar uma população mieloderivada supressora. Na população de células CD11b<sup>-</sup> foram analisados os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Os valores nos *dot plots* representam a frequência das populações em relação ao total de esplenócitos.

### 3.6. Ensaios de ativação de linfócitos T

Após o isolamento das suspensões de linfonodo, as células foram marcadas com Cell Dye 450 (Cat: 562158) (BD Biosciences), seguindo instruções do fabricante, para determinação da taxa de proliferação. Posteriormente, foram cultivadas  $2 \times 10^5$  células/poço em placas de 96



poços de fundo U em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF, na presença ou não dos peptídeos correspondentes a epítomos de E6/E7 (5 µg/mL) ou de PMA (10 ng/mL) e Isonomicina (1 µg/mL). Após 4 dias de incubação, as células foram marcadas com os anticorpos de superfície anti-CD4 PE-Cy5 (clone RM4-5) e anti-CD8 PE (clone 53-6.7). A proliferação foi determinada por citometria de fluxo mediante a diluição do Cell Dye nas populações de linfócitos T.

### **3.7. Imuofluorescência**

Fragmentos de tumor e baço de provenientes de camundongos C57BL/6 foram congelados em Tissue-Tek O.C.T (Sakura Finetek, The Netherlands) após coleta. Os tecidos foram cortados no criostato (5 µm de espessura), colocados em lâminas do tipo Superfrost Plus (Fisher Scientific, EUA) e foram fixados com uma solução de acetona e metanol em proporção de 2:1 durante 5 minutos a temperatura ambiente. Depois os tecidos foram secados ao ar e reidratados com PBS em três repetições. Em seguida foi feita a etapa de bloqueio com PBS contendo 5% de SBF durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foram incubados os anticorpos anti-p-STAT-3 (clone Tyr705 D3A7) e anti-p-NF-κB (clone Ser536 93H1) em tampão contendo PBS, 5% de SBF e 0,5% de NP-40 durante 30 minutos a temperatura ambiente para a marcação intracelular. Após feitas as lavagens dos tecidos em três repetições com PBS contendo 5% de SBF, foram incubados com o anticorpo secundário anti-IgG Alexa Fluor 488 (clone A11006) durante 30 minutos a temperatura ambiente e como controle, os tecidos sofreram o mesmo procedimento e foram incubadas apenas com o anticorpo secundário. Os anticorpos utilizados foram da Cell Signaling e da Invitrogen. Depois os tecidos foram lavados novamente e em seguida usado o meio de montagem Vectashield para fluorescência com DAPI. As imagens foram adquiridas no microscópio BX61 (Olympus, Japão).

### **3.8. Western Blot**

#### ***3.8.1. Extração de proteínas***

As suspensões celulares de baço também foram usadas para a extração de proteínas. De modo que foram utilizadas  $20 \times 10^6$  células e lavadas duas vezes com PBS. Seguidamente, foram

lisadas com tampão RIPA (50 mM de Tris HCl, pH 8,0; 150mM de NaCl, 0,1% de dodecilsulfato de sódio (SDS do inglês, *sodium dodecyl sulfate*), 1% de NP-40 e 0,5% de desoxicolato de sódio) contendo coquetel de inibidor de proteases para extratos de células e tecidos de mamíferos (P8340, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), bem como coquetel de inibidor de fosfatases (P0044, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células incubadas no tampão durante 30 minutos a 4°C e agitadas em vórtex a velocidade máxima para realização da lise celular. Em seguida, os lisados foram centrifugados a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e armazenados a uma temperatura de -20°C.

### **3.8.2. *Quantificação de proteínas***

Os sobrenadantes dos lisados de baço foram utilizados para realizar a quantificação de proteínas mediante o método de Bradford. Para isso, 200 µl de reagente comercial Biorad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), diluído previamente usando 4 partes de água e 1 parte de reagente, foram colocados em uma placa de 96 poços de fundo reto. Em seguida, foram adicionados 3 µl dos sobrenadantes fazendo triplicatas para cada amostra. Finalmente, foi realizada uma diluição seriada de uma solução a 1 mg/mL de albumina de soro bovino (BSA) para obtenção de uma curva padrão. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro a 595 nm e as concentrações das proteínas foram calculadas mediante a equação da reta baseada na curva padrão de BSA.

### **3.8.3. *Estudo de expressão de proteínas***

Após a determinação da concentração de proteínas dos lisados, foram usados 25 µg de cada lisado para fracionamento das proteínas por tamanho por eletroforese por SDS-PAGE em gel de 10% poliacrilamida. A corrida foi feita em uma cuba contendo tampão de corrida (25mM de Tris HCl, pH 8,3; 192mM de Glicina e 0,01% de SDS) a uma corrente constante de 80 volt a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. Em seguida, foi feita a transferência das proteínas do gel para uma membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) em tampão de transferência (25mM de Tris HCl, pH 8,3; 192mM de Glicina; 0,01% de SDS e 10% de metanol) a uma corrente fixa de 250 mA a temperatura de 4°C durante 1 hora e 30 minutos. Depois foi feita a etapa de bloqueio com 5% leite diluído em PBS contendo 0,1% Tween 20 durante

aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente em agitação. A membrana foi incubada durante a noite a 4°C em agitação com diferentes anticorpos de marcação intracelular tanto nas formas fosforiladas como os totais de STAT-3 e NF-κB. Como proteína de referência, representando o controle de quantidade de amostras, foi usado um anticorpo contra Tubulina. Seguidamente, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado com a enzima HRP (do inglês, *horseradish peroxidase*) durante 1 hora a temperatura ambiente em agitação. A detecção foi feita usando um substrato quimioluminescente ECL (Kit ECL; GE Healthcare, Little Chalfont, UK) e as bandas foram impressas em filmes de raios-X. As imagens foram computadorizadas e foi feita a densitometria do programa ImageJ.

### 3.9. Análise estatística

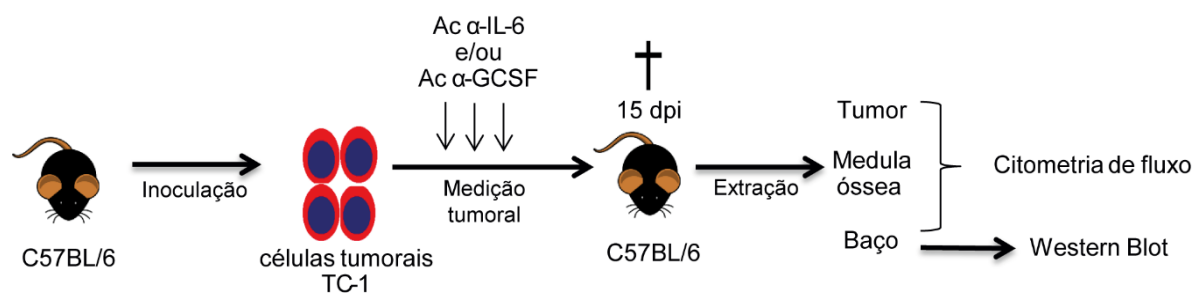
As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni, em experimentos com mais de dois grupos experimentais. Em experimentos com apenas dois grupos experimentais foi utilizado o “teste t” (não-pareado). Todos os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ . A análise estatística e os gráficos foram feitos usando o *GraphPad prism* versão 5.0 (*GraphPad Software*, San Diego, USA).

# RESULTADOS

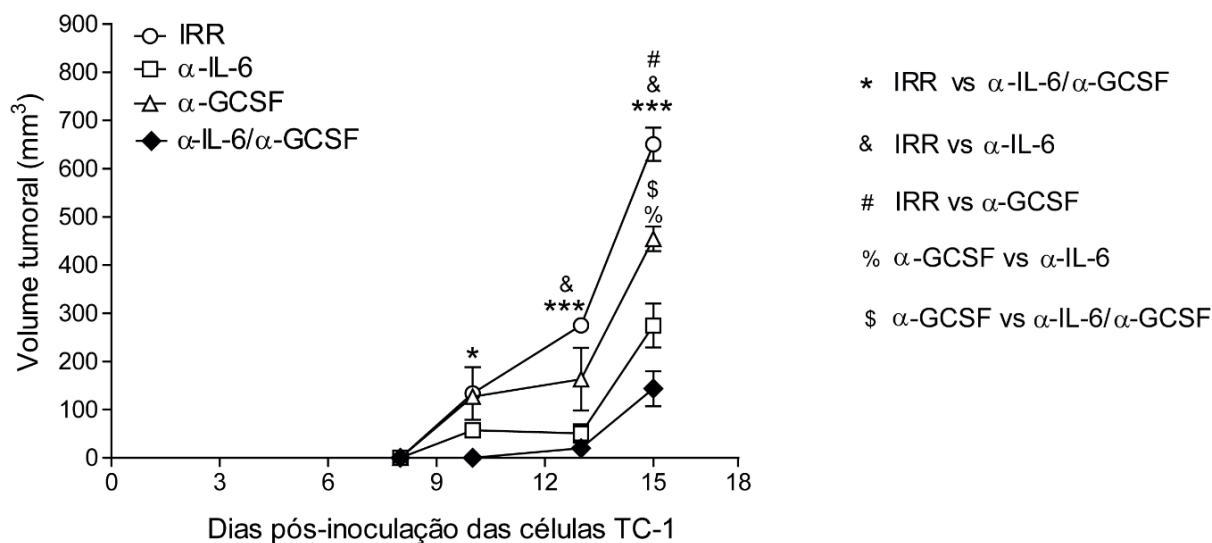
## 4. RESULTADOS

### 4.1. As citocinas IL-6 e G-CSF contribuem em conjunto no crescimento do tumor TC-1

Nosso grupo, assim como outros grupos de pesquisa, mostroua que as células transformadas por HPV expressam IL-6 e G-CSF (ALVAREZ; BELDI; SARMANHO; ROSSETTI *et al.*, 2017; MABUCHI; MATSUMOTO; KAWANO; MINAMI *et al.*, 2014; STONE; ROSSETTI; BOLPETTI; BOCCARDO *et al.*, 2014). Ambas citocinas ativam a via STAT-3, que é importante para a progressão do câncer (YAN; WEI; YUAN; SUN *et al.*, 2013). Desse modo, para caracterizar o papel da IL-6 e G-CSF em um modelo experimental associado ao HPV, animais C57BL/6 foram inoculados com  $1 \times 10^5$  células tumorais TC-1. Assim que os tumores foram palpáveis, os camundongos foram tratados com 50  $\mu\text{g}$  de anticorpos neutralizantes anti-G-CSF ( $\alpha$ -G-CSF) e/ou anti-IL-6 ( $\alpha$ -IL-6) a cada 3 dias (Figura 7). Também um dos grupos foi tratado com 50  $\mu\text{g}$  de anti-IgG denominado como grupo irrelevante (IRR) sendo nosso controle experimental. Nossos resultados mostraram que cada anticorpo neutralizante, de maneira independente, preveniu significativamente o crescimento do tumor, enquanto que a combinação de ambos foi ainda mais eficiente (Figura 8).



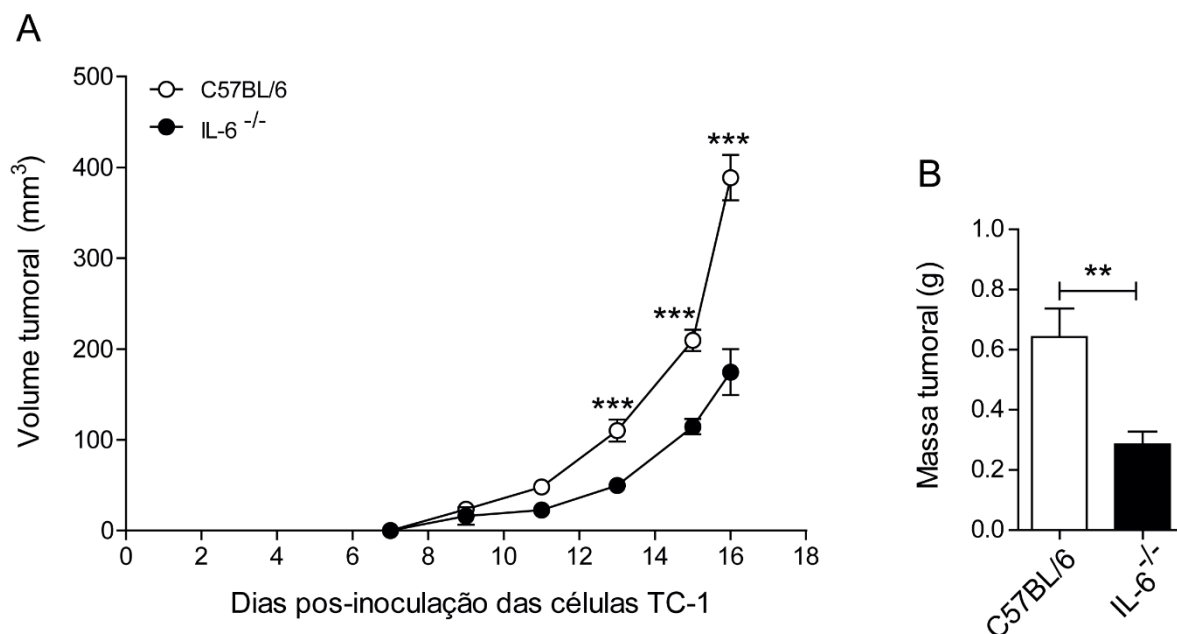
**Figura 7. Esquema geral dos procedimentos no experimento *in vivo* de tratamento com os anticorpos neutralizantes.** Animais C57BL/6 foram inoculados com  $1 \times 10^5$  células tumorais TC-1 por via s.c no dorso superior direito. Assim que os tumores foram palpáveis, os camundongos foram tratados por via i.p com 50  $\mu\text{g}$  de anticorpo neutralizante anti-G-CSF ( $\alpha$ -G-CSF) e/ou 50  $\mu\text{g}$  de anti-IL-6 ( $\alpha$ -IL-6) a cada 3 dias. Também um dos grupos foi tratado com 50  $\mu\text{g}$  de anti-IgG ( $\alpha$ -IgG) denominado como grupo irrelevante (IRR) sendo nosso controle experimental. O crescimento do tumor foi acompanhado até o dia 15<sup>o</sup> dpi, data que os animais foram eutanasiados sendo realizada a extração de baço, medula óssea e os tumores. Após da coleta dos órgãos foram obtidas as suspensões celulares e utilizadas na citometria de fluxo assim como uma parte das suspensões de baço foram destinadas para realizar Western Blot.



**Figura 8. A neutralização de IL-6 e G-CSF inibe o crescimento do tumor TC-1.** Camundongos C57BL/6 foram inoculados com  $1 \times 10^5$  células tumorais TC-1 por via s.c no dorso superior direito. O volume dos tumores foi medido a partir do 8º dpi e 50 µg dos anticorpos neutralizantes foram administrados: α-IgG (irrelevante) ou α-IL-6 ou α-G-CSF ou α-G-CSF/α-IL-6 a cada 3 dias por via i.p até o dia 15º dpi. Os dados representam a média ± SEM de três animais por grupo experimental (\* p < 0,05; \*\*\* p < 0,001).

#### 4.1.1. A citocina IL-6 é importante para o crescimento do tumor TC-1

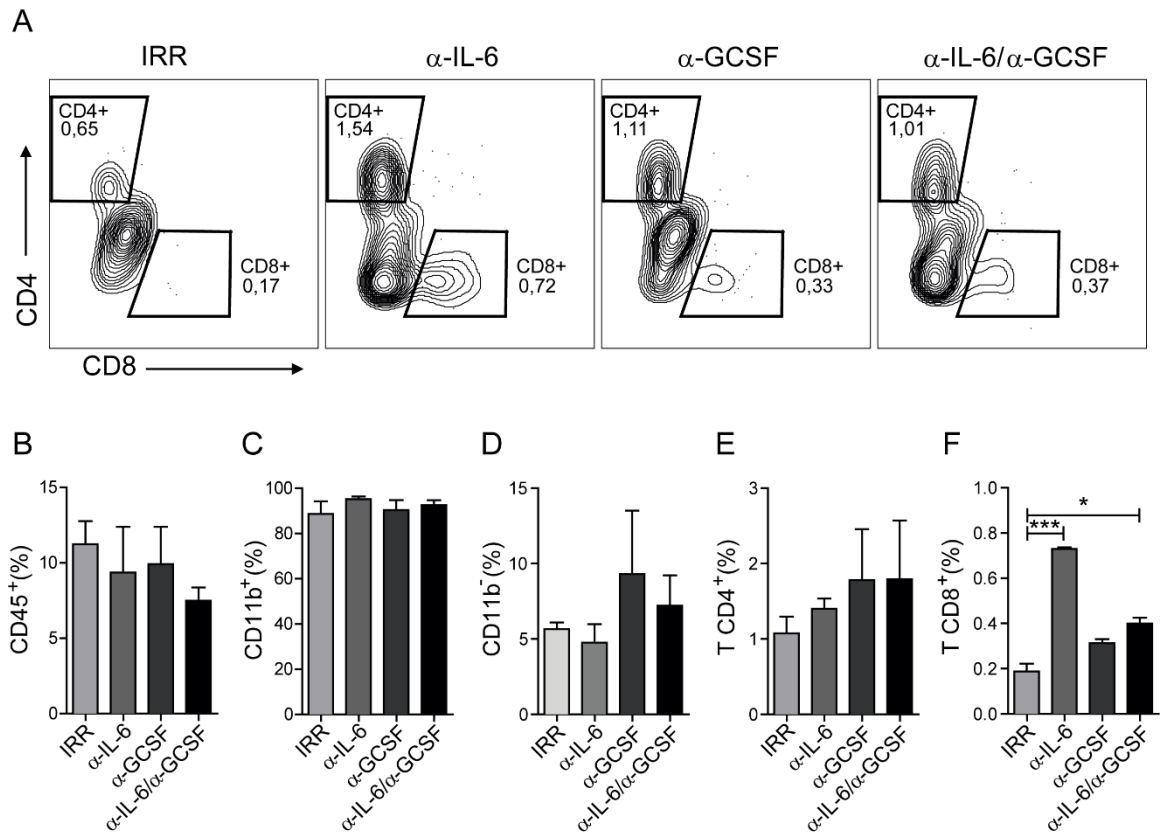
Para corroborar o papel de IL-6 durante o desenvolvimento do tumor TC-1, camundongos C57BL/6 e animais geneticamente deficientes em IL-6 (IL-6<sup>-/-</sup>) foram inoculados com  $1 \times 10^5$  células tumorais TC-1. O tamanho dos tumores foi medido a partir do 7º dpi das células. Nossos resultados mostraram que os animais IL-6<sup>-/-</sup> apresentaram uma redução significativa do volume tumoral (Figura 9A) assim como da massa tumoral (Figura 9B) quando comparados com animais C57BL/6, confirmando os resultados previamente observados com a utilização do anticorpo neutralizante anti-IL-6.



