

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO SISTÊMICO DE  
PACIENTES COM CÂNCER AVANÇADO SUBMETIDOS À  
IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS**

**Cláudia Mendonça Rodrigues**

Uberaba-MG

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**Cláudia Mendonça Rodrigues**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO SISTÊMICO DE  
PACIENTES COM CÂNCER AVANÇADO SUBMETIDOS À  
IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Patologia, área de concentração Patologia Clínica, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dra. Márcia Antoniazi Michelin

**Co-orientador:** Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta

Uberaba-MG

2010

**Capa:** Os Linfócitos (rosa) reconhecem fragmentos de patógenos e objetos estranhos associados a moléculas da superfície da célula dendrítica (azul), que lhes apresenta os antígenos.

**Foto:** Dr. Olivier Schwartz, Institute Pasteur/SPL - Stock Photos

**Fonte:** [http://www2.uol.com.br/sciam/reportagens/vacina\\_terapeutica\\_contra\\_o\\_cancer.html](http://www2.uol.com.br/sciam/reportagens/vacina_terapeutica_contra_o_cancer.html)

Rodrigues, Cláudia Mendonça.

Avaliação do perfil imunológico sistêmico de pacientes com câncer avançado submetidos à imunoterapia com células dendríticas/Cláudia Mendonça Rodrigues. 2010  
107f.; quad.; tab.;

Dissertação de Mestrado em Patologia Clínica – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2010.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dra. Márcia Antoniazi Michelin

1.Câncer 2. Células T 3.Células B 4.Células Dendríticas

*Dedicatória*

*Aos meus pais (Jerônimo e Milda), ao meu irmão (Adriano) e ao meu noivo  
(Cícero) com muito amor!*

*À amiga Bruna França Matias com carinho e gratidão!*

*Agradecimientos*

*À Profª Dra. Márcia Antoniazi Michelin e ao Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta, por terem me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho e pela importante orientação durante todos estes anos.*

*Ao amigo Nelson Rannieri Tirone, pela ajuda, confiança e companheirismo.*

*À amiga sincera Bruna França Matias, pela atenção e imenso apoio sempre quando precisei.*

*À minha família, por toda força, carinho e atenção.*

*Ao meu noivo Cícero, pelo amor e compreensão.*

*A todos os colegas do laboratório e pós-graduandos, Douglas, Ariana, Pamela, Cristiane, Letícia e André que me acompanharam nesta trajetória.*

*À Nelma, pela atenção dispensada na pós-graduação.*

*À Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pela estrutura que possibilitou o desenvolvimento desta pesquisa.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro a esta pesquisa.*

*E por fim, a todos os pacientes que participaram e tornaram possível o desenvolvimento deste estudo.*



*Sumário*

## SUMÁRIO

### LISTA DE TABELAS E QUADROS

### LISTA DE ABREVIATURAS

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
2.1	Objetivo geral.....	35
2.1	Objetivo específico.....	35
<b>3.</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>37</b>
3.1	Pacientes.....	37
3.2	Critérios de Inclusão.....	38
3.3	Critérios de exclusão.....	38
3.4	Amostras obtidas para a produção da vacina e análise da resposta imunológica.....	38
3.5	Obtenção das células mononucleares.....	39
3.6	Preparação da vacina de células dendríticas.....	40
3.7	Protocolo de vacinação.....	40
3.8	Análise da resposta imune por citometria de fluxo.....	40
3.9	Análise dos resultados.....	43
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
4.1	Aplicação da vacina.....	45
4.2	Segurança e toxicidade.....	45
4.3	Análise descritiva dos resultados.....	45
4.4	Análise estatística dos resultados.....	73
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>93</b>

### ANEXOS

# *Lista de Tabelas e Quadros*

<b>Quadro 1.</b>	Características dos pacientes submetidos ao tratamento de acordo com idade, sexo, tipo tumoral, estadio e intervenção terapêutica prévia.....	37
<b>Quadro 2.</b>	Marcações de superfície e intracelulares utilizadas.....	42
<b>Tabela 1.</b>	Descrição das quantidades de terapias, análises realizadas e intervalo de tempo.....	45

## *Lista de Abreviaturas*

**APC** – Célula Apresentadora de Antígeno

**CCR** – Receptor de quimiocina

**CD** – Cluster de diferenciação

**CDs** – Células Dendríticas

**CHP** – Complexo de Histocompatibilidade Principal

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de Carbono

**CTLA-4** - Antígeno 4 associado ao Linfócito T Citotóxico

**CTLs** – Linfócitos T citotóxico

**ELISA** - Ensaio imuno adsorvente de ligação de enzimas

**ERK** - Quinase regulada por sinal extracelular

**F** – Feminino

**FAPEMIG** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

**FOXP3** - fator de transcrição *Forkhead box p3*

**g** - gramas

**GITR** - Receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoide

**GM-CSF** - Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

**HLA-DR**- Antígeno Leucocitário Humano - DR

**IFN** – *Interferon*

**IL** - Interleucina

**M** - Masculino

**MEM** - *Minimal Essential Medium*

**mL** – mililitro

**NIC III** – Neoplasia Intraepitelial Cervical grau III

**NK** – *Natural Killer*

**NKT** – *Natural Killer T*

**nTregs** – T regulatórias naturais

**PAC** - Pacientes

**PBS** - *Phosphate Buffered Saline*

**PI-9** – Proteína Inibidora - 9

**PSA** – Antígeno Prostático Específico

**rpm** – Rotações por minuto

**STAT-4** - *Signal Transduction and Activation of Transcription* - 4

**T-bet** – Fator de transcrição *T box*

**TCR** – Receptor de células T

**TGF** – Fator de crescimento transformador

**Th** – *T helper* ou auxiliar

**TNF** – Fator de necrose tumoral

**TNM** - Tamanho, Acometimento linfonodal e Metástases à distância (estadio tumoral)

**Tr1** – T regulador 1

**Treg** – T regulatório

**UFTM** – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

*Resumo*



**Introdução:** O câncer é um importante problema de saúde pública. Estudos recentes tem demonstrado a eficácia na indução de resposta imune antitumoral através da imunoterapia com células dendríticas (CDs) para diferentes tipos de cânceres.

**Objetivo:** Avaliar perfil imunológico sistêmico antes e durante o tratamento com a vacina de CDs em pacientes com câncer avançado. **Metodologia:** Para tanto, oito pacientes com diagnóstico de câncer foram tratados através da administração de CDs por via subcutânea com intervalo de 15 dias entre as aplicações. Para a produção da vacina autóloga utilizou-se amostras de sangue periférico e biópsia tumoral. Durante o tratamento, colheu-se amostras de sangue periférico para a análise das populações de células imunes realizada através de citometria de fluxo utilizando anticorpos para as seguintes marcações: células T totais ( $\alpha$ -CD3 PE), células T auxiliares ( $\alpha$ -CD4 PE), células B ( $\alpha$ -CD19 PE) e células T regulatórias ( $\alpha$ -CD25 FITC/  $\alpha$ -FOXP3 PE). Avaliou-se ainda a expressão de citocinas intracelulares ( $\alpha$ -IL-2, IL-12, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  FITC) assim como a expressão da cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2 ( $\alpha$ -CD25 FITC). Para a avaliação dos resultados realizou-se análise descritiva dos parâmetros avaliados para todos os pacientes de forma individual, e para a análise estatística agrupou-se os resultados de todos os envolvidos submetendo-os ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. **Resultados e Discussão:** Durante a avaliação de células T CD4+ concomitantemente com citocinas IL-2, IL-12, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , observou-se notável expressão de IFN- $\gamma$  e IL-2 ( $p=0,0134$ ) e leve expressão de IL-12, IL-10 e TNF- $\alpha$ . Na avaliação da expressão da cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2 (CD25+) por células T CD4+, não foi observado estímulo considerável. Houve importante percentual de células T CD3+, porém quando avaliado a expressão de IL-2 o estímulo foi apenas ligeiro. Observou-se ainda estímulo de células B (CD19+) expressando IL-2, porém o mesmo não foi observado na marcação única (CD19+). Quando avaliado a expressão de

células T regulatórias não observamos estímulo considerável. Desta forma, nota-se que a imunoterapia com CDs foi capaz de estimular a resposta imune, observado principalmente pelo estímulo de células T auxiliares expressando IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , citocinas importantes do perfil Th1. No entanto, houve queda da resposta após certo momento do tratamento para todos os parâmetros avaliados, sugerindo novo mecanismo de escape lançado pelos tumores. **Conclusão:** De modo geral, observamos que a imunoterapia com CDs foi capaz de alterar o perfil imunológico sistêmico em pacientes com diferentes tipos de cânceres avançados durante certo tempo de tratamento.

**Palavras-chave:** câncer, células T, células B, células dendríticas.

*Abstract*

**Introduction:** Cancer is a major public health problem. Recent studies have demonstrated efficacy in inducing antitumor immune response by immunotherapy with dendritic cells (DCs) for different types of cancers. **Objective:** To evaluate systemic immune profile before and during treatment with DCs vaccine in patients with advanced cancer. **Methods:** For that purpose, eight patients with cancer were treated by subcutaneous administration of DCs with an interval of 15 days between applications. For the production of the autologous vaccine we used peripheral blood samples and tumor biopsy. During treatment, blood samples were collected for analysis of immune cell populations performed by flow cytometry using antibodies to the following marks: total T cells ( $\alpha$ -CD3-PE), helper T cells ( $\alpha$ -CD4 PE), B cells ( $\alpha$ -CD19-PE) and regulatory T cells ( $\alpha$ -CD25 FITC /  $\alpha$ -FOXP3-PE). We also evaluated the expression of intracellular cytokines ( $\alpha$ -IL-2, IL-12, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  FITC) as well as expression of IL-2 receptor  $\alpha$  chain ( $\alpha$ -CD25 FITC). The evaluation of the results was performed by descriptive analysis of all parameters for patients individually. For statistical analysis, the results of all patients were grouped and submitted to the Kruskal-Wallis test.

**Results and Discussion:** During the evaluation of CD4 + T cells concomitantly with IL-2, IL-12, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , we observed a remarkable expression of IFN- $\gamma$  and IL-2 ( $p = 0.0134$ ) and mild expression of IL-12, IL-10 and TNF- $\alpha$ . Assessing CD4 + T cells expressing the IL-2 receptor  $\alpha$  chain (CD25 +), there was no considerable stimulus. Important CD3 + T cells percentage was observed, but when measured the expression of IL-2 the stimulation was only slight. We also noticed stimulation of B cells (CD19 +) expressing IL-2, but the same was not observed to CD19+ only. We did not observe considerable stimulus of regulatory T cells expression. Thus, the immunotherapy with DCs was able to stimulate the immune response, observed mainly by the stimulation of helper T cells expressing IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , cytokines of Th1

profile. However, there was a decrease of the response after a treatment time for all parameters, suggesting a new mechanism of tumor escape launched by tumors.

**Conclusion:** Overall, we found that immunotherapy with DCs was able to alter the systemic immune profile in patients with different types of advanced cancer for a time of treatment.

**Keywords:** cancer, T cells, B cells, dendritic cells.

*Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

As grandes transformações ocorridas na sociedade e economia nas últimas décadas levaram a alterações nos padrões e estilos de vida da população e grandes mudanças puderam também ser observadas em relação ao processo saúde-doença, com aumento de doenças crônico-degenerativas, principalmente doenças cardiovasculares e câncer.

O câncer é um importante problema de saúde pública tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. No Brasil as estimativas, para o ano de 2010 válidas também para o ano de 2011, assinalam para a ocorrência de 489.270 novos casos de câncer, sendo que os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino (BRASIL, 2009). Nas estatísticas da Organização Mundial de Saúde o câncer foi causa de morte de aproximadamente 7,4 milhões de pessoas em 2004 e estudos preveem que mais de 83,2 milhões de pessoas terão morrido de câncer até 2015, sendo a segunda maior causa de óbitos no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008).

Toda essa transformação ocorrida em relação ao processo saúde-doença nos últimos tempos vem tornando cada vez mais complexo o seu entendimento.

### 1.1 Desenvolvimento do câncer

O câncer corresponde a um conjunto de doenças genéticas que deriva de várias mutações em genes específicos, gerando instabilidades genômicas e conseqüentemente proliferação celular acelerada e descontrolada. Tais mutações podem levar a perda ou

aumento de função do gene, sendo que alterações tanto genéticas quanto epigenéticas estão envolvidas na oncogênese e progressão tumoral (HART, 2004; MERLO et al., 2006). O processo tumorigênico ocorre devido a algumas características peculiares: crescimento autossuficiente e ilimitado, resistência a apoptose, resistência aos estímulos de inibição do crescimento, angiogênese sustentada, potencial metastático (ZITVOGEL et al., 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2000) e escape frente à vigilância imunológica (DUNN et al., 2002; SCHAROVSKY et al., 2006).

Todas as alterações das células cancerígenas culminam na produção de “sinais de perigo” resultando na expressão de proteínas mutantes que podem ser reconhecidas como estranhas para o sistema imunológico gerando uma resposta antitumoral (ZITVOGEL et al., 2008).

## 1.2 Resposta imune contra o câncer

Estamos constantemente expostos a diversos danos como vírus, bactérias, toxinas, dentre outros. No entanto, o organismo desenvolveu um sistema de proteção que é constituído por mecanismos capazes de combatê-los.

Paul Ehrlich, durante o século 20, foi o primeiro a sugerir que o sistema imune apresentava a habilidade de reconhecer células tumorais como estranhas e reagir contra elas. No entanto, a ideia de que as células tumorais seriam antígenos “não próprios” e que as células do sistema imune teriam a capacidade de reconhecê-las e eliminá-las foi questionado por algum tempo (EHRlich, 1909; SCHAROVSKY, 2006).

Embora sob tantas controvérsias, um pouco mais tarde, Macfarlane Burnet e Lewis Thomas reafirmaram a ideia de Ehrlich quando lançaram a *teoria da vigilância imunológica* propondo que mesmo quando não detectados, a maioria dos tumores pode



ser eliminado de forma eficiente pelo sistema imunológico (BURNET, 1970; THOMAS, 1982; SCHAROVSKY, 2006; DUNN, 2002).

Desta forma, atualmente já se conhece que o sistema imune é formado por duas linhas principais de resposta: a imunidade inata e a imunidade adquirida ou adaptativa. A imunidade inata é composta por células como os macrófagos, células dendríticas (CDs), células *natural killers* (NK), neutrófilos, basófilos, eosinófilos e mastócitos. Esta corresponde à primeira linha de defesa contra patógenos agindo principalmente como sentinelas patrulhando o organismo na busca por corpos estranhos. É caracterizada como uma resposta imediata, porém sem memória imunológica (VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006; DEGLI-ESPOSTI; SMYTH, 2005).

O estímulo da resposta imune inata conduz a ativação da imunidade adquirida, que é composta por células T citotóxicas (CD8+), T auxiliares ou *helper* (CD4+) e células B (CD19+). Estas células que compõem a imunidade adquirida são caracterizadas por apresentarem um vasto repertório de receptores antigênicos e indução de memória imunológica (JOHANSSON; DENARDO; COUSSENS, 2008).

Embora caracterizadas como duas linhas de repostas distintas, estas se encontram em constante interação. Para que haja a indução de uma resposta imune adquirida com ativação de linfócitos T de forma eficaz há necessidade da apresentação antigênica via complexo de histocompatibilidade principal (CHP) de classe I para linfócitos T CD8+, ou de classe II para linfócitos T CD4+ por células apresentadoras de antígenos, além de estímulos através de mediadores (citocinas pró-inflamatórias). A partir desta apresentação antigênica, através do receptor de células T (TCR) que se encontra associado à molécula responsável pela transdução de sinal de ativação denominada CD3 (complexo TCR/CD3), os linfócitos T conseguem realizar o reconhecimento de antígeno na fenda do CHP (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998).

Frente a todos estes mecanismos complexos que compõem o sistema imunológico, observa-se que a resposta antitumoral é realizada mais comumente por uma resposta celular mediada principalmente por células T citotóxicas (CTLs) e *natural killers* (NK), embora haja antígenos de superfície que possam também ser reconhecidos por anticorpos (resposta imune humoral). O foco principal dos estudos envolvendo a resposta imune antitumoral sempre girou em torno da resposta imune realizada por linfócitos T citotóxicos. A maioria dos tumores são CHP classe I positivos e estas células imunes tem grande habilidade em erradicar grandes massas tumorais, além da capacidade de reconhecer uma vasta linha de antígenos tumorais (TOES, 1999; JOHANSSON; DENARDO; COUSSENS, 2008). No entanto, outras células e outros mecanismos também estão envolvidos e são importantes na resposta imune antitumoral.

#### 1.2.1 Linfócitos T auxiliares CD4+

Existem relatos de que as células T CD4+ apresentam importantes e distintas funções na imunidade antitumoral. Alguns epítomos derivados de antígenos tumorais humanos e reconhecidos por células T CD4+ já foram descritos (TOPALIAN et al., 1996; CHAUX et al., 1999). Muitas pesquisas visam o seu papel como auxiliar na indução de CTLs com evidências de que este auxílio também é dependente das células apresentadoras de antígenos (APCs) como intermediárias, um processo denominado de apresentação cruzada de antígenos (*cross-priming*). Além disso, a interação entre CD40 e CD40 ligante entre as células T CD4+ e a APC parece importante para a ativação desta última e conseqüentemente para apresentação antigênica e estimulação dos CTLs (BENNETT et al., 1998; CELLA et al., 1996; BAXEVANIS et al., 2000).

Desta maneira, as células T auxiliares (CD4+), como o próprio nome diz, auxiliam a resposta imune de diversas maneiras, podendo coordená-la através de diversos mecanismos principalmente através da produção de citocinas.

A partir da ativação dos linfócitos T CD4+ *naive*, via reconhecimento do antígeno na fenda do CHP de classe II através do receptor de células T (primeiro sinal) e interação das moléculas de adesão e co-estimulatórias (segundo sinal), ocorre a expansão clonal destas células que podem se diferenciar em células efetoras e ou de memória. O caminho de resposta das células T CD4+ efetoras depende do microambiente presente no momento da ativação, ou seja, com base nas citocinas presentes e envolvidas neste momento, a resposta imune pode seguir caminhos diferenciados (KENNEDY; CELIS, 2008). Além disso, há indícios de que as CDs, talvez através de um terceiro sinal, também sejam responsáveis pela polarização da resposta imune (KALINSKI et al., 1999). De acordo com o tipo de antígeno ao qual as CDs são expostas há expressão de diferentes moléculas co-estimulatórias podendo induzir à distintos caminhos de repostas mediadas por células T CD4+ (DE JONG; SMITS; KAPSENBERG, 2005; DE JONG et al., 2002).

Tendo em vista a possibilidade de indução de diferentes caminhos de resposta das células T auxiliares, existem subpopulações destas que podem ser definidas pelas citocinas que produzem e o tipo de imunidade que estabelecem.

Células do tipo T helper 1(Th1) produzem interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), interleucina-2 (IL-2) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), potencializando a imunidade mediada por células e induzidas via sinalização de IL-12 através do transdutor de sinal e ativador de transcrição - 4 (STAT-4) e T-bet (GLIMCHER; MURPHY, 2000; ATHIE-MORALES, 2004; KENNEDY; CELIS, 2008). Células tipo Th2 produzem IL-4, IL-5 e fator transformador de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que direcionam uma resposta imune do tipo

humoral e são induzidas via IL-4 com ativação dos fatores de transcrição 6 (STAT6) e GATA-3 (MOWEN; GLIMCHER, 2004; KENNEDY; CELIS, 2008).

O desenvolvimento de Th1 ou Th2 ocorre por regulação cruzada, sendo que IFN- $\gamma$  tende a induzir Th1 e suprimir Th2, enquanto IL-4 suprime Th1 induzindo Th2. A geração eficiente de uma resposta do tipo Th1 parece eficaz na ação antitumoral e o contrário parece ocorrer na indução de Th2 (SREDNI et al., 1996; KENNEDY; CELIS, 2008). O estudo de Bais e colaboradores (2005) demonstrou a mudança para um padrão de citocinas do perfil Th2 durante a carcinogênese em mulheres com neoplasia intraepitelial cervical grau III (NICIII).

Outra subpopulação de células T CD4<sup>+</sup> apresenta função imunossupressora e é denominada de células T regulatórias (Tregs). As células Tregs que se formam no timo são ditas de ocorrência natural ou células Tregs naturais (nTregs) . Expressam as moléculas CD4<sup>+</sup> e CD25<sup>+</sup> e o fator de transcrição FOXP3<sup>+</sup>, identificado como fator chave no desenvolvimento de células Tregs. Envolvidas principalmente na manutenção da autotolerância imunológica, prevenção de doenças autoimunes e de resposta exacerbadas contra patógenos, seu papel supressivo envolve tanto o contato célula-célula como a produção de citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$  (SAKAGUCHI, 2004; ZHENG; RUDENSKY, 2007). Por outro lado, existem ainda as Tregs conhecidas como induzidas ou adquiridas que se originam na periferia a partir de determinados estímulos (CHEN et al., 2003). Dentre estas existem as células Tr1 e Th3 que realizam suas funções regulatórias através da liberação das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ , respectivamente. Estas uma vez induzidas passam a expressar FOXP3. Dentre os marcadores de superfície presentes nas células Tregs e que também estão associados a seu fenótipo e funções estão: antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) e receptor de

TNF induzido por glicocorticóides (GITR) (BEISSERT; SCHWARZ; SCHWARZ, 2006; SAKAGUCHI et al., 2008; VIGNALID; COLISSON; WORKMAN, 2008).

Além da atuação na prevenção de autoimunidade e manutenção da autotolerância, há evidências de que as células Tregs atuam a favor da progressão tumoral devido à supressão da resposta imune (BEYER; SCHULTZE, 2006). As células Tregs tem a habilidade de inibir a função efetora de células NK (GHIRINGHELLI et al. 2005), linfócitos T citotóxicos específicos para o tumor (CHEN et al., 2005) e agem ainda sobre as CDs inibindo sua função normal (LARMONIER et al., 2007). No estudo de Wolf e colaboradores (2003), foi possível observar o aumento de células Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> no sangue periférico de pacientes com câncer com potentes características imunossupressoras.

Recentemente outras subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> foram descritas como as células Th17 e Th9. As células Th17 são produtoras de IL-17, IL-23, IL-6 e TNF- $\alpha$ , estão relacionadas com a promoção ou manutenção de processos inflamatórios crônicos e envolvidas em doenças autoimunes (KORN et al., 2009; GUEDES et al., 2010). Pouco investigadas até o momento, as células Th9 parecem atuar na proliferação de células T e conduz a inflamação tecidual. São induzidas principalmente através do estímulo por TGF- $\beta$  e IL-4 e a principal citocina secretada por essas células é a IL-9. Essa citocina, inicialmente conhecida como citocina do perfil Th2, apresenta diferentes papéis no sistema imune atuando principalmente em doenças autoimunes e no desenvolvimento e manutenção de células efetoras (VELDHOEN et al., 2008; MA, TANGYE; DEENICK, 2010; LI; ROSTAMI, 2010).

### 1.2.2 Linfócitos B

Embora a resposta imune antitumoral mediada por células seja de maior importância, a indução de resposta imune humoral com produção de autoanticorpos contra antígenos super expressos ou modificados no câncer já foi relatado em alguns trabalhos (PONTES et al., 2006; HAMRITA, 2008). Ainda que não esteja bem instituído o mecanismo exato para a produção destes autoanticorpos, sabe-se que a maior expressão dos antígenos tumorais durante a carcinogênese, ocorrência de processamento anormal de proteínas celulares antigênicas com presença de proteínas mutadas e alteração da via de transdução de sinal, sejam eventos que conduzam a uma maior imunogenicidade tumoral, conseqüentemente estimulando a resposta imune humoral (DESMETZ, 2009; ANDERSON; LA BAER, 2005).

Sendo assim, estudos demonstram que a identificação das proteínas antigênicas bem como dos autoanticorpos relacionados são importantes estratégias para a descoberta de novos biomarcadores tumorais (DESMETZ, 2009; SHOSHAN & ADMON, 2007; IMAFUKU; OMENN; HANASH, 2004).

Desta forma, frente à teoria de vigilância imunológica e o conhecimento de todos estes mecanismos defesa, o que se espera é que células do sistema imune consigam reconhecer e destruir células tumorais prevenindo seu desenvolvimento. Porém, nos últimos anos, tem se observado que o sistema imunológico pode falhar, em determinadas condições, permitindo a progressão tumoral e metástases.

### 1.3 Escape tumoral

Existem evidências de que o tumor tenha a capacidade de escapar da vigilância imunológica quer através do mecanismo de imunoeedição ou através da imunossupressão (supressão ativa do sistema imune) (ZITVOGEL et al., 2008). Em relação ao primeiro, este pode ser dividido em três passos principais: *eliminação*, que se refere ao sucesso inicial na erradicação das células tumorais pelo sistema imunológico; *equilíbrio*, em que células tumorais e sistema imune encontram-se em equilíbrio e as células que sobreviveram à eliminação passam a sofrer “modelamentos” devido à pressão imunológica, com mutações genéticas variadas que as levam a apresentarem-se menos imunogênicas; *escape*, fase final da imunoeedição onde as células tumorais variantes menos imunogênicas conseguem escapar da vigilância imunológica e continuar a sua proliferação (MALMBERG; LJUNGGREN, 2006; DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004).

Desta forma, os mecanismos de escape principais lançados pelas células tumorais podem ser divididos em três processos principais (MALMBERG; LJUNGGREN, 2006; PAWELEC, 2004):

**Ausência de reconhecimento:** alterações na expressão de moléculas do CHP dificultando o reconhecimento antigênico pelos linfócitos T, defeito no processamento e apresentação antigênica, diminuição da expressão de antígenos tumorais, aumento da expressão de ligantes e receptores inibitórios, supressão mediada por células Tregs.

**Ausência de susceptibilidade:** disfunção na sinalização através de receptores de morte; alteração na via da p53, resistência à perforina através da expressão de PI-9 e Catepsina B.

**Indução de disfunção imune:** secreção de citocinas imunossupressoras (TGF- $\beta$ , Il-10), indução de células mieloides supressivas e células Tregs.

Além disso, os tumores podem ainda conduzir à supressão das funções das CDs, tornando-as incapazes de estimular e ativar de forma eficiente as células T. Observa-se que esta imunossupressão das CDs ocorre de forma sistêmica e alterações na sua diferenciação são frequentemente evidenciadas, com diminuição de CDs maduras, funcionais e aumento de CDs imaturas e funcionalmente incapazes de ativar as células T (GABRILOVICH, 2004).

Nestle e colaboradores (1997) investigaram no carcinoma basocelular de pele a expressão de moléculas co-estimulatórias em CDs associadas ao tumor e observaram importantes coleções de CDs HLA-DR positivas, porém estas se encontravam deficientes em importantes moléculas co-estimulatórias, sendo fracas estimuladoras da proliferação de células T.

#### 1.4 Células Dendríticas

As CDs são potentes células apresentadoras de antígeno com função crucial na regulação da resposta imune adquirida. São originadas a partir de células tronco hematopoiéticas e podem surgir de pelo menos dois tipos de linhagens distintas. Apresentam morfologia longa e ramificados prolongamentos, assemelham-se a um neurônio e podem ser encontrados no sangue, na medula óssea, em vários órgãos como rins, pulmões, intestino, coração e trato genital (KAH-WAI; JACEK; JACEK, 2006).

A heterogeneidade das CDs e a possibilidade da existência de subpopulações com diferentes funções têm levado os pesquisadores a considerar este fato na produção de estratégias de terapias com CDs. A classificação das CDs em subpopulações sofre divergências entre os vários autores, porém de modo geral estas parecem se subdividirem em: CDs mielóides e CDs plasmocitóides, dependendo do percurso de



desenvolvimento (KAH-WAI; JACEK; JACEK, 2006; FRICKE; GABRILOVICH, 2006). Estas células apresentam-se também com características fenotípicas diferentes. As CD3 plasmocitóides (COLONNA; TRINCHIERI; LIU, 2004) são produtoras de IFN do tipo I e sua função está associada ao controle de infecções virais. As CD3 mielóide estão envolvidas na iniciação e regulação da resposta imune, sendo intensamente utilizada em estudos clínicos baseados em CD3 devido à possibilidade de sua geração *in vitro* a partir de precursores CD34+ ou monócitos CD14+ (NONN et al., 2003; BERNHARD et al., 1995).

