

SOFIA BEVILÁQUA DE CASTRO

**Influência do meio condicionado por células de carcinoma epidermoide de
língua sobre linfoblastos e células mononucleares do sangue periférico**

São Paulo

2018

SOFIA BEVILÁQUA DE CASTRO

**Influência do meio condicionado por células de carcinoma epidermoide de
língua sobre linfoblastos e células mononucleares do sangue periférico**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientador: Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Castro, Sofia Beviláqua de.

Influência do meio condicionado por células de carcinoma epidermoide de língua sobre linfoblastos e células mononucleares do sangue periférico / Sofia Beviláqua de Castro ; orientador Fábio Daumas Nunes . -- São Paulo, 2018.

87 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Carcinoma epidermoide. 2. Células mononucleares do sangue periférico. 3. Linfoblastos. 4. Citocinas. 5. Meio condicionado. 6. Diferenciação celular. I. Nunes, Fábio Daumas. II. Título.

Castro SB. Influência do meio condicionado por células de carcinoma epidermoide de língua sobre linfoblastos e células mononucleares do sangue periférico. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 22/10/2018

Banca examinadora

Prof^a. Dra. Luciana Corrêa

Instituição: Faculdade de Odontologia da USP

Julgamento: Aprovada

Prof^a. Dra. Ana Paula Ligeiro de Oliveira

Instituição: Universidade Nove de Julho

Julgamento: Aprovada

Prof^a. Dra. Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues

Instituição: Universidade Nove de Julho

Julgamento: Aprovada

Dedico este trabalho à minha filha, Stella, minha motivação, amiguinha e companheira de estudos desde o início da graduação até aqui. Sendo paciente e compreensiva em momentos que precisei estar ausente.

AGRADECIMENTOS

A toda minha família, que, apesar dos desentendimentos, sempre permaneceu unida e buscando apoiar quem precisasse.

Aos meus amados avós, Eli e Ézer, que sempre me apoiaram.

A minha mãe, Ézer Maira, por ter me incentivado a ingressar na pós-graduação.

Aos meus irmãos, Alice, Pedro, Tiago e Paulo, por serem meus companheiros e amigos em momentos que a vida se mostrou difícil.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes, por ter me recebido de braços abertos quando me interessei pela pesquisa. Obrigada pelos ensinamentos, pela compreensão e paciência. Saiba que é uma inspiração para mim, um exemplo do que almejo ser como pessoa.

A minha co-orientadora e amiga, Lucyene Miguita, que sempre me ajudou e me ensinou desde o bê-a-bá do laboratório até aqui. Esse trabalho não seria possível sem você. Obrigada pelos conselhos e por sua amizade.

A Prof^a. Dra. Ana Paula Ligeiro, do Laboratório de Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho, pelo fornecimento das placas de ELISA e anticorpos para citometria de fluxo, e colaboração fundamental para este trabalho. Assim como sua aluna, Léia Britto, que ajudou na realização dos ensaios de ELISA.

A Prof^a Dra. Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues, do Laboratório de Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho, pelo fornecimento das PBMCs utilizadas para a pesquisa e por toda a contribuição para a minha formação na pós-graduação.

A todos os Professores do Departamento (Prof. Décio Santos P. Jr; Prof^a Karen Ortega, Prof^a Luciana Corrêa; Prof^a Marília Trierveiler; Prof^a Marina Gallotiini; Prof. Paulo Braz; Prof^a Suzana Orsini).

Aos funcionários da secretaria, Vinícius e Carlito, e dos laboratórios, Adriana, Edna, Elisa e Juvani. Obrigada por todo suporte.

Aos amigos do nosso grupo de pesquisa, Daniele Heguedusch, Emília Aguiar, Guilherme Trafani, Letícia Tonin, Marcos Custódio e Robson Cordeiro. Obrigada por toda ajuda e por tornarem nossos dias de laboratório mais leves e divertidos.

Aos amiguinhos da pós (Jefferson, Karine, Letícia D., Mariana, Paulo, Rayza, Rodrigo, Stephanie e Wellington) pela ajuda, conversas e risadas.

Às minhas amigas, Mariela Eugênia, Gabi Soares e Keith Berardinelli, pelos momentos de descontração, pelas conversas e conselhos.

A Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de estudo, aprendizado e crescimento.

A CNPq e CAPES, pelo financiamento dessa pesquisa.

Aos pacientes e doadores de material biológico, que contribuem para o progresso da ciência.

“Nós somos o caminho para o cosmos conhecer a si mesmo” Carl Sagan

RESUMO

Castro SB. Influência do meio condicionado por células de carcinoma epidermoide de língua sobre linfoblastos e células mononucleares do sangue periférico [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

O carcinoma epidermoide é a neoplasia maligna mais comum em boca e está entre as principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, devido a seu comportamento agressivo, evoluindo à metástase loco regional e a distância. O microambiente tumoral contém numerosos tipos celulares e muita atenção tem sido dada na literatura científica sobre a participação das células inflamatórias no desenvolvimento e progressão do câncer, pois as células neoplásicas são capazes de subverter a resposta imune. Os linfócitos T são o componente central na imunidade antitumoral, através da produção de citocinas por células e morte celular. Pouco se sabe sobre como substratos derivados de células neoplásicas influenciam as células no microambiente tumoral. Assim, o presente estudo propôs analisar a influência do meio condicionado derivado de células de carcinoma epidermoide de língua (SCC4 e MC SCC9) sobre linfoblastos (CEM) e células mononucleares do sangue periférico (PBMC-A e PBMC-B) para compreender melhor seu papel na imunidade anti-tumoral, imunoedição e evasão imune. Após estimulação com meio condicionado, os linfoblastos e as PBMCs foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular, de citometria de fluxo e RT-qPCR para analisar a expressão de genes de apoptose e citocinas. O meio condicionado também foi coletado e avaliado por ELISA para verificar as citocinas secretadas pelas SCCs, bem como pela CEM e PBMC. Ambos meios condicionados foram capazes de reduzir a viabilidade da CEM e das PBMCs. A expressão de *BCL2* e *BAK* não foi afetada na CEM, enquanto que MC SCC4 aumentou a expressão de *BAK* na PBMC-B. Os MCs das SCCs apresentaram expressão reduzida de IL-1 β , IL-10 e INF- γ . A IL-6 e IL-8 são expressas em níveis um pouco maiores pela SCC4 e superexpressas pela SCC9. A linhagem CEM não apresentou expressão de RNAm de IL-6, enquanto que a PBMC-B apresentou redução da expressão de IL-6 quando cultivada com ambos meios, sendo significativa com o meio MC SCC9. A expressão de RNAm de IL-8 reduziu na CEM e aumentou na PBMC-B com ambos os meios. A diferenciação para células CD4⁺ aumentou com

ambos os MCs nas duas linhagens, reduzindo células CD34⁺. O MC SCC4 não alterou o número de linfócitos T CD4⁺/FOXP3⁺ da CEM e PBMC-B. O MC SCC9 induziu aumento da população CD4⁺/CD8⁺ na PBMC-B e ambos os MCs induziram aumento da população CD8⁺/FOXP3⁺ da PBMC-B. Os resultados sugerem que os produtos derivados de carcinoma epidermoide de língua podem variar nas linhagens celulares, reduzindo a viabilidade, alterando a expressão de citocinas e aumentando as células CD4⁺ nas duas linhagens e aumentando o perfil CD8⁺/FOXP3⁺ e CD4⁺/CD8⁺ nas PBMCs.

Palavras-chave: Carcinoma epidermoide. Células mononucleares do sangue periférico. Linfoblastos. Citocinas. Meio condicionado. Diferenciação celular.

ABSTRACT

Castro SB. Influence of conditioned medium from squamous cell carcinoma of the tongue on lymphoblasts and peripheral blood mononuclear cells [Dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

Squamous cell carcinoma is the most common malignant neoplasm of the oral cavity, featuring as one of the main causes of morbidity and mortality due to its aggressive behavior, locoregional and distant metastases. Attention has been given to the tumor microenvironment and the role of the inflammatory cells may develop in the progression of cancer, because neoplastic cells are capable of subverting the immune response. T cells play a central actor in the antitumor immunity because of their cytokine production by living and dying cells. Little is known about how the products derived from neoplastic cells interact with the cells in the tumor microenvironment. Therefore, the present study aimed to analyze the influence of a conditioned medium (CM) derived from tongue squamous carcinoma cells (SCC4 and SCC9) on lymphoblasts (CEM) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC-A e PBMC-B), in order to better understand its role in the antitumor immunity, immunoediting and immune evasion. Lymphoblast and PBMCs were stimulated by the conditioned medium and then submitted to a cell viability assay, flow cytometry and RT-qPCR in order to analyze the expression of apoptotic and cytokine-related genes. To verify which cytokines were secreted by SCCs as well as by CEM and PBMCs, the conditioned medium was also collected and evaluated by ELISA. Both types of conditioned medium reduced CEM and PBMC viability. For CEM, *BCL2* and *BAK* expression remained unaffected, whereas for PBMC-B there was an increase in the expression of *BAK* using the CM-SCC4. CMs showed reduced expression of IL-1 β , IL-10 and INF- γ . IL-6 and IL-8 are expressed at a bit higher levels by SCC4 and high expressed by SCC9. CEM showed no IL-6 mRNA expression. PBMC-B reduced the expression of IL-6 when cultivated with both types of CM, with a significant reduction with the CM-SCC9. For both types of medium, IL-8 mRNA was reduced in CEM and increased in PBMC-B. The differentiation towards CD4⁺ cells was increased with both MCs in the two cell lines. CM-SCC4 did not alter the number of CD4⁺/FOXP3 cells of CEM and PBMC-B. CM-SCC9 increased the population of CD4⁺/CD8⁺ cells of

PBMC-B and both types of CM increased the population of CD8⁺/FOXP3⁺ of PBMC-B. Collectively, our results suggest that the products derived from tongue squamous cell carcinoma may vary between the cell lines and reduce the viability, change cytokine expression and increase CD4⁺ cells and also increase the population of CD8⁺/FOXP3⁺ and CD4⁺/CD8⁺ in PBMCs.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Peripheral blood mononuclear cells. Lymphoblasts. Cytokines. Conditioned medium. Cell differentiation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	7-Aminoactinomicina D
BAD	Antagonista de BCL2 de morte celular (do inglês, BCL2 antagonist of cell death)
BAK	Assassino 1 antagonista de BCL2 (do inglês, BCL2 antagonist killer 1)
BCL2	Linfoma 2 de células B (do inglês, B cell lymphoma 2)
CAFs <i>fibroblast</i>)	Fibroblasto associado ao câncer (do inglês, <i>Cancer-associated fibroblast</i>)
CD	Grupamento de diferenciação (do inglês, <i>Cluster of Differentiation</i>)
cDNA	DNA complementar
CE	Carcinoma epidermoide
CECP	Carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço
CO ₂	Dióxido de carbono
CTLA-4	Antígeno 4 associado com linfócito T citotóxico (do inglês, <i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>)
CTLs	Linfócitos T citotóxicos (do inglês <i>Cytotoxic T lymphocytes</i>)
CTRL	Controle
DC	Células dendríticas (do inglês, <i>Dendritic cells</i>)
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco (do inglês, <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
EMT <i>transition</i>)	Transição epitélio-mesênquima (do inglês, <i>epithelial-mesenchymal transition</i>)
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FasL	Fas ligante (do inglês, <i>Fas ligand</i>)
FOXP3	Caixa cabeça de garfo P3 (do inglês, <i>Forkhead box P3</i>)

GITR	Receptor de fator de necrose tumoral induzido por glicocorticóide (do inglês, <i>Glucocorticoid-induced tumor necrosis fator receptor</i>)
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (do inglês, <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
HC	Hidrocortisona
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
ILCs	Células linfoides inatas (do inglês <i>Innate lymphoid cells</i>)
LB	Linfócitos B
LT	Linfócitos T
MC	Meio condicionado
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade (do inglês <i>Major histocompatibility complex</i>)
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês, <i>messenger Ribonucleic acid</i>)
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas (do inglês, <i>Nuclear factor of activated T-cells</i>)
NF- κ B	Fator nuclear kappa-B (do inglês, <i>Nuclear factor kappa B</i>)
NK	Assassinas naturais (do inglês, <i>Natural Killer</i>)
NO	Óxido nítrico
P	Probabilidade de significância
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, <i>Pathogen-associated molecular</i>)
Pb	Pares de bases
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico (do inglês, <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>)
RT-qPCR	Quantificação em tempo real da reação da polimerase em cadeia (do inglês, <i>Real time quantitative Polymerase chain reaction</i>)
SCC	Célula de carcinoma epidermoide (do inglês, <i>Squamous cell carcinoma</i>)
SFB	Soro fetal bovino

SOCS	Supressores de sinalização de citocinas (do inglês, <i>Suppressor of cytokine signaling</i>)
STAT3	Transdutor de sinais e ativador da transcrição 3 (do inglês, <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>)
TAM-M2	Macrófagos do tipo M2 associados ao tumor (do inglês, <i>Tumor-associated macrophages M2</i>)
TCR	Receptor de célula T (do inglês, <i>T cell receptor</i>)
TGF- β	Fator de transformação do crescimento- β (do inglês, <i>Transforming growth factor</i>)
Th	T auxiliares (do inglês, <i>T helper</i>)
TILs	Linfócitos infiltrantes de tumor (do inglês, <i>Tumor-infiltrating lymphocytes</i>)
TME	Microambiente tumoral (do inglês, <i>Tumor Microenvironment</i>)
TNFR	Receptor para TNF- α (<i>TNF-α receptor</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral (do inglês, <i>Tumor necrosis factor-α</i>)
TREGS	T reguladores

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Kappa
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
μL	Microlitros
mL	Mililitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	25
3	PROPOSIÇÕES	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
5	RESULTADOS	47
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS.....	75
	ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	83
	ANEXO B – Carta de cessão de células	87

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, causando mais mortes do que as doenças cardíacas e o acidente vascular cerebral(1). Dados da série Globocan, da “International Agency for Research on Cancer” (IARC), apontaram 14,1 milhões de casos novos e 8,2 milhões de mortes por câncer nos 5 continentes, em 2012, indicando um aumento de 20 milhões de ocorrências para 2025 (2). Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa para o Brasil nos anos de 2018/2019 é de 420 mil novos casos por ano, excetuando os casos de câncer de pele não-melanoma(3). Os cânceres de lábio e cavidade oral representaram 2,1% (300 mil) dos casos novos de câncer no mundo, em 2012, sendo que dois terços ocorreram em indivíduos do sexo masculino. No Brasil, estima-se que a incidência em 2018/2019 chegue a 11.200 mil em homens e 3.500 em mulheres(3).

O carcinoma epidermoide (CE) é a neoplasia maligna mais comum em boca(4), compreendendo aproximadamente 90% dos cânceres dessa região(5), sendo mais comum em língua e assoalho bucal (6,7). A taxa de incidência varia entre os países e, pode variar de região para região dentro de um mesmo país, devido às diferenças culturais, socioeconômicas, acesso à educação em saúde e ao atendimento médico(4). No que se refere aos fatores de risco para o desenvolvimento de CE, autores demonstraram haver relação entre diversos aspectos. Pacientes fumantes e etilistas apresentam um risco maior para seu desenvolvimento(5,7,8), devido ao potencial carcinogênico destas substâncias(9). Mas o uso concomitante aumenta ainda mais este risco, podendo chegar a 100 vezes mais(4), devido ao efeito sinérgico desta associação(10). Quanto ao sexo, verifica-se na literatura certa controvérsia, entretanto, estudos indicam o aumento da ocorrência em mulheres(4,5), provavelmente, devido à mudança de comportamento e aumento da exposição das mulheres ao fumo e ao consumo de álcool(11). No quesito idade, há maior prevalência e pior prognóstico para os pacientes com mais de 45 anos(4,5,8).

Apesar dos avanços nas pesquisas sobre CE, a sobrevida dos pacientes não apresentou significativa melhora nos últimos anos(12). O tratamento para essa doença ocasiona alta morbidade para os pacientes, levando a perdas funcionais e estéticas. Além disso, a falha no tratamento e recidiva locorregional ocorre em aproximadamente 30% dos casos, levando a óbito a maioria dos pacientes(13).

Para melhor compreensão do carcinoma epidermoide, é necessário compreender a interação entre os componentes do microambiente onde ele se desenvolve, o microambiente tumoral (TME). O TME é composto por células e seus produtos(12). Dentre os componentes celulares, o TME é composto pelas células neoplásicas em si, fibroblastos associados ao câncer (CAFs), endoteliócitos, bem como as células do sistema imune, tais como células dendríticas (DCs), neutrófilos associados ao tumor, células mielóides supressoras (MDSC), células assassinas naturais (NK), macrófagos associados ao tumor (TAMs), linfócitos B e T(14). A comunicação entre esses componentes se dá através das citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, enzimas histolíticas e proteínas remodeladoras da matriz extracelular (MEC), que juntas modulam a carcinogênese(15).

Apesar do sistema imunológico representar uma importante função fisiológica no reconhecimento e eliminação de células transformadas, está clara a participação desse sistema no desenvolvimento e progressão tumoral, visto que mecanismos liderados pelas células neoplásicas são capazes de subverter a resposta imune levando a sua inatividade e evasão imune(16). Assim, é importante a realização de pesquisas que visam compreender a atuação do sistema imunológico no TME, bem como as células neoplásicas atuam sobre as células imunes, para que se possa desenvolver abordagens terapêuticas mais eficazes e melhorar o prognóstico e sobrevida pacientes acometidos com essa doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A carcinogênese oral é um processo multifatorial, que se desenvolve por muitos anos e, durante este período, ocorrem transformações neoplásicas em regiões da cavidade oral, onde um número limitado de queratinócitos expressam mudanças citogenéticas e epigenéticas, que alteram a progressão do ciclo celular, mecanismos de reparação do DNA, diferenciação celular e apoptose, podendo serem causadas por mutações ao acaso, erros no processo de reparação do DNA, após a exposição a uma variedade de fatores biológicos ou substâncias com potencial carcinogênico(17). Essas alterações podem ser sofridas por queratinócitos com características de células tronco e perpetuadas através de um processo de seleção no microambiente da mucosa oral (12).

Hanahan e Weinberg, em 2000, propuseram seis características principais do câncer, que constituem um princípio organizador, de forma a fornecer um quadro lógico para a compreensão das doenças neoplásicas, sugerindo que as células normais evoluem progressivamente para um estado neoplásico, através da aquisição de características que lhes permitem tornar carcinogênicas. Essas características estão relacionadas aos mecanismos de homeostase celular, levando a alterações como: potencial de replicação ilimitada, autossuficiência na sinalização para o crescimento, falta de sensibilidade a sinais limitadores do crescimento, eficiência na evasão da apoptose, aumento da angiogênese e capacidade de invasão e metástase (18).