**Figura 9. Ausência de IL-6 promove a redução do crescimento do tumor TC-1.** Camundongos C57BL/6 e IL-6<sup>-/-</sup> foram injetados com  $1 \times 10^5$  células tumorais TC-1 por via s.c no dorso superior direito. O volume dos tumores (A) foi medido a partir do 7° dpi. A massa dos tumores (B) foi medido no 16° dpi. Os dados são representativos de três experimentos independentes e representam a média  $\pm$  SEM de cinco animais por grupo experimental (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.1.2. Neutralização de IL-6 e G-CSF promove o aumento de infiltração de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no microambiente tumoral

Para avaliar os efeitos gerados mediante a inibição de IL-6 e G-CSF sobre as populações imunes presentes no microambiente tumoral, os tumores do experimento representado na Figura 7 foram digeridos e as suspensões de células foram marcadas com um painel de anticorpos para determinação das populações de leucócitos infiltrantes de tumores. Observamos um aumento significativo de infiltração de células T CD8<sup>+</sup> (Figura 10A e F) nas suspensões de tumores provenientes de animais tratados com anticorpo  $\alpha$ -IL-6 ou  $\alpha$ -IL-6/ $\alpha$ -G-CSF quando comparado com as células infiltrantes de tumores extraídos dos animais pertencentes ao grupo irrelevante (controle). Em contraste, a frequência dos leucócitos (Figura 10B), das células mielóides (Figura 10C), dos linfócitos (Figura 10D) e dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 10E) foi similar entre os tumores provenientes dos diferentes grupos estudados quando foram analisados por citometria de fluxo.

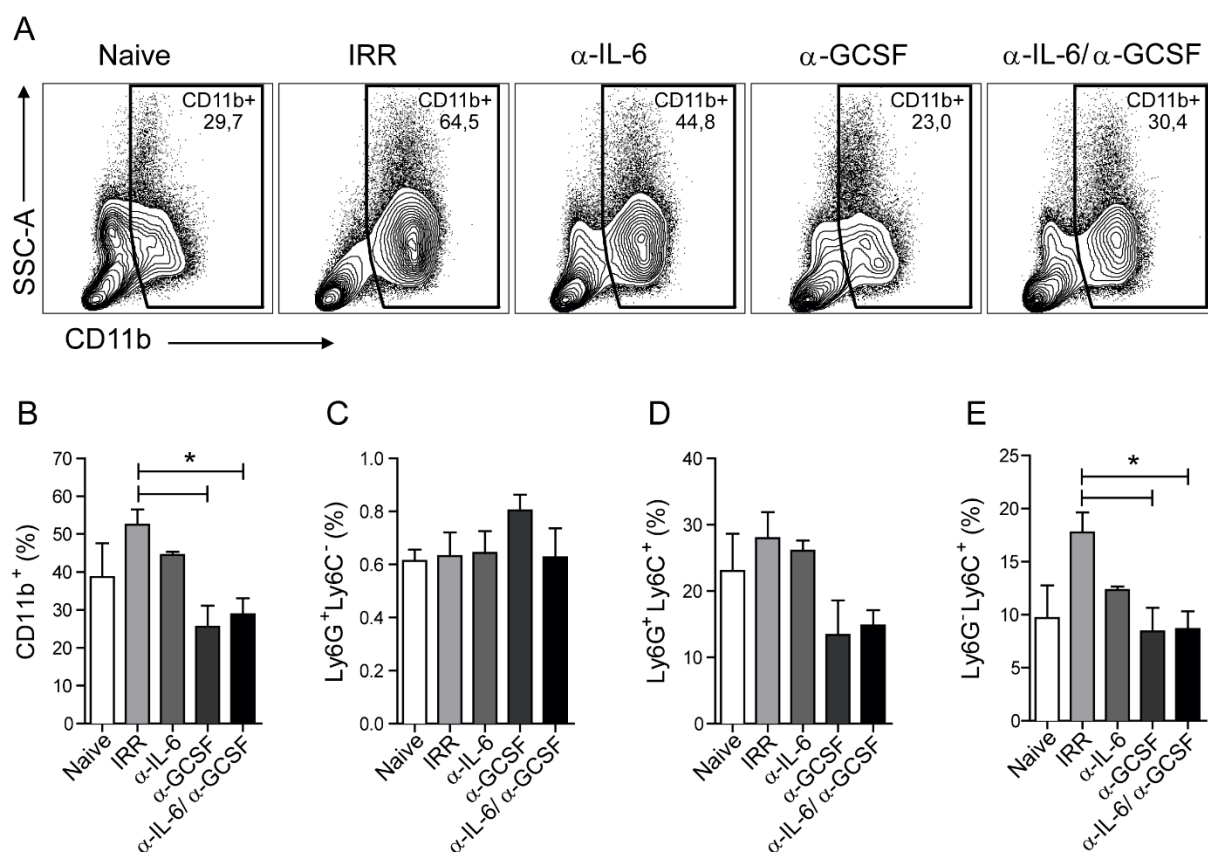


**Figura 10. A neutralização combinada das citocinas promove o aumento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no tumor.** Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao protocolo de indução do tumor. No 15<sup>o</sup> dpi foram coletados e digeridos com Colagenase I/IV os tumores. Por citometria de fluxo foi determinada a frequência das populações de células imunes em relação a população total de células tumorais. A frequência dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> presentes no tumor está representada em forma de *dot plots* (A) e em gráficos de barras (E; F) respectivamente e a frequência dos leucócitos (B), células mielóides (C) e linfócitos (D) está representada em forma de gráficos de barras. Os dados representam a média ± SEM de três animais por grupo experimental (\* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001).

#### 4.1.3. Ausência de IL-6 e G-CSF promove a redução da frequência de células mielóides e dos monócitos na medula óssea

Para avaliar as consequências a nível sistêmico do bloqueio das citocinas estudadas, foi feita a extração da medula óssea dos diferentes grupos incluindo os animais naive e foram caracterizadas por citometria de fluxo as células do sistema imune presentes nas suspensões celulares. Nossos resultados mostraram uma redução significativa na frequência das células mielóides (Figura 11A e B) assim como dos monócitos (Figura 11E) nos grupos de animais que receberam o α-G-CSF ou combinação de ambos anticorpos na medula óssea. No entanto, a frequência dos neutrófilos (Figura 11C) e das células de origem mielóides Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> (Figura 11D), foi semelhante entre os diferentes grupos avaliados.



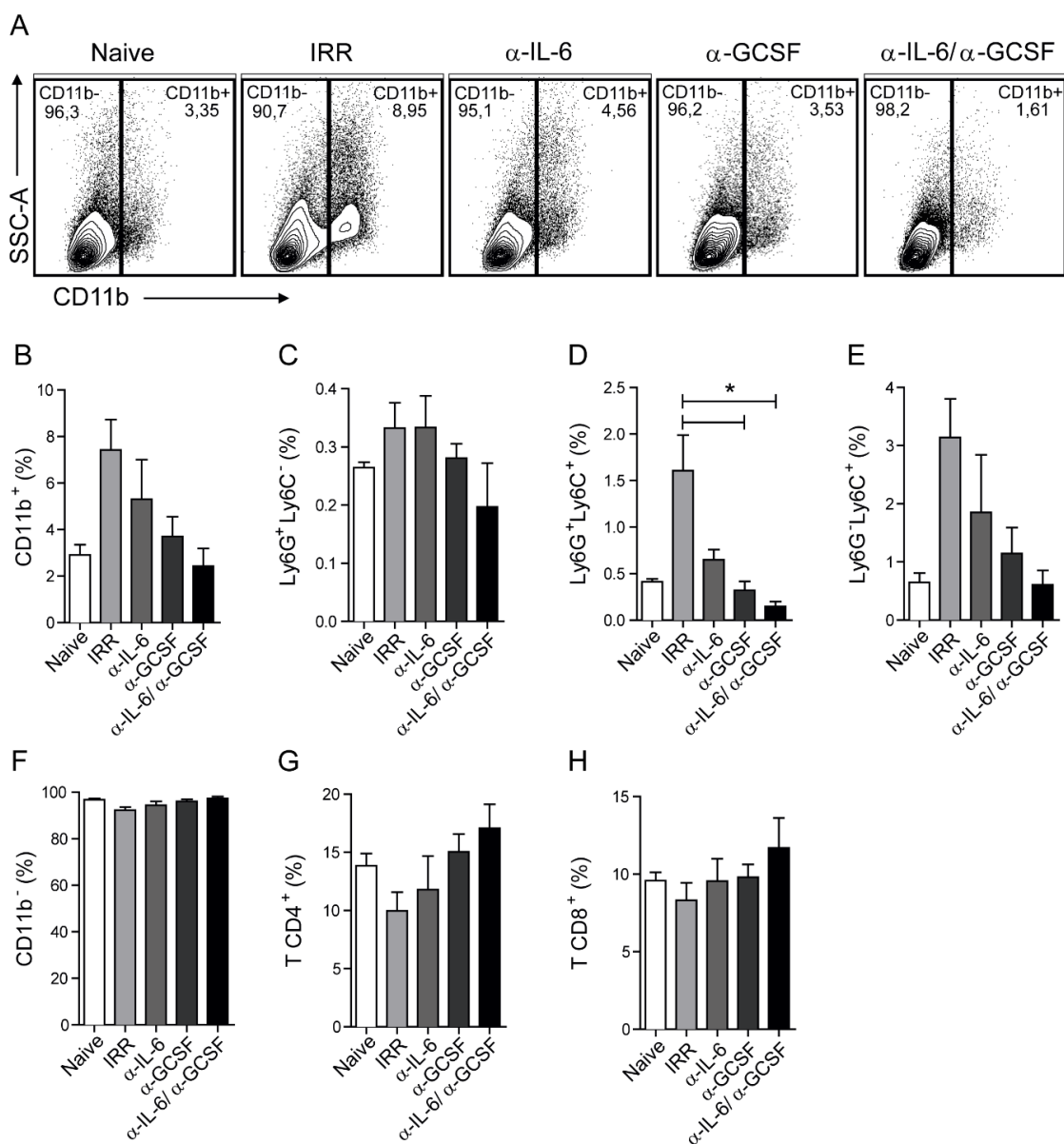


**Figura 11. O bloqueio de IL-6 e G-CSF reduz a frequência de células mielóides e dos monócitos na medula óssea.** As células isoladas da medula óssea de animais submetidos ou não (naive) ao tratamento com diferentes anticorpos neutralizantes foram analisadas por citometria de fluxo. A frequência das células mielóides está representada em forma de *dot plots* (A) e em gráficos de barras (B) enquanto que a frequência dos neutrófilos (B), das células de origem mielóide Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup> (C) e dos monócitos (D) está representada em gráficos de barras. Os dados representam a média ± SEM de três animais por grupo experimental (\* p < 0,05).

#### 4.1.4. O bloqueio de IL-6 e G-CSF reduz a frequência das células de origem mielóide Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> no baço

Para estudar outras consequências sistêmicas do bloqueio de IL-6 e G-CSF foram também coletados e processados os baços dos diferentes grupos, incluindo os animais naive. A caracterização fenotípica das populações de células imunes presentes nas suspensões obtidas foi realizada por citometria de fluxo. Nossos resultados não mostraram diferenças na frequência das células mielóides (Figura 12A e B) obtidas do baço entre os grupos avaliados. No entanto, observou-se uma redução significativa na frequência das células de origem mielóide Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup>, que podem representar uma população mieloderivada supressora, embora as mesmas

ainda não tenham sido testadas para esse fenótipo (Figura 12D), nas amostras provenientes dos baços dos animais que receberam o tratamento com  $\alpha$ -G-CSF, assim como a combinação terapêutica em comparação com o grupo irrelevante. Em contraste, não houveram diferenças significativas na frequência dos neutrófilos (Figura 12C) e dos monócitos (Figura 12E) entre os grupos. Finalmente, foram avaliados os linfócitos (Figura 12A e F) provenientes das células isoladas dos baços dos animais de cada grupo experimental e nossos resultados não mostraram diferenças significativas na frequência desta população, nem na frequência dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 12G) ou dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Figura 12H) entre os grupos.

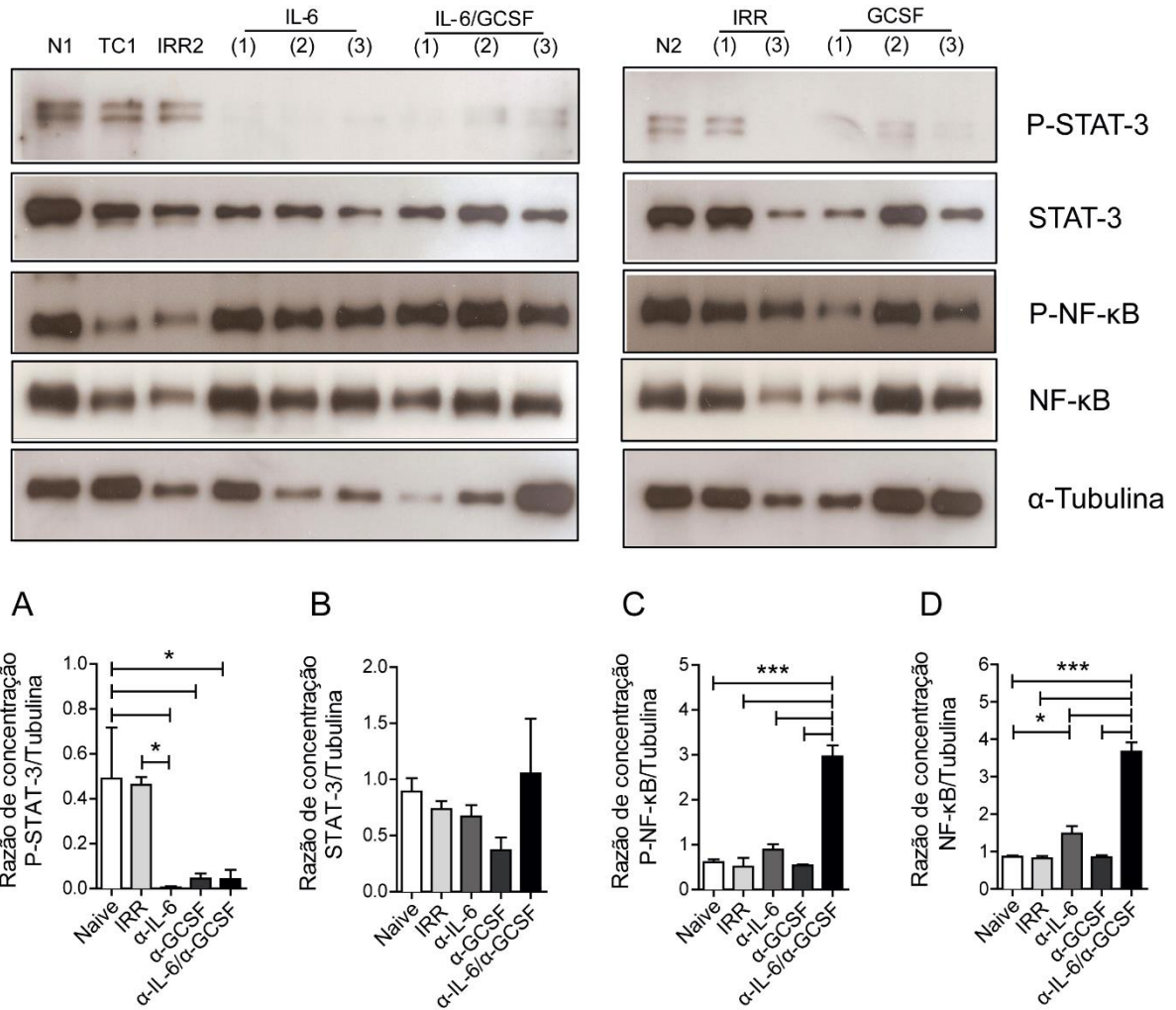


**Figura 12.** A neutralização de IL-6 e G-CSF favorece a redução da frequência das células de origem mielóide Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> no baço. As suspensões celulares de baço foram obtidas de animais submetidos ou não ao tratamento com diferentes anticorpos neutralizantes e analisadas por citometria

de fluxo a frequência das populações de células imunes em relação a população total de células no baço. A frequência células mielóides (CD11b<sup>+</sup>) e os linfócitos (CD11b<sup>-</sup>) presentes no baço está representada em forma de *dot plots* (A) e em gráficos de barras (B e F) respectivamente. A frequência dos neutrófilos (C), das células de origem mielóide Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> (D), monócitos (E), linfócitos T CD4<sup>+</sup> (G) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (H) está representada em forma de gráficos de barras. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três animais por grupo experimental (\*  $p < 0,05$ ).

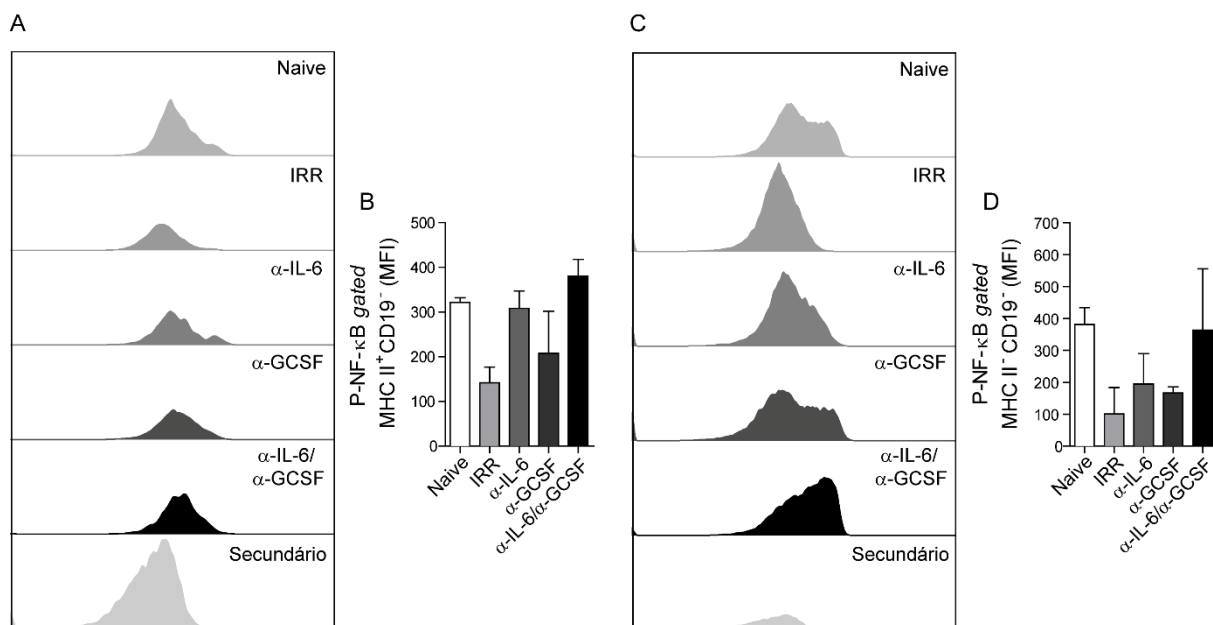
#### ***4.1.5. Deficiência de IL-6 e G-CSF promove aumento da expressão de p65 fosforilada na via de sinalização de NF- $\kappa$ B no baço***

Trabalhos realizados em nosso laboratório demonstraram os macrófagos tumorais secretam IL-10, citocina importante no estabelecimento de tolerância aos antígenos tumorais, induzindo a diferenciação de células T reguladoras, e inibindo a apresentação de antígenos através da inibição parcial da sinalização por NF- $\kappa$ B (STONE; ROSSETTI; BOLPETTI; BOCCARDO *et al.*, 2014). Assim, para relacionar os efeitos locais do microambiente tumoral com os efeitos sistêmicos sobre o sistema imune e as interações entre as diferentes vias de sinalização nas células, uma parte das suspensões de baços de animais C57BL/6 naive ou com tumores TC-1 tratados com anticorpos neutralizantes de IL-6 e G-CSF de forma independente ou em combinação, foram usadas para a extração de proteínas. Dos lisados, foram usados 25  $\mu$ g de proteínas e o fracionamento das proteínas foi por massa molecular usando uma eletroforese de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%. As proteínas foram transferidas a membrana de PVDF sendo incubada com diferentes anticorpos de detecção de moléculas intracelulares de vias de sinalização. Se observou uma redução significativa da expressão de P-STAT-3 (Figura 13A) nos lisados de baço de animais que apresentaram tumores tratados com os neutralizantes por separado ou com a combinação. Enquanto a concentração STAT-3 total (Figura 13B) não apresentou diferenças entre os diferentes grupos experimentais. Enquanto a forma fosforilada (Figura 13C) e total de NF- $\kappa$ B (Figura 13D) apresentaram um aumento significativo nas amostras de baço dos animais tratados com a combinação dos neutralizantes das citocinas estudadas em comparação com os restantes grupos experimentais.



**Figura 13. Vias de sinalização no baço de animais tratados com neutralizantes de IL-6 e G-CSF.** Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao protocolo de indução do tumor TC-1. As suspensões celulares de baço foram obtidas de animais submetidos ou não ao tratamento com diferentes anticorpos neutralizantes e submetidas ao processo de extração de proteínas. Por Western Blot foi feita a detecção de proteínas totais (B e D) e fosforiladas (A e C) envolvidas na transdução de sinais. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três animais por grupo experimental (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

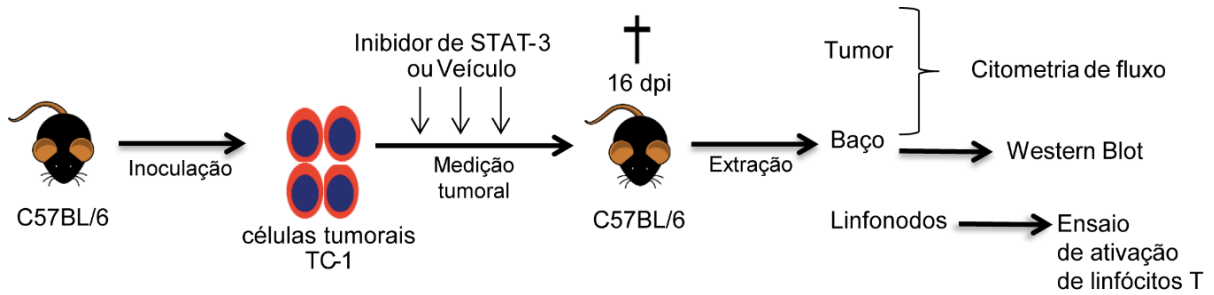
Por citometria de fluxo foram corroborados esses resultados de modo que foram determinadas as populações celulares do baço bem como o estado de ativação da via de sinalização de NF- $\kappa$ B nestas células. Embora não seja significativo, se observou um aumento da expressão da forma fosforilada de NF- $\kappa$ B (Figura 14A e B) nas células apresentadoras de antígenos (MHC II<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) nas suspensões de baço provenientes dos animais que receberam tratamento com os anticorpos neutralizantes de maneira independente assim como a combinação quando comparados com o grupo irrelevante. Este efeito foi acompanhado pelo aumento da fosforilação de NF- $\kappa$ B nos linfócitos T (Figura 14C e D) do grupo tratado com a combinação terapêutica em comparação com o grupo controle (irrelevante).



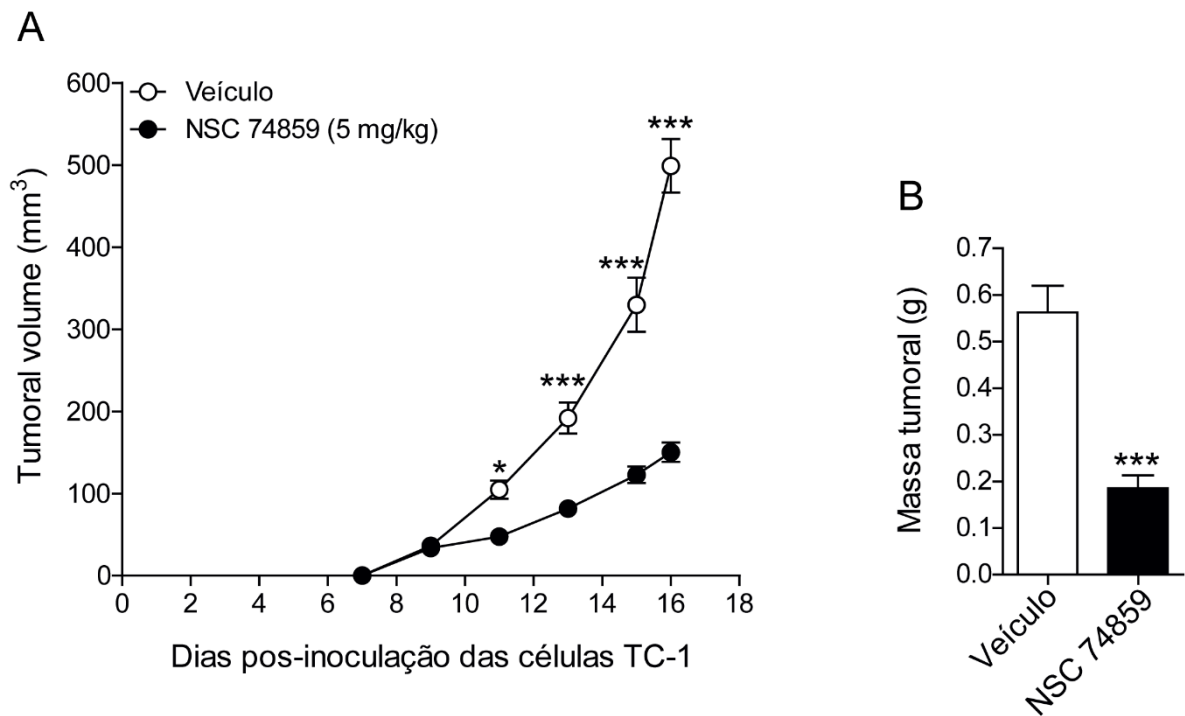
**Figura 14. A neutralização de IL-6 e G-CSF promove a fosforilação de NF-κB no baço.** As suspensões celulares de baço foram obtidas de animais submetidos ou não ao tratamento com diferentes anticorpos neutralizantes e após a marcação de moléculas de superfície, foram fixadas, permeabilizadas e foi realizada a marcação intracelular para estudar a via de NF-κB por citometria de fluxo. A intensidade média de fluorescência (MFI) de P-NF-κB das APCs presentes no baço está representada em forma de histograma (A) e em gráficos de barras (B) assim como dos linfócitos T (C e D). Os dados representam a média ± SEM de três animais por grupo experimental.

#### 4.2. Inibição de STAT-3 previne o crescimento do tumor

Nós hipotetizamos que a via STAT-3 poderia interferir na sinalização de NF-κB, baseados nos dados anteriormente mostrados assim como em outros estudos desenvolvidos em nosso laboratório, os quais mostraram que em amostras de pacientes com câncer do colo uterino, a via de sinalização de NF-κB se encontra parcialmente inibida em leucócitos, APCs e nos linfócitos T. De modo que após induzir os tumores em camundongos C57BL/6 foram tratados com 5 mg/kg de NSC 74859 (inibidor farmacológico de STAT-3) ou com o veículo (PBS 1x + 2% DMSO) diariamente, até o 16<sup>o</sup> dpi. O tamanho dos tumores foi medido a partir do 7<sup>o</sup> dpi das células tumorais TC-1 (Figura 15). Nossos resultados mostraram que a inibição da STAT-3 reduziu significativamente o crescimento tumoral (Figura 16A) assim como a massa do tumor (Figura 16B) quando comparados com animais do grupo veículo (controle).



**Figura 15. Esquema geral dos procedimentos no experimento *in vivo* de tratamento com o inibidor farmacológico de STAT-3.** Camundongos C57BL/6 foram inoculados com  $1 \times 10^5$  células TC-1 por via s.c no dorso superior direito. Após a detecção do tumor o 7º dpi das células tumorais, foi medido o tamanho dos tumores e os animais foram tratados por via i.p com 5 mg/kg de NSC 74859 (inibidor farmacológico de STAT-3) ou com o veículo (PBS 1x + 2% DMSO) diariamente. Aos 16º dpi, foram coletados dos animais eutanasiados os baços, linfonodos assim como os tumores. Após da coleta dos órgãos foram obtidas as suspensões celulares de baço e tumor, sendo utilizadas na citometria de fluxo e Western Blot, enquanto que as suspensões de linfonodos foram utilizadas no experimento *in vitro* de ativação dos linfócitos T.

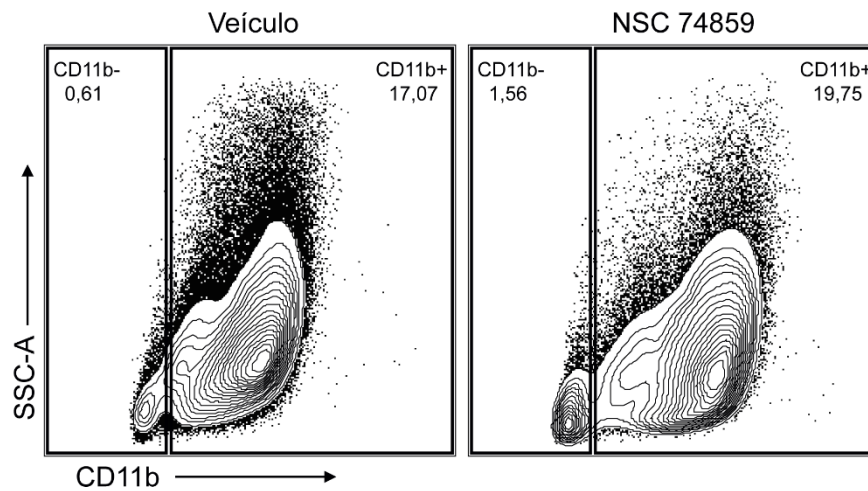


**Figura 16. Inibição de STAT-3 previne o crescimento tumoral.** Camundongos C57BL/6 foram inoculados com  $1 \times 10^5$  células tumorais TC-1 por via s.c no dorso superior direito. O volume dos tumores (A) foi medido a partir do 7º dpi e em seguida os animais foram tratados por via i.p com 5 mg/kg de NSC 74859 ou com o veículo diariamente. A massa dos tumores (B) foi medida no 16º dpi. Os dados são representativos de dois experimentos independentes e representam a média  $\pm$  SEM de cinco animais por grupo experimental (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

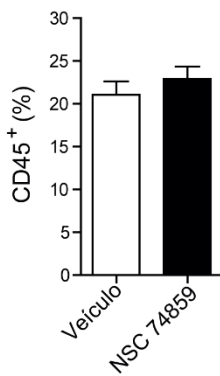
#### ***4.2.1. Neutralização de STAT-3 promove o aumento de infiltração de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no microambiente tumoral***

Em seguida para avaliar os efeitos gerados pela a inibição de STAT-3 sobre o infiltrado inflamatório presente no microambiente tumoral, foram coletados e processados os tumores provenientes dos animais que receberam o tratamento com o inibidor farmacológico de STAT-3 ou com o veículo e avaliamos por citometria de fluxo as populações imunes presentes nas suspensões tumorais. Nossos resultados mostraram um aumento significativo de infiltração de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Figura 17I) nas suspensões celulares provenientes de tumores do grupo de animais tratados com bloqueador de STAT-3 em comparação a frequência destas populações imunes observadas nas suspensões provenientes do grupo veículo. Em contraste, a frequência dos leucócitos (Figura 17B), das células mielóides (Figura 17A e C), dos neutrófilos (Figura 17D), das células de origem mielóide Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> (Figura 17E), dos monócitos (Figura 17F), de linfócitos (Figura 17A e G) e das células T CD4<sup>+</sup> (Figura 17H) foram similares entre os dois grupos avaliados.

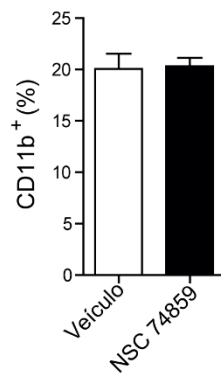
A



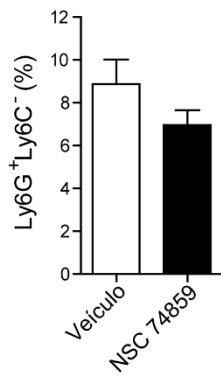
B



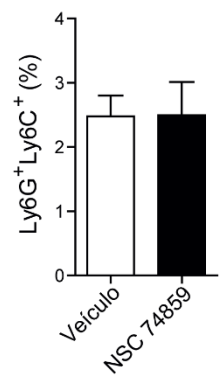
C



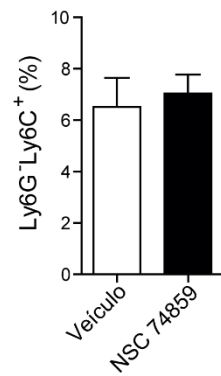
D



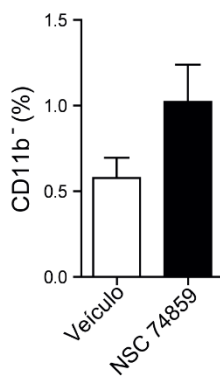
E



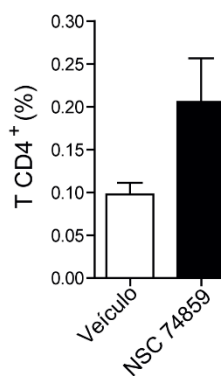
F



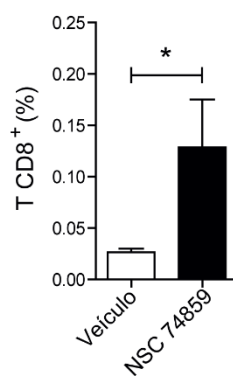
G



H



I



**Figura 17. Bloqueio de STAT-3 promove o aumento de infiltração de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no tumor.**

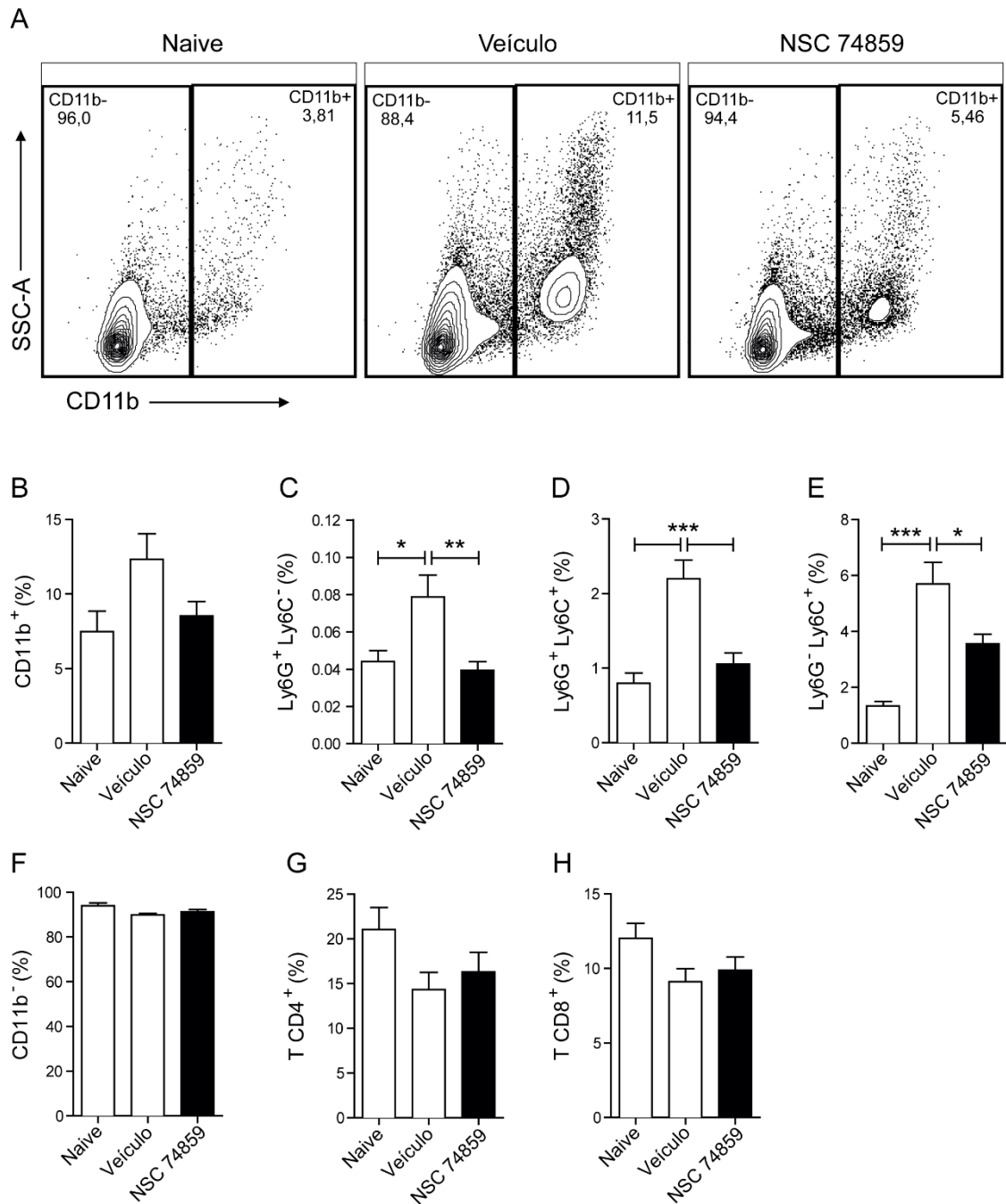
Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao protocolo de indução do tumor TC-1 e tratados ou não com o inibidor de STAT-3 (5 mg/kg). No 16<sup>o</sup> dpi foram coletados e processados os tumores. Por citometria de fluxo foi determinada a frequência das populações de células imunes em relação a população total de células tumorais. A frequência das células mielóides e linfócitos presentes no tumor está representada em forma de *dot plots* (A) e em gráficos de barras (C e G) respectivamente. A frequência dos leucócitos (B), dos neutrófilos (D), das células de origem mielóide Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> (E), monócitos (F), linfócitos T CD4<sup>+</sup> (H) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (I) está representada em forma de gráficos de



barras. Os dados são representativos de dois experimentos independentes e representam a média  $\pm$  SEM de cinco animais por grupo experimental (\*  $p < 0,05$ ).

#### ***4.2.2. A inibição de STAT-3 reduz a frequência dos neutrófilos, de células de origem mielóide Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> e dos monócitos no baço***

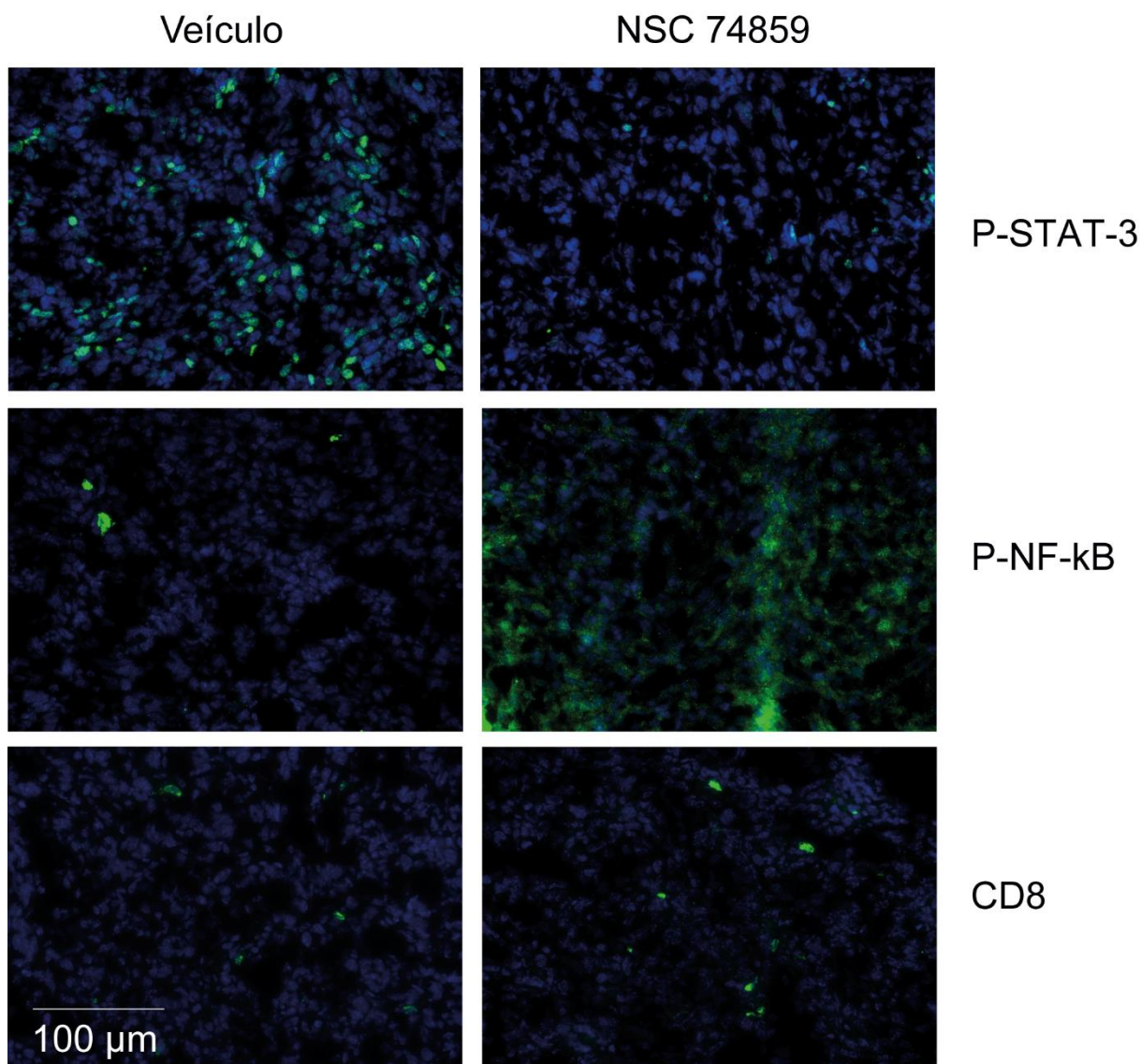
A fim de avaliar os efeitos sistêmicos diretos da inibição de STAT-3 sobre as células do sistema imune, foram isoladas as células dos baços de animais submetidos ou não ao bloqueio de STAT-3. Observa-se uma diminuição significativa na frequência dos neutrófilos (Figura 18C), das células de origem mielóide Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> (Figura 29D) e dos monócitos (Figura 18E) nas suspensões de baço dos animais que apresentaram tumor e receberam o tratamento com o inibidor de STAT-3 assim como nos animais do grupo naive em comparação com as amostras dos animais do grupo veículo. No entanto, não foram apreciadas diferenças estatísticas na frequência das células mielóides (Figura 18A e B), dos linfócitos (Figura 18A e F), dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 18G) e dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Figura 18H) de baço dos camundongos com tumor tratados com o bloqueador da via estudada quando comparados com as suspensões de baço provenientes do grupo veículo ou do grupo naive.



**Figura 18. A inibição de STAT-3 reduz a frequência dos neutrófilos, de células de origem mielóide Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> e dos monócitos no baço.** As suspensões celulares de baço foram obtidas de animais submetidos ou não ao tratamento com o inibidor farmacológico NSC 74859 e analisadas por citometria de fluxo. A frequência das populações de células imunes em relação a população total de células no baço. A frequência células mielóides e os linfócitos presentes no baço está representada em forma de *dot plots* (A) e em gráficos de barras (B e F) respectivamente. A frequência dos neutrófilos (C), das células de origem mielóide Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> (D), monócitos (E), linfócitos T CD4<sup>+</sup> (G) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (H) está representada em forma de gráficos de barras. Os dados são representativos de dois experimentos independentes e representam a média  $\pm$  SEM de cinco animais por grupo experimental (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### ***4.2.3. Inibição de STAT-3 reduz a ativação da via no microambiente tumoral e promove a ativação da via de sinalização de NF- $\kappa$ B***

Para comprovar os efeitos na transdução de sinais intracelulares nas células infiltrantes de tumor nos animais tratados ou não farmacologicamente com o NSC 74859, foram congelados fragmentos de tumor e marcadas as moléculas de superfície nos tecidos obtidos. Seguidamente, foram fixadas, permeabilizadas e foi realizada a marcação intracelular para estudo da via de sinalização de STAT-3 e NF- $\kappa$ B por imunofluorescência. Estes resultados obtidos pela professora Ana Paula Lepique como parte do nosso projeto, mostraram uma diminuição na fosforilação de STAT-3 nas amostras dos tumores (Figura 19) isolados do grupo tratado com o inibidor quando comparado com o grupo veículo, localizando-se fundamentalmente nos núcleos das células tumorais de animais do grupo controle. Além disso, observamos um aumento da fosforilação de p65 NF- $\kappa$ B (Figura 19) nos tumores obtidos do grupo tratado com o NSC 74859 em comparação com o grupo veículo, localizando-se nos núcleos de algumas células e citoplasma de outras células em forma de grânulos. Este efeito foi acompanhado do aumento na população de leucócitos TCD8<sup>+</sup> (Figura 19) presentes no tumor de animais que receberam o tratamento com o inibidor farmacológico de STAT-3 em comparação com o grupo controle.

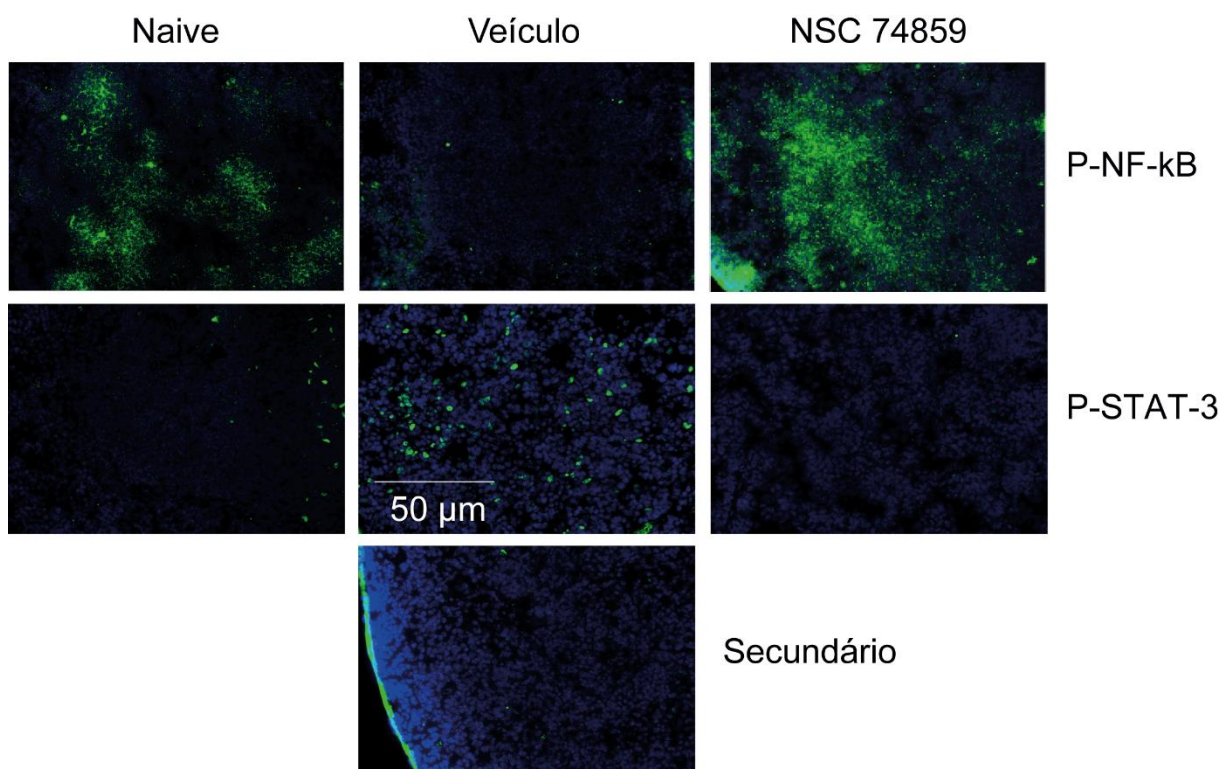


**Figura 19.** O bloqueio de STAT-3 promove a fosforilação da via de sinalização de NF- $\kappa$ B e promove a infiltração de células T CD8<sup>+</sup> no tumor. Camundongos C57BL/6 foram inoculados com  $1 \times 10^5$  células TC-1 e após a detecção dos tumores foram tratados ou não com o inibidor de STAT-3 (5 mg/kg). No 16<sup>o</sup> dpi foram coletados, congelados em Tissue-Tek O.C.T fragmentos dos tumores. Os tecidos de tumor dispostos em lâminas foram submetidas ao processo de marcação intracelular para estudo das vias de sinalização de P-STAT-3 e P-NF- $\kappa$ B assim como a marcação de superfície das células TCD8<sup>+</sup> infiltrantes do tumor. Em azul foi feita a marcação com DAPI e a marcação em verde é específica para cada um dos marcadores estudados.

#### **4.2.4. A inibição de STAT-3 reduz a fosforilação desta via no baço induz a ativação de NF- $\kappa$ B**

Para avaliar os efeitos sistêmicos do bloqueio na via de transdução de sinais intracelulares STAT-3 na fosforilação desta via ou da sinalização de NF- $\kappa$ B no baço dos animais naive ou com tumores tratados ou não com o NSC 74859, foram congelados fragmentos

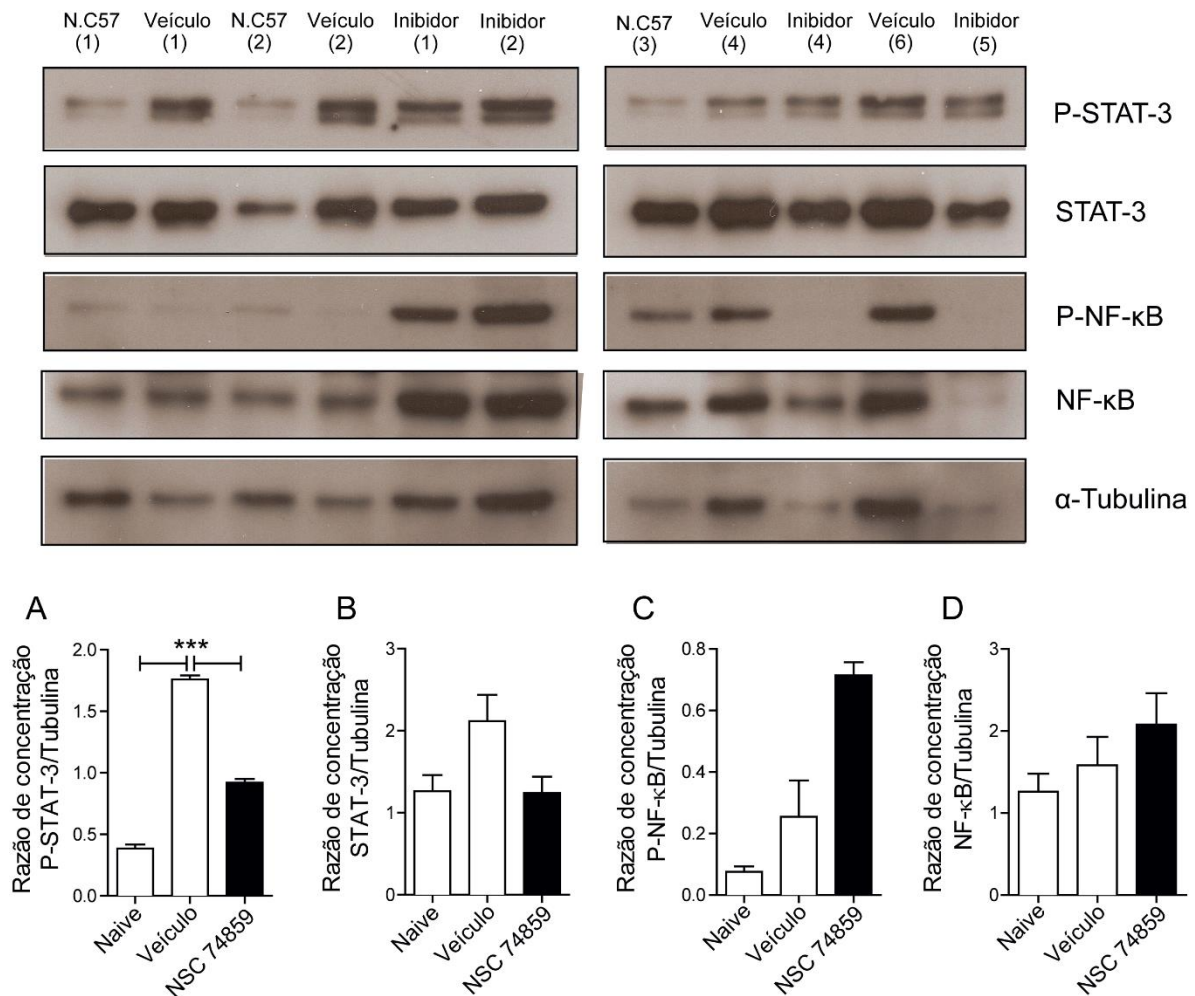
de baço e submetidos ao processo de marcação intracelular. Se observou um aumento da fosforilação de STAT-3 nas amostras de baço provenientes do grupo veículo quando comparado com as amostras provenientes dos baços de animais tratados com o NSC 74859 ou do grupo naive (Figura 20). Também podemos apreciar um aumento da fosforilação de NF- $\kappa$ B (Figura 20) nas amostras de baço provenientes do grupo de animais tratados com o inibidor de STAT-3 quando comparado com as amostras de baço do grupo controle.



**Figura 20. A inibição de STAT-3 induz a ativação de NF- $\kappa$ B no baço.** Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao protocolo de indução do tumor TC-1 e tratados ou não com o inibidor de STAT-3 (5 mg/kg). No 16<sup>o</sup> dpi foram coletados, congelados em Tissue-Tek O.C.T fragmentos de baço. Os tecidos dispostos em lâminas foram submetidas ao processo de marcação intracelular para estudo das vias de sinalização de P-STAT-3 e P-NF- $\kappa$ B. Em azul foi feita a marcação com DAPI e a marcação em verde é específica para cada um dos marcadores estudados.

Para corroborar os efeitos sistêmicos do bloqueio de STAT-3 sobre outras vias de sinalização intracelular importantes para a ativação da resposta imune contra tumores, uma parte das suspensões de baços de animais C57BL/6 naive o com tumores TC-1 tratados ou não com o NSC 74859 foram usadas para a extração de proteínas. A determinação da ativação das vias de STAT-3 e NF- $\kappa$ B foi feita por Western Blot. Podemos apreciar um aumento significativo da expressão da forma fosforilada de STAT-3 (Figura 21A) nos lisados de baço do grupo

veículo com respeito ao grupo tratado com o NSC 74859 assim como do grupo naive. Entretanto, embora não seja significativo, observa-se um aumento da fosforilação de NF- $\kappa$ B (Figura 21C) nas amostras de baço do grupo tratado com o NSC 74859 com respeito as amostras provenientes do grupo veículo. Enquanto a forma total de STAT-3 (Figura 21B) e forma total de NF- $\kappa$ B (Figura 21D) não apresentaram diferenças entre os diferentes grupos experimentais estudados.