As CD3 passam por duas fases de desenvolvimento: CD3 imatura e CD3 maduras. As CD3 imaturas localizam-se principalmente nos tecidos periféricos e ao se deparar com o antígeno realizam suas funções de captura e processamento do mesmo. Em seguida há o reconhecimento de “sinais de perigo” associados aos patógenos que faz com que estas CD3 imaturas iniciem seu processo de maturação, migrando para os órgãos linfóides secundários para realizar a apresentação do antígeno e ativação de linfócitos T (GILBOA, 2007; JONULEIT et al., 2001). No estágio imaturo as CD3 se tornam muito eficientes na captura de antígeno pelo fato de possuírem mecanismos como a macropinocitose, receptores para a porção Fc de imunoglobulinas, receptores do tipo lectinas e receptores para o reconhecimento de células apoptóticas e necróticas. Já no estágio maduro as CD3 expressam altos níveis de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86), aumentam a expressão de moléculas de CHP I e passam a expressar moléculas CD83 e CCR7. Ao mesmo tempo, estas deixam de expressar os receptores de quimiocinas CCR1, CCR5 e CCR6 favorecendo a migração destas células ativadas para áreas timo dependentes dos linfonodos (MCLELLAN et al., 1995; FONG; ENGLEMAN, 2000).

Inúmeros estudos clínicos relacionados com a imunoterapia envolvendo CD8 vêm sendo realizados, visto que estas células tem papel primordial na ativação da resposta imune. Essa é mais frequentemente aplicada em melanomas, porém outros tipos de tumores como de próstata, cervical, renal, dentre outros, também vem sendo avaliados. (KYTE et al., 2006; HERSEY et al., 2004; HEISER et al., 2002; SATIN et al., 2006; BARBUTO et al., 2004; KOBAYASHI et al., 2003).

### 1.5 Imunoterapia com Células Dendríticas

A utilização do sistema imunológico de forma a combater o câncer já é um tema que vem sendo explorado desde o século XIX . Desde então as pesquisas envolvendo o sistema imune vem avançando a cada dia mais. Vários tipos de imunoterapias vêm sendo desenvolvidas como uma forma de tratamento de várias neoplasias: terapia com imunoestimulantes, anticorpos, citocinas ou terapias celulares (DOUNGAN; DRANOFF, 2009).

Nos últimos anos vários trabalhos vêm comprovando os benefícios da imunoterapia com CD8, demonstrando segurança diante da presença de insignificantes efeitos colaterais do tratamento, além de resultados interessantes na estimulação de células (BARBUTO et al., 2004; SATIN et al., 2006; HEISER et al. 2002). Desta maneira, esforços são aplicados na busca da estimulação de uma resposta imune antitumoral eficaz. Variados protocolos para a produção da vacina vem sendo avaliados, assim como a busca da melhor forma de administração da mesma com intuito de obtenção de melhor ativação de células T (BENDER et al. 1996; FONG et al., 2001; BEDROSIAN et al., 2003).

Heiser e colaboradores (2002), realizaram o tratamento de 13 pacientes com câncer de próstata através da administração de crescentes doses da vacina com CDs transfectadas com RNAm codificado para antígenos prostáticos específicos (PSA). Não houve evidência de toxicidade dose-limite ou efeitos adversos, sendo possível observar a indução de respostas de células T específicas para PSA consistentemente em todos os pacientes, sugerindo bioatividade *in vivo* da vacina.

Em outro estudo notou-se o desenvolvimento de resposta de CTL específica para CEA (antígeno carcinoembrionário) em pacientes com malignidades gastrintestinais após a imunoterapia com CDs pulsadas com peptídeo CEA. As CDs foram obtidas a partir de monócitos de sangue periférico, sob estímulo de IL-4 e GM-CSF e foram pulsadas com CEA652. A administração foi feita a oito pacientes via subcutânea na região inguinal a cada duas ou três semanas. Quatro de sete pacientes desenvolveram respostas de CTL após as vacinações, não sendo observado efeitos adversos tóxicos importantes. Três dos pacientes apresentaram estabilização da doença após a vacinação (MATSUDA et al., 2004).

É diante de todos esses mecanismos complexos que envolvem o escape tumoral frente ao sistema imune, considerando ainda a importância crucial das CDs na indução de resposta imune contra antígenos tumorais e o fato de que estas podem se encontrar imaturas e incapazes de desenvolver suas funções de modo normal devido à ação tumoral, foi que se desenvolveu este estudo.

*Objetivos*

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar perfil imunológico sistêmico antes e durante o tratamento com a vacina de CDs em pacientes com câncer avançado.

### 2.2 Objetivos específicos

Avaliar os seguintes parâmetros, por Citometria de Fluxo, antes e durante o tratamento com imunoterapia de CDs em pacientes com câncer avançado:

1. Linfócitos T totais (CD3+)
  - Linfócitos T auxiliares (CD4+)
  - Linfócitos T regulatórios (CD25+, FOXP3+)
2. Linfócitos B (CD19+)
3. Citocinas intracelulares (IL-2, IL-12, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) expressas pelas populações celulares descritas nos itens 1 e 2.

*Metodologia*

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Pacientes

Foram selecionados oito pacientes prospectivamente no Hospital Escola de Uberaba com diagnóstico de câncer. Todos os envolvidos foram informados a respeito das intenções da pesquisa e puderam confirmar sua participação através da assinatura do termo de consentimento (**Anexo 1**). O projeto prevendo a imunoterapia com CDs para pacientes com câncer se encontra aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), protocolo número 683-2006 (**Anexo 2**). Este está sendo financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Parte dos pacientes envolvidos no estudo passou previamente por tratamentos convencionais como quimioterapia e/ou radioterapia. Sendo assim, para a participação no estudo e submissão à imunoterapia com CDs, exigiu-se um tempo médio de dois meses de espera para o início deste tratamento. No **quadro 1** encontra-se um resumo das características gerais de cada paciente envolvido na pesquisa.

**Quadro 1:** Características dos pacientes submetidos ao tratamento de acordo com idade, sexo, tipo tumoral, estadió e intervenção terapêutica prévia.

PACIENTES	IDADE	SEXO	TUMOR	ESTADIO (TNM)	INTERVENÇÃO PRÉVIA
PAC 1	76	F	Câncer de vagina	IIIB (T3N1M0)	Cirurgia
PAC 2	77	F	Melanoma de vagina	IIC (T4NxMx)	-
PAC 3	48	F	Câncer de vagina	0 (T <i>in situ</i> )	Radioterapia, Cirurgia, Interferon
PAC 4	17	M	Neurofibromatose	Benigno	Cirurgia
PAC 5	66	F	Câncer de Mama	IV (T4dN2M1)	Quimioterapia, Radioterapia, Cirurgia

<b>PAC 6</b>	80	F	Câncer de Mama	IIC (T4dN3Mx)	-
<b>PAC 7</b>	39	F	Câncer de colo uterino	IVB (T2bN0M1)	Quimioterapia, Radioterapia, Cirurgia
<b>PAC 8</b>	27	F	Câncer de Mama	IV (T2N1M1))	Quimioterapia, Radioterapia, Cirurgia

\*NOTAS: TNM = classificação do estágio tumoral, onde T refere-se ao tamanho, N ao acometimento linfonodal e M para presença de metástases à distância. Sexo = m (masculino) e f (feminino).

### 3.2 Critérios de Inclusão

Como critérios para a inclusão dos pacientes na pesquisa temos:

- Pacientes com qualquer idade ou sexo;
- Pacientes diagnosticados com qualquer tipo de câncer (sólido) que possibilite realização de biópsia.

### 3.3 Critérios de Exclusão

Como critérios para a exclusão dos pacientes na pesquisa temos:

- Pacientes em estado terminal intensamente imunossuprimidos;
- Pacientes com outras doenças imunossupressoras;
- Pacientes ainda sobre tratamentos convencionais como quimioterapia e radioterapia.

### 3.4 Amostras obtidas para produção da vacina e análise da resposta imunológica

Cada paciente envolvido no estudo foi submetido à coleta de amostra de biópsia para avaliação anatomopatológica, extração das proteínas tumorais e produção da



vacina de CDs. Foram colhidas ainda amostras de sangue periférico para obtenção de leucócitos para a realização da avaliação da resposta imunológica antes e durante o tratamento com vacina de CDs, pelo método de citometria de fluxo (citômetro FACSCalibur<sup>TM</sup> BD com princípio de “sorter”) e obtenção de células mononucleares para produção da vacina.

### 3.5 Obtenção das Células Mononucleares

Colheu-se o sangue periférico dos pacientes e colocou-se cuidadosamente sobre 15 ml de uma solução de *Ficoll-Hypaque* em tubos plásticos cônicos de 50 ml. Os tubos foram centrifugados a 1450 rpm por 20 minutos a 4°C em centrífuga refrigerada. Ao final da centrifugação, obteve-se um anel de células mononucleares na interface entre a solução de Ficoll e o RPMI utilizado para suspender as células. Os outros tipos celulares ficaram no fundo do tubo. O anel de células foi cuidadosamente coletado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para um tubo cônico de 50,0 ml. O excesso de Ficoll foi removido por centrifugação lavando-se as células por três vezes com 30,0 ml de MEM (*Minimal Essential Medium*) em cada lavagem, a 4°C e a velocidade de 1500 rpm por 10 minutos. As células foram finalmente ressuspensas em 5,0 ml de RPMI contendo 4,75 g/l de HEPES, 10% de soro humano AB<sup>+</sup> inativado, 1,6% de L-glutamina, 3% de coquetel dos antibióticos penicilina e estreptomicina e 0,05 mg de gentamicina. A quantidade de células obtidas foi determinada por contagem em câmara de *Neubauer*. Avaliou-se a viabilidade celular utilizando-se o teste do azul de tripan. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis utilizando-se capela de fluxo laminar, com exceção da contagem de células.

### 3.6 Preparação da vacina de células dendríticas

Após a separação, as células mononucleares foram mantidas *in vitro* em cultura a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 7 dias na presença de GM-CSF e IL-4 para diferenciação em CDs. As células diferenciadas foram colocadas em contato com os antígenos tumorais obtidos através da biópsia, colhida do próprio paciente e submetidas à eletroporação. Após este processo, as CDs foram conservadas por mais algum tempo em cultura para o processo de maturação.

### 3.7 Protocolo de vacinação

Realizou-se a infusão de aproximadamente 5 a 10 x 10<sup>6</sup> cels/mL de CDs autólogas ativadas com os antígenos tumorais por via subcutânea e com intervalo médio de 15 dias entre as aplicações durante um tempo indeterminado de tratamento.

### 3.8 Análise da resposta imune por citometria de fluxo

Durante o processo de acompanhamento dos pacientes, a cada momento de aplicação de uma nova vacina, amostras de sangue periférico foram colhidas para a avaliação da resposta imunológica, sendo que a primeira coleta foi realizada antes da aplicação da primeira vacina para avaliarmos o momento antes (pré) do início do tratamento. Inicialmente as análises da resposta imunológica foram realizadas a cada momento de aplicação da vacina, sendo então com intervalo médio de 15 dias entre as análises, para observarmos o que ocorreria a curto prazo. Posteriormente as análises

passaram a ser realizadas com intervalo médio de 30 dias, ou seja, a cada duas aplicações da vacina.

Para tanto, amostras de sangue periférico colhidas foram preparadas para a análise de algumas populações celulares como: células T totais (CD3+), células T auxiliares (CD4+), células B (CD19+). Avaliou-se ainda células T auxiliares (CD4+) expressando citocinas como IL-2, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ , e a cadeia  $\alpha$  do receptor da citocina IL-2 (CD25+). Foram analisados também células T totais e células B expressando IL-2, assim como as células T regulatórias (CD25+FOXP3+) (Ver **quadro 2** com as respectivas marcações).

A técnica utilizada foi a citometria de fluxo (citômetro FACSCalibur™ BD com princípio de “sorter”) (**Anexo 3**) de acordo com o protocolo de citometria sugerido no Kit *Fixation/Permeabilization BD Cytotfix/Citoperm™* com utilização de anticorpos *BD Pharmigen™*.

Em linhas gerais, inicialmente após a coleta de sangue total, realizou-se a lise de hemácias utilizando-se 20 mL da solução de lise *BD FACS™ Lysing Solution* para cada 1 mL de sangue. Incubou-se por 15 a 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida centrifugou-se a 1.200g, por 10 minutos à 4°C. Após este último processo descartou-se todo o sobrenadante e logo lavou-se duas vezes com solução de PBS (*PHOSPHATE BUFFERED SALINE*) uma vez concentrada (1x).

Na última lavagem com PBS 1x descartou-se todo o sobrenadante e adicionou-se novamente cerca de 1 ml de PBS 1x para a aplicação de 2 a 4ul de *BD GolgiStop™*. Incubou-se à 4°C por cerca de 30 minutos e em seguida lavou-se as amostras duas vezes com PBS 1x.

Em seguida realizou-se a contagem de células em câmara *Neubauer* para posterior marcação destas, em 50 ul de PBS, com quantidade apropriada do anticorpo de

marcação de superfície. Incubou-se por 30min a 4°C ao abrigo da luz. Após a incubação com este primeiro anticorpo submeteram-se as amostras a mais duas lavagens com 1 mL de PBS 1x.

Para realizar a permeabilização celular e posterior marcação intracelular adicionou-se 250ul por tubo da solução de *Fixation/Permeabilization BD* e incubou-se por 20min a 4°C. Após este tempo lavou-se duas vezes com 1 mL do tampão *Perm/wash<sup>TM</sup>* 1x (1ml cada tubo). Ressuspendeu-se as células em 50ul de tampão *Perm/wash<sup>TM</sup>* adicionando então os anticorpos intracelulares. Incubou-se à 4°C por 30 min. Logo após lavou-se duas vezes (1ml/tubo) com tampão *Perm/wash<sup>TM</sup>* e após a última lavagem ressuspendeu-se as amostras para 500ul em PBS 1x para ser feito a leitura por citometria de fluxo .

**Quadro 2.** Marcações de superfície e intracelulares utilizadas.

	<b>Marcação Superfície</b>	<b>Marcação Intracelular</b>
<b>Isotipo controle 1</b>	$\alpha$ -IgG1 PE	$\alpha$ -IgG1 FITC
<b>Isotipo controle 2</b>	$\alpha$ -IgG1 PE	
<b>Isotipo controle 3</b>	$\alpha$ -IgG2A PE	$\alpha$ -IgG1 FITC
<b>Isotipo controle 4</b>	$\alpha$ -IgG1 FITC	$\alpha$ -IgG1PE
<b>Linfócitos T auxiliares</b>	$\alpha$ -CD4 PE + $\alpha$ -CD25 FITC	
<b>Linfócitos T regulatórios</b>	$\alpha$ -CD25FITC	$\alpha$ -FOXP3PE
<b>Linfócitos T auxiliares</b>	$\alpha$ -CD4 PE	$\alpha$ -IFN-G FITC
<b>Linfócitos T auxiliares</b>	$\alpha$ -CD4 PE	$\alpha$ -IL-2 FITC
<b>Linfócitos T auxiliares</b>	$\alpha$ -CD4PE	$\alpha$ -TNF-A FITC
<b>Linfócitos T auxiliares</b>	$\alpha$ -CD4PE	$\alpha$ -IL-12/IL-23 FITC
<b>Linfócitos T auxiliares</b>	$\alpha$ -CD4PE	$\alpha$ -IL-10 FITC
<b>Linfócitos B</b>	$\alpha$ -CD19 PE	
<b>Linfócitos B</b>	$\alpha$ -CD19 PE	$\alpha$ -IL-2 FITC
<b>Linfócitos T totais</b>	$\alpha$ -CD3 PE	
<b>Linfócitos T totais</b>	$\alpha$ -CD3 PE	$\alpha$ - IL-2 FITC

### 3.9 Análise dos Resultados

Tendo em vista ao fato de que o grupo envolvido neste estudo foi composto por pacientes de diferentes tipos de tumores, estádios, idades e sexo, foi realizada inicialmente uma análise descritiva dos resultados de todos os pacientes envolvidos para a observação individual do comportamento de cada marcação realizada.

Posteriormente, para a análise estatística realizou-se o agrupamento dos resultados de cada paciente para cada parâmetro analisado e aplicou-se o teste de variância não paramétrico de Kruskal-Wallis.

*Resultados*

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Aplicação da vacina

A tabela abaixo descreve a quantidade de terapias (vacinas aplicadas) realizadas por paciente, as análises efetuadas e o momento em que passamos a realizar as análises do perfil imunológico com intervalo de 30 dias.

**Tabela 1:** Descrição das quantidades de terapias, análises realizadas e intervalo de tempo.

	PAC 1	PAC 2	PAC 3	PAC 4	PAC 5	PAC 6	PAC 7	PAC 8
<b>Terapias</b>	33	28	26	11	4	3	3	2
<b>Análises</b>	26	21	19	12	5	4	4	3
<b>Análises Intervalo de 30 dias</b>	A partir da 17ª análise	A partir da 12ª análise	A partir da 10ª análise	-	-	-	-	-

### 4.2 Segurança e toxicidade da vacina

A imunoterapia com CDs apresentou-se segura com ausência de efeitos colaterais ou toxicidades importantes. Apenas a paciente 2, portadora de melanoma, apresentava a Vitiligo antes do tratamento e aparentemente apresentou piora do quadro após o início do tratamento.

### 4.3 Avaliação descritiva dos resultados

Realizou-se a avaliação descritiva dos resultados baseando-se na observação da expressão de cada marcação realizada antes do início da terapia (pré) e durante as

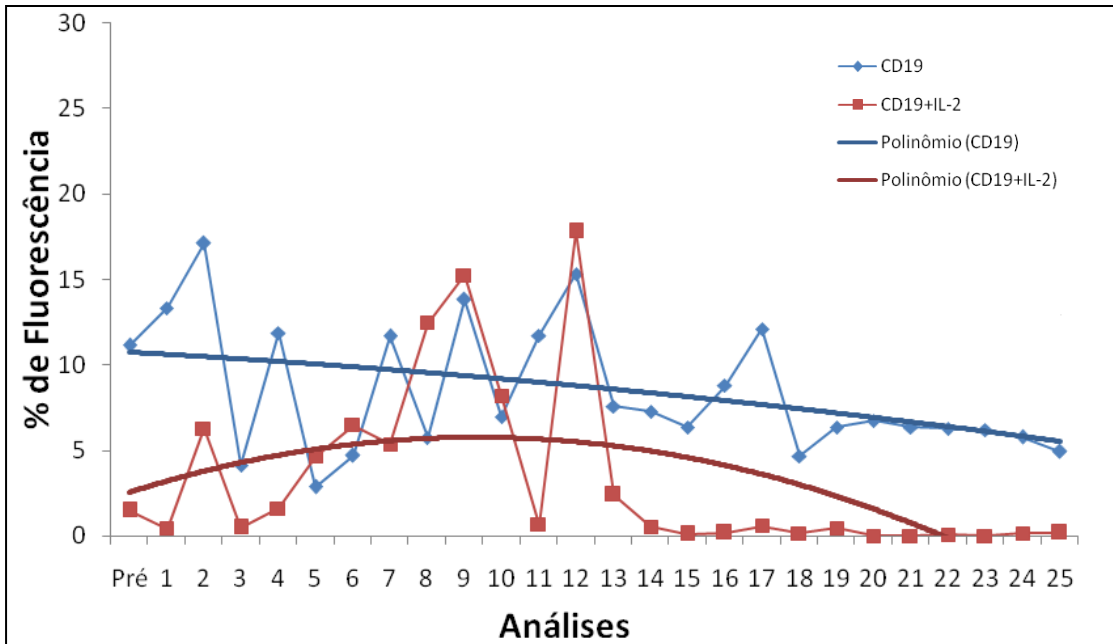
análises da mesma. Esta observação baseou-se no percentual de fluorescência de cada marcação no decorrer das análises das terapias realizadas, sendo demonstradas pela expressão linear e linha de tendência polinomial. Levamos em conta que para os pacientes com menor quantidade de terapia a tendência demonstra apenas o início do tratamento, já que houve motivos para perda de seguimento

#### **A) Expressão de Linfócitos B (CD19+)**

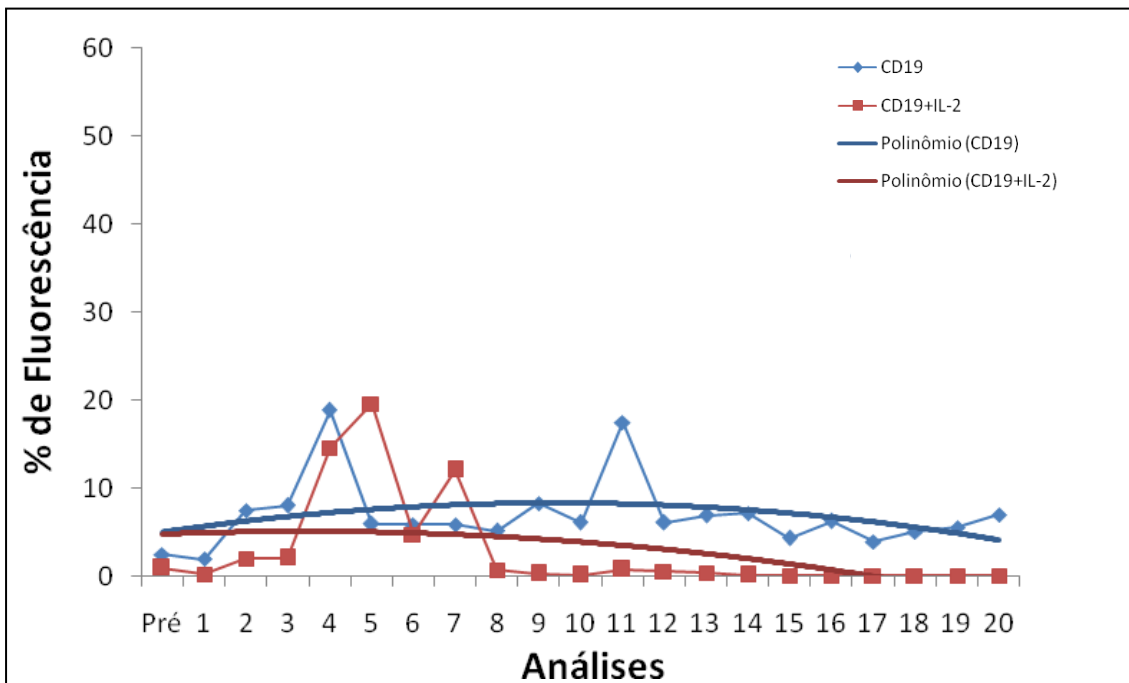
Com relação ao percentual de fluorescência para linfócitos B, assim como este expressando a citocina IL-2, observa-se que quando avaliado a apenas a expressão de CD19+ este apresenta-se oscilatório na maioria dos pacientes. No entanto, para os pacientes 2 e 3 há tendência a aumento, enquanto que o paciente 4 tende a manutenção do percentual inicial. O mesmo ocorre com o paciente 1, no entanto com tendência a queda. Os pacientes 5 e 6 apresentam ligeira queda, seguido de aumento do percentual. Os pacientes 7 e 8 tendem a aumento gradativo do mesmo (gráficos de 1 a 8).

Na avaliação dos linfócitos B expressando IL-2, o que nota-se é aumento do percentual de fluorescência nos pacientes 1 e 2, porém seguido de queda. Houve tendência a diminuição da expressão nos pacientes 3, 5 e 8, além de leve aumento seguido de retorno do percentual inicial (pré) nos pacientes 6 e 7. O paciente 4 não apresentou estímulo notável dos marcadores (gráficos de 1 a 8).

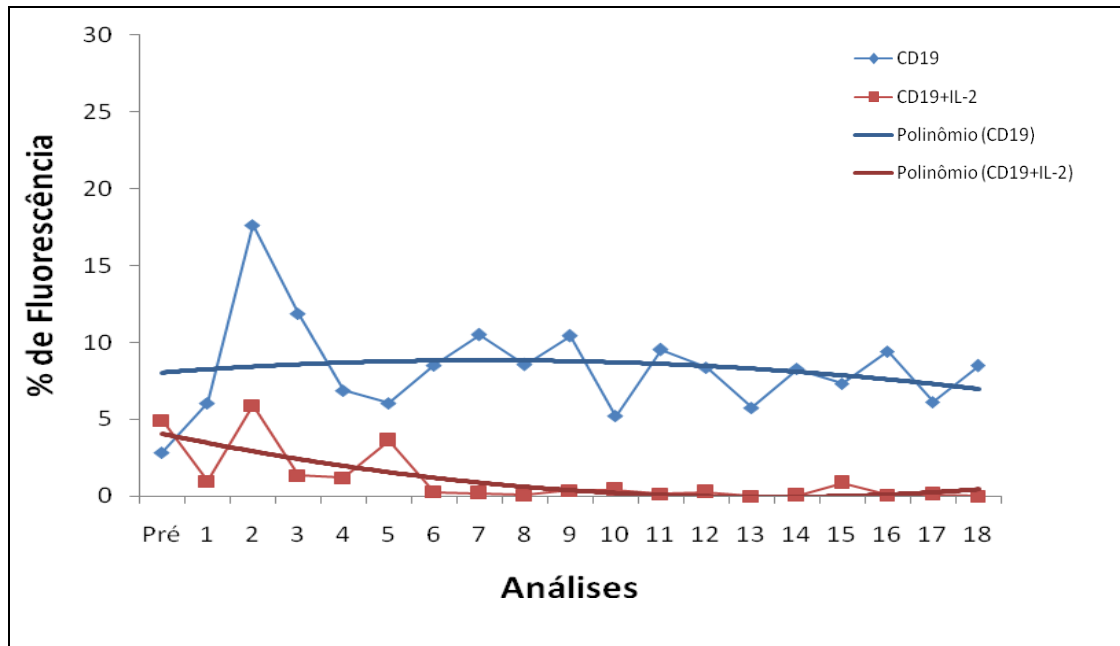




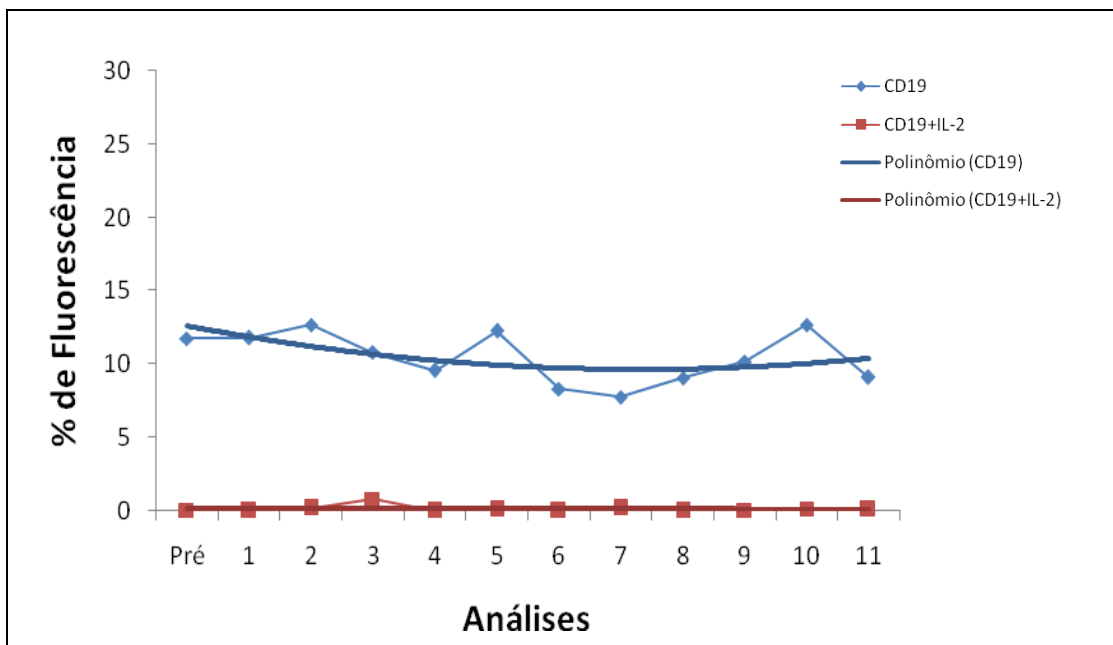
**Gráfico 1:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos B e sua expressão da citocina IL-2 (marcações **CD19** e **CD19+IL-2** respectivamente), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para **PAC 1**.



