



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

CAYO AMARAL ABREU

**AVALIAÇÃO DO IMIQUIMODE SOBRE A RESPOSTA
INATA E O FENÓTIPO FUNCIONAL DE LINFÓCITOS T
DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO MELANOMA
EXPERIMENTAL.**

Salvador, BA
2017

CAYO AMARAL ABREU

**AVALIAÇÃO DO IMIQUIMODE SOBRE A RESPOSTA
INATA E O FENÓTIPO FUNCIONAL DE LINFÓCITOS T
DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO MELANOMA
EXPERIMENTAL.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dra. Fabiola Cardillo.

Salvador, BA
2017

Porque ter um filho não é simplesmente colocá-lo no mundo, é amar, educar, e ensinar valores. Aos melhores pais do mundo: **Leise Cristiani e Luis Cláudio**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a **Deus**, por me dar a vida e colocar pessoas maravilhosas no meu caminho, que me ajudaram a trilhar e sempre seguir em frente.

Aos meus pais, **Leise Cristiani e Luis Cláudio**, por me apoiarem independente do que aconteça, por muitas vezes sacrificando suas vontades para que eu possa viver meus sonhos. Amo vocês de maneira incondicional.

A minha orientadora, **Dra. Fabiola Cardillo**, ou simplesmente **Dra. F.**, por além de me dar oportunidade, ser de fato uma excelente orientadora, sempre disposta a sanar dúvidas, não importando hora ou local. Muito obrigado.

Dr. Marcos Lázaro, jamais esquecerei tudo que fez por mim, desde 2010, no nosso primeiro contato, quando você demonstrou não somente um excelente professor de graduação, mas um amigo que levarei por toda minha vida. Calma para o êxito.

Ao **Dr. Daniel Pessina**, me espelho muito em você, não só como exemplo de profissional, mas como pessoa, verdadeiro poço de conhecimento, que me abraçou e muito me ensinou no início da minha caminhada.

As amigas de laboratório e futuras doutoras, **Amanda Catariny**, e **Maiara Bonfim**, que se tornaram amigas para vida, obrigado pelo apoio nos experimentos, conselhos, broncas, e pela amizade que sabemos bem que não se resume ao laboratório.

Dinalva França de Jesus, difícil expressar em palavras a pessoa que você é, está sempre disposta a fazer o bem, ajudar, sem importar a quem, gênio forte, e fazendo sempre questão de falar que “seu santo é macho”. Se cada pessoa no mundo tivesse uma Dinalva na vida, o mundo seria muito melhor.

Ao **Dr Thiago Cardoso**, pelo excelente suporte, além de sempre demonstrar disposição, e oferecer ajuda nos experimentos e discussões.

Aos amigos **Alessandro Martins, Ane Caroline, Candace Andrade, Cintia Araújo, Emanuelle Souza, Isa Rita, Jéssica Vieira, Kelvin Edson, Michael Macedo, Tiago Landim, Yuri Tabajara** do **Instituto Gonçalo Moniz**, pelos momentos de apoio, conhecimento e descontração.

Ao **Instituto Gonçalo Moniz**, por fornecer toda estrutura necessária para desenvolvimento do projeto.

Aos familiares, que mesmo não citando todos, são de suma importância, em especial minha avó, **Leda Teixeira** e meu avô, **Carlos Carlixto**.

Amigos que durante a recente caminhada me apoiaram, **Yago Duran, Mariana Cunha, Adriano Guerra, André Barral, Anne Caroline, Marcelo Soares, Renzo Carvalho, Rodrigo Brandão**. Obrigado por tudo, amo vocês.

Ao **PPGIm**, oferecer todo suporte acadêmico, e a todo tempo estimular seus alunos a melhorar, não só academicamente, mas também pessoalmente, em especial a **Dilcéia Oliveira** por acolher todo novo aluno com muito carinho e dedicação, como se fossem seus filhos.

Aos órgãos de financiamento de pesquisa, **PAPES/CNPq**, e o **CAPES**, pelo apoio financeiro, fundamental para o projeto.

E por último e não menos importante, minha namorada **Caroline Vivas**, que desde que a conheci foi se tornando peça indispensável na minha vida, uma verdadeira companheira para todos os momentos, seja ele qual for, minha melhora amiga que sempre me apoia e me mostra a luz, por mais escuro que seja a caminhada. Sempre estarei do seu lado, assim como sei que estará do meu, te amo.

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.”

Friedrich Nietzsche.

RESUMO

O melanoma é um tipo de tumor de pele com altas taxas de incidências por todo mundo. Buscando formas de terapia auxiliar, destaca-se o Imiquimode (IMIQ), um creme de uso tópico que atua no receptor tipo toll-7 (TLR-7) estimulando o sistema imune inato a promover atividades tumoricidas. No presente estudo o tumor de linhagem B16F0 foi inoculado na orelha dos camundongos, seguidos do tratamento com o creme IMIQ. A mortalidade e o desenvolvimento tumoral foram acompanhados, nos diferentes grupos experimentais. Após 12 dias de tratamento, baços e linfonodos cervicais foram removidos em grupos de animais tratados e não tratados. As células foram colocadas em cultivo, plaqueadas e marcadas para análise em citômetro de fluxo. Grupos tratados com IMIQ apresentaram considerável eficácia no aumento da sobrevida e na contenção do tumor. Além disso, foi demonstrado que a atividade antitumoral é dependente da molécula de CD1, comprovando a importância das células NKT no combate ao melanoma. Ademais, nos grupos tratados, houve maior produção de IFN- γ por linfócitos TCD8 esplênicos, e TNF- α por células TCD4 e TCD8 de linfonodos drenantes. Pôde-se ainda notar o aumento de granzima B (GZB) produzida por células dendríticas (DCs) no baço de animais com melanoma. Já na estimulação de esplenócitos com o mitógeno Concanavalina A, foi evidenciada inibição na produção de GZB por células dendríticas. Conclui-se que NKT pode ser a principal responsável pela migração dessa população celular e que a produção de GZB por DCs pode ser inibida mediante a presença de antígenos tumorais.

Palavras-chave: Células Dendríticas. Células NKT. Imiquimode. Melanoma.

ABSTRACT

Melanoma is a type of skin tumor with high incidence rates worldwide. Aiming for forms of auxiliary therapy, Imiquimode (IMIQ), a topical cream that acts on the toll-7 receptor (TLR-7), stimulates the innate immune system to promote tumoricidal activities. In the present study the B16F0 lineage tumor was inoculated into the ears of the mice, followed by treatment with the IMIQ cream. Mortality and tumor development were monitored in the different experimental groups. After 12 days of treatment, spleens and cervical lymph nodes were removed in groups of treated and untreated animals. Cells were plated, plated and labeled for flow cytometer analysis. Groups treated with IMIQ showed considerable efficacy in increasing survival and tumor containment. In addition, it has been demonstrated that the antitumor activity is dependent on the CD1 molecule, proving the importance of NKT cells in the fight against melanoma. In addition, in the treated groups, there was a greater production of IFN- γ by splenic TCD8 lymphocytes, and TNF- α by TCD4 and TCD8 cells from draining lymph nodes. It was also possible to note the increase of granzyme B (GZB) produced by dendritic cells (DCs) in the spleen of animals with melanoma. Already in the stimulation of splenocytes with the mitogen Concanavalin A, inhibition was demonstrated in the production of GZB by dendritic cells. It is concluded that NKT may be the main responsible for the migration of this cell population and that the production of GZB by DCs can be inhibited by the presence of tumor antigens.

Keywords: Dendritic cells. NKT cells. Imiquimod. Melanoma

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Inoculação de B16F0 (células de melanoma) na orelha dos camundongos C57Bl/6	30
Figura 2	Sobrevida dos camundongos inoculados com B16F0 após tratamento com Imiquimode (IMIQ).	31
Figura 3 A	Avaliação do tamanho do tumor em camundongos inoculados com células de melanoma e tratados com IMIQ	32
Figura 3 B	Avaliação do tamanho tumoral através da mediana, entre os diferentes grupos experimentais	32
Figura 4 A	Células T CD4, comparação entre os grupos: controles não tratados (C) e tratados com IMIQ.	33
Figura 4 B	Células T CD8, comparação entre os grupos: controles não tratados (C) e tratados com IMIQ.	33
Figura 5	Células T CD4 de memória central: comparação entre os grupos: controles não tratados (C) e tratados com IMIQ.	34
Figura 6 A	Quantificação de células dendríticas (CD11c ⁺ CD11b ⁺ CD8 α ⁻), comparação entre os grupos: controles não tratados (C) e tratados com IMIQ.	35
Figura 6 B	Número relativo de células NKT (NK 1.1 ⁺ , TCR $\alpha\beta$ ⁺), comparação entre os grupos: controles não tratados (C) e tratados com IMIQ.	35
Figura 7	Produção de IFN- γ por Linfócitos T CD8, no baço e no linfonodo drenante, em animais tratados (IMIQ) e em animais não tratados (C), esplenócitos cultivados com meio (C), ou estimuladas com α CD3	36
Figura 8	TNF- α produzido em cultura por Linfócitos T do linfonodo drenante em populações CD4 ⁺ (a esquerda) e CD8 ⁺ (a direita, em animais tratados (IMIQ) e em animais não tratados (C), quando estimulados com α CD3.	37
Figura 9 A	Sobrevida dos animais selvagens (WT) e desprovidos da molécula de CD1 (CD1KO), que receberam o tratamento (IMIQ) e que não receberam o tratamento	39
Figura 9 B	Avaliação do tamanho tumoral em cada animal nos diferentes grupos.	39
Figura 9 C	Tamanho tumoral avaliado pela mediana dos animais CD1KO e seus controles.	39

<p>Figura 10</p>	<p>DCs que produzem Granzima B em cultura: em animais tratados (IMIQ) e não tratados (C), com diferentes estímulos, Con A, Con A mais antígenos tumorais (Con A + Ags), ou PBS (C).</p> <p>Comparação das DCs que produzem Granzima B em cultura no grupo de animais tratados (IMIQ), que receberam estímulo com Con A com grupo de células que receberam o estímulo com Con A mais antígenos tumorais (Con A + Ags).</p>	<p>41</p>
------------------	---	-----------

Lista de Siglas e Abreviaturas

α Gal-cer	α Galactosilceramida
APCs	Células apresentadoras de antígeno
Ags	Antígenos tumorais
Bio	Biotina
BCI-2	Do inglês <i>B cell lymphoma 2</i>
CD	Grupo ou “ <i>cluster</i> ” de diferenciação
cDCs	Células dendríticas convencionais
Con A	Concanavalina A
CD1KO	CD1 Knock-out
CTL	Linfócitos T citolíticos
CTL A-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
DAMPs	Padrões moleculares associados a lesão
DCs	Célula dendrítica
dLN	Linfonodo drenante
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Fluoresceína
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
IFN	Interferon
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IL	Interleucina
IMIQ	Imiquimode
MC	Melanoma cutâneo
MDSC	Células mielóides supressoras
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
μ m	Micrômetro
MMPs	Metaloproteases de matriz
mL	Mililitro
MIP-1 α	Proteína 1 α inflamatória de macrófagos
NK	Linfócito <i>Natural Killer</i>
NKT	Linfócito T <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido Nítrico
PBS	Solução Salina tamponada com Fosfato
PD-1	Proteína de morte celular programada - 1
pDCs	Células dendríticas plasmocitóides
PE	Ficoeritrina
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
TCR	Receptores de células T
TGF- β	Fator transformador de crescimento β
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TLR- 7 e 8	Receptor tipo <i>toll-7</i> / Receptor tipo <i>toll-8</i>
Treg	Linfócito T regulatório ou regulador
UV	Radiação ultravioleta
WT	Do inglês, <i>wild type</i> , animal selvagem.

Sumário

Introdução geral.....	13
Revisão de literatura.....	15
Hipótese e Objetivos.....	21
Hipótese	21
Objetivo geral.....	21
Objetivos específicos	21
CAPÍTULO 1: Artigo Científico: Avaliação do imiquimode sobre a resposta inata e o fenótipo funcional de linfócitos T durante o desenvolvimento do melanoma experimental.	23
Introdução.....	23
Materiais e métodos.....	25
Animais: C57Bl/6 selvagens (WT) e CD1KO (CD1 -/-)	25
Cultura de células de melanoma e inoculação em camundongos C57Bl/6.....	25
Crescimento tumoral e mortalidade.....	26
Tratamento com Imiquimode.....	26
Cultura de células esplênicas e de linfonodos cervicais	27
Obtenção de extratos de antígenos tumorais	27
Marcação de moléculas de superfície em esplenócitos e dLNs.....	28
Marcação de citocina intracelular em células esplênicas e do dLN e leitura.....	28
Análise estatística e avaliação dos dados	29
Resultados.....	30
Padronização do modelo experimental	30
Sobrevida dos camundongos C57Bl/6 inoculados com B16F0 após tratamento com IMIQ.	31
Avaliação do tamanho do tumor em camundongos inoculados com células de melanoma e tratados com IMIQ	32
O tratamento com IMIQ, reduz a população de células de memória central (CD4+ CD44+ CD62L+) no baço.....	33
Imiquimode é capaz de induzir a produção de IFN- γ e TNF- α em ensaios <i>in vitro</i> por linfócitos.....	36
As células NKT promovem a contenção do tumor e favorecem o aumento da sobrevivida.	38
Os antígenos tumorais promovem a redução da população de DCs produtoras de Granzima B em ensaios <i>ex vivo</i>	40
Discussão	42
Conclusão geral.....	48
Referências.....	49

Introdução geral

O tumor de pele pode ser classificado entre os tipos mais malignos, dentre eles os mais comuns são o câncer de células basais, e o câncer de células escamosas. A mortalidade do melanoma cutâneo, chega a ser três vezes maior que os outros tipos de câncer de pele (ILKOVITCH & LOPEZ, 2008), sendo um tipo raro, porém o mais agressivo dentre os cânceres de pele já descritos (VILANOVA et al, 2013). Sua incidência vem aumentando progressivamente em todo o mundo, sendo que uma das hipóteses para isso é o aumento dos níveis de exposição à radiação ultravioleta (UV), além dos fatores genéticos e ambientais que aumentam a ameaça de desenvolvimento desse tipo de tumor (MACKIE et al, 2009). Os tratamentos tradicionais como a quimioterapia e a radioterapia são os mais utilizados, sendo que o procedimento cirúrgico para retirada total do tumor é essencial (BAKOS et al, 2013).

Novas terapias são necessárias para que ocorra um combate tumoral eficiente capaz de recrutar e ativar células do sistema imunológico de uma maneira rápida e eficaz, para o controle do tumor. Tais terapias devem apresentar menos efeitos colaterais comparadas aos tratamentos convencionais são necessárias, capazes de estimular o sistema imune, para o desenvolvimento de uma resposta rápida e eficaz. Como por exemplo a utilização de DCs pulsadas com antígeno específico, relatada em trabalho publicado em 2006 por VARGAS e colaboradores, o qual demonstrou que DCs isoladas do baço de camundongos BALB/c, (que receberam melanoma pela via subcutânea), foram purificadas, cultivadas, posteriormente pulsadas com um antígeno específico e por fim inoculadas em outros animais com melanoma. As mesmas foram aptas a induzirem resposta potencializada contra o antígeno pulsado, resultando em respostas de células B produzindo maiores titulações de anticorpos no soro dos animais, além de uma maior quantidade de hibridoma. Uma outra abordagem recente tem sido o Imiquimode (IMIQ), um creme de uso tópico estimulante do receptor tipo toll-7 (TLR-7), com eficácia já relatada no tratamento de câncer de células escamosas (HUANG et al, 2009).

O TLR-7 é um receptor capaz de realizar o reconhecimento de PAMPs (padrões moleculares associados ao patógeno), bem como de DAMPs (padrões moleculares associados a lesão), além de ser expresso por uma grande diversidade celular, dentre elas os melanócitos e células de Langerhans. O mesmo está presente em algumas células do sistema imunológico como DCs (células dendríticas). Dentre as células que atuam no combate tumoral, destaca-se as células *Natural Killer* (NK); que reconhecem células que apresentem ausência ou alteração na expressão da molécula de MHC de classe I, sendo capazes de identificar estruturas que promovem reconhecimento de tumores como estranhos (revisto por RAULET, 2003). Células NKT, outra população celular comprometida no combate tumoral, são uma subpopulação de células T que apresenta um repertório restrito de receptores de células T (TCR) e marcadores de células NK, como o NK1.1. Estas são dependentes da molécula de CD1 para que seu reconhecimento seja realizado e promove eliminação da célula alvo pelo mecanismo dependente de perforina (revisto por BRUTKIEWICZ & SRIRAM, 2002). Outra população celular que se destaca pela atividade antitumoral, é a de células dendríticas (DCs), capazes de produzir e liberar Interferon do tipo I, mediante estímulo, gerando a morte tumoral pela produção e liberação de Granzima B (GZB) (DROBITS et al, 2012). Em seres humanos as DCs também são as principais apresentadoras de antígenos para linfócitos T “naïve”, que quando entram em contato com o antígeno apresentado pelas DCs, os linfócitos se ativam e apresentam respostas antígeno-específicas (NISHIMURA et al., 2000). Os linfócitos T tem papel importante na atividade tumoricida, pois participam ativamente na produção e liberação de citocinas, como IFN- γ , e TNF- α que, segundo DONIA e colaboradores em trabalho publicado em 2013, que em humanos, quando essas citocinas são secretadas por linfócitos T CD8 podem aumentar a sensibilidade à lise das células tumorais.

No presente trabalho determinamos a eficácia do tratamento com IMIQ no melanoma experimental desenvolvido na orelha de camundongos C57Bl/6. Para isso camundongos foram inoculados e DCs, bem como NKT, foram avaliadas durante o desenvolvimento do tumor.

Revisão de literatura

As neoplasias malignas de pele exibem elevadas taxas de incidência por todo mundo, crescendo de 3 a 7% por ano nas populações de caucasianos (revisto por ERDEI & TORRES, 2010), nas quais apresentam maiores taxas de crescimento (LUIZ et al, 2012) inclusive no Brasil, estando associadas também a altos índices de mortalidade. O aumento da incidência pode estar relacionado à melhoria nos métodos de detecção juntamente a uma detecção mais precoce, além da promoção de política de saúde sobre o assunto (revisto por ERDEI & TORRES, 2010). O desenvolvimento do melanoma cutâneo (MC) é resultado de acúmulos de alterações no DNA e lesão aos melanócitos. Células da pele responsáveis pela produção de uma substância que provê termoregulação e fotoproteção à pele, a melanina (LIN & FISHER, 2007). Caso esses danos sejam persistentes, os melanócitos apresentam o fenótipo maligno, e promovem o desenvolvimento de vasos sanguíneos (angiogênese). Além disso, os melanócitos podem metastizar (revisto por THOMPSON et al, 2005). O prognóstico deste tipo de tumor depende da fase na qual o mesmo é descoberto, sendo que esta neoplasia causa metástases frequentemente, e a sobrevida permanece nos próximos cinco anos após sua remoção. Nos últimos anos, os pacientes com MC demonstraram melhores índices de sobrevida, principalmente devido ao diagnóstico precoce. Nos países desenvolvidos, a taxa média de sobrevida em 5 anos é estimada em 73%, enquanto nos países em desenvolvimento é de 56%. A taxa média de sobrevida no mundo é estimada em torno de 69% (BAKOS et al, 2013).

Atualmente existem os tratamentos inovadores, como a terapia com inibidores imunológicos do “checkpoint” celular, que consiste em bloquear determinadas moléculas que regulam a atividade funcional de células imunológicas, como o bloqueio da molécula de CTLA-4 (antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico). Esta molécula tem a função de regular a resposta imunológica para que não cause danos aos tecidos saudáveis; e o bloqueio da molécula de PD-1 (proteína de morte celular programada-1) para que a apoptose de células envolvidas na atividade antitumoral não seja induzida pelo tumor, como método de evasão do sistema imune (GEORGE et al, 2016). Os métodos clássicos de tratamento como a radioterapia e a quimioterapia são os mais

utilizados atualmente na clínica, no entanto o procedimento cirúrgico para retirada completa do tumor é imprescindível (BAKOS et al, 2013).

Para contenção do tumor é necessário que o mesmo seja reconhecido como estranho ao próprio sistema imunológico do indivíduo. A atividade antitumoral deve ocorrer de maneira adequada preservando a integridade estrutural dos tecidos (WANG & WANG, 2007).

Diferentes mecanismos podem estar atuando nas diferentes fases do desenvolvimento das células tumorais, tais como sinais insuficientes para inflamação no início do seu crescimento, ou mesmo acúmulo de células, ou fatores inibitórios (WANG & WANG, 2007). Diversos tumores produzem e secretam uma grande quantidade de fatores supressores da resposta imune para realizar o escape do sistema imunológico, dentre esses o fator transformador de crescimento- β (TGF- β), secretado em grandes quantidades por muitos tumores, sendo essa citocina capaz de inibir a função efetora e proliferação de linfócitos, macrófagos e outras populações celulares. Outro mecanismo associado ao escape tumoral é a criação de sítios próprios, por meio de barreiras físicas compostas por fibrina e colágeno, que impedem a migração de células do sistema imunológico. Tumores do tipo melanoma são tumores altamente malignos nos seus estágios avançados, com prognóstico ruim, devido a sua elevada probabilidade de induzir metástases. Burlando a resposta antitumoral, células mielóides supressoras (MDSC) podem acumular e suprimir a resposta imune através da produção de interleucina (IL-10) citocina responsável pela inibição da atividade funcional de macrófagos e a produção de citocinas do perfil Th1 (revisto em SU et al, 2016), e também revisto por DRAGHICIU e colaboradores em 2015, várias citocinas, o óxido nítrico (NO), depleção de arginina e produção de metaloproteases de matriz (MMPs) para a migração, remodelação tecidual, angiogênese. As MDSCs bloqueiam a função de células T e “natural killer” (NK), diferenciação de monócitos com fenótipo funcional tipo macrófago 2 (M2, normalmente relacionado a estados de imunossupressão) e indução de macrófagos associados ao tumor, podendo induzir o acúmulo de células T reguladoras (Treg). M2 e macrófagos associados ao tumor secretam várias substâncias que também suprimem células T, melhoram a função MDSC e induzem o recrutamento células T regulatórias (Tregs). As células Tregs e as células dendríticas imaturas (MDCS) produzem

fatores que servem para expandir ambas as populações e também suprimem células T (WOO et al., 2002).

As células NK, são células derivadas da linhagem linfóide e compõem de 10 a 20% das células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Tais células são aptas a realizar o reconhecimento de células que possuam alterações ou ausência na expressão da molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), a MHC classe I, no caso de células infectadas por vