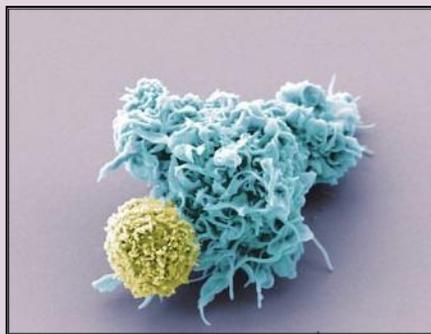


UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

BRUNA FRANÇA MATIAS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR MACRÓFAGOS, CÉLULAS
NK E LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS EM PACIENTES ONCOLÓGICOS
SUBMETIDOS À IMUNOTERAPIA COM CÉLULAS DENDRÍTICAS**



**UBERABA – MG
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

BRUNA FRANÇA MATIAS

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR MACRÓFAGOS, CÉLULAS
NK E LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS EM PACIENTES ONCOLÓGICOS
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: Profa. Dra. Márcia Antoniazi
Michelin

Co-orientador: Prof. Dr. Eddie Fernando Candido
Murta

UBERABA – MG

2010

DEDICATÓRIAS

À minha mãe Cárita, que sempre acreditou nos meus sonhos, me dando forças para lutar por eles. Pela compreensão, paciência, carinho e apoio incondicional em todas as minhas decisões! Obrigada por me permitir ter chegado até aqui, sem você nada disso teria sido possível;

Ao meu noivo Eduardo, pela imensa contribuição em todos os momentos dessa trajetória, por compreender meu cansaço e minha falta de tempo. Acima de tudo, agradeço pelo amor, carinho, companheirismo e por tornar os meus dias mais felizes!

Ao meu pai Tadeu, por sempre acreditar que a educação é o melhor caminho, por confiar nas minhas escolhas e torcer pelas minhas vitórias;

À minha irmã Paula, que mesmo longe sempre esteve tão próxima, com quem sempre pude contar e me apoiar, minha verdadeira amiga e, também, por proporcionar-me o maior presente da minha vida, o meu sobrinho Rafael, a quem meu amor é indescritível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, sobretudo, a Deus pela vida e inspiração de todos os dias;

“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida no livro do tempo. Aquilo que colocamos nela, corre por nossa conta”.

Chico Xavier

À Dra. Márcia Antoniazi Michelin, minha orientadora, por sua participação e auxílio ao longo de toda a caminhada e agradeço, principalmente, pelos conhecimentos compartilhados, pela amizade, paciência e compreensão durante todos os momentos dessa caminhada. Este trabalho é também fruto da sua dedicação como grande pesquisadora;

Ao Dr. Eddie Fernando Candido Murta, meu coorientador, pela atenção, correções e apoio durante a realização deste trabalho. Sua postura ética e sua carreira profissional são de minha imensa admiração e respeito;

À grande amiga e parceira científica, Cláudia Mendonça, que durante esses três anos mostrou-se uma verdadeira companheira em todos os projetos compartilhados. Com você aprendi a ser mais forte e sua presença foi essencial nessa jornada. *“Os amigos são irmãos que Deus nos permite escolher”*;

A todos os amigos e colegas do Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON), que me ajudaram direta ou indiretamente na realização deste estudo, em especial aos amigos André, Ariana, Christianne, Douglas, Letícia, Nelson e Pâmela, pela amizade e companheirismo;

Aos pacientes, que voluntariamente participaram deste projeto, meus sinceros e especiais agradecimentos;

Ao apoio da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), agradeço aos recursos financeiros destinados à elaboração desta pesquisa;

Agradeço a todos que, de alguma forma participaram e colaboraram com este trabalho e àqueles que me ensinaram a prosseguir sempre.

"Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende".

Guimarães Rosa

RESUMO

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra as células neoplásicas e os principais tipos celulares envolvidos incluem células NK, macrófagos e células dendríticas (CDs). Após a indução da resposta imune inata, o microambiente é preparado para uma resposta mais sofisticada, a adquirida, sendo os linfócitos a população celular mais específica contra os antígenos tumorais. As células dendríticas funcionam como ponte entre a resposta imune inata e a adquirida, devido à sua alta capacidade de apresentação antigênica. No presente estudo foram avaliados oito pacientes com câncer avançado, submetidos à imunoterapia com células dendríticas autólogas amadurecidas *in vitro*, objetivando-se analisar a influência dessa abordagem terapêutica sobre populações celulares envolvidas na imunidade inata e adquirida. Para tanto, as CDs autólogas foram obtidas por meio da diferenciação de células mononucleares do sangue periférico, mantidas em cultura e, posteriormente, eletroporadas com o antígeno tumoral obtido do paciente por biópsia. A vacina foi administrada por via subcutânea com um intervalo médio de 15 dias. Amostras do sangue periférico foram colhidas para a análise das populações de células imunes, sendo que as análises celulares foram realizadas antes de iniciar a terapia e durante as vacinações. As marcações celulares foram realizadas por citometria de fluxo, utilizando-se os anticorpos intra e extracelulares seguintes: macrófagos (α -CD14 PE, α -IFN- γ FITC, α -TNF- α FITC e α -IL-12 FITC), células NK (α -CD56 PE, α -CD25 PE, α -IL-12 FITC e α -IL-2 FITC) e linfócitos T citotóxicos (α -CD8 PE, α -CD25 PE e α -IL-2 FITC). Os oito pacientes foram analisados de forma individual, através de gráficos lineares para os marcadores avaliados, submetendo-os a linhas de tendências. Para a análise estatística utilizou-se o teste de Kruskal-wallis, considerando-se a amostragem significativa quando $p \leq 0,05$. Diante dos resultados obtidos, verificou-se elevação da expressão celular dos macrófagos com o TNF- α ($p=0,0465$) e dos linfócitos T citotóxicos com a IL-2 ($p=0,0445$). Portanto, o aumento dessas populações celulares indica que a imunoterapia com CDs influencia positivamente as células alvo da imunidade inata e adquirida, em pacientes com câncer avançado. Contudo, após um longo período de estímulo imunoterapêutico essas populações adotaram uma tendência à diminuição, possivelmente, devido a um novo mecanismo de evasão tumoral.

Palavras-chave: imunoterapia, câncer, imunidade inata, imunidade adquirida, células dendríticas, células NK, macrófagos, linfócitos T.

ABSTRACT

Innate immunity is the first line of host defense against tumor cells and the main cell types involved include NK cells, macrophages and dendritic cells (DCs). After induction of innate immune response, the microenvironment is prepared to a more sophisticated one, the acquired response, and lymphocytes are the most specific cell population against tumor antigens. Dendritic cells act as a bridge between innate and acquired immune response, due to its high capacity for antigen presentation. In this study we evaluated eight patients with advanced cancer undergoing immunotherapy with autologous dendritic cells matured *in vitro*, aiming to analyze the influence of this therapeutic approach on cell populations involved in innate and acquired immunity. For this purpose, autologous DCs were obtained by differentiation of peripheral blood mononuclear cells maintained in culture and subsequently electroporated with tumor antigens obtained from biopsy. The vaccine was administered subcutaneously with an average interval of 15 days. Peripheral blood samples were collected for analysis of immune cells populations, and the analysis were performed before starting therapy and during vaccinations. The cells markings were made by flow cytometry, using intracellular and extracellular antibodies as follows: macrophages (α -CD14 PE, α -IFN- γ FITC, α -TNF- α FITC and α -IL-12 FITC), NK cells (α -CD56 PE, α -CD25 PE, α -IL-12 FITC and α -IL-2 FITC) and cytotoxic T lymphocytes (α -CD8 PE, α -CD25 PE and α -IL-2 FITC). The eight patients were analyzed individually, using line graphs for the markers evaluated, subjecting them to trendlines. For the statistical analysis we used Kruskal-wallis test, considering the sampling significant when $p \leq 0.05$. Based on these results, there was elevation of the cellular expression of macrophages with TNF- α ($p=0.0465$) and cytotoxic T lymphocytes with IL-2 ($p=0.0445$). Therefore, the increase of these cell populations indicates that immunotherapy with DCs influences the target cells of innate and acquired immunity in patients with advanced cancer. However, after a long period of immunotherapeutic stimulation, the populations adopt a tendency to decrease, possibly due to a novel mechanism of tumor evasion.

Keywords: immunotherapy, cancer, innate immunity, acquired immunity, dendritic cells, NK cells, macrophages, T lymphocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto de pele não melanoma, na população brasileira.....	15
---	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Mecanismos de evasão tumoral.....	20
Tabela 2: Descrição do grupo estudado.....	29
Tabela 3: Marcações intra e extracelulares.....	32
Tabela 4: Critérios utilizados para análise celular dos pacientes.....	33

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD14 com o IFN- γ , com o TNF- α e com a IL-12 no paciente 1.....	34
Gráfico 2: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD14 com o IFN- γ , com o TNF- α e com a IL-12 no paciente 2.....	35
Gráfico 3: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD14 com o IFN- γ , com o TNF- α e com a IL-12 no paciente 3.....	35
Gráfico 4: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD14 com o IFN- γ , com o TNF- α e com a IL-12 no paciente 4.....	36
Gráfico 5: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD14 com o IFN- γ , com o TNF- α e com a IL-12 no paciente 5.....	36
Gráfico 6: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD14 com o IFN- γ , com o TNF- α e com a IL-12 no paciente 6.....	37
Gráfico 7: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD14 com o IFN- γ , com o TNF- α e com a IL-12 no paciente 7.....	37
Gráfico 8: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD14 com o IFN- γ , com o TNF- α e com a IL-12 no paciente 8.....	38
Gráfico 9: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD56 com IL-2, com IL-12 e com CD25 no paciente 1.....	40
Gráfico 10: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD56 com IL-2, com IL-12 e com CD25 no paciente 2.....	40
Gráfico 11: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD56 com IL-2, com IL-12 e com CD25 no paciente 3.....	41
Gráfico 12: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD56 com IL-2, com IL-12 e com CD25 no paciente 4.....	41
Gráfico 13: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD56 com IL-2, com IL-12 e com CD25 no paciente 5.....	42
Gráfico 14: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD56 com IL-2, com IL-12 e com CD25 no paciente 6.....	42
Gráfico 15: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD56 com IL-2, com IL-12 e com CD25 no paciente 7.....	43
Gráfico 16: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD56 com IL-2, com IL-12 e com CD25 no paciente 8.....	43
Gráfico 17: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD8 com IL-2 e com CD25 no paciente 1.....	45

Gráfico 18: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD8 com IL-2 e com CD25 no paciente 2.....	46
Gráfico 19: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD8 com IL-2 e com CD25 no paciente 3.....	46
Gráfico 20: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD8 com IL-2 e com CD25 no paciente 4.....	47
Gráfico 21: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD8 com IL-2 e com CD25 no paciente 5.....	47
Gráfico 22: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD8 com IL-2 e com CD25 no paciente 6.....	48
Gráfico 23: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD8 com IL-2 e com CD25 no paciente 7.....	48
Gráfico 24: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD8 com IL-2 e com CD25 no paciente 8.....	49
Gráfico 25: Análise linear das medianas, máximos e mínimos do CD14 com IFN-γ do grupo estudado, submetido à estatística pelo teste de Kruskal-wallis.....	50
Gráfico 26: Análise linear das medianas, máximos e mínimos do CD14 com TNF-α do grupo estudado, submetido à estatística pelo teste de Kruskal-wallis.....	51
Gráfico 27: Análise linear das medianas, máximos e mínimos do CD14 com IL-12 do grupo estudado, submetido à estatística pelo teste de Kruskal-wallis.....	51
Gráfico 28: Análise linear das medianas, máximos e mínimos do CD56 com IL-2 do grupo estudado, submetido à estatística pelo teste de Kruskal-wallis.....	52
Gráfico 29: Análise linear das medianas, máximos e mínimos do CD56 com IL-12 do grupo estudado, submetido à estatística pelo teste de Kruskal-wallis.....	53
Gráfico 30: Análise linear das medianas, máximos e mínimos do CD56 com CD25 do grupo estudado, submetido à estatística pelo teste de Kruskal-wallis.....	53
Gráfico 31: Análise linear das medianas, máximos e mínimos do CD8 com IL-2 do grupo estudado, submetido à estatística pelo teste de Kruskal-wallis.....	54
Gráfico 32: Análise linear das medianas, máximos e mínimos do CD8 com CD25 do grupo estudado, submetido à estatística pelo teste de Kruskal-wallis.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC:	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
APC:	Célula apresentadora de antígeno
CD:	<i>Cluster of Differentiation</i> (Molécula de superfície)
CDs:	Células dendríticas
CEP:	Comitê de Ética em Pesquisa
CHP:	Complexo de histocompatibilidade principal
CNPq:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA:	Ácido desoxirribonucléico
EDTA:	Ácido etileno tetra-acético
EGF:	Fator de crescimento endotelial
ELISA:	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
FAPEMIG:	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FITC:	<i>Fluorescein Conjugate</i>
GM-CSF:	Fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrogênio
ICAM:	Molécula de adesão intercelular
iCD:	Célula dendrítica imatura
IFN:	Interferon
IgG:	Imunoglobulina G
IL:	Interleucina
INCA:	Instituto Nacional do Câncer
iNOS:	Óxido nítrico sintetase induzível
IPON:	Instituto de Pesquisa em Oncologia
LAMP3:	Proteína de membrana 3 associada ao lisossomo
LPS:	Lipopolissacarídeo
M-CSF:	Fator estimulador de colônia de macrófagos
MDP:	Muramil dipeptídeo
MMP:	Metaloproteinase
NK:	<i>Natural Killer</i> (célula matadora natural)
NO:	Óxido nítrico
PBS:	Solução salina tamponada com fosfato

pCD:	Célula dendrítica plasmocitóide
PE:	<i>Phycoerythrin</i>
PGE-2:	Prostaglandina E2
RNA:	Ácido ribonucléico
SIDA:	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TAA:	Antígenos associados ao tumor
TAM:	Macrófagos associados ao tumor
TCR:	Receptor da célula T
TGF- β :	Fator de crescimento transformador beta
Th:	<i>T helper</i>
TIL:	Linfócitos T infiltrantes do tumor
TNF:	Fator de necrose tumoral
Treg:	Célula T regulatória
UFMG:	Universidade Federal do Triângulo Mineiro
VEGF:	Fator de crescimento endotelial vascular
VLP:	<i>Virus like particles</i> (partículas semelhantes a vírus)
WHO:	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE GRÁFICOS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Transformação Celular Neoplásica.....	15
1.2 Resposta Imune aos Tumores.....	17
<i>1.2.1</i> <i>Resposta Imune Inata.....</i>	<i>18</i>
<i>1.2.2</i> <i>Resposta Imune Adquirida.....</i>	<i>18</i>
<i>1.2.3</i> <i>Vigilância Imunológica e Escape Tumoral.....</i>	<i>19</i>
1.3 O papel das Células Dendríticas no Câncer.....	21
1.4 Macrófagos.....	22
1.5 Células NK.....	24
1.6 Linfócitos T citotóxicos.....	24
1.7 Imunoterapia do Câncer.....	25
<i>1.7.1</i> <i>Vacina baseada em Células Dendrítica.....</i>	<i>26</i>
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivo Geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos.....	28
3 MATERIAIS E MÉDOTOS.....	29
3.1 Casuística.....	29

3.1.1	<i>Crêterios de Inclusão</i>	29
3.1.2	<i>Crêterios de Exclusão</i>	30
3.2	Prepara�o da Vacina de Células Dendríticas Autólogas	30
3.3	Análise Celular por Citometria de Fluxo	30
3.4	Análise dos Resultados	32
4	RESULTADOS	34
4.4.1	<i>Análise dos Macrófagos</i>	34
4.4.2	<i>Análise das Células NK</i>	39
4.4.3	<i>Análise dos Linfócitos T citotóxicos</i>	45
4.4.1	<i>Análise Estatística dos Macrófagos</i>	50
4.4.1	<i>Análise Estatística das Células NK</i>	52
4.4.1	<i>Análise Estatística dos Linfócitos T citotóxicos</i>	54
5	DISCUSSÃO	56
6	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXOS	77

1 INTRODUÇÃO

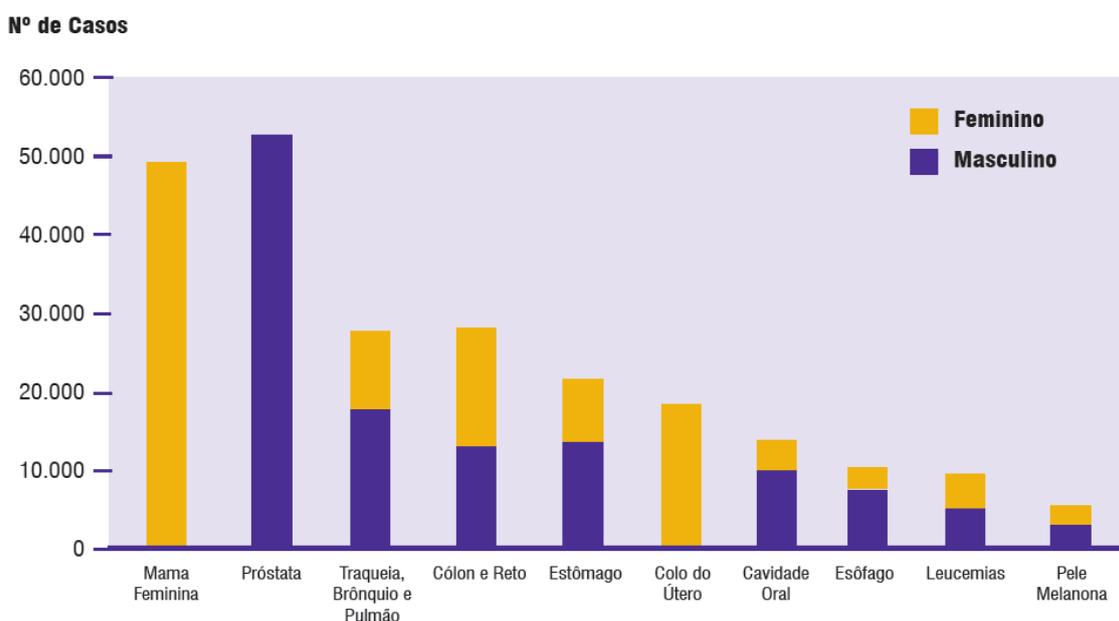
1.1 Transformação Celular Neoplásica

As neoplasias são consideradas doenças resultantes da quebra da integridade funcional do ciclo celular, como consequência de alterações moleculares ou por ação de estímulos diversos. Essa mutação pode ser adquirida pela ação de agentes ambientais, como agentes químicos, radiação, vírus, ou pode ser herdada geneticamente (LOEB e HARRIS, 2008).

As neoplasias malignas constituem importante causa de doença e morte mundialmente e, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO) em 2008, cerca de 12,7 milhões novos casos de câncer e 7,6 milhões de óbitos ocorreram no mundo todo.

Em relação à ocorrência de câncer no Brasil, estimativas para o ano de 2010, válidas também para o ano de 2011, indicam que ocorrerão 489.270 novos casos de câncer. Em 2010, estima-se que o câncer de pele do tipo não melanoma será o mais incidente na população brasileira (114 mil casos novos), seguido pelos cânceres de próstata (52 mil), mama (49 mil), cólon e reto (28 mil), pulmão (28 mil), estômago (21 mil) e colo do útero (18 mil) (Figura 1) (INCA, 2010).

Figura 1: Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto de pele não melanoma, na população brasileira.



Fonte: Instituto Nacional do Câncer – INCA, 2010.

Diante desse levantamento epidemiológico, os tipos de câncer mais incidentes no sexo masculino, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os de próstata e pulmão, e no sexo feminino os de mama e colo do útero, o que segue o mesmo perfil de amplitude observado na América Latina (INCA, 2010).

A carcinogênese é um processo em diversas etapas tanto em nível fenotípico quanto genotípico. Um tumor maligno apresenta diversas características fenotípicas, tais como: crescimento excessivo, invasividade local e capacidade de formar metástases à distância. Essas características são adquiridas de maneira gradativa, consistindo em um fenômeno chamado de progressão tumoral. No que se refere ao envolvimento molecular, a progressão resulta do acúmulo de lesões genéticas que em alguns casos são favorecidas por defeitos no reparo do DNA (ácido desoxirribonucléico) (LINDAHL, 1993; LOEB e HARRIS, 2008).

Os genes que modificam proteínas do ciclo celular e previnem eventos que levam a transformação maligna das células são denominados de genes supressores tumorais. O primeiro gene de supressão tumoral clonado, conhecido como gene Rb por ser descrito nos retinoblastomas, expressa a proteína pRb. É o principal regulador do ciclo celular, codifica a proteína nuclear que regula a expressão genética e sua disfunção leva a perda dos controles inibitórios do ciclo celular (JOHUNG et al., 2007). Contudo, atualmente, vários outros genes supressores são conhecidos, como por exemplo, os BRCA1 e 2 que estão envolvidos com câncer de mama, o gene APC com o câncer colorretal, o WT1 com o tumor de Wilms, o p16^{ink4} com o melanoma familiar, o NF1 e 2 com a neurofibromatose; dentre outros (HUSSAIN e HARRIS, 2000; SHIH, 2000).

Mais de 50% dos tumores malignos apresentam mutação pontual em um dos alelos do gene p53 e perda do outro (HOLLSTEIN et al., 1991; LAMB e CRAWFORD, 1986). Essas mutações podem ser devidas a fatores ambientais ou genéticos. O gene p53 parece ser o maior envolvido nas mutações genéticas do câncer humano, tendo como principal finalidade supervisionar se todos os genes estão íntegros (HUSSAIN e HARRIS, 2000; WEISZ et al., 2007).

As mutações no gene p53 têm sido extensivamente estudadas e descritas em diversas malignidades humanas. Em tais casos, o gene p53 pode perder suas funções e o ciclo celular não pode progredir para a fase G1/S, levando a instabilidade do genoma e acúmulo de mutações podendo resultar em transformações neoplásicas (HOLLSTEIN et al., 1991; KOYAMATSU et al., 2003).

1.2 Resposta Imune aos Tumores

O sistema imune tem um importante papel na prevenção do desenvolvimento tumoral, sendo capaz de identificar ameaças a homeostase orgânica, reagindo de forma a eliminar, neutralizar ou tolerar ações danosas.

A complexidade das interações entre as células tumorais e o sistema imune do hospedeiro envolve diversas linhagens celulares e mediadores, além disso, respostas imunológicas podem se comportar de maneiras diferentes em cada indivíduo. A resposta imune em alguns hospedeiros pode inibir o crescimento tumoral levando a remissões espontâneas ou pode promover inflamação crônica induzindo a progressão tumoral e angiogênese (DOUGAN e DRANOFF, 2009).

A associação entre as células do sistema imune e o câncer é conhecida há tempos, embora os mecanismos que envolvam tal interação ainda não estejam completamente elucidados. Inicialmente, acreditava-se que os infiltrados de leucócitos encontrados ao redor de neoplasias representavam uma tentativa do hospedeiro em erradicar as células neoplásicas. De fato, o extenso infiltrado de células matadoras naturais (NK - do inglês, *Natural Killer*) em cânceres gástricos ou colorretais está associado a um melhor prognóstico (COCA et al., 1997; ISHIGAMI et al., 2000). Entretanto, estudos populacionais revelam que pacientes que mantêm um estado inflamatório crônico apresentam maior risco de desenvolver câncer (KARIN e GRETEN, 2005).

Acredita-se que o processo de eliminação do tumor compreende tanto a imunidade inata quanto adquirida, formando um sistema integrado de defesas do hospedeiro contra tumores, no qual diversas células e moléculas funcionam mutuamente. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos e células tumorais e os principais tipos celulares envolvidos incluem células NK e macrófagos. A resposta imune adaptativa está envolvida na eliminação de microorganismos invasores e na defesa do hospedeiro em fases mais tardias do crescimento tumoral, sendo o linfócito T o tipo celular mais específico contra os antígenos tumorais e responsável pela memória imunológica (LEHRNBECHER et al., 2008; LOOSE e VAN DE WIELE, 2009).

1.2.1 Resposta Imune Inata

O controle tumoral é feito, sobretudo, por meio de citocinas (interferon – IFN, interleucina – IL e fator de necrose tumoral – TNF), macrófagos e células NK. Quando o sistema imune é estimulado pela primeira vez, há ativação e recrutamento de células inflamatórias e linfócitos através da liberação de citocinas e quimiocinas específicas (SHI et al., 2003).

O reconhecimento e a lise de células tumorais por células NK também são de extrema relevância na imunidade inata contra tumores. Células NK podem ser ativadas por citocinas, como a IL-2 e o IFN- γ , desencadeando um processo de destruição da célula-alvo através da liberação de granzima e perforina. Adicionalmente, a IL-12 produzida por macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos, possui participação importante na fase inicial da ativação de células NK estimulando-as a exercerem citotoxicidade e a produzirem mais IFN- γ que, por sua vez, aumenta o potencial tumoricida dos macrófagos (ENZLER et al., 2003; De VISSER et al., 2006).

Em seguida, são produzidos os IFNs tipo I que ativam as células apresentadoras de antígenos (APCs), especialmente as células dendríticas (CDs), consideradas “sentinelas” do hospedeiro e responsáveis pela iniciação da imunidade adquirida (KAPLAN, 1998). Algumas citocinas são prontamente produzidas em resposta a “sinais de alerta” e podem alterar substancialmente a função das CDs, por induzir a diferenciação, ativação, migração e maturação dessas células como, por exemplo, fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF), IFN- α , IL-4, IL-5, IL-12 e TNF (YOO et al., 2002; LANGENKAMP et al., 2000; SERAFINI et al., 2004).

1.2.2 Resposta Imune Adquirida

Após a indução da primeira linha de defesa do hospedeiro, o ambiente é organizado para uma resposta imune mais sofisticada, onde interações entre APCs maduras e citocinas levam a uma resposta imune mais eficiente e direcionada. As células da resposta imune adquirida, como os linfócitos B e linfócitos T, são diferenciadas dos leucócitos da imunidade inata pela expressão de receptores antigênicos, produzidos por rearranjos genéticos, que

permitem um repertório de ação mais vasto do que as células da imunidade inata (De VISSER et al., 2006).

O direcionamento à resposta imune adaptativa específica contra as células tumorais depende da apresentação de epítomos antigênicos por moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (CHP) classe I no sítio de inflamação, sendo o linfócito T citotóxico (também conhecido por linfócito T CD8+) o principal tipo celular responsável pela destruição e eliminação dessas células. Para que isso seja possível, as CDs podem reconhecer e apresentar o antígeno tumoral de forma cruzada para células T CD8+, e, ao mesmo tempo, ativar células T auxiliares (também denominadas por T CD4+) que são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias e irromper uma resposta imune antitumoral (GUERMONPREZ et al., 2003; HEATH et al., 2004). Esse processo, chamado de “*cross-priming*”, foi primeiramente proposto por Bevan no ano de 1975 (BEVAN, 1975). A apresentação cruzada é fundamental na ativação de células T CD8+, uma vez que células dendríticas possuem uma habilidade especial de transportar o antígeno tumoral dos compartimentos endossomais ao citosol para o acesso convencional do CHP de classe I (GUERMONPREZ et al., 2003; HOUDE et al., 2003; LIN et al., 2008).

Como os linfócitos B e T são derivados de um único precursor, a expansão clonal a partir do reconhecimento e interação com antígenos extrínsecos é fundamental. Durante a resposta primária, parte dos linfócitos se diferencia em células de memória de longa sobrevivência resultando em respostas sustentadas à exposição dos antígenos (SCHNURR et al., 2004; VAN DER BRUGGEN et al., 2002).

1.2.3 Vigilância Imunológica e Escape Tumoral

Em 1909 foi elaborado o conceito de vigilância imunológica pelo imunologista alemão Paul Ehrlich, mas só foi consolidado em 1957 por Burnet e Thomas (BARONZIO et al., 2009; BURNET, 1957; THOMAS, 1959). De acordo com a teoria da vigilância imunológica, o sistema imune é relevante no controle do crescimento tumoral, tendo em vista que células da imunidade reconhecem e destroem clones de células mutadas do hospedeiro, antes que elas se desenvolvam em tumores. Eventos que envolvem desde a mutação da primeira célula até os processos de metástase, angiogênese, invasão e evasão imune

dependem da interação entre as células tumorais, imunes, estromais e endoteliais (FERRANTINI et al., 2007; GABRILOVICH, 2004; KAH-WAI et al., 2006).

A maioria dos antígenos tumorais são imunógenos fracos e funções imunes como a resposta de célula T antígeno-específica e a regulação imune mediada por células T regulatórias (Treg) frequentemente falham e não funcionam de maneira adequada podendo levar ao crescimento tumoral (FERRANTINI et al., 2007).

Estudos conduzidos na última década identificaram vários mecanismos de escape associados ao crescimento tumoral que podem envolver tanto as células tumorais e os antígenos associados ao tumor como o sistema imune do hospedeiro (Tabela 1) (GABRILOVICH et al., 2004; ROTH et al., 2001; SOMBROEK et al., 2002).

Tabela 1: Mecanismos de evasão tumoral.

Células tumorais e antígenos associados ao tumor (TAAs)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Baixa imunogenicidade (maioria são antígenos próprios e poucos são neo-antígenos tumorais) ▪ Diminuição ou perda da expressão de moléculas do CHP classe I ▪ Baixa expressão de moléculas co-estimulatórias ▪ Diminuição de eventos apoptóticos (baixa expressão de Fas/FasL solúvel) ▪ Diminuição da regulação da expressão dos genes associados à apresentação antigênica ▪ Secreção de mediadores e citocinas imunossupressoras (TGF-β^*, IL-10, IL-6 e PGE-2[*]) ▪ Perda dos epítomos antigênicos durante o tratamento convencional ▪ Presença de barreiras físicas que impedem o acesso das células imunes efetoras
Sistema imune do hospedeiro	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Falência do sistema imune em não reconhecer os antígenos tumorais nas fases iniciais do crescimento tumoral ▪ Tolerância de células T aos antígenos específicos do tumor ▪ Supressão de células T ▪ Defeitos na apresentação antigênica pelas APCs

*Notas: TGF- β (fator de crescimento transformador beta); PGE-2 (prostaglandina E2).

Fontes: GABRILOVICH, 2004; ROTH, 2001; SOMBROEK, 2002.

Os tumores, sob certas condições, suprimem as funções das CDs para prevenir uma resposta imune, sendo capazes de reverter mecanismos de ataque e controle da progressão tumoral. A natureza exata das interações entre as células tumorais e as CDs ainda não está clara, e também não se sabe exatamente se células dos tecidos normais simplesmente se

comportam neutras em relação às CDs e falham em ativá-las pela falta de sinais de perigo, ou se elas produzem ativamente sinais inibitórios para prevenir a ativação de CDs (RABINOVICH et al., 2007).

Além dos tumores se desenvolverem por mecanismos relacionados à deficiência da vigilância imunológica, eles podem induzir tolerância como resultado de desequilíbrios no microambiente tumoral. Interações de estimulação mútua entre as CDs e células T citotóxicas podem iniciar uma resposta imunogênica ou tolerogênica (STEINMAN et al, 2003).

1.3 O papel das Células Dendríticas no Câncer

As células dendríticas fazem parte do sistema fagocítico mononuclear e funcionam como ponte entre a resposta imune inata e adquirida, devido à sua capacidade de apresentação antigênica. Em 1868, essas células foram identificadas, pela primeira vez, pelo patologista alemão Paul Langerhans, a partir do isolamento de células presentes na pele, nomeando-as de células de Langerhans. Mais de um século depois, em 1973, essas células foram descritas nos linfonodos e no timo, por Steinman e Cohn, e desde então se tornaram chave no entendimento do sistema imune (LANGERHANS, 1868; SHURIN e SALTER, 2009; STEINMAN e COHN, 1973).

As CDs originam-se de células pluripotentes CD34+ presentes na medula óssea, na qual possuem duas vias de diferenciação. A via mielóide gera três classes de CDs mielóides, que compreende as células de Langerhans, encontradas no epitélio estratificado como a pele e a mucosa, as CDs intersticiais que são encontradas nos interstícios dos tecidos e, por último, as CDs dermais, uma população de células localizada na derme. A via linfóide gera células dendríticas plasmocitóides que se apresentam em uma proporção substancialmente menor quando comparado as CDs mielóides (conhecidas também como CDs convencionais), e estão presentes nos órgãos linfóides como o timo, medula óssea, baço, tonsilas e linfonodos (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998; FONG e ENGLEMAN, 2000; TOEBACK et al., 2009).

Em estudos clínicos, a classificação através da expressão de moléculas de superfície tem sido extensivamente utilizada, na qual CDs são agrupadas em: mielóides e plasmocitóides, sendo diferenciadas pelo marcador mielóide CD11c (CD - do inglês, *Cluster of Differentiation*). As células dendríticas mielóides possuem marcação

CD14-/CD11c+/CD123-, enquanto as plasmocitóides são CD14-CD11c-/CD123+ (BALLESTRERO et al, 2008; PULENDRAN et al., 1999; SHORTMAN e LIU, 2002).

Originalmente, as CDs deixam a medula óssea ainda numa forma imatura, denominadas CDs imaturas (iCD), que se caracterizam pela grande capacidade de capturar e processar antígenos, todavia, possuem pequena habilidade em estimular linfócitos T. Células dendríticas imaturas apresentam pouca ou nenhuma expressão de moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80 e CD86 além de não produzirem IL-12 suficiente para a proliferação de linfócitos T (KELLEHER e KNIGHT, 1998; SCHWARTZ, 1990).

Formas imaturas de CDs têm propriedades tolerogênicas e estão localizadas na maioria dos tecidos periféricos. Diferentes modelos têm sido propostos para explicar os mecanismos pelos quais as CDs são capazes de induzir e manter tolerância imunológica, sendo eles: CD imaturas agem como APCs tolerogênicas, conversão de células T virgens em células T regulatórias, liberação de citocinas imunossupressoras (IL-10), inibição da maturação da iCD por células T reguladoras, CDs tolerogênicas mutadas geneticamente (MORELLI et al., 2001; STEINMAN et al., 2003).

Após a captura antigênica nos locais de inflamação, as CDs passam por mudanças fenotípicas e funcionais, resultando em um estágio maduro. Estudos indicam que o processo de maturação das CDs está fortemente associado à sua migração dos tecidos periféricos para os órgãos linfóides de drenagem, sendo justificado por uma série de eventos simultâneos, tais como: a perda dos receptores endocíticos e/ou fagocíticos, o aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias como CD40, CD58, CD80 e CD86, e mudanças na sua morfologia, como o aumento da expressão de LAMP3 (proteína de membrana 3 associada ao lisossomo) nos compartimentos lisossomais, além da expressão aumentada de CHP classe I e II na superfície, que são eventos necessários para a apresentação eficiente de peptídeos e estimulação de células T (CELLA et al., 1997; JEFFORD et al., 2001).

1.4 Macrófagos

Os macrófagos pertencem ao sistema fagocítico mononuclear e fazem parte, principalmente, da primeira linha de defesa contra patógenos, podendo ser identificados pela presença do marcador de superfície CD14 (WRIGHT et al., 1990). Atuam basicamente nos processos inflamatórios e no controle de células tumorais. São células com extensa

participação em eventos regulatórios, dentre eles a promoção ou inibição da inflamação, atuação no reparo e renovação dos tecidos, ação tumoricida e microbicida, além de participarem na interação da resposta imune inata com a adquirida (KLIMP et al., 2002).

Infiltrados de macrófagos são frequentemente observados nos tecidos neoplásicos, podendo destruir células tumorais através da produção dos intermediários reativos do oxigênio (ROIs) e do TNF- α , quando ativados por diversos fatores, como os lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, muramil peptídeo (MDP), ácido ribonucléico (RNA) de filamento duplo e citocinas; dentre as quais se destacam o IFN- γ , o GM-CSF, e o fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) (KLIMP et al., 2002). Além disso, macrófagos são fagócitos profissionais e responsáveis também pela fagocitose de células tumorais opsonizadas por anticorpos (SHI et al., 2003).

Nas últimas décadas, o papel dos macrófagos no crescimento tumoral tem sido extensivamente estudado, embora os mecanismos que envolvem essas células na resposta imune contra os tumores permaneçam intrigantes e contraditórios. No microambiente tumoral, os macrófagos podem secretar certas substâncias que são capazes de estimular o crescimento neoplásico, dependendo do estágio e da natureza do tumor (KLIMP et al., 2002). Após a migração dessas células mononucleares para os sítios neoplásicos, ocorrem mudanças nas suas propriedades tanto fenotípicas quanto genotípicas (SHURIN e SALTER, 2009).

Em estudo conduzido por Chen e colaboradores (2005), revelou-se que mais de 50 genes foram diferentemente expressos em macrófagos associados aos tumores (TAMs), quando comparados aos controles, incluindo IL-6, IL-8 e MMP-9 (metaloproteinase - 9). Além disso, em determinadas condições, os TAMs podem produzir menores quantidades de óxido nítrico (NO) que os macrófagos presentes em tecidos normais, prejudicando sua atividade tumoricida (BASKIC et al., 2001).

No microambiente tumoral, os TAMs podem liberar uma variedade de agentes tóxicos como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), proteases, substâncias imunossupressoras, além de diversos fatores de crescimento e citocinas (fator de crescimento endotelial - EGF, fator de crescimento endotelial vascular - VEGF, M-CSF, IL-1, IL-8) e, conseqüentemente, podem levar ao aumento da atividade mitótica e criação de uma rede imunossupressora que promove o crescimento tumoral, invasão e neoangiogênese (MANTOVANI et al., 1992; SHURIN e SALTER, 2009).

1.5 Células NK

As células NK foram descritas pela primeira vez em 1975, quando foi demonstrado que determinadas células possuíam atividade citotóxica contra ampla gama de células tumorais de forma espontânea, ou seja, sem necessidade de pré-condicionamento (JOSEPH e LEWIS, 2009; KIESSLING et al., 1975). Células NK podem ser identificadas pela presença dos marcadores de superfície CD56 e CD16 e, também, pela ausência do CD3, encontrado em todos os linfócitos T (COOPER et al., 2001).

A origem das células NK ainda permanece desconhecida, contudo muitos estudos indicam que essas células são derivadas de precursores da medula óssea e não dependem do timo para seu desenvolvimento (CALIGIURI, 2008; YOON et al., 2007).

Quando células NK são ativadas, elas exercem um papel central na imunovigilância contra neoplasias, levando à destruição da célula maligna e à liberação de antígenos tumorais que, por sua vez, podem iniciar uma resposta imune adaptativa específica (ZAMAI et al., 1998).

Dentre os linfócitos, as células NK são as primeiras a responder à ativação por IL-2, produzindo vasta gama de citocinas como IFN- γ , TNF- α , TNF- β , GM-CSF, IL-12 e IL-15. Células NK ainda possuem atividade citolítica para determinados alvos tumorais, mas não para todos; experimentos demonstram que células ativadas por IL-2, IL-12 e IL-18 possuem uma letalidade mais ampla (BIRON et al., 1999; FEHNIGER et al., 2003; LEHRNBECHER et al., 2008).

1.6 Linfócitos T citotóxicos

Os linfócitos T são originados de precursores hematopoiéticos da medula óssea, sendo que parte de sua maturação ocorre no timo. Os linfócitos T citotóxicos possuem um marcador de membrana específico, o CD8 e, devido a isso, podem ser conhecidos por células T CD8+. Outro marcador de membrana, presente em todos os linfócitos T, é o CD3, componente essencial do receptor de membrana presente nessas células, o receptor de célula T (TCR). A molécula CD8 é uma glicoproteína de membrana dimérica de 30 kDA, que pode ser constituída essencialmente por dois tipos de cadeias: α e β . Outra molécula de superfície de

grande importância para ativação dos linfócitos T CD8+ é o CD25, cadeia α do receptor da IL-2, que pode estar presente em linfócitos e células NK e possui papel determinante na diferenciação e proliferação de células T CD8+, além de permitir a identificação dos linfócitos T reguladores (Tregs) (AROSA e CARDOSO, 2007; YU e FU, 2006).

O principal mecanismo de eliminação das células tumorais depende da ação de linfócitos T citotóxicos que reconhecem antígenos apresentados pelo CHP classe I. A ativação dessas células citotóxicas condiciona a sua diferenciação em células com funções imunomoduladoras, indutoras ou supressoras da resposta imune (LIN et al., 2008).

Os linfócitos T infiltrantes do tumor (TILs) têm sido reconhecidos em inúmeros tumores e são alvos de pesquisas e debates. Estudos realizados em pacientes com melanoma, câncer de ovário e cólon, evidenciaram que a presença dos TILs são muito frequentes e geram achados clínicos favoráveis (LIAKOU et al., 2007). Já em estudo conduzido por Usubütün e colaboradores (1998), com câncer de células renais, a presença de linfócitos ou macrófagos intratumorais não teve valor prognóstico.

Além dos efeitos citotóxicos diretos, os TILs podem alterar o microambiente tumoral pela secreção de citocinas como TNF- α , IL-4 e IL-10, favorecendo a proliferação e neoangiogênese tumoral (BLANKENSTEIN, 2005). Em estudo conduzido por Maluf e colaboradores (2008), observou-se elevada presença dos TILs CD3+ em amostras de NIC III relacionados com recorrência da lesão após o tratamento definitivo com conização. Foi concluído que a presença expressiva de CD3+ em lesões recorrentes pode ser fator para pior prognóstico da doença.

Monnier-Benoit e colaboradores (2006) avaliaram a progressão tumoral de pacientes com NIC I, NIC III e câncer invasivo e observaram que, nos pacientes que evoluíram para tumores invasivos, havia predomínio de linfócitos T CD8+ em relação aos T CD4+. Os autores sugeriram que a presença de células T CD4+ em fases iniciais asseguraria a presença precoce de células efetoras T CD8+, favorecendo a eliminação das células tumorais.

1.7 Imunoterapia do Câncer

A aplicação clínica de agentes imunoterápicos tem sido alvo de investigação no tratamento de neoplasias, devido à percepção de que muitos antígenos tumorais são sensíveis

à ação de células imunes potencialmente funcionais. Nas últimas décadas, através de experimentos animais e, mais recentemente em humanos, notou-se a relevância do sistema imune em reconhecer, processar e apresentar os antígenos tumorais desencadeando respostas antitumorais, embora o câncer seja capaz de impedir respostas eficientemente adequadas.

Com o avanço na investigação de alternativas terapêuticas contra o câncer, foi possível produzir vacinas baseadas em DNA, células dendríticas, células tumorais modificadas, proteínas recombinantes, peptídeos sintéticos, além de vetores virais, bacterianos e vírus semelhantes a partículas (VLPs - do inglês, *Virus-like particles*) quiméricos (FELTKAMP et al., 1993; PENG et al., 2004; TILLMAN et al., 2000).

Vacinas de células dendríticas podem ser a melhor maneira para indução de respostas em células T citotóxicas, pois antígenos codificados são sintetizados no citoplasma e entram na via de apresentação antigênica do CHP classe I, explorando as enormes capacidades dessas células para a estimulação do sistema imune (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998; TILLMAN et al., 2000).

1.7.1 Vacina baseada em Células Dendríticas

Através do potencial imunogênico que as CDs proporcionam, alguns estudos têm sido desenvolvidos a fim de elaborar uma vacina a partir dessas células amadurecidas *in vitro*, pulsadas com antígenos tumorais para pacientes com neoplasias.

Através dessa nova intervenção terapêutica, o sistema imune é estimulado a uma resposta específica, além de discriminar com muita exatidão seus alvos, tornando os mecanismos de ataque altamente precisos para os tecidos neoplásicos. Outra vantagem é que a vacina contra o câncer pode provocar menos efeitos colaterais, pois não leva à imunossupressão, como os quimioterápicos ou radioterápicos (HUNG et al., 2007).

O isolamento das DCs *in vitro*, embora possível, é trabalhoso e pouco eficiente. Contudo, foi descrita a possibilidade de induzir, em cultura, a diferenciação de outros tipos celulares em células dendríticas. Dentre esses tipos precursores está o monócito, uma célula facilmente obtida do sangue periférico e que dá origem a células morfológica e funcionalmente equivalentes às dendríticas (COOLS et al., 2007).

Ao longo dos anos, o câncer foi, principalmente, tratado por intervenções cirúrgicas, quimioterapia e radioterapia, com fortes impactos citotóxicos tanto para as células tumorais como para células normais, podendo acarretar efeitos adversos severos e, além disso, muitas vezes não impedir a progressão da doença e o surgimento de metástases (BAXEVANIS et al., 2009).

Contudo, o desenvolvimento de vacinas enfrenta grandes obstáculos. Qualquer câncer, ao se desenvolver pode ser submetido a mecanismos de seleção imunológica, que culminam no estabelecimento de um equilíbrio entre a doença e o sistema imune. O rompimento desse equilíbrio, imprescindível para o estabelecimento de uma resposta contra o tumor no paciente, torna-se objetivo difícil de ser alcançado, pois a compreensão dos mecanismos que circundam o sistema imune e o câncer ainda estão longe de serem totalmente elucidados.

O número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo, configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial. Diante desse cenário, justifica-se a necessidade do desenvolvimento de ações abrangentes para o controle do câncer, especialmente no que tange ao tratamento da doença já instalada. Tendo em vista que o sistema imune é potencialmente capaz de controlar e orquestrar uma resposta antitumoral através do reconhecimento das células mutadas por células dendríticas, a disponibilização de um ambiente favorável para a elaboração de uma vacina terapêutica *in vitro* é a proposta maior deste estudo a fim de aumentar a perspectiva de vida de pacientes com câncer, inclusive nos estágios mais avançados. Para tanto, a relevância dessa pesquisa fundamenta-se em compreender a interação entre células do sistema imune inato e adaptativo durante a imunoterapia com células dendríticas para pacientes oncológicos, para que possamos aumentar a expectativa de vida dos pacientes, com o objetivo de prevenir a progressão neoplásica e estimular a sua regressão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta imune sistêmica em pacientes com câncer avançado, submetidos à imunoterapia com células dendríticas.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar por citometria de fluxo a resposta imune inata e adquirida, através da avaliação dos macrófagos, células NK e linfócitos T citotóxicos, em pacientes oncológicos antes e durante a imunoterapia com células dendríticas.
- Avaliar o comportamento e ativação dessas células por meio de marcações extracelulares (CD14, CD56, CD8 e CD25) e marcações de citocinas intracelulares (IL-2, IFN- γ e IL-12).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

O projeto destinado à imunoterapia com células dendríticas em pacientes foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFTM, sob o nº 683-2006/CEP (ANEXO A). Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre após esclarecimento (ANEXO B). Essa linha de pesquisa encontra-se financiada pela FAPEMIG e CNPq. Neste projeto, realizamos a avaliação imunológica em humanos antes e durante toda a terapia.

Foram estudados oito pacientes (Tabela 2), previamente selecionados no Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), no período de junho de 2008 a julho de 2010.

Tabela 2: Descrição do grupo estudado.

Pacientes	Idade (anos)	Sexo*	Tipo de Tumor	Estadio (TNM)*	Período de Tratamento
1	76	f	Câncer de vagina	IIIB (T3N1M0)	07/07/08 - jul/10
2	77	f	Melanoma de vagina	IIC (T4NxMx)	04/05/09 - jul/10
3	48	f	Câncer de vagina	0 (tumor <i>in situ</i>)	22/05/09 - jul/10
4	17	m	Neurofibromatose	benigno	23/02/10 - jul/10
5	66	f	Câncer de mama	IV (T4dN2M1)	27/08/09 - 18/11/09
6	39	f	Câncer de colo uterino	IVB (T2bN0M1)	27/06/08 - 26/08/08
7	80	f	Câncer de mama	IIIC (T4dN3Mx)	25/06/08 - 22/10/08
8	27	f	Câncer de mama	IV (T2N1M1)	17/08/09 - 08/09/09

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

3.1.1 Critérios de Inclusão

- Pacientes com tumores sólidos passíveis de biópsia.
- Pacientes em qualquer idade ou sexo.

3.1.2 Critérios de Exclusão

- Pacientes com doenças imunossupressoras, à exceção do câncer, como SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e doenças auto-imunes severas.
- Pacientes que fazem qualquer outra terapia adicional seja ela a quimioterapia, radioterapia, ou até o uso de drogas antitumorais.
- Pacientes com menos de dois meses de término por quimioterapia ou radioterapia.

3.2 Preparação da Vacina de Células Dendríticas Autólogas

Para a obtenção da vacina de células dendríticas autólogas dos pacientes, foi coletado 20 mL de sangue periférico em heparina e as células foram separadas em gradiente de FICOLL para obtenção de células mononucleares.

Após a separação, as mesmas foram mantidas em cultura *in vitro*, à 37⁰C e 5% CO₂, durante sete dias em meio RPMI enriquecido com GM-CSF e IL-4 para diferenciação em células dendríticas.

Para a obtenção dos antígenos, foi realizado o procedimento de lisado das células tumorais, através do congelamento da biópsia em nitrogênio líquido seguido por descongelamento, lisando assim, as células tumorais e, por conseguinte, liberando os antígenos. As células diferenciadas foram colocadas em contato com os antígenos tumorais, obtidos de cada paciente e submetidas à eletroporação.

A infusão das células dendríticas amadurecidas *in vitro* com os antígenos tumorais foi realizada por via subcutânea.

3.3 Análise Celular por Citometria de Fluxo

As células totais do sangue periférico foram coletadas uma vez antes de iniciar a terapia com células dendríticas (análise pré-terápica) e uma vez a cada injeção da vacina imunoterápica, para que fosse possível acompanhar a evolução da terapia em cada paciente. A

cada análise, foram coletados dois tubos de sangue total com anticoagulante EDTA (ácido etileno tetra-acético), equivalente a aproximadamente 10 mL, por paciente.

Para a obtenção dos leucócitos, o sangue colhido foi transferido para tubos cônicos de 50 mL, adicionando-se uma solução de lise (BD Biosciences - FACS™ *Lysing Solution*) na proporção 1:20 mL. Após incubação à temperatura ambiente por 20 minutos, o material foi centrifugado por 10 minutos, à temperatura de 4°C, em uma rotação de 1200g. Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante cuidadosamente, conservando o precipitado de células. O excesso da solução de lise foi removido por centrifugação lavando-se as células por 3 vezes com 30ml de PBS (solução salina tamponada com fosfato) em cada lavagem, a 4°C e a velocidade de 1200g por 10 minutos. Adicionou-se 1 mL de PBS no precipitado de células, acrescentando 2 uL da proteína transportadora inibitória (BD Golgistop™) para cada 3 mL de sangue inicialmente colhidos em EDTA. Incubou-se por, no mínimo, 20 minutos a 4°C e, posteriormente, as células foram lavadas por centrifugação com 30 mL PBS para retirar o excesso de proteína.

Após a centrifugação, foi retirado o sobrenadante preservando-se apenas o precipitado e então, as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS. Em seguida, a quantidade de células obtidas foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

A suspensão de células foi transferida para tubos de ensaio sendo, primeiramente, realizada a marcação extracelular. Dois tubos foram destinados aos isotipos controles, três para a marcação de macrófagos, três para células NK e dois para linfócitos T citotóxicos (Tabela 3).

Os anticorpos utilizados para a marcação de membrana (extracelular) dos isotipos controles foram: α -IgG1 PE BD (PE - *Phycoerythrin*), α -IgG2a PE BD e α -IgG1 FITC BD (FITC - *Fluorescein Conjugate*). Para a marcação de membrana dos macrófagos utilizou-se o anticorpo α -CD14 PE BD, para as células NK o anticorpo α -CD56 PE BD e para os linfócitos T citotóxicos o α -CD8 PE BD. Além desses, foi também utilizado o anticorpo α -CD25 FITC BD para a marcação de membrana das células NK e linfócitos T citotóxicos. Após a primeira marcação, as células eram incubadas a 4°C por 30 minutos, no escuro. Em seguida, foi feita a lavagem das células com PBS para a remoção do excesso de anticorpos. Posteriormente, as células foram incubadas com solução de permeabilização e fixação (BD Cytotfix/Cytoperm™), a 4°C por 20 minutos, no escuro; para que fosse possível a marcação intracelular.

Para essa marcação, os anticorpos utilizados para os isotipos controles foram o α -IgG1 FITC BD e α -IgG1 PE BD. Para os macrófagos utilizaram-se os anticorpos α -IFN- γ FITC BD, α -TNF- α FITC BD e α -IL-12/23 FITC BD; para células NK o α -IL-2 FITC BD e α -IL-12/23 FITC BD; e para linfócitos T citotóxicos o anticorpo α -IL-2 FITC BD.

Após a marcação intracelular, as células eram novamente incubadas a 4°C por 30 minutos, no escuro; e lavadas em solução tampão (BD Perm/Wash™ Buffer) para a remoção do excesso de marcadores. Finalmente, as células eram ressuspensas em 500 uL de PBS para a leitura no citômetro BD FACSCalibur™ (ANEXO C).

Tabela 3: Marcações intra e extracelulares.

Tubos	Descrição	Marcação Extracelular	Marcação Intracelular	Isotipo Controle
1	Isotipo 1	α -IgG1 PE	α -IgG1 FITC	-
2	Isotipo 2	α -IgG2a PE	α -IgG1 FITC	-
3	Linfócito T CD8	α -CD8 PE + α -CD25 FITC	-	ISO1
4		α -CD8 PE	α -IL-2 FITC	ISO1
5	Macrófago	α -CD14PE	α -IFN- γ FITC	ISO2
6		α -CD14 PE	α -TNF- α FITC	ISO2
7		α -CD14 PE	α -IL-12/23 FITC	ISO2
8	Célula NK	α -CD56 PE	α -IL-2 FITC	ISO1
9		α -CD56 PE	α -IL-12/23 FITC	ISO1
10		α -CD56 PE+ α -CD25 FITC	-	ISO1

3.4 Análise dos Resultados

Os pacientes foram analisados por duas formas diferentes: de maneira individual e agrupada, sendo essa, utilizada para o emprego da estatística.

Para a análise individual, os pacientes foram avaliados por gráficos lineares para cada marcador utilizado, submetendo-os a linhas de tendências.

Para a análise estatística, os oito pacientes foram agrupados e o comportamento das células do sistema imune, de uma maneira geral, foi analisado antes e durante a imunoterapia com CDs. Como a distribuição dos dados não era pareada e havia perda de seguimento, uma análise de natureza não paramétrica foi empregada utilizando-se o software GraphPad Prism 5.03. Os dados foram analisados pelo teste estatístico de Kruskal-wallis. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

Os pacientes foram analisados antes de iniciar a imunoterapia com CDs, denominado como análise da pré-terapia. As análises seguintes foram realizadas no dia de cada aplicação da vacina, sendo que o sangue foi colhido antes da vacinação, e cada análise celular era destinada a terapia que se precedia, nomeadas por análises pós-terapia 1, 2, 3, e assim por diante, ou apenas por algarismos, como demonstrado nos gráficos a seguir. Os pacientes que permaneceram no grupo de estudo por um período de tempo mais prolongado, a análise celular do sistema imune se manteve a cada duas aplicações subsequentes, de acordo com a descrição da tabela 4.

Tabela 4: Critérios utilizados para análise celular dos pacientes.

Pacientes	1	2	3	4	5	6	7	8
Nº de vacinas	33	28	26	11	4	3	3	2
Nº de análises celulares	26	21	19	12	5	4	4	3
Início da análise celular a cada duas vacinas	A partir da 17ª vacina	A partir da 12ª vacina	A partir da 10ª vacina	-	-	-	-	-

Os valores em todos os gráficos seguintes são expressos de acordo com a porcentagem de fluorescência da dupla marcação avaliada (eixo y) pelo seguimento das análises celulares (eixo x), sendo que as escalas podem variar, porque a expressão das células do sistema imune é relativamente instável.

No intuito de facilitar a compreensão do comportamento dessas células, linhas tendenciais (polinômios) foram traçadas e, principalmente através dessas tendências é que as análises seguintes serão descritas.

4 RESULTADOS

4.4.1 – Análise dos Macrófagos

Os gráficos foram representados para cada paciente de acordo com os marcadores avaliados para os macrófagos, incluindo o marcador de membrana CD14 para este tipo celular e os marcadores intracelulares para análise das citocinas secretadas por essas células como o IFN- γ , o TNF- α e a IL-12.

Gráfico 1: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD14 com o IFN- γ , com o TNF- α e com a IL-12 no paciente 1.

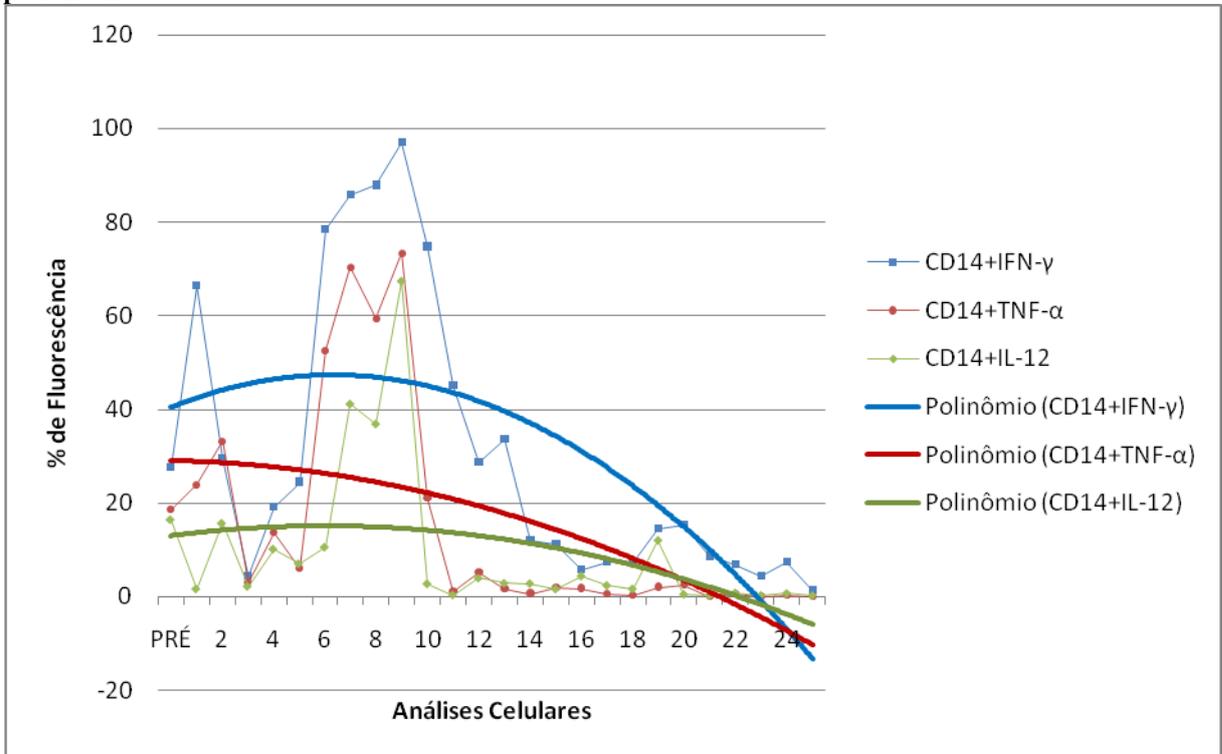


Gráfico 2: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD14 com o IFN- γ , com o TNF- α e com a IL-12 no paciente 2.

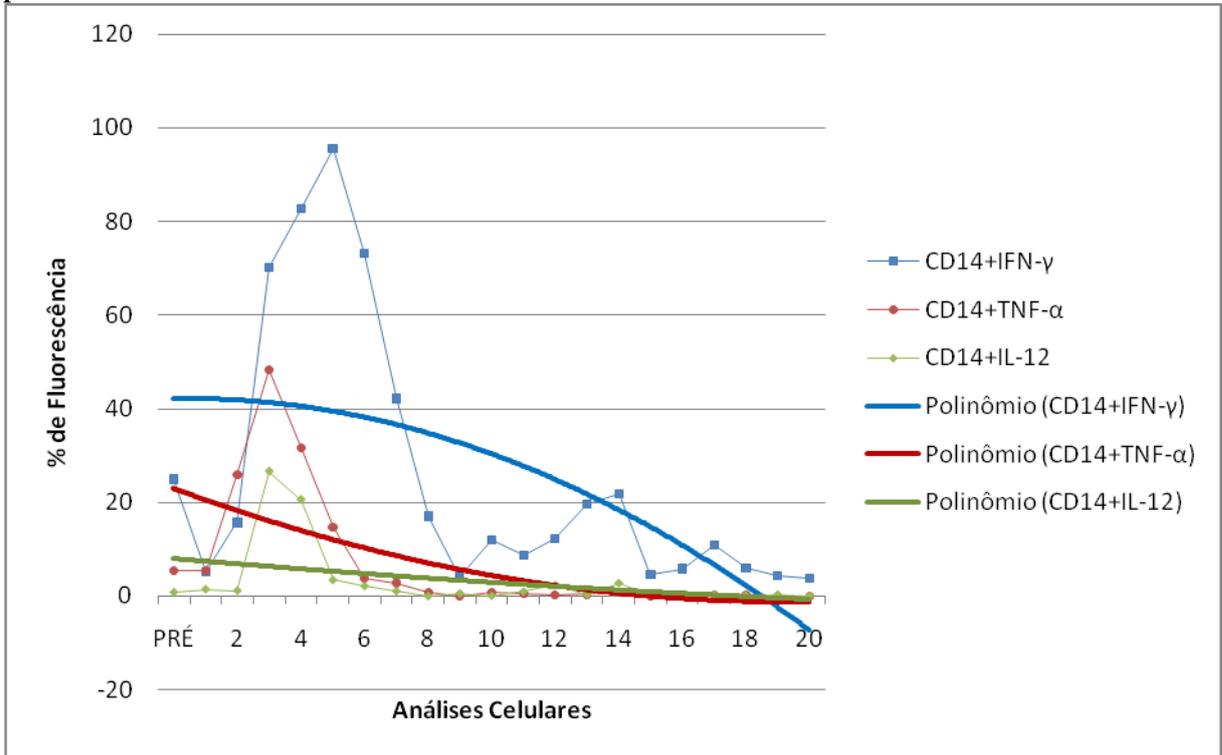


Gráfico 3: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD14 com o IFN- γ , com o TNF- α e com a IL-12 no paciente 3.

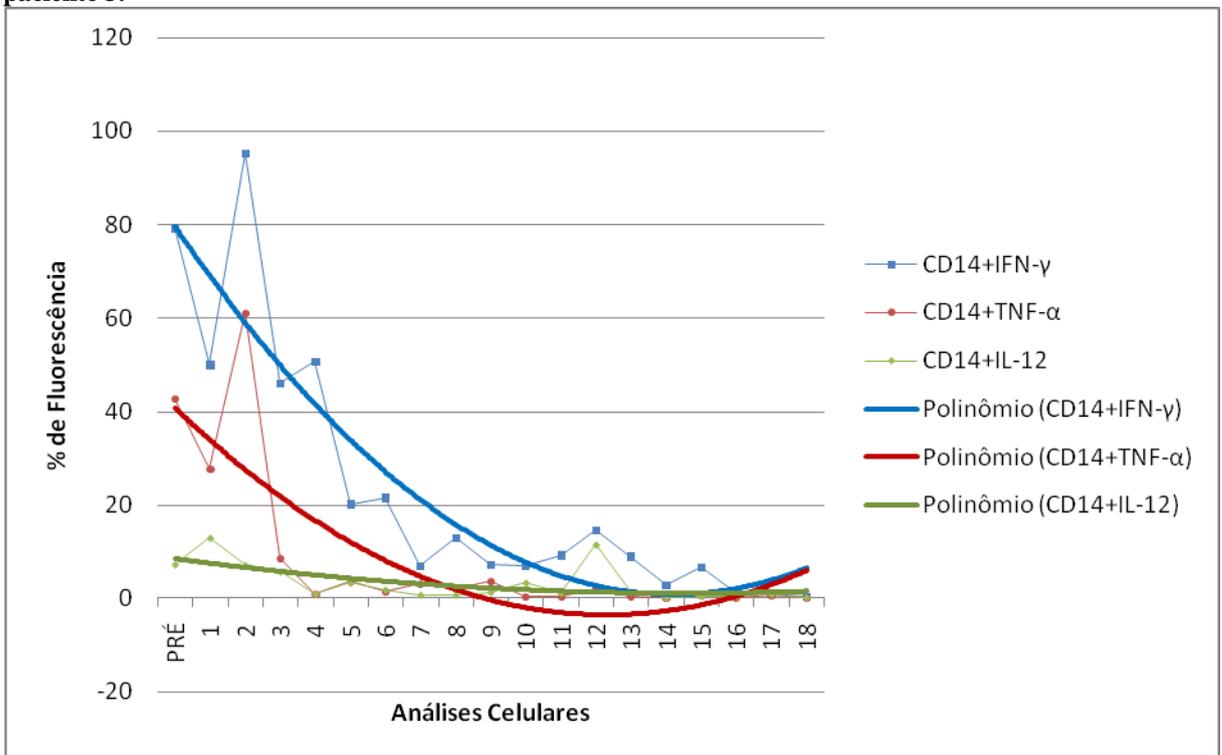


Gráfico 4: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD14 com o IFN- γ , com o TNF- α e com a IL-12 no paciente 4.

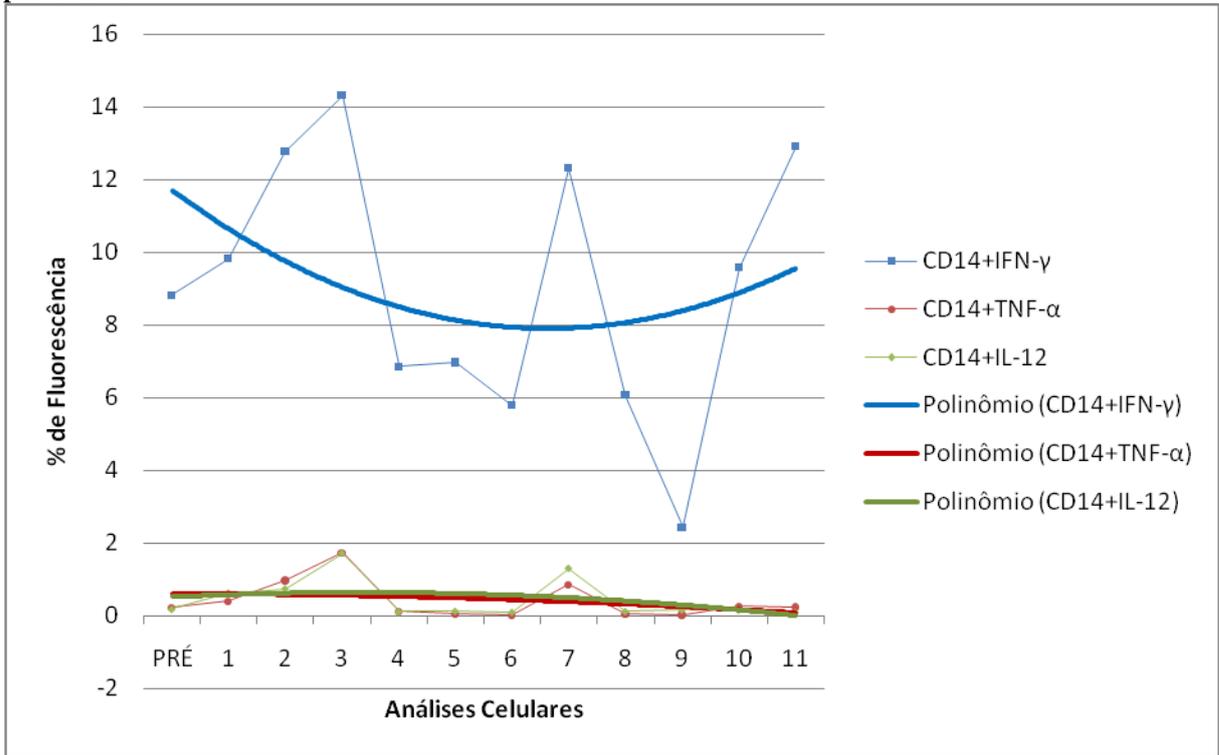


Gráfico 5: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD14 com o IFN- γ , com o TNF- α e com a IL-12 no paciente 5.

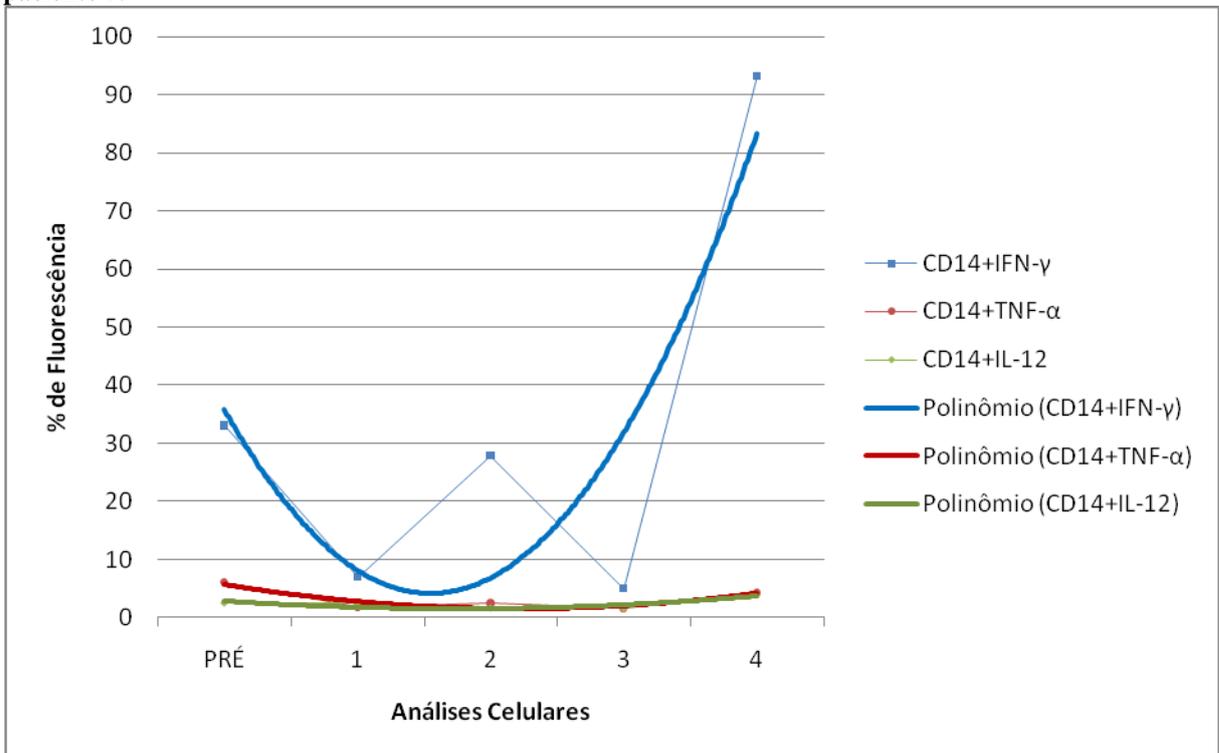


Gráfico 6: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD14 com o IFN- γ , com o TNF- α e com a IL-12 no paciente 6.

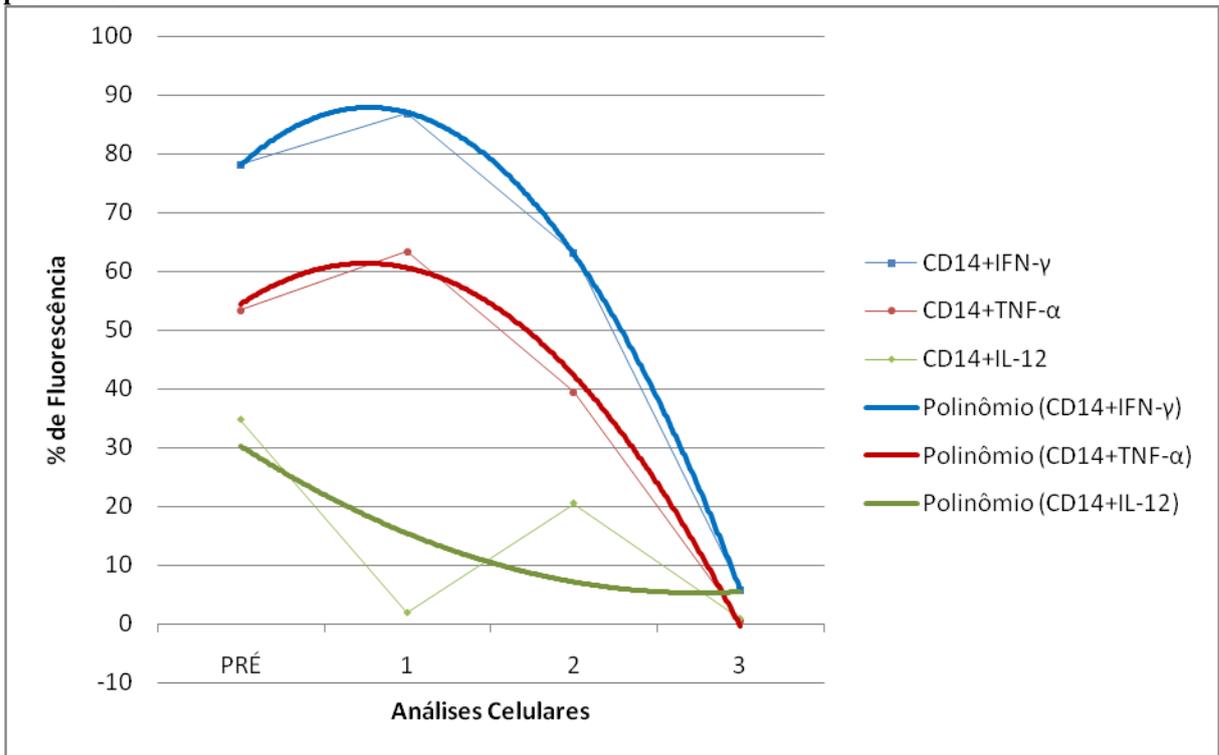


Gráfico 7: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD14 com o IFN- γ , com o TNF- α e com a IL-12 no paciente 7.

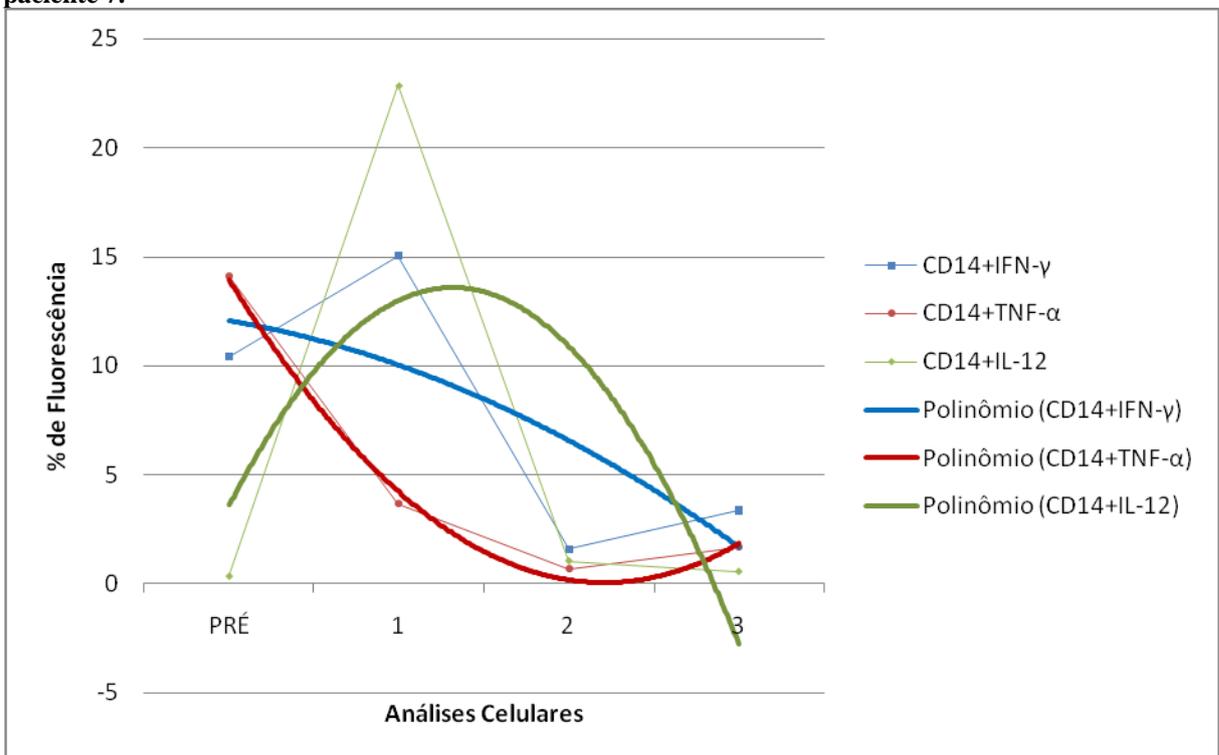
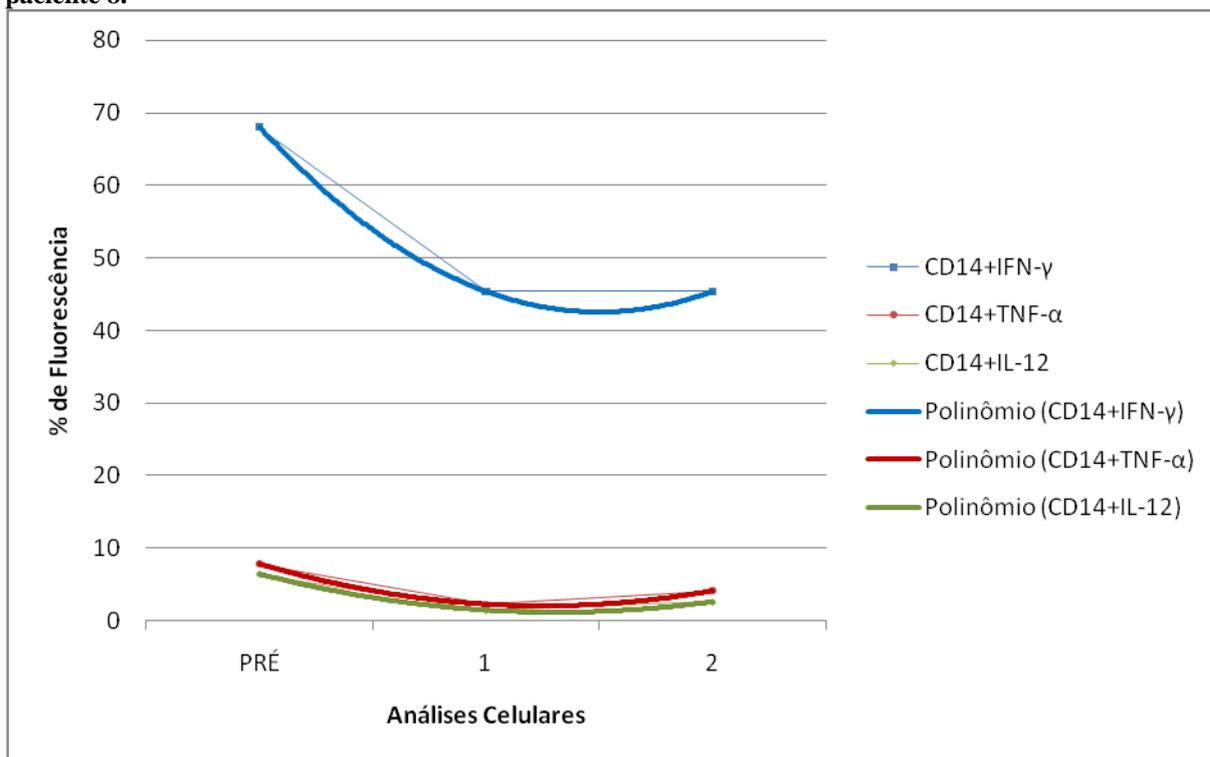


Gráfico 8: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD14 com o IFN- γ , com o TNF- α e com a IL-12 no paciente 8.



Os níveis de expressão dos marcadores CD14 com IFN- γ , representado em azul nos gráficos, nos pacientes 1, 2, 3, 4, 6 e 7 iniciam-se entre 10 e 80%, tendem a diminuir e elevam-se após as primeiras vacinas com CDs, seguidos por uma tendência de diminuição de expressão até o final das análises. Nos pacientes 1 e 2, que receberam uma maior quantidade de vacinas, essa redução foi mais expressiva entre a sexta e nona análise celular. Os pacientes 5 e 8 começaram o tratamento com expressões celulares variando de 30 a 70%, adotando um comportamento semelhante após a imunoterapia: inicialmente houve uma diminuição da porcentagem de expressão dos marcadores analisados, mas seguiu-se uma tendência ao aumento.

Com relação à análise da dupla marcação, CD14 com TNF- α , representado em vermelho nos gráficos, os pacientes 1, 2 e 3 iniciaram uma expressão celular entre 0 e 45%, que após as primeiras vacinas com CDs, foi observado um aumento dos níveis de expressão nos três pacientes, contudo, entre a terceira e oitava análises celulares, a tendência foi de diminuição. Os pacientes 4, 5 e 8 mantiveram os níveis de expressão entre 0 e 10% do início ao final das análises. O paciente 6 começou a imunoterapia com aproximadamente 15% de expressão desse tipo celular, acompanhada por uma tendência de diminuição até a segunda análise, seguido por um aumento. O paciente 7 iniciou a terapia com uma elevada expressão

desses marcadores, por volta de 50%, com tendência ao aumento após a primeira vacina e evidente decréscimo até o final das análises.

A avaliação dos macrófagos através da dupla marcação do CD14 com a IL-12, representada em verde nos gráficos, demonstra que, nos pacientes 1, 2, 3, 4, 5 e 8, a análise da expressão dessas células, pelas linhas de tendência, manteve-se entre 0 e 20%, sendo que nos pacientes 1 e 2 observou-se picos de estimulação após o início do tratamento seguidos por diminuição entre a quarta e oitava análises celulares. Os demais pacientes referidos se mantiveram com baixas expressões, sem oscilações relevantes. O paciente 6 iniciou a imunoterapia com níveis de expressão dos marcadores em torno de 35%, porém houve uma tendência de diminuição até o final das análises. De maneira peculiar, o paciente 7 praticamente não apresentou expressão desse tipo celular na análise da pré-terapia; após a primeira vacina com CDs os níveis dos marcadores aumentaram sensivelmente, contudo, houve uma tendência a diminuição nas análises seguintes.

4.4.2 – Análise das Células NK

A análise das populações de células NK foi realizada pela marcação das moléculas de superfície CD56, específica para esse tipo celular, e CD25, cadeia α do receptor da IL-2. Sua atividade foi acompanhada pela análise das citocinas expressas por essas células, a IL-2 e IL-12.

Gráfico 9: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD56 com IL-2, com IL-12 e com CD25 no paciente 1.

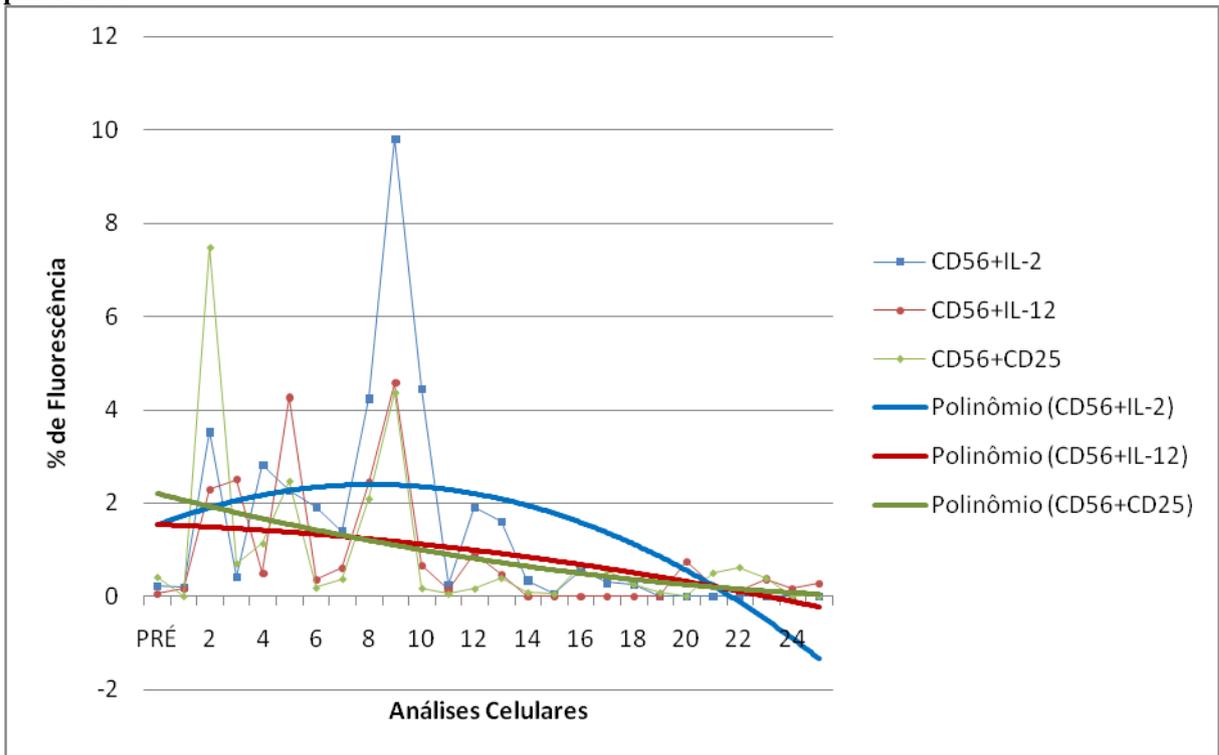


Gráfico 10: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD56 com IL-2, com IL-12 e com CD25 no paciente 2.

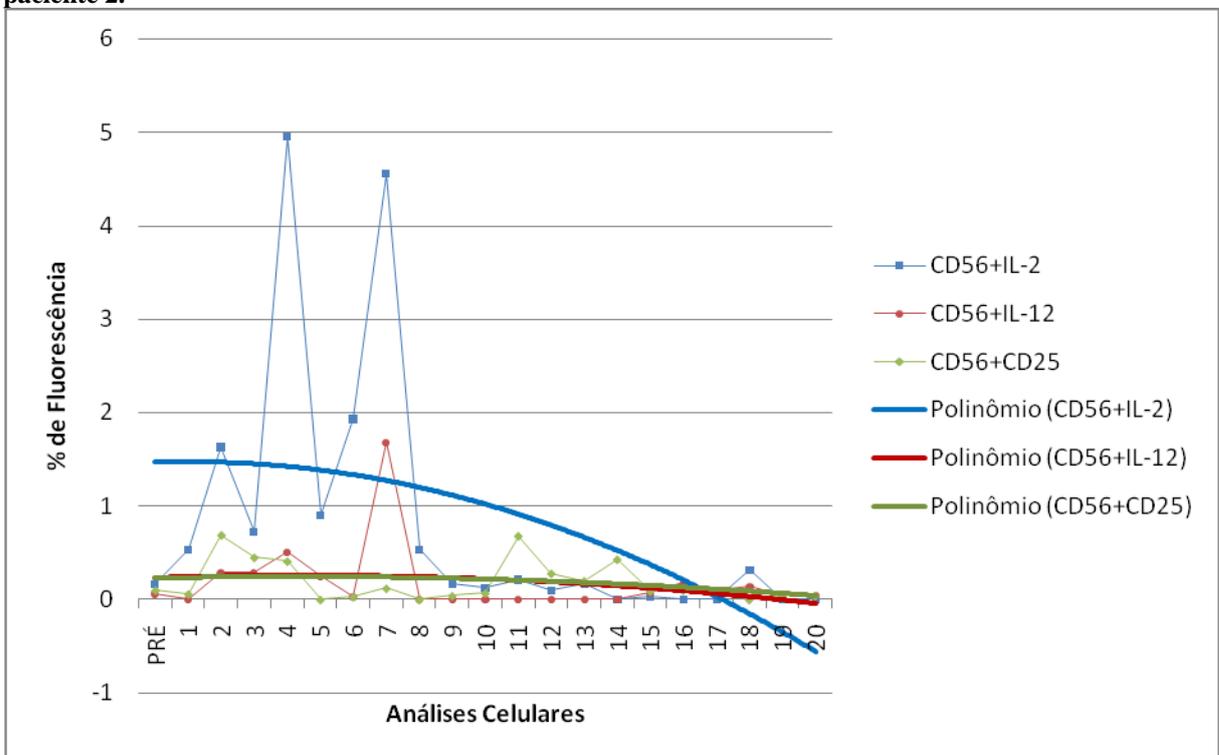


Gráfico 11: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD56 com IL-2, com IL-12 e com CD25 no paciente 3.

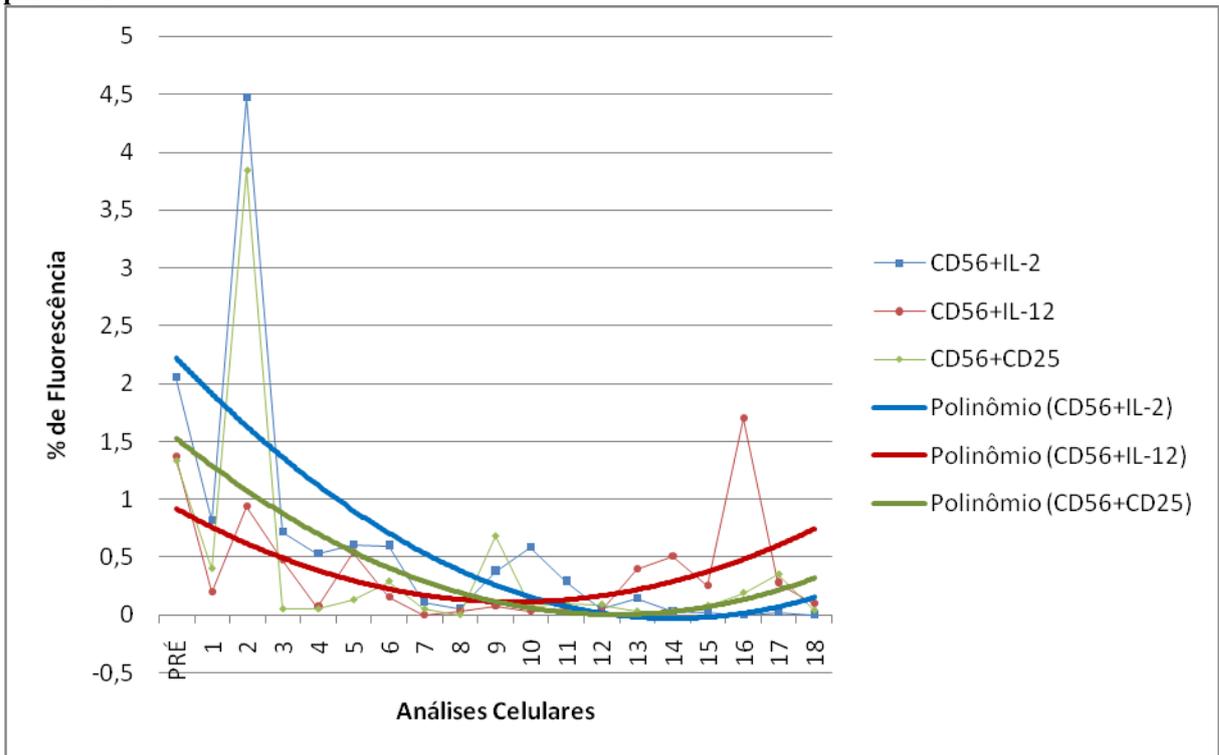


Gráfico 12: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD56 com IL-2, com IL-12 e com CD25 no paciente 4.

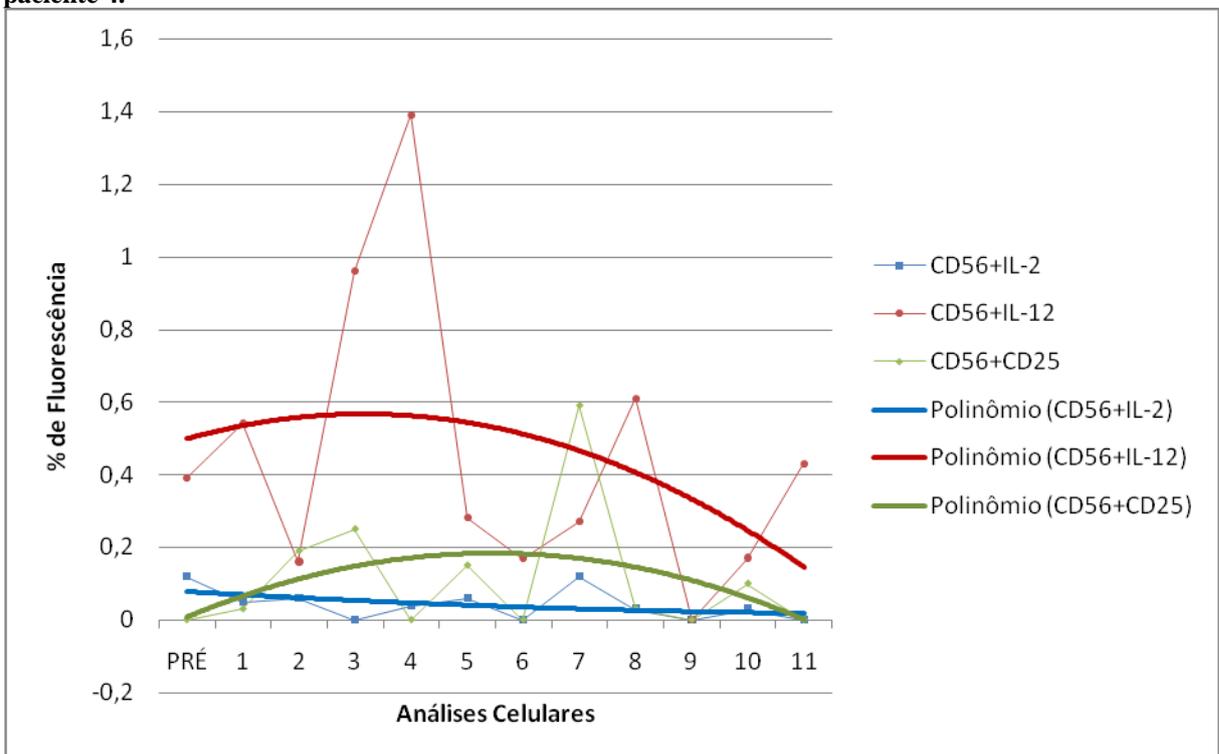


Gráfico 13: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD56 com IL-2, com IL-12 e com CD25 no paciente 5.

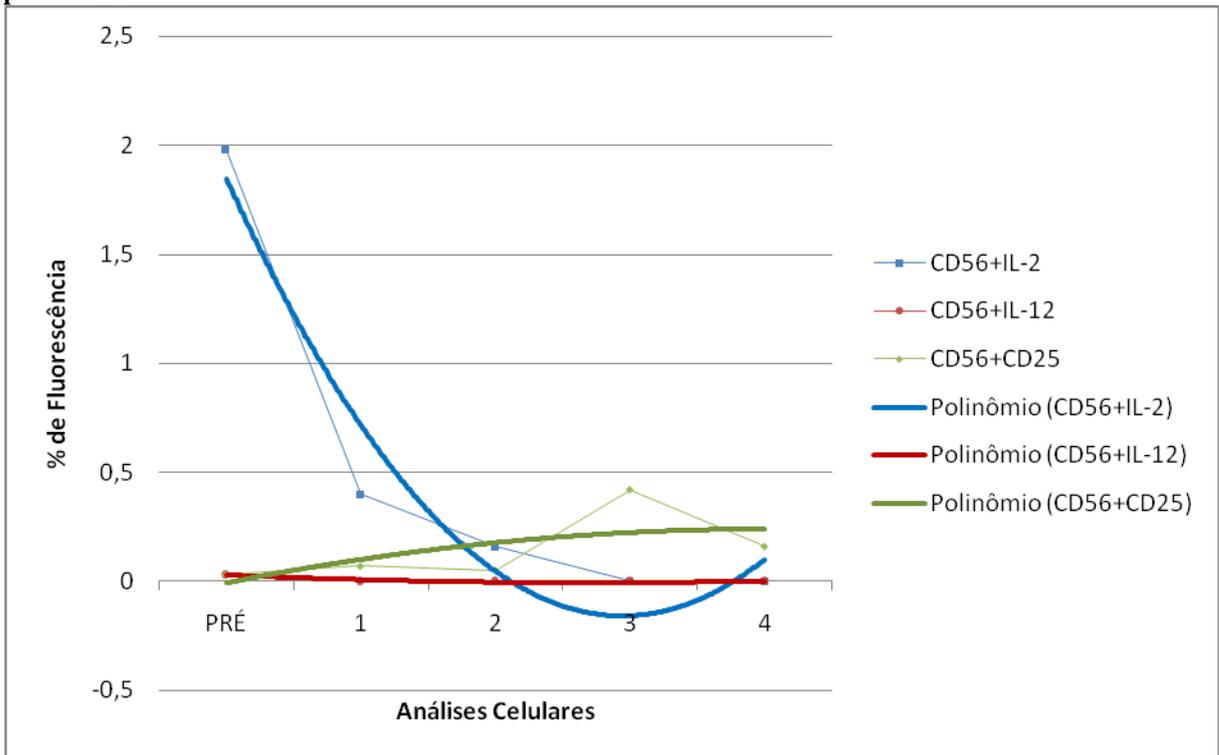


Gráfico 14: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD56 com IL-2, com IL-12 e com CD25 no paciente 6.

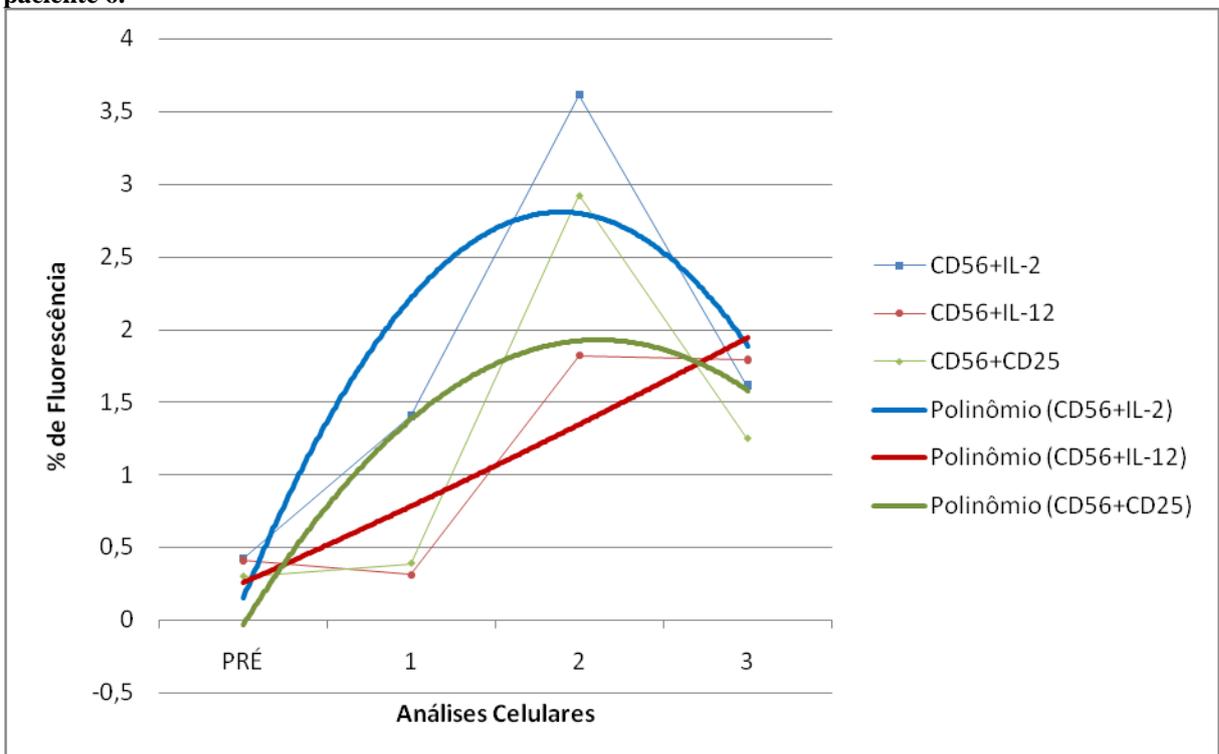


Gráfico 15: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD56 com IL-2, com IL-12 e com CD25 no paciente 7.