2.1 Microambiente tumoral

Para uma abordagem mais eficaz da doença, o câncer deve ser considerado como uma alteração que envolve complexas interações entre os componentes do microambiente onde se desenvolve, a neoplasia em si e as células adjacentes, em vez de se considerar o câncer apenas como células autônomas(19), pois as características malignas do carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) decorrem também do microambiente tumoral (TME), onde a proliferação e o comportamento das células neoplásicas afetam o estroma e a vascularização local através da produção e secreção de fatores que favorecem a transição epitélio-mesênquima (EMT); metástase através do sistema vascular e modulação da imunidade local(15,20).

Além das células neoplásicas, o TME de CECP é composto por numerosas células, como fibroblastos associados ao câncer (CAFs), endoteliócitos, células do sistema imune, incluindo macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, linfócitos infiltrantes de tumor (TILs; B e T), células NK, entre outras, que produzem proteínas como quimiocinas e citocinas, moléculas que atuam como mediadores da inflamação aguda e crônica, de forma autócrina, parácrina ou endócrina ,com ação em diversos mecanismos fisiológicos e possuem efeitos diretos sobre a carcinogênese(14,21).

Muita atenção tem sido dada na literatura científica sobre a participação do sistema imunológico na progressão e comportamento do câncer, sendo de grande importância a compreensão da sua interação com as células neoplásicas no TME, para que se possa lançar mão de novas estratégias terapêuticas.

2.2 Sistema imunológico

O sistema imune é constituído por um intrincado conjunto de células e moléculas que proporcionam a defesa do hospedeiro contra uma série de patógenos, os quais podem ser substâncias químicas, micróbios e toxinas, que causam injúrias e

doenças, ou até mesmo moléculas próprias do indivíduo que podem levar a doenças autoimunes. Esse sistema proporciona a prevenção de lesões e doenças, bem como a resolução das mesmas quando instaladas(22).

As células do sistema imunológico expressam proteínas de membrana, que são utilizadas para distinguir os grupamentos de diferenciação (CD, do inglês *Cluster of Differentiation*), característicos de uma linhagem celular específica ou de seus estágios de diferenciação. Essas proteínas são empregadas como marcadores imunológicos, possibilitando a identificação dos grupos celulares(23).

De maneira geral, existem dois tipos de resposta imune: inata e adaptativa, que são componentes de um sistema integrado de defesa do indivíduo no qual numerosas moléculas e células atuam cooperativamente.

2.2.1 Imunidade inata

A imunidade inata ocorre nas horas seguintes à injúria, fornecendo a primeira linha de defesa contra microrganismos, promovendo e influenciando a intensidade e natureza da resposta imune adaptativa. É inespecífica, reconhecendo estruturas comuns a vários agentes infecciosos, os chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-associated molecular patterns*). Não possui memória, isto é, um indivíduo exposto seguidas vezes a um determinado antígeno, ou seja, moléculas orgânicas estranhas a nosso organismo, apresenta a mesma resposta imune. É composta pelas barreiras físicas (superfícies epiteliais) e químicas (agentes antimicrobianos); proteínas do sistema complemento e mediadores inflamatórios (quimiocinas e citocinas); e células como os fagócitos e as células linfoides inatas.

Os fagócitos (macrófagos e neutrófilos) tem como função elementar a destruição e eliminação de microrganismos, bem como dar início e regular o processo inflamatório através da secreção de citocinas. As células linfoides inatas (ILCs, do inglês "Innate Lymphoid Cells"), sendo as células assassinas naturais (NK, do inglês *Natural killer*) as mais bem descritas na literatura, são fundamentais na vigilância imunológica. As células NK (CD56⁺) correspondem de 10 a 20% das células circulantes. Diferenciam as células saudáveis das não saudáveis e, através da

secreção de Interleucina-12 (IL-12) por macrófagos com microrganismos fagocitados, secretam Interferon- γ (IFN- γ) que por sua vez irá ativá-los para eliminação. Os receptores inibitórios dessas células reconhecem moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major histocompatibility complex*) de classe I (MHC-I), que são proteínas de superfície constitutivamente expressas em todas as células nucleadas do organismo, e cuja principal função é a apresentação de peptídeos derivados de proteínas citoplasmáticas próprias ou não próprias na superfície celular(24). As células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígenos (APCs) que possuem longas projeções membranosas (dendritos) e estão presentes no epitélio e outros tecidos do organismo, onde captam patógenos e os transportam aos linfonodos para apresentá-los aos linfócitos T (LT) imaturos (naïve), provendo sinais que levam à diferenciação e proliferação. Dessa forma, as DCs possuem papel fundamental na ativação da resposta imune adaptativa, agindo como elo entre esses dois sistemas(23).

2.2.2 Imunidade adaptativa

A resposta imune adaptativa, conhecida também como imunidade adquirida ou específica, é ativada e desenvolvida posteriormente, tendo o início tardio. Possui especificidade, ou seja, tem a habilidade de distinguir uma ampla variedade de antígenos específicos, tais como proteínas derivadas de vírus, bactérias ou células neoplásicas. Possui memória, levando a uma potencialização de resposta a segundas exposições, portanto, um indivíduo infectado pela segunda vez por um antígeno responderá mais rapidamente e de forma mais eficaz. Existem dois tipos de resposta adaptativa: imunidade humoral e celular.

A imunidade humoral é o principal mecanismo de eliminação de patógenos extracelulares. Ao se falar de imunidade humoral, logo pensamos nos anticorpos, também chamados Imunoglobulinas (Ig), que são proteínas presentes no sangue e nas secreções mucosas, com função central nesse tipo de resposta. Eles são produzidos pelos plasmócitos nos órgãos linfoides e na medula óssea. A primeira exposição a um antígeno inicia a resposta primária que leva a ativação dos linfócitos

B (LB) naïves e a sua diferenciação em plasmócitos produtores de anticorpos, bem como células B de memória que serão ativadas em caso de uma repetida infecção através da resposta secundária, que leva a uma maior produção de anticorpos e de forma mais rápida. Ao se ligarem aos antígenos, essas proteínas neutralizam sua ação impedindo sua patogenicidade, ocasionam a opsonização ativando o sistema complemento e facilitando a fagocitose, por ligação a receptores de Fc (fragmento cristalizável) presentes nas membranas dos macrófagos, neutrófilos e células dendríticas(23,25).

A imunidade celular tem como ator principal o linfócito T, um tipo celular originado na medula óssea e que sofre maturação no timo. Na Figura 6.1, temos a representação gráfica dos estágios de maturação dos linfócitos T, da célula-tronco ao linfócito T naïve, com os marcadores de superfície inerentes a cada estágio.

Quadro 6.1 – Representação gráfica dos estágios de diferenciação dos linfócitos

Estágio de maturação	Célula-tronco	Pró-T	Pré-T	Duplo-positiva	Positiva simples (Célula T imatura)	Célula T madura (naïve)
Marcadores de superfície	c-kit ⁺ CD44 ⁺ CD25 ⁻ CD34 ⁺	c-kit ⁺ CD44 ⁺ CD25 ⁺ CD34 ⁺	c-kit ⁺ CD44 ⁻ CD25 ⁻ CD34 ^{low}	CD4 ⁺ CD8 ⁺ TCR/CD3 ^{low}	CD4 ⁺ CD8 ⁻ ou CD4 ⁻ CD8 ⁺ TCR/CD3 ^{high}	
Local anatômico	Medula óssea	Timo				Periferia
Resposta antigênica	Não há	Não há	Não há	Seleção + e -	-	Ativação (proliferação e diferenciação)

Fonte: Imagem adaptada de Abbas et al. (2015)

A resposta imune celular ocorre através do reconhecimento e ligação dos receptores de células T (TCR, do inglês *T cell receptor*) dos LT naïves (CD45RA) ao conjunto MHC/antígeno presentes na superfície de outras células. Como resultado, os linfócitos lideram mecanismos efetores que podem auxiliar os fagócitos a eliminar os antígenos, causar a morte celular das células infectadas ou tornarem-se células de memória (CD45RO). Os LT são divididos em subpopulações distintas de acordo com os co-receptores CD4⁺ (LT auxiliares) e CD8⁺ (LT citotóxicos; CTLs, do inglês *cytotoxic T lymphocytes*).

Os LT CD4⁺, conhecidos como LT auxiliares (Th, do inglês *T helper*) reconhecem os antígenos apresentados pelas APCs via MHC de classe II e são subdivididos em perfis Th1, Th2, Th17, T reguladores (T_{REGS}) entre outros, de acordo com a diferenciação e expressão de citocinas após a apresentação de antígeno, o que reflete diferentes respostas imunológicas. Os LTh1 secretam grandes quantidades de IL-2, o que resulta na proliferação de LT, inclusive dos próprios LT CD4⁺ de modo autócrino, e promove a proliferação e aumento da atividade citotóxica pelo LT CD8⁺. Além da IL-2, os LTh1 secretam uma gama de citocinas e quimiocinas, que levam à diferenciação e proliferação de LB e induzem a inflamação recrutando leucócitos (neutrófilos, monócitos e eosinófilos) para o sítio de infecção amplificando a resposta pelo circuito de feedback positivo através da ligação do co-estimulador CD40/CD40L que leva a secreção de IL-12 pelo macrófago, estimulando as células T e NK a secretarem IFN- γ que por sua vez ativa os macrófagos para a eliminação do antígeno através da produção de enzimas que geram espécies reativas de oxigênio (EROS) e óxido nítrico (NO)(25). Os LTs com perfil Th2 tem papel importante nas defesas imunes humorais através da produção de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 induzindo a produção de anticorpos. São importantes nas doenças alérgicas e defesa contra infecções helmínticas(25). Os LTh17 representam um subgrupo de LT efetores importantes na defesa contra microrganismos extracelulares. Produzem IL-22, IL-26 e IL-17, que são potentes citocinas pró-inflamatórias e sua desregulação está associada a várias doenças autoimunes(26).

Os linfócitos T_{REG} tem importante papel na autotolerância e na gestão das respostas imunes através da supressão mediada por contato célula-célula e secreção de citocinas imunossupressoras, evitando a inflamação crônica. São produzidas no timo, mas também podem ser induzidas a partir de células T naíve na periferia(27). Existem algumas subpopulações com propriedade regulatória, como as T_{RI}, produtoras de IL-10, que inibe a ativação de APCs e suprimem algumas respostas de células T in vivo, as células TH3, capazes de suprimir através da produção de TGF- β (28), entre outros tipos de linfócitos, como os T_{REG} de ocorrência natural descritos por Sakaguchi et al(29). As T_{REGS} naturais representam de 5 a 10% dos LT CD4⁺ do sangue periférico, são produzidas naturalmente no timo e precisam da IL-2 para seu desenvolvimento. Expressam constitutivamente o receptor da cadeia α da IL-2 (CD25), sendo, portanto, denominadas CD4⁺CD25⁺(30), assim como outros marcadores que não são específicos, mas que colaboram para sua identificação,

como o CTLA-4 (do inglês, *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), o GITR (do inglês, *Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*) e o receptor para TNF- α (TNFR)(31). O TGF- β é uma citocina com ação supressora em células alvo e modula a expressão de FOXP3 (do inglês, *Forkhead box P3*), um fator nuclear que exerce funções em regiões reguladoras específicas no DNA, estimulando ou inibindo a transcrição de genes específicos pelas T_{REGS}, podendo alterar o perfil de células T periféricas CD4⁺CD25⁻ para células CD4⁺CD25⁺(32). Pesquisas mostraram que após a interação do antígeno com o TCR, o Foxp3 interage com o fator nuclear κ B (NF- κ B) e o fator nuclear de células T ativadas (NFAT) levando a supressão de genes que transcrevem citocinas pró-inflamatórias, como a IL-4, que possui papel importante na resposta humoral; a IL-2, que induz a proliferação de LT e aumenta a capacidade citotóxica dos LT CD8⁺; e IFN- γ , importante na ativação de macrófagos e LT CD8⁺(33). Algumas citocinas como a IL-1, IL-6 e TNF- α tem a capacidade de inibir o desenvolvimento e função das T_{REG} no sítio inflamatório(23).

Por fim, os LT CD8⁺ estão envolvidos na resposta antiviral e antitumoral. Reconhecem os antígenos citoplasmáticos apresentados por moléculas de MHC de classe I e, após a adesão e coestimulação, se proliferam gerando CTLs de memória ou efetores, ganhando a capacidade de eliminar por citotoxicidade qualquer célula que apresente esse mesmo antígeno(23). Os CTLs efetores liberam perforinas, proteínas que formam poros nas membranas celulares, e secretam granzimas que ativam as enzimas caspases que por sua vez levam à fragmentação do DNA. Também podem se ligar ao receptor Fas das células alvo através do FasL, induzindo a apoptose(25). Além dos CTLs, os LT CD8⁺ também compreendem uma população de LT_{REG} CD8⁺ (CD8⁺Foxp3⁺), representando 0,9% \pm 0,6% das PBMCs(34). Esse tipo de LT_{REG} atua imunossuprimindo por interferirem em respostas imunes nos tecidos linfoides secundários, afetando a ativação de LT CD4⁺(35).

2.3 Inflamação e câncer

Em 1863, Rudolf Virchow descreveu a presença de leucócitos nos tecidos neoplásicos, sugerindo que esse “infiltrado linforreticular” representava a relação entre câncer e doenças inflamatórias crônicas (36). Lloyd J. Old, em 1959, levantou

questões imunológicas relacionadas ao câncer através de sua renomada obra intitulada “Effect of Bacillus Calmette Guérin (BCG) infection on transplanted tumours in the mouse”, na qual associou o método de imunização da tuberculose com a capacidade de gerar resposta antitumoral, mediante estimulação do sistema imunológico através de componentes bacterianos (37).

Os anos seguintes foram marcados pelo notável avanço nas pesquisas sobre o câncer, de modo que novas observações auxiliaram tanto para elucidar quanto para remodelar a elaboração original das características principais do câncer, proposta por Hanahan e Weinberg em 2000, que define as características do câncer como capacidades funcionais adquiridas que permitem que as células neoplásicas sobrevivam, proliferem e disseminem. A aquisição dessas características é possível graças a duas características habilitadoras: a instabilidade genômica em células neoplásicas, levando a mutações ocasionais; e a inflamação como promotora de tumor, através de fatores de crescimento, fatores de sobrevivência celular, fatores pró-angiogênicos, enzimas modificadoras da matriz e EROS, que atuam como substâncias mutagênicas. Somando-se a essas características, outras duas propriedades distintas das células neoplásicas foram propostas por serem funcionalmente importantes para o desenvolvimento e progressão tumoral, consideradas, portanto, como características emergentes do câncer: a reprogramação do metabolismo energético celular, a fim de suportar o crescimento contínuo de células e a proliferação, substituindo o programa metabólico que opera na maioria dos tecidos normais e alimentando as operações fisiológicas das células associadas; e a evasão das células neoplásicas do ataque e eliminação por células imunes.

Em decorrência do processo de carcinogênese, células começam a expressar proteínas de genes mutados ou proteínas normais, mas em níveis desregulados. Essas proteínas seguem o percurso normal de processamento e apresentação de peptídeos na membrana celular através de moléculas de MHC de classe I, por isso, as células NK e os LT CD8⁺ são os principais componentes celulares da imunovigilância contra neoplasias e irão desenvolver uma resposta citotóxica contra essas células neoplásicas(38). Somando-se a isso, células dendríticas, frequentes no microambiente tumoral, fagocitam essas células e apresentam seus peptídeos via MHC de classe II para os linfócitos T CD4⁺ ativando-os e promovendo a secreção de uma gama de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-2, um fator de crescimento

linfocitário; o INF- γ que ativa os macrófagos e aumenta a atividade citotóxica por CTLs e NKs; a IL-4, importante na resposta humoral; a IL-6, importante na síntese de proteínas de fase aguda, proliferação de LB produtores de anticorpos e diferenciação de LT para o perfil Th17; o TNF- α , que induz a expressão de ligantes específicos para leucócitos nas células endoteliais dos vasos sanguíneos, atraindo estas células para o local da inflamação e induz a apoptose por meio da ativação das caspases(23,39).

Apesar das evidências do papel do sistema imunológico na atividade antineoplásica, indivíduos imunocompetentes também podem desenvolver neoplasias. Ao se aprofundar as pesquisas sobre a imunologia do câncer, verificou-se que o sistema imune não atua apenas sobre a eliminação tumoral, mas também age selecionando células em desenvolvimento neoplásico. Surge então o conceito de imunoeedição, composto pela fase de eliminação tumoral, garantida pela imunovigilância; a fase de equilíbrio, em que o sistema imune atua de forma dinâmica controlando o câncer, mas sem a capacidade de eliminá-lo totalmente, exercendo pressão seletiva sobre células neoplásicas levando à fase de evasão imune, na qual essas células adquirem a capacidade de escapar do sistema imune do hospedeiro(40) através da redução da imunogenicidade, desenvolvendo modificações na maquinaria de processamento de antígenos, com a perda de expressão de MHC de classe I, produção de mediadores imunossupressores e progressão de células imunomoduladoras no TME(41).

Em resposta a uma variedade de estímulos, as células neoplásicas, secretam metaloproteinases de matriz (MMPs), enzimas que degradam a matriz extracelular, favorecendo a migração de células; o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) com sua ação paradoxal, pois é um fator que medeia a inflamação e tem ação efetora na morte celular por LT C8+ e células NK, mas sua presença tem sido associada ao mau prognóstico(42), pois junto com outros fatores, como a IL-1 β e IL-8, induz a expressão de ligantes específicos para leucócitos nas células endoteliais dos vasos sanguíneos, recrutando estas células para o local da inflamação e favorecendo a angiogênese; a IL-6, uma citocina produzida por células imunes, endoteliais e tumorais e vários estudos mostraram elevados níveis de IL-6 em CECP, sendo associada com o mau prognóstico(43–45); o fator de transformação do crescimento- β (TGF- β), que contribui para a EMT, altera o perfil de células T periféricas para o perfil de célula T reguladora

(T_{REG}) secretoras de IL-10, proporcionando um TME imunossuprimido, favorecendo a progressão do câncer(19).

A resposta imune adaptativa favorece a carcinogênese através de interações no TME, com aumento na expressão de TGF- β e IL-10 por macrófagos do tipo M2 associados ao tumor (TAM-M2), promovendo a tolerância imune e diferenciação de células T em células T_{REGS}, que estão associadas com resposta antineoplásica prejudicada(46). Sinais de IL-6 inibem a maturação de DCs e ativação de células NK, macrófagos, neutrófilos e LTs via STAT3 (do inglês, *Signal transducer and activator of transcription 3*), um fator de transcrição envolvido com diversas vias imunossupressoras(39). Outro fator de transcrição que foi reconhecido por estar associado à carcinogênese é o fator nuclear κ -B (NF- κ B), que em resposta à carcinógenos, estresse e citocinas inflamatórias, como a IL-1 β , IL-17 e TNF- α , modula a jusante a imunidade, através de genes que transcrevem proteínas relacionadas a inflamação e resposta imune (p.ex., IL-6, IL-8, IL-10), proliferação (p.ex., Ciclina D1, GM-CSF) e proteínas anti-apoptóticas (p.ex., *BCL2*, Survivina). No entanto, a ativação aberrante do NF- κ B contribui para a expressão de oncogenes e proto-oncogenes e regula negativamente a p53, uma proteína importante na supressão tumoral através da ativação de apoptose em células pré-neoplásicas.

Considerando o que foi exposto, torna-se fundamental a necessidade de pesquisas quem busquem compreender melhor o papel do sistema imunológico no desenvolvimento do câncer e a interação das células neoplásicas com os componentes do microambiente tumoral, para que se possa desenvolver abordagens terapêuticas mais eficazes e melhorar o prognóstico e sobrevida pacientes acometidos com essa doença(39).

3 PROPOSIÇÕES

A proposta para esta pesquisa foi analisar a influência do meio condicionado por células de carcinoma epidermoide de língua em linfoblastos e células mononucleares do sangue periférico, no que se refere à viabilidade, secreção de citocinas, expressão gênica e diferenciação celular, de forma a compreender melhor os mecanismos relacionados à carcinogênese.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente Projeto de Pesquisa teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, com parecer consubstanciado nº 2.745.569 (Anexo A).

4.1 Linhagens pré-estabelecidas

As células da linhagem CCRF-CEM (ATCC® CCL-119™, Manassas, VA, EUA), derivada de leucemia linfoblástica aguda foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² (Corning, New York, EUA), em meio de cultivo RPMI-1640, suplementado com 100 µg/mL de penicilina (Invitrogen™), 100 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen™) e 10% de SFB. As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade. O crescimento celular foi monitorado diariamente através da contagem de células, utilizado o método de exclusão de azul de Trypan (Trypan Blue®; Sigma-Aldrich) para a contagem celular em microscópio, determinando o número de células viáveis presentes na amostra. Foi adicionado 10 mL a cada 2 ou 3 dias ou feito o subcultivo, de forma a manter a densidade de células entre 2-3 x 10⁵ e 1-2 x 10⁶ células por mL até a obtenção do número de células necessário para os ensaios.

Foram utilizadas as linhagens de células SCC4 (ATCC® CRL 1624™, Manassas, VA, EUA) e SCC9 (ATCC® CRL 1629™, Manassas, VA, EUA), derivadas de carcinoma epidermoide de língua. As linhagens foram cultivadas em garrafas de cultivo de 75 cm² (Corning, New York, EUA) em meio de cultivo Dulbecco Modified Eagle e Ham-F12 (DMEM/F12 1:1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado com 10% de SFB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 50 ng/mL succinato sódico de hidrocortisona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen™) e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade. O crescimento celular foi monitorado

diariamente e o meio de cultivo trocado a cada dois ou três dias, de acordo com a densidade de células.

4.2 Cultura primária

As linhagens primárias de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), provenientes de 2 doadores saudáveis (PBMC-A e PBMC-B), foram gentilmente cedidas pelo Biorrepositório da Universidade Nove de Julho (Anexo B). Abaixo segue a descrição da coleta e processamento das amostras antes da aquisição das linhagens.

4.2.1 Isolamento das PBMC:

As células foram obtidas a partir do processamento de câmara de leucorredução (“peão”). Foi cortado o acesso inferior do peão com uma tesoura autoclavada e o peão foi posicionado no interior de um tubo cônico de 50 mL, com a parte mais estreita para dentro do tubo e então foi cortado o acesso superior. Seguiu-se com o encaixe da agulha da seringa sem o êmbolo no interior do acesso superior e foi adicionado 10 mL de solução salina na seringa e encaixado e pressionado o êmbolo cuidadosamente de forma a lavar o conteúdo do peão que foi transferido para o tubo cônico. O volume da amostra obtida foi completado com solução salina até se obter 40 mL de volume total. Em 2 tubos cônicos de 50 mL foi adicionado 10 mL de Ficoll e adicionado 20 mL da amostra diluída em cada um deles. Procedeu-se com a centrifugação a 2200 rpm por 20 minutos. O sobrenadante obtido foi descartado e o pellet ressuspendido em 40 mL de solução salina.

4.2.2 Obtenção dos linfócitos derivados das PBMC

Com as PBMC isoladas, foi realizada a contagem e ajustada a concentração das mesmas para 5×10^6 céls/mL. As mesmas foram cultivadas em frascos de cultura de 75 cm² (Corning, New York, EUA), em meio de cultivo RPMI-1640, suplementado com 100 µg/mL de penicilina (Invitrogen™), 100 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen™) e 10% de SFB e mantidas em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade por 2 horas, tempo necessário para a aderência dos monócitos ao frasco. Após esse período, fez-se a coleta das células em suspensão. Obtivemos então, uma população composta predominantemente por linfócitos, mas que ainda pode haver outras células do sangue periférico associadas. As PBMCs foram criopreservadas até o momento da utilização.

4.3 Coleta do MC derivado de carcinoma epidermoide

As linhagens de CE foram descongeladas e cultivadas em meio convencional, até atingirem a subconfluência. Após esse período, as células foram contadas em câmara de Neubauer e foram subcultivadas com 10^6 células por frasco de T75. Após 48 horas, o meio foi removido e substituído por meio RPMI livre de SFB e HC. Passadas 24hs, esse meio foi coletado, filtrado e mantido em tubos cônicos de 15 mL a -80° C até o momento da sua utilização para os ensaios funcionais e de caracterização nas linhagens celulares.

4.4 Ensaio de viabilidade celular

4.4.1 Por contagem de células viáveis com azul de Trypan

Para verificar se o MC por células de CE (SCC4 e SCC9) afeta a viabilidade dos linfoblastos e das PBMC, células da linhagem CEM foram descongeladas e cultivadas até atingirem o número de células necessárias ($2,7 \times 10^7$ céls), enquanto que as PBMC foram descongeladas 24hs antes do ensaio. Ambas as linhagens foram mantidas em frascos de T75, na densidade de 10^6 céls/mL, em RPMI, com 10% de SFB e 1% de antibiótico/ antimicótico. Após essa fase, as células foram transferidas para placas de 24 poços, com 1 mL de meio (RPMI ou MC sem SFB), na densidade de 10^6 céls/mL e mantidas em incubadora a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade. Esse ensaio foi realizado por 3 dias, em triplicata amostral e experimental, conforme Quadro 4.1.

Após o plaqueamento, as células foram submetidas à contagem a cada 24hs, por 3 dias (24, 48 e 72hs), utilizando o método de exclusão de azul de Trypan, baseando-se no princípio de que as células vivas possuem membranas celulares íntegras de forma a excluir o corante, enquanto que as células mortas não possuem essa capacidade. Para isso, após agitação da amostra no poço, uma suspensão celular de 10µL foi misturada a 10µL do corante e examinada visualmente em câmara de Neubauer para a contagem celular em microscópio, determinando o número de células viáveis presentes na amostra.

Quadro 4.1 - Desenho do plaqueamento da linhagem CCRF-CEM e PBMC para ensaio de viabilidade celular com azul de Trypan em Placa de 24 poços. CTRL – Controle (MNC sem SFB); MC – Meio condicionado

CEM CTRL 1	CEM + MC SCC4 1	CEM + MC SCC9 1	PBMC CTRL 1	PBMC + MC SCC4 1	PBMC + MC SCC9 1
CEM CTRL 2	CEM + MC SCC4 2	CEM + MC SCC9 2	PBMC CTRL 2	PBMC + MC SCC4 2	PBMC + MC SCC9 2
CEM CTRL 3	CEM + MC SCC4 3	CEM + MC SCC9 3	PBMC CTRL 3	PBMC + MC SCC4 3	PBMC + MC SCC9 3
-	-	-	-	-	-

Fonte: a autora

4.5 Análise de citocinas por ELISA

Para detectar e quantificar as citocinas secretadas pelas células de carcinoma epidermoide, bem como pela CEM e PBMC-A, antes e após a exposição ao MC, foi realizado o ensaio imunoenzimático (ELISA). Nesse ensaio um anticorpo reconhece um antígeno para o qual é específico e a enzima covalentemente ligada ao anticorpo catalisa uma reação gerando um corante detectado por espectrofotometria.

Inicialmente, foi realizado o cultivo da CEM e PBMC-A em frascos de cultura de 25 cm², na densidade de 10⁶céls/mL, em RPMI sem SFB, para os grupos controles, e MC derivado de SCC4 e SCC9. Após 24hs de estímulo, o meio de cultivo foi coletado para análise de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IFN- γ , seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante dos kits relacionados no Quadro 4.2.

Quadro 4.2 - Relação dos kits de Elisa utilizados

Citocina	Nome do produto	Fabricante	Nº de catálogo
IL-1β	Human IL-1 β ELISA MAX TM Deluxe Set	BioLegend®	437004
IL-6	Human IL-6 ELISA MAX TM Deluxe Set	BioLegend®	430504
IL-8	Human IL-8 ELISA MAX TM Standard Set	BioLegend®	431501
IL-10	Human IL-10 ELISA MAX TM Standard Set	BioLegend®	430601
IFN-γ	Human IFN- γ ELISA MAX TM Deluxe Set	BioLegend®	430104

Fonte: a autora

4.6 PCR

Para coleta do material a ser avaliado por PCR, foi realizado o cultivo de linfoblastos (CEM) e células PBMC-B em frascos de cultura de 25 cm², na densidade de 10⁶céls/mL por 24hs. Para os controles, as células foram cultivadas em RPMI sem SFB. Os grupos experimentais foram cultivados, separadamente, em MC por SCC4 e

SCC9. Após esse período, as amostras foram transferidas para tubos cônicos e centrifugados a 1200 xg por 5 min em temperatura ambiente, lavados com solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS), incubadas com 500µl de Trizol (Invitrogen™) por 5 minutos e armazenadas a -80°C até o momento de sua utilização.

4.6.1 Extração de RNA

A extração do RNA foi realizada através da técnica de isotiocianato de guanidina. Após a lise celular, as amostras foram transferidas para tubos de polipropileno livres de RNase e DNase e em cada amostra foi adicionado 100µl de clorofórmio. Após a centrifugação a 10.400 rpm durante 15 min a 4 ° C, a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para tubos estéreis e foram adicionados 250 µl de álcool isopropílico. Os tubos foram novamente centrifugados a 10.400 rpm por 10 min a 4° C. Neste momento foi possível observar a formação do precipitado de RNA no fundo do tubo. A solução sobrenadante foi descartada e adicionado 1 ml de álcool a 75% gelado. Após centrifugação a 8.400 rpm durante 5 min, o álcool foi descartado e o RNA ressuspendido em água livre de DNase e RNase. A concentração do RNA foi determinada em Nanodrop com comprimento de onda de 260 e 280 nm e armazenado a -80°C até o momento de sua utilização.

4.6.2 Síntese do cDNA

O DNA complementar (cDNA) utilizado nas reações de qPCR-RT foram sintetizados através de uma reação de transcrição reversa utilizando-se High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems), em um volume final de reação de 21 µL partindo-se de 1,0 µg de RNA total. Para a síntese do cDNA, os tubos com as

amostras foram colocados em termociclador (Mastercycler, Eppendorf) e submetidos a 25°C por 10 min seguido de um período de incubação de 120 min a 37°C.

4.6.3 Análise quantitativa da expressão gênica por RT-qPCR

A análise quantitativa da expressão gênica foi efetuada para verificar a expressão de mRNA das citocinas IL-6 e IL-8, bem como de *BCL2*, *BAD* e *BAK*, genes relacionados à apoptose celular. Cada gene-alvo foi comparado entre as linhagens celulares a partir da utilização do gene de expressão constitutiva de HPRT, para controle de normalização de massa. O protocolo a ser utilizado para o presente trabalho foi o do fluoróforo SYBR® Green I (SYBR Green Master Mix®, Applied Biosystems). Os primers foram desenhados utilizando-se o programa GeneTool 2.0 (Biotools, Alberta, Canadá), de forma que as sequências fossem presentes em éxons diferentes, com uma temperatura de associação entre 58 e 62°C e que gerassem produtos de tamanho idealmente entre 100 e 200pb. As sequências e genes analisados encontram-se no Quadro 4.3.

Quadro 4.3 - Genes, sequência dos primers analisados e respectivas concentrações de trabalho e temperatura de Melt

Gene	Sequência Foward (F) e Reverse (R)	Concentração	Temperatura de Melting
<i>HPRT</i>	F: TGAGGATTTGGAAAGGGTGT R: GAGCACACAGAGGGCTACAA	0,4 µM	60°C
<i>IL6</i>	F: CAGAGCTGTGCAGATGAGTAC R: GTGGTTGGGTCAGGGGTGGTT	0,25 µM	63°C
<i>IL8</i>	F: TCTGTGTGAAGGTGCAGTTTTG R: GGGGTGGAAAGGTTTGGAGT	0,25 µM	60°C
<i>BAD</i>	F: CAGGCCTCCTGTGGGAC R: GGTAGGAGCTGTGGCGACT	0,4 µM	60°C
<i>BAK</i>	F: CCGAAGCCATTTTTTCAGGT R: GACCTCCATCTCCACCCTG	0,4 µM	60°C
<i>BCL2</i>	F: CGCCCTGTGGATGACTGAGTA R: GGGCCGTACAGTTCCACAAAG	0,4µM	60°C

Fonte: a autora

Para a quantificação relativa dos genes estudados no presente trabalho, todas as amostras experimentais foram amplificadas em duplicata e a quantidade normalizada do gene-alvo foi determinada através da curva-padrão, obtida a partir de 4 diluições seriadas de cDNA das linhagens utilizadas, também amplificadas em duplicata a cada reação. Para fins de quantificação, foram consideradas apenas amostras com pico de dissociação específica.

4.7 Citometria de Fluxo

A análise de Citometria de Fluxo foi realizada para verificar os marcadores de superfície celular presentes na linhagem de linfoblastos (CEM) e PBMC antes e após a estimulação com MC derivado de cada linhagem de carcinoma epidermoide (SCC4 e SCC9).

Para tanto, essas células foram cultivadas por 24hs em meio não condicionado (MNC; grupo controle) e MC. Após este período foram analisadas pelo citômetro de fluxo BD FACS ARIA II™ do Serviço de Citometria de Fluxo do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB), um equipamento que permite a identificação das subpopulações através de biomarcadores.

Para esse ensaio, as células foram incubadas com os anticorpos monoclonais conjugados com fluoróchromos, seguindo protocolo estabelecido pelos fabricantes.

Quadro 4.4 - Anticorpos e seus respectivos clones, fluoróchromo, fabricante e número de catálogo, utilizados na imunofenotipagem das células por Citometria de Fluxo

Anticorpo	Fluoróchromo	Clone	Fabricante	Nº de catálogo
anti-CD4	APC	RPA-T4	BD*	555349
anti-CD8	FITC	Hit8a	Biosciences**	35-0089
anti-Foxp3	PE	259D/C7	BD*	560046
anti-CD34	APC	581	BD*	555824
anti-7-AAD	PE	-	BD	555816

Fonte: a autora *Becton & Dickinson Company©; **Tonbo Biosciences FCx-Pro™

Os resultados foram analisados através do programa Flowing Software® Versão 2.5.1 (Perttu Terno, Turku Centre for Biotechnology University of Turku, Finland).

4.8 Análise Estatística

Para a análise estatística do ensaio de viabilidade celular, secreção de citocinas, RT-qPCR e citometria de fluxo foi utilizado o teste de variância One Way ANOVA e posteriormente o teste de Tukey no software GraphPad (Microsoft, EUA). A significância estatística foi determinada em $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

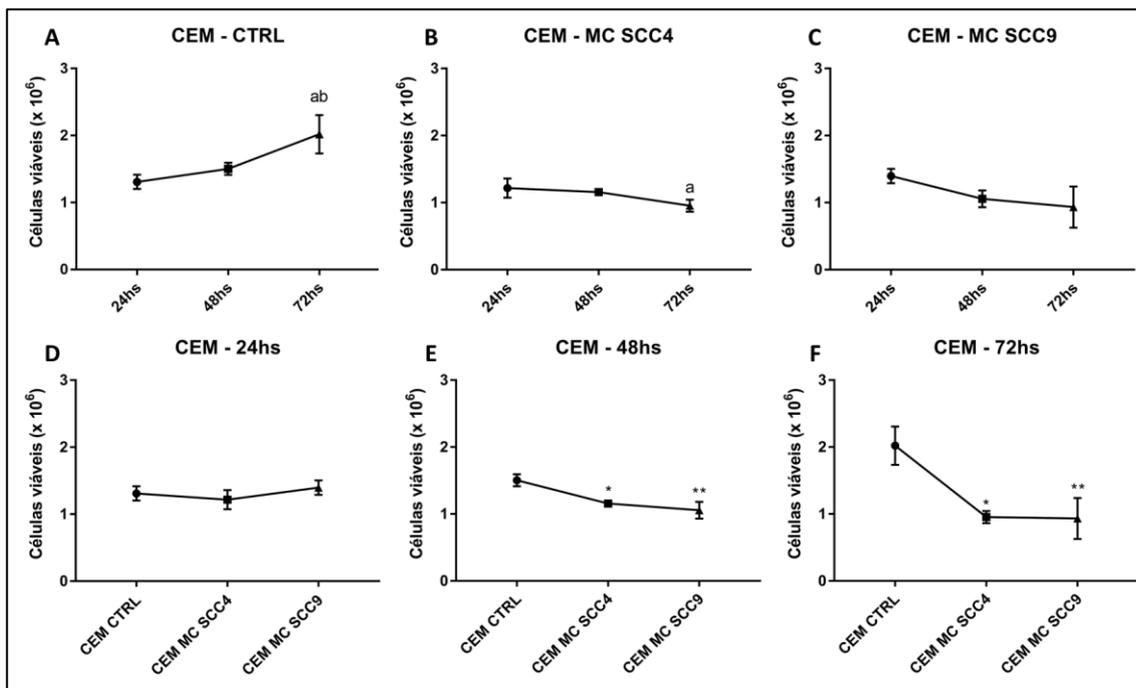
5.1 Viabilidade das células cultivadas com MC derivado de CEL

A viabilidade das células cultivadas em diferentes meios de cultivo (CTRL; MC SCC4 e MC SCC9) foi analisada nos períodos de 24, 48 e 72 horas, primeiramente através da contagem de células com azul de Trypan. Foi possível notar que houve um crescimento celular das células CEM quando cultivadas com o meio CTRL, havendo maior crescimento celular no período de 72hs, quando comparados ao período de 24hs ($P=0,0076$) e 48hs ($P=0,0315$) (Figura 5.1A). As células CEM cultivadas com MC SCC4 apresentaram redução da proliferação celular no período de 72hs comparado ao período de 24hs ($P=0,0426$) (Figura 5.1B) assim como as células cultivadas com MC SCC9, apesar da não significância estatística ($P=0,0671$) (Figura 5.1C).