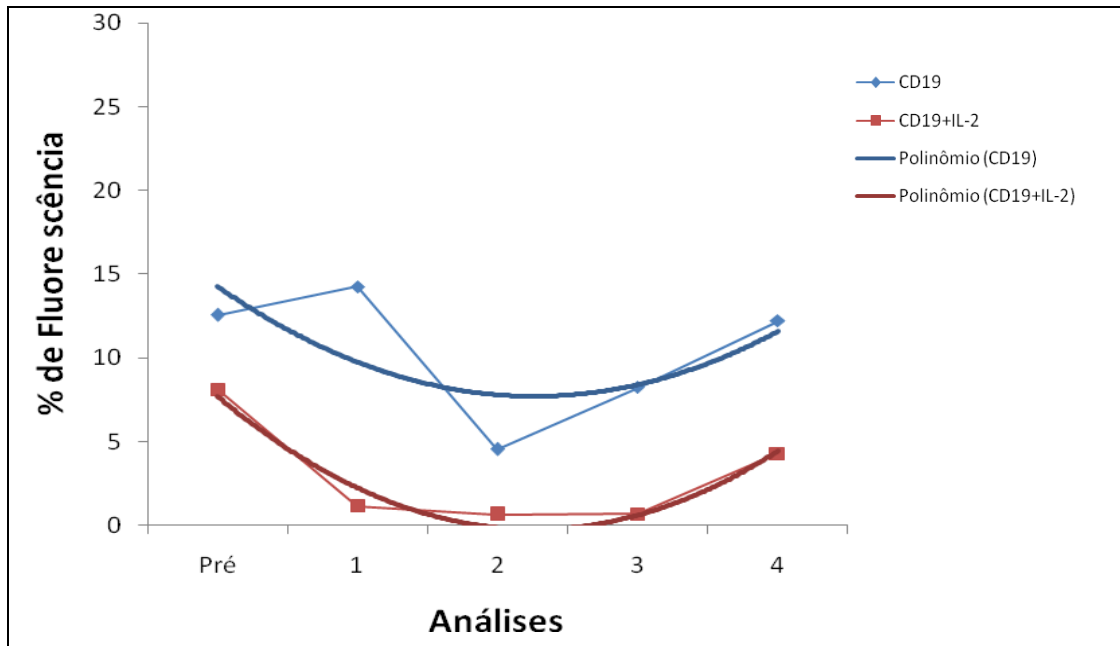
**Gráfico 2:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos B e sua expressão da citocina IL-2 (marcações **CD19** e **CD19+IL-2** respectivamente), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para **PAC 2**.



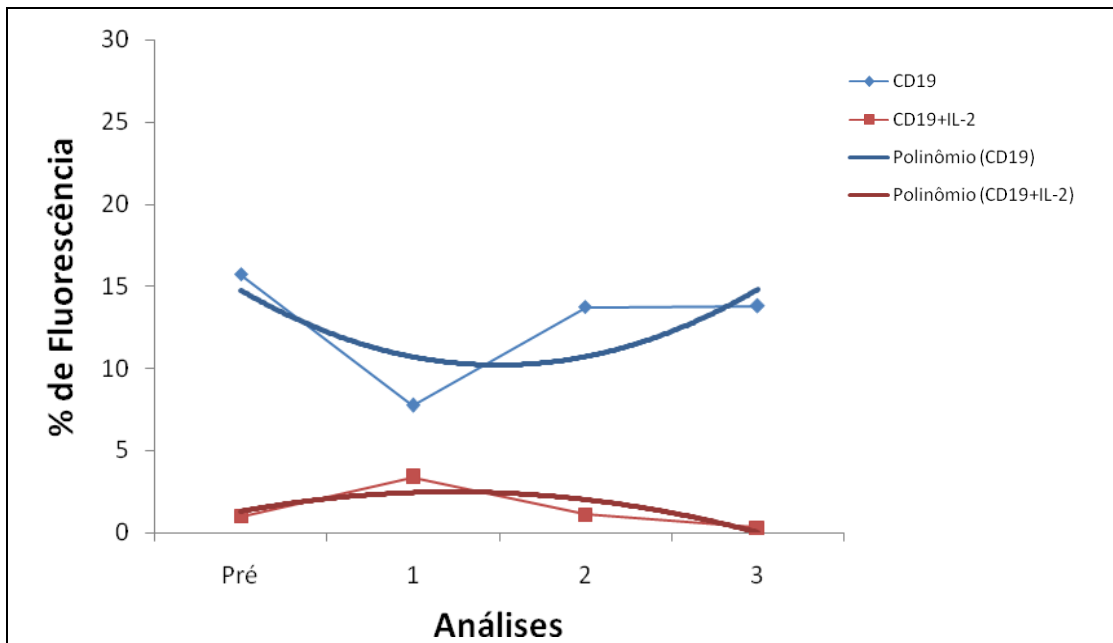
**Gráfico 3:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos B e sua expressão da citocina IL-2 (marcações **CD19** e **CD19+IL-2** respectivamente), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 3.



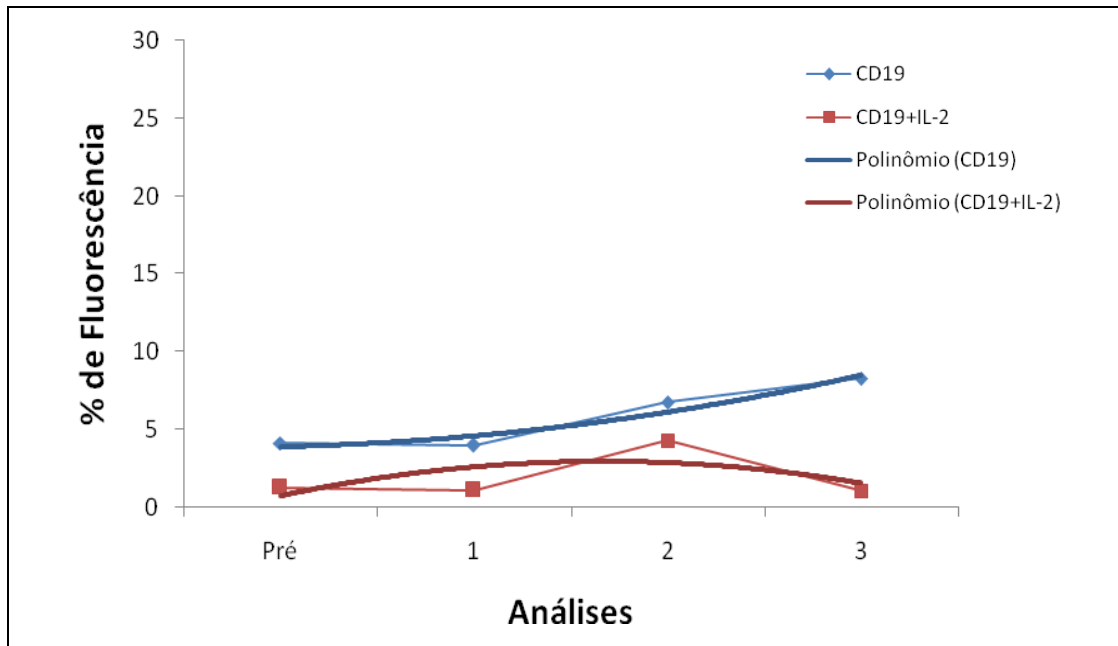
**Gráfico 4:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos B e sua expressão da citocina IL-2 (marcações **CD19** e **CD19+IL-2** respectivamente), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 4.



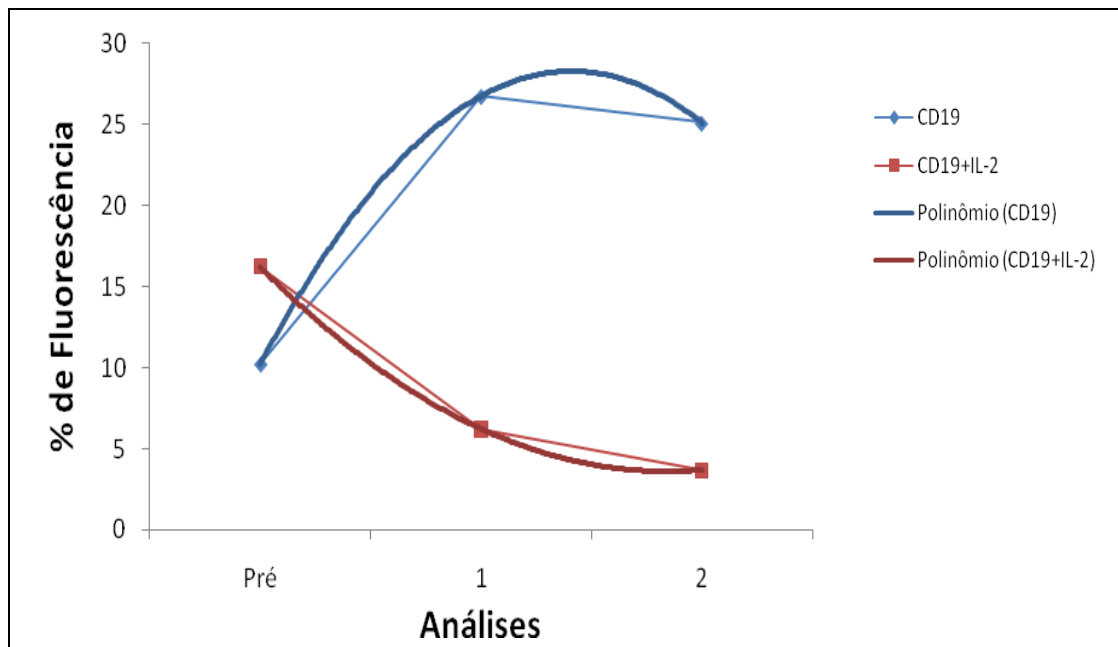
**Gráfico 5:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos B e sua expressão da citocina IL-2 (marcações **CD19** e **CD19+IL-2** respectivamente), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 5.



**Gráfico 6:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos B e sua expressão da citocina IL-2 (marcações **CD19** e **CD19+IL-2** respectivamente), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 6.



**Gráfico 7:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos B e sua expressão da citocina IL-2 (marcações **CD19** e **CD19+IL-2** respectivamente), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para **PAC 7**.

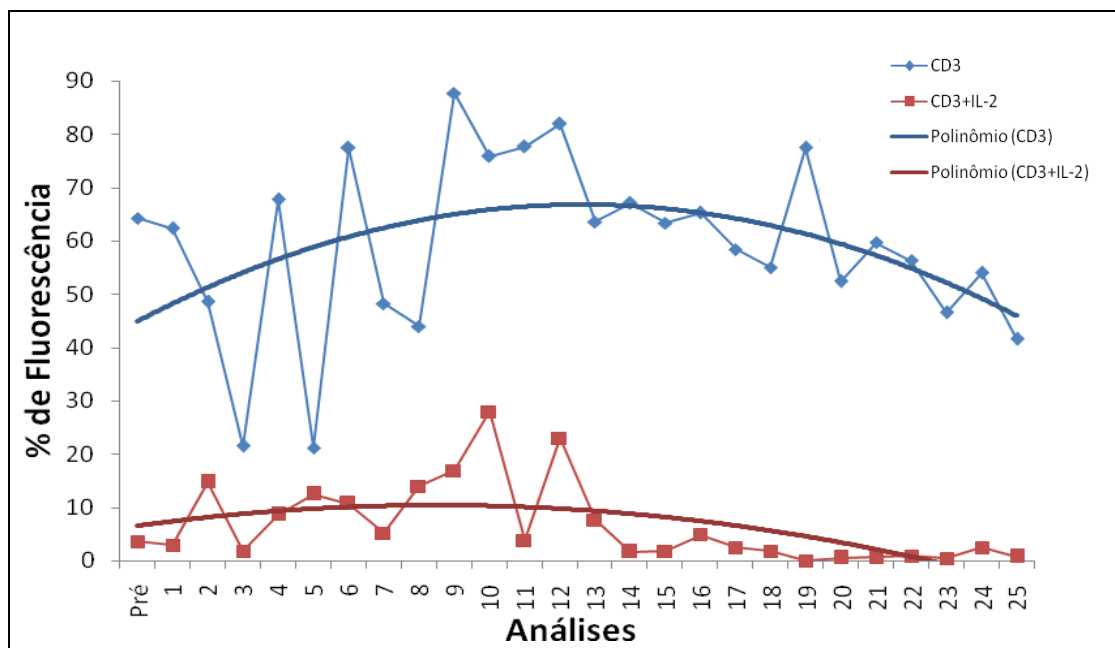


**Gráfico 8:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos B e sua expressão da citocina IL-2 (marcações **CD19** e **CD19+IL-2** respectivamente), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para **PAC 8**.

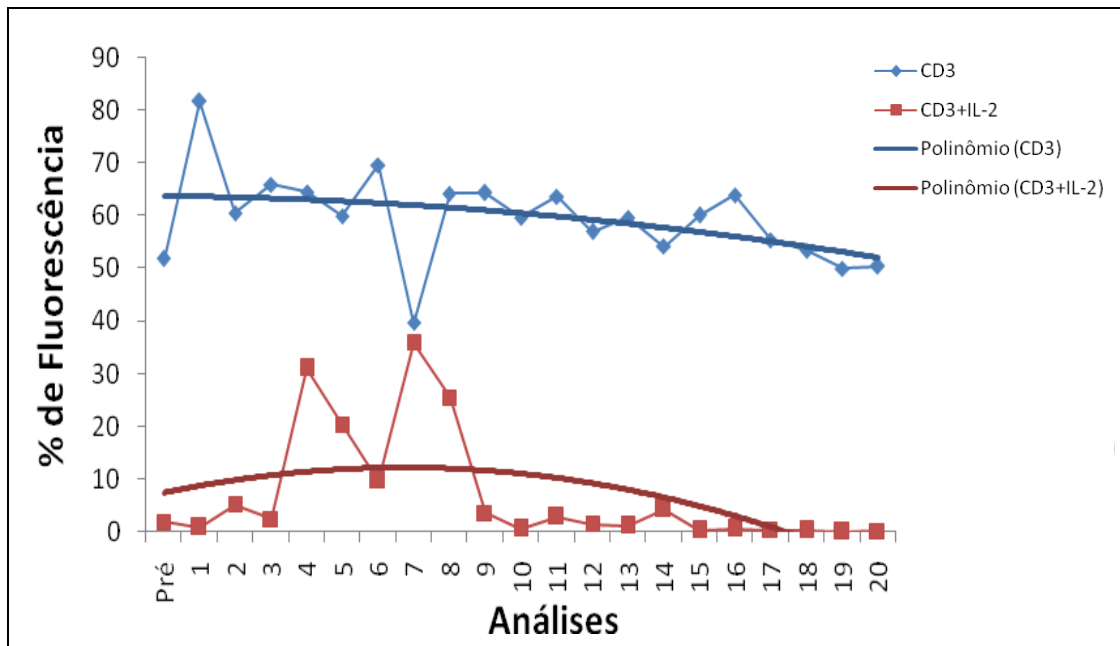
## B) Expressão de Linfócitos T totais (CD3+)

Ao analisarmos a expressão de linfócitos T totais (CD3+) isoladamente, observamos que a maioria dos pacientes apresenta perfil oscilatório após o início da terapia, sendo que os pacientes 1, 2 e 3 tendem a apresentar aumento do percentual durante certo período, seguido de queda ao final do tratamento. Já os pacientes 5, 6 e 7 apresentam queda do percentual após o início das análises do tratamento. O paciente 8 tende a aumento gradativo (gráficos de 9 a 16).

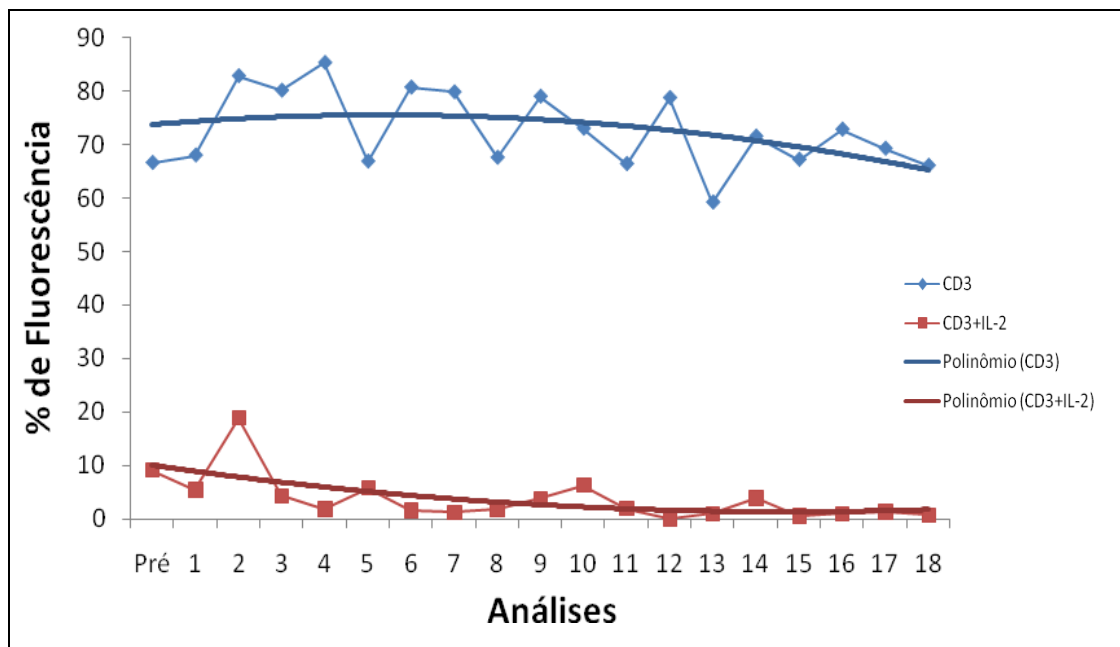
Ao avaliarmos a expressão da citocina IL-2, o que observamos é tendência a aumento inicial seguido de queda nos pacientes 1 e 2, enquanto que os pacientes 3 e 5 tendem a queda. Em relação ao 6 e 7, estes apresentam leve estímulo destes marcadores, seguido de queda. O paciente 8 sofre ligeira diminuição na primeira análise, porém retorna próximo ao valor da pré. Por outro lado, o paciente 4 não apresenta nenhum estímulo importante (gráficos de 9 a 16).



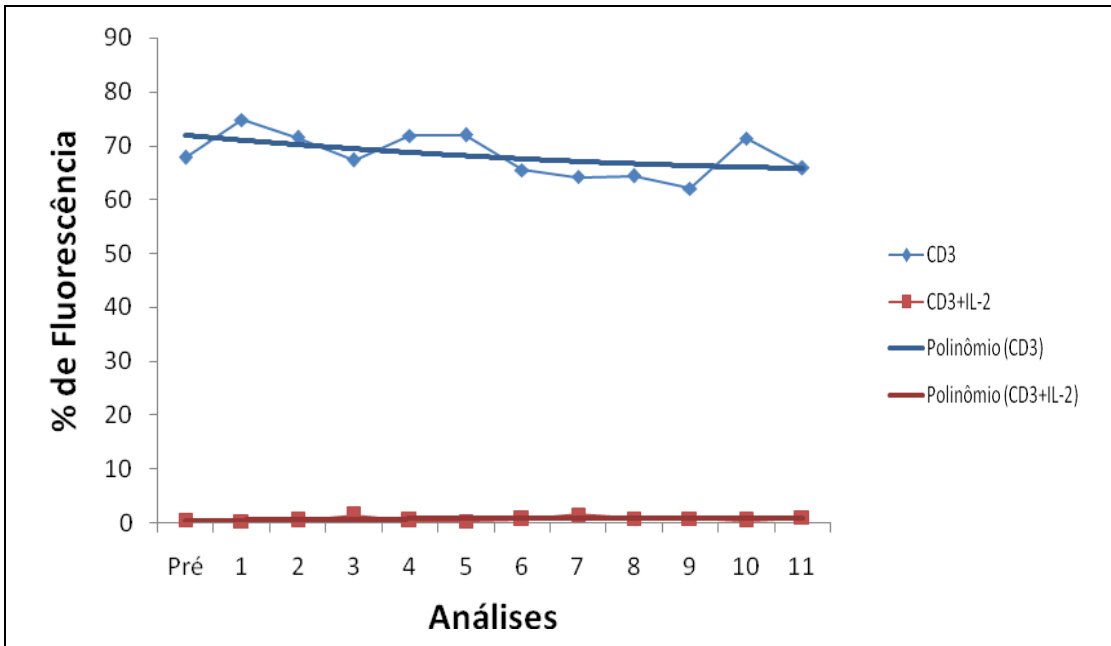
**Gráfico 9:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T totais e sua expressão da citocina IL-2 (marcações CD3 e CD3+IL-2 respectivamente), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 1.



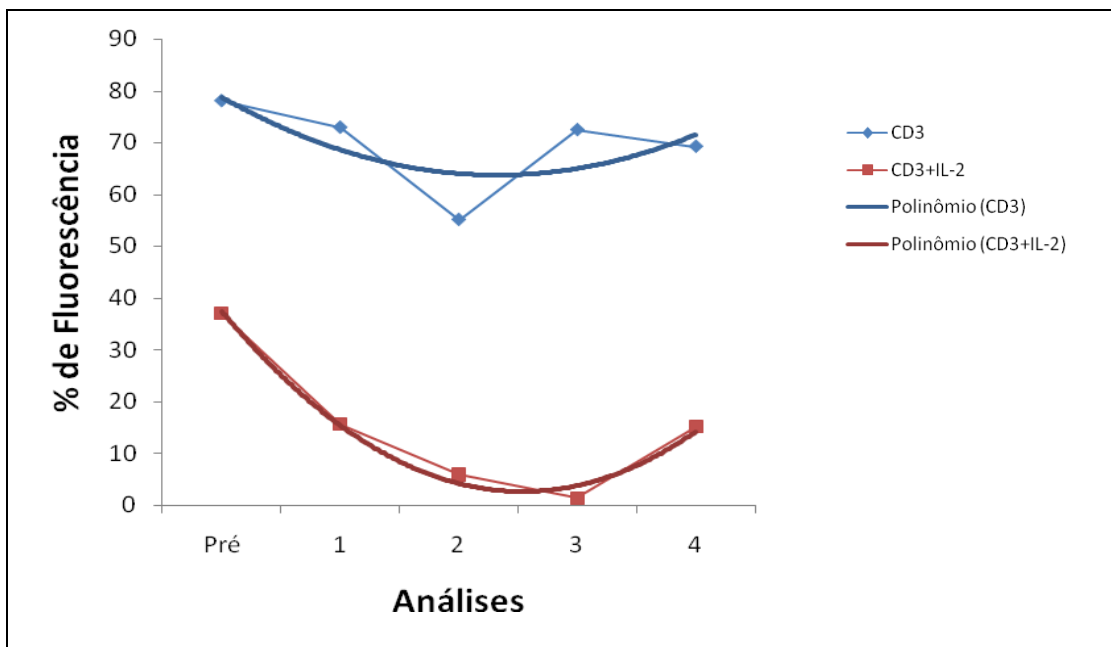
**Gráfico 10:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T totais e sua expressão da citocina IL-2 (marcações **CD3** e **CD3+IL-2** respectivamente), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para **PAC 2**.



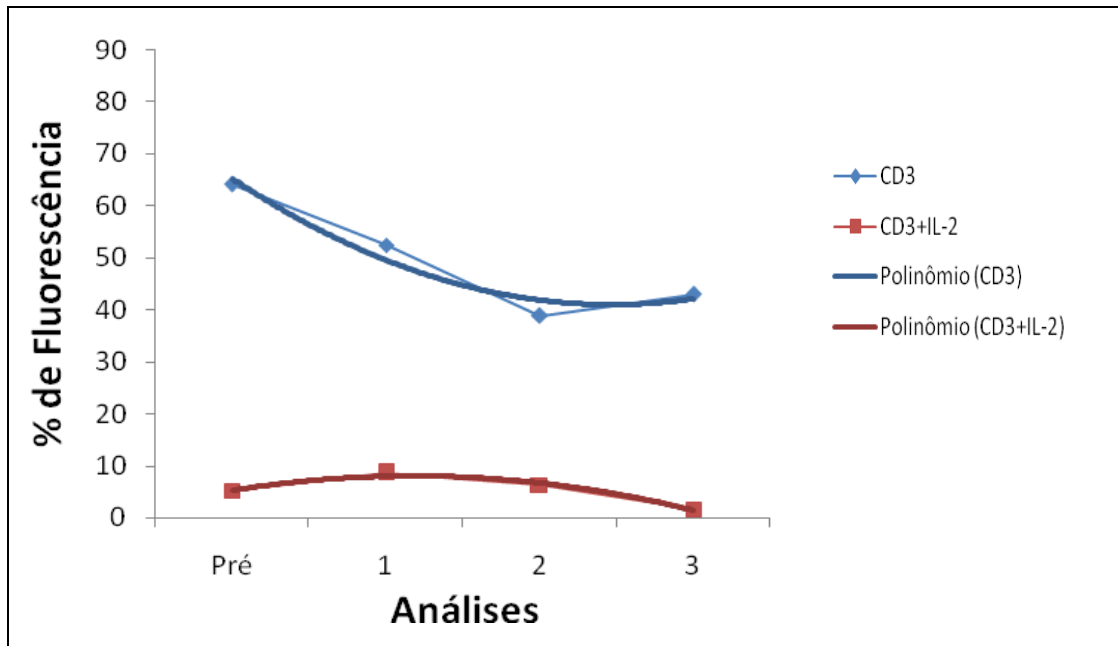
**Gráfico 11:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T totais e sua expressão da citocina IL-2 (marcações **CD3** e **CD3+IL-2** respectivamente), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para **PAC 3**.



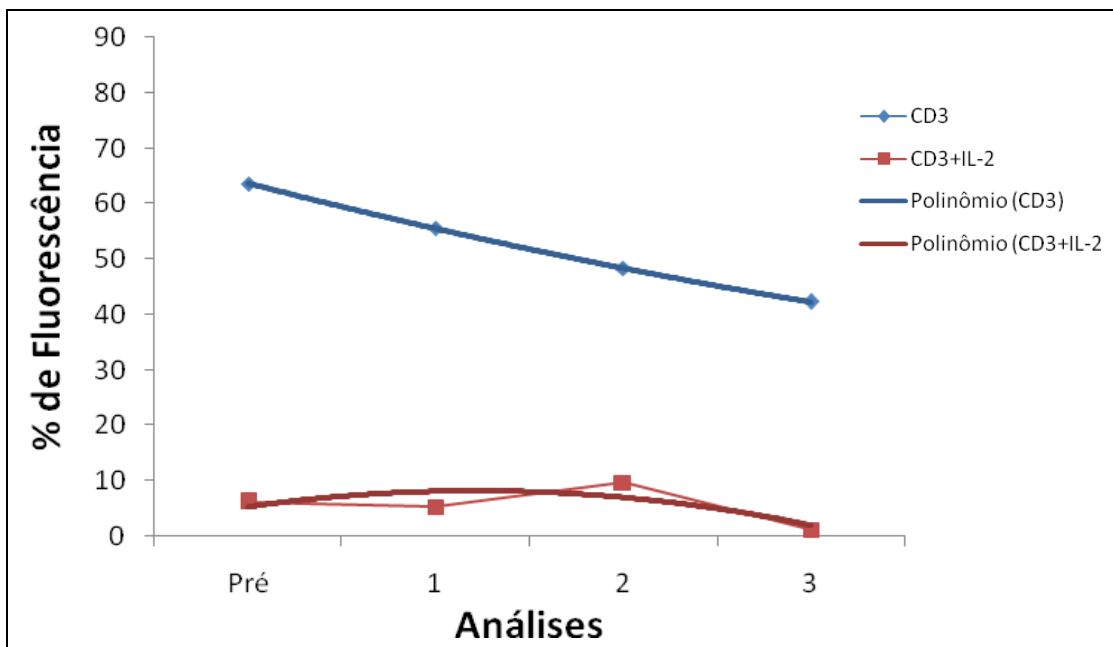
**Gráfico 12:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T totais e sua expressão da citocina IL-2 (marcações **CD3** e **CD3+IL-2** respectivamente), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para **PAC 4**.



**Gráfico 13:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T totais e sua expressão da citocina IL-2 (marcações **CD3** e **CD3+IL-2** respectivamente), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para **PAC 5**.

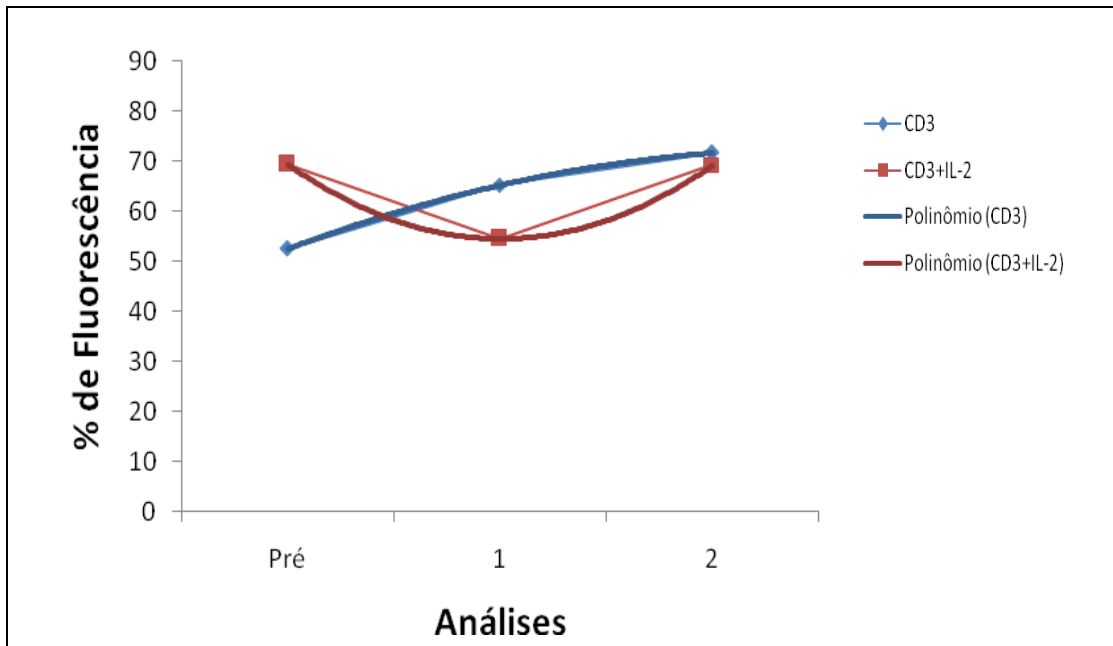


**Gráfico 14:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T totais e sua expressão da citocina IL-2 (marcações **CD3** e **CD3+IL-2** respectivamente), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para **PAC 6**.