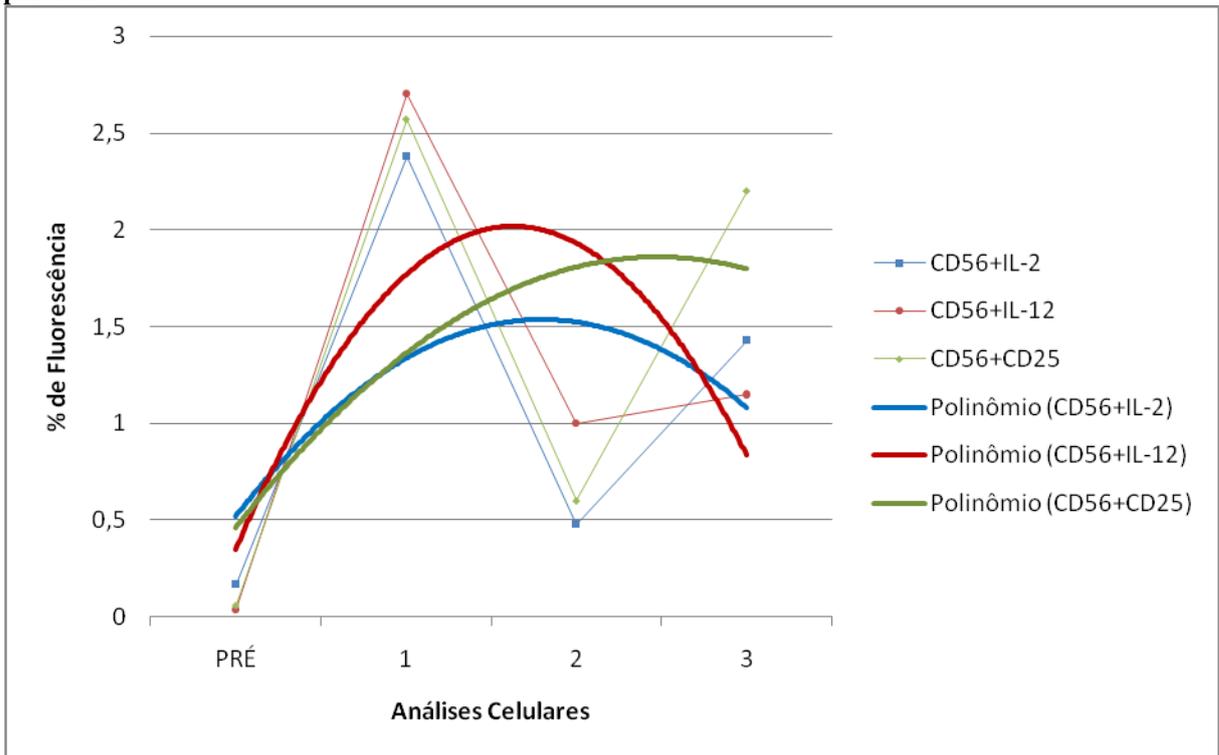
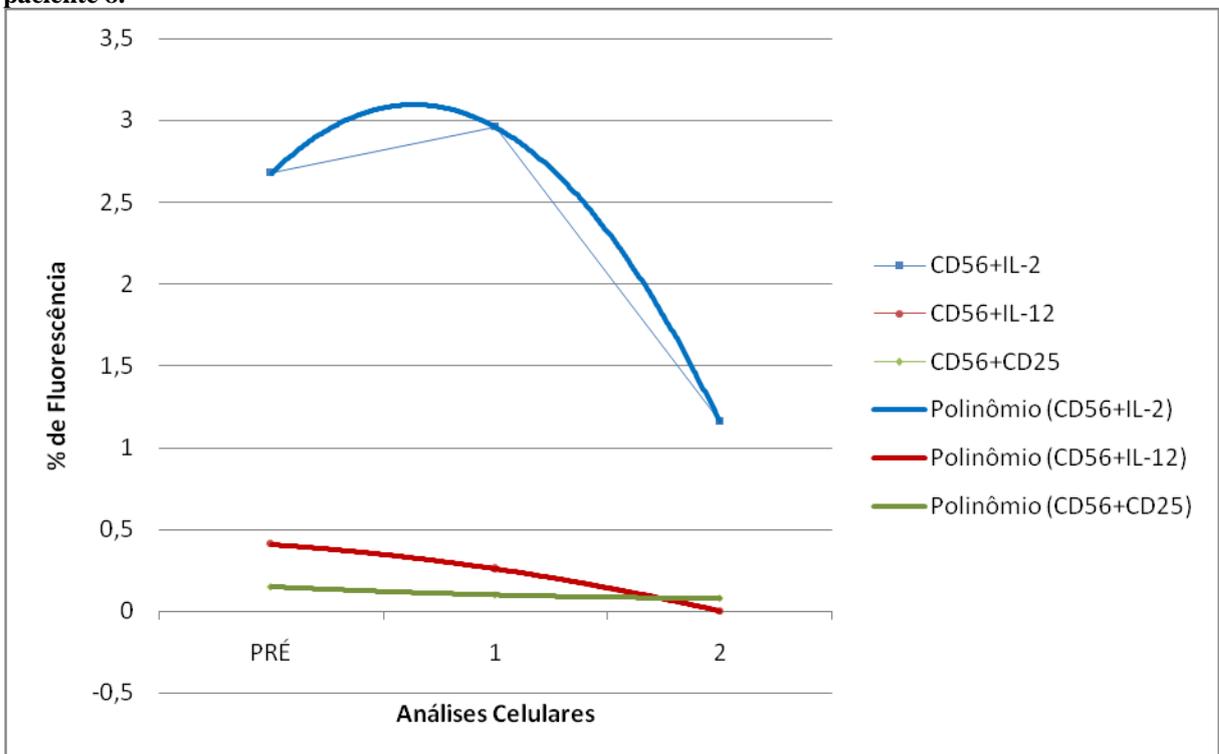


Gráfico 16: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD56 com IL-2, com IL-12 e com CD25 no paciente 8.



Ao analisar a dupla marcação do CD56 com a IL-2, os pacientes 1, 2, 6, 7 e 8 iniciaram a imunoterapia com CDs expressando baixos níveis desses marcadores, próximos a 2,5%, evidenciando aumento após as primeiras vacinas, porém, seguido por um decréscimo dos níveis de expressão. Nos pacientes 1 e 2, que se mantiveram em tratamento por um período mais prolongado, observou-se que essa redução ocorreu apenas entre a sétima e décima análise celular. Os pacientes 3 e 5 demonstraram uma análise inicial em torno de 2%, com tendência a diminuição após a terapia, no entanto, nas últimas análises, tendeu-se ao aumento. O paciente 4 começou a imunoterapia com CDs expressando valores baixos dos marcadores, de 0 a 0,2%, e após aplicações da vacina observaram-se poucas oscilações, sendo que a tendência manteve-se baixa durante todas as análises.

Com relação às análises celulares dos marcadores CD56 com IL-12, os pacientes 1, 2, 4 e 7 iniciaram o tratamento com baixos níveis de expressão, por volta de 0,5% e, a partir dos primeiros estímulos imunoterapêuticos, observou-se aumento desses níveis, porém, seguidos por uma tendência à diminuição. Nos pacientes 1 e 2, essa redução foi evidenciada por volta da oitava análise; por outro lado, no paciente 4 observou-se, novamente, o aumento da porcentagem de expressão dessas células nas últimas análises. O paciente 3 começou a imunoterapia com baixa expressão celular, aproximadamente 1,5%, manteve um perfil oscilatório de expressão durante todo tratamento, com tendência de diminuição até a nona análise, acompanhada por aumento a partir de então. O paciente 5 iniciou a terapia com praticamente nenhuma expressão celular, em torno de 0%, seguindo o mesmo perfil até o final das análises. Os pacientes 6 e 8 obtiveram uma análise da pré-terapia similar, próxima à 0,5%, contudo, adotaram respostas antagônicas, enquanto o paciente 6 tendeu a aumentar os níveis de expressão após a imunoterapia com CDs, o paciente 8 teve uma tendência à diminuição dos valores até o final das análises.

Ao analisar a dupla marcação da membrana celular através do CD56 com o CD25, evidenciou-se que os pacientes 1, 3 e 4, inicialmente, apresentavam pouca ou nenhuma expressão desse tipo celular, de 0 a 1,5%, e que, após as primeiras vacinas com CDs, houve uma elevação desses níveis acompanhado de comportamentos oscilatórios com uma tendência à diminuição. Nos pacientes 1 e 3 essa redução foi mais evidenciada por volta da décima análise celular. Com o paciente 4 houve uma tendência inicial a aumentar a expressão até a sexta análise diminuindo a partir dela. Os pacientes 5, 6 e 7 iniciaram a imunoterapia com pouca expressão dos marcadores avaliados, de 0 a 0,5%; após o tratamento houve uma tendência de aumento desses níveis até o final das análises. Já os paciente 2 e 8, do início ao

final do tratamento, mantiveram uma tendência de baixa expressão, entre 0 e 0,5%, sendo observado no paciente 2 um perfil oscilatório ao longo das análises celulares.

4.4.3 – Análise dos Linfócitos T citotóxicos

Os linfócitos T citotóxicos foram analisados similarmente aos macrófagos e células NK. Foram realizadas marcações de moléculas de superfície CD8, que é específica para essa população celular; e CD25, cadeia α do receptor da IL-2. Além disso, foi analisada a expressão da citocina IL-2.

Gráfico 17: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD8 com IL-2 e com CD25 no paciente 1.

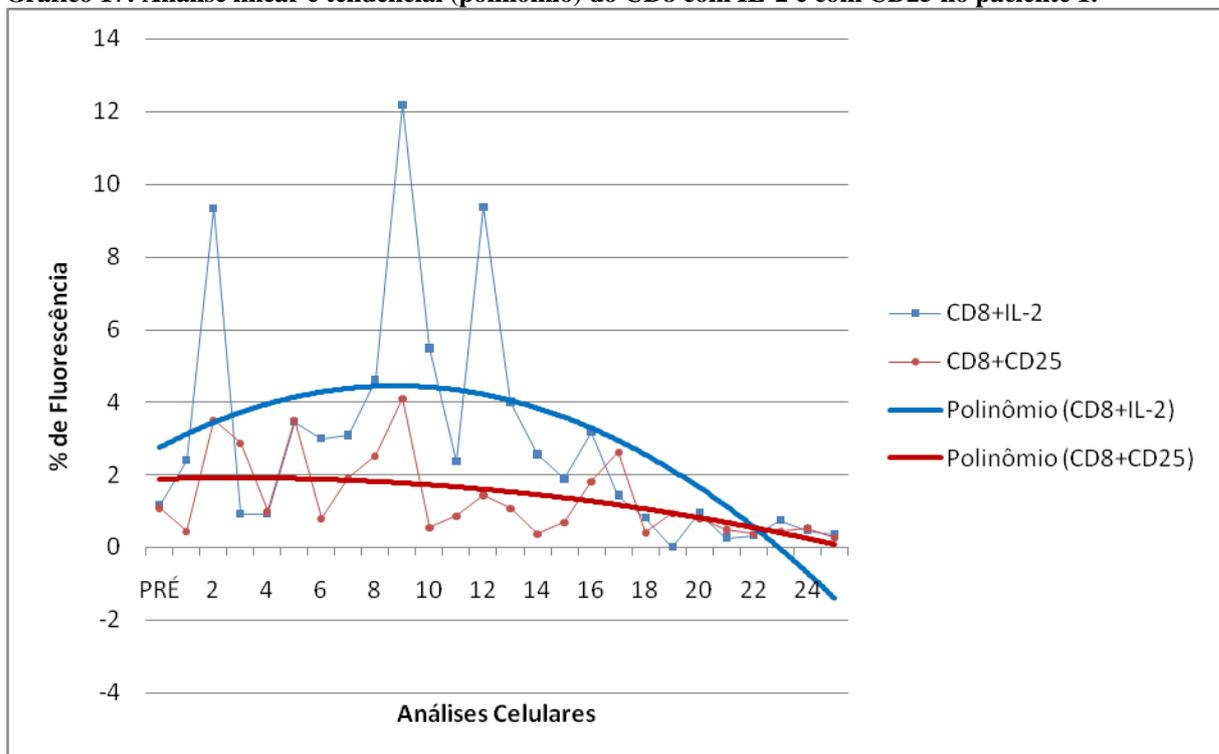


Gráfico 18: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD8 com IL-2 e com CD25 no paciente 2.

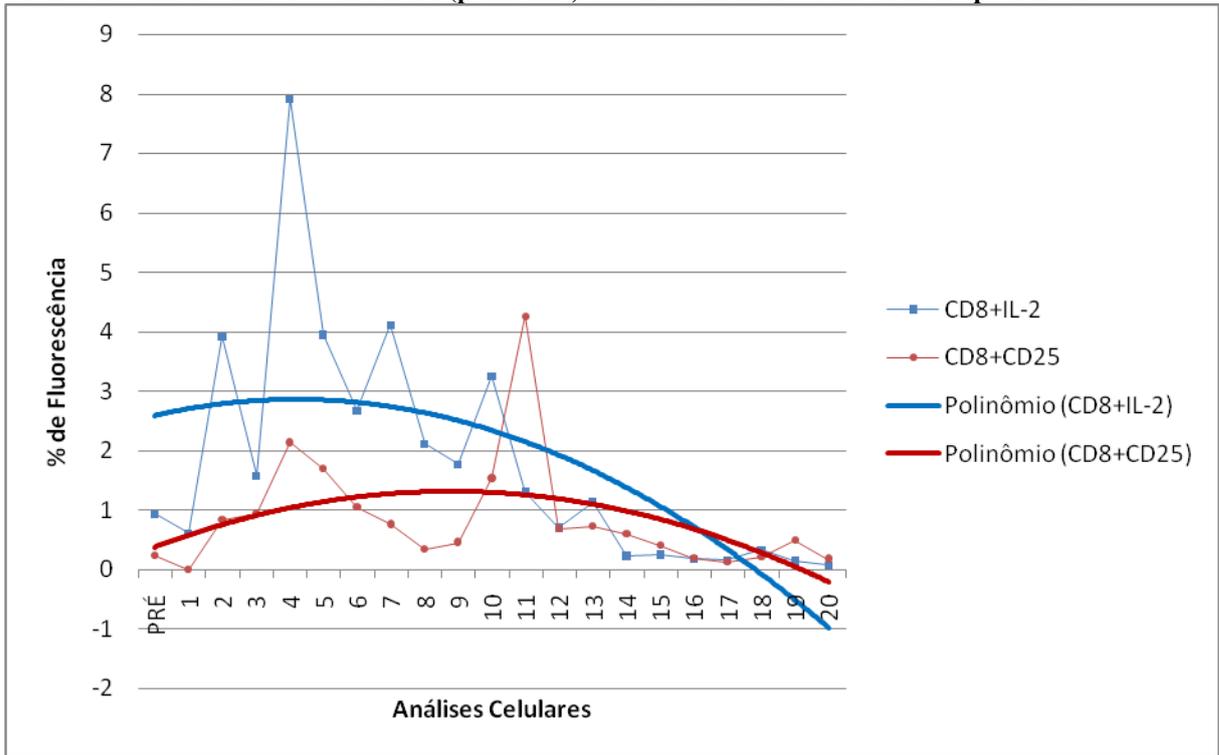


Gráfico 19: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD8 com IL-2 e com CD25 no paciente 3.

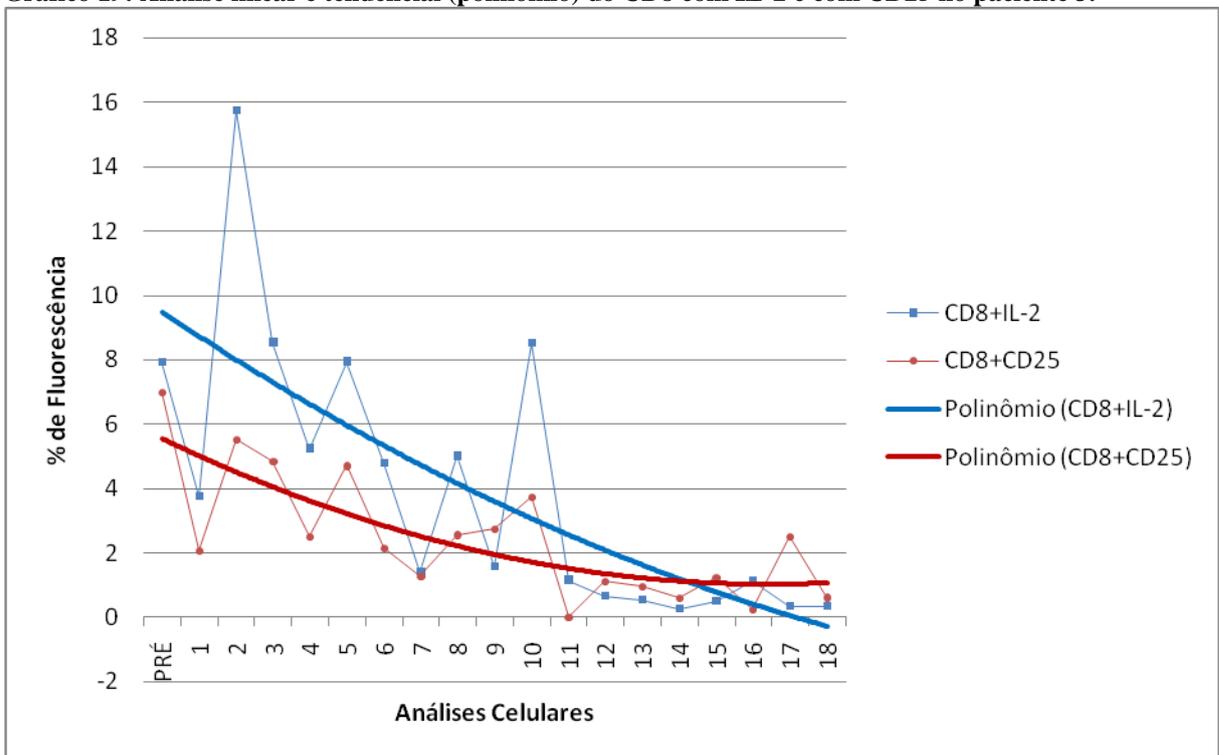


Gráfico 20: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD8 com IL-2 e com CD25 no paciente 4.

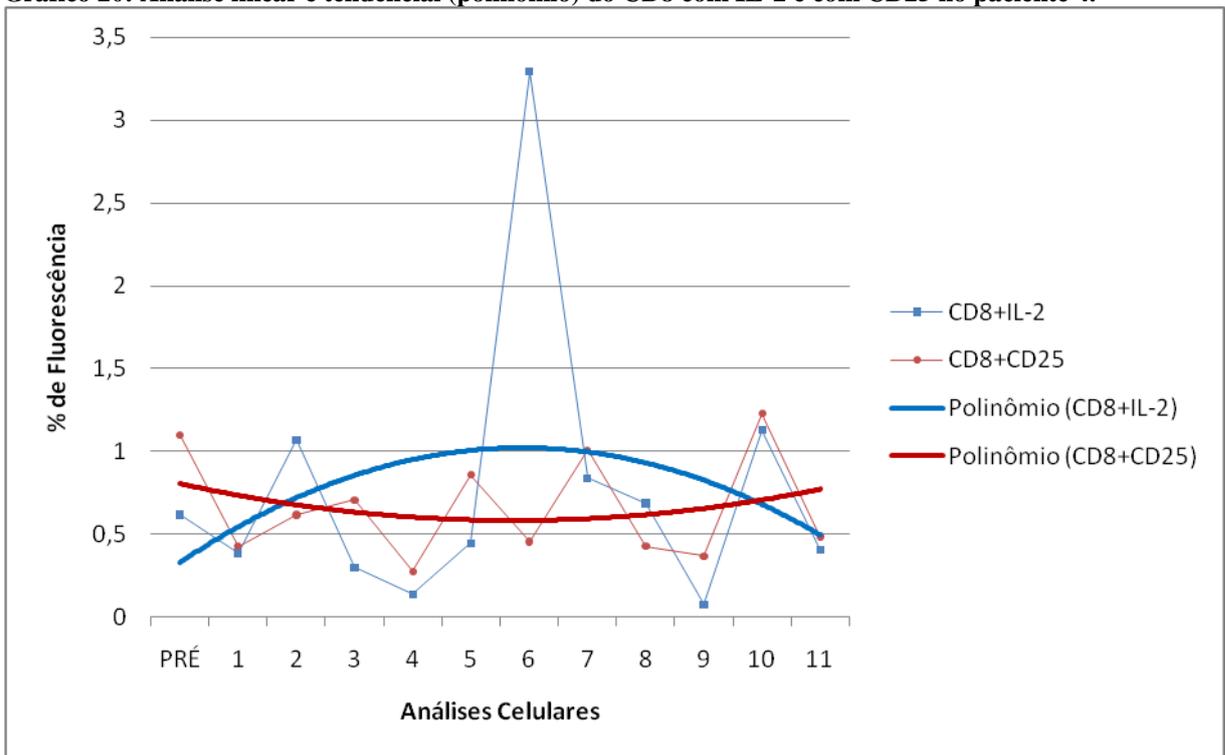


Gráfico 21: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD8 com IL-2 e com CD25 no paciente 5.

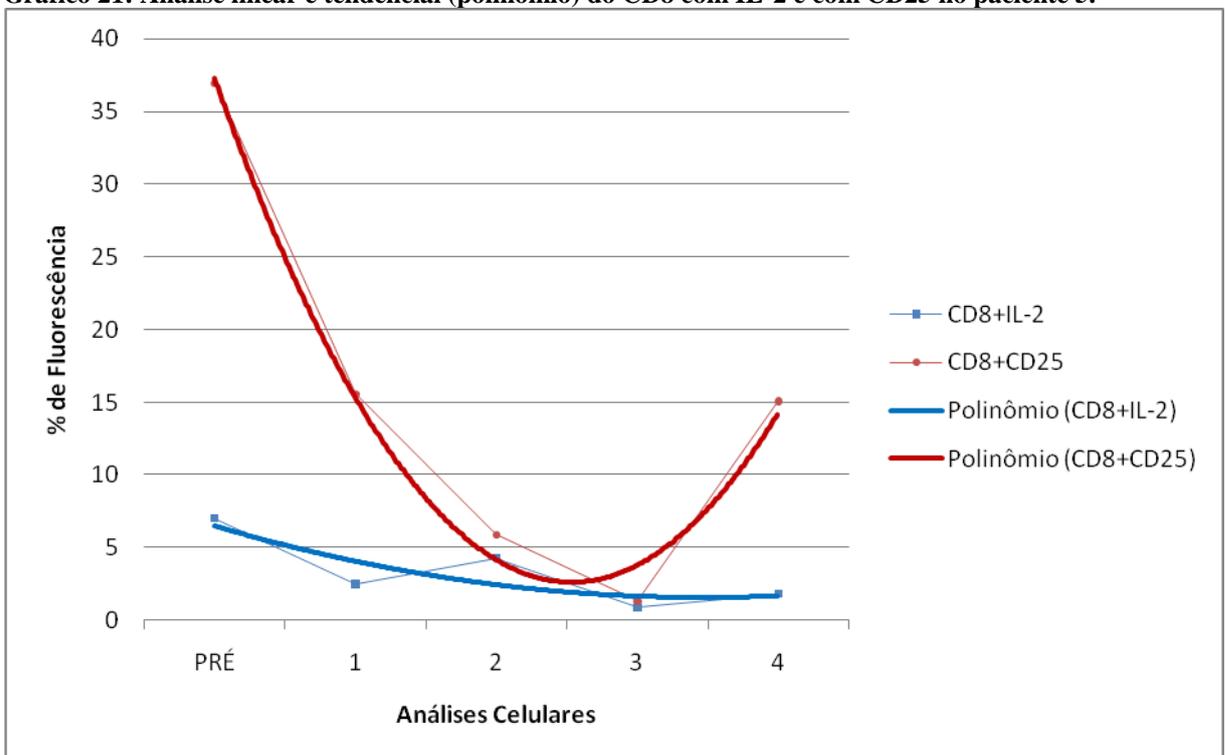


Gráfico 22: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD8 com IL-2 e com CD25 no paciente 6.

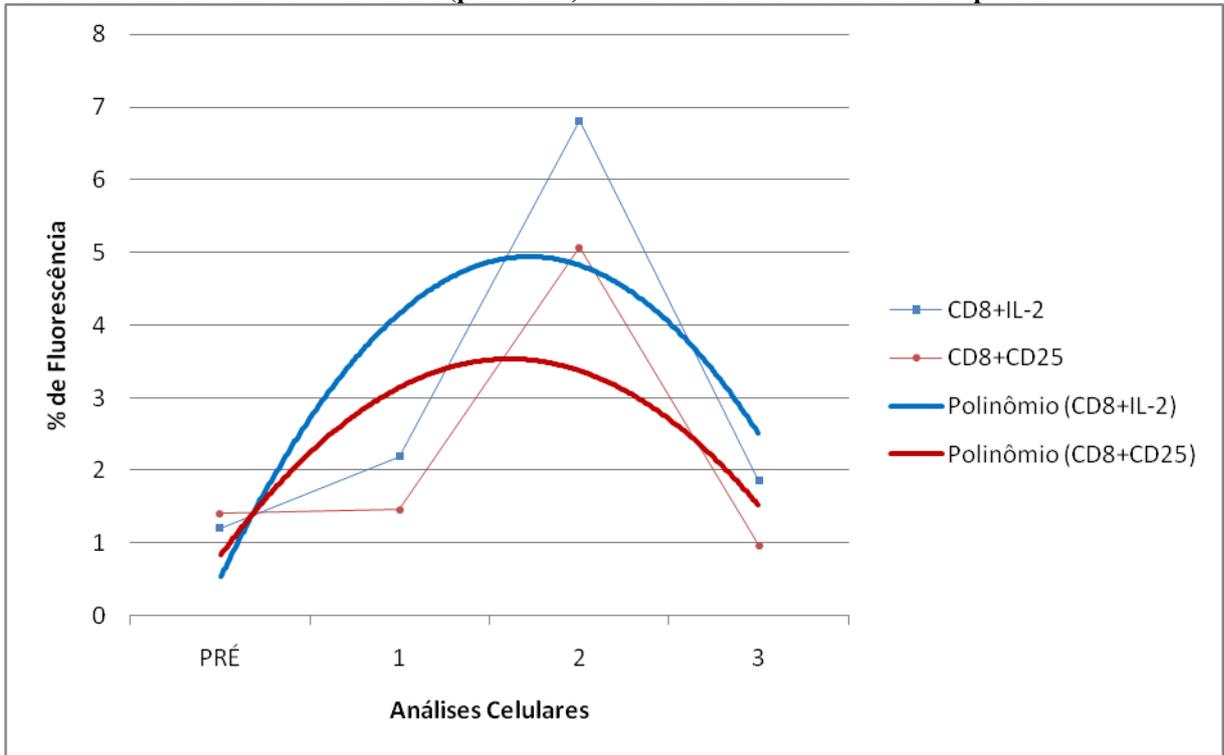


Gráfico 23: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD8 com IL-2 e com CD25 no paciente 7.

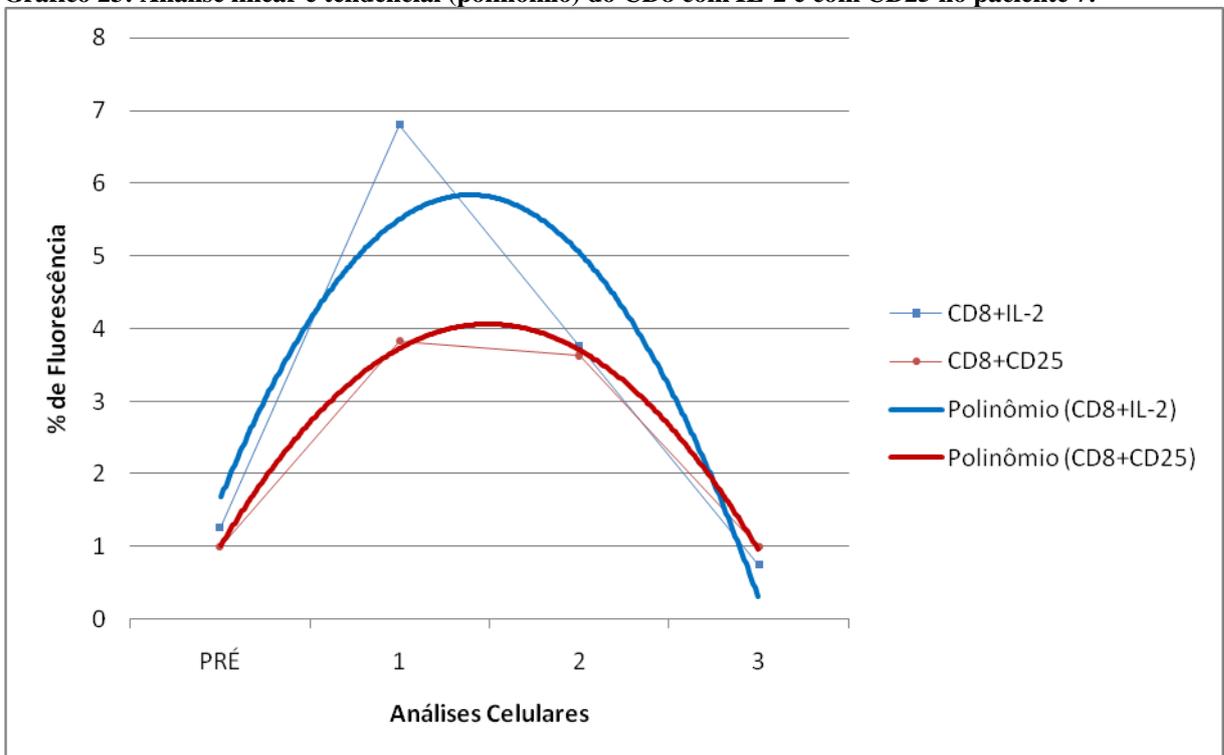
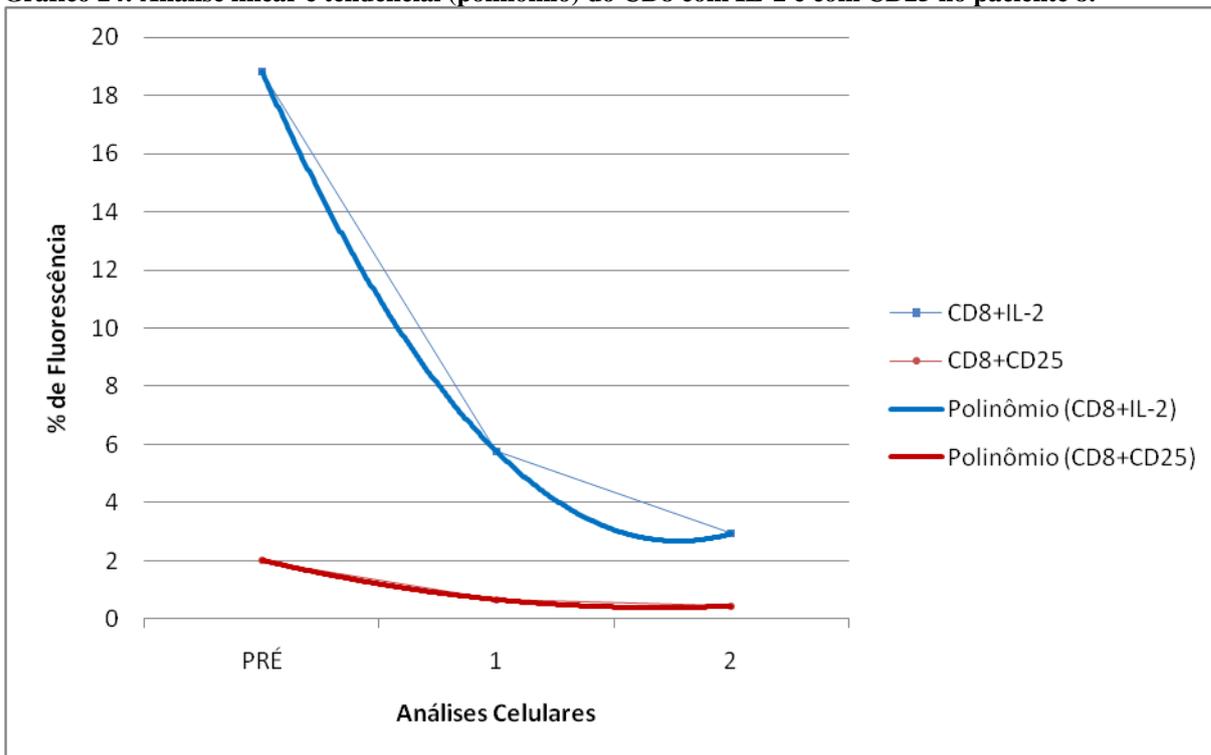


Gráfico 24: Análise linear e tendencial (polinômio) do CD8 com IL-2 e com CD25 no paciente 8.



Ao analisar a dupla marcação para os linfócitos T citotóxicos, através do CD8 e da IL-2, comportamentos de expressão seguindo um mesmo padrão foram evidenciados na maioria dos pacientes. Dentre eles, os pacientes 1, 2, 3, 4, 6 e 7, que iniciaram a imunoterapia com CDs expressando baixos níveis dos marcadores, de 0 a 8% e, após as primeiras aplicações da vacina, aumentaram substancialmente seus níveis de expressão, com comportamentos oscilatórios, seguidos por tendências à diminuição. Nos pacientes que apresentavam maiores quantidades de análises celulares (1, 2, 3 e 4), essa redução foi mais evidente por volta da décima análise. O paciente 5 começou o tratamento com pouca expressão dos marcadores, entre 5 e 10%, mantendo-se com pequenas oscilações e tendência discreta à diminuição. Em contrapartida, o paciente 8 iniciou a imunoterapia com elevada expressão da dupla marcação, em torno de 18%, e após o tratamento apresentou severa diminuição dessa expressão.

Em relação aos marcadores de membrana CD8 com CD25, observou-se que os pacientes 1, 3 e 8 iniciaram o tratamento expressando de 1 a 8% desses marcadores celulares, com tendências a diminuição do início ao final das análises, sendo que os pacientes 1 e 3 adotaram perfis oscilatórios com picos de estimulação durante algumas análises e essa redução foi principalmente evidenciada nas últimas análises. Os pacientes 2, 6 e 7 possuíam uma análise inicial com pouca expressão, em torno de 2%, foram estimulados após o início da imunoterapia com CDs, contudo adotaram uma tendência de diminuição até o final das

análises. No paciente 2 essa redução foi mais evidenciada após a décima primeira análise. Os pacientes 4 e 5 apresentaram uma expressão celular de comportamento semelhante, com uma tendência inicial de diminuição seguida por aumento, entretanto algumas particularidades devem ser consideradas, como a manutenção de um perfil oscilatório no paciente 4 e acentuada redução dos níveis celulares iniciais do paciente 5.

4.4.4 – Análise Estatística dos Macrófagos

Os resultados da análise estatística foram expressos através de gráficos lineares das medianas, incluindo-se barras de erros para os valores máximos e mínimos obtidos.

Gráfico 25: Análise linear das medianas, máximos e mínimos do CD14 com IFN- γ do grupo estudado, submetido à estatística pelo teste de Kruskal-wallis.

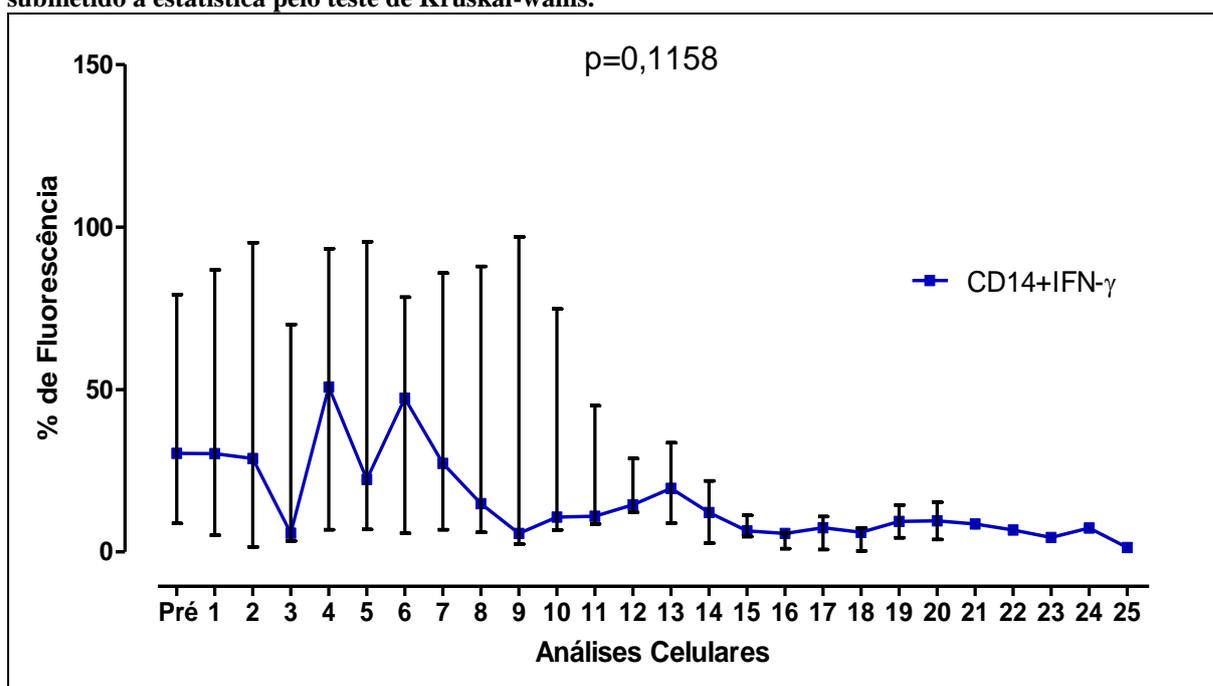


Gráfico 26: Análise linear das medianas, máximos e mínimos do CD14 com TNF- α do grupo estudado, submetido à estatística pelo teste de Kruskal-wallis.

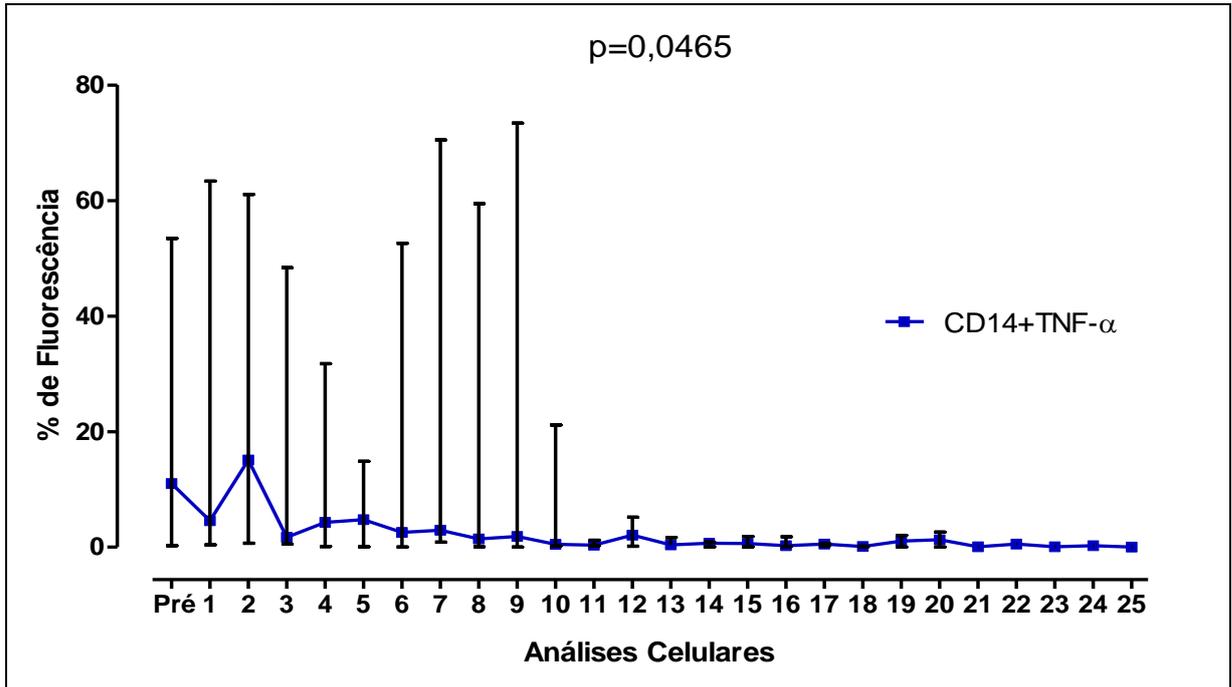
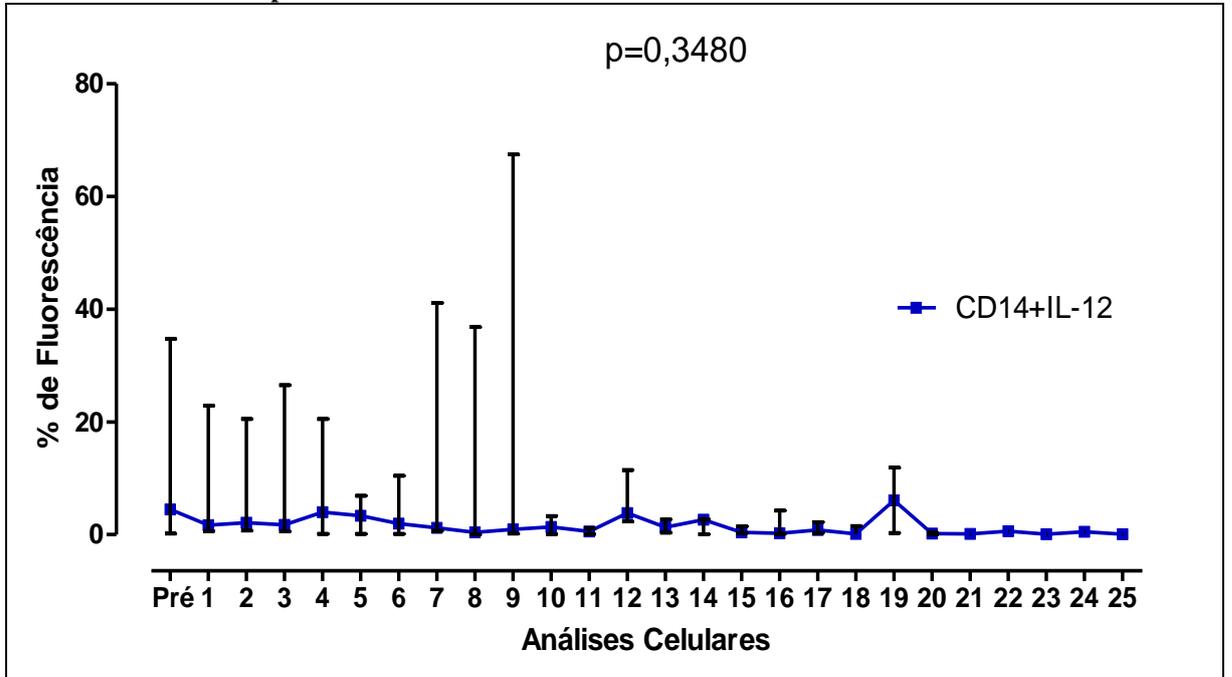


Gráfico 27: Análise linear das medianas, máximos e mínimos do CD14 com IL-12 do grupo estudado, submetido à estatística pelo teste de Kruskal-wallis.



O gráfico 25, que analisa os macrófagos expressando IFN- γ , demonstrou oscilação apresentando picos de estimulação na quarta, sexta e décima terceira análises. A partir de então, assumiu uma tendência ao declínio, com o $p=0,1158$. O gráfico 26, que representa a expressão de TNF- α pelos macrófagos, evidenciou uma estimulação significativa após o início da imunoterapia com CDs, no entanto, a partir da segunda análise tendeu a diminuir, com o $p=0,0465$. Ao analisar o gráfico 27, que avalia a expressão da IL-12 nos macrófagos, não foram observadas alterações significativas do início ao final das análises, sendo o $p=0,3480$.

4.4.5 – Análise Estatística das Células NK

Gráfico 28: Análise linear das medianas, máximos e mínimos do CD56 com IL-2 do grupo estudado, submetido à estatística pelo teste de Kruskal-wallis.

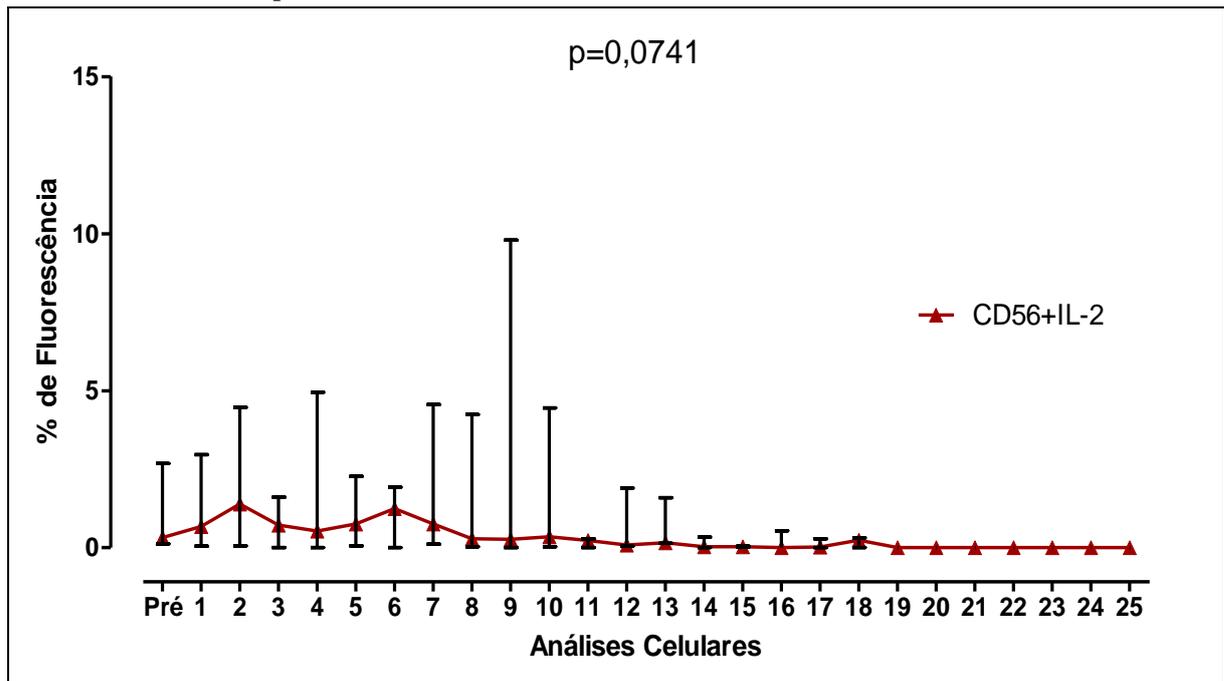


Gráfico 29: Análise linear das medianas, máximos e mínimos do CD56 com IL-12 do grupo estudado, submetido à estatística pelo teste de Kruskal-wallis.

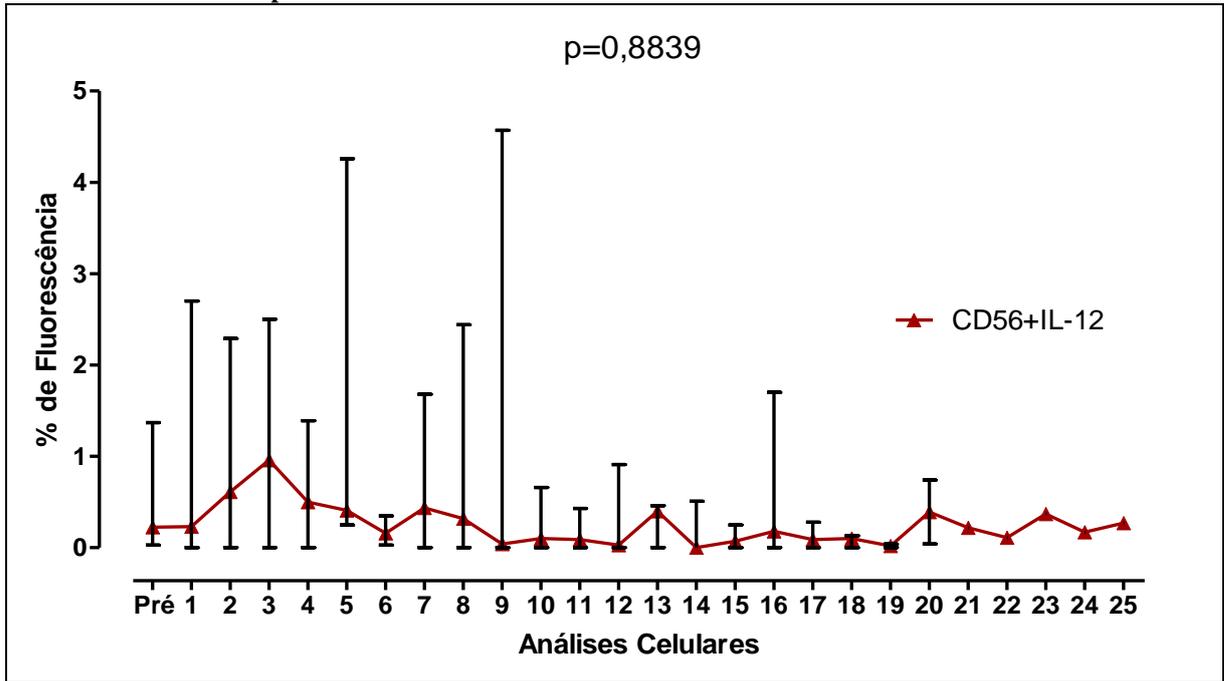
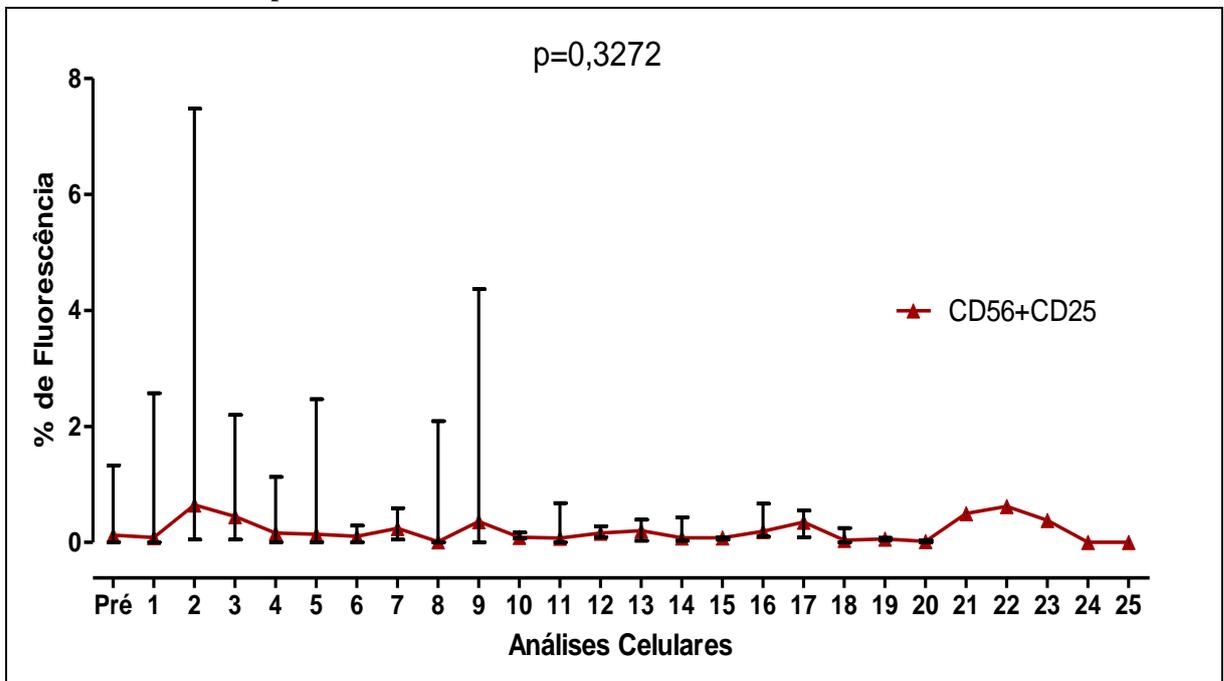


Gráfico 30: Análise linear das medianas, máximos e mínimos do CD56 com CD25 do grupo estudado, submetido à estatística pelo teste de Kruskal-wallis.



O gráfico 28, que avalia a expressão da IL-2 pelas células NK no grupo estudado, demonstra que houve aumento da expressão dos marcadores analisados após as primeiras vacinas com CDs, embora exista uma tendência de diminuição principalmente observada a partir da sexta análise celular, com o $p=0,0741$. Ao analisar a expressão da IL-12 pelas células NK, demonstrado no gráfico 29, houve um comportamento oscilatório dessa população celular durante todo o seguimento dos pacientes, sendo o $p=0,8839$. De maneira similar, no gráfico 30 que analisa as células NK com o CD25, após a imunoterapia com CDs, os pacientes não apresentaram variações importantes pela análise da mediana, ocorreu baixa expressão celular e algumas oscilações do início ao final da terapia, com o $p=0,3272$.

4.4.6 – Análise Estatística dos Linfócitos T citotóxicos

Gráfico 31: Análise linear das medianas, máximos e mínimos do CD8 com IL-2 do grupo estudado, submetido à estatística pelo teste de Kruskal-wallis.

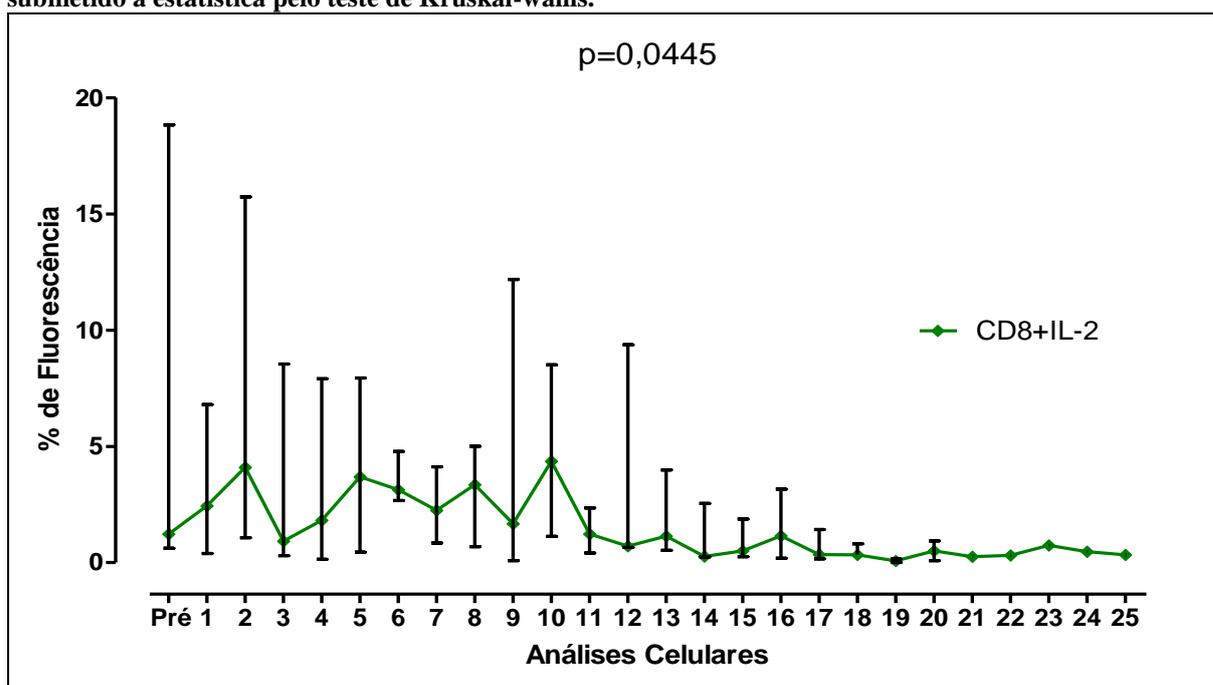
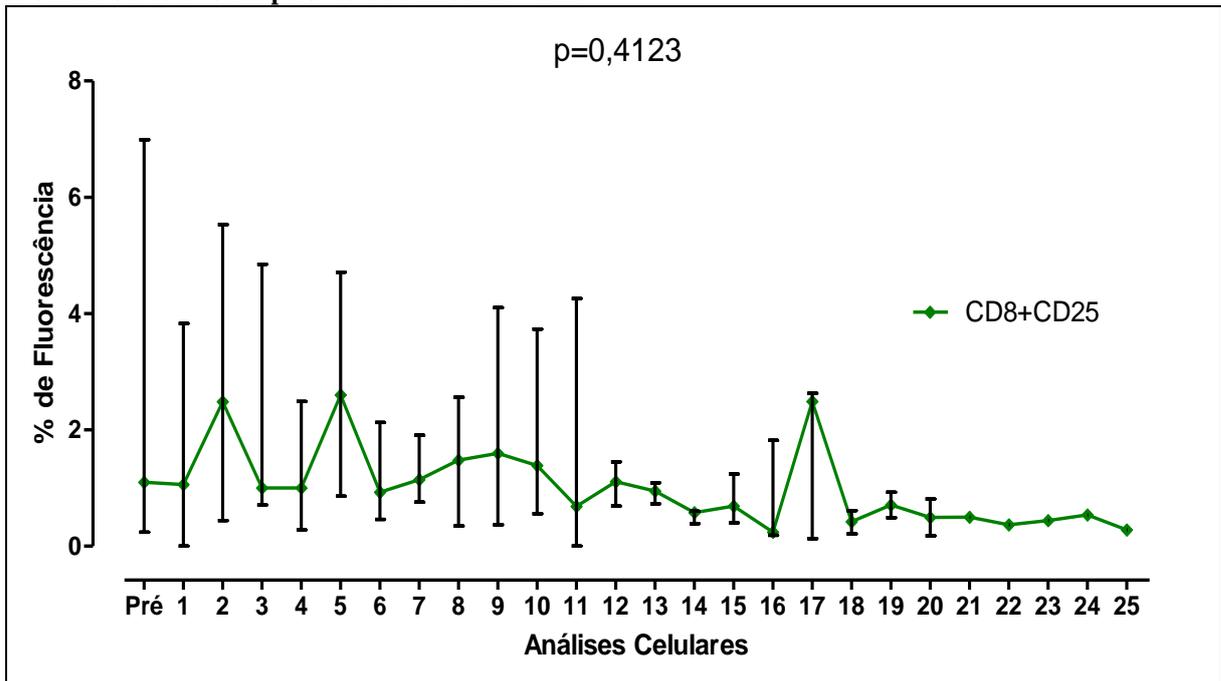


Gráfico 32: Análise linear das medianas, máximos e mínimos do CD8 com CD25 do grupo estudado, submetido à estatística pelo teste de Kruskal-wallis.



O gráfico 31, que avalia a expressão da IL-2 pelos linfócitos T citotóxicos, evidenciou um aumento significativo dessa população celular após a imunoterapia com CDs, todavia, após a décima análise houve uma tendência à diminuição, com o $p=0,0445$. Com relação ao CD25, analisado nessas células (gráfico 32), foi observado um estímulo ao aumento após a terapia, porém, com um perfil muito oscilatório, sendo o $p=0,4123$.

5 DISCUSSÃO

Sabe-se que a resposta imune é controlada por fatores genéticos e, assim sendo, possui características e peculiaridades próprias para cada indivíduo. Inicialmente, realizamos uma análise individual de cada paciente acompanhando-os por um longo período, uma vez que a imunidade adota comportamentos variados em cada pessoa. Foram estudados oito pacientes com câncer avançado seguidos ininterruptamente. Além disso, uma análise geral foi importante para simular o desempenho da vacina com células dendríticas frente a mecanismos complexos e versáteis de que os tumores dispõem para o escape imunológico.

Um aspecto comumente observado foi a maneira inconstante em que o sistema imune se comportou nos pacientes, nos quais as concentrações de células e citocinas apresentaram mesmo perfil de instabilidade. Para tanto, diversos fatores podem influenciar no comportamento de células e mediadores da resposta imune, como os estados de inflamação (gripes, resfriados, ou qualquer doença inflamatória), o próprio tipo tumoral, estados de estresse, depressão, dentre uma ampla gama de fatores associados à estimulação da imunidade. Logo, esse tipo de análise é muito sensível e valores oscilatórios são comumente observados.

As células dendríticas são reconhecidas como potentes adjuvantes naturais, sendo consideradas células apresentadoras de antígenos profissionais capazes de mediar respostas em linfócitos T, desencadeando uma resposta imune específica contra uma variedade de antígenos. Nos últimos anos, devido ao potencial imunogênico que essas células possuem, a imunoterapia com células dendríticas contra antígenos tumorais tem sido alvo de pesquisas, e os seus efeitos na imunidade do hospedeiro é a peça chave para o desenvolvimento do presente trabalho.

A resposta imune sistêmica foi avaliada, por citometria de fluxo, através das principais células da imunidade inata que possuem atividade antitumoral, os macrófagos e células NK, e pela célula que possui papel central na imunidade adquirida contra os tumores, os linfócitos T citotóxicos. Nossos resultados demonstram uma estimulação da resposta imune com aumento dessas populações celulares expressando citocinas do perfil Th1, após o início da imunoterapia com células dendríticas autólogas pulsadas com antígenos tumorais específicos e aplicadas por via subcutânea em um intervalo médio de 15 dias.

As vacinações com CDs autólogas foram bem toleradas sem efeitos colaterais consideráveis. Embora, uma das pacientes em tratamento por melanoma maligno metastático de vagina (Paciente 2), que já apresentava a doença auto-imune de Vitiligo, teve um agravamento após a imunoterapia com CDs, contudo, sabe-se que pode ocorrer resposta auto-imune contra melanócitos durante o tratamento antimelanoma (ROSENBERG e WHITE, 1996).

Em estudo conduzido por Van Furth e Cohn (1968), caracterizou-se a morfologia e propriedades cinéticas e funcionais dos macrófagos, através do isolamento *in situ* dessas linhagens celulares presentes na cavidade peritoneal, fígado e pulmão de camundongos. Através desse estudo foi determinado que populações de macrófagos são renovadas mesmo nos estados estacionários, característica de essencial importância conhecida por plasticidade. Essa propriedade das células mononucleares, em resposta a estímulos externos, torna-as fenotipicamente diferentes, ora monócitos, ora macrófagos, ou mesmo células dendríticas, desempenhando funções específicas nos diversos tecidos e estados de inflamação (BISWAS e MANTOVANI, 2010; GEISSMANN et al., 2010).

A orquestração da função das células mononucleares é um elemento chave que liga a inflamação e o câncer e oferece um paradigma para a plasticidade e a função dos macrófagos. Uma das funções dos macrófagos, no microambiente tumoral, é fornecer um mecanismo de defesa contra as células cancerosas, onde são capazes de reconhecer e destruir tais células, através da ligação específica por receptores presentes na membrana (BISWAS e MANTOVANI, 2010; UTSUGI et al., 1991).

Estudos têm demonstrado que a quantidade de fosfatidilserina na membrana externa das células tumorais e não tumorais é um dos fatores responsáveis pelo reconhecimento específico da célula tumoral (ELNEMR et al., 2000; UTSUGI et al., 1991). Westenfelder e colaboradores (1993) demonstraram a importância da estrutura de carboidratos para ativação de monócitos, indicando que a glicosilação alterada pelas células tumorais pode ser responsável pela indução de uma resposta antitumoral.

A destruição de células tumorais envolvendo os macrófagos pode ocorrer por dois mecanismos distintos. O primeiro é conhecido por citotoxicidade tumoral mediada por macrófagos e o segundo, citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Na citotoxicidade mediada por macrófagos, moléculas de adesão como o ICAM-1 (molécula de adesão intercelular-1) são essencialmente importantes na interação entre as células tumorais e os macrófagos (JONJIC et al., 1992; WEBB et al., 1991). Na ADCC, a presença de

anticorpos para o reconhecimento antigênico é necessário. Em ambos os processos haverá liberação de mediadores citotóxicos, incluindo TNF- α , IL-1, NO e intermediários do oxigênio reativo (QI et al., 1995; SHAW et al., 1978).

Em 1986, Mosmann e colaboradores realizaram um estudo observando que clones de células T CD4⁺ poderiam ser divididas em duas classes, Th1 e Th2, dependendo do perfil de citocinas produzido por essas células. Por sua vez, células secretoras de IFN- γ aumentam a capacidade tumoricida dos macrófagos, pela liberação de substâncias citotóxicas, como o NO e IL-1 (BOEHM et al., 1997; DILEEPAN et al., 1995).

Mais recentemente, foi também descoberta uma diversidade de perfis de citocinas que modulam a resposta imune durante os processos de inflamação como: Treg, Th17, Th22 e Th9 (AWASTHI e KUCHROO, 2009; EYERICH et al., 2009; VELDHOEN et al., 2008).

No presente estudo, analisamos populações de macrófagos expressando IFN- γ , TNF- α e IL-12 em pacientes com câncer avançado tratados com imunoterapia baseada em células dendríticas e verificamos que houve estímulo ao aumento nas três populações avaliadas, embora a expressão da IL-12 tenha sofrido pouca influência na análise agrupada.

A produção de IFN- γ pelos macrófagos foi descrita, pela primeira vez, há mais de 30 anos por Neumann e Sorg, ao observarem que determinadas populações dessas células poderiam ser induzidas a produzir interferon, dependendo do seu estado de diferenciação (NEUMANN e SORG, 1977). Entretanto, pouco se conhece a respeito da produção de IFN- γ pelos macrófagos em resposta à imunoterapia com células dendríticas. Nossos achados, embora não tenham sido significantes, podem contribuir para futuras investigações, visto que pouco do assunto tem sido publicado na literatura mundial.

Com relação à expressão intracelular de TNF- α nos macrófagos, nossos resultados foram estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$), evidenciando um aumento expressivo durante as primeiras análises celulares após a imunoterapia com CDs. Nossos resultados indicam que essas células são estimuladas e podem participar, através da imunidade inata, do processo de indução e manutenção de respostas antitumorais. O TNF- α produzido por macrófagos, induz apoptose de células tumorais através da geração de intermediários reativos do oxigênio, indução da expressão de iNOS (óxido nítrico sintetase induzível), quebra de DNA e indução de atividade proteolítica. Sob certas circunstâncias, o TNF- α exerce efeitos citotóxicos no endotélio vascular e modula propriedades endoteliais pró-coagulantes. Estudos envolvidos em imunoterapia celular adotiva com monócitos/macrófagos demonstraram respostas biológicas

relacionados à elevação de TNF- α no líquido peritoneal, porém observou-se pouco resultado quanto à regressão tumoral (ANDREESSEN et al., 1990; HENNEMANN et al., 1995).

A IL-12 é uma citocina de especial importância, pois regula a resposta imune inata e determina o tipo e a duração da resposta imune adquirida. É produzida principalmente, em resposta a estímulos de monócitos, macrófagos e células dendríticas. Uma das suas principais ações é a indução de outras citocinas, especialmente o IFN- γ , que coordena a imunidade. Inicialmente, a IL-12 age nas células NK e células T, amplificando a resposta imune inata e, posteriormente, junto a IL-18, age de maneira sinérgica aumentando a atividade citolítica e potencializando a imunidade nessas células (LAUWERYS et al., 1999; MICALLEF et al., 1996; ROBINSON et al., 1997).

As células NK possuem importante papel na indução de respostas antitumorais e potencializam atividades nas células dendríticas através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- γ e a IL-12 (FERNANDEZ et al., 1999). De maneira recíproca, CDs são capazes de estimular células NK pela liberação de IL-12, IL-15 e IL-18 que participam na proliferação, ativação e manutenção das células NK, contribuindo ainda mais para a atividade antitumoral nessas células (SANCHEZ et al, 2010).

Avaliamos a expressão das citocinas IL-12, IL-2 e a cadeia α do seu receptor, o CD25, nas células NK, e verificamos que houve aumento desses marcadores após as primeiras vacinas com CDs. Nossos achados sugerem que a imunoterapia com CDs tem a capacidade de induzir respostas imunes efetoras em células NK, com a estimulação de um perfil de resposta Th1 após o início da imunoterapia. Apesar de não se ter analisado linfócitos T CD4+ nesse estudo, que são consideradas as principais células secretoras de citocinas, estudos prévios realizados com o mesmo grupo de pesquisa confirmam a manutenção do perfil de resposta Th1, após a vacina de CDs.

A IL-2 possui relevante papel na condução da proliferação celular e protege as células imunes da morte pela indução de mecanismos anti-apoptóticos. Por sua vez, o receptor para a IL-2 é essencial para a manutenção da apresentação antigênica, podendo influenciar na transdução do sinal através da qualidade, força e tempo da sinalização (ELLERY e NICHOLLS, 2002; KIM et al., 2006).

Dao e colaboradores (2005) realizaram um estudo experimental *in vitro*, utilizando o linfoma de células B humano como modelo, em que a apresentação cruzada dos antígenos dessas células pelas CDs requer auxílio de células NK. Segundo os autores, na cultura de

células NK adicionadas a linfócitos T citotóxicos e CDs sensibilizadas com antígenos, houve aumento de IL-18 e diminuição de IL-12 e IL-15, justificando que a efetiva apresentação cruzada exige mais ativação de CDs por células NK e uma abundante produção de IL-18 que, juntamente com mecanismos ainda indefinidos, contribuem para a geração de linfócitos T citotóxicos responsivos aos linfomas de células B.

Suminoe e colaboradores (2009) conduziram um estudo que avaliou a atividade citotóxica das células NK e o potencial de ativação dos linfócitos T CD8+, antes e durante a administração de células dendríticas pulsadas com peptídeos tumorais específicos e combinadas com a proteína imunogênica KLH (do inglês - *keyhole limpet hemocyanin*), em cinco crianças com tumores sólidos refratários. A atividade citotóxica das células NK foi determinada pelo ensaio padrão K562 com marcação celular ^{51}Cr e, segundo essa avaliação, três dos cinco pacientes tiveram um aumento da atividade citotóxica das células NK após a imunoterapia com CDs, sendo que dois desses pacientes apresentaram uma citotoxicidade duradoura (12 – 17 meses). O potencial de resposta das células T CD8+ foi determinado pela análise de linfócitos do sangue periférico, duplamente marcados com anticorpos CD8⁺ IFN- γ e CD8⁺ HLA-DR⁺ para avaliação das células por citometria de fluxo. Dois dos cinco pacientes obtiveram aumento desses tipos celulares e, além disso, apresentaram um efeito imunossupressor tumoral mais evidente. Segundo os autores, é importante uma ativação recíproca entre as células NK e as CDs para que seja possível uma amplificação da resposta imune antitumoral.

Em experimento conduzido por Borg e colaboradores (2004), investigou-se o papel da IL-12 sobre as células dendríticas estimuladas por IFN- γ produzido pelas células NK, em sistemas *in vitro* animais (camundongos) e humanos. Para tanto, inicialmente células mononucleares do sangue periférico foram mantidas em cultura e amadurecidas, dando origem às CDs que, por sua vez, foram ativadas com LPS. Posteriormente, foi realizado a cocultura de células NK com CDs, para os dois sistemas estudados, e o sobrenadante foi colhido após 24 horas. Nesse material, foram realizadas as dosagens de IL-12 e IFN- γ por Ensaio Imunoenzimático (ELISA - do inglês, *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e, foi observado que CDs maduras podem estimular as células NK a secretar IFN- γ e esse estímulo é dependente de IL-12. Assim sendo, o estímulo à secreção do IFN- γ pelas células NK pode levar a polarização da resposta Th1, ao mesmo tempo em que, células NK podem estimular CDs a produzir IL-12, otimizando uma resposta efetora pelos linfócitos T citotóxicos, evento sinergicamente recíproco conhecido por *cross-talk*.

A interação entre as células NK e as células dendríticas foi demonstrada em estudo conduzido por Liu e colaboradores (2008), em que as células dendríticas plasmocitóides (pCDs) foram transfectadas com um vetor CpG-ODN-2216 em camundongos induzidos ao melanoma B16, demonstrando que pCDs ativadas induziram a progressão lenta do tumor e aumentavam o tempo de sobrevivência, induzindo uma infiltração vigorosa de linfócitos T citotóxicos específicos aos antígenos. Nesse trabalho demonstrou-se que as pCDs induzidas fazem apresentação cruzada para células T citotóxicas e são dependentes das células NK infiltrantes do tumor. Os autores concluíram que células NK iniciam a morte da célula tumoral por uma atividade citolítica aumentada. A apresentação cruzada dos antígenos tumorais por CDs ativadas leva a uma expansão específica dos linfócitos T citotóxicos.

Analizamos a IL-2 e o CD25 nos linfócitos T citotóxicos, demonstrando que houve estímulo dessas células pelo aumento dos marcadores avaliados após a imunoterapia com células dendríticas. Nossos resultados demonstraram, sobretudo, que a estimulação das células dendríticas *in vitro*, potencializa respostas imunes efetoras em células T citotóxicas, pois após as vacinações, observou-se aumento significativo da IL-2 nessas células ($p \leq 0,05$).

Nossos achados corroboram com a literatura. Brossart e colaboradores (2000) conduziram um estudo em pacientes com câncer de mama e ovariano avançados, vacinados com DC autólogas pulsadas com peptídeos HER-2/neu ou MUC1. A resposta antígeno-específica foi determinada pela análise da produção de IFN- γ pelos linfócitos T citotóxicos, através de citometria de fluxo. Após as três vacinas iniciais, cinco dos dez pacientes apresentaram aumento da resposta pelos linfócitos T, sendo que em dois desses pacientes, as respostas foram identificadas mesmo após seis meses da vacinação.

Estudos realizados por Avigan e colaboradores (2004), utilizando vacina de células dendríticas autólogas preparadas por fusão com o antígeno tumoral, em pacientes com câncer de mama metastático e câncer renal, demonstraram elevação da porcentagem dos linfócitos T através do aumento da expressão da citocina IFN- γ , após a exposição com o lisado tumoral, levando à indução imunológica e clínica de atividade antitumoral. Entretanto, como CDs alogênicas são dependentes da expressão de moléculas do CHP classe I para a apresentação de antígenos eficientemente, após determinado período de vacinação, houve perda da expressão de CHP classe I pelos antígenos tumorais, conhecido por um dos principais mecanismos de evasão da imunidade do hospedeiro.

Diante desses achados, novos estudos têm sido abordados a fim de potencializar a vacina de células dendríticas para uma imunogenicidade mais duradoura. Speiser e colaboradores (2010) conduziram um estudo em que a indução de respostas T citotóxicas é reforçada, mediante a apresentação antigênica pelas CDs e por estímulos inatos, como ligantes dos receptores toll-like. Nesse estudo, foi desenvolvida uma vacina contra o melanoma, a partir da ligação do peptídeo específico do melanoma (Melan-A/Mart-1) com um vírus como nanopartículas (VLPs) carregadas com um ligante para o receptor toll-like 9 (A-type CpG), para a ativação e o processamento das CDs pelos VLPs (método de transfecção de vetor em CDs). Avaliou-se 22 pacientes com melanoma e foi realizada a análise das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-2 para avaliar a função das células T, no sangue periférico por citometria de fluxo. Houve elevação significativa de células T citotóxicas, após 14 semanas de análises. A produção das citocinas também foi aumentada nas células T durante esse período, demonstrando que a vacinação resulta em estimulação de resposta em células T citotóxicas humanas com propriedades de imunoproteção a longo prazo.

No presente estudo, não houve pareamento dos pacientes em relação à idade, sexo e tipo tumoral, pois estudos desse tipo não consentem a escolha seletiva de pacientes, visto que do ponto de vista ético é permitida a realização da imunoterapia com CDs apenas em pacientes cujos recursos terapêuticos convencionais tenham se esgotado ou que se recusem a usá-los.

Contudo, nossos resultados mostram a relevância da imunoterapia com células dendríticas autólogas para pacientes com câncer avançado, pois além da otimização da resposta imune após o tratamento, estudos prévios conduzidos no Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) evidenciam uma melhora da resposta clínica com aumento da sobrevida em alguns pacientes (estudos ainda em andamento).

Outro estudo também vem sendo desenvolvido no IPON, dentro da mesma linha de pesquisa, para analisar respostas pró-tumorais, através da análise de células Treg e dos linfócitos T CD4⁺ expressando citocinas do perfil Th2, e não se observou o envolvimento dessas células após a imunoterapia com células dendríticas (estudo ainda em andamento).

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, demonstrou-se que após um período prolongado de terapia, houve uma diminuição de todas as populações celulares, de maneira mais evidente entre a oitava e décima análises. Esses achados indicam que, mesmo com a

estimulação da resposta imune inicialmente, após determinado momento, os tumores podem desenvolver novos mecanismos de evasão tumoral.

Possíveis mecanismos, que podem estar envolvidos na ineficácia da vacina com células dendríticas para o tratamento do câncer, incluem heterogeneidade das populações de CDs, uso de protocolos inadequados para a preparação da vacina, estágio de maturação incompleto e inabilidade de tráfego das CDs, mutações do antígeno tumoral, imunossupressão tumoral mediada por auto-tolerância, baixa avidéz de células T para os antígenos associados ao tumor e supressão por células T reguladoras (EVEL-KABLER e CHEN, 2006; MATHIS e BENOIST, 2004).

6 CONCLUSÃO

- Após a intervenção imunoterapêutica com células dendríticas estimuladas *in vitro* e pulsadas com antígenos tumorais específicos para cada paciente, observou-se o aumento das populações celulares de macrófagos, células NK e linfócitos T citotóxicos, por meio da avaliação das moléculas de superfície presentes nessas células (CD14+ para macrófagos, CD56+ para células NK e CD8+ para linfócitos T citotóxicos), das citocinas intracelulares expressas (IFN- γ e TNF- α para macrófagos, IL-12 para macrófagos e células NK e, IL-2 para células NK e linfócitos T citotóxicos) e do receptor de membrana CD25 (para células NK e linfócitos T citotóxicos).
- Nossos resultados confirmam, sobretudo, o aumento do potencial de resposta dos macrófagos pela expressão do TNF- α e dos linfócitos T citotóxicos, pela IL-2, após a imunoterapia com CDs.
- Esse estudo indica que, após determinado tempo de estimulação da resposta imune contra os antígenos tumorais, ocorre uma diminuição dessa resposta, mais observada entre a oitava e a décima análise celular, possivelmente, em virtude da adaptação do tumor ao estímulo imunoterapêutico dispondo-se de um novo mecanismo de evasão tumoral.

REFERÊNCIAS

ANDREESSEN, R.; SCHEIBENBOGEN, C.; BRUGGER, W. et al. Adoptive transfer of tumor cytotoxic macrophages generated in vitro from circulating blood monocytes: a new approach to cancer immunotherapy. **Cancer Research**. v. 50, n. 23, p. 7450-6, 1990.

AROSA, F.A.; CARDOSO, E.M. Linfócitos T. In:_____. **Fundamentos de Imunologia**. Ed. Lidel. Lisboa, 2007. cap. 8, p. 123-145.

AVIGAN, D.; VASIR, B.; GONG, J. et al. Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cancer induces immunological and clinical responses. **Clinical Cancer Research**. v. 15, n. 10, p.4699-708, 2004.

AWASTHI, A.; KUCHROO, V.K. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. **International Immunology**. V. 21, n. 5, p. 489-498, 2009.

BALLESTRERO, A.; BOY, D.; MORAN, E. et al. Immunotherapy with dendritic cells for cancer. **Advanced Drug Delivery Review**. v.60, p. 173-183, 2008.

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

BARONZIO, G.; FIORENTINI, G.; COGLE, C.R. **Cancer Microenvironment and Therapeutic Implications: Tumor Pathophysiology Mechanisms and Therapeutic Strategies**. In: BARONZIO, G.; FREITAS, I.; FIORENTINI, G.; CRUGNOLA, A.R.; HAGER, D., CEPPODOMO, D.; KISELEVSKY, M.V. 1a. Ed. Springer, 2009, c. 9, p. 157.

BASKIC, D.; ACIMOVIC, L.; SAMARDZIC, G. et al. Blood monocytes and tumor associated macrophages in human cancer: differences in activation levels. **Neoplasma**. v.48, p. 169–174, 2001.

BAXEVANIS, C.N.; PEREZ, S.A.; PAPAMICHAIL, M. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. **Cancer Immunology Immunotherapy**. v. 58, n. 3, p. 317-24, 2009.

BEVAN, M.J. Interaction antigens detected by cytotoxic T cells with the major histocompatibility complex as modifier. **Nature**. v. 256, n. 5516, p. 419-421, 1975.

BIRON, C.A.; NGUYEN, K.B.; PIEN, G.C. et al. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. **Annual Review Immunology**. v.17, p. 189–220, 1999.

BISWAS, S.K.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. **Nature Immunology**. v.11, p.889 – 896, 2010.

BLANKENSTEIN, T. The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. **Current Opinion in Immunology**. v. 17, p. 180–186, 2005.

BOEHM, U.; KLAMP, T.; GROOT, M.; HOWARD, J.C. Cellular responses to interferon-gamma. **Annual Review of Immunology**. v. 15, p. 749-795. 1997

BORG, C.; JALIL, A.; LADERACH, D. et al. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. **Blood**. v. 104, n. 10, p. 3267-3275, 2004.

BROSSART, P.; WIRTHS, S.; STUHLER, G. et al. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. **Blood**. v. 96, n. 9, p. 3102-3108, 2000.

BURNET, M. Cancer: a biological approach. I. The processes of control. **British Medical Journal**. v. 1, n. 5022, p. 779–786, 1957.

CALIGIURI, M.A. Human natural killer cells. **Blood**. v.112, n.3, p.461-469, 2008.

CELLA, M.; SALLUSTO, F; LANZAVECCHIA, A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. **Current Opinion in Immunology**. v. 9, n.1, p.10-16, 1997.

CHEN, J.J.; LIN, Y.C.; YAO, P.L. et al. Tumor associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. **Journal of Clinical Oncology**. v. 23, n. 5, p. 953–964, 2005.

COCA, S.; PEREZ-PIQUERAS, J.; MARTINEZ, D. et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. **Cancer**. v. 79, n. 12, p. 2320-2328. 1997.

COOLS, N.; PONSARTS, P.; VAN TENDELOO, V.F.I.; BERNEMAN, Z. N. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 82, n. 6, p. 1365-1374, 2007.

COOPER, M.A.; FEHNIGER, T.A.; CALIGIURI, M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. **Trends in Immunology**. v. 22, n. 11, p. 633-640, 2001.

DAO, T.; GOMEZ-NUNEZ, M.; ANTCZAK, C. et al. Natural killer cells license dendritic cell cross-presentation of B lymphoma cell--associated antigens. **Clinical Cancer Research**. v. 11, p. 8763-72, 2005.

De VISSER, K.E., EICHTEN, A., COUSSENS, L.M. Paradoxical Roles of the Immune System During Cancer Development. **Nature Reviews. Cancer**. v. 6, n. 1, p. 24-37, 2006.

DILEEPAN, K.N.; PAGE, J.C.; LI, Y.; STECHSCHULTE, D.J. Direct activation of murine peritoneal macrophages for nitric oxide production and tumor cell killing by interferon-gamma. **Journal Interferon Cytokine Research**. v. 5, p. 387-394, 1995.

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

ELLERY, J.M.; NICHOLLS, P.J. Alternate signalling pathways from the interleukin-2 receptor. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. v. 13, n. 1, p. 27-40, 2002.

ELNEMR, A.; OHTA, T.; YACHIE, A. et al. N-ethylmaleimide-enhanced phosphatidylserine externalization of human pancreatic cancer cells and immediate phosphatidylserine mediated phagocytosis by macrophages. **International Journal of Oncology**. v. 16, n. 6, p. 1111-1116, 2000.

ENZLER, T.; GILLESSEN, S.; MANIS, J.P. et al. Deficiencies of GM-CSF and interferon-gamma link inflammation and cancer. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 197, p. 1213-1219, 2003.

EVEL-KABLER, K.; CHEN, S.Y. Dendritic cell-based tumor vaccines and antigen presentation attenuators. **Molecular Therapy**. v. 13, n. 5, p. 850-858, 2006.

EYERICH, S.; EYERICH, K.; PENNINO, D.; et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 119, n. 12, p. 3573-3585, 2009.

FEHNIGER, T.A.; COOPER, M.A.; NUOVO, G.J. et al. CD56 bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. **Blood**. v. 101, n. 8, p. 3052-3057, 2003.

FELTKAMP, M. C.; VREUGDENHIL, G. R.; VIERBOOM, M. P. et al. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. **European Journal of Immunology**. v. 23, n. 9, p. 2242–2249, 1993.

FERNANDEZ, N.C.; LOZIER, A.; FLAMENT, C. et al. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. **Nature Medicine**. v. 5, p. 405–411, 1999.

FERRANTINI, M.; CAPONE, I.; BELARDELLI, F. Dendritic cells and cytokines in immune rejection of cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. v. 19, p. 93-107, 2007.

FONG, L.; ENGLEMAN, E.G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. **Annual Reviews Immunology**. v. 18, p. 245-273, 2000.

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

GEISSMANN, F.; MANZ, M.G.; JUNG, S. et al. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. **Science**. v. 327, n. 5966, p. 656-661, 2010.

GUERMONPREZ, P.; SAVEANU, L.; KLEIJMEER, M. et al. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. **Nature**. v. 425, p. 397-402, 2003.

HEATH, W.R.; BELZ, G.T.; BEHRENS, G.M. et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. **Immunological reviews**. v. 199, p. 9-26, 2004.

HENNEMANN, B.; SCHEIBENBOGEN, C.; ANDREESEN, R. Biological response to intrahepatic adoptive immunotherapy with autologous interferon activated macrophages. **European Journal of Cancer**. v. 31A, n. 5, p. 852, 1995.

HOLLSTEIN, M.; SIDRANSKY, D.; VOGELSTEN, B. P53 mutations in human cancers. **Science**. v. 253, p. 49-53, 1991.

HOUDE, M.; BERTHOLET, S.; GAGNON, E. et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. **Nature**. v. 425, p. 402-406, 2003.

HUNG, C.F.; MONIE, A.; ALVAREZ, R.D.; WU, T.C. DNA vaccines for cervical cancer: from bench to bedside. **Experimental & Molecular Medicine**. v. 39, n. 6, p. 679-89, 2007.

HUSSAIN, S.P; HARRIS, C.C. Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. **Mutation Research**. v. 462, p. 311-322, 2000.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>>. Acesso em 18/07/2010.

ISHIGAMI, S.; NATSUGOE, S.; TOKUDA, K. et al. Clinical impact of intratumoral natural killer cell and dendritic cell infiltration in gastric cancer. **Cancer Letters**.; v.159, p. 103-108, 2000.

JEFFORD M, MARASKOVSKY E, CEBON J, DAVIS I D. The use of dendritic cells in cancer Therapy. **The Lancet Oncology**. v. 2, p. 343-353, 2001.

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

JONJIC, N.; ALBERTI, S.; BERNASCONI, S. et al. Heterogeneous susceptibility of human melanoma clones to monocyte cytotoxicity: role of ICAM-1 defined by antibody blocking and gene transfer. **European Journal of Immunology**. v. 22, p. 2255-2260, 1992.

JOSEPH C.S.; LEWIS L.L. Natural killer cells remember: An evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? **European Journal of Immunology**. v. 39, n. 8, p. 2059-2064, 2009.

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, p. 35-40, 2006.

KAPLAN, D.; SHANKARAN, V.; DIGHE, A.S. et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. **The Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 95, p. 7556-7561, 1998.

KARIN, M.; GRETEN, F.R. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews Immunology**. v.5, p. 749–759, 2005.

KELLEHER, P.; KNIGHT, S.C. IL-12 increases CD80 expression and the stimulatory capacity of bone marrow-derived dendritic cells. **International Immunology**. v. 10, n. 6, p. 749–755, 1998.

KIESSLING, R.; KLEIN, E.; PROSS, H.; WIGZELL, H. Natural killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. **European Journal of Immunology**. v. 5, p.117–121, 1975.

KIM, H.P.; IMBERT, J.; LEONARD, W.J. Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system. **Cytokine & Growth Factor Reviews**. v. 17, n. 5, p. 349-366, 2006.

KLIMP, A.H.; DE VRIES, E.G.; SCHERPHOF, G.L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 44, n. 2, p. 143-161, 2002.

KOYAMATSU, Y.; YOKOYAMA, M.; NAKAO, Y. et al. A comparative analysis of Human papillomavirus types 16 and 18 and expression of p53 gene and Ki-67 in cervical, vaginal and vulvar carcinoma. **Gynecology Oncology**. v.90, p. 547-551, 2003.

LAMB, P.; CRAWFORD, L. Characterization of the human p53 gene. **Molecular Cell Biology**. v. 6, p. 1379–1385, 1986.

LANGENKAMP, A.; MESSI, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. **Nature Immunology**. v. 1, p. :311–316, 2000.

LANGERHANS, P. Uber die Nerven der menschlichen Haut. **Virchow Archives of Pathological Anatomy and Histology**. v. 44, p. 325–337, 1868.

LAUWERYS, B.R.; RENAULD, J.C.; HOUSSIAU, F.A. Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin-12 and interleukin-18. **Cytokine** v. 11, n. 11, p. 822–830, 1999.

LEHRNBECHER, T.; KOEHL, U.; WITTEKINDT, B. et al. Changes in host defense induced by malignancies and antineoplastic treatment: implication for immunotherapeutic strategies. **The Lancet Oncology**. v. 9, p. 269-278, 2008.

LIAKOU, C.I.; NARAYANAN, S.; TANG, D. et al. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human bladder cancer. **Cancer Immunology**. v. 26, p.7–10, 2007.

LIN, H.H.; RAY, S.; TONGCHUSAK, S. et al. Evaluation of MHC class I peptide binding prediction servers: applications for vaccine research. **BMC Immunology**. v. 16, n.9, p.8, 2008.

LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**. v. 362, p. 709–715, 1993.

LIU, C.; LOU, Y.; LIZÉE, G. et al. Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 118, n. 3, p. 1165-1175, 2008.

LOEB, L.A.; HARRIS, C.C. Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective. **Cancer Research**, v. 68, p. 6863-6872, 2008.

LOOSE, D.; VAN DE WIELE, C. The immune system and cancer. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**. v. 24. N. 3, p. 369-376, 2009.

MALUF, P.J.; MICHELIN, M.A.; ETCHERBEHERE, R.M. et al. T lymphocytes (CD3) may participate in the recurrence of cervical intraepithelial neoplasia grade III. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 278, p. 525-530, 2008.

MANTOVANI, A.; BOTTAZZI, B.; COLOTTA, F. et al. The origin and function of tumor associated macrophages. **Immunology Today**. v. 137, p. 265–270, 1992.

MATHIS, D.; BENOIST, C. Back to central tolerance. **Immunity**. v. 20, p. 509-516, 2004.

MICALLEF, M.J.; OHTSUKI, T.; KOHNO, K. et al. Interferon- γ -inducing factor enhances T helper cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-production. **European Journal of Immunology**. v.26, n. 7, p. 1647–1651, 1996.

MONNIER-BENOIT S.; MAUNY, F.; RIETHMULLER, D. et al. Immunohistochemical analysis of CD4+ and CD8+ T-cell subsets in high risk human papillomavirus-associated pre-malignant and malignant lesions of uterine cervix. **Gynecology Oncology**. v. 102, p. 22-31, 2006.

MORELLI, A.E.; HACKSTEIN, H.; THOMSON, A.W. Potential of tolerogenic dendritic cells for transplantation. **Seminars in Immunology**. v.13, p. 323-335, 2001.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **The Journal of Immunology**. v. 136, p. 2348–2357, 1986.

NEUMANN, C; SORG, C. Immune interferon. I. Production by lymphokine-activated murine macrophages. **European Journal of Immunology**. v. 7, n. 10, p. 719-725, 1977.

PENG, S.; TOMSON, T.; TRIMBLE, C. et al. Development of a DNA vaccine targeting HPV-16 oncogenic protein E6. **The Journal of Virology**. v. 78, p. 8468-8476, 2004.

PULENDRAN, B.; SMITH, J.L.; CASPARY, G. et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. **The Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 96, n. 3, p.1036-1041, 1999.

QI, C.F.; NIERODA, C.; De FILIPPI R. et al. Macrophage colonystimulating factor enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity against human colon carcinoma cells. **Immunology Letters**. v. 47, n.1-2, p.15-24, 1995.

RABINOVICH, G.A.; GABRILOVICH, D.; SOTOMAYOR, E.M. Immunosuppressive Strategies that are Mediated by Tumor Cells. **Annual Reviews Immunology**. v. 25, p. 267-96, 2007.

ROBINSON, D.; SHIBUYA, K.; MUI, A. et al. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon- γ production and activates IRAK and NF- β B. **Immunity**. v. 7, n. 4, p. 571-81, 1997.

ROSENBERG, S.A.; WHITE, D.E. Vitiligo in patients with melanoma: normal tissue antigens can be targets for cancer immunotherapy. **Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology**. v. 19, n.1, p. 81–84, 1996.

ROTH, W.; ISENMANN, S.; NAKAMURA, M. et al. Soluble decoy receptor 3 is expressed by malignant gliomas and suppresses CD95 ligand-induced apoptosis and chemotaxis. **Cancer Research**. v. 61, p. 2759–2765, 2001.

SANCHEZ, C.J.; LE TREUT, T.; BOEHRER, A. et al. Natural killer cells and malignant haemopathies: a model for the interaction of cancer with innate immunity. **Cancer Immunology, Immunotherapy**. 2010.

SCHNURR, M.; CHEN, Q.; SHIN, A. et al.. Tumor antigen processing and presentation depends critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. **Blood**. v. 105, p. 2465-2472, 2004.

SCHWARTZ, R.H. A cell culture model for T cell anergy. **Science**. v.248, p. 1349-1356, 1990.

SERAFINI, P.; CARBLEY, R.; NOOMAN, K.A.; BORRELLO, I. High-Dose Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Producing Vaccines Impair the Immune Response through the Recruitment of Myeloid Suppressor Cells. **Cancer Research**. v. 64, p. 6337-6343, 2004.

SHAW, G.M.; LEVY, P.C.; LOBUGLIO, A.F. Human monocyte antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to tumor cells. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 62, n. 6, p. 1172-1180, 1978.

SHI, Y.; EVANS, J.E.; ROCK, K.L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. **Nature**. v.425, p. 516-521, 2003.

SHIH, H.; NATHANSON K.; SEAL. S. et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer families with multiple primary cancers. **Clinical Cancer Research**. v. 6, p. 4259–4264, 2000.

SHORTMAN, K.; LIU, Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nature Reviews Immunology**. v.2, p. 151-161, 2002.

SHURIN, M.R.; SALTER, R.D. **Dendritic cells in Cancer**. 1a. Ed. Springer, 2009.

SOMBROEK, C.C.; STAM, A.G.; MASTERSON, A.J. et al. Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation. **The Journal of Immunology**. v. 168, n. 9, 4333-4343, 2002.

SPEISER, D.E.; SCHWARZ, K.; BAUMGAERTNER, P. et al. Memory and effector CD8 T-cell responses after nanoparticle vaccination of melanoma patients. **Journal of Immunotherapy**. v. 33, n. 8, p. 848-858, 2010.

STEINMAN, R.M.; COHN, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 137, p. 1142–1162, 1973.

STEINMAN, R.M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWEIG, M.C. Tolerogenic dendritic cells. **Annual Review of Immunology**. v.21, p. 685-711, 2003.

SUMINOE, A.; MATSUZAKI, A.; HATTORI, H.; KOGA, Y.; HARA, T. Immunotherapy with autologous dendritic cells and tumor antigens for children with refractory malignant solid tumors. **Pediatric Transplantation**. v. 6, p. 746-753, 2009.

THOMAS, L. Reactions to homologous tissue antigens in relation to hypersensitivity. Cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. **Editado por Lawrence, H.S. Hoeber-Harper**, Nova York. p. 529–532, 1959.

TILLMAN, B.; HAYES, T.; DeGRUIJL, T. et al. Adenoviral vectors targeted to cd40 enhance the efficacy of dendritic cell-based vaccination against human papillomavirus 16-induced tumor cells in a murine model. **Cancer Research**. v. 60, p. 5456-5463, 2000.

TOEBAK, M.J.; GIBBS, S.; BRUYNZEEL, D.P. et al. Dendritic cells: biology of the skin. **Contact Dermatitis**. v. 60, p. 2-20, 2009.

USUBÜTÜN, A.; AYHAN, A.; UYGUR, M.C. et al. Prognostic factors in renal cell carcinoma. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**. v. 17, p. 77-81, 1998.

UTSUGI, T.; SCHROIT, A.J.; CONNOR, J. et al. Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. **Cancer Research**. v. 51, p. 3062-3066, 1991.

VAN DER BRUGGEN, P.; ZHANG, P.; CHAUX, V. et al. Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. **Immunology Reviews**. v. 188, p. 51-64, 2002.

Van FURTH R.; COHN Z.A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 128, n. 3, p. 415-435, 1968.

VELDHOEN, M.; UYTENHOVE, C.; VAN SNICK, J. 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, p. 1341-1346, 2008.

WEBB D.S.; MOSTOWSKI, H.S.; GERRARD, T.L. Cytokine-induced enhancement of ICAM-1 expression results in increased vulnerability of tumor cells to monocyte-mediated lysis. **The Journal of Immunology**. v.146, p. 3682-3686, 1991.

WEISZ, L.; OREN, M.; ROTTER, V. Transcription regulation by mutant p53. **Oncogene**. v. 26, p. 2202-2211, 2007.

WESTENFELDER, U.; SCHRAVEN, B.; MANNEL, D.N. Characterization of monocyte-activating tumour cell membrane structures. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 38, p. 388-394, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2008**. Geneva , 2008. Cap.1, p. 21 (1:112).

WRIGHT S.D.; RAMOS, R.A.; TOBIAS, P.S. et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. **Science**. v. 249, p. 1431-1433, 1990.

YOO, J.K.; CHO, J.H.; LEE, S.W.; SUNG, Y.C. IL-12 provides proliferation and survival signals to murine CD4₊ T cells through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. **The Journal of Immunology**. v.169, p. 3637-3643, 2002.

YOON, S.R.; CHUNG, J.W.; CHOI, I. Development of natural killer cells from hematopoietic stem cells. **Molecules and Cells**. v. 24, n.1, 1-8. 2007.

YU, P.; FU, Y.X. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? **Laboratory Investigation**. v. 86, n. 3, p. 231-45, 2006.

ZAMAI, L.; AHMAD, M.; BENNETT, I.M. et al. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. **Journal of Experimental Medicine**. v. 188, p. 2375-2380, 1998.

ANEXO A – Cópia do aceite do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM (683-2006/CEP).



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


13/06/08
João Batista Ribeiro
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM


ANEXO B – Modelo do 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**”. 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 imunoterapêutico. 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

Documento de Identidade

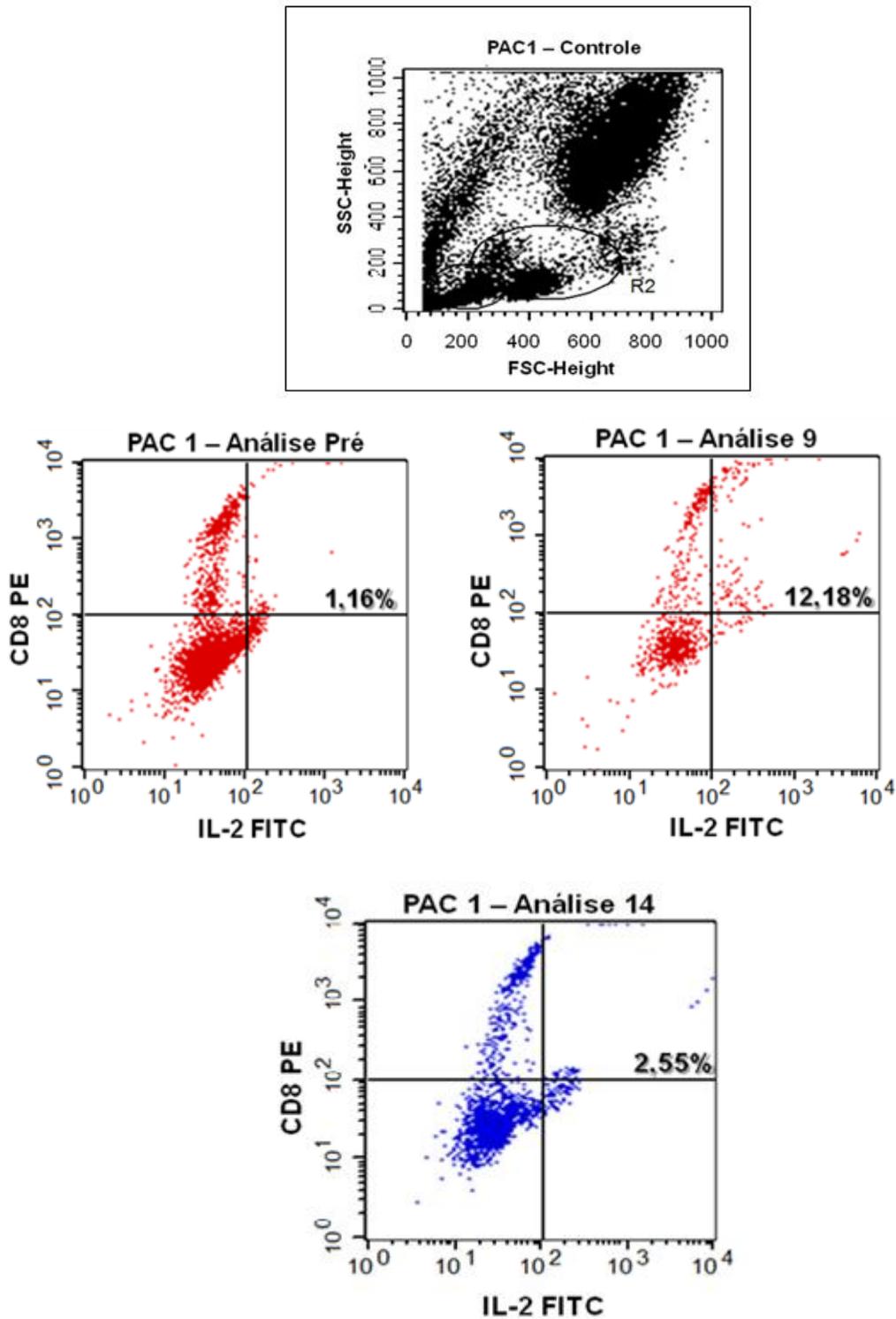
Assinatura do pesquisador responsável
Prof. Dr. Eddie Fernando Candido Murta

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.

ANEXO C – Modelo da análise por citometria de fluxo.

Paciente 1: Avaliação da porcentagem de fluorescência nos linfócitos T citotóxicos, através da dupla marcação CD8⁺ IL-2⁺, nas análises da pré-terapia, pós-terapia 9 e 14.



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](#)