Ao compararmos os diferentes tratamentos por período, foi possível observar que não houve diferença significativa entre os meios de cultivo sobre a viabilidade celular no momento de 24hs (Figura 5.1D), porém foi observado uma redução da viabilidade celular nas células CEM cultivadas com MC SCC4 e MC SCC9 nos períodos de 48hs ($P=*0,0088$ e $**0,0025$, respectivamente) (Figura 5.1E), assim como no período de 72h, reduzindo consideravelmente a viabilidade das células CEM quando cultivadas com MC SCC4 ($*P=0,0045$) e com MC SCC9 ($**P=0,0041$).

Figura 5.1 - Curvas de viabilidade celular da linhagem CEM cultivada com meio controle e meio condicionado derivado de linhagens de células de carcinoma epidermoide. A, viabilidade das células CEM CTRL no período de 24, 48 e 72hs. a, $P=0,0076$ e b, $P=0,0315$. B, viabilidade das células CEM cultivadas com MC SCC4 nos diferentes períodos analisados. a, $P=0,0426$. C, Viabilidade das células CEM cultivadas com MC SCC9 nos diferentes períodos analisados. D, Viabilidade das células CEM no período de 24hs cultivadas com MC SCC4 e MC SCC9 comparados ao grupo controle. E, Viabilidade das células CEM no período de 48hs cultivadas com MC SCC4 e MC SCC9 comparados ao controle. F, Viabilidade das células CEM no período de 72hs cultivadas com MC SCC4 e MC SCC9 comparados ao grupo controle.

CTRL, controle. MC SCC4, meio condicionado derivado de SCC4. MC SCC9, meio condicionado derivado de SCC9. a, significância estatística quando comparada com período de 24hs. b, significância estatística quando comparada com o grupo de 48hs. *, significância estatística entre o grupo controle *versus* MC SCC4. **, significância estatística entre o grupo controle *versus* MC SCC9. Teste ANOVA e Tukey



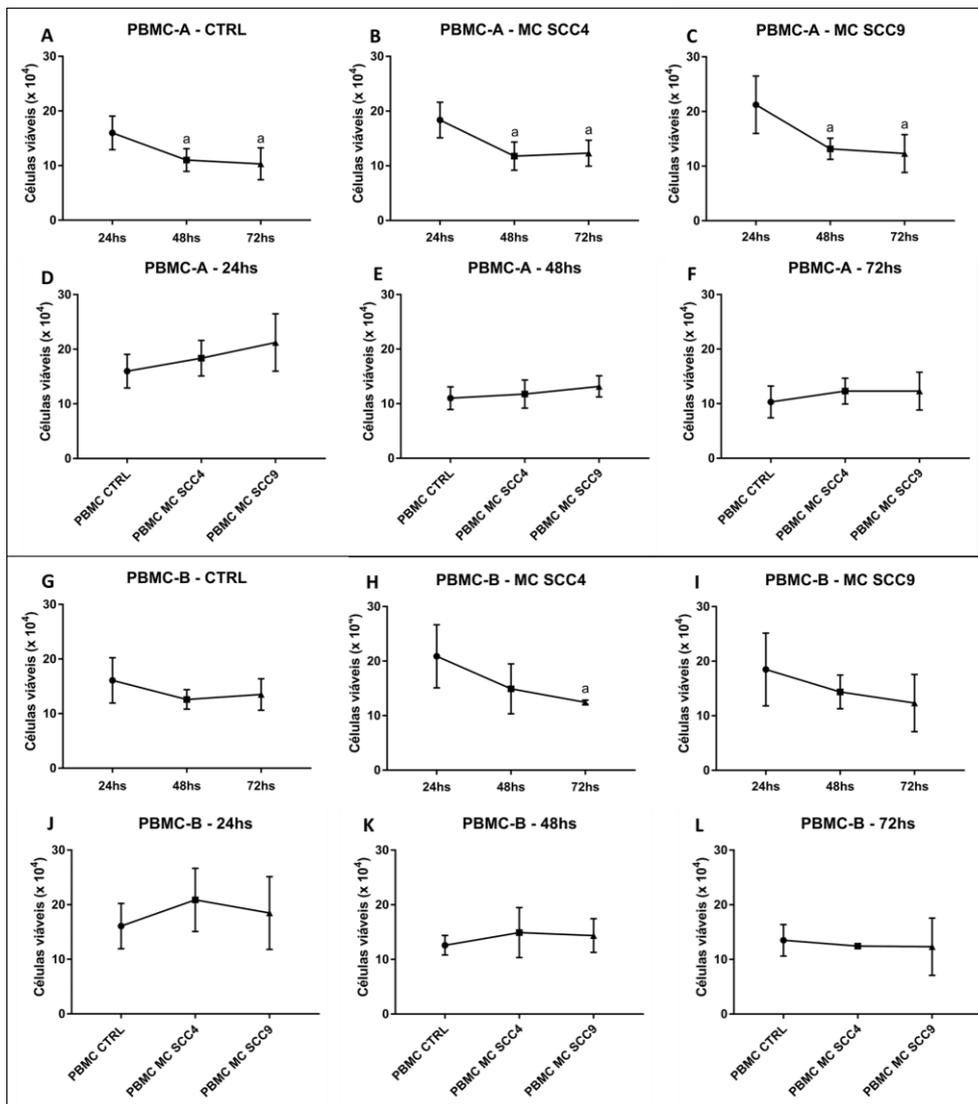
Fonte: a autora

Também foi analisada a viabilidade celular em duas linhagens de PBMCs. Na linhagem PBMC-A, a viabilidade celular reduziu durante o período em cultivo celular quando cultivadas em meio controle (Figura 5.2A), assim como quando cultivadas em MC SCC4 (Figura 5.2B) e MC SCC9 (Figura 5.2C). Esta redução da viabilidade celular é significativa no grupo controle quando comparamos o período de 24hs com o de 48hs ($P=0,0333$) e o período de 24hs com o de 72hs ($P=0,0162$), assim como quando cultivadas com MC SCC4 e MC SCC9 no período de 48hs comparado à 24hs ($P=0,0068$ e $0,0147$, respectivamente) e 72hs comparado à 24hs ($P=0,0119$ e $0,0077$,

respectivamente). Ao compararmos os diferentes tratamentos por período, as células PBMC-A quando cultivada nos meios condicionados mostrou uma maior viabilidade celular comparado ao grupo controle no período de 24hs (Figura 5.2D), sendo de forma mais discreta nos períodos de 48hs (Figura 5.2E) e 72hs (Figura 5.2F), porém sem significância estatística.

A linhagem PBMC-B também apresentou redução da viabilidade celular em todos os tratamentos durante o período de cultivo (Figura 5.2, mas com significância estatística apenas quando cultivadas com o MC SCC4 entre o período de 24hs e 72hs ($P=0,0404$). Ao analisar por período, a linhagem PBMC-B também apresenta maior viabilidade celular quando cultivada com os meios condicionados no período de 24hs (Figura 5.2J) e 48hs (Figura 5.2K) quando comparados ao grupo controle, porém sem significância estatística.

Figura 5.2 - Curvas de viabilidade celular das linhagens PBMC-A e PBMC-B quando cultivadas com meio controle e meio condicionado de carcinoma epidermoide. A, viabilidade do grupo PBMC-A CTRL no período de 24, 48 e 72hs, com redução significativa entre os períodos de 24hs e 48hs ($P=0,0333$) e 24hs e 72hs ($P=0,0162$). B, viabilidade das células PBMC-A cultivada com MC SCC4 no período de 24, 48 e 72hs, com redução significativa entre os períodos de 24hs e 48hs ($P= 0,0068$) e o 24hs e 72hs ($P= 0,0119$). C, viabilidade das células PBMC-A cultivadas com MC SCC9 no período de 24, 48 e 72hs, com redução significativa entre os períodos de 24hs e 48hs ($P= 0,0147$) e o 24hs e 72hs ($P= 0,0077$). D, Viabilidade da PBMC-A no período de 24hs cultivadas com meio não condicionado, MC SCC4 e MC SCC9. E, Viabilidade da PBMC-A no período de 48hs cultivadas com meio não condicionado, MC SCC4 e MC SCC9. F, Viabilidade da PBMC-A no período de 72hs cultivadas com meio não condicionado, MC SCC4 e MC SCC9. G, viabilidade do grupo PBMC-B CTRL no período de 24, 48 e 72hs. H, viabilidade das células PBMC-B cultivadas com MC SCC4 no período de 24, 48 e 72hs, com redução significativa entre os períodos de 24hs e 72hs ($P=0,0404$). I, viabilidade das células PBMC-B cultivadas com MC SCC9 no período de 24, 48 e 72hs. J, Viabilidade da PBMC-B no período de 24hs cultivadas com meio não condicionado, MC SCC4 e MC SCC9. K, Viabilidade da PBMC-B no período de 48hs cultivadas com meio não condicionado, MC SCC4 e MC SCC9. L, Viabilidade da PBMC-B no período de 72hs cultivadas com meio não condicionado, MC SCC4 e MC SCC9. a, significância estatística quando comparada com período de 24hs. Teste ANOVA e Tukey

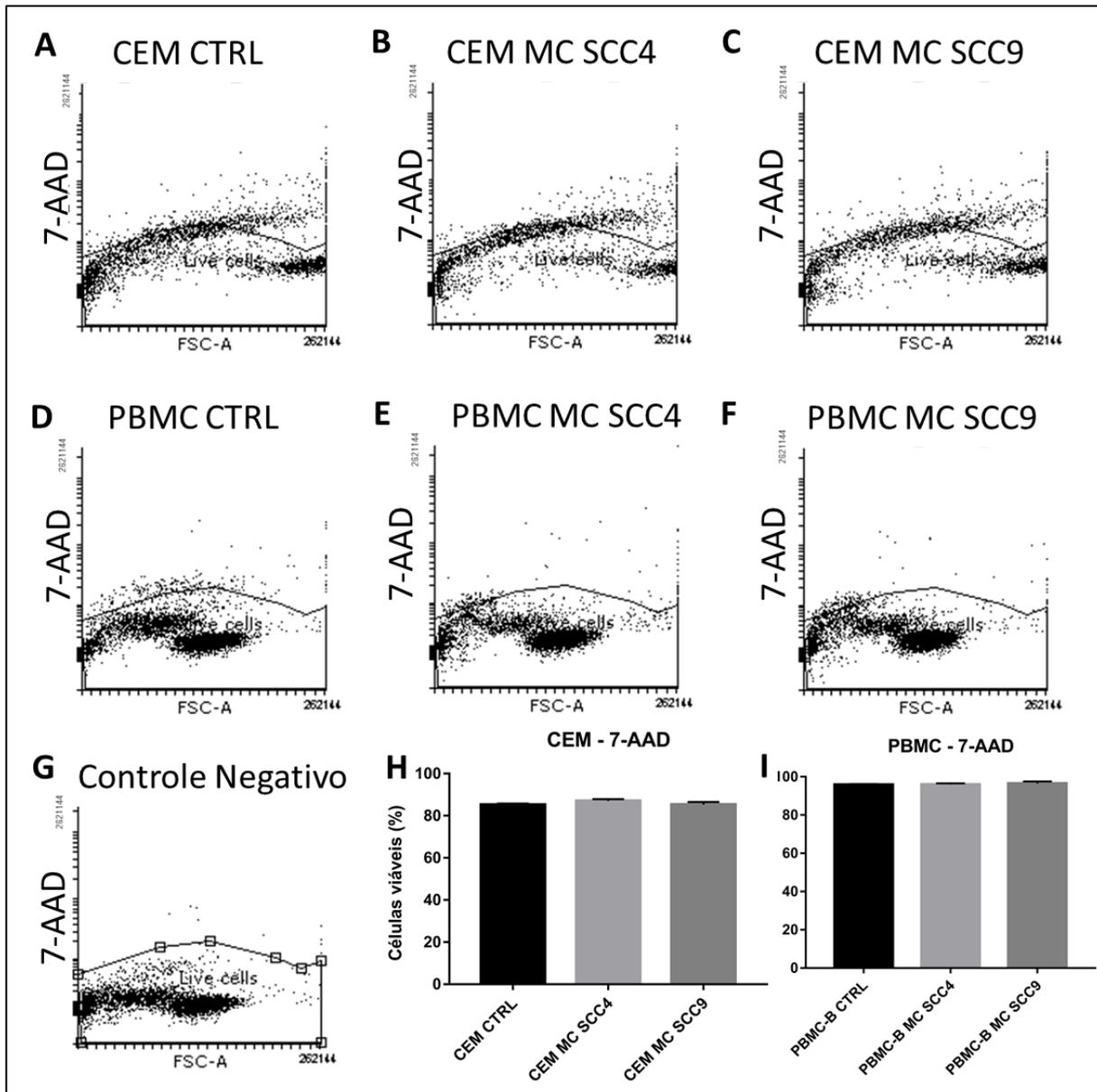


Fonte: a autora

A viabilidade celular foi verificada através da citometria de fluxo, mas apenas no período de 24h, utilizando a marcação negativa com 7-AAD, um corante de DNA não vital que permite a diferenciação entre células viáveis e células apoptóticas ou necróticas que apresentam perda da integridade de membrana(47). Assim, a área de controle negativo (células sem o anticorpo) para o 7-AAD (Figura 5.3G) corresponde à área de células viáveis, células analisadas para os demais anticorpos.

Foi observado que a linhagem CEM apresentou em média $85,3\pm 0,46\%$ de células viáveis (Figura 5.3A), enquanto que a linhagem PBMC-B apresentou em média $95,8\pm 0,31\%$ (Figura 5.3D). E quando tratadas com MC SCC4 a CEM apresentou a viabilidade celular uma média de $87\pm 0,78\%$ (Figura 5.3B) e a PBMC-B com $96\pm 0,53\%$ (Figura 5.3E). No MC SCC9 a CEM apresentou uma viabilidade média de $85,3\pm 1,1\%$ (Figura 5.3C) e a PBMC-B $96,5\pm 0,98\%$ (Figura 5.3F) das células analisadas. Não houve diferença estatística entre as linhagens tratadas e não tratadas.

Figura 5.3 - Gráficos de células viáveis 7-AAD negativas, por citometria de fluxo. A-C, viabilidade celular da CEM. D-F, viabilidade celular da PBMC. G, Controle negativo para 7-AAD. H, gráfico com porcentagem de células viáveis CEM CTRL, CEM MC SCC4 e CEM MC SCC9. I, gráfico com porcentagem de células viáveis da PBMC-B CTRL, PBMC-B MC SCC4 e PBMC-B MC SCC9



Fonte: a autora

5.2 Análise da expressão de mRNA associados à apoptose

Para verificar se a redução da viabilidade celular estava relacionada à indução de vias de apoptose, os genes *BAD*, *BCL2* e *BAK* foram analisados nas linhagens CEM e PBMC-B após terem sido cultivadas com MC SCC4 e MC SCC9 por 24 horas e comparadas com o grupo controle, cultivado com meio convencional. A análise de expressão gênica foi efetuada com cálculos relativos à expressão do gene constitutivo HPRT.

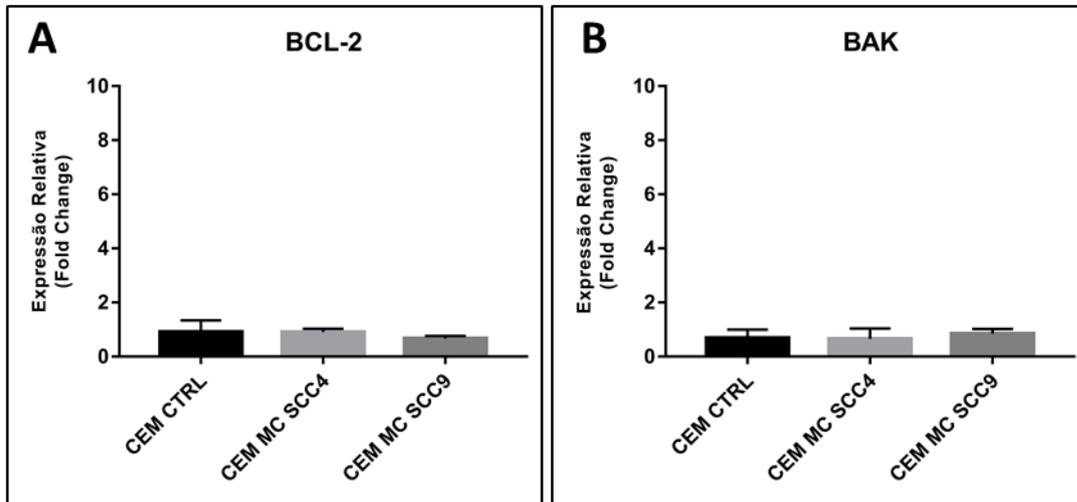
5.2.1 Expressão de *BAD*

Não foi detectada expressão de mRNA do *BAD* em todas as amostras analisadas de CEM e PBMC-B, embora o controle positivo utilizando as linhagens SCC4 e SCC9 tenham apresentado amplificação (dado não mostrado).

5.2.2 CEM

Na linhagem CEM, a expressão de *BCL2* mostrou pequena redução quando cultivada com os MC SCC4 e MC SCC9 em comparação com o CTRL, porém, esses dados não obtiveram significância estatística, com $P=0,9958$ e $0,2600$, respectivamente (Figura 5.4A). Para o *BAK*, não houve diferença entre o CTRL e MC SCC4 para o gene *BAK*, enquanto que comparando o CTRL com MC SCC9, este mostrou um ligeiro aumento da expressão mRNA, mas com valor não significativo ($P=0,6412$) (Figura 5.4B).

Figura 5.4 - Expressão de *BCL2* e *BAK* nas células CEM cultivadas com meio condicionado derivado das linhagens SCC4 e SCC9 de carcinoma epidermoide, durante 24 horas. A, Expressão de *BCL2*. B, Expressão de *BAK*. CEM CTRL, grupo controle da linhagem CEM. CEM MC SCC4, linhagem CEM cultivada com meio condicionado derivado da linhagem SCC4. CEM MC SCC9, linhagem CEM cultivada com meio condicionado derivado da linhagem SCC9

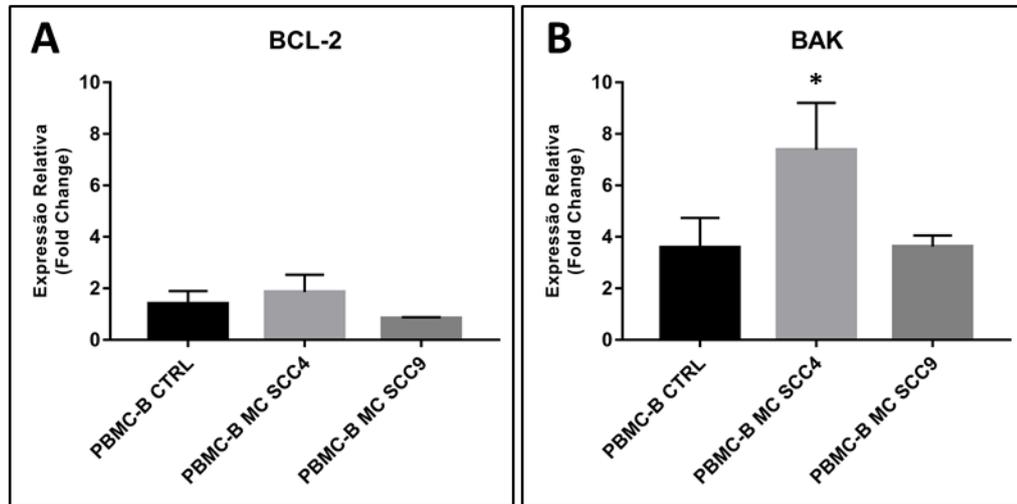


Fonte: a autora

5.2.3 PBMC

A PBMC-B apresentou um aumento da expressão de mRNA de *BCL2* (Figura 5.5A) quando cultivada com MC SCC4 e redução da expressão quando cultivada com MC SCC9, porém, esses dados não obtiveram significância estatística. Analisando o *BAK* (Figura 5.5B), encontramos um notável aumento de expressão quando cultivadas em MC SCC4, com valores estatisticamente significativos ($P=0,0056$), mas não houve diferença de expressão entre o CTRL e MC SCC9.

Figura 5.5 - Expressão de mRNA de *BCL2* e *BAK* na PBMC-B cultivadas com meio convencional, MC SCC4 e MC SCC9. A. Expressão de *BCL2* na PBMC-B cultivada com meio CTRL, MC SCC4 e SCC9, apresentando redução quando tratada com MC SCC9, mas sem significância estatística. B. Expressão de *BAK* na PBMC-B mostrando aumento quando cultivada com MC SCC4 ($P=0,0056$). *, significância estatística por teste ANOVA e Tukey

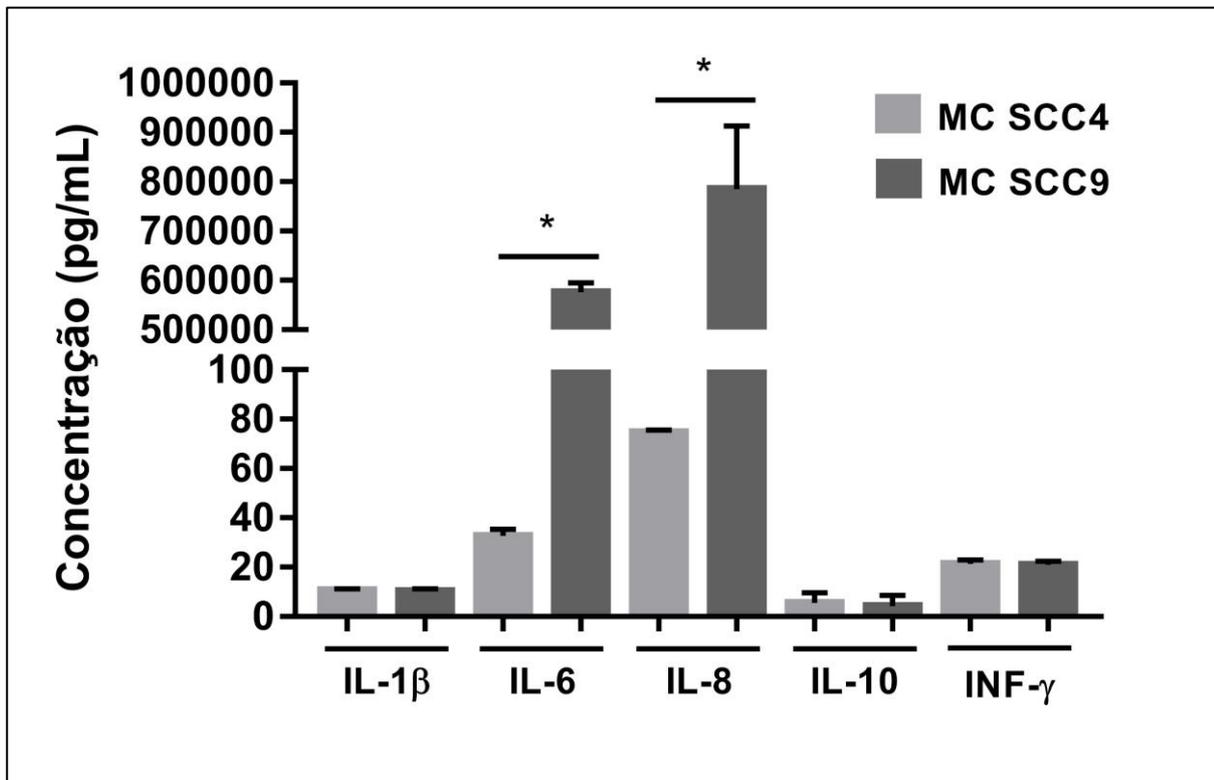


Fonte: a autora

5.3 Análise de expressão proteica por ELISA

Foram analisadas as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IFN- γ e pudemos observar que os meios condicionados derivados de SCC4 e SCC9 apresentam um perfil de concentração de citocinas semelhante para IL-1 β , IL-10 e IFN- γ e, apesar de ambas as linhagens apresentarem expressão constitutiva de IL-6 e IL-8, verificamos que o MC SCC9 apresenta níveis mais elevados dessas citocinas quando comparamos com o MC SCC4, com $P<0,0001$. (Figura 5.6).

Figura 5.6 - Concentração de citocinas presentes em meio de cultivo das linhagens celulares SCC4 e SCC9 derivadas de carcinoma epidermoide, quando analisadas por Elisa. *, Comparação entre os níveis de expressão no MC SCC4 e MC SCC9, com $P < 0,0001$.



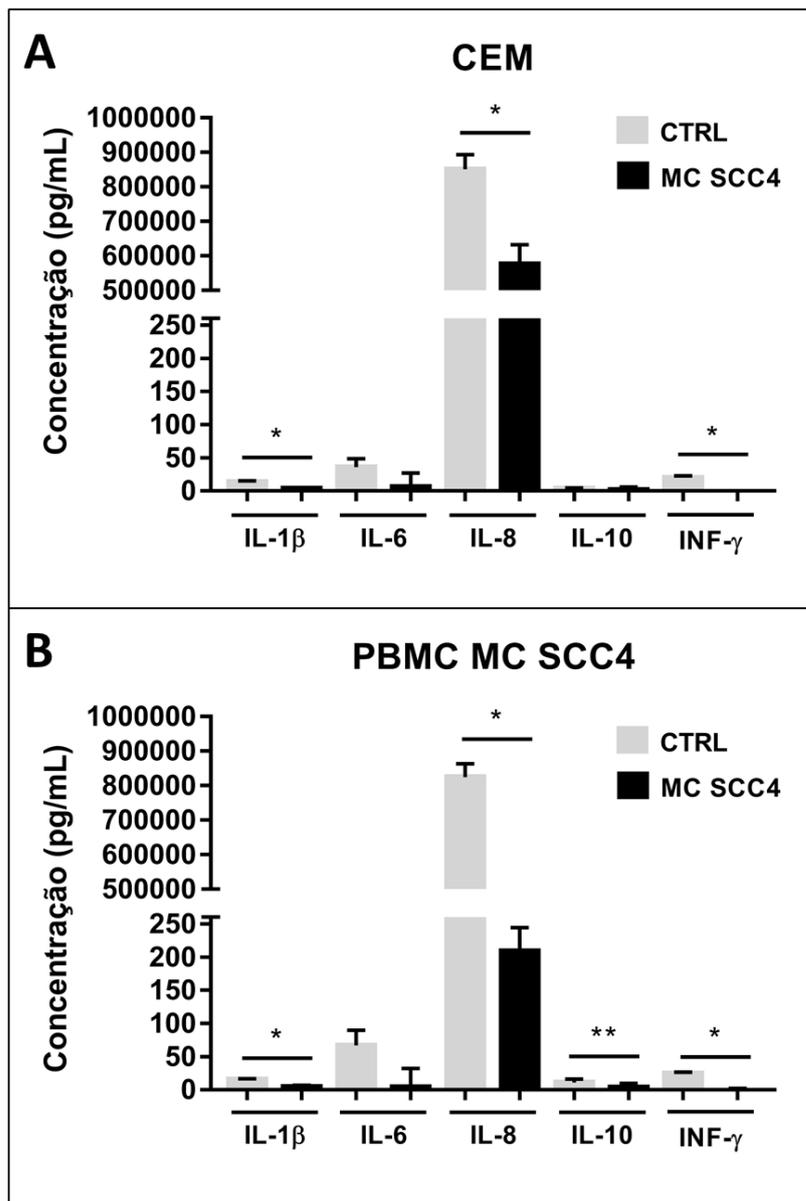
Fonte: a autora

Para as análises de citocinas liberadas pelas linhagens celulares CEM e PBMC-A, os valores de concentração de citocinas presentes nos meios condicionados derivados de carcinoma epidermoide foram subtraídos após a quantificação, com a finalidade de verificar o produto real derivado apenas das células CEM e PBMC-A quando estimuladas com o MC SCC4 e MC SCC9.

Ao analisarmos o meio de cultivo da CEM (Figura 5.7A) e PBMC (Figura 5.7B), quando expostas ao MC SCC4, verificamos que todas as citocinas analisadas apresentam maior expressão no meio controle, ou seja, no meio não condicionado, havendo uma redução da expressão quando expostas ao MC SCC4. Esta redução é estatisticamente significativa para as citocinas IL-1 β ($P < 0,0001$), IL-8 ($P < 0,0001$) e INF- γ ($P < 0,0001$) na CEM; e assim como as citocinas IL-1 β ($P < 0,0001$), IL-8 ($P < 0,0001$) e INF- γ ($P < 0,0001$) na PBMC-A. Para a IL-6, verificamos que esta apresenta níveis mais elevados quando as células são cultivadas em meio CTRL,

notando-se uma diminuição da concentração quando cultivadas em MC SCC4 em ambas as linhagens. No entanto, os valores obtidos não foram estatisticamente significativos. Na linhagem CEM a concentração de IL-10 permaneceu inalterada quando cultivada com MC SCC4, enquanto que na linhagem PBMC, apesar de discreta redução da concentração de IL-10, esta diferença foi significativa ($P=0,0200$).

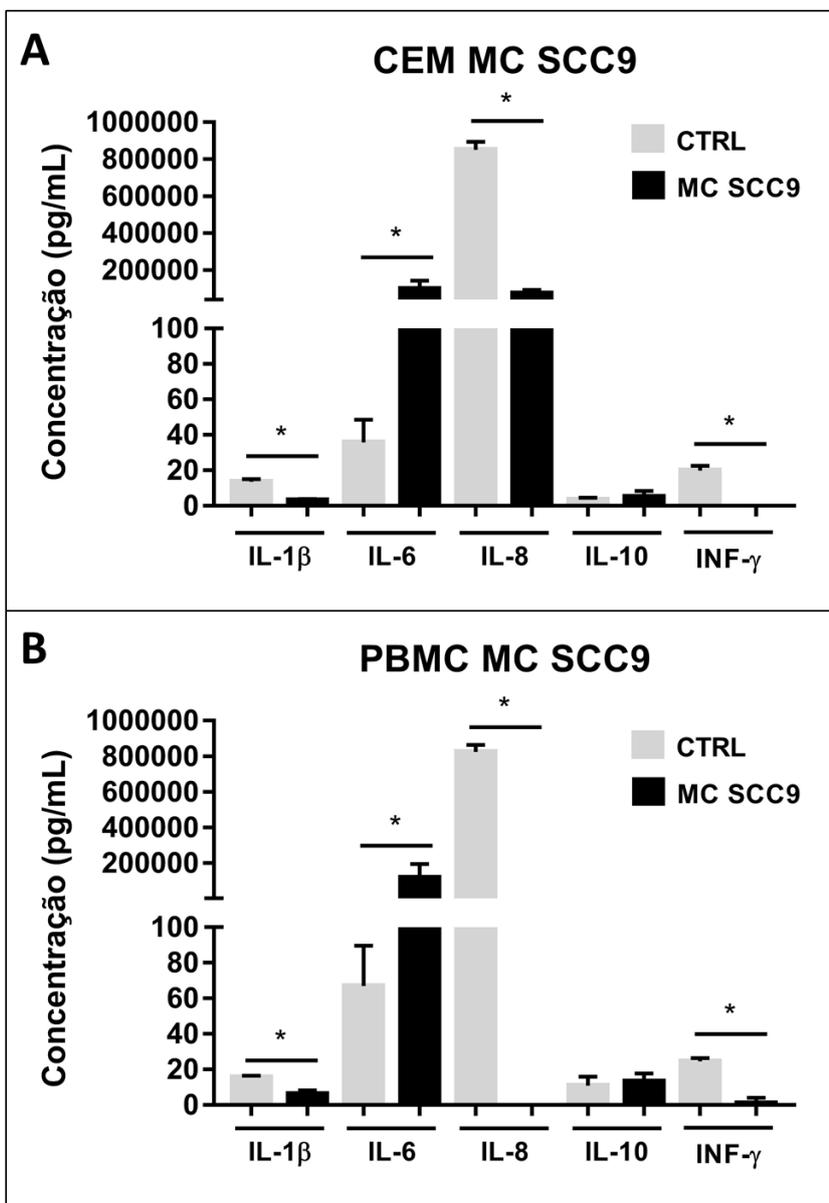
Figura 5.7 - Concentração das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IFN- γ nas células CEM (A) e PBMC-A (B) cultivadas em meio CTRL e MC SCC4. *, Comparação com o grupo CTRL com $P<0,0001$. **, Comparação com o grupo CTRL com $P=0,0200$ pelo teste ANOVA e Tukey



Fonte: a autora

Quando expostas ao MC SCC9, verificamos que a CEM (Figura 5.8A) e PBMC (Figura 5.8B) apresentaram redução estatisticamente significativa de IL-1 β ($P < 0,0001$), aumento de IL-6 ($P < 0,0001$), redução de IL-8 ($P < 0,0001$), redução de IFN- γ ($P < 0,0001$) e sem alteração significativa de IL-10.

Figura 5.8 - Concentração das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IFN- γ nas células CEM (A) e PBMC- A (B) cultivadas em meio CTRL e MC SCC9. *, Comparação com o grupo CTRL com $P < 0,0001$ pelo teste ANOVA e Tukey



Fonte: a autora

5.4 Análise da expressão de mRNA relacionados às citocinas

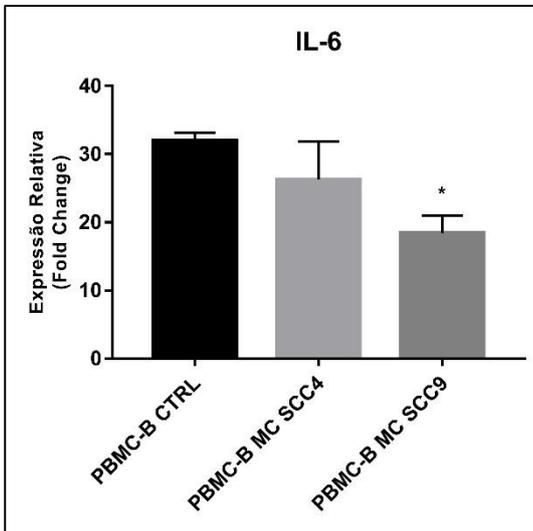
Foi efetuada a análise da expressão de mRNA de IL-6 e IL-8 nas células CEM e PBMC-B. Foram efetuados os cálculos relativos a expressão do gene constitutivo HPRT e as análises estatísticas efetuadas através da comparação entre o grupo CTRL *versus* MC SCC4 e grupo CTRL *versus* MC SCC9.

5.4.1 Expressão de IL-6 mRNA

A linhagem CEM não apresentou expressão de mRNA de IL-6 em nenhuma das condições analisadas.

A análise da expressão de IL-6 na PBMC-B (Figura 5.9) mostrou a redução da expressão de mRNA dessa citocina quando expostas aos meios condicionados, sendo a quantidade de expressão de 32 ± 1 quando cultivada em meio controle e reduzida para 26 ± 5 em MC SCC4, mas sem significância estatística, e $18,5 \pm 2,35$ quando em MC SCC9, com significância estatística comparado com o CTRL com $P=0,0153$ pelo teste ANOVA e Tukey.

Figura 5.9 - Expressão de mRNA da IL-6 por qRT-PCR, na PBMC-B, quando cultivada com meios condicionados derivados de linhagens de carcinoma epidermoide SCC4 e SCC9, e comparados com o meio de cultivo convencional. Expressão de IL-6 na PBMC-B mostrando redução em relação com o CTRL quando cultivada com MC SCC9, com $P=0,0153$. *, significância estatística comparada com o CTRL, pelo teste ANOVA e Tukey

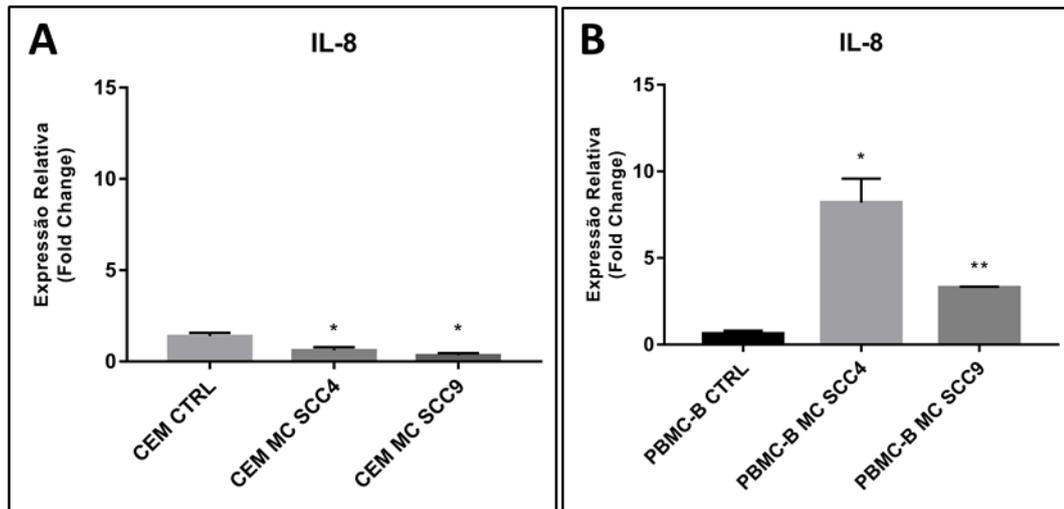


Fonte: a autora

5.4.2 Expressão de IL-8 mRNA

A CEM mostrou redução da expressão de mRNA de IL-8 quando exposta aos meios condicionados (Figura 5.10A). O *fold change* no grupo controle foi menor que 1,5; reduzindo para 0,6 quando tratada com MC SCC4 ($P<0,0001$) e 0,35 quando cultivada com MC SCC9 ($P<0,0001$). Por outro lado, a PBMC-B, apresentou aumento da expressão dessa quimiocina, com um *fold change* de 0,6 no grupo controle; maior que 8 quando exposta ao MC SCC4 ($P<0,0001$) e maior que 3 quando tratada com MC SCC9 ($P=0,0087$) (Figura 5.10B).

Figura 5.10 - Expressão de mRNA da IL-8 por qRT-PCR, na linhagem CEM e nas PBMC-B, quando cultivadas com meios condicionados derivados de linhagens de carcinoma epidermoide SCC4 e SCC9, e comparados com o meio de cultivo convencional. A, expressão de IL-8 na linhagem CEM mostrando redução em relação com o CTRL, com $*P < 0,0001$ em ambas as comparações. B, Expressão de IL-8 na PBMC-B, mostrando aumento em relação ao CTRL quando cultivada em MC SCC4 ($*P < 0,0001$) e MC SCC9 ($**P = 0,0087$), pelo teste ANOVA e Tukey



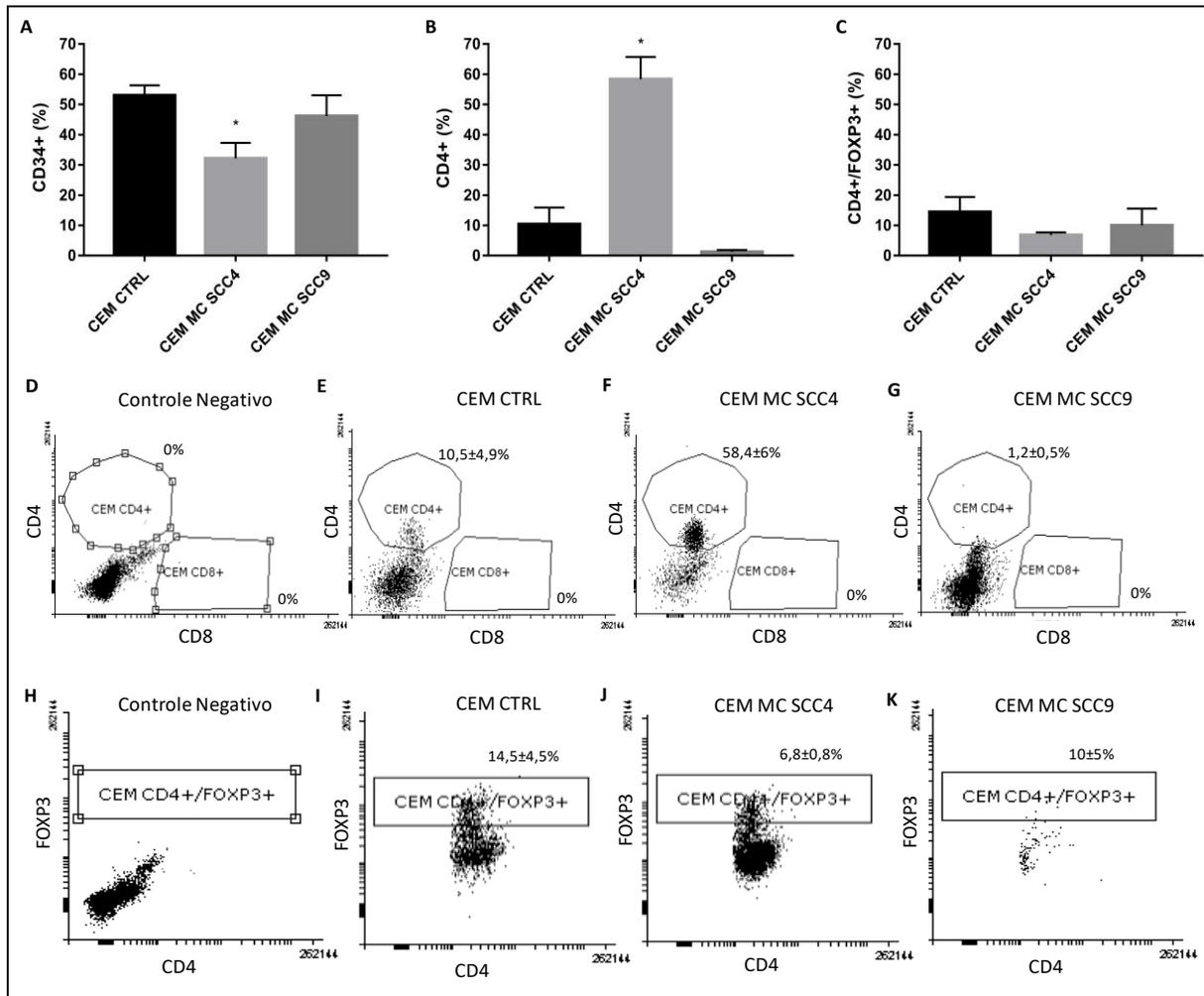
Fonte: a autora

5.5 Expressão de marcadores de diferenciação celular por citometria de fluxo

5.5.1 Expressão de marcadores de diferenciação pela CEM quando cultivada com meio condicionado de SCC4 e SCC9

A linhagem CEM apresentou $53 \pm 3\%$ de células positivas para CD34, mas quando exposta ao MC SCC4, esse valor reduz para $32,2 \pm 4,2\%$ significativamente ($P = 0,0182$). Não houve diferença da marcação para CD34 quando exposta ao MC SCC9 (Figura 5.11A). A população com marcação para CD4 aumentou de $10,5 \pm 4,9\%$ para $58,4 \pm 6\%$ ($P = 0,0003$) ao ser exposta ao MC SCC4, porém, quando expostas ao MC SCC9, não apresentaram mudanças significativas (Figura 5.11B). Para a dupla marcação de $CD4^+/Foxp3^+$, essa linhagem mostrou ligeira redução quando expostas ao MC SCC4 e SCC9, porém sem significância estatística (Figura 5.11C; Figura 5.11I-K). Essa linhagem não apresentou marcação para CD8 (Figura 5.11E-G).

Figura 5.11 - Representações gráficas da expressão dos marcadores de superfície CD34, CD4, CD8 e FOXP3 da CEM quando exposta ao MC SCC4 e MC SCC9, por citometria de fluxo. A, Porcentagem de células CEM CD34⁺, mostrando redução da expressão de CD34 quando exposta ao MC SCC4, com P=0,0182. B, Porcentagem de células CEM CD4⁺, mostrando aumento significativo da expressão de CD4 quando exposta ao MC SCC4 em comparação ao CTRL, com P=0,0003. C, Porcentagem de células CEM com dupla marcação CD4⁺/FOXP3⁺ sem alteração significativa entre o CTRL e os MCs SCC4 e SCC9. D, gráfico de controle negativo para CD4 e CD8. E-G, gráficos de células viáveis CEM com áreas analisadas para CD4 e CD8. H, gráfico de controle negativo para CD4 e FOXP3. I-K, gráficos de células viáveis CEM CD4 positivas com áreas analisadas para FOXP3. *, comparação com o CTRL pelo teste ANOVA e Tukey



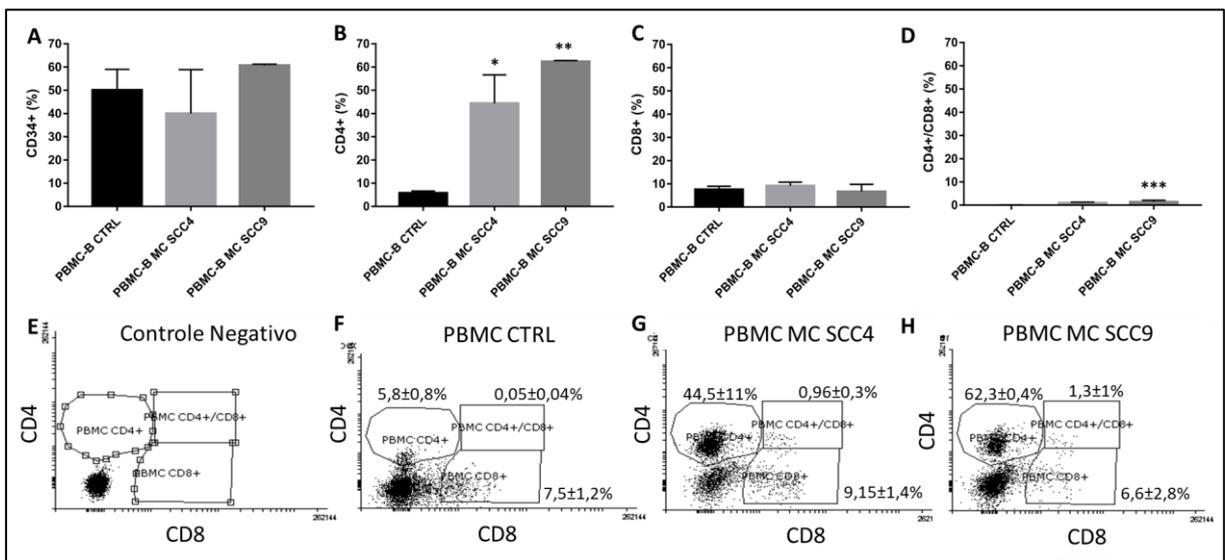
Fonte: a autora

5.5.2 Perfil da PBMC-B quando cultivada com MC de CEL

A PBMC-B apresentou expressão de CD34⁺ em 50% (± 8) das células, com uma redução quando cultivadas em MC SCC4 (40 \pm 17%) e aumento em MC SCC9 (60 \pm 0,5%), porém sem significância estatística (Figura 5.12A). Quando cultivada em

meio controle, apresentaram apenas $5,8 \pm 0,8\%$ de células $CD4^+$, porém, quando exposta aos MCs, revelaram significativo aumento para esse marcador de superfície $CD4$, passando para $44,5 \pm 11\%$ com MC SCC4 ($P=0,0041$) e $62,3 \pm 0,4\%$ com MC SCC9 ($P=0,0012$) (Figura 5.12B). Para o $CD8$, as células não apresentaram diferença significativa quando cultivadas com MC SCC4 e SCC9 em comparação com o CTRL ($7,5 \pm 1,2\%$) (Figura 5.13C). A população de células duplamente positivas ($CD4^+/CD8^+$) compreendeu $0,05 \pm 0,04\%$ da PBMC-B, com aumento para $0,96 \pm 0,3\%$ quando cultivadas em meio MC SCC4, mas sem significância estatística, e quando cultivadas com o meio MC SCC9 esse perfil aumentou para $1,3 \pm 1\%$, com $P=0,0248$ (Figura 5.12D). As Figuras 5.12 E até H mostram as áreas delimitadas para a análise de células $CD4$ e $CD8$ positivas em cada grupo.

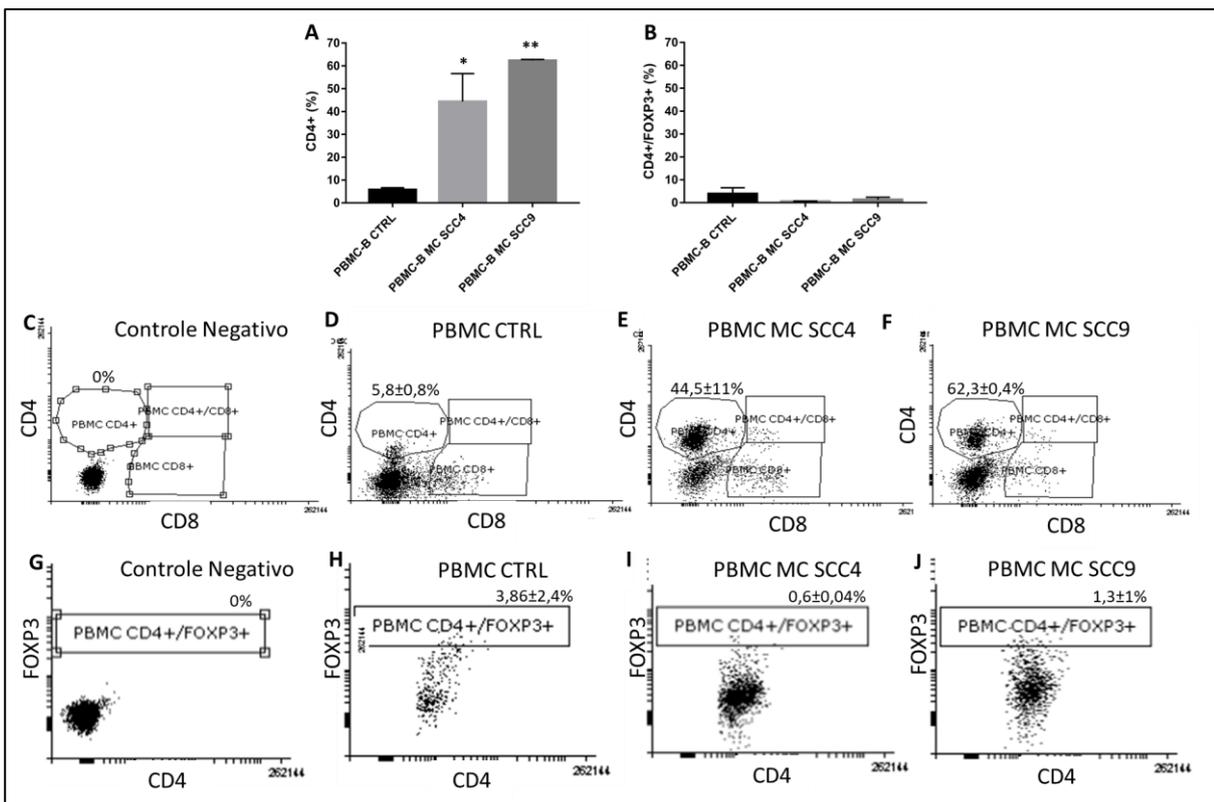
Figura 5.12. Gráficos da análise por citometria de fluxo de células PBMC-B. A, Porcentagem média de 50% (± 8) de células PBMC-B positivas para $CD34$. Quando cultivadas em MC SCC4 apresenta redução dessa população para 40% (± 17) e, quando expostas ao MC SCC9, apresenta aumento para 60% (0,5), porém, sem significância estatística. B, Marcação de $CD4$ na PBMC-B cultivada em meio não condicionado ($5,8 \pm 0,8\%$), apresentando aumento em MC SCC4 para $44,5 \pm 11\%$ ($*P=0,0041$), aumento em MC SCC9 para $62,3 \pm 0,4\%$ ($**P=0,0012$). C, Marcação de células $CD8^+$, não apresentando diferença quando cultivadas com MC SCC4 ($9,15 \pm 1,4\%$) e SCC9 ($6,6 \pm 2,8\%$) em comparação com o CTRL ($7,5 \pm 1,2\%$). D, população de células duplamente positivas ($CD4^+/CD8^+$) correspondendo a $0,05 \pm 0,04\%$ no meio não condicionado, com aumento para $0,96 \pm 0,3\%$ quando cultivadas em meio MC SCC4, mas sem significância estatística, e aumento significativo em MC SCC9 ($1,3 \pm 1\%$), com $***P=0,0248$. D-G, áreas delimitadas para a análise de células $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD4^+/CD8^+$ em meio não condicionado, MC SCC4 e MC SCC9. Teste ANOVA e Tukey



Fonte: a autora

Das células analisadas em meio controle, apenas 5,8% ($\pm 0,8$) delas são positivas para o marcador de CD4. Dentre as células positivas para CD4, apenas 3,6% ($\pm 2,4$) delas exibem dupla marcação de CD4⁺/FOXP3⁺, e, apesar de haver aumento de células CD4⁺ em MC SCC4 e MC SCC9, há uma redução da dupla marcação CD4⁺/FOXP3⁺ em MC SCC4 e MC SCC9 para 0,6% ($\pm 0,04$) e 1,3% (± 1), respectivamente. No entanto, essa redução não apresentou significância estatística (Figura 5.13).