**Gráfico 15:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T totais e sua expressão da citocina IL-2 (marcações **CD3** e **CD3+IL-2** respectivamente), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para **PAC 7**.

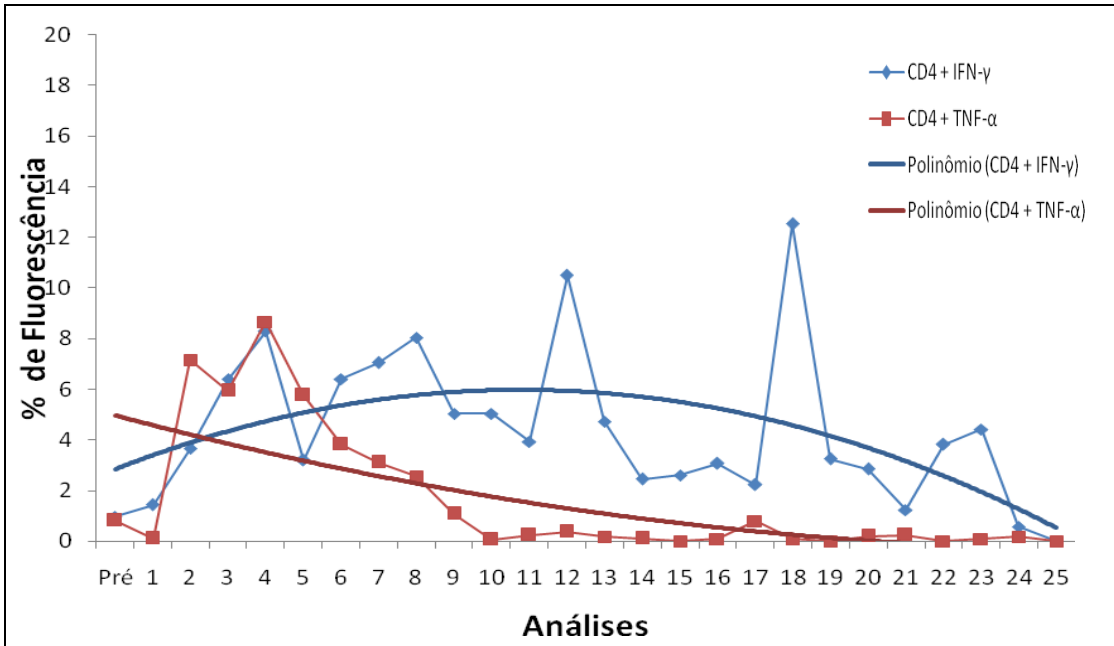




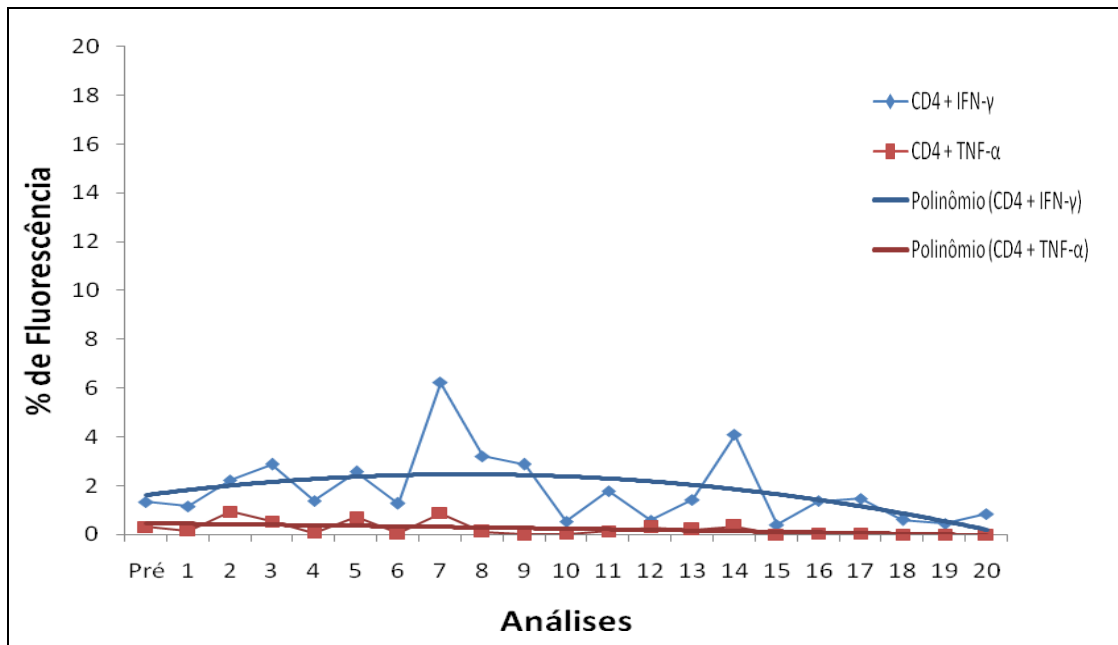
**Gráfico 16:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T totais e sua expressão da citocina IL-2 (marcações **CD3** e **CD3+IL-2** respectivamente), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para **PAC 8**.

### C) Expressão de Linfócitos T auxiliares (CD4+)

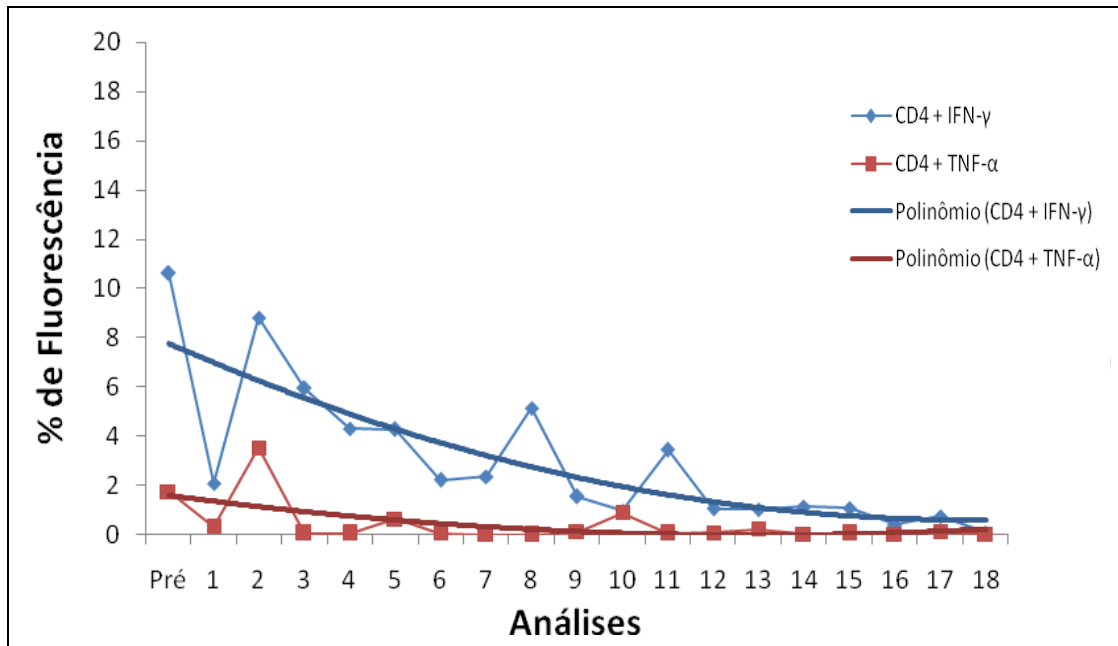
Quando avaliados os linfócitos T CD4+ expressando a citocina IFN- $\gamma$ , observamos que a maioria dos pacientes apresenta perfil oscilatório com tendência a aumento do percentual durante certo tempo de análise, porém seguido de queda. Já os pacientes 3 e 8 comportam-se de forma contrária com diminuição gradual do percentual. Por outro lado, ao observarmos a expressão de linfócitos T CD4+ juntamente com TNF- $\alpha$ , apenas os pacientes 1, 6 e 7 apresentam ligeiro estímulo durante análise inicial da terapia. Os demais pacientes tendem a diminuição ou mantêm a expressão próxima ao valor da pré-análise (gráficos 17 a 24).



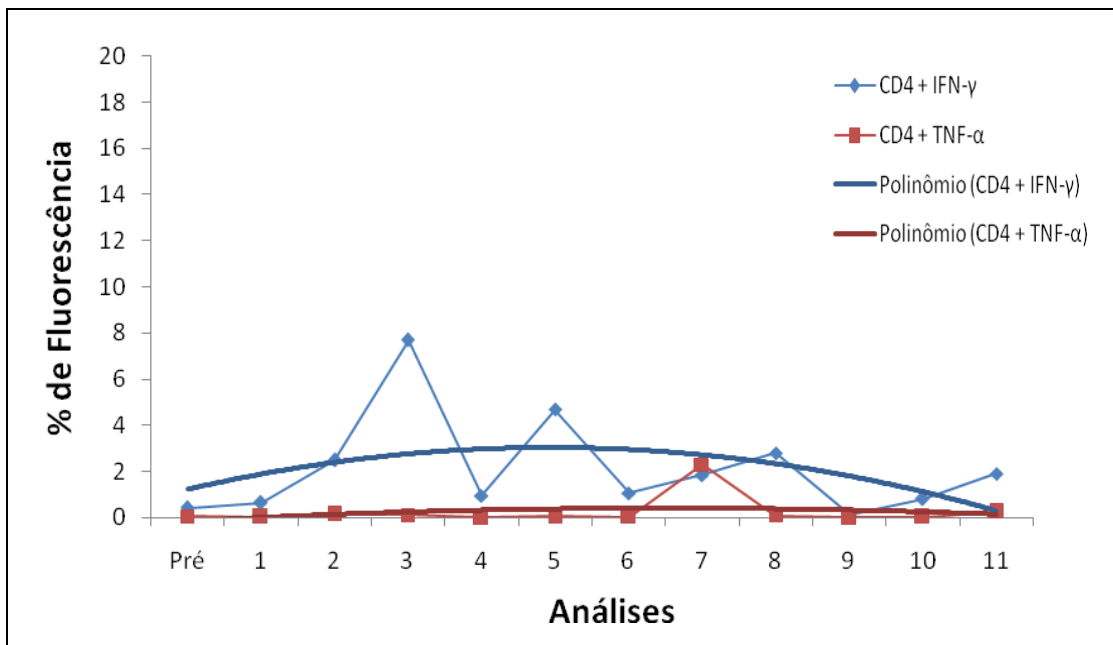
**Gráfico 17:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 1.



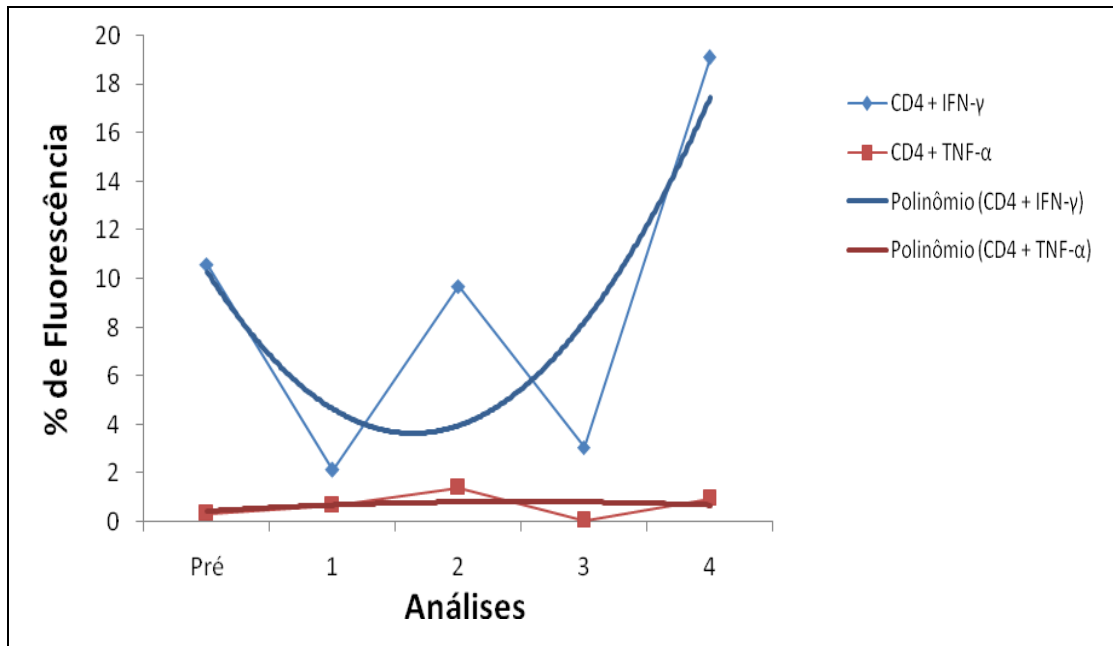
**Gráfico 18:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 2.



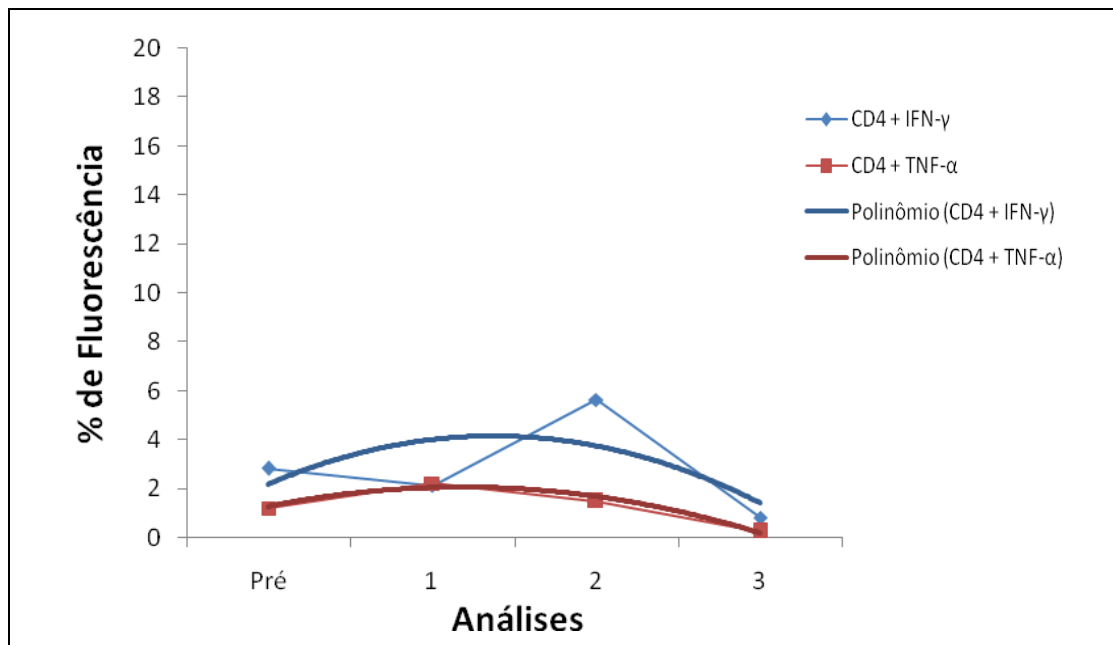
**Gráfico 19:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 3.



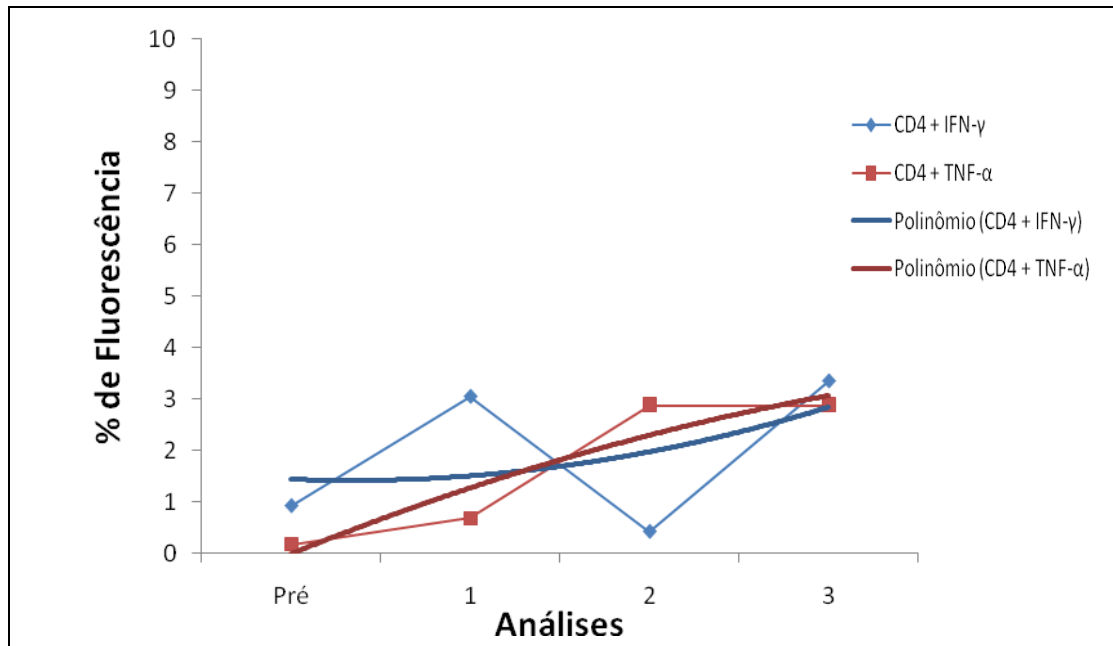
**Gráfico 20:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 4.



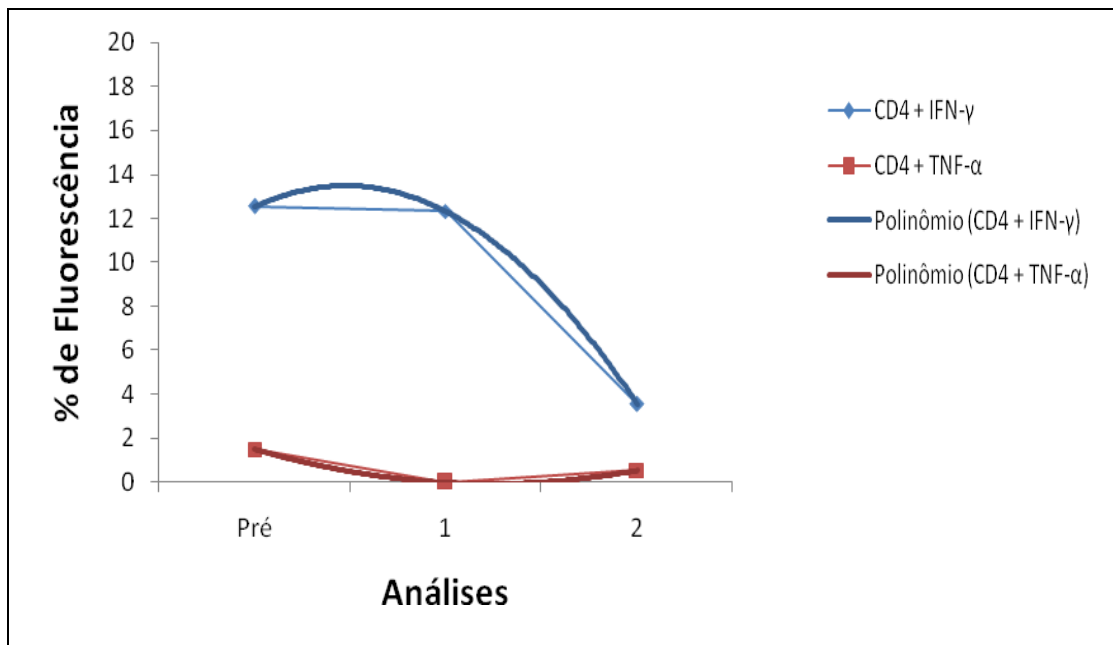
**Gráfico 21:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 5.



**Gráfico 22:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 6.



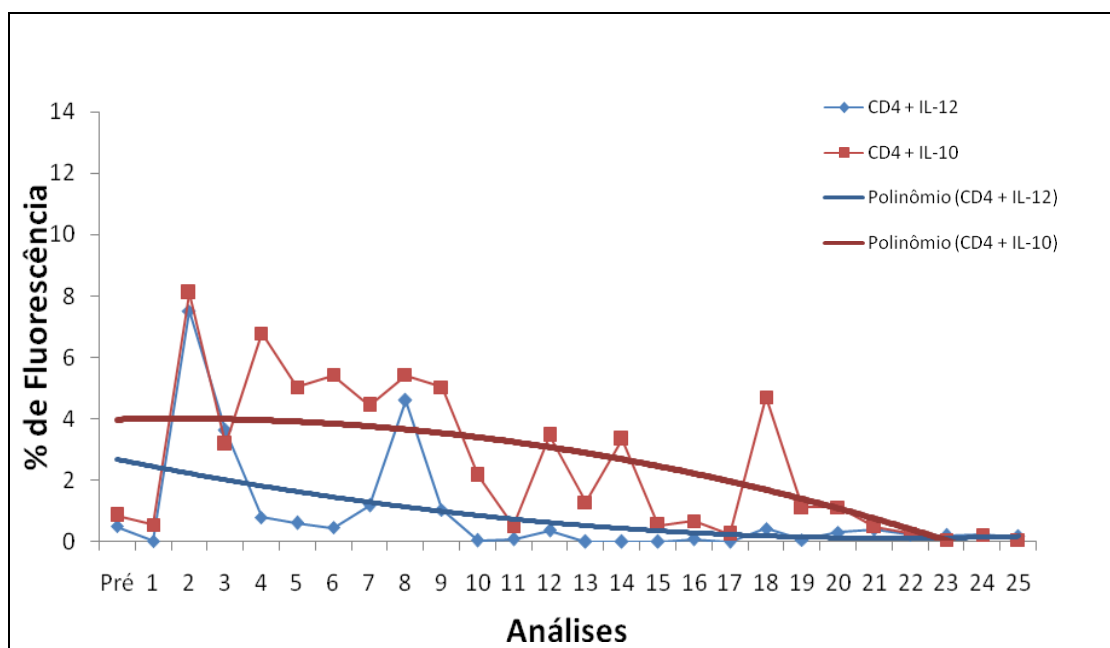
**Gráfico 23:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 7.



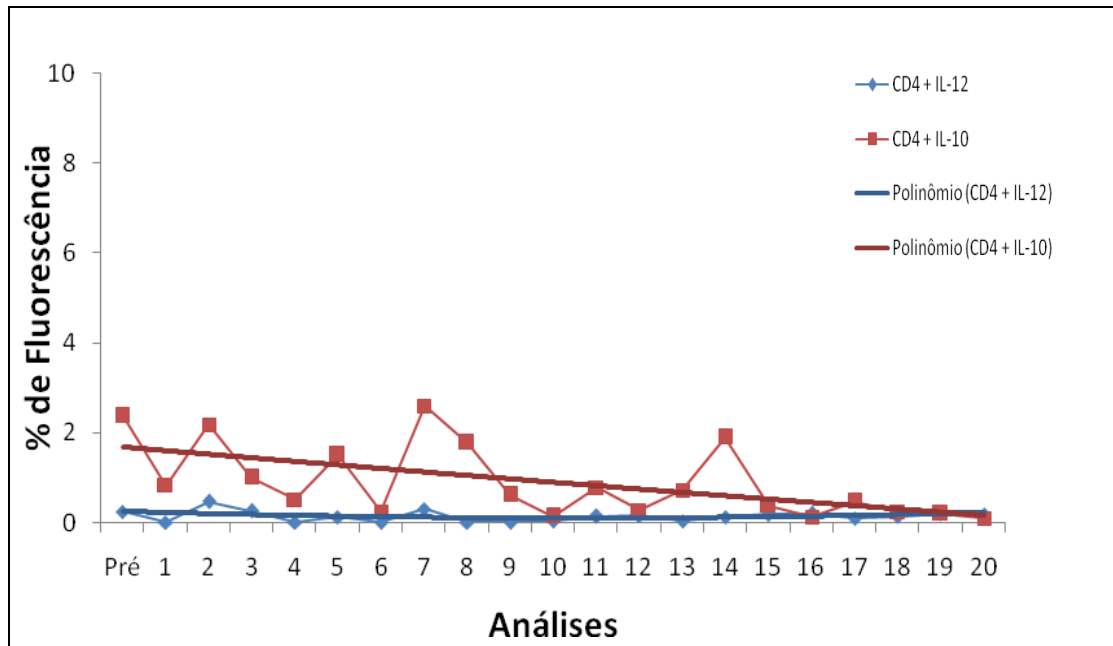
**Gráfico 24:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 8.

Observando a expressão de IL-10 por linfócitos T CD4+, nota-se que os pacientes 1, 4 e 7 apresentam certo aumento nas análises iniciais da terapia. Os pacientes 2, 3 e 8 comportam - se com queda do percentual, enquanto o 5 e 6 demonstram oscilação, sendo o primeiro com queda inicial e o segundo aumento inicial.

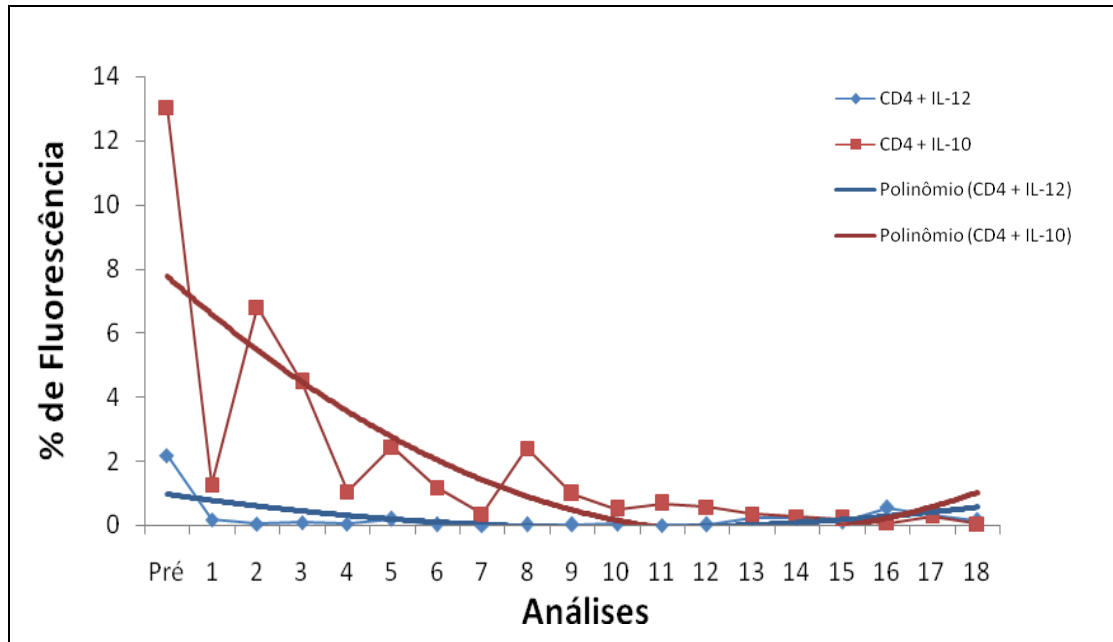
Já na avaliação da expressão de IL-12, observamos que os pacientes 1, 6 e 7 inicialmente apresentam certo percentual, enquanto que o 2, 5 e 8 não apresentam expressão notável comportando-se próximos a zero por cento. O paciente 4 demonstra tendência a manutenção dos valores da pré análise com algumas oscilações notáveis e o paciente 3 tende a queda logo que se inicia o tratamento (gráficos 25 a 32).