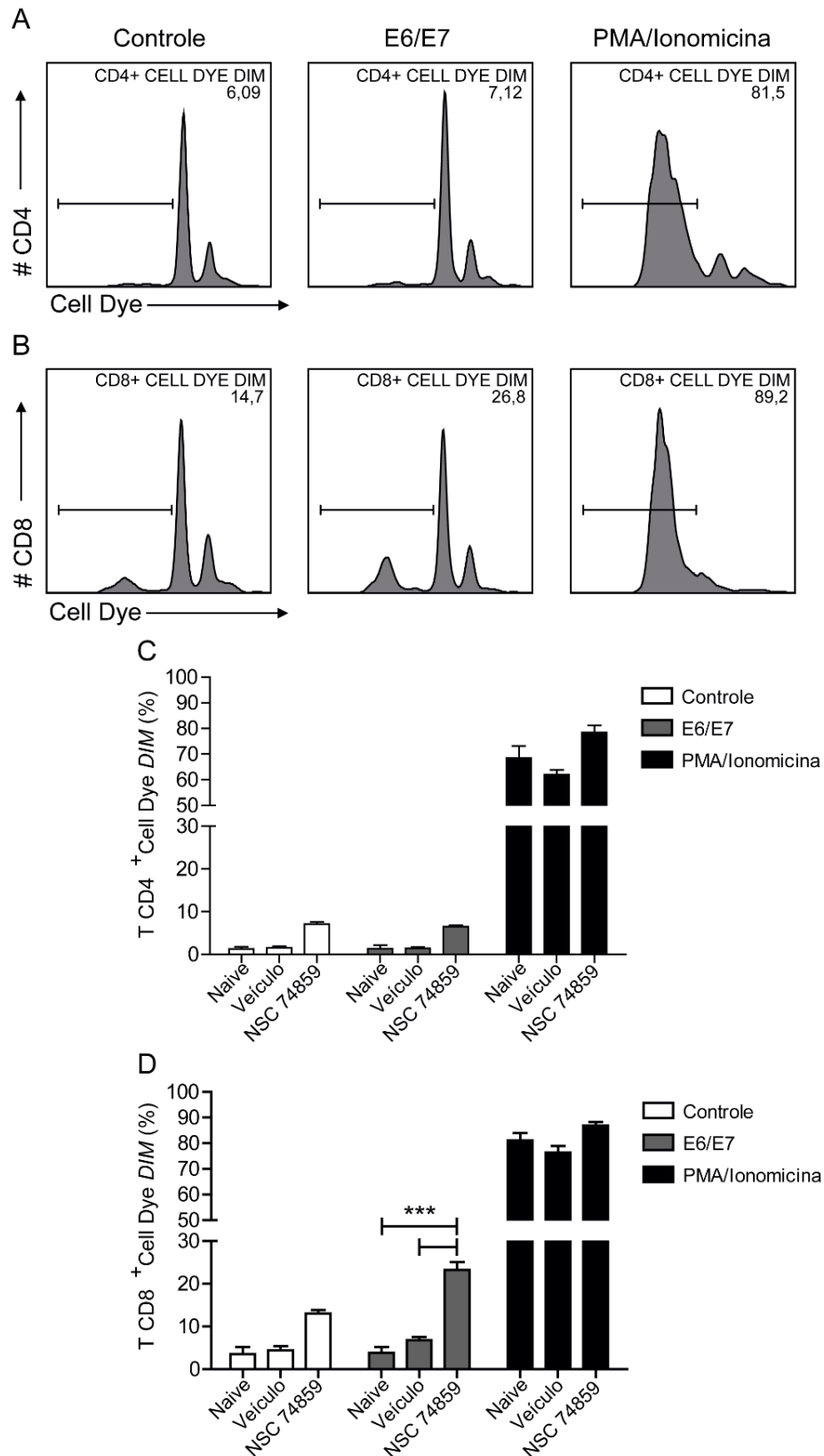


**Figura 21. Vias de sinalização no baço de animais tratados com o inibidor de STAT-3.** Camundongos C57BL/6 foram submetidos ao protocolo de indução do tumor TC-1. As suspensões celulares de baço foram obtidas de animais submetidos ou não ao tratamento com o inibidor farmacológico NSC 74859. Em seguida, foram submetidas ao processo de extração de proteínas e feita a detecção por Western Blot de proteínas totais (B e D) e fosforiladas (A e C) envolvidas na transdução de sinais. As amostras foram identificadas de seguinte maneira: naive (N), veículo (tratamento com PBS 1x + 2% DMSO), inibidor (tratamento com inibidor farmacológico de STAT-3) e os números são específicos de cada animal do grupo experimental. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três animais por grupo experimental (\*\*\*) p < 0,001).

#### ***4.2.5. Inibição de STAT-3 promove a proliferação dos linfócitos T***

Para avaliar se a deficiência de STAT-3 afeta a capacidade de proliferação dos linfócitos T, foram obtidas as suspensões celulares dos linfonodos de animais naive ou que apresentaram tumores TC-1 que foram tratados ou não com NSC 74859. Para determinar a capacidade proliferativa, as células foram marcadas com Cell Dye 450 sendo estimuladas ou não na presença dos peptídeos correspondentes a peptídeos E6/E7 (5 µg/mL) de HPV16 ou de PMA (10 ng/mL) e Ionomicina (1 µg/mL). A proliferação foi determinada por citometria de fluxo mediante a diluição do Cell Dye nas populações de linfócitos T. Foi observado um aumento significativo da proliferação nas células TCD4<sup>+</sup> (Figura 22A e C) provenientes dos linfonodos de animais naive ou com tumor tratados ou não com o inibidor de STAT-3 na presença do estímulo com de PMA/Ionomicina em comparação com esses mesmos grupos experimentais estimulados com só meio (controle) ou que receberam o estímulo com os peptídeos E6/E7 de HPV16. Em contraste não foram apreciadas diferenças significativas na capacidade proliferativa dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> entre os diferentes grupos experimentais na presença dos diferentes estímulos.

Entretanto foi observado um aumento significativo da proliferação nos linfócitos TCD8<sup>+</sup> (Figura 22B e D) provenientes dos linfonodos de animais naive ou com tumor tratados ou não com o inibidor de STAT-3 na presença do estímulo com de PMA/Ionomicina em comparação com esses mesmos grupos experimentais estimulados com só meio ou com os peptídeos E6/E7 de HPV16. Além disso, a proliferação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> apresentou um aumento significativo nas amostras de animais com tumor que receberam o tratamento com o inibidor de STAT-3, na presença do estímulo com os peptídeos E6/E7 quando comparados com as amostras provenientes dos animais naive o do grupo veículo nesta mesma condição de estimulação.



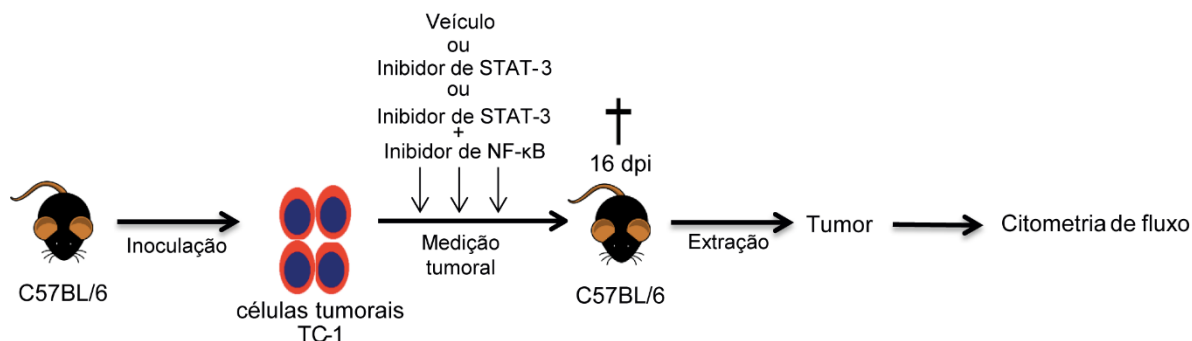
**Figura 22. A inibição de STAT-3 promove a proliferação dos linfócitos T in vitro.** Animais C57BL/6 foram submetidos ao protocolo de indução do tumor TC-1 e tratados ou não com o inibidor de STAT-3 (5 mg/kg). No 16<sup>o</sup> dpi foram coletados e processados os linfonodos. As suspensões de linfonodo foram marcadas com Cell Dye e mantidas em cultura durante 4 dias na presença ou não dos



peptídeos E6/E7 (5  $\mu\text{g/mL}$ ) ou de PMA (10  $\text{ng/mL}$ ) e Ionomicina (1  $\mu\text{g/mL}$ ). A proliferação foi determinada por citometria de fluxo pela diluição do Cell Dye nas populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> representada em histograma (A e B) respectivamente e em gráfico de barras (C e D) respectivamente. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três animais por grupo experimental (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

### 4.3. Inibição de NF- $\kappa$ B promove o crescimento do tumor

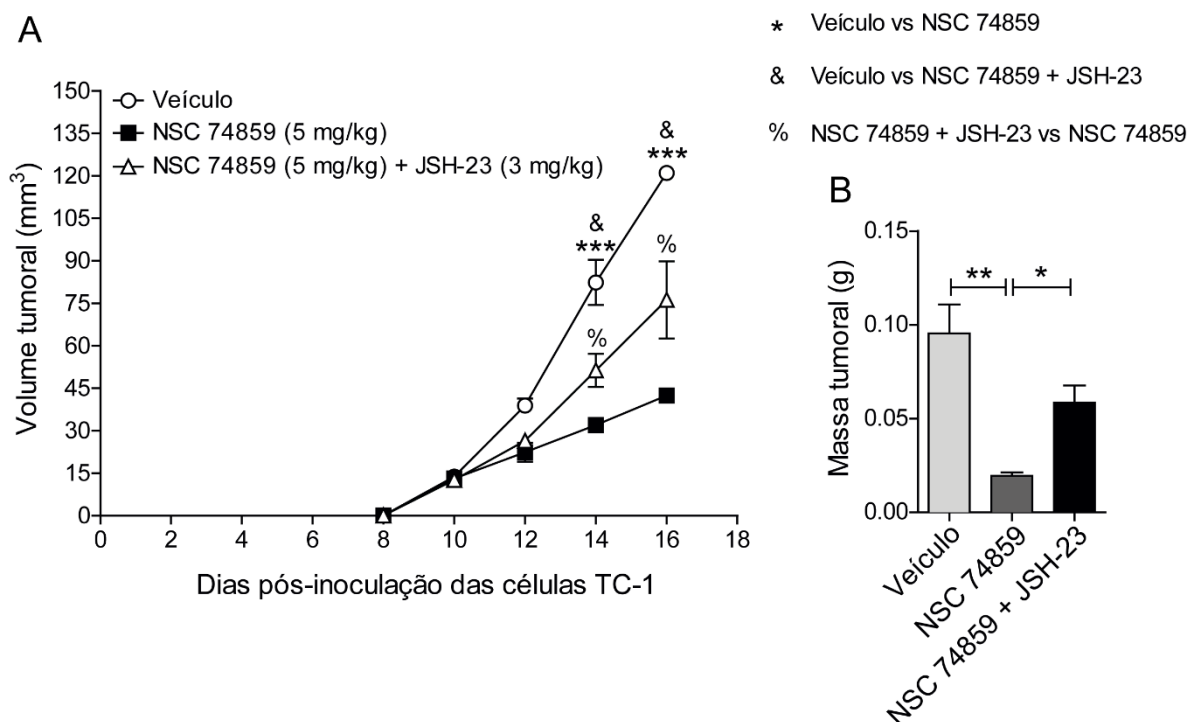
Seguidamente a nossa próxima etapa, baseada nos resultados prévios, para concluir se realmente a via STAT-3 pode interferir na sinalização de NF- $\kappa$ B, após induzir os tumores em camundongos C57BL/6 foram tratados com 5 mg/kg de NSC 74859 (inibidor farmacológico de STAT-3) ou com o veículo (PBS 1x + 2% DMSO) ou com a combinação de 5 mg/kg de NSC 74859 e 3 mg/kg de JSH-23 (inibidor farmacológico de NF- $\kappa$ B) diariamente, até o 16<sup>o</sup> dpi. O tamanho dos tumores foi medido a partir do 9<sup>o</sup> dpi das células tumorais TC-1 (Figura 23) até completar os 16<sup>o</sup> dpi, momento em que foram coletados os tumores dos animais eutanasiados e obtidas as suspensões celulares para o estudo do infiltrado inflamatório presente no microambiente tumoral.



**Figura 23. Esquema geral dos procedimentos no experimento *in vivo* de tratamento com o inibidor farmacológico de NF- $\kappa$ B.** Camundongos C57BL/6 foram inoculados com  $1 \times 10^5$  células TC-1 por via s.c no dorso superior direito. Após a detecção do tumor o 9<sup>o</sup> dpi das células tumorais, foi medido o tamanho dos tumores e os animais foram tratados com 5 mg/kg de NSC 74859 (inibidor farmacológico de STAT-3) ou com o veículo (PBS 1x + 2% DMSO) ou com a combinação de 5 mg/kg de NSC 74859 e 3 mg/kg de JSH-23 (inibidor farmacológico de NF- $\kappa$ B) diariamente por via i.p. Aos 16<sup>o</sup> dpi, foram coletados dos animais eutanasiados os tumores. Após da coleta foram obtidas as suspensões celulares de tumor, sendo utilizadas na citometria de fluxo para a determinação infiltrado inflamatório.

Observamos que a inibição de STAT-3 reduziu significativamente o crescimento tumoral (Figura 24A) assim como a massa do tumor (Figura 24B) quando comparados com animais do grupo veículo (controle). Interessantemente, observamos que o tratamento

simultâneo com os inibidores farmacológicos de STAT-3 e NF- $\kappa$ B reverteu significativamente o volume tumoral (Figura 24A) assim como a massa do tumor (Figura 24B) favorecendo o crescimento tumoral quando comparados com animais do grupo que receberam o tratamento só com inibidor de STAT-3. Também podemos observar o aumento significativo do crescimento tumoral (Figura 24A) nos animais do grupo veículo em comparação com os tumores dos camundongos que foram tratados com a combinação dos inibidores das vias de sinalização.

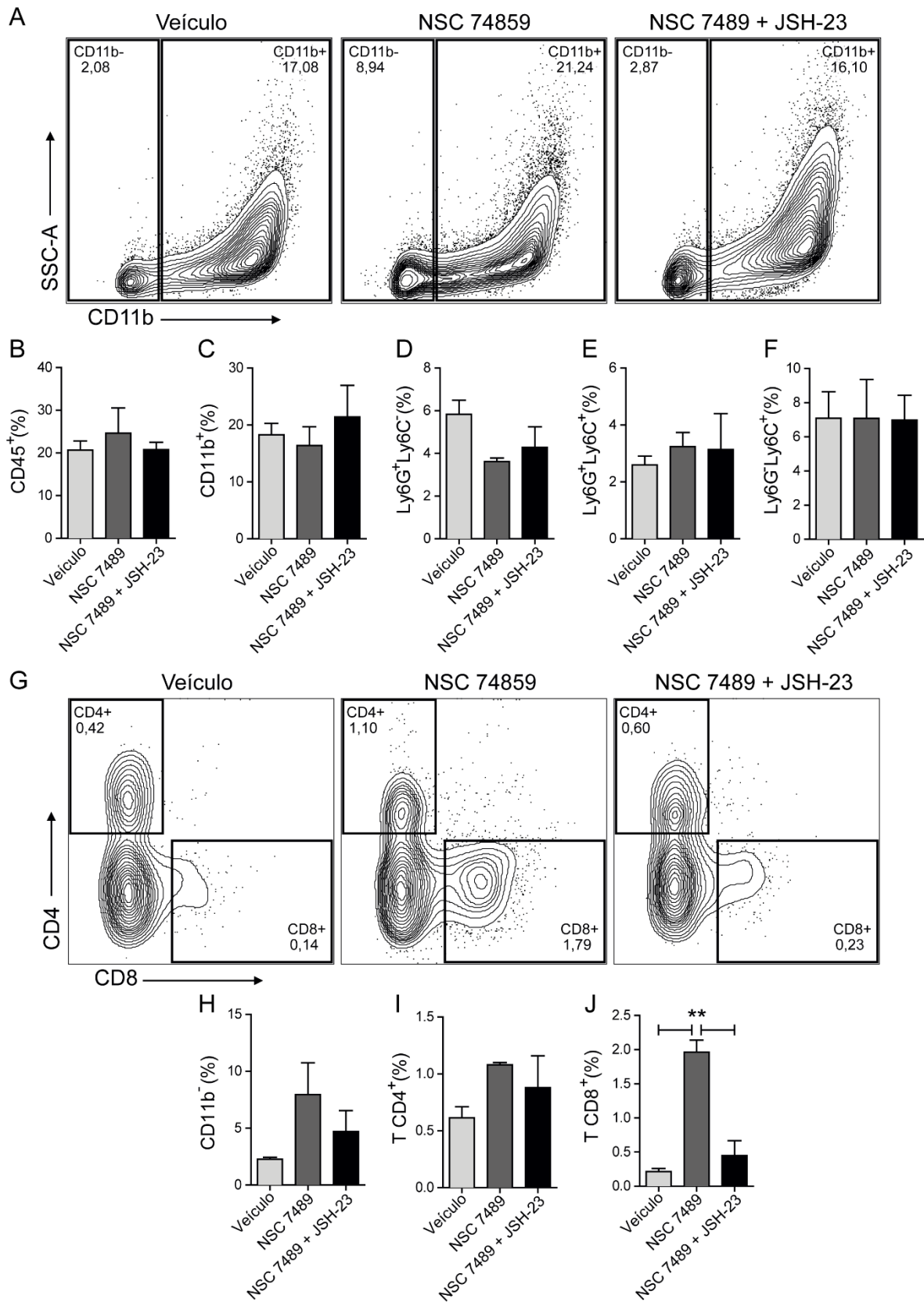


**Figura 24. Inibição de NF- $\kappa$ B reverte o efeito no crescimento tumoral.** Camundongos C57BL/6 foram inoculados com  $1 \times 10^5$  células tumorais TC-1 por via s.c no dorso superior direito. Após a detecção do tumor o 9<sup>o</sup> dpi das células tumorais, foi medido o tamanho dos tumores e os animais foram tratados com 5 mg/kg de NSC 74859 ou com o veículo (PBS 1x + 2% DMSO) ou com a combinação de 5 mg/kg de NSC 74859 e 3 mg/kg de JSH-23 (inibidor farmacológico de NF- $\kappa$ B) por via i.p diariamente. O volume dos tumores (A) foi medido a partir do 8<sup>o</sup> dpi. A massa dos tumores (B) foi medida no 16<sup>o</sup> dpi. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três animais por grupo experimental (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.3.1. Neutralização de NF- $\kappa$ B reduz a infiltração de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no microambiente tumoral

Para avaliar os efeitos gerados mediante a inibição de STAT-3 e NF- $\kappa$ B sobre o infiltrado inflamatório presente no microambiente tumoral, foram coletados e processados os

tumores provenientes dos animais que receberam o tratamento com o inibidor farmacológico de STAT-3 ou com o veículo ou com a combinação de inibidores NSC 74859 e JSH-23 e avaliamos por citometria de fluxo as populações imunes presentes nas suspensões tumorais. Nossos resultados mostraram um aumento significativo de infiltração de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Figura 25G e J) nas suspensões celulares provenientes de tumores do grupo de animais tratados com o bloqueador de STAT-3 em comparação a frequência desta população observada nas suspensões tumorais provenientes do grupo veículo e do grupo tratado simultaneamente com a combinação de inibidores. Em contraste, a frequência dos leucócitos (Figura 25B), das células mielóides (Figura 25A e C), dos neutrófilos (Figura 25D), das células de origem mielóide Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> (Figura 25E), dos monócitos (Figura 25F), de linfócitos (Figura 25A e H) e das células T CD4<sup>+</sup> (Figura 25G e I) foram similares entre os diferentes grupos experimentais avaliados.



ou com o veículo ou com a combinação de 5 mg/kg de NSC 74859 e 3 mg/kg de JSH-23 diariamente por via i.p. No 16° dpi foram coletados e processados os tumores. Por citometria de fluxo foi determinada a frequência das populações de células imunes em relação a população total de células tumorais. A frequência das células mielóides, linfócitos, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos T CD8<sup>+</sup> presentes no tumor está representada em forma de *dot plots* (A e G) e em gráficos de barras (C, H, I e J) respectivamente. A frequência dos leucócitos (B), dos neutrófilos (D), das células de origem mielóide Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> (E) e monócitos (F) está representada em forma de gráficos de barras. Os dados representam a média ± SEM de três animais por grupo experimental (\*\* p < 0,01).

#### 4.4. Transferência adotiva de linfócitos provenientes de animais tratados com inibidor de STAT-3 previne o crescimento tumoral

O aumento da infiltração tumoral pelas células T após o tratamento com anticorpos neutralizantes ou inibidor de STAT-3 sugeriu que houve um aumento nas respostas adaptativas antitumorais. Para testar essa hipótese, reconstituímos camundongos RAG1<sup>-/-</sup> (animais geneticamente deficientes de linfócitos T e B) que apresentaram tumores TC-1, com linfócitos provenientes de doadores C57BL/6 que apresentaram tumores tratados com inibidor STAT-3 ou controles não tratados. O tamanho dos tumores foi medido a partir do 8° dpi das células tumorais TC-1 (Figura 26) até completar os 16° dpi, momento em que foram coletados os tumores e os linfonodos dos animais eutanasiados e obtidas as suspensões celulares para o estudo das populações imunes presentes nestes órgãos.

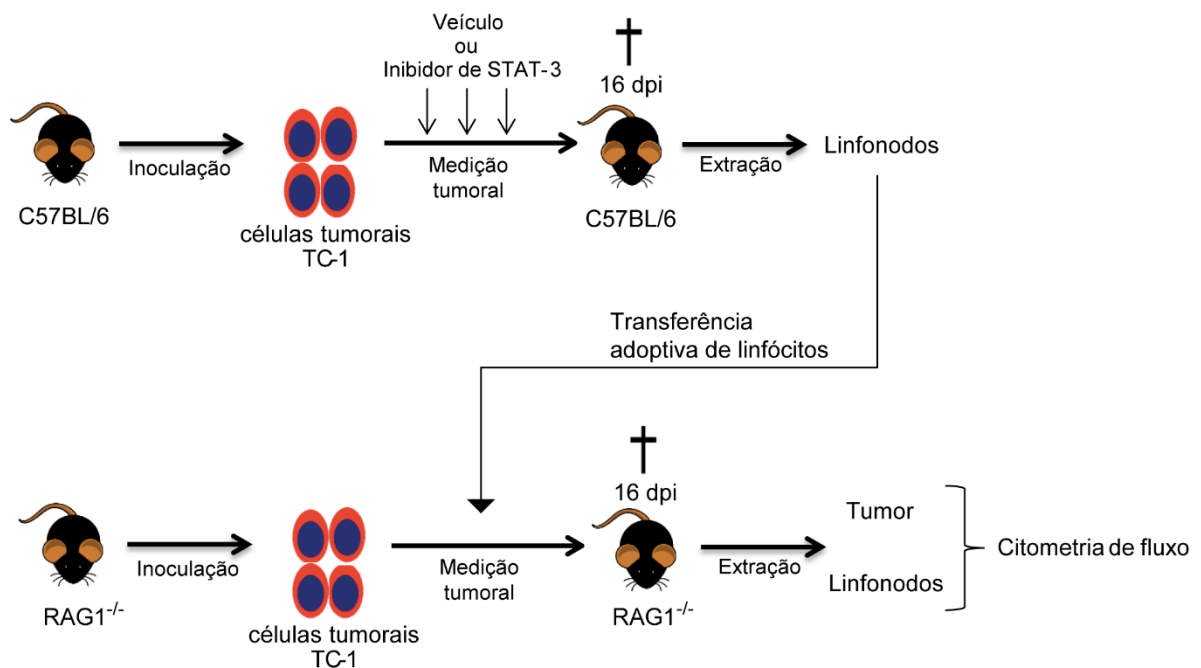
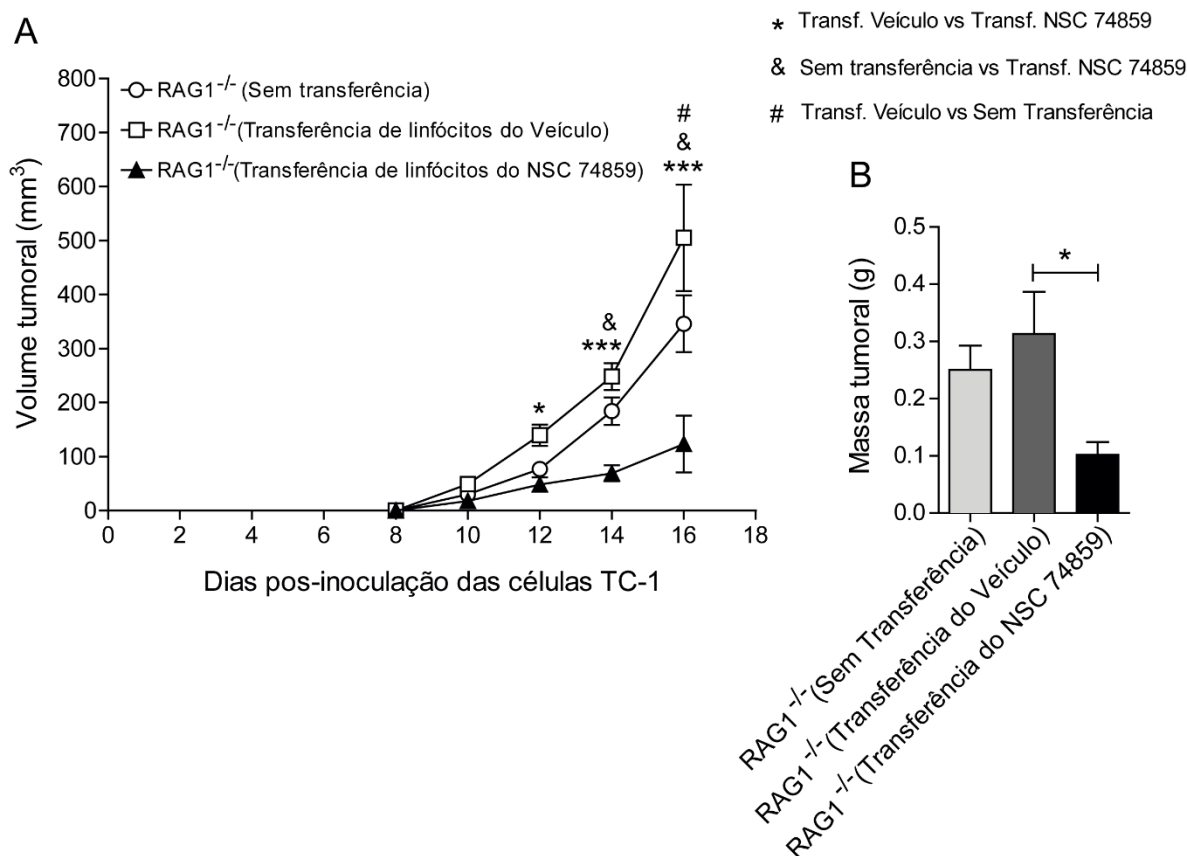


Figura 26. Esquema geral dos procedimentos no experimento *in vivo* de transferência adotiva de linfócitos provenientes de C57BL/6 tratados ou não com inibidor de STAT-3. Camundongos

C57BL/6 foram inoculados com  $1 \times 10^5$  células TC-1 por via s.c no dorso superior direito. Após a detecção do tumor, foi medido o tamanho dos tumores e os animais foram tratados com 5 mg/kg de NSC 74859 ou com o veículo por via i.p diariamente. Aos 16° dpi, foram coletados dos animais eutanasiados os linfonodos. Após da coleta dos órgãos foram obtidas as suspensões de linfonodos e foram injetadas por via i.p  $5 \times 10^6$  células no experimento *in vivo* de transferência adotiva de linfócitos a camundongos RAG1<sup>-/-</sup> os quais previamente foram inoculados com  $1 \times 10^5$  células TC-1 e apresentaram tumores palpáveis no momento da transferência adotiva.

Nossos resultados mostraram que os animais RAG1<sup>-/-</sup> que receberam a transferência adotiva dos linfócitos provenientes dos animais C57BL/6 com tumores tratados com o NSC 74859 apresentaram uma redução significativa do crescimento tumoral (Figura 27A) quando comparados com camundongos RAG1<sup>-/-</sup> que receberam a transferência adotiva dos linfócitos provenientes dos animais C57BL/6 com tumores do grupo veículo ou os animais RAG1<sup>-/-</sup> que não receberam transferência de linfócitos. Além disso, podemos observar os animais RAG1<sup>-/-</sup> que receberam a transferência adotiva dos linfócitos provenientes dos animais C57BL/6 com tumores tratados com o NSC 74859 apresentaram uma redução significativa da massa do tumor (Figura 27B) em comparação com os RAG1<sup>-/-</sup> que foram reconstituídos com linfócitos provenientes dos animais C57BL/6 com tumores do grupo veículo. Também se observou que os RAG1<sup>-/-</sup> que não receberam transferência de linfócitos apresentaram uma diminuição significativa do volume tumoral quando comparados com os RAG1<sup>-/-</sup> que receberam a transferência adotiva dos linfócitos provenientes dos animais C57BL/6 com tumores do grupo veículo.

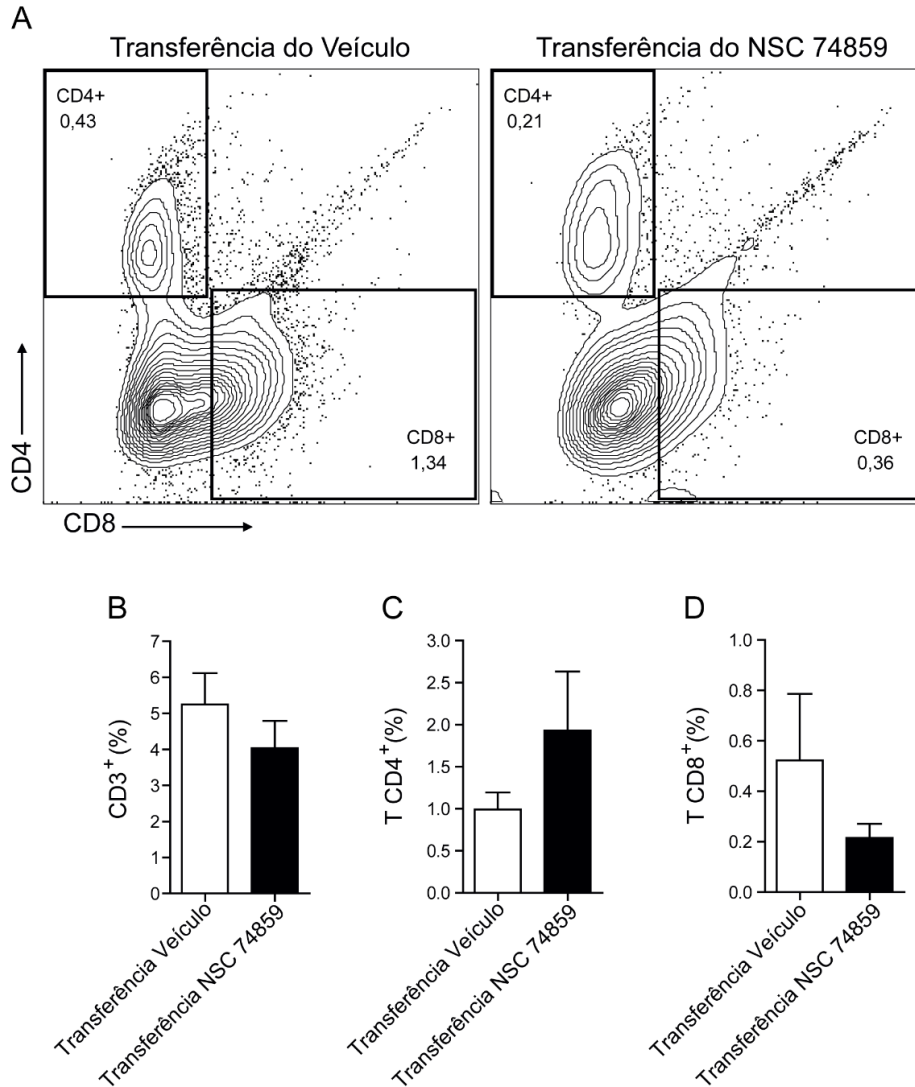


**Figura 27. Transferência adotiva de linfócitos provenientes de animais tratados com inibidor de STAT-3 previne o crescimento tumoral.** Camundongos C57BL/6 foram inoculados com  $1 \times 10^5$  células tumorais TC-1 por via s.c no dorso superior direito. Após a detecção do tumor o 7<sup>o</sup> dpi das células tumorais os animais foram tratados com 5 mg/kg de NSC 74859 ou com o veículo diariamente por via i.p. As suspensões de linfonodos foram utilizadas no experimento *in vivo* de transferência adotiva de linfócitos em camundongos RAG1<sup>-/-</sup> previamente inoculados com  $1 \times 10^5$  células TC-1. O volume dos tumores (A) foi medido a partir do 8<sup>o</sup> dpi. A massa dos tumores (B) foi medida no 16<sup>o</sup> dpi. Os dados são representativos de dois experimentos independentes e representam a média  $\pm$  SEM de três animais por grupo experimental (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.4.1. Transferência adotiva de linfócitos foi capaz de reconstituir os animais RAG1<sup>-/-</sup>

Para comprovar a eficiência no processo de transferência adotiva de linfócitos a animais RAG1<sup>-/-</sup> foram coletados os linfonodos dos animais eutanasiados no dia 16<sup>o</sup> dpi e obtidas as suspensões celulares para o estudo das populações imunes por citometria de fluxo. Os linfócitos provenientes de doadores C57BL/6 que apresentaram tumores tratados com o NSC 74859 ou controles não tratados foram capazes de colonizar os linfonodos dos camundongos RAG1<sup>-/-</sup> que receberam a transferência adotiva de ambos grupos experimentais (Figura 28A). Podemos observar que a frequência dos linfócitos T CD3<sup>+</sup> (Figura 28B), dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Figura

28A e C) e dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Figura 28A e D) foram semelhantes entre os dois grupos experimentais estudados.

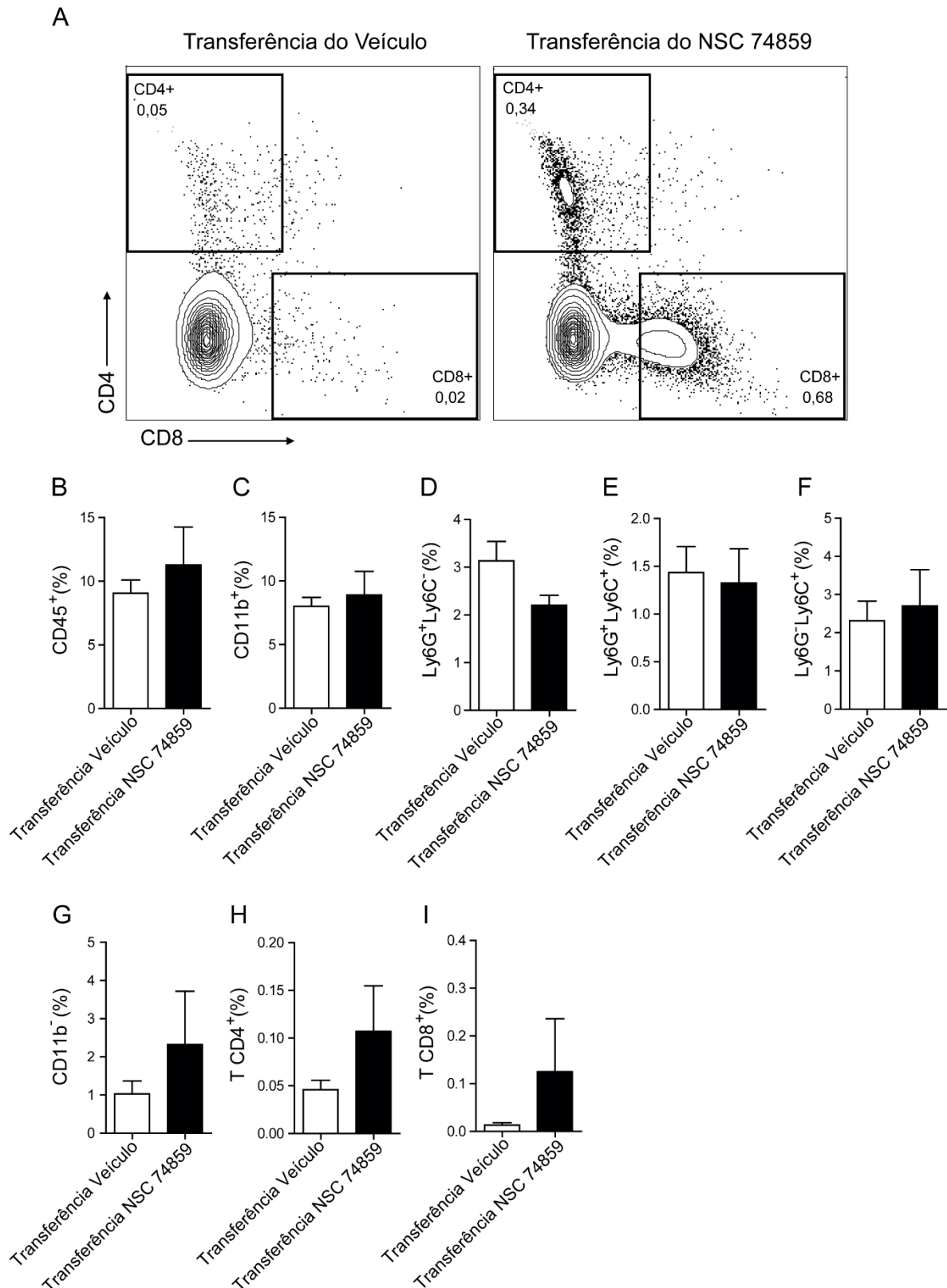


**Figura 28. Transferência adotiva de linfócitos foi capaz de reconstituir os animais RAG1<sup>-/-</sup>.** Camundongos RAG1<sup>-/-</sup> que apresentaram tumores TC-1 foram reconstituídos com linfócitos provenientes de doadores C57BL/6 que apresentaram tumores tratados com inibidor STAT-3 ou controles não tratados. Por citometria de fluxo foi determinada a frequência das populações de células imunes em relação a população total de células nos linfonodos destes animais. A frequência dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> presentes nos linfonodos está representada em forma de *dot plots* (A) e em gráficos de barras (C e D) respectivamente. A frequência dos linfócitos T CD3<sup>+</sup> (B) está representada em forma de gráficos de barras. Os dados representam a média ± SEM de três animais por grupo experimental.



#### ***4.4.2. Transferência adotiva de linfócitos provenientes de animais tratados com inibidor de STAT-3 foi mais eficiente na infiltração de linfócitos T no tumor***

Para determinar as consequências da reconstituição dos animais RAG1<sup>-/-</sup> sobre o infiltrado inflamatório presentes nos tumores destes animais foram coletados, processados e obtidas as suspensões tumorais e avaliadas por citometria de fluxo as populações imunes presentes. Embora não seja significativo, nossos resultados mostraram que, aparentemente, a transferência adotiva de linfócitos provenientes de animais tratados com inibidor de STAT-3 foi mais eficiente na infiltração de linfócitos T no tumor dos animais RAG1<sup>-/-</sup> quando comparados com os que receberam a transferência de linfócitos provenientes de animais do grupo veículo (Figura 29A). Em contraste, a frequência dos leucócitos (Figura 29B), das células mielóides (Figura 29C), dos neutrófilos (Figura 29D), das células de origem mielóide Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> (Figura 29E) e dos monócitos (Figura 29F) foram similares entre os grupos experimentais avaliados.



**Figura 29.** Transferência adotiva de linfócitos provenientes de animais tratados com inibidor de STAT-3 são mais eficientes na infiltração de linfócitos T no tumor. Camundongos RAG1<sup>-/-</sup> que apresentaram tumores TC-1 foram reconstituídos com linfócitos provenientes de doadores C57BL/6 que apresentaram tumores tratados com NSC 74859 ou doadores C57BL/6 que apresentaram tumores do

grupo veículo. A frequência das populações de células imunes em relação a população total de células tumorais foi determinada por citometria de fluxo. A frequência dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> presentes nos linfonodos está representada em forma de *dot plots* (A) e em gráficos de barras (H e I) respectivamente. A frequência dos leucócitos (B), das células mielóides (C), dos neutrófilos (D), das células de origem mielóide Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> (E), monócitos (F) e dos linfócitos (G) está representada em forma de gráficos de barras. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três animais por grupo experimental.

## DISCUSSÃO

## 5. DISCUSSÃO

A infecção por Papilomavírus Humano de alto risco oncogênico, particularmente HPV16 e HPV18, é o principal fator etiológico do câncer cervical (MUNOZ; BOSCH; DE SANJOSE; HERRERO *et al.*, 2003; WALBOOMERS; JACOBS; MANOS; BOSCH *et al.*, 1999) e uma porcentagem de outros cânceres anogenitais e orofaríngeos (CHATURVEDI; ENGELS; PFEIFFER; HERNANDEZ *et al.*, 2011; MILLER; PURICELLI; STACK, 2012). A persistência da infecção com esses subtipos de HPV induz inflamação crônica (WALCH-RUCKHEIM; MAVROVA; HENNING; VICINUS *et al.*, 2015), existem dados clínicos e epidemiológicos que associam inflamação crônica à progressão do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O papel da IL-6 e G-CSF e a sinalização por STAT-3 durante o desenvolvimento de tumores associados ao HPV, assim como os efeitos sistêmicos do tumor sobre o sistema imune, não foram totalmente descritos, pelo que é importante entender melhor essas interações moleculares. Uma das citocinas geradas durante processos inflamatórios crônicos é a IL-6, e tem sido descrita como essencial no estabelecimento tumoral assim como no crescimento e geração de metástase (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; ROSE-JOHN, 2012). Estudos mostraram que elevadas concentrações de IL-6 no soro de pacientes representa um indicador prognóstico desfavorável em diversos tipos de câncer incluindo melanoma, carcinoma colorretal, mama, pulmão, gástrico e pancreático (HEIKKILA; EBRAHIM; LAWLOR, 2008; LIPPITZ, 2013). No microambiente tumoral diferentes populações celulares produzem IL-6, entre elas as próprias células tumorais, assim como células do sistema imune que incluem os macrófagos associados a tumores (TAM do inglês, *tumor-associated macrophages*) (MITCHEM; BRENNAN; KNOLHOFF; BELT *et al.*, 2013), as MDSC (OH; LEE; SHON; NAM *et al.*, 2013) e fibroblastos (EREZ; TRUITT; OLSON; ARRON *et al.*, 2010).

Por outro lado, existem outras citocinas como o G-CSF que podem desempenhar um papel essencial na progressão tumoral. O G-CSF pode ser secretado no contexto tumoral pelas próprias células tumorais e promover a expansão das MDSC na circulação e no microambiente tumoral, como foi demonstrado em estudos feitos usando modelos murinos de carcinoma de mama e de pulmão (SHOJAEI; WU; QU; KOWANETZ *et al.*, 2009; WAIGHT; HU; MILLER; LIU *et al.*, 2011). Nosso grupo, assim como outros grupos de pesquisa (HEUSINKVELD; DEVOS VAN STEENWIJK; GOEDEMANS; RAMWADHDOEBE *et al.*, 2011), mostrou que as

células transformadas por HPV expressam IL-6 (STONE; ROSSETTI; BOLPETTI; BOCCARDO *et al.*, 2014) e G-CSF (ALVAREZ; BELDI; SARMANHO; ROSSETTI *et al.*, 2017; STONE; ROSSETTI; LIMA; LEPIQUE, 2014).

Nossos resultados mostraram que as citocinas IL-6 e G-CSF possuem efeitos somatórios que promovem o crescimento de tumor associado a HPV. Estas citocinas produzem efeitos tanto locais como sistêmicos que favorecem o aumento das populações de células mielóides com potencial fenótipo imunossupressor contribuindo com a diminuição do infiltrado de linfócitos T ou favorecendo a inibição da resposta dos mesmos. A principal resposta efetora contra o vírus está representada pela imunidade adaptativa mediada por linfócitos T (HEUSINKVELD; WELTERS; VAN POELGEEST; VAN DER HULST *et al.*, 2011). No entanto, existem estudos mostrando que em pacientes que apresentaram lesões de alto grau do colo do útero a resposta efetora dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> é geralmente deficiente (TRIMBLE; CLARK; THOBURN; HANSON *et al.*, 2010). Entretanto, outros estudos demonstraram que um dos mecanismos de evasão imune do vírus se encontra mediado pela oncoproteína E5 que causa a retenção de HLA-A e B no complexo de Golgi, impedindo a apresentação dos antígenos virais para os linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (ASHRAFI; HAGSHENAS; MARCHETTI; O'BRIEN *et al.*, 2005). Além disso, estudos realizados em modelos murinos demonstraram que o tumor primário pode alterar o processo de mielopoiese, transformando células mielóides, em células com elevada capacidade imunossupressora (MCKENNA; KAPP, 2006). Especificamente, em nosso laboratório, estudos prévios mostraram que tumores associados ao HPV16 controlam a homeostase de células mielóides em órgãos linfóides gerando um ambiente supressor para células T (STONE; ROSSETTI; BOLPETTI; BOCCARDO *et al.*, 2014). Já em pacientes com câncer de colo uterino, observaram um aumento no infiltrado inflamatório nas lesões, caracterizado por um acúmulo de macrófagos de perfil M2 e de neutrófilos acompanhado de uma correlação negativa entre a frequência de neutrófilos e de linfócitos T (ALVAREZ; BELDI; SARMANHO; ROSSETTI *et al.*, 2017). Por sua vez, estudos realizados em pacientes com carcinoma hepatocelular demonstraram que a expressão de PD-1L na superfície de monócitos e macrófagos presentes no estroma peritumoral é um dos mecanismos que leva a supressão da resposta efetora de linfócitos T (KUANG; ZHAO; PENG; XU *et al.*, 2009).

Entretanto, nossos resultados também indicam que as citocinas IL-6 e G-CSF, expressas no microambiente tumoral, induzem a ativação de STAT-3 a nível sistêmico, o que pode interferir na ativação intracelular de NF- $\kappa$ B nas células imunes local e sistemicamente. Dados na literatura, mostraram que o início da sinalização de IL-6 em células tumorais ativa

mediadores da proliferação celular que são rigidamente controlados em condições homeostáticas. A desregulação da ativação de STAT-3 no câncer leva a transformação celular sendo amplamente considerado um oncogene (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; PILATI; AMESSOU; BIHL; BALABAUD *et al.*, 2011; REBOUISSOU; AMESSOU; COUCHY; POUSSIN *et al.*, 2009). Além disso, a citocina IL-6 mediante a ativação de STAT-3 permite a sobrevivência das células tumorais promovendo a expressão de proteínas anti-apoptótica como Bcl-2 (GRITSKO; WILLIAMS; TURKSON; KANEKO *et al.*, 2006). Adicionalmente, a ativação de STAT-3 iniciada por IL-6 em populações celulares infiltrantes do tumor como os TAM e as MDSC favorece a expressão do VEGF nestas células, regulando positivamente a angiogênese nos tumores (KUJAWSKI; KORTYLEWSKI; LEE; HERRMANN *et al.*, 2008). Embora a ativação de STAT-3 pode estar sendo mediada por IL-6, essa via de transdução de sinais intracelular pode ser iniciada por G-CSF no microambiente tumoral. Estudos recentes demonstraram que a administração de G-CSF exógeno em modelos murinos de neuroblastomas promove o crescimento tumoral e a geração de metástases (AGARWAL; LAKOMA; CHEN; HICKS *et al.*, 2015). Esse fenômeno foi revertido administrando nos animais tratamentos que bloquearam a via de sinalização G-CSF/STAT-3, mediante o uso de um anticorpo neutralizante de G-CSF ou um inibidor seletivo de STAT-3 (AGARWAL; LAKOMA; CHEN; HICKS *et al.*, 2015).

Por outro lado, a ativação de STAT-3 no microambiente tumoral mediada por estas citocinas, pode estar interferindo na ativação de outras vias de sinalização como NF- $\kappa$ B nas células imunes infiltrantes do tumor. Estudos prévios realizados em nosso laboratório mostraram que a via de NF- $\kappa$ B estava parcialmente inibida em leucócitos de pacientes com câncer do colo uterino, tanto nas células apresentadoras de antígenos assim como nos linfócitos T. Adicionalmente, em modelos murinos observaram que os macrófagos tumorais secretam IL-10, e essa citocina tem papel importante no estabelecimento de tolerância aos antígenos tumorais, induzindo a diferenciação de células T reguladoras, e inibindo a apresentação de antígenos através da inibição parcial da sinalização por NF- $\kappa$ B (STONE; ROSSETTI; BOLPETTI; BOCCARDO *et al.*, 2014). Além disso, em estudos realizados pelo grupo de Sjoerd H. van der Burg, demonstraram que a infecção de queratinócitos com HPV16 prejudica a acetilação de NF- $\kappa$ B, causando uma redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias e diminuindo a atração de células imunes em resposta a estímulos das vias imunes inatas ou adaptativas (TUMMERS; GOEDEMANS; PELASCINI; JORDANOVA *et al.*, 2015). A via canônica de NF- $\kappa$ B é ativada mediante a ligação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 a seu

receptor levando a formação do dímero p65/p50 (HAYDEN; GHOSH, 2008) enquanto que a via não canônica ou alternativa leva a formação do dímero RelB/p52 (SUN, 2011). Evidências na literatura mostram que os linfócitos T citotóxicos que constituem importantes mediadores da resposta imune antitumoral precisam da expressão de NF- $\kappa$ B (p65/p50) para desempenhar suas funções pró-inflamatórias e efectoras (MONDOR; SCHMITT-VERHULST; GUERDER, 2005). Essas evidências na literatura mostram concordância com os nossos achados experimentais, nos quais observamos que a inibição do STAT-3 levou ao aumento da fosforilação de NF- $\kappa$ B e ao aumento da resposta imune antitumoral. Os efeitos pró-tumorais do STAT-3 são parcialmente dependentes da regulação negativa de NF- $\kappa$ B. Em nosso trabalho, foi determinada a fosforilação no resíduo serina 536 de p65 NF- $\kappa$ B como evidência da ativação desta via de sinalização tanto no microambiente tumoral assim como a nível sistêmico. Ao analisar a expressão de NF- $\kappa$ B nas amostras de tumor e baço por imunofluorescência, o padrão de expressão parecia ser em forma de grânulos na localização nuclear e citoplasmática, mostrando que a proteína se encontrava potencialmente ativada, principalmente nas amostras provenientes de animais que receberam o tratamento com o inibidor de STAT-3. Por outro lado, não investigamos a via não canônica de NF- $\kappa$ B em nosso modelo. Uma das possibilidades seria que, nos tumores de animais não tratados com o inibidor de STAT-3, possamos encontrar ativada a via não canônica de NF- $\kappa$ B, o que pode contribuir com a supressão de respostas inflamatórias e imunológicas (YU; WANG; YAN; ZHANG *et al.*, 2014). No entanto, desconhecemos o mecanismo pelo qual ativação da via de sinalização de STAT-3 interfere na atividade de NF- $\kappa$ B.

Entretanto, existem estudos realizados em pacientes com câncer utilizando como terapia inibidores de STAT-3. Um dos exemplos foi a utilização na clínica do oligonucleotídeo AZD9150, que é um inibidor de STAT-3, em pacientes com linfoma e câncer de pulmão de células não pequenas (HONG; KURZROCK; KIM; WOESSNER *et al.*, 2015). Outro exemplo dos estudos realizados foi o ensaio clínico fase I utilizando o inibidor oral de STAT-3 denominado OPB-111077, em pacientes com carcinoma hepatocelular avançado (YOO; KANG; LIM; KIM *et al.*, 2019).

Finalmente, nós sugerimos como uma possível terapia para combater o câncer de colo de útero ou outros tipos de câncer associados ao HPV, o tratamento dos pacientes com inibidores seletivos de STAT-3 que impediriam a progressão tumoral em fases iniciais da doença. Outra possível terapia seria a combinação de quimioterapia ou imunoterapias com a administração de fármacos inibidores seletivos de STAT-3.



# CONCLUSÕES

## 6. CONCLUSÕES

- ❖ As citocinas IL-6 e G-CSF induzem o crescimento do tumor associado ao HPV, com efeitos locais e sistêmicos, promovendo o aumento das populações de células mielóides no baço dos camundongos e redução da frequência de infiltrado de linfócitos T no tumor.
- ❖ As citocinas IL-6 e G-CSF expressas no microambiente tumoral induzem a ativação de STAT-3 sistemicamente e a inibição de NF- $\kappa$ B no baço.
- ❖ A ativação da via de transdução de sinais STAT-3 induz crescimento do tumor associado a HPV, inibe a ativação de linfócitos T, o que poderia contribuir para a menor infiltração dessas células nos tumores. Além disso, induz o aumento das células de origem mielóide a nível sistêmico.
- ❖ A via de sinalização de STAT-3 interfere na ativação intracelular de NF- $\kappa$ B no microambiente tumoral e a nível sistêmico em um modelo experimental associado a HPV, o que indica que os efeitos pró-tumorais do STAT-3 dependem, pelo menos em parte, da regulação negativa de NF- $\kappa$ B.

## REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, S.; LAKOMA, A.; CHEN, Z.; HICKS, J. *et al.* G-CSF Promotes Neuroblastoma Tumorigenicity and Metastasis via STAT3-Dependent Cancer Stem Cell Activation. **Cancer Res**, 75, n. 12, p. 2566-2579, Jun 15 2015.
- ALVAREZ, K. L. F.; BELDI, M.; SARMANHO, F.; ROSSETTI, R. A. M. *et al.* Local and systemic immunomodulatory mechanisms triggered by Human Papillomavirus transformed cells: a potential role for G-CSF and neutrophils. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 9002, Aug 21 2017.
- ASHRAFI, G. H.; HAGHSHENAS, M. R.; MARCHETTI, B.; O'BRIEN, P. M. *et al.* E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. **Int J Cancer**, 113, n. 2, p. 276-283, Jan 10 2005.
- BAKKAR, N.; GUTTRIDGE, D. C. NF-kappaB signaling: a tale of two pathways in skeletal myogenesis. **Physiol Rev**, 90, n. 2, p. 495-511, Apr 2010.
- BERNARD, E.; PONS-SALORT, M.; FAVRE, M.; HEARD, I. *et al.* Comparing human papillomavirus prevalences in women with normal cytology or invasive cervical cancer to rank genotypes according to their oncogenic potential: a meta-analysis of observational studies. **BMC Infect Dis**, 13, p. 373, Aug 13 2013.
- BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin**, 68, n. 6, p. 394-424, Nov 2018.
- CHATURVEDI, A. K.; ENGELS, E. A.; PFEIFFER, R. M.; HERNANDEZ, B. Y. *et al.* Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. **J Clin Oncol**, 29, n. 32, p. 4294-4301, Nov 10 2011.
- DINIZ, M. O.; SALES, N. S.; SILVA, J. R.; FERREIRA, L. C. Protection against HPV-16-Associated Tumors Requires the Activation of CD8+ Effector Memory T Cells and the Control of Myeloid-Derived Suppressor Cells. **Mol Cancer Ther**, 15, n. 8, p. 1920-1930, Aug 2016.
- DOWHANICK, J. J.; MCBRIDE, A. A.; HOWLEY, P. M. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. **J Virol**, 69, n. 12, p. 7791-7799, Dec 1995.
- EREZ, N.; TRUITT, M.; OLSON, P.; ARRON, S. T. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. **Cancer Cell**, 17, n. 2, p. 135-147, Feb 17 2010.
- GRITSKO, T.; WILLIAMS, A.; TURKSON, J.; KANEKO, S. *et al.* Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. **Clin Cancer Res**, 12, n. 1, p. 11-19, Jan 1 2006.
- GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer. **Cell**, 140, n. 6, p. 883-899, Mar 19 2010.

GUIDUCCI, C.; VICARI, A. P.; SANGALETTI, S.; TRINCHIERI, G. *et al.* Redirecting *in vivo* elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. **Cancer Res**, 65, n. 8, p. 3437-3446, Apr 15 2005.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, n. 5, p. 646-674, Mar 4 2011.

HASAN, U. A.; BATES, E.; TAKESHITA, F.; BILIATO, A. *et al.* TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. **J Immunol**, 178, n. 5, p. 3186-3197, Mar 1 2007.

HASAN, U. A.; ZANNETTI, C.; PARROCHE, P.; GOUTAGNY, N. *et al.* The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. **J Exp Med**, 210, n. 7, p. 1369-1387, Jul 1 2013.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. **Cell**, 132, n. 3, p. 344-362, Feb 8 2008.

HEIKKILA, K.; EBRAHIM, S.; LAWLOR, D. A. Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer. **Eur J Cancer**, 44, n. 7, p. 937-945, May 2008.

HEUSINKVELD, M.; DE VOS VAN STEENWIJK, P. J.; GOEDEMAN, R.; RAMWADHDOEBE, T. H. *et al.* M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. **J Immunol**, 187, n. 3, p. 1157-1165, Aug 1 2011.

HEUSINKVELD, M.; WELTERS, M. J.; VAN POELGEEST, M. I.; VAN DER HULST, J. M. *et al.* The detection of circulating human papillomavirus-specific T cells is associated with improved survival of patients with deeply infiltrating tumors. **Int J Cancer**, 128, n. 2, p. 379-389, Jan 15 2011.

HIRANO, T.; ISHIHARA, K.; HIBI, M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. **Oncogene**, 19, n. 21, p. 2548-2556, May 15 2000.

HONG, D.; KURZROCK, R.; KIM, Y.; WOESSNER, R. *et al.* AZD9150, a next-generation antisense oligonucleotide inhibitor of STAT3 with early evidence of clinical activity in lymphoma and lung cancer. **Sci Transl Med**, 7, n. 314, p. 314ra185, Nov 18 2015.

INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. p. 128, 2017.

JEON, S.; ALLEN-HOFFMANN, B. L.; LAMBERT, P. F. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. **J Virol**, 69, n. 5, p. 2989-2997, May 1995.

JUNK, D. J.; BRYSON, B. L.; JACKSON, M. W. HiJAK'd Signaling; the STAT3 Paradox in Senescence and Cancer Progression. **Cancers (Basel)**, 6, n. 2, p. 741-755, Mar 26 2014.

- KAJITANI, N.; SATSUKA, A.; KAWATE, A.; SAKAI, H. Productive Lifecycle of Human Papillomaviruses that Depends Upon Squamous Epithelial Differentiation. **Front Microbiol**, 3, p. 152, 2012.
- KAWANO, M.; MABUCHI, S.; MATSUMOTO, Y.; SASANO, T. *et al.* The significance of G-CSF expression and myeloid-derived suppressor cells in the chemoresistance of uterine cervical cancer. **Sci Rep**, 5, p. 18217, Dec 15 2015.
- KRIEK, J. M.; JAUMDALLY, S. Z.; MASSON, L.; LITTLE, F. *et al.* Female genital tract inflammation, HIV co-infection and persistent mucosal Human Papillomavirus (HPV) infections. **Virology**, 493, p. 247-254, Jun 2016.
- KUANG, D. M.; ZHAO, Q.; PENG, C.; XU, J. *et al.* Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. **J Exp Med**, 206, n. 6, p. 1327-1337, Jun 8 2009.
- KUJAWSKI, M.; KORTYLEWSKI, M.; LEE, H.; HERRMANN, A. *et al.* Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. **J Clin Invest**, 118, n. 10, p. 3367-3377, Oct 2008.
- LEPIQUE, A. P.; DAGHASTANLI, K. R.; CUCCOVIA, I. M.; VILLA, L. L. HPV16 tumor associated macrophages suppress antitumor T cell responses. **Clin Cancer Res**, 15, n. 13, p. 4391-4400, Jul 1 2009.
- LI, N.; GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. The unholy trinity: inflammation, cytokines, and STAT3 shape the cancer microenvironment. **Cancer Cell**, 19, n. 4, p. 429-431, Apr 12 2011.
- LIN, K. Y.; GUARNIERI, F. G.; STAVELEY-O'CARROLL, K. F.; LEVITSKY, H. I. *et al.* Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. **Cancer Res**, 56, n. 1, p. 21-26, Jan 1 1996.
- LIPPITZ, B. E. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. **Lancet Oncol**, 14, n. 6, p. e218-228, May 2013.
- MABUCHI, S.; MATSUMOTO, Y.; KAWANO, M.; MINAMI, K. *et al.* Uterine cervical cancer displaying tumor-related leukocytosis: a distinct clinical entity with radioresistant feature. **J Natl Cancer Inst**, 106, n. 7, Jul 2014.
- MCKENNA, K. C.; KAPP, J. A. Accumulation of immunosuppressive CD11b+ myeloid cells correlates with the failure to prevent tumor growth in the anterior chamber of the eye. **J Immunol**, 177, n. 3, p. 1599-1608, Aug 1 2006.
- MILLER, D. L.; PURICELLI, M. D.; STACK, M. S. Virology and molecular pathogenesis of HPV (human papillomavirus)-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Biochem J**, 443, n. 2, p. 339-353, Apr 15 2012.

- MITCHEM, J. B.; BRENNAN, D. J.; KNOLHOFF, B. L.; BELT, B. A. *et al.* Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. **Cancer Res**, 73, n. 3, p. 1128-1141, Feb 1 2013.
- MONDOR, I.; SCHMITT-VERHULST, A. M.; GUERDER, S. RelA regulates the survival of activated effector CD8 T cells. **Cell Death Differ**, 12, n. 11, p. 1398-1406, Nov 2005.
- MOSCICKI, A. B.; SCHIFFMAN, M.; KJAER, S.; VILLA, L. L. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer. **Vaccine**, 24 Suppl 3, p. S3/42-51, Aug 31 2006.
- MUNGER, K.; BASILE, J. R.; DUENSING, S.; EICHTEN, A. *et al.* Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. **Oncogene**, 20, n. 54, p. 7888-7898, Nov 26 2001.
- MUNOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSE, S.; HERRERO, R. *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, 348, n. 6, p. 518-527, Feb 6 2003.
- MUNOZ, N.; CASTELLSAGUE, X.; DE GONZALEZ, A. B.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, 24 Suppl 3, p. S3/1-10, Aug 31 2006.
- NIU, G.; WRIGHT, K. L.; HUANG, M.; SONG, L. *et al.* Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. **Oncogene**, 21, n. 13, p. 2000-2008, Mar 27 2002.
- OH, K.; LEE, O. Y.; SHON, S. Y.; NAM, O. *et al.* A mutual activation loop between breast cancer cells and myeloid-derived suppressor cells facilitates spontaneous metastasis through IL-6 trans-signaling in a murine model. **Breast Cancer Res**, 15, n. 5, p. R79, 2013.
- OVESTAD, I. T.; GUDLAUGSSON, E.; SKALAND, I.; MALPICA, A. *et al.* Local immune response in the microenvironment of CIN2-3 with and without spontaneous regression. **Mod Pathol**, 23, n. 9, p. 1231-1240, Sep 2010.
- PIETRAS, K.; OSTMAN, A. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. **Exp Cell Res**, 316, n. 8, p. 1324-1331, May 1 2010.
- PILATI, C.; AMESSOU, M.; BIHL, M. P.; BALABAUD, C. *et al.* Somatic mutations activating STAT3 in human inflammatory hepatocellular adenomas. **J Exp Med**, 208, n. 7, p. 1359-1366, Jul 4 2011.
- REBOUISSOU, S.; AMESSOU, M.; COUCHY, G.; POUSSIN, K. *et al.* Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. **Nature**, 457, n. 7226, p. 200-204, Jan 8 2009.
- ROMANCZUK, H.; THIERRY, F.; HOWLEY, P. M. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. **J Virol**, 64, n. 6, p. 2849-2859, Jun 1990.

- ROSE-JOHN, S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. **Int J Biol Sci**, 8, n. 9, p. 1237-1247, 2012.
- SCHEFFNER, M.; WERNESS, B. A.; HUIBREGTSE, J. M.; LEVINE, A. J. *et al.* The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, 63, n. 6, p. 1129-1136, Dec 21 1990.
- SHOJAEI, F.; WU, X.; QU, X.; KOWANETZ, M. *et al.* G-CSF-initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor refractoriness to anti-VEGF therapy in mouse models. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, n. 16, p. 6742-6747, Apr 21 2009.
- SILVER, J. S.; HUNTER, C. A. gp130 at the nexus of inflammation, autoimmunity, and cancer. **J Leukoc Biol**, 88, n. 6, p. 1145-1156, Dec 2010.
- STONE, S. C.; ROSSETTI, R. A.; BOLPETTI, A.; BOCCARDO, E. *et al.* HPV16-associated tumors control myeloid cell homeostasis in lymphoid organs, generating a suppressor environment for T cells. **J Leukoc Biol**, 96, n. 4, p. 619-631, Oct 2014.
- STONE, S. C.; ROSSETTI, R. A.; LIMA, A. M.; LEPIQUE, A. P. HPV associated tumor cells control tumor microenvironment and leukocytosis in experimental models. **Immun Inflamm Dis**, 2, n. 2, p. 63-75, Aug 2014.
- SUN, S. C. Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. **Cell Res**, 21, n. 1, p. 71-85, Jan 2011.
- TRIMBLE, C. L.; CLARK, R. A.; THOBURN, C.; HANSON, N. C. *et al.* Human papillomavirus 16-associated cervical intraepithelial neoplasia in humans excludes CD8 T cells from dysplastic epithelium. **J Immunol**, 185, n. 11, p. 7107-7114, Dec 1 2010.
- TUMMERS, B.; GOEDEMANS, R.; PELASCINI, L. P.; JORDANOVA, E. S. *et al.* The interferon-related developmental regulator 1 is used by human papillomavirus to suppress NFkappaB activation. **Nat Commun**, 6, p. 6537, Mar 13 2015.
- WRIGHT, J. D.; HU, Q.; MILLER, A.; LIU, S. *et al.* Tumor-derived G-CSF facilitates neoplastic growth through a granulocytic myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism. **PLoS One**, 6, n. 11, p. e27690, 2011.
- WALBOOMERS, J. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X. *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol**, 189, n. 1, p. 12-19, Sep 1999.
- WALCH-RUCKHEIM, B.; MAVROVA, R.; HENNING, M.; VICINUS, B. *et al.* Stromal Fibroblasts Induce CCL20 through IL6/C/EBPbeta to Support the Recruitment of Th17 Cells during Cervical Cancer Progression. **Cancer Res**, 75, n. 24, p. 5248-5259, Dec 15 2015.
- WHITESIDE, T. L. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, 27, n. 45, p. 5904-5912, Oct 6 2008.



YAN, B.; WEI, J. J.; YUAN, Y.; SUN, R. *et al.* IL-6 cooperates with G-CSF to induce protumor function of neutrophils in bone marrow by enhancing STAT3 activation. **J Immunol**, 190, n. 11, p. 5882-5893, Jun 1 2013.

YOO, C.; KANG, J.; LIM, H. Y.; KIM, J. H. *et al.* Phase I Dose-Finding Study of OPB-111077, a Novel STAT3 Inhibitor, in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma. **Cancer Res Treat**, 51, n. 2, p. 510-518, Apr 2019.

YU, J.; WANG, Y.; YAN, F.; ZHANG, P. *et al.* Noncanonical NF-kappaB activation mediates STAT3-stimulated IDO upregulation in myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. **J Immunol**, 193, n. 5, p. 2574-2586, Sep 1 2014.

## APÊNDICE

**APÊNDICE**

**(Trabalhos submetidos ou Publicações realizadas durante o período do Doutorado)**

**PLOS Biology**

**Cross-talk between STAT3 and p65 NF-kappaB as an immune evasion mechanism and therapeutic target for cervical cancer.**

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	PBIOLOGY-D-19-03378
<b>Full Title:</b>	Cross-talk between STAT3 and p65 NF-kappaB as an immune evasion mechanism and therapeutic target for cervical cancer.
<b>Article Type:</b>	Initial Research Submission
<b>Corresponding Author:</b>	Ana Paula Lepique Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo Sao Paulo, Sao Paulo BRAZIL
<b>First Author:</b>	Ana Paula Lepique
<b>Order of Authors:</b>	Ana Paula Lepique
<b>Abstract:</b>	The tumor microenvironment generates different types of molecules, many soluble ones as cytokines and metabolites. These may circulate and signal systemically. To better understand the effects of this systemic and chronic signaling, we sought to characterize the activation status of signaling pathways involved in cell proliferation, inflammation and immune responses in cervical high-grade lesions and cancer. We chose Akt, STAT3, p65 NFkB and CREB as markers for these processes and used protein phosphorylation as a putative marker for activation. In patients' biopsies, we did not find significant changes in these proteins' expression according to lesion grade, although we did observe a strong positive correlation in the expression of STAT3, Akt and CREB in cancer biopsies. In circulating leukocytes, however, we observed that transition from high-grade lesion to cancer was accompanied by a significant increase in STAT3 expression and significant decrease in p65 NFkB expression, which led us to investigate a potential relationship between them in cancer. Using a tumor experimental model, we first decided to neutralize IL-6 and G-CSF, two cytokines expressed by cervical cancer cells and known to activate STAT3, after that, we inhibited STAT3 with NSC74859. In both cases, we observed significant inhibition of tumor growth, increase in T lymphocyte recruitment to the tumor, reduction in phospho-STAT3 and increase in p65 NFkB expression in splenocytes, in a manner partially dependent on NFkB activity. Finally, we showed that transfer of lymphocytes from NSC74859 treated mice to tumor bearing recipients conferred protection to tumor growth. Our data shows that expression of STAT3 and p65 NFkB may be markers for tumor progression, and that pharmacological inhibition of STAT3 may be considered as therapy of patients with cervical cancer and possibly to other patients with systemic increase in STAT3 signaling.
<b>Additional Information:</b>	
<b>Question</b>	<b>Response</b>

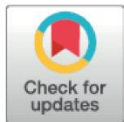
## RESEARCH ARTICLE

# Swainsonine, an alpha-mannosidase inhibitor, may worsen cervical cancer progression through the increase in myeloid derived suppressor cells population

Caio Raony Farina Silveira<sup>1</sup>, Marcella Cipelli<sup>1</sup>, Carolina Manzine<sup>1</sup>, Sílvia Helena Rabelo-Santos<sup>2</sup>, Luiz Carlos Zeferino<sup>3</sup>, Gretel Rodríguez Rodríguez<sup>1</sup>, Josiane Betim de Assis<sup>1</sup>, Suellen Hebster<sup>4</sup>, Isabel Bernadinelli<sup>5</sup>, Fabio Laginha<sup>5</sup>, Enrique Boccardo<sup>4</sup>, Luisa Lina Villa<sup>6,7</sup>, Lara Termini<sup>6</sup>, Ana Paula Lepique<sup>1\*</sup>

1 Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Departamento de Imunologia, São Paulo, Brazil, 2 Faculdade de Farmácia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiás, Brazil, 3 Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Campinas, Brazil, 4 Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Departamento de Microbiologia, São Paulo, Brazil, 5 Hospital Pérola Byington, São Paulo, Brazil, 6 Departamento de Radiologia e Oncologia, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 7 Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil

\* [alepique@icb.usp.br](mailto:alepique@icb.usp.br)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Silveira CRF, Cipelli M, Manzine C, Rabelo-Santos SH, Zeferino LC, Rodríguez Rodríguez G, et al. (2019) Swainsonine, an alpha-mannosidase inhibitor, may worsen cervical cancer progression through the increase in myeloid derived suppressor cells population. PLoS ONE 14 (3): e0213184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213184>

**Editor:** Joao P.B. Viola, Instituto Nacional de Cancer, BRAZIL

**Received:** September 9, 2018

**Accepted:** February 17, 2019

**Published:** March 6, 2019

**Copyright:** © 2019 Silveira et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** Data is contained within the manuscript.

**Funding:** CRFS and GRR have student fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, respectively. MC and CM had student fellowships from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. This work was supported by FAPESP

## Abstract

Cervical cancer, caused by high oncogenic risk Human Papillomavirus (HPV) infection, continues to be a public health problem, mainly in developing countries. Using peptide phage display as a tool to identify potential molecular targets in HPV associated tumors, we identified  $\alpha$ -mannosidase, among other enriched sequences. This enzyme is expressed in both tumor and inflammatory compartment of the tumor microenvironment. Several studies in experimental models have shown that its inhibition by swainsonine (SW) led to inhibition of tumor growth and metastasis directly and indirectly, through activation of macrophages and NK cells, promoting anti-tumor activity. Therefore, the aim of this work was to test if swainsonine treatment could modulate anti-tumor immune responses and therefore interfere in HPV associated tumor growth. Validation of our biopanning results showed that cervical tumors, both tumor cells and leukocytes, expressed  $\alpha$ -mannosidase. *Ex vivo* experiments with tumor associated macrophages showed that SW could partially modulate macrophage phenotype, decreasing CCL2 secretion and impairing IL-10 and IL-6 upregulation, which prompted us to proceed to *in vivo* tests. However, *in vivo*, SW treatment increased tumor growth. Investigation of the mechanisms leading to this result showed that SW treatment significantly induced the accumulation of myeloid derived suppressor cells in the spleen of tumor bearing mice, which inhibited T cell activation. Our results suggested that SW contributes to cervical cancer progression by favoring proliferation and accumulation of myeloid cells in the spleen, thus exacerbating these tumors systemic effects on the immune system, therefore facilitating tumor growth.



# NFAT1 Regulates Ly6C<sup>hi</sup> Monocyte Recruitment to the CNS and Plays an Essential Role in Resistance to *Toxoplasma gondii* Infection

Luciana Benevides<sup>1,2</sup>, Verônica M. Saltarelli<sup>1</sup>, Franciele Pioto<sup>1,2</sup>, Lais A. Sacramento<sup>1</sup>, Murilo S. Dias<sup>1</sup>, Gretel R. Rodríguez<sup>1</sup>, João P. B. Viola<sup>3</sup>, Vanessa Carregaro<sup>1</sup> and João S. Silva<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, <sup>2</sup> Fiocruz-Bi-Institutional Translational Medicine Platform, Ribeirão Preto, Brazil, <sup>3</sup> Program of Immunology and Tumor Biology, Brazilian National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

José Roberto Mineo,  
Federal University of Uberlândia, Brazil

### Reviewed by:

Emma Harriet Wilson,  
University of California, Riverside,  
United States  
Dolores Correa,  
National Institute of Pediatrics  
(Mexico), Mexico

### \*Correspondence:

João S. Silva  
jsdsilva@fmrp.usp.br

Monocytes play key roles in the maintenance of homeostasis and in the control of the infection. Monocytes are recruited from the bone marrow to inflammatory sites and are essential for antimicrobial activity to limit tissue damage and promote adaptive T cell responses. Here, we investigated the role of Nuclear Factor of Activated T cells 1 (NFAT1) in the regulation of Ly6C<sup>hi</sup> inflammatory monocyte recruitment to the CNS upon *T. gondii* infection. We show that NFAT-1-deficient monocytes are unable to migrate to the CNS of *T. gondii*-infected mice. Moreover, NFAT1<sup>-/-</sup> mice are highly susceptible to chronic *T. gondii* infection due to a failure to control parasite replication in the CNS. The inhibition of Ly6C<sup>hi</sup> inflammatory monocyte recruitment to the CNS severely blocked CXCL10 production and consequently the migration of IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T cells. Moreover, the transfer of Ly6C<sup>hi</sup> monocytes to infected NFAT1<sup>-/-</sup> mice favored CD4<sup>+</sup> T cell migration to the CNS and resulted in the inhibition of parasite replication and host defense. Together, these results demonstrated for the first time the contribution of NFAT1 to the regulation of Ly6C<sup>hi</sup> monocyte recruitment to the CNS and to resistance during chronic *T. gondii* infection.