Figura 5.13 - Gráficos da análise por citometria de fluxo da população de células PBMC. A, C-F, Marcação de CD4 na PBMC-B cultivada em meio não condicionado ($5,8 \pm 0,8\%$), apresentando aumento em MC SCC4 para $44,5 \pm 11\%$ (* $P=0,0041$), aumento em MC SCC9 para $62,3 \pm 0,4\%$ (** $P=0,0012$). B, G-J, Análise da população PBMC-B CD4⁺/FOXP3⁺, esta população compreende $3,6 \pm 2,4\%$ do total das células CD4⁺, com ligeira redução em MC SCC4 ($0,6 \pm 0,04\%$) e MC SCC9 ($1,3 \pm 1\%$), porém sem significância estatística pelo Teste ANOVA e Tukey

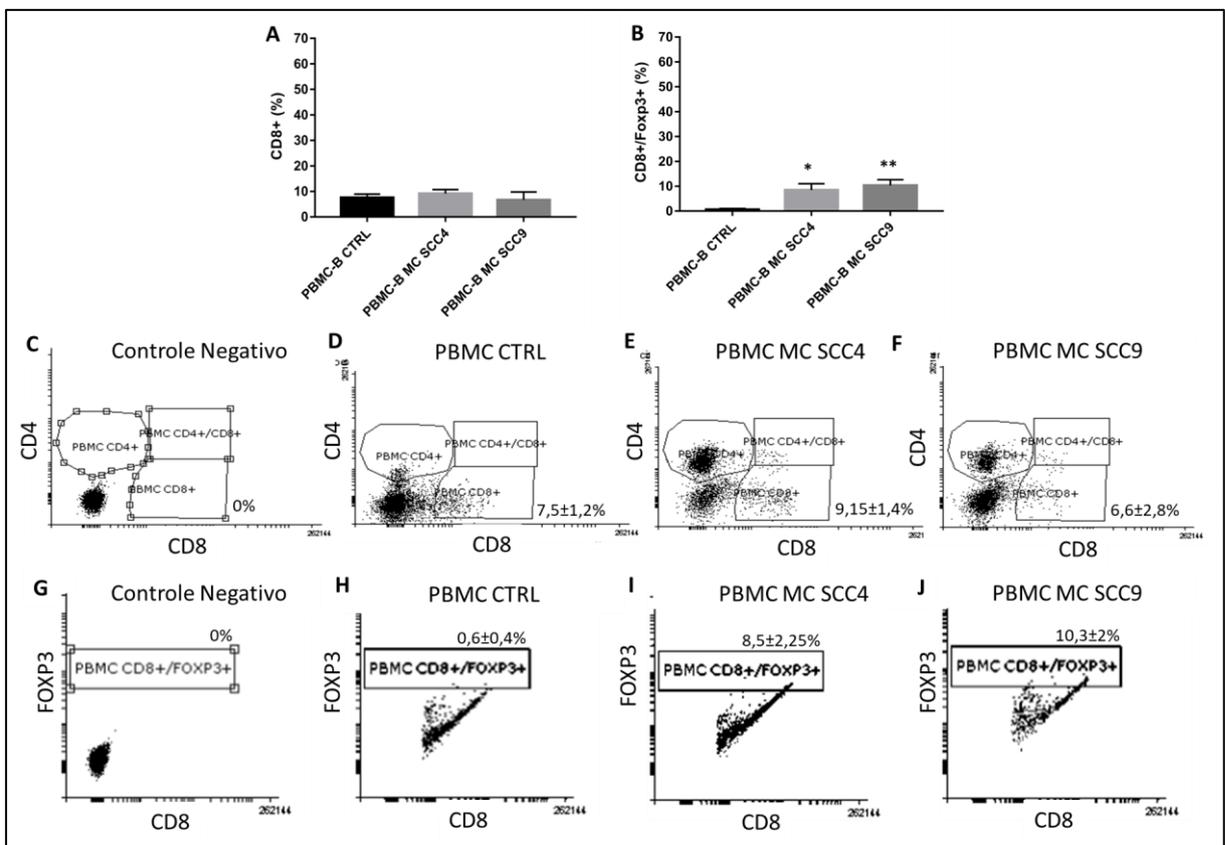


Fonte: a autora

Das células analisadas em meio controle, apenas 7,5% ($\pm 1,2$) delas são positivas para o marcador de CD8. Dentre as células positivas para CD8, apenas 0,6% ($\pm 0,4$) delas exibem dupla marcação de CD8⁺/FOXP3⁺, mas quando cultivadas em

MC esse perfil aumenta para $8,5 \pm 2,25\%$ com o MC SCC4 (* $P=0,0070$) e $10,3 \pm 2\%$ com MC SCC9 (** $P=0,0024$) (Figura 5.14).

Figura 5.14 – Gráficos da análise por citometria de fluxo da população de células PBMC. A, C-F, Marcação de CD8 na PBMC-B cultivada em meio não condicionado ($7,5 \pm 1,2\%$), apresentando aumento em MC SCC4 para $9,15 \pm 1,4\%$ e ligeira redução em MC SCC9 para $6,63 \pm 2,8\%$. B, G-J, Análise da população PBMC-B $CD8^+/FOXP3^+$, esta população compreende $0,6 \pm 0,4\%$ do total das células $CD8^+$, e expostas ao MC SCC4, com aumento para $8,5 \pm 2,25\%$ (* $P=0,0070$) e expostas ao MC SCC9 com aumento para $10,3 \pm 2\%$ (** $P=0,0024$). Teste ANOVA e Tukey



Fonte: a autora

6 DISCUSSÃO

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço é o sexto câncer mais comum em todo o mundo e, apesar dos avanços nas pesquisas, apenas de 50 a 60% dos pacientes sobrevivem após o diagnóstico(48). Esse dado reflete a complexidade das condições moleculares sob as quais essa neoplasia se desenvolve. Progressos nas pesquisas elucidaram algumas questões importantes para a compreensão desse tipo de câncer, como padrões de mutação, perfis transcricionais e marcadores biológicos(41). No entanto, esse progresso não tem resultado em consequências diretas para o paciente e sua qualidade de vida.

O câncer é uma alteração que envolve complexas interações entre os componentes do microambiente onde se desenvolve e essa interação resultará em características que definirão o seu comportamento(19). O microambiente tumoral (TME) é composto não apenas pelas células neoplásicas, mas também por diversas células associadas ao tumor, como fibroblastos associados ao câncer (CAFs), endoteliócitos e as células do sistema imune, incluindo macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, linfócitos infiltrantes de tumor (TILs; B e T), células NK, entre outras, bem como as quimiocinas e citocinas (14,21). Evidências comprovam a participação do sistema imunológico no desenvolvimento do carcinoma epidermoide e que as próprias células tumorais atuam de forma a modular e subverter a resposta imune, através de mediadores inflamatórios, favorecendo sua progressão(14,16), sendo este um dos focos de nosso estudo. Devido a esses fatores, tem-se desenvolvido muitas pesquisas para que se possa entender melhor esses mecanismos, de forma a buscar novas estratégias terapêuticas, especialmente com o advento da imunoterapia.

O cultivo celular é de grande importância para as pesquisas biomédicas, pois as células mantidas em cultura necessitam de técnicas simples para se obter respostas para questões complexas relacionadas ao metabolismo celular sob condições fisiológicas e patológicas(49). Sob corretas condições laboratoriais, as células neoplásicas se proliferam indefinidamente, de forma que são imortalizadas(50). Considerando que as modificações genéticas presentes em linhagens de células neoplásicas se aproximam das alterações inerentes ao tumor de

origem, as células imortalizadas são intensamente utilizadas em estudos que buscam compreender a etiopatogenia dessa doença, bem como em estudos pré-clínicos para o desenvolvimento de novas abordagens farmacológicas(51). Contudo, o cultivo celular *in vitro* apresenta algumas limitações, tendo em vista a complexidade das respostas *in vivo* dadas as interações das células neoplásicas com as células adjacentes e seus produtos, que juntos compõe o TME(50).

Inicialmente, foi realizado o ensaio de viabilidade celular, onde pudemos observar que a CEM, uma linhagem derivada de leucemia linfoblástica aguda, quando cultivada em meio controle, apresenta proliferação celular, com o número duas vezes maior no período de 72h do que em 24hs, o que era de se esperar por se tratar de uma célula imortalizada cultivada em seu meio convencional.

Ao analisarmos o período de 24hs, não houve alterações na viabilidade celular quando cultivadas em meio CTRL, MC SCC4 e MC SCC9. Isto também foi verificado pelo ensaio de citometria de fluxo, através da marcação negativa de 7-AAD e através da contagem de células negativas para o azul de Trypan. Entretanto, em 48 e 72hs, pudemos verificar que a CEM apresenta redução da viabilidade quando exposta ao MC SCC4 e MC SCC9. Em contrapartida, quando cultivadas em MC, notamos que parece ocorrer uma redução da viabilidade celular nos períodos de 48h e 72h de forma significativa quando comparados ao grupo controle. Dessa forma, podemos sugerir que o meio condicionado por células de carcinoma epidermoide está inibindo a proliferação celular da CEM.

Ao analisarmos a viabilidade celular em células PBMCs, em 24hs de exposição, as células dos dois doadores, quando cultivadas em meio não condicionado (CTRL) comparado quando cultivadas com MC SCC4 e MC SCC9 não apresentaram diferença significativa da viabilidade celular pelas duas técnicas aplicadas em nosso estudo. Mas de forma interessante apresentaram redução da viabilidade ao longo do tempo, independentemente do tipo de meio de cultivo utilizado.

Para verificar se há a participação de genes relacionados à apoptose nos leucócitos quando expostos aos meios condicionados, foi avaliado por RT-qPCR a expressão de *BCL2*, *BAD* e *BAK*, sendo o *BCL2* um gene anti-apoptótico e *BAD* e *BAK* genes pró-apoptóticos(52) no período de 24 horas. Na linhagem CEM a expressão de *BAD*, não foi detectada em nenhuma das amostras, apesar de ter sido

expresso em nosso controle positivo realizado com a célula U937. O *BCL2* e o *BAK* apresentaram expressão tanto no CTRL quanto em MC SCC4 e SCC9, mas não houve diferença de expressão entre as amostras. Esses resultados propõem que a redução da viabilidade celular na CEM não está relacionada com os genes de apoptose.

Na PBMC a expressão de *BAD* também não foi detectada em nenhuma das amostras. O *BCL2* não apresentou aumento da expressão de forma significativa, mas a expressão de *BAK* aumentou significativamente quando a PBMC-B foi exposta ao MC SCC4 por 24hs. No entanto, a expressão de *BAK* nessa amostra parece não estar relacionada com a exposição ao MC, visto que o padrão de viabilidade celular foi semelhante em todas as amostras de PBMC analisadas.

Pudemos observar algumas diferenças nas respostas de viabilidade celular entre a linhagem imortalizada analisada e a PBMC, dada a heterogeneidade dessa última população, composta por linfócitos T, linfócitos B, células NK, monócitos e células dendríticas, entre outras (53) e por se tratarem de linhagens primárias. Além disso, há uma variação na frequência dessas populações entre os indivíduos, o que pode refletir algumas diferenças nessas respostas. No que se refere aos componentes do sangue periférico, os linfócitos compreendem de 70-90% das células; os monócitos de 10 a 20% e as células dendríticas são raras, representando apenas de 1 a 2%. Dentre a população linfocítica, de 5 a 10% são linfócitos B; de 5 a 20% compõe as células NK; e de 70 a 85% de células são linfócitos T (CD3⁺), a população de interesse para essa pesquisa. Dentre os linfócitos T (CD3⁺) há os LT CD4⁺ e LT CD8⁺ na proporção de 2:1 e, após a ativação, o subconjunto de linfócitos T CD4⁺ irão se diferenciar nos diversos perfis(53,54).

Para verificarmos como os meios condicionados por células de carcinoma interferem na diferenciação da CEM e PBMC, foi realizado o ensaio de citometria de fluxo.

Ao analisarmos o perfil imunológico dos linfoblastos e PBMC por citometria de fluxo, verificamos que, ao serem expostas ao meio condicionado pelas duas linhagens de carcinoma epidermoide, essas células entraram em processo de diferenciação celular, com redução da população CD34⁺ e aumento significativo da população duplo-positiva pela PBMC-B e da população CD4⁺ em ambas as linhagens celulares.

Os resultados obtidos pelos ensaios de citometria de fluxo, bem como de viabilidade celular, que nos mostrou que houve uma redução da proliferação celular, mas sem estarem entrando em apoptose, o que mostrado pelo RT-qPCR de genes pró-apoptóticos, podem ser compreendidos pelo fato de que, células em processo de diferenciação, reprogramam seu metabolismo em detrimento das vias de síntese que alocam nutrientes para o crescimento e a atividade proliferativa(55,56). Dessa forma, podemos sugerir que os meios condicionados por SCC4 e SCC9 induziram a diferenciação da CEM e PBMC.

Nossos resultados de ELISA mostraram que as células de carcinoma (SCC4 e SCC9) secretam constitutivamente níveis reduzidos de IL-1 β , IL-10 e IFN- γ . A IL-6 e IL-8 são expressas em níveis um pouco maiores pela SCC4 e superexpressas pela SCC9.

Nosso ensaio de ELISA mostrou que a CEM e PBMC, quando em contato com o MC SCC4 e SCC9, reduzem a expressão de IL-1 β , com dados estatisticamente significativos. A IL-1 β é uma citocina mediadora da inflamação e apresenta altos níveis de expressão no microambiente tumoral. É secretada por linfócitos T, macrófagos e fibroblastos associados ao câncer (CAFs) estimulada pela exposição a carcinógenos(57). Está diretamente relacionada com a transformação maligna, em muitos tipos de câncer, incluindo o carcinoma epidermóide, por promover a angiogênese, proliferação celular e metástase(57,58).

A IL-10 apresentou expressão muito reduzida pelas SCCs e pela CEM e PBMC em meio não condicionado e, quando foram expostas aos MC SCC4 e MC SCC9, não houveram grandes alterações na expressão proteica, o que era de se esperar, visto que a IL-10 é secretada por macrófagos associados ao tumor com perfil M2 ou linfócitos T_{REGS}, levando a imunossupressão(46). De forma interessante os nossos resultados de caracterização por citometria de fluxo confirmam um pequeno percentual de células CD4⁺/FOXP3⁺, marcação característica de células T reguladoras. Foi possível observar que a CEM e PBMCs apresentam diferenciação para o perfil CD4⁺, quando cultivadas com os meios condicionados, mas não houve aumento da população com dupla marcação CD4⁺/FOXP3⁺.

Ao analisarmos os níveis de IFN- γ , verificamos que tanto a CEM quanto a PBMC apresentaram expressão constitutiva dessa citocina, mas quando essas

células foram expostas ao MC SCC4 e MC SCC9, observamos a redução da sua expressão, com todos os valores estatisticamente significativos. Bussu et al. (2018) analisaram os níveis séricos de algumas citocinas em pacientes acometidos com câncer de cabeça e pescoço e mostraram que o IFN- γ apresentou efeito protetor quando avaliada em relação ao prognóstico, apresentando redução dos seus níveis séricos em pacientes associados com pior prognóstico(59). Essa citocina é secretada por células NK e linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) através do reconhecimento antigênico por moléculas de MHC de classe I, gerando resposta citotóxica antitumoral(60). Apesar de nosso resultado de IFN- γ parecer estar de acordo com uma resposta pró-tumoral, isto pode não estar acontecendo, tendo em vista que nossas células ficaram em contato apenas com o meio de cultivo das células de carcinoma epidermoide, não havendo o contato célula-célula, portanto não ocorreu o reconhecimento de antígeno, o que levaria o aumento de IFN- γ no sobrenadante de cultura.

Nossos resultados mostraram que a IL-6 é expressa pela SCC4 em níveis menores e aberrantemente expressa pela SCC9. É também produzida constitutivamente pela CEM e PBMC-A, em níveis mais reduzidos. Quando a CEM e PBMC são expostas ao MC SCC4, verificamos que há uma ligeira redução da sua expressão, no entanto, com valores estatisticamente não significativos. Já com o MC SCC9, tanto a CEM quanto a PBMC apresentaram significativo aumento da expressão de IL-6. Esta citocina possui ação pleiotrópica que atua na imunidade inata e adquirida(23). É produzida por diversos tipos celulares, tais como, células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, queratinócitos, linfócitos B e T e células tumorais(45). Tem ação pró-inflamatória, estimulando a produção por proteínas de fase aguda pelo fígado; inibe a geração de células T_{REGS}; induz a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos secretores de anticorpos; estimula a ativação de células NK e linfócitos T citotóxicos; e medeia a diferenciação de células T CD4⁺ imaturas em células efetoras da imunidade(23). Sua síntese desregulada está relacionada com a proliferação tumoral, metástase e o estado de caquexia no câncer(14,45).

A IL-6 induz a diferenciação de células CD34⁺ em células T CD4⁺ efetoras(45), o que está de acordo com nossos achados de células CEM tratadas com MC SCC4, e PBMC tratado com ambos meios condicionados, as quais apresentam um aumento da população de células CD4⁺. Entretanto, apesar do significativo aumento da expressão dessa citocina pela CEM quando em MC SCC9, ela não foi capaz de induzir

a diferenciação de CEM CD34⁺ em CEM CD4⁺, pois não observamos redução da população CD34⁺ e nem aumento a população CD4⁺.

Apesar da alta expressão de IL-6 detectada nos sobrenadantes de cultivo, não houve aumento da expressão de mRNA de IL-6 após tratadas por 24hs, momento este que foi realizada a coleta do material a ser processado para quantificação por RT-qPCR. Este fenômeno pode ser explicado pelo fato da produção de IL-6 ser altamente regulada, transcricional e pós-transcricionalmente(61), por mecanismo de feedback negativo, onde a interação com seu receptor (IL-6R) ativa STAT3, um fator de transcrição, envolvido em muitas vias de imunossupressão, que transcreve genes supressores de sinalização de citocinas (SOCS), inibindo a sua expressão(62).

A IL-8 é uma quimiocina da família CXC, expressa por monócitos e macrófagos, em resposta a estresse, promovendo a migração de leucócitos para o local da inflamação e a angiogênese. Por não ser foco da nossa pesquisa, não foi analisada a população de monócitos presentes nas PBMC. Estudo recentes têm demonstrado que as células neoplásicas são capazes de induzir a diferenciação de monócitos para um perfil M2, pró-tumoral(63). Os macrófagos associados aos tumores possuem um papel duplo nas neoplasias, eliminando células neoplásicas e produzindo fatores de crescimento linfagiógenos e angiogênicos, citocinas e proteases(64). O ensaio por ELISA mostrou que a SCC4 e SCC9 expressam IL-8, assim como a CEM e a PBMC-A, no entanto, quando a CEM foi exposta ao MC SCC4 e SCC9, verificamos que houve redução significativa da sua secreção, enquanto que a PBMC-A reduziu a expressão de IL-8 e inibiu a sua secreção em MC SCC9. Os dados de qRT-PCR mostram o mesmo resultado para a CEM e o inverso para a PBMC-B. A IL-8 ativa diversas vias de sinalização que estão relacionadas com a angiogênese, sobrevivência, proliferação celular, invasão e metástase(65).

Os linfócitos T_{REG} tem importante papel na autotolerância e na gestão das respostas imunes através da imunossupressão, evitando a inflamação crônica(27). As T_{REGS} expressam constitutivamente o receptor da cadeia α da IL-2 (CD25), sendo, portanto, denominadas CD4⁺CD25⁺(30), assim como outros marcadores que não são específicos, mas que colaboram para sua identificação, como o receptor para TNF- α (TNFR)(31). O TGF- β é uma citocina com ação supressora em células alvo e modula a expressão de FOXP3, um fator nuclear que exerce funções em regiões reguladoras

específicas no DNA, estimulando ou inibindo a transcrição de genes específicos pelas T_{REGS}, podendo alterar o perfil de células T periféricas CD4⁺CD25⁻ para células CD4⁺CD25⁺(32), secretoras de IL-10, proporcionando um microambiente tumoral imunossuprimido, favorecendo a progressão do câncer(19). Algumas citocinas, incluindo a IL-6 e TNF- α tem a capacidade de inibir o desenvolvimento e função das T_{REG} no sítio inflamatório(23), o que pode justificar a ausência de diferenciação dessa população pela CEM e PBMC-B para CD4⁺FOXP3⁺.

Interessantemente, encontramos um aumento da população CD8⁺/FOXP3⁺ na linhagem PBMC exposta aos MCs por SCC4 e SCC9. Células com esse perfil representaram aproximadamente 0,9% das PBMCs(34) e foi mostrado em ratos que essas células tem atividade imunossupressora por interferirem em respostas imunes nos tecidos linfoides secundários, afetando a ativação de linfócitos T CD4⁺(35). Entretanto, em uma revisão sistemática, Ruitter et al. (2017) mostraram que, dentre 2550 artigos encontrados com marcadores de perfil de células T, 11 deles demonstraram presença da população de linfócitos T_{REGS} FOXP3⁺ em carcinomas epidermoide de cabeça e pescoço e que estas células CD8⁺FOXP3⁺ foram relacionadas com um bom prognóstico(66).

Nossos resultados sugerem que os produtos derivados das células de carcinoma epidermoide podem variar entre as linhagens, resultando em respostas imunológicas diferentes pela CEM e PBMC, mas que, em 24hs de exposição a esses meios de cultivo, as células de linfoblastos e células mononucleares do sangue periférico reagem a favor de uma resposta anti-tumoral, verificada através do ensaio de viabilidade, no qual as células CEM não apresentaram redução, com proliferação no Controle, e manutenção do número de células cultivadas nos meios condicionados, o que semelhantemente ocorre com as PBMCs, visto que a redução da viabilidade apresentada não está relacionada com a exposição aos meios condicionados. Somando a isto, verificamos que, quando em contato com os meios condicionados, as células entram processo de diferenciação celular, confirmada pela redução das populações CD34⁺ em ambas as linhagens; pelo aumento da população CD4⁺ na CEM e PBMCs analisadas; pela redução do perfil de células T_{REGS} CD4⁺FOXP3⁺ e aumento das células duplo-positivas (CD4⁺CD8⁺) e CD8⁺FOXP3⁺ nas PBMCs.

Para se obter dados mais precisos sobre as interações entre os componentes do TME, é importante a realização de mais pesquisas, com tempos diferentes de exposição aos meios condicionados, bem como aumentar o número de citocinas avaliadas e anticorpos para definir melhor os perfis imunológicos que essas células estão assumindo, tendo em vista a grande diversidade de células constituintes do sangue periférico e os diferentes graus de diferenciação que as células podem apresentar.

7 CONCLUSÕES

- Os produtos derivados das células de carcinoma epidermoide variam entre as linhagens de carcinoma epidermoide, o que reflete em respostas imunológicas diferentes;
- O meio condicionado derivado de carcinoma epidermoide é capaz de induzir a diferenciação celular de linfoblastos e células derivadas do sangue periférico, o que foi verificado pela redução da população CD34⁺; aumento da população CD4⁺, aumento das células duplo-positivas (CD4⁺/CD8⁺) e CD8⁺/FOXP3⁺ nas PBMCs;
- No período de 24hs de exposição aos meios de cultivo derivados de carcinoma epidermoide, as células de linfoblastos e PBMC reagem a favor de uma resposta imune anti-tumoral, porém após este período o meio condicionado parece reduzir a viabilidade destas células.

REFERÊNCIAS¹

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359–86.
2. Levi F. Cancer incidence in five continents, vol. VI. A review by Fabio Levi. *Eur J Cancer* 1993;29(6):2315-9.doi://doi.org.10.1016/0959-8049(93)90227-7.
3. INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2018-Incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro; 2017. [citado 02 Ago 2018];130 p. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>
4. Brener S, Jeunon FA, Barbosa AA, Grandinetti H de AM. Carcinoma de células escamosas bucal : uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. *Rev Bras Cancerol*. 2007 jan-mar;53(1):63–9.
5. Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endod*. 2006, jul;102(1):67-76.
6. Feller L, Lemmer J. Oral squamous cell carcinoma: epidemiology, clinical presentation and treatment. *J Cancer Ther* [Internet]. 2012 [citado 13 Jan 2017];3(4):263–8. Disponível em: <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=21591>.doi:10.4236/jet.2012.34037
7. Blatt S, Ziebart T, Krüger M, Pabst AM. Diagnosing oral squamous cell carcinoma: how much imaging do we really need? A review of the current literature. *J Craniomaxillofac Surg* [Internet]. 2016 May [citado 14 Mai 2017];44(5):538–49. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26976698>
8. Al-Rajhi N, Khafaga Y, El-Husseiny J, Saleem M, Mourad W, Al-Otieschan A, et al. Early stage carcinoma of oral tongue: Prognostic factors for local control and survival. *Oral Oncol*. 2000;36(6):508–14.

¹ De acordo com o estilo Vancouver.

9. Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya KAAS. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: A descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. *Oral Oncol.* 2003 Feb;39(2):106-14
10. INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016-Incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro; 2015 [citado 13 Mai 2018]. Inca [Internet]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>
11. Amorim Filho FS, Andrade Sobrinho J, Abrão Rapoport A MBC, Neil F, Novo YJ. Estudo de variáveis demográficas, ocupacionais e co-carcinogênicas no carcinoma espinocelular da base de língua nas mulheres. *Rev Bras Otorrinolaringol* [Internet]. 2003 [citado 12 Fev 2017];69:472–8. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0034-72992003000400006&script=sci_abstract&lng=pt
12. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2015 [citado 07 Out 2018];8(9):11884–94. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4637760&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
13. Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(4):489–501.
14. Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-ad V, Pribitkin E, et al. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Oncol* [Internet]. 2014 [citado 13 Jan 2018];41(2):217–34. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093775414000517>
15. Wang M, Zhao J, Zhang L, Wei F, Lian Y, Wu Y, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer.* 2017;8(5):761–73. Doi: 10.7150/jca.17648
16. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoeediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002;3(11):991–8.
17. Thomson PJ. Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention—proliferation, position, progression and prediction. *J Oral Pathol Med.* 2018; May;1–5. Doi: <https://doi.org/10.1111/jop.12733>

18. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* [Internet]. 2000 Jan 7 [citado 14 Set 2017];100(1):57–70. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931>
19. Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett* [Internet]. 2014 [citado 24 Fev 2017];8(1):7–11. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4063640&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
20. Taghavi N, Yazdi I. Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: clinical, histologic, genetic and molecular concepts. *Arch Iran Med* [Internet]. 2015 May [citado 12 Out 2017];18(5):314–9. Disponível em: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84928897866&partnerID=40&md5=24f3b4566f034c41798bf76d2aa891ed>
21. Amedei A, Prisco D, MM DE. The use of cytokines and chemokines in the cancer immunotherapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* [Internet]. 2013 [citado 24 Abr 2018];8(2):126–42. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22894642%5Cnhttp://www.ingentaconnect.com/content/ben/pra/2013/00000008/00000002/art00002?token=0054177b9a763d239412f415d7678257070517b427a5a5142253048296a7c2849266d656cd51da6b7fc2%5Cnhttp://www.ingentaconnect.com/conten>
22. Kumar V, Abbas A, Aster J. Robbins patologia básica. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.
23. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
24. Jobim M, Jobim LFJ. Natural killer cells and immune surveillance. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. 2008 [citado 21 Mar 2018];84(7):58–67. Disponível em: http://www.jped.com.br/conteudo/Ing_resumo.asp?varArtigo=1865&cod=&idSecao=1
25. Parkin J, Cohen B. Overview of the immune system. *Lancet*. 2001;357(9270):1777–89.
26. Mesquita D, Cruvinel WM, Câmara NOS, Kállas EG, Andrade LEC. Autoimmune diseases in the TH17 era. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42(6):476–86.

27. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775–87.
28. Smith DA, Germolec DR. Introduction to immunology and autoimmunity. *Environ Health Perspect*. 1999;107(SUPPL. 5):661–5.
29. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* [Internet]. 1995 Aug 1 [citado 23 Ago 2018];155(3):1151–64. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/content/155/3/1151>
30. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high Regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* [Internet]. 2001 [citado 23 Ago 2018];167(3):1245–53. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.167.3.1245>
31. Gupta S, Shang W, Sun Z. Mechanisms regulating the development and function of natural regulatory T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008;56(2):85–102.
32. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4 + CD25 – Naive T cells to CD4 + CD25 + regulatory T cells by TGF- β induction of transcription Factor Foxp3. *J Exp Med* [Internet]. 2003 [citado 24 Ago 2018];198(12):1875–86. Disponível em: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20030152>
33. Campbell DJ, Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2007 [citado 22 Nov 2017];7(4):305–10. Disponível em: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2061>
334. Wen Z, Shimojima Y, Shirai T, Li Y, Ju J, Yang Z, et al. NADPH oxidase deficiency underlies dysfunction of aged CD8+ Tregs. *J Clin Invest* [Internet]. 2016 Apr 18;126(5):1953–67. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27088800>
35. Alvarez Arias DA, Kim H-J, Zhou P, Holderried TAW, Wang X, Dranoff G, et al. Disruption of CD8+ treg activity results in expansion of t follicular helper cells and enhanced antitumor immunity. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2014 [citado 13 Mai 2018];2(3):207–16. Disponível em: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/2326-6066.CIR-13-0121>

36. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539–45.
37. Old LJ, Clarke DA, Benacerraf B. Effect of bacillus calmette-guérin infection on transplanted tumours in the mouse. *Nature*. 1959;184(4682):291–2.
38. Adach A, Ellert-miklaszewska A, Kaminska B. Inflammation and cancer. 2009 Dec [citado 12 Fev 2018];512(December):265–78. Disponível em: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-60327-530-9>
39. Ferris RL. Immunology and immunotherapy of head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2015 Oct;33(29):3293–304. Doi: 10.1200/JCO.2015.61.1509
40. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: Immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(10):715–27.
41. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
42. Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13(2):135–41.
43. Choudhary MM, France TJ, Teknos TN, Kumar P. Interleukin-6 role in head and neck squamous cell carcinoma progression. *World J Otorhinolaryngol Neck Surg* [Internet]. 2016 [citado 25 Abr 2018];2(2):90–7. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S209588111630035X>
44. Murakami M, Hirano T. The pathological and physiological roles of IL-6 amplifier activation. *Int J Biol Sci*. 2012;8(9):1267–80. doi:10.7150/ijbs.4828
45. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci* [Internet]. 2012 [citado 25 Ago 2018];122(4):143–59. Disponível em: <http://clinsci.org/lookup/doi/10.1042/CS20110340>
46. Taams LS, Palmer DB, Akbar AN, Robinson DS, Brown Z, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology*. 2006 May;118(1):1–9. doi: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02348.x>

47. Schmid I, Uittenbogaart C, Jamieson BD. Live-cell assay for detection of apoptosis by dual-laser flow cytometry using Hoechst 33342 and 7-amino-actinomycin D. *Nat Protoc.* 2007;2(1):187–90.
48. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: Defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol.* 2006;24(14):2137–50.
49. Vunjak-Novakovic G, Freshney RI, editors. *Culture of cells for tissue engineering* [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2005. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471741817>
50. Masters JR. Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2000;1(3):233–6. Disponível em: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=11252900&retmode=ref&cmd=prlinks>
51. Von Moltke LL, Greenblatt DJ, Schmider J, Wright CE, Harmatz JS, Shader RI. In vitro approaches to predicting drug interactions in vivo. *Biochem Pharmacol.* 1998 [citado 25 Ago 2018];55(2):113–22.
52. Zhan Y, Carrington EM, Zhang Y, Heinzl S, Lew AM. Life and Death of Activated T Cells: Life and Death of Activated T Cells? *Frontiers in Immunology.* 2017; 8: 1809. doi: 10.3389/fimmu.2017.01809. – Corrigir posição
53. Kleiveland CR. The impact of food bioactives on health in vitro an ex vivo models [Internet]. Cham: Springer; 2015. Chapter 15, Peripheral blood mononuclear cells [citado 23 Jul 2018]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29787062>
54. Hirahara K, Poholek A, Vahedi G, Laurence A, Kanno Y, Milner JD, et al. Mechanisms underlying helper T-cell plasticity: implications for immune-mediated disease. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2013;131(5):1276–87. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.03.015>
55. Agathocleous M, Harris WA. Metabolism in physiological cell proliferation and differentiation. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2013;23(10):484–92. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2013.05.004>

56. Palm W, Thompson CB. Review Nutrient acquisition strategies of mammalian cells. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2017;546(7657):234–42. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nature22379>
57. Wu T, Hong Y, Jia L, Wu J, Xia J, Wang J, et al. Modulation of IL-1 β reprogrammes the tumor microenvironment to interrupt oral carcinogenesis. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Feb;6(September 2015):1–10. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/srep20208>
58. Lee CH, Chang JSM, Syu SH, Wong TS, Chan JYW, Tang YC, et al. IL-1 β promotes malignant transformation and tumor aggressiveness in oral cancer. *J Cell Physiol*. 2015;230(4):875–84.
59. Bussu F, Graziani C, Gallus R, Cittadini A, Galli J, De Corso E, et al. IFN- γ and other serum cytokines in head and neck squamous cell carcinomas. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2018;38(2):94–102.
60. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* [Internet]. 1994 [citado 13 Feb 2017];1(6):447–56. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7895156>
61. Anderson P. Post-transcriptional control of cytokine production. *Nat Immunol* [Internet]. 2008 Apr [citado 23 Jun 2018];9(4):353–9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16718380>
62. Zhang L, Badgwell DB, Bevers JJ, Schlessinger K, Murray PJ, Levy DE, et al. IL-6 signaling via the STAT3/SOCS3 pathway: functional analysis of the conserved STAT3 N-domain. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2006 Aug [citado 29 Ago 2018];288(1–2):179–89. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11010-006-9137-3>
63. Merry R, Belfield L, McArdle P, McLennan A, Crean S, Foey A. Oral health and pathology: a macrophage account. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Jan;50(1):2–7. doi: 10.1016/j.bjoms.2010.10.020
64. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1073–81.

65. Waugh DJJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(21):6735–41.

66. de Ruiter EJ, Ooft ML, Devriese LA, Willems SM. The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunol* 2017;6(11):1–10. doi: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1356148>

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Influência do meio condicionado de células de carcinoma em células inflamatórias

Pesquisador: Fabio Daumas Nunes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 68441417.3.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.745.569

Apresentação do Projeto:

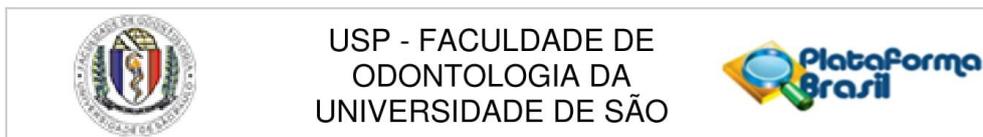
O presente projeto tem como objetivo analisar a influência do meio condicionado por células de carcinoma epidermoide de língua em células de linfoblastos e células mononucleares do sangue periférico, no que se refere à viabilidade, secreção de citocinas, expressão gênica e diferenciação celular, de forma a compreender melhor os mecanismos relacionados à carcinogênese, bem como a atuação do sistema imune na progressão do câncer.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Entender a interação entre os componentes do microambiente tumoral. Verificar como os linfoblastos e PBMCs reagem à exposição do meio condicionado pelas células de carcinoma epidermoide de língua.

Objetivo Secundário: Analisar a influência do meio condicionado por células de carcinoma epidermoide de língua em células de linfoblastos e células mononucleares do sangue periférico, no que se refere à viabilidade, secreção de citocinas, expressão gênica e diferenciação celular, de forma a compreender melhor os mecanismos relacionados à carcinogênese, bem como a atuação do sistema imune na progressão do câncer.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br



Continuação do Parecer: 2.745.569

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos contidos no projeto são mínimos, visto que o projeto irá realizar ensaios laboratoriais apenas utilizando linhagens de células e todos os participantes do grupo que irão manipular os experimentos possuem prévio treinamento e utilização devidos equipamentos de proteção individual.

Os benefícios consistem em criar parâmetros para a caracterização de componentes do micrombiente tumoral, favorecendo a compreensão do seu comportamento para que se possa tomar medidas de tratamento mais adequadas para os pacientes com carcinoma epidermoide de boca.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

No decorrer da realização dos experimentos pretendidos para o presente projeto de pesquisa, ocorreu a perda total de uma das linhagens celulares (JURKAT ATfomoscomCC@ TIB-152™, Manassas, VA, EUA). Devido a esse fato, tornou-se inevitável a substituição desse grupo experimental por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), as quais serão adquiridas do Biorrepositório da Universidade Nove de Julho (Uninove). adicionalmente os pesquisadores consideram interessante inserir o ensaio por ELISA para avaliar o sobrenadante de cultura com o objetivo de verificar a secreção de citocinas pelas células de carcinoma epidermoide, bem como as células inflamatórias antes e após a exposição ao meio. Assim sendo, os pesquisadores propõe uma Emenda ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, de modo a realizar os novos experimentos propostos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

São apresentados: Informações Básicas do Projeto, atualizada pela Justificativa da Emenda, Carta de autorização de UNINOVE, Carta de Autorização do BIOBANCO da FOU SP, , Folha de Rosto.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227			
Bairro: Cidade Universitária	CEP: 05.508-900		
UF: SP	Município: SAO PAULO		
Telefone: (11)3091-7960	Fax: (11)3091-7814	E-mail: cepfo@usp.br	



USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 2.745.569

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não constam pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1123045_E1.pdf	25/06/2018 12:16:33		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_Dispenza_TCLE.pdf	25/06/2018 12:14:56	SOFIA BEVILAQUA DE CASTRO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Emenda_CEP.PDF	25/06/2018 11:41:16	SOFIA BEVILAQUA DE CASTRO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Carta_Biobanco.PDF	25/06/2018 11:38:30	SOFIA BEVILAQUA DE CASTRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Emenda_CEP.pdf	25/06/2018 11:22:16	SOFIA BEVILAQUA DE CASTRO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Carta_UNINOVE.jpeg	22/06/2018 16:52:46	SOFIA BEVILAQUA DE CASTRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 29 de Junho de 2018

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

ANEXO B – Carta de cessão de células

**Carta de Cessão de Células**

São Paulo, 21 de Junho de 2018

TÍTULO DA PESQUISA: Influência do meio condicionado por células de carcinoma epidermoide de língua sobre linfoblastos e células mononucleares do sangue periférico

PESQUISADORES:

Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes
Sofia Bevilaqua de Castro
Lucyene Miguita Luiz
Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues

ORIENTADOR/PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes

OBJETIVO PRINCIPAL DA PESQUISA:

Esse projeto tem como objetivo principal verificar a influência do meio condicionado por células de carcinoma epidermoide de língua sobre células de linfoblastos (CEM) e células mononucleares do sangue periférico quanto à viabilidade, secreção de citocinas, expressão gênica e diferenciação celular, de forma a se compreender melhor os mecanismos relacionados à carcinogênese, bem como a atuação do sistema imune na progressão do câncer.

Autorizo a utilização das células mononucleares do sangue periférico para a pesquisa acima descrita. Essas células pertencem ao Biorrepositório da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) e estão sob minha responsabilidade.

Sem mais,

Data: 21/06/18

Professora Dra. Maria Fernanda Setúbal Destro Rodrigues
Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde
Universidade Nove de Julho