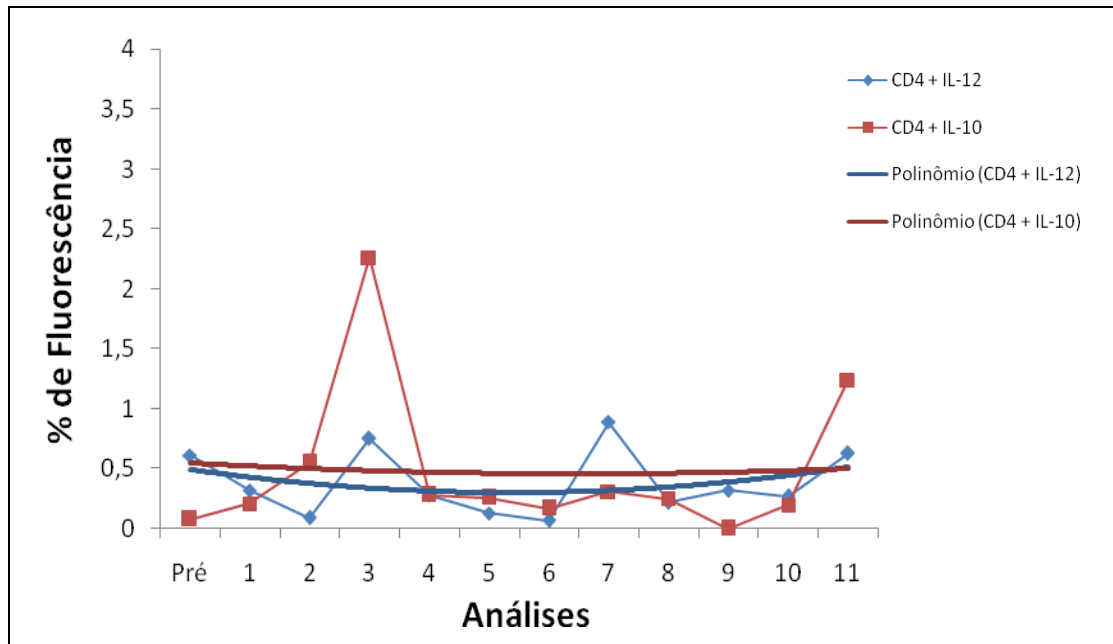
**Gráfico 25:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando as citocinas IL-12 e IL-10, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 1.



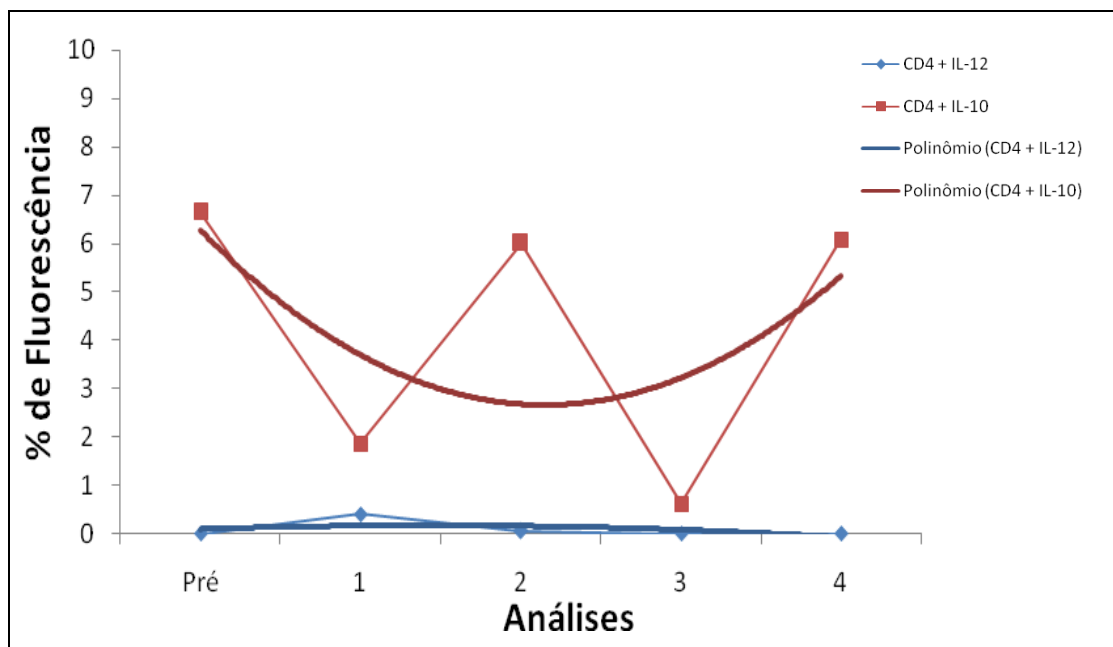
**Gráfico 26:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando as citocinas IL-12 e IL-10, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 2.



**Gráfico 27:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando as citocinas IL-12 e IL-10, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 3.

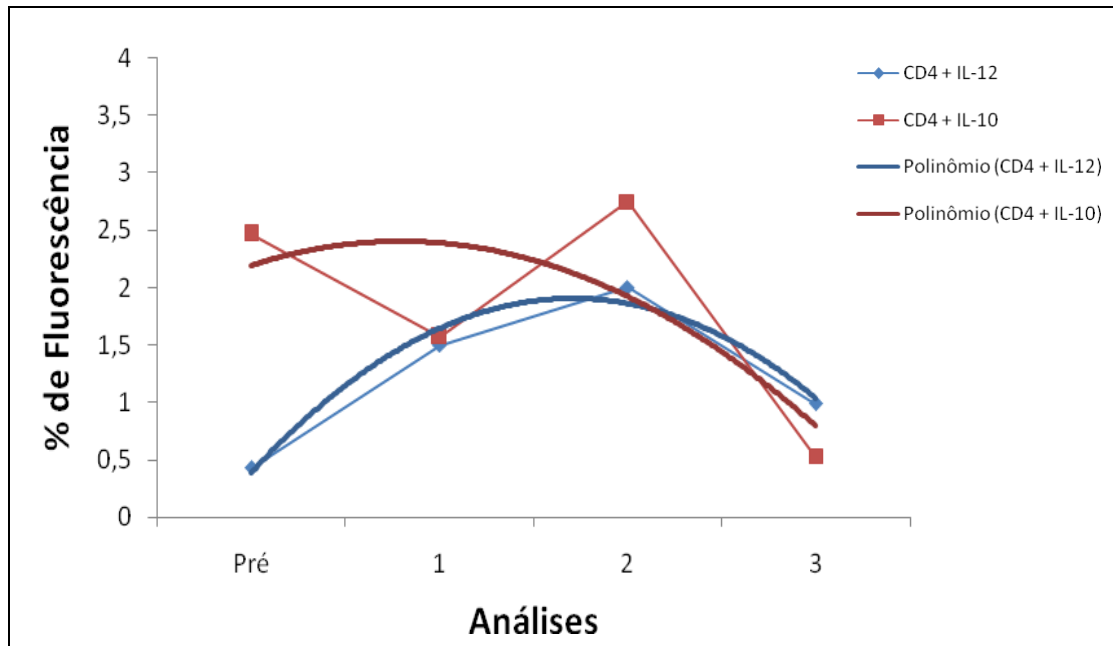


**Gráfico 28:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando as citocinas IL-12 e IL-10, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 4.

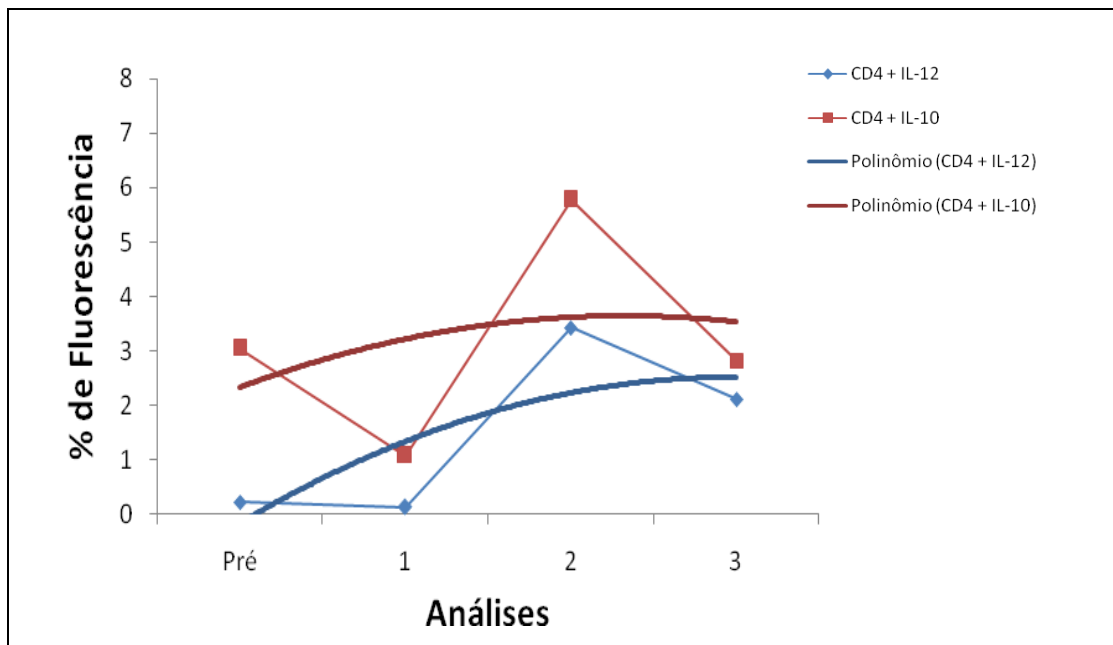


**Gráfico 29:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando as citocinas IL-12 e IL-10, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 5.

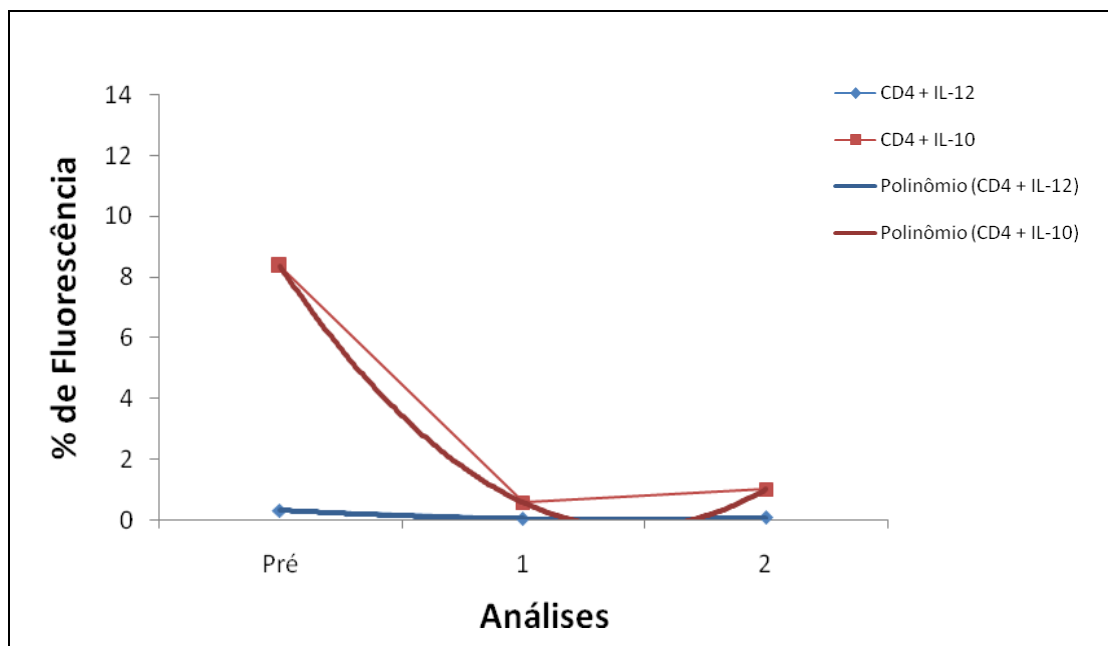




**Gráfico 30:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando as citocinas **IL-12** e **IL-10**, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para **PAC 6**.



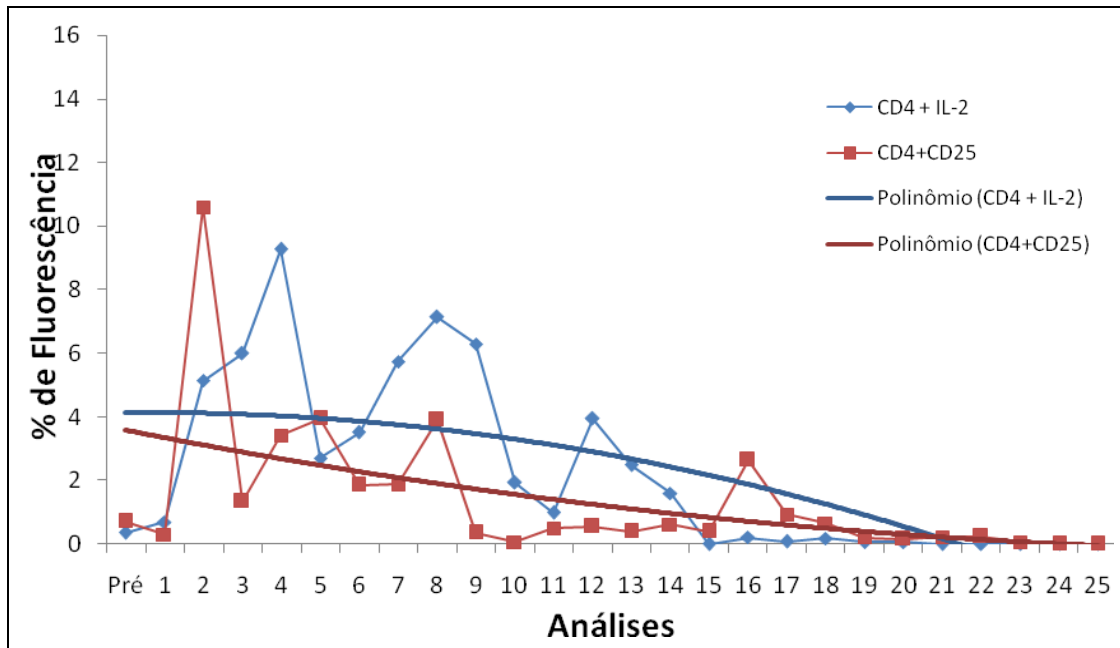
**Gráfico 31:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando as citocinas **IL-12** e **IL-10**, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para **PAC 7**.



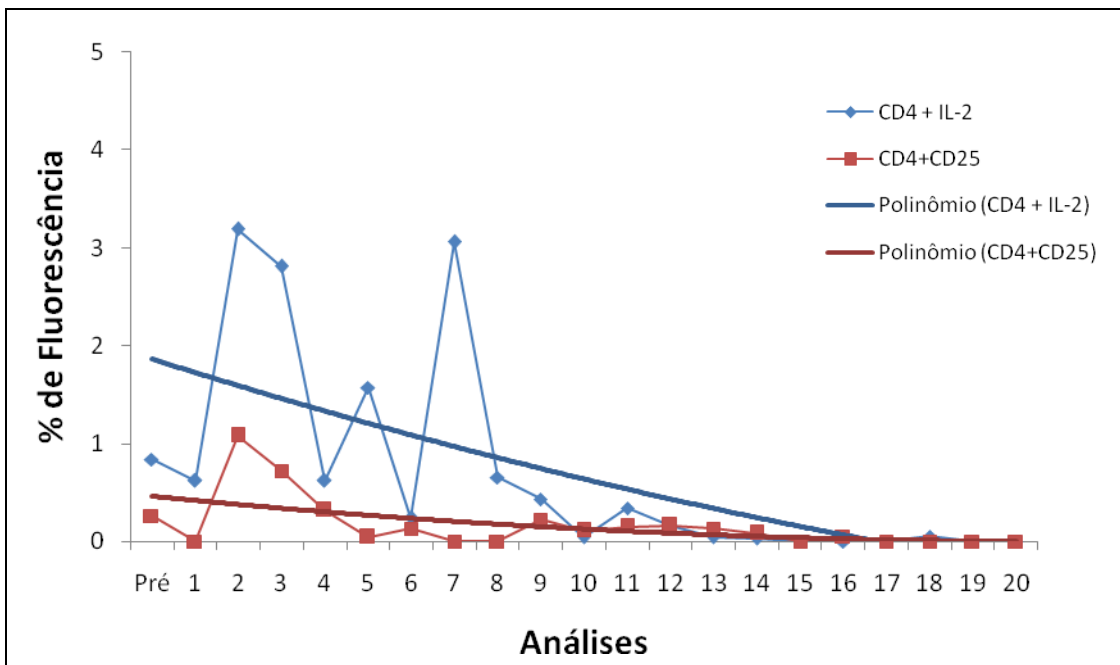
**Gráfico 32:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando as citocinas **IL-12** e **IL-10**, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para **PAC 8**.

O comportamento da expressão de IL-2 por linfócitos T CD4+ entre os pacientes 1, 2, 4 e 6 é de elevação do percentual nas análises iniciais, seguido de queda após certo momento. O paciente 7 demonstra elevação e, de forma contrária, os pacientes 3, 5 e 8 apresentam queda do percentual de expressão desta citocina.

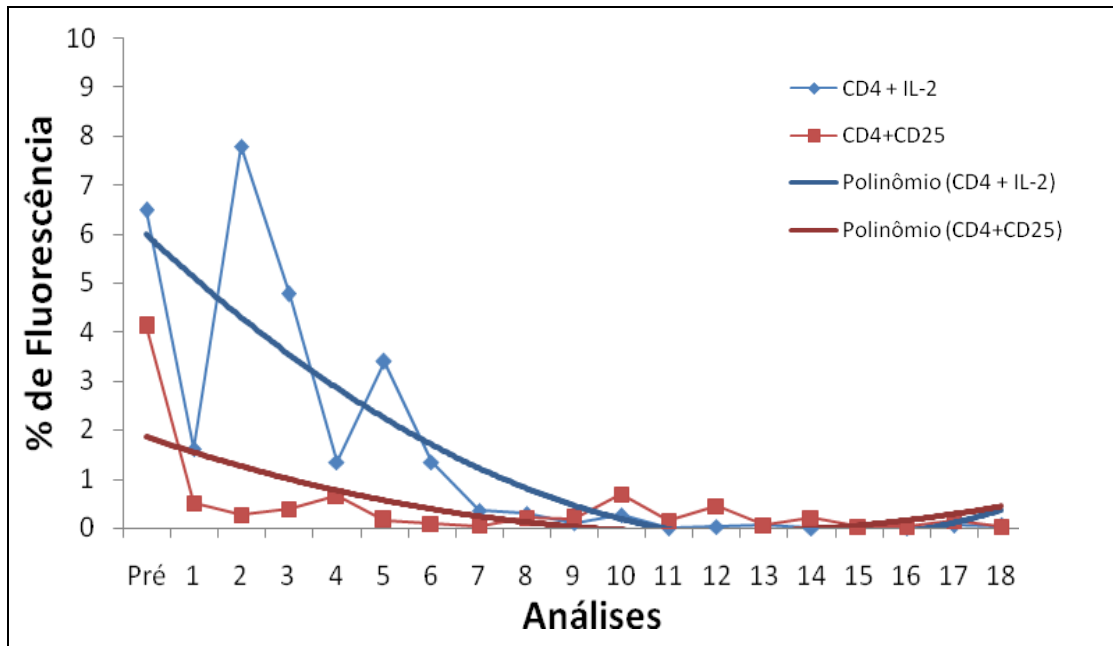
Quando avaliada a expressão do marcador CD4+ simultaneamente com CD25+, de modo geral, estes tendem a seguir o mesmo comportamento da IL-2, porém com percentual mais baixo. Apenas o paciente 5 demonstra comportamento contrário com aumento inicial seguido de queda e o 3 tende a diminuição gradativa sem expressão considerável no início da terapia (gráficos 33 a 40).



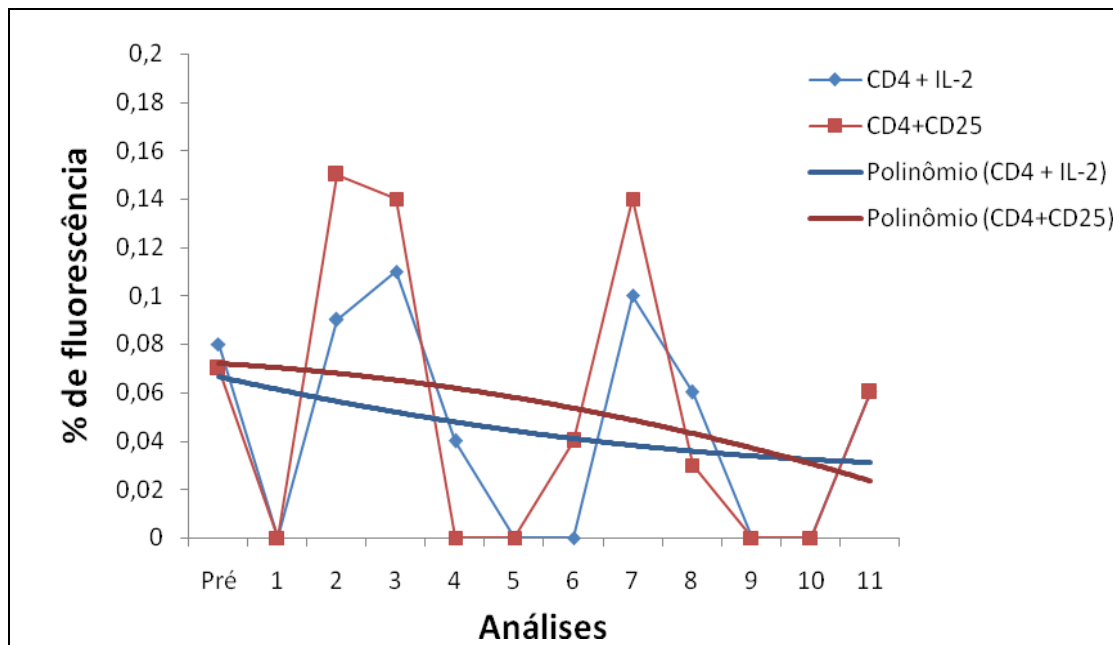
**Gráfico 33:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando CD25 e IL-2, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 1.



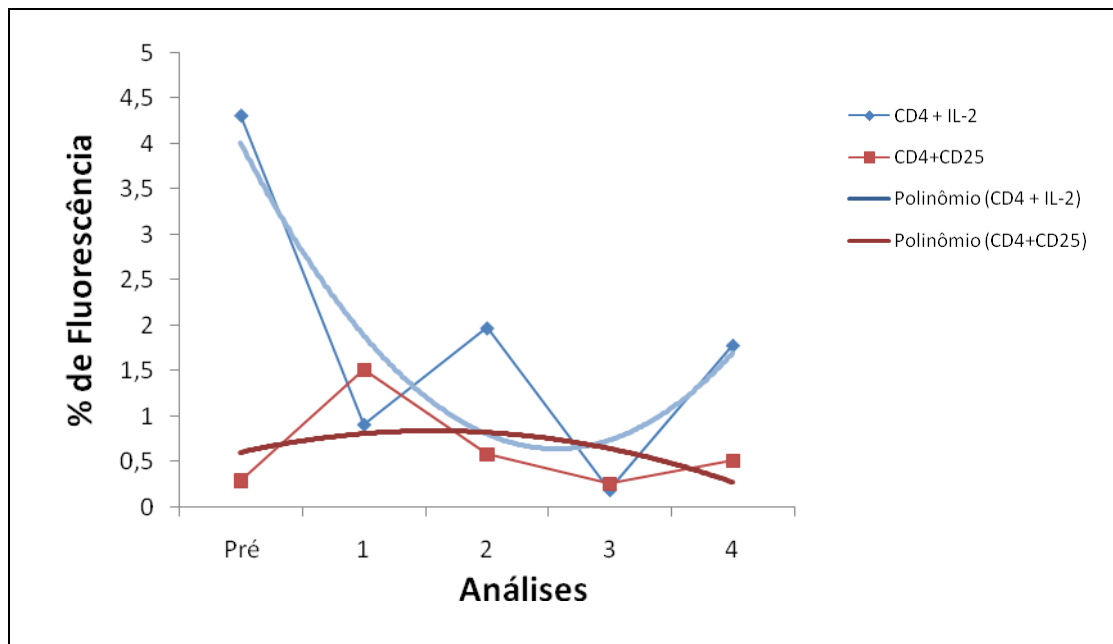
**Gráfico 34:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando CD25 e IL-2, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 2.



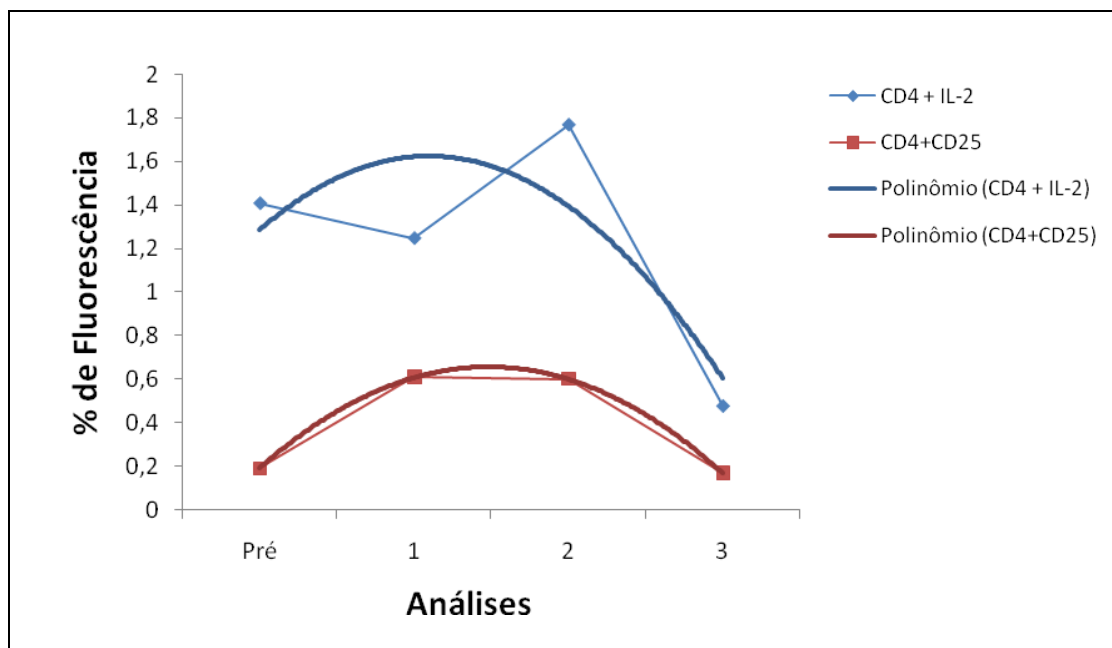
**Gráfico 35:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando CD25 e IL-2, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 3.



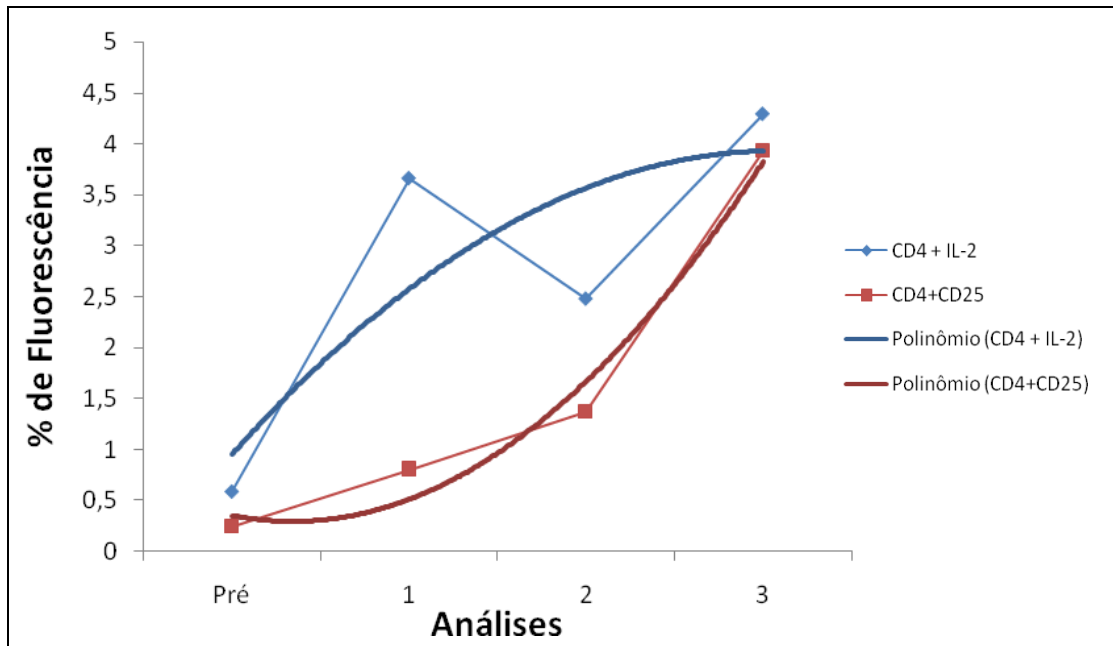
**Gráfico 36:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando CD25 e IL-2, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 4.



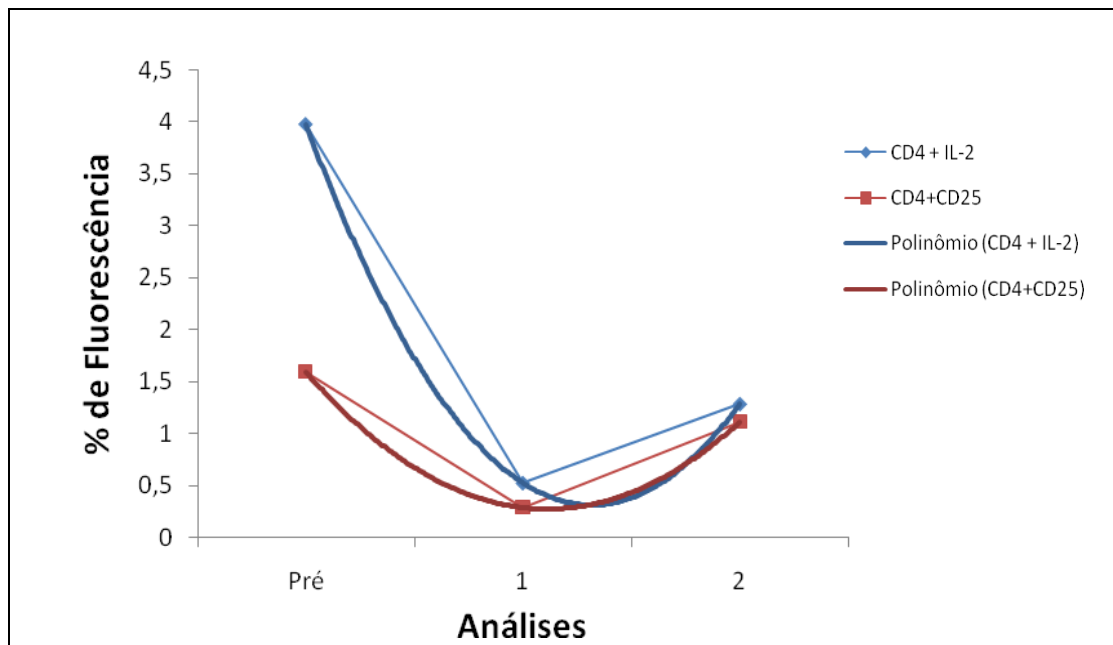
**Gráfico 37:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando **CD25** e **IL-2**, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para **PAC 5**.



**Gráfico 38:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando **CD25** e **IL-2**, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para **PAC 6**.



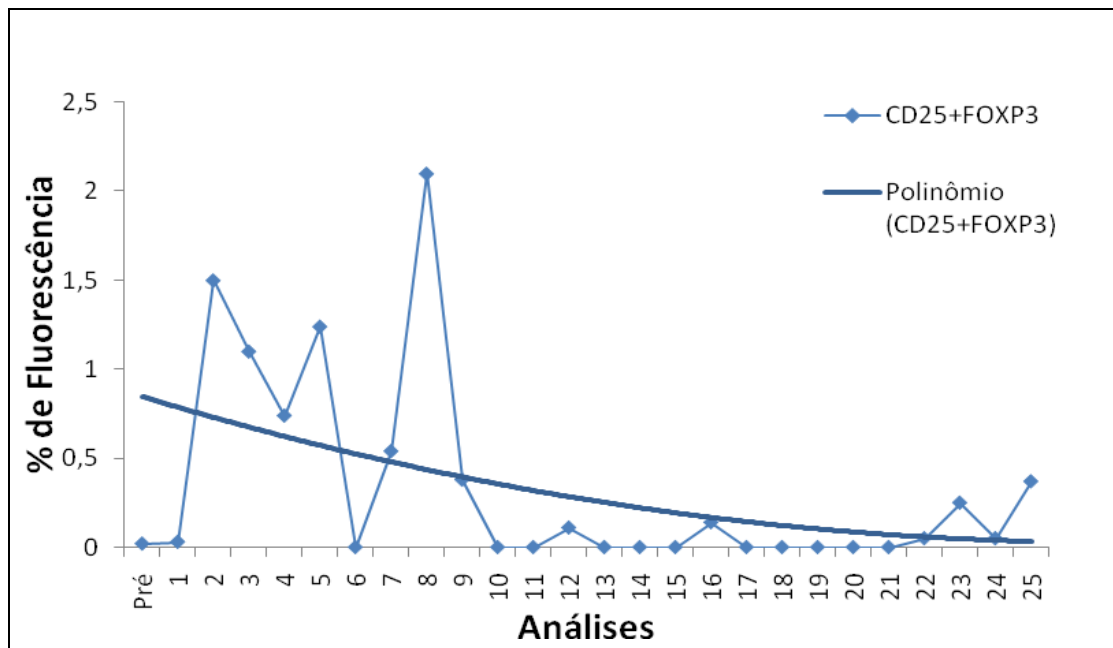
**Gráfico 39:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando CD25 e IL-2, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 7.



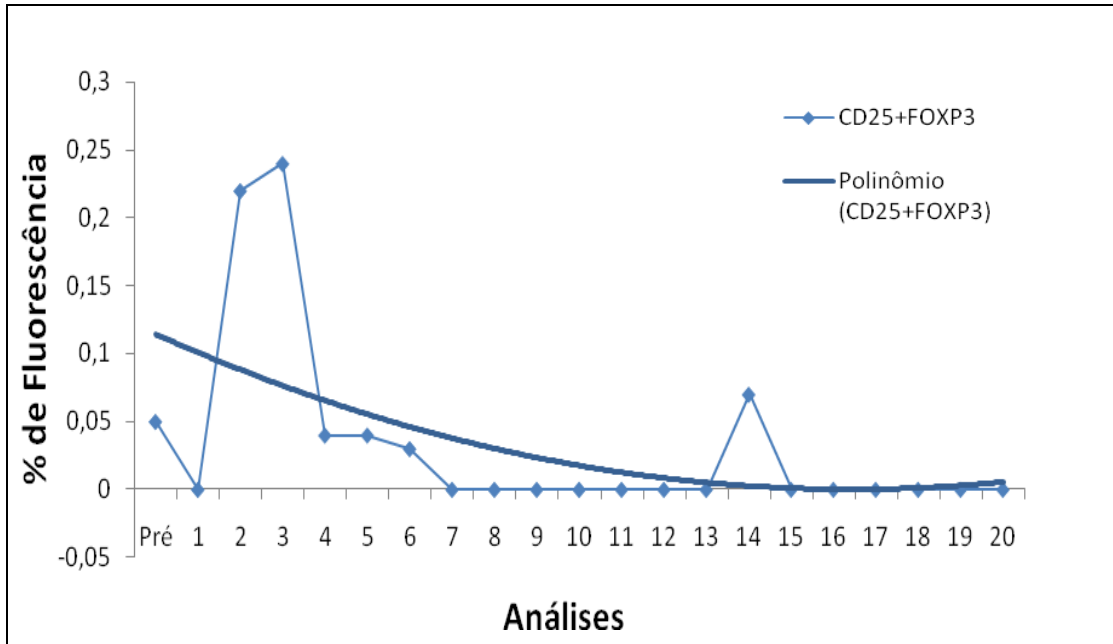
**Gráfico 40:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando CD25 e IL-2, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 8.

#### D) Expressão de Linfócitos T regulatórios (CD25+FOXP3+)

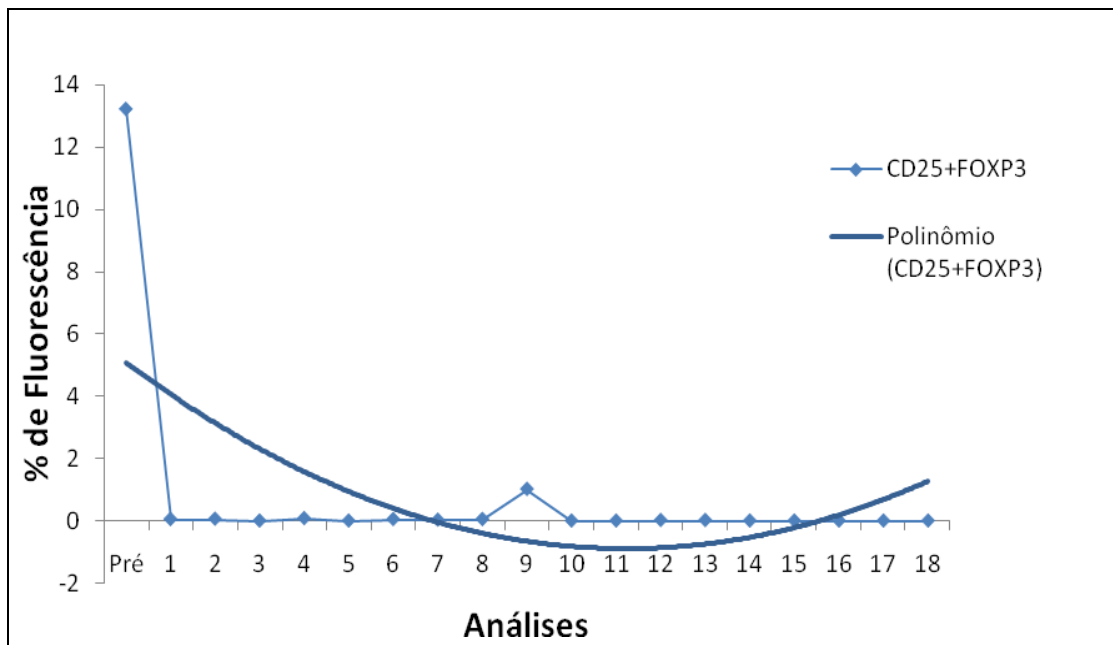
Durante a observação da expressão de células T regulatórias (CD25+FOXP3+), nota-se que parte dos indivíduos tendem a ligeiro aumento do percentual (4,5,6,7) e parte tende a diminuição (1,2,3 e 8) do mesmo. Os pacientes 1 e 2 durante as primeiras análises ainda apresentam certa expressão destes marcadores (gráficos 41 a 48).



**Gráfico 41:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T regulatórios (CD25+FOXP3+), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 1.

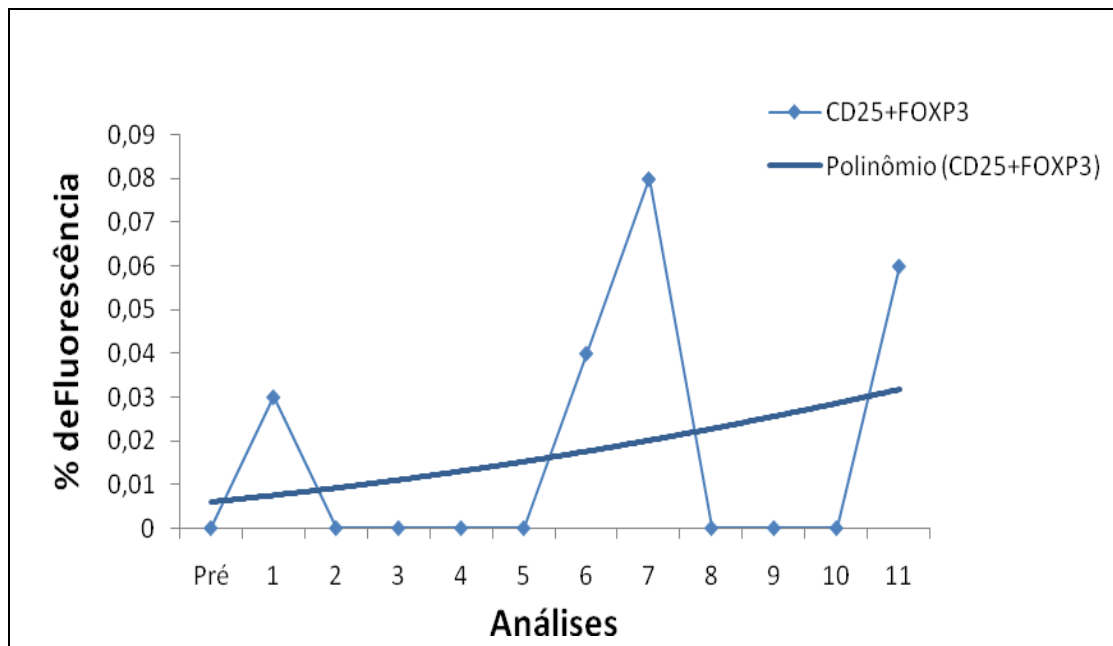


**Gráfico 42:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T regulatórios (CD25+FOXP3+), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 2.

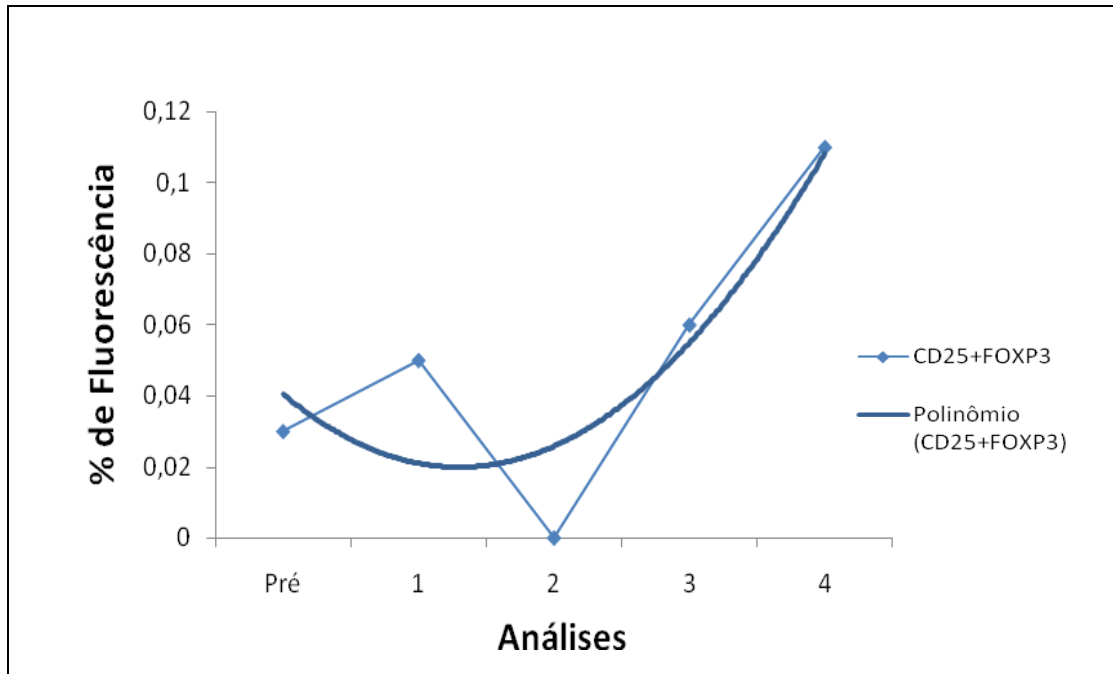


**Gráfico 43:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T regulatórios (CD25+FOXP3+), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 3.

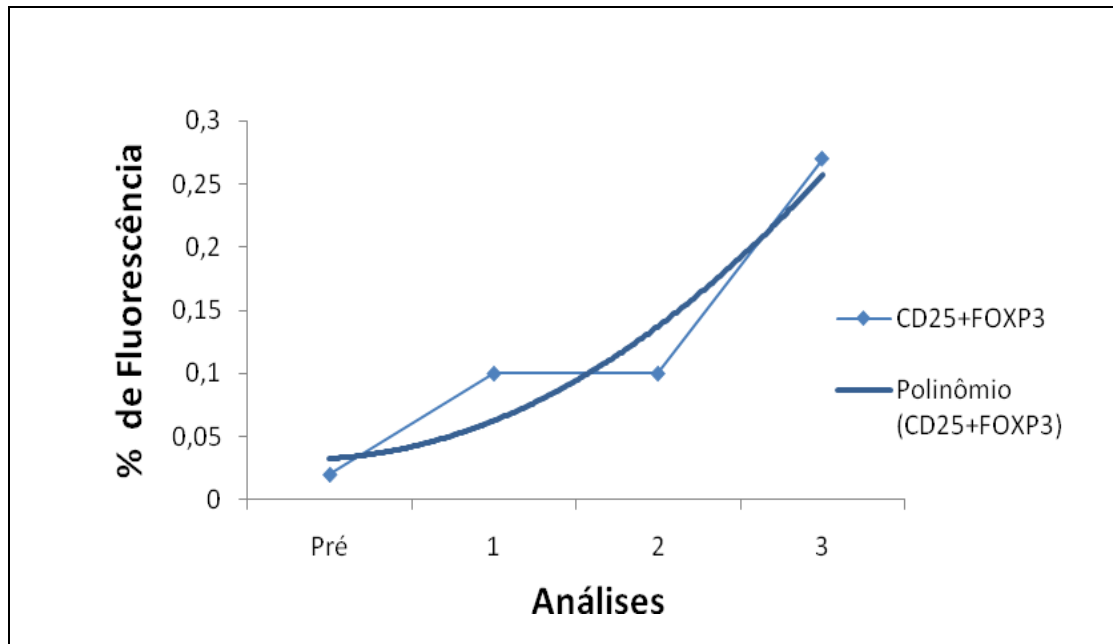




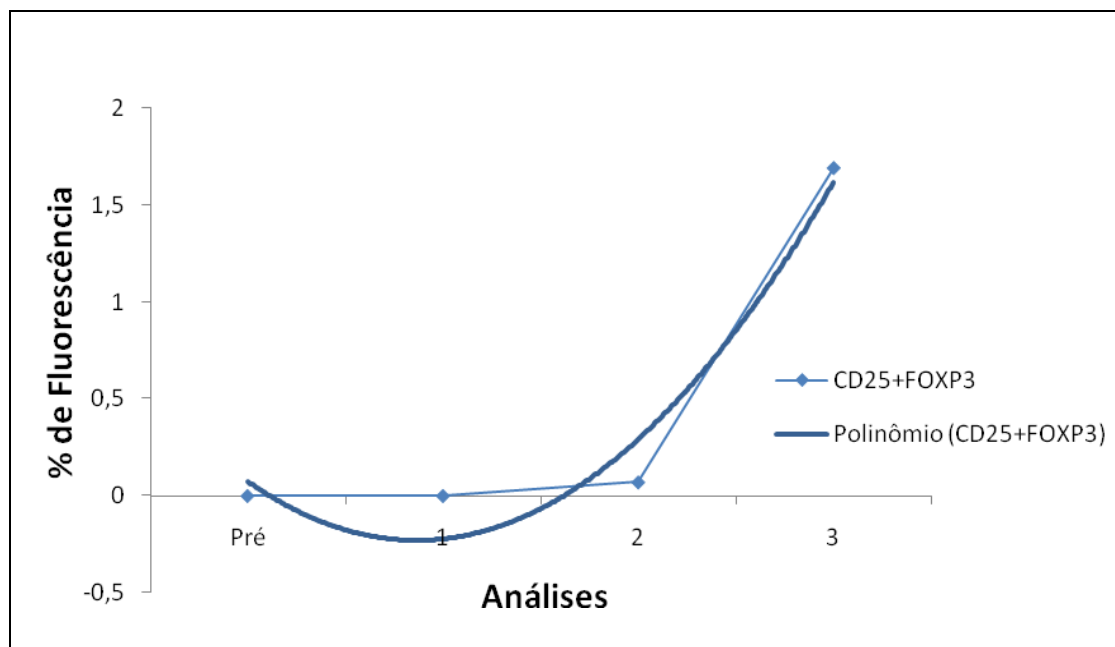
**Gráfico 44:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T regulatórios (CD25+FOXP3+), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 4.



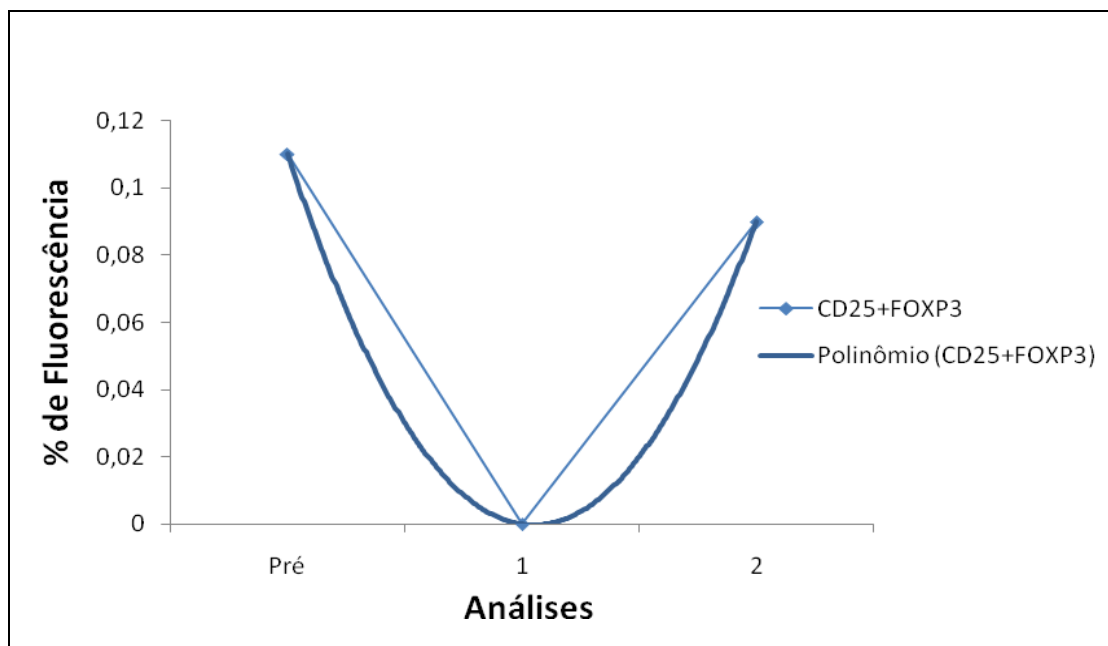
**Gráfico 45:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T regulatórios (CD25+FOXP3+), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 5.



**Gráfico 46:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T regulatórios (CD25+FOXP3+), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 6.



**Gráfico 47:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T regulatórios (CD25+FOXP3+), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 7.



**Gráfico 48:** Avaliação da % de fluorescência e linha de tendência polinomial para Linfócitos T regulatórios (CD25+FOXP3+), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas para PAC 8.

#### 4.4 Análise estatística dos resultados

##### A) Linfócitos T CD4+

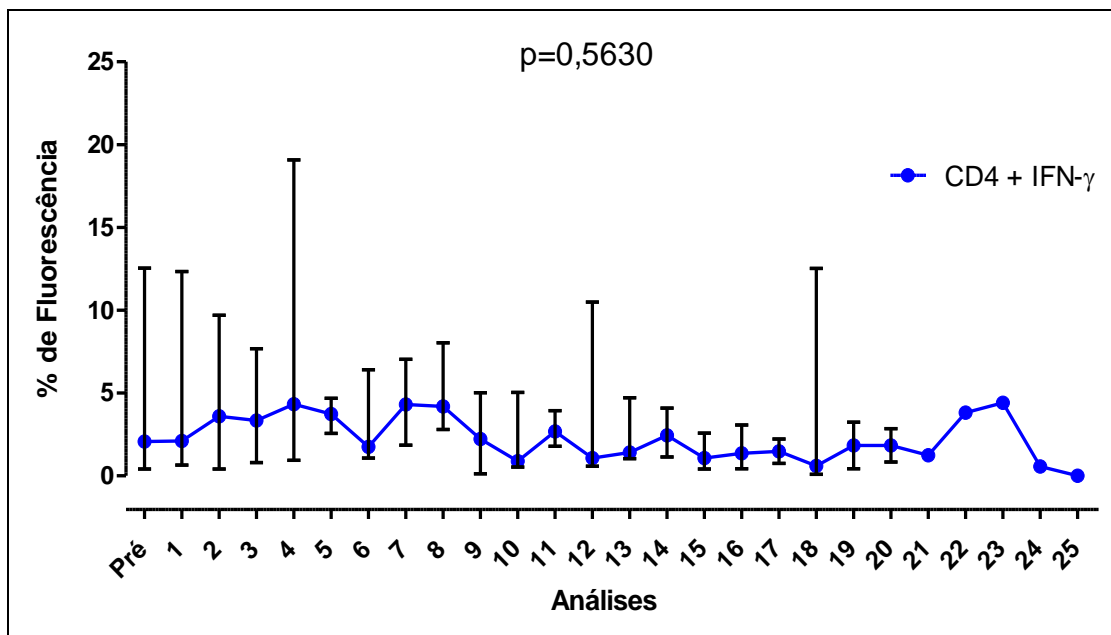
Em relação à avaliação de linfócitos T CD4+ expressando as citocinas IFN- $\gamma$  ( $p=0,5630$ ) e IL-2, podemos notar que durante o início da terapia houve certa tendência a aumento do percentual mais especificamente até a 8<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> análise respectivamente, sendo que para os linfócitos T CD4+ expressando IL-2, esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0,0134$ ) (gráficos 49 e 50).

Já a expressão de TNF- $\alpha$  e IL-12 pelos linfócitos T CD4+, houve apenas ligeira estimulação quando avaliado os valores da mediana, no entanto nota-se que os valores máximos no início das análises encontram-se altos, sugerindo que existem pacientes

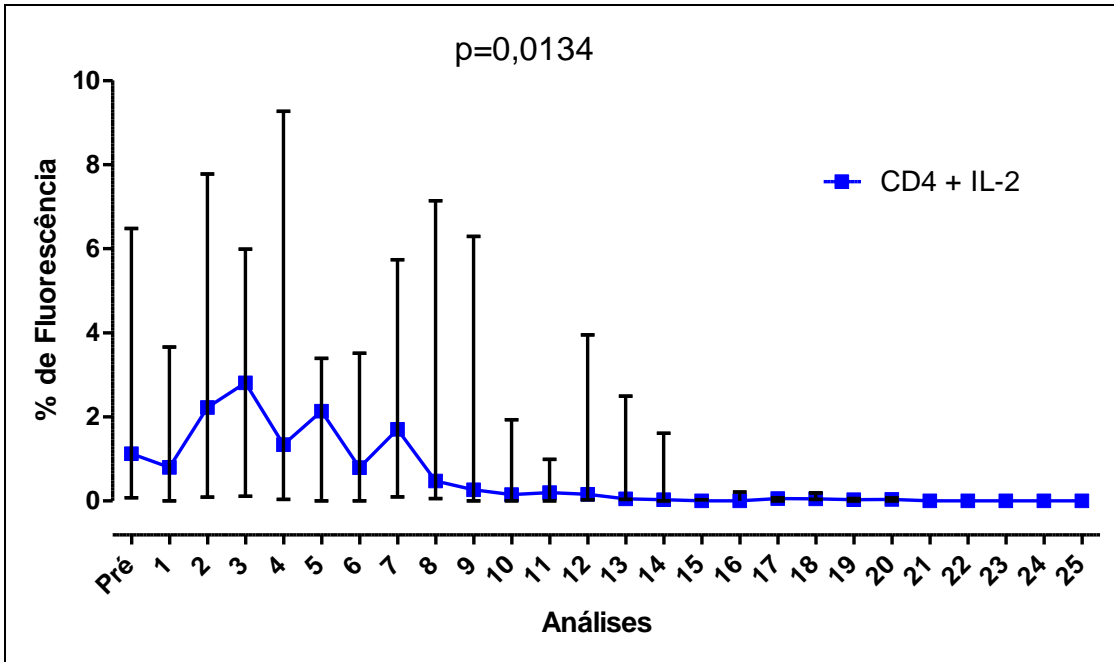
expressando altos valores no início do tratamento ( $p=0,0525$  e  $p=0,8795$ ) (gráficos 51 e 52).

Na avaliação da expressão de IL-10, nota-se a existência de valores altos durante a pré-análise, considerando também o pico de valor máximo. Após o início do tratamento houve apenas um pico na análise 2, seguido de queda ( $p=0,0969$ ) (gráfico 53).

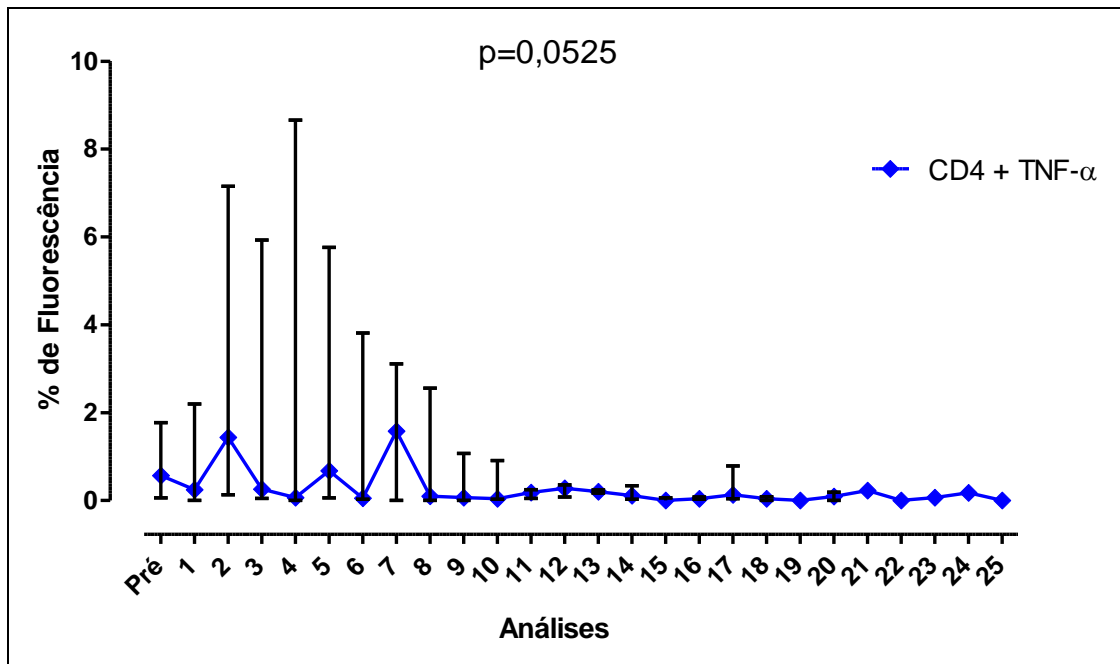
Em relação à expressão da cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2 (CD25+), houve ausência de expressão importante ( $p=0,4725$ ) (gráfico 54).



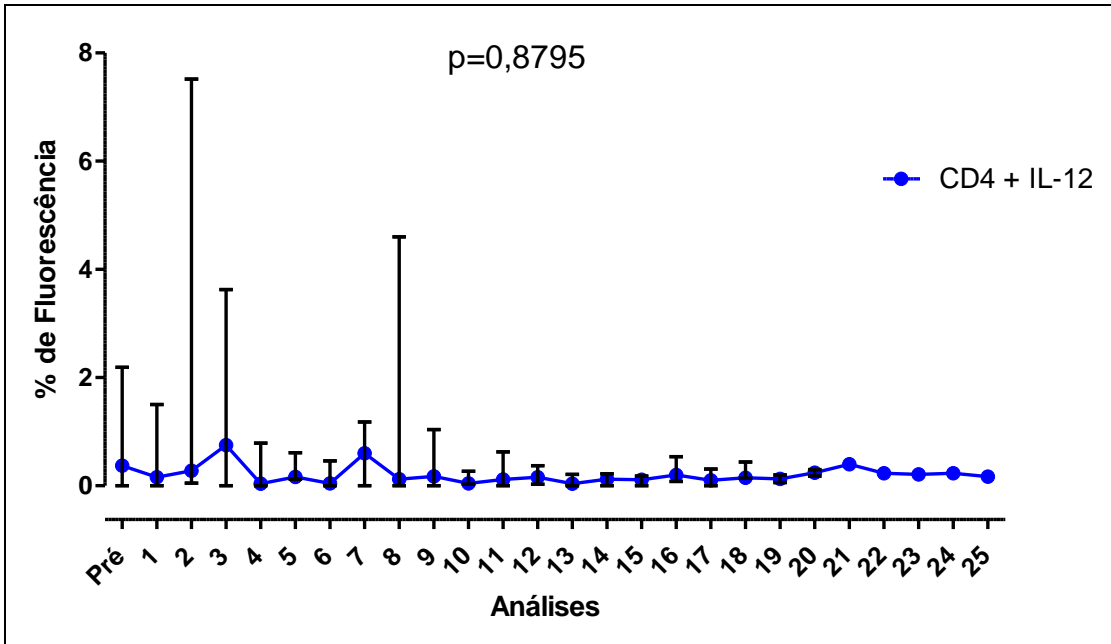
**Gráfico 49:** Avaliação da % de fluorescência para linfócitos T CD4+ expressando a citocina IFN- $\gamma$ , antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas, com base nos valores das medianas, valores mínimos e máximos em relação aos pacientes tomados em grupo.



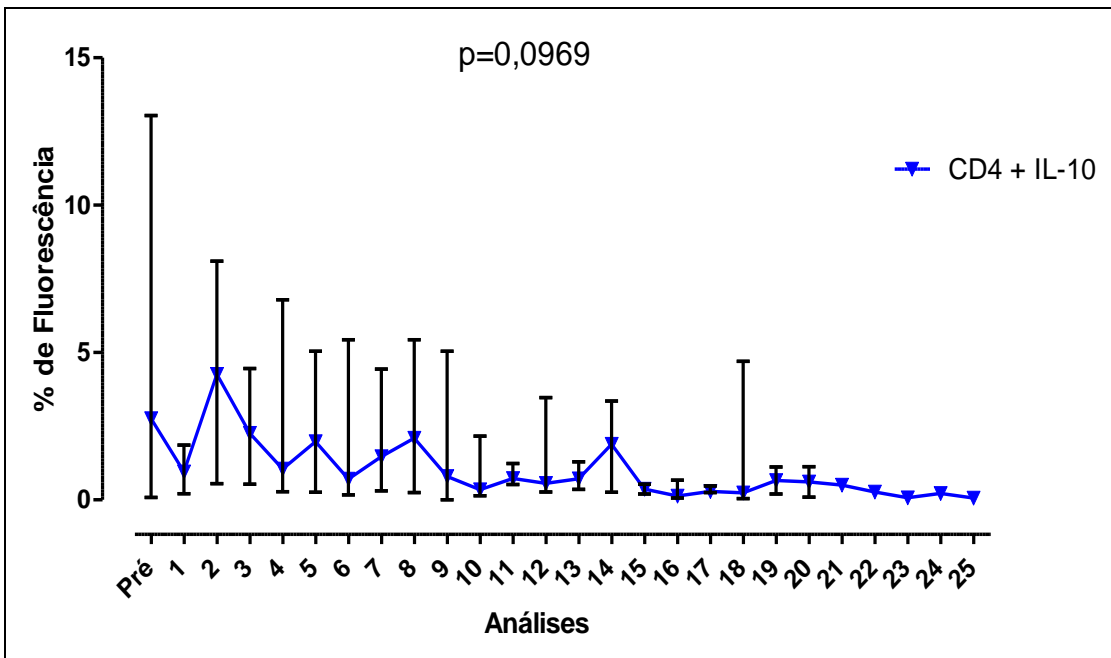
**Gráfico 50:** Avaliação da % de fluorescência para linfócitos T CD4+ expressando a citocina IL-2, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas, com base nos valores das medianas, valores mínimos e máximos em relação aos pacientes tomados em grupo.



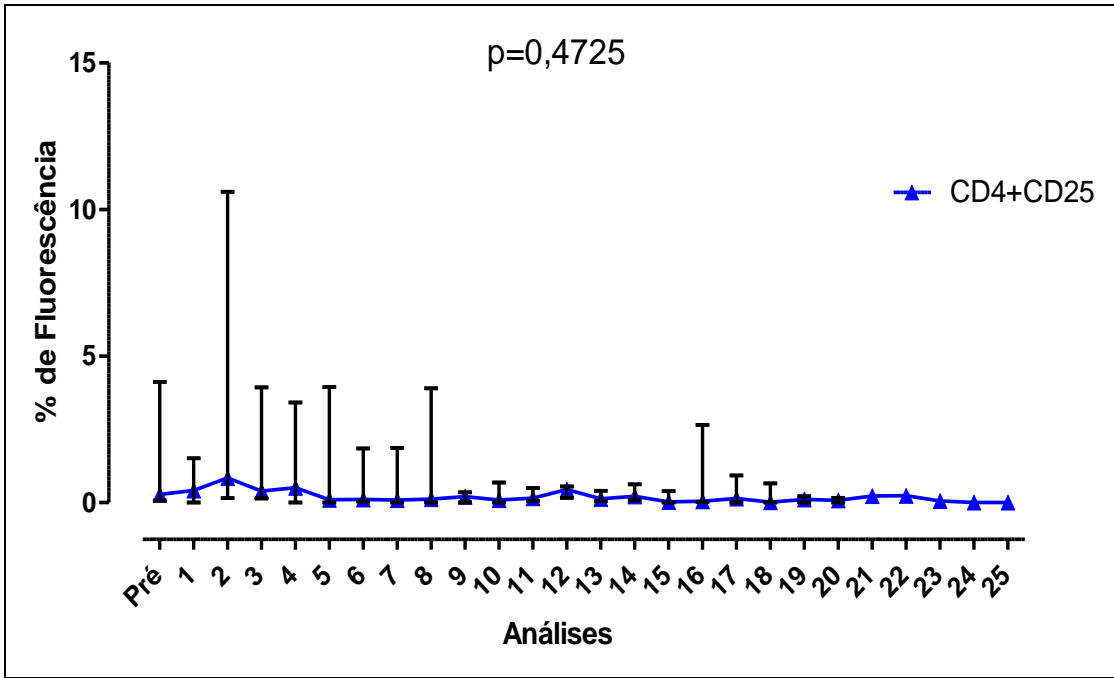
**Gráfico 51:** Avaliação da % de fluorescência para linfócitos T CD4+ expressando a citocina TNF-α, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas, com base nos valores das medianas, valores mínimos e máximos em relação aos pacientes tomados em grupo.



**Gráfico 52:** Avaliação da % de fluorescência para linfócitos T CD4+ expressando a citocina IL-12, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas, com base nos valores das medianas, valores mínimos e máximos em relação aos pacientes tomados em grupo.



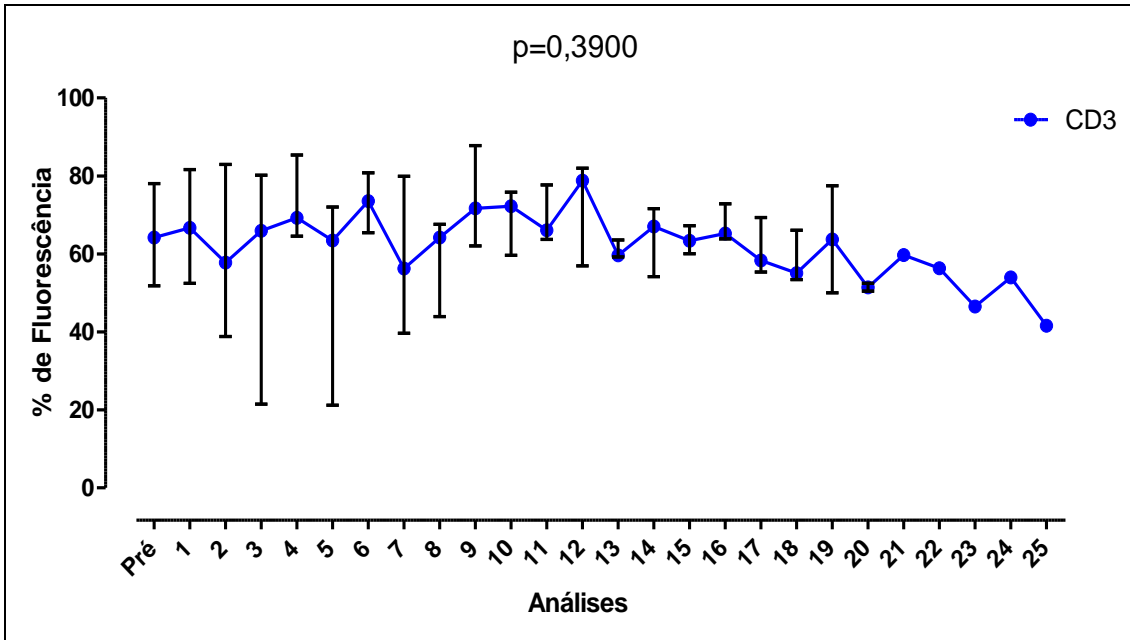
**Gráfico 53:** Avaliação da % de fluorescência para linfócitos T CD4+ expressando a citocina IL-10, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas, com base nos valores das medianas, valores mínimos e máximos em relação aos pacientes tomados em grupo.



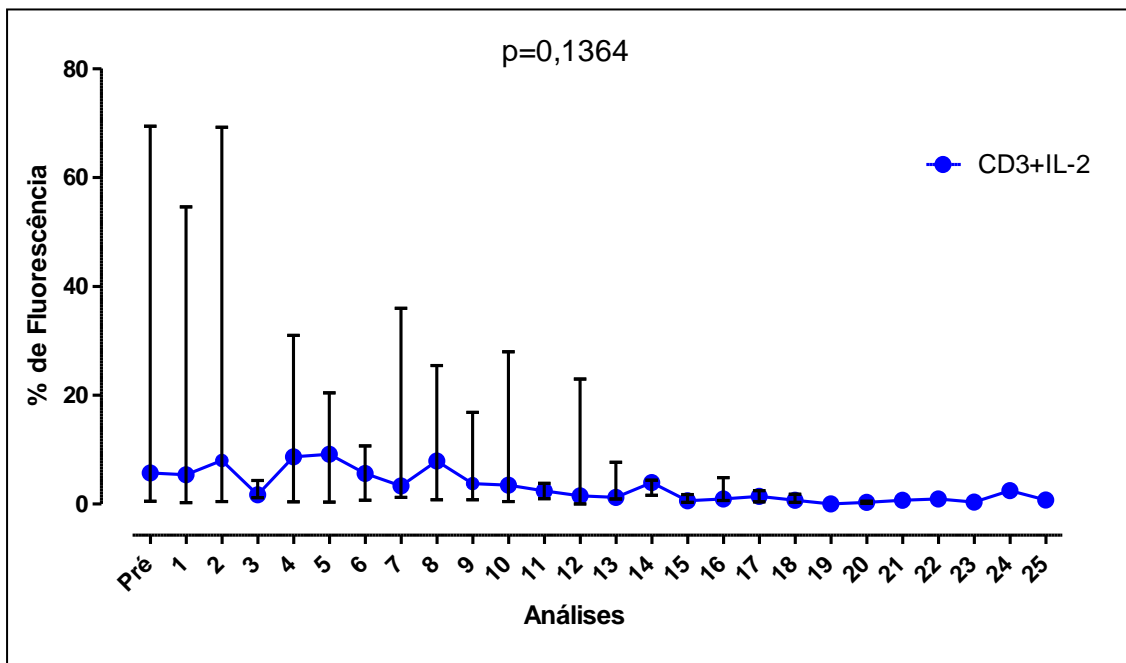
**Gráfico 54:** Avaliação da % de fluorescência para linfócitos T **CD4+** expressando a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2 (**CD25+**), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas, com base nos valores das medianas, valores mínimos e máximos em relação aos pacientes tomados

### B) Linfócitos T totais (CD3+)

Avaliando os linfócitos T totais (CD3+), conseguimos perceber que este tende a certo aumento até a 12ª análise e posteriormente ligeira queda ( $p=0,3900$ ), contrário ao que ocorre com as demais análises que caem próximas a zero por cento. Já na expressão da citocina IL-2, o aumento foi discreto e um tanto oscilatório até a 8ª análise ( $p=0,1364$ ) (gráficos 55 e 56).



**Gráfico 55:** Avaliação da % de fluorescência para linfócitos T CD3+, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas, com base nos valores das medianas, valores mínimos e máximos em relação aos pacientes tomados em grupo.

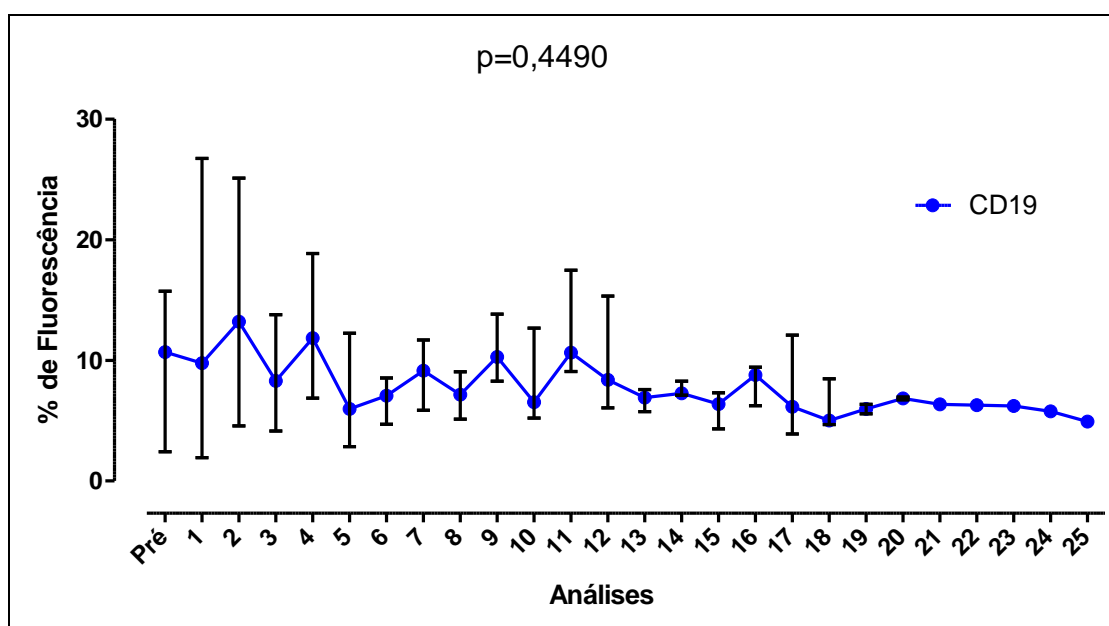


**Gráfico 56:** Avaliação da % de fluorescência para linfócitos T CD3+ expressando a citocina IL-2, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas, com base nos valores das medianas, valores mínimos e máximos em relação aos pacientes tomados em grupo.

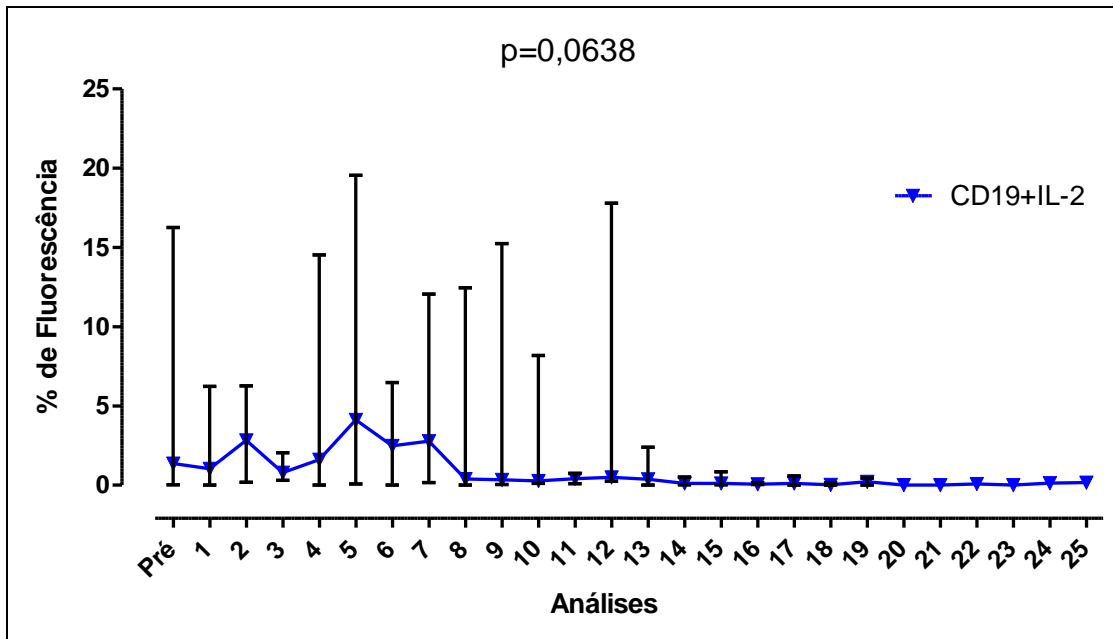


### C) Linfócitos B (CD19+)

No estudo dos marcadores para linfócitos B (CD19+), apenas este expressando IL-2 houve leve aumento, mais especificamente até a 7ª análise e em seguida como as demais avaliações tenderam a queda ( $p=0,0638$ ). Na marcação única há tendência à diminuição ( $p=0,4490$ ). No entanto, avaliando os picos de valores máximos, percebemos a presença de altos valores durante a pré e as primeiras análises pós-terapias (gráficos 57 e 58).



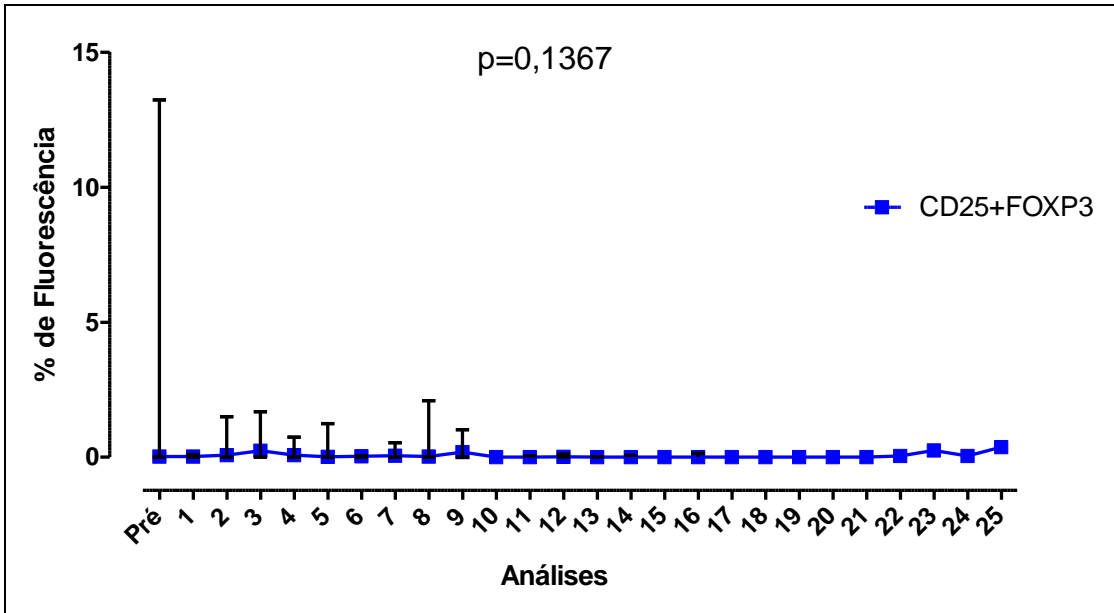
**Gráfico 57:** Avaliação da % de fluorescência para linfócitos T CD19+, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas, com base nos valores das medianas, valores mínimos e máximos em relação aos pacientes tomados em grupo.



**Gráfico 58:** Avaliação da % de fluorescência para linfócitos T CD19+ expressando a citocina IL-2, antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas, com base nos valores das medianas, valores mínimos e máximos em relação aos pacientes tomados em grupo.

#### D) Linfócitos T regulatórios (CD25+FOXP3+)

Não houve expressões consideráveis de linfócitos T regulatórios (CD25+FOXP3+) quando avaliado os pacientes tomados como grupo. No entanto, observa-se presença de alto percentual de valor máximo na análise pré-tratamento ( $p=0,1367$ ) (gráfico 59).



**Gráfico 59:** Avaliação da % de fluorescência para linfócitos T regulatórios (CD25+ FOXP3+), antes da terapia (pré) e durante todas as análises das terapias realizadas, com base nos valores das medianas, valores mínimos e máximos em relação aos pacientes tomados em grupo.

*Discussão*

## 5. DISCUSSÃO

A imunoterapia com CDs vem sendo utilizada há algum tempo e demonstrado resultados importantes. Com base na literatura observamos diversos estudos envolvendo este tipo de tratamento, sendo que protocolos variados baseados em diferentes formas de obtenção da vacina, antígenos tumorais e formas de administração, são utilizados para o tratamento de diversas malignidades. De modo geral os estudos envolvendo esta terapia demonstram-se seguros, sem efeitos colaterais preocupantes (MATSUDA et al, 2004; HEISER et al., 2002).

Em nosso estudo, a vacina também se demonstrou segura e sem maiores efeitos colaterais. Apenas a paciente 2 apresentou piora do quadro do Vitiligo já existente, podendo ser um efeito colateral da vacina, que no caso desta paciente, foi baseada em antígenos tumorais proveniente de Melanoma. Provavelmente a vacina tenha estimulado a resposta imune contra melanócitos, demonstrando então sinais de estimulação do sistema imunológico neste paciente. Este efeito adverso parece ser relativamente comum se tratando de Melanoma, visto que no estudo de Banchereau e colaboradores (2001) foi possível observar caso semelhante.

Com relação à avaliação da resposta imunológica frente ao tratamento, em nossa pesquisa avaliamos a presença de alguns tipos celulares e a expressão de citocinas intracelulares através de citometria de fluxo. Na literatura ainda não encontramos esta mesma forma de análise, sendo que a maioria dos trabalhos avaliados analisa a resposta imunológica através de ensaios de proliferação e citotoxicidade de células T (TIMMERMAN et al., 2002; HEISER et al., 2001; OSTERROTH et al., 2000), assim como a produção de anticorpos através do método de ELISA (FONG et al., 2001).

Considerando a resposta imunológica antes e durante o tratamento, em nossos resultados percebemos que a imunoterapia com CDs tem a capacidade de estimular o sistema imunológico, sendo observado principalmente pelo aumento do percentual de linfócitos T CD4+ expressando IFN- $\gamma$ , assim como IL-2, após o início do tratamento. No entanto, apenas para a avaliação da citocina IL-2 houve diferença estatisticamente significativa. Quando avaliado a expressão de CD25+, a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2, observamos através da análise descritiva que este se comporta de modo semelhante à expressão de IL-2, porém com percentuais mais baixos. Por outro lado, na análise geral não observamos expressão considerável.

Resultados semelhantes aos nossos puderam ser observados no estudo de Fong e colaboradores (2001) que avaliaram os efeitos de diferentes vias de administração da vacina com CDs e observaram a produção de IFN- $\gamma$ , no entanto a partir da administração da vacina por vias intradérmica e intralinfática. Mumberg e colaboradores (1999), em seu estudo observaram a importância das células T CD4+ e da citocina IFN- $\gamma$  na ação antitumoral mesmo que de forma indireta.

A citocina IL-2 é um importante fator proliferativo de linfócitos T frente à estimulação antigênica, sendo considerada central na regulação da resposta de células T (SWAIN, 1991; FEHNIGER; COOPER; CALIGIURI, 2002). O IFN- $\gamma$  apresenta um papel primordial na indução de resposta imune protetora induzindo o desenvolvimento da resposta imune do tipo Th1. A produção de IL-2 e IFN- $\gamma$  por células Th1 induzem ainda o desenvolvimento de macrófagos ativados, assim como linfócitos T citotóxicos (CD8+), considerando que este último apresenta papel fundamental na resposta antitumoral (MURPHY et al., 2000; IKEDA; OLD; SCHREIBER, 2002).

Na avaliação da expressão da citocina TNF- $\alpha$  pelas células T CD4+, observamos que, de forma geral, houve apenas leve estimulação não significativa no início do

tratamento, sendo apenas perceptível nos pacientes 1, 6 e 7, sendo que o paciente 1 apresentou estímulo intenso se comparado aos outros. Durante uma avaliação da expressão de TNF- $\alpha$  após tratamento com vacina com DCs administrada por via intravenosa, apenas uma paciente dos seis avaliados apresentaram fraca expressão, o que condiz com nossos achados (FONG et al., 2001).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina multifuncional e o maior mediador de inflamação, apresentando-se envolvido na apoptose, sobrevivência e proliferação celular. Pode ser detectado em células estromais e malignas em diversos tipos de cânceres. A produção desta citocina de forma crônica no microambiente tumoral é capaz de induzir o desenvolvimento e disseminação do mesmo. Em contrapartida, o TNF- $\alpha$  é uma molécula importante também na destruição celular mediada por células NK e células T CD8+ (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; BALKWILL, 2002). Isto demonstra as variadas funções desta citocina.

Tendo em vista ao fato de que houve estímulo de resposta de células T CD4+ expressando citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , isto sugere que a imunoterapia com CDs tem a capacidade de induzir o perfil de resposta do tipo Th1. Neste estudo, não realizamos a avaliação da expressão de células T citotóxicas e natural killers, porém estudos em andamento realizados por nosso grupo demonstraram aumento da expressão destas células no início do tratamento, nestes mesmos indivíduos. Sendo assim, provavelmente o sistema imunológico esteja atuando de forma efetora contra as células tumorais.

Observando a expressão de IL-10 e IL-12 por linfócitos T CD4+, o que podemos notar é que a expressão de IL-10 na pré-terapia encontra-se mais elevada comparada a expressão de IL-12. Após o início do tratamento, nota-se que a expressão de ambas as citocinas comportam-se de maneira semelhante na maioria dos pacientes. Desta forma,

estes resultados apontam que a imunoterapia com células dendríticas pode estimular tanto a expressão de citocinas efetoras como imunossupressoras por parte de linfócitos T CD4+.

A citocina IL-12, assim como o INF- $\gamma$ , é importante para a estimulação de resposta imune do tipo Th1. Esta apresenta a habilidade de induzir atividades citotóxicas em células NK e células T CD8+, além de estimular a produção de INF- $\gamma$  por estas mesmas células (HSIEH et al., 1993; DORMAN; HOLLAND, 2000).

Em relação a IL-10, esta poder ser secretada por uma variedade de células (CHANG et al., 2007; BINGISSER et al., 2000) e embora sua ação imunossupressoras seja descrita, já existem relatos também de sua função efetora sobre células T CD8+ (GROUX et al., 1998). Incluída dentro do perfil de células do tipo Th2, a IL-10 é capaz de estimular funções de células B. Por outro lado, existem relatos da produção desta citocinas por células do tipo Th1 (TRINCHIERI, 2007), assim como de sua função antitumoral (ADRIIS; KLEIN; JASNIS, 1999; FUJII et al., 2001). Saraiva e colaboradores (2009), demonstraram ainda que a diferenciação in vitro de células Th1 expressando IL-10 foi dependente da ativação do fator de transcrição STAT 4 induzido pela citocina IL-12, de forte ativação via TCR e fosforilação ERK1 e ERK2.

Nossos resultados demonstram ainda, através da avaliação da marcação única de células B (CD19+), perfil oscilatório com tendência a queda na análise geral. No entanto, há ligeira estimulação de células B expressando citocinas IL-2 no início do tratamento, sugerindo que a imunoterapia tem a habilidade de estimular também a resposta imune humoral. Na literatura não encontramos avaliação da expressão de IL-2 por células B, porém Holtl e colaboradores (1999), no tratamento de pacientes com carcinoma de células renais através de CDs pulsadas com peptídios, também identificaram a indução de resposta imune humoral através da análise da produção de



anticorpos. Fong e colaboradores (2001) também observaram a indução de significantes títulos de anticorpos antígenos específicos utilizando a administração intravenosa da vacina. Além disso, estudos avaliando a vacina com CDs em camundongos também obtiveram resultados semelhantes (KOIDO et al., 2000).

Embora seja notável o estímulo da resposta imunológica através de nossos resultados, observamos que esta ocorre apenas durante certo tempo e em seguida tem-se a queda da expressão da maioria dos marcadores celulares analisados. Estes resultados indicam que mesmo com este efeito positivo inicial da vacina com CDs, a partir de certo momento, pode ser que os tumores lancem novos mecanismos de escape ao sistema imune, levando à imunossupressão da resposta imunológica e possivelmente progressão tumoral.

Buscando resultados semelhantes na literatura, percebemos que a maioria dos estudos não avalia o tratamento por tempo prolongado como realizado em nosso estudo e isso provavelmente faz com que este tipo de comportamento não seja observado em outras pesquisas.

Desta forma, avaliando de forma individual a expressão de células T regulatórias (CD25+FOXP3+), observamos que a maioria dos pacientes apresenta fraca expressão inicial, com exceção ao paciente 3 que apresentou alto percentual antes do início do tratamento. No entanto, na análise geral agrupada não obtemos diferença estatisticamente significativa, sendo os valores da mediana próximos a 0%. Podemos observar ainda que mesmo com a queda da resposta imunológica após certo tempo de terapia, que sugere imunossupressão, estas células de função imunossupressoras não se elevam, concluindo que não são as células T regulatórias de fenótipo CD25+, FOXP3+, as responsáveis pela queda de resposta.

Na avaliação da expressão de IL-2 por células T totais (CD3+) foi possível observar leve aumento do percentual no início do tratamento, demonstrando existência de células T totais ativadas. Além disso, a elevada expressão da marcação única de CD3+ foi também notável durante as análises, mesmo não sendo estatisticamente significativa. Entretanto, como ocorre em relação aos outros marcadores avaliados, há queda da expressão após certo momento. Comparada às outras marcações realizadas que tende a zero por cento, a expressão de CD3+ sofre apenas uma ligeira diminuição. Sendo assim, isto nos leva a questionar se não haveria alguma outra população de células expressando CD3+, com exceção de linfócitos T CD4+ e CD8+, que poderia estar sendo contabilizada nesta marcação e apresentando alguma função imunológica seja antitumoral ou regulatória.

De modo geral, os resultados demonstram a estimulação do sistema imunológico pela imunoterapia com CDs, porém esta tende a queda a partir de certo momento (após 10<sup>a</sup>, 12<sup>a</sup> análise). Isto justifica a estabilização ou mesmo a lenta progressão tumoral em alguns dos pacientes apenas na fase inicial do tratamento, analisado em um estudo paralelo em andamento onde o objetivo foi a avaliação clínica destes mesmos pacientes após a imunoterapia com CDs.

Parte dos pacientes avaliados foi submetido ao tratamento durante longo tempo, com várias administrações da vacina e estimulação imunológica. Uma das explicações para não resposta após certo tempo de tratamento poderia ser a ocorrência de seleção de variantes do tumor com fenótipos imuno-resistentes (KHONG; RESTIFO, 2002). Desta forma, seria interessante para a produção da vacina, a utilização de novas amostras de biópsias tumorais durante o tratamento, para que consigamos contornar esta seleção natural que ocorre com os tumores.

Além disso, células como  $T\gamma/\delta$  e NKT são duas populações que expressam o complexo receptor de células T (TCR/CD3+). As células  $T\gamma/\delta$  são uma subpopulação de células T que expressam o heterodímero TCR gama/delta e compõem cerca de 0 a 6% dos linfócitos T de sangue periférico (HAAS; PEREIRA; TONEGAWA, 1993). As células NKT são uma subpopulação de linfócitos T que apresentam ao mesmo tempo marcadores de células T (TCR/CD3+) e NK (NK 1.1 ou CD161) (GODFREY et al., 2000; SMYTH et al., 2002 ). Ambas as populações já foram identificadas com funções protetoras assim como regulatórias no câncer (CUI et al., 1997; TERABE et al., 2000; PENG et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2001; BILGI et al., 2008). Desta forma, uma investigação futura destes tipos celulares também pode ser importante.

*Conclusão*

## 6. CONCLUSÃO

1. Após o início do tratamento houve aumento do percentual de linfócitos T totais (CD3+) na maioria dos pacientes, com tendência a ligeira queda após a 12ª análise. Na avaliação da expressão de IL-2 houve leve aumento do percentual, com tendência a diminuição próxima à zero por cento.
2. Houve estímulo de células B (CD19+) expressando IL-2 no início da terapia, porém com tendência a queda após certo momento. Ocorreu tendência à diminuição do percentual da marcação única CD19+.
3. Estímulo de células T auxiliares expressando as citocinas IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12 pode ser observado, sendo mais intenso em relação às duas primeiras citocinas. A expressão de CD25 por estas células não apresentou considerável alteração.
4. Não houve importante estimulação de células T regulatórias (CD25+FOXP3+) durante todo o tempo de terapia.

De modo geral, a imunoterapia com CDs foi capaz de alterar o perfil imunológico sistêmico em pacientes com diferentes tipos de cânceres avançados, durante certo tempo de tratamento.

*Referências*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRI, S.; KLEIN, S.; JASNIS, M. IL-10 expression by CT26 colon carcinoma cells inhibits their malignant phenotype and induces a T cell-mediated tumor rejection in the context of a systemic Th2 response. **Gene Therapy**, v. 6, p. 1705–1712, 1999.

ANDERSON K. S.; LA BAER, J. The sentinel within: exploiting the immune system for cancer biomarkers. **Journal of Proteomic Research**, v. 4, n.4, p. 1123–1133, 2005.

ATHIE-MORALES, V. et al. Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 1, p. 61-9, 2004.

BAIS, A.G. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. **Journal of Clinical Pathology**, v.58, p.1096–1100, 2005.

BALKWILL, F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, p. 135–141, 2002.

\_\_\_\_\_; MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v.357, p. 539–45, 2001.

BANCHEREAU, J. et al. Immune and Clinical Responses in Patients with Metastatic Melanoma to CD34 Progenitor-derived Dendritic Cell Vaccine. **Cancer Research**, v. 61, p. 6451–6458, September 1, 2001.

\_\_\_\_\_.; STEINMAN R. M. Dendritic cells and the control of immunity **Nature**, v. 392, March 1998.

BARBUTO, J.A. M. et al. Dendritic cell–tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 53, p. 1111–1118, 2004.

BAXEVANIS, C. N. et al. Tumor-Specific CD41 T Lymphocytes from Cancer Patients Are Required for Optimal Induction of Cytotoxic T Cells Against the Autologous Tumor. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 3902-3912, 2000.

BEDROSIAN, I. et al. Intranodal Administration of Peptide-Pulsed Mature Dendritic Cell Vaccines Results in Superior CD8+ T-Cell Function in Melanoma Patients. **Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 20, October, 2003.

BEISSERT, S.; SCHWARZ, A.; SCHWARZ T. Regulatory T Cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 15–24, 2006.

BENDER, A. et al. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 196, p. 121-135, 1996.

BENNETT, S.R. et al. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. **Nature**, v. 393, p. 478-480, 1998.

BERNHARD, H. et al. Generation of Immunostimulatory Dendritic Cells from Human CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells of the Bone Marrow and Peripheral Blood. **Cancer Research**, v.5, p. 1099-1104, 1995.

BEYER, M.; SCHULTZE, J. L. Regulatory T cells in cancer. **Blood**, v. 108, n. 31, 2006.

BILGI, O. et al. Peripheral Blood Gamma-Delta T Cells in Advanced-Stage Cancer Patients. **Advances in Therapy**, v. 25, n. 3, p. 218–224, 2008.

BINGISSER, R. et al. Interleukin-10 Secretion by Alveolar Macrophages and Monocytes in Sarcoidosis. **Respiration**, v.67, p.280-286, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf>. Acesso em: 23/08/2010

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

CELLA, M. et al. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, p. 747–752, 1996.



CHANG, H.D. et al. Expression of IL-10 in Th memory lymphocytes is conditional on IL-12 or IL-4, unless the IL-10 gene is imprinted by GATA-3. **European Journal of Immunology**, v.37, p.807–817, 2007.

CHAUX, P. et al. Identification of MAGE-3 Epitopes Presented by HLA-DR Molecules to CD41 T Lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 5, 1999.

CHEN, M.L. et al. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102, p. 419-424, 2005.

CHEN, W. et al. Conversion of peripheral CD4+CD25– T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-β induction of transcription factor Foxp3. **The Journal of Experimental Medicine**, v.198, p. 1875–1886, 2003.

COLONNA, M.; TRINCHIERI, G.; LIU, Y.J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. **Nature Immunology**, v.5, p.1219–1226, 2004.

CUI, J. et al. Requirement for Valpha 14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. **Science**, v.278, p.1623-1626, 1997.

DEGLI-ESPOSTI, M.A.; SMYTH, M.J. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. **Nature Reviews/ Immunology**, v.5, 2005.

DE JONG E. C.; SMITS H. H.; KAPSENBER, G. M. L. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Seminars in Immunopathology*, v.26, p. 289–307, 2005.

\_\_\_\_\_. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse Th cell-polarizing signals. **The Journal of Immunology**, v.168, p.1704-1709, 2002.

DESMETZ, C. Humoral response to cancer as a tool for biomarker discovery. **Journal of Proteomics**, v.72, p. 982 – 988, 2009.

DORMAN S. E.; HOLLAND S. M. Interferon-g and interleukin-12 pathway defects and human disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.11, p.321±333, 2000.

DOUGAN, M.; DRANOFF, G. Immune Therapy for cancer. **Annual Review Immunology**, v.27, p.83-117, 2009.

DUNN, G.P. et al. Cancer immunoediting: from immune surveillance to tumor escape. **Nature Immunology**, v. 3, n. 11, 2002.

\_\_\_\_\_ ; OLD, L. J. ; SCHREIBER R. D. The three Es of cancer immunoediting. **Annual Review Immunology**, v. 22, p. 329–60, 2004.

EHRlich, P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. **Ned Tijdschr Geneeskde**, v. 5, p. 273-290, 1909

FEHNIGER, T. A.; COOPER, M. A.; CALIGIURI, M. A. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.13, p.169–183, 2002.

FONG, L. et al. Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. **The Journal Immunology**, v. 166, p. 4254–4259, 2001.

\_\_\_\_\_ ; ENGLEMAN, E.G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. **Annual Review Immunology**, v.18, p. 245-273, 2000.

FRICKE, I.; GABRILOVICH, D. I. Dendritic cells and tumor microenvironment: a dangerous liaison. **Immunological Investigations**, v.35, n. 3-4, p. 459–483, 2006.

FUJII, S. et al. Interleukin-10 promotes the maintenance of antitumor CD8 function in situ. **Blood**, v. 98, p. 2143-2151, 2001.

GABRILOVICH, D. Mechanisms and functional significance of tumor-induced dendritic-cell defects. **Nature Reviews Immunology**, v.4, p.941-952, 2004.

GHIRINGHELLI, F. et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- $\beta$ -dependent manner. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 8, p. 1075–1085, October 2005.

GILBOA, E. DC-based cancer vaccines. **The Journal of Clinical Investigation**, v.117, n.5, 2007.

GLIMCHER L. H.; MURPHY K. M. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. **Genes and Development**, v.14, p.1693–1711, 2000.

GODFREY, D. I. et al. NKT cells: facts, functions and fallacies. **Immunology Today**, v.21, p. 573-583, 2000.

GROUX, H. et al. Inhibitory and Stimulatory Effects of IL-10 on Human CD8+T Cells. **The Journal of Immunology**, v.160, p.3188-3193,1998.

GUEDES, P. M. M. et al. IL-17 Produced during Trypanosoma cruzi Infection Plays a Central Role in Regulating Parasite-Induced Myocarditis. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 4, n. 2, p. e604, (2010).

HAAS, W.; PEREIRA, P.;TONEGAWA, S. Gamma/delta cells. **Annual Review of Immunology**, v.11, p. 637–685, 1993.

HAMRITA, B. et al. Identification of tumor antigens that elicit a humoral immune response in breast cancer patients' sera by serological proteome analysis (SERPA). **Clinica Chimica Acta**, v. 393, p. 95–102, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, p.57–70, 2000.

HART, I.R. Biology of cancer. **Medicine**, v. 32, n. 3, p. 1-5, March 2004.

HEISER, A. et al. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. **The Journal of Clinical Investigation**, v.109, n. 3, p. 409–417, 2002.

\_\_\_\_\_. Human Dendritic Cells Transfected with Renal Tumor RNA Stimulate Polyclonal T-Cell Responses against Antigens Expressed by Primary and Metastatic Tumors. **Cancer Research**, v.61, p. 3388–3393, April 2001.

HERSEY, P. et al. Phase I/II study of treatment with dendritic cell vaccines in patients with disseminated melanoma. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 53, p. 125–134, 2004.

HOLTL, L. et al. Cellular and humoral immune responses in patients with metastatic renal cell carcinoma after vaccination with antigen pulsed dendritic cells. *The Journal of Urology*, v. 161, p. 777-782, March 1999.

HSIEH, C. S. et al. Development of Th1 CD4<sup>+</sup> T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. **Science**, v.260, p.547±9, 1993.

IKEDA H.; OLD L. J.; SCHREIBER, R.D. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.13, p. 95–109, 2002.

IMAFUKU, Y.; OMENN, G.S.; HANASH, S. Proteomics approaches to identify tumor antigen directed autoantibodies as cancer biomarkers. **Disease Markers**, v.20, p.149–53, 2004.

JOHANSSON, M.; DENARDO, D. G.; COUSSENS, L. M. Polarized immune responses differentially regulate cancer development. **Immunological Reviews**, v. 222, p.145–154, 2008.

JONULEIT, H. et al. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific t-cell responses in humans following intranodal injection. *International Journal of Cancer*, v.93, p. 243–251, 2001.

KAH-WAI, L.; JACEK, T.; JACEK, R. Dendritic cells heterogeneity and its role in cancer immunity. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v.2, n.2, 2006.

KALINSKI, P. et al. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. **Immunology Today**, [v. 20, n. 12](#), p. 561-567, December 1999.

KENNEDY, R.; CELIS, E. Multiple roles for CD4<sup>+</sup> T cells in anti-tumor immune responses. **Immunological Reviews**, v.222, 2008.

KHONG, H. T.; RESTIFO, N. P. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. **Nature Immunology**, v. 3, n. 11, November 2002.

KOBAYASHI, H. et al. Gamma/delta T cells provide innate immunity against renal cell carcinoma. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 50, n. 3, p.115-124, 2001.

- KOBAYASHI, T. et al. Tumor mRNA-loaded dendritic cells elicit tumor-specific CD8+ cytotoxic T cells in patients with malignant glioma. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v.52, p. 632–637, 2003.
- KOIDO, S. et al. Transfected with MUC1 RNA Vaccination of Dendritic Cells Induction of Antitumor Immunity. **The Journal of Immunology**, v.165, p.5713-5719, 2000.
- KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review Immunology**, v.27, p.485–517, 2009.
- KYTE, J. A. et al. Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA. **Cancer Gene Therapy**, v.13, p. 905–918, 2006.
- LARMONIER, N. et al. Tumor-derived CD4+CD25+ regulatory T cell suppression of dendritic cell function involves TGF-*b* and IL-10. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v.56, p.48–59, 2007.
- LI, H.; ROSTAMI, A. IL-9: Basic Biology, Signaling Pathways in CD4+ T Cells and Implications for Autoimmunity. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v.5, p.198–209, 2010.
- MA, C. S.; TANGYE S. G.; DEENICK, E. K. Human Th9 cells: inflammatory cytokines modulate IL-9 production through the induction of IL-21. **Immunology and Cell Biology**, v.88, p. 621–623, 2010.
- MALMBERG, K.J.; LJUNGGREN, H.G. Escape from immune- and nonimmune-mediated tumor surveillance. **Seminars in Cancer Biology**, v. 16, p. 16–31, 2006.
- MATSUDA, K et al. Enhancement of cytotoxic T-lymphocyte responses in patients with gastrointestinal malignancies following vaccination with CEA peptide-pulsed dendritic cells. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v.53, p. 609–616, 2004.
- MERLO, L.M.F. et al. Cancer as an evolutionary and ecological process. **Nature Reviews / Cancer**, v.6, 2006.
- MOWEN, K. A.; GLIMCHER, L. H. Signaling pathways in Th2 development. **Immunology Review**, v.202, p. 203–222, 2004.

MUMBERG, D. et al. CD4 T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-g. **Immunology**, v. 96, p. 8633–8638, July 1999.

MURPHY, K. M. et al. Signaling and transcription in T helper development. **Annual Review Immunology**, v.18, p.451–94, 2000.

NESTLE, F. O. et al. Human sunlight-induced basal-cell-carcinoma-associated dendritic cells are deficient in T co-stimulatory molecules and are impaired as antigen presenting cells. **American Journal of Pathology**, v.150, p. 641–651,1997.

NONN, M. et al. Dendritic cell-based tumor vaccine for cervical cancer I: in vitro stimulation with recombinant protein-pulsed dendritic cells induces specific T cells to HPV16 E7 or HPV18 E7. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.129, n. 9, p. 511-20, 2003.

OSTERROTH, F. et al. Stimulation of cytotoxic T cells against idiotype immunoglobulin of malignant lymphoma with protein-pulsed or idiotype-transduced dendritic cells. **Blood**, v. 95, n. 4, February 2000.

PAWELEC , G. Tumour escape: antitumour effectors too much of a good thing? **Cancer Immunology Immunotherapy**, v. 53, p. 262–274, 2004.

PENG, G. et al. Tumor-Infiltrating  $\gamma\delta$ T Cells Suppress T and Dendritic Cell Function via Mechanisms Controlled by a Unique Toll-like Receptor Signaling Pathway. **Immunity**, [v. 27, n. 2](#), p. 334-348, August 2007.

PONTES, E. R. et al. Auto-antibodies in prostate cancer: humoral immune response to antigenic determinants coded by the differentially expressed transcripts FLJ23438 and VAMP3. *The Prostate*, v. 66, n. 14, p. 1463-1473, 2006.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. **Annual Review Immunology**, v.22, p.531–62, 2004.

\_\_\_\_\_. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. **Cell**, v. 133, May 2008.

SANTIN, A. D. et al. HPV 16/18-pulsed dendritic cell vaccination in cervical cancer patients with recurrent disease refractory to standard treatment modalities. **Gynecologic Oncologic**, v.100, p. 409-478, 2006.

SARAIVA, M. et al. Interleukin-10 Production by Th1 Cells Requires Interleukin-12-Induced STAT4 Transcription Factor and ERK MAP Kinase Activation by High Antigen Dose. **Immunity**, v. 31, p.209–219, August 2009.

SCHAROVSKY, O.G. et al. From immune surveillance to tumor-immune escape: the story of an enemy with multiple strategies of resistance and counterattack. **Immunología**. v. 25, n. 2, p. 101-114, Abril-Junio 2006.

SHOSHAN, S. H.; ADMON, A. Novel technologies for cancer biomarker discovery: humoral proteomics. **Cancer Biomarkers**, v. 3, p.141–52, 2007.

SMYTH, M. J. et al. NKT cells — conductors of tumor immunity? **Current Opinion in Immunology**, v.14, p.165–171, 2002.

SREDNI, B. et al Predominance of TH1 Response in Tumor Bearing Mice and Cancer Patients Treated With AS 101. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 88, n.18, September 1996.

SWAIN, S.L. Lymphokines and the immune response: the central role of interleukin-2. **Current Opinion in Immunology**, v. 3, p. 304–10, 1991.

TERABE, M. et al. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. **Nature Immunology**, v. 1, p. 515–20, 2000.

THOMAS, L. On immunosurveillance in human cancer. **Yale Journal of Biology and Medicine**; v. 55, p. 329-333, 1982.

TIMMERMAN, J. M. et al. Idiotypic-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. **Blood**, v. 99, n. 5, March 2002.

TOES, R. E.M. et al. CD4 T Cells and Their Role in Antitumor Immune Responses. **The Journal of Experimental Medicine**, v.189, n.5, 1999.

TOPALIAN, S.L et al. Melanoma-specific CD4 T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. **Journal Experimental Medicine**,v.183, p. 1965–197, 1996.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n.2, p. 239–243, February 2007.

VELDHOEN, M. et al. Transforming growth factor- $\beta$  ‘reprograms’ the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9–producing subset. **Nature Immunology**, v. 9, n. 12, December 2008.

VIGNALI D. A. A.; COLLISON L. W.; WORKMAN C. J. How regulatory T cells work. **Nature Reviews Immunology**, v.8, 2008.

VISSER, K.E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature Reviews/Cancer**, v.6, 2006.

ZHENG, Y.; RUDENSKY, A.Y. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. **Nature Immunology**, v. 8, p.457–62, 2007.

ZITVOGEL, L. et al. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 6, 2008.

WOLF, A. M. et al. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 9, p. 606–612, 2003.

WORLD HEALTH STATISTICS 2008. Geneva, World Health Organization,. Cap 1, p. 21, (1:112), 2008.



*Anexos*

**Anexo 1:** Termo de consentimento livre após esclarecimento

**TERMO DE ESCLARECIMENTO**

Você está sendo convidado a participar do estudo “**Imunoterapia com células dendríticas no tratamento do câncer avançado**”. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso sua participação é importante. O objetivo deste estudo é:

- Estudar possíveis alterações imunológicas e patológicas de tumores.
- Avaliar o tratamento imunoterápico. Sintomas como dor muscular e aumento da temperatura podem ocorrer. Estas alterações podem ser tratadas e os pesquisadores orientarão sobre a medicação.
- Caso você participe, será necessário coletar amostra de sangue e do tumor (biópsia) para o estudo que estamos propondo e que normalmente é coletado para seus exames ou tratamentos, e que não lhe trazem risco de vida.

Você poderá obter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

## **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO**

Eu, \_\_\_\_\_, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.

Uberaba, ...../...../.....

---

Assinatura do voluntário ou seu responsável legal  
Identidade

---

Documento de

---

Assinatura do pesquisador responsável  
Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

Telefone de contato dos pesquisadores: 34 3318-5326/ 3318-5595/ 9148-3373

Em caso de dúvida em relação a esse documento, você pode entrar em contato com o Comitê Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelo telefone 3318-5854.




Mem 09/08/IPON/UFTM  
Uberaba, 10 de Junho de 2008

Ao Sr. João Batista Ribeiro  
Coordenador do CEP-UFTM

Prezado Coordenador,

Venho por meio deste solicitar que no Parecer Consubstanciado (Parecer 683 de 10/03/2006), que trata de Imunoterapia com Células Dendríticas, sejam incluídos grupos de pacientes com neoplasias em outros órgãos, além do colo uterino. A presente solicitação justifica-se pelo fato de que a terapia citada pode ser aplicada no tratamento de neoplasia em outros órgãos por se tratar da mesma metodologia e dos mesmos reagentes descritos anteriormente, constituindo-se em um avanço para pacientes cujas terapias convencionais não são possíveis de serem realizadas, ou que não apresentaram resultados clínicos.

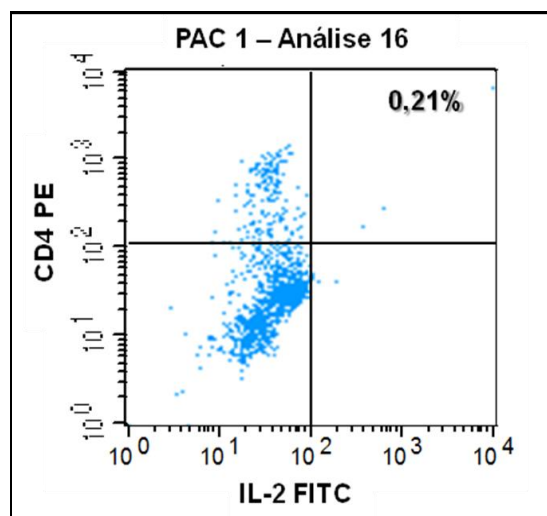
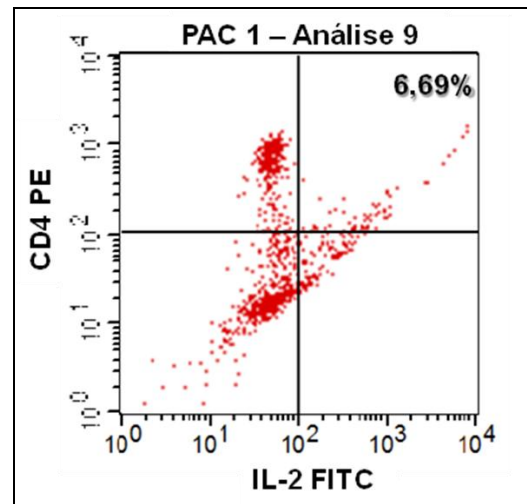
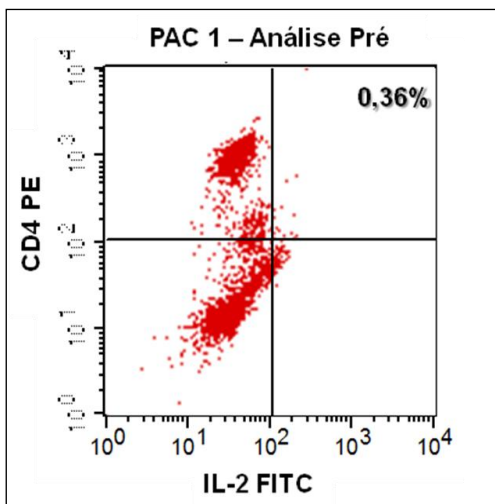
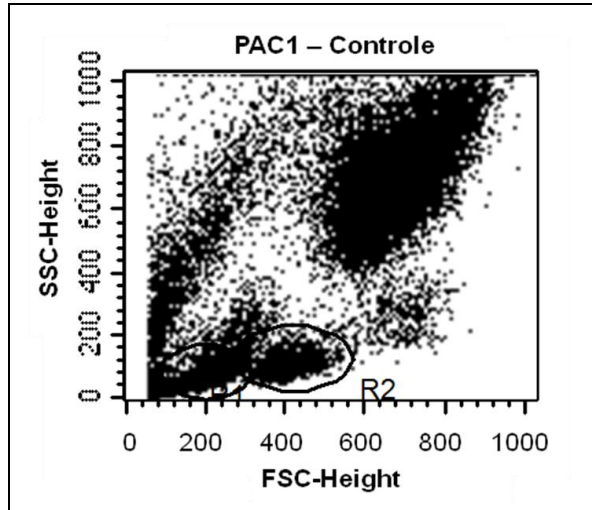
Atenciosamente,

  
Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta  
Prof. Titular – Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia  
Instituto de Pesquisa em Oncologia – IPON  
Coordenador do Projeto

  
João Batista Ribeiro  
Coordenador do CEP-UFTM

**Anexo 3:** Gráficos representativos da Citometria de Fluxo.

Avaliação da expressão de CD4+IL-2 em % de fluorescência para PAC 1.





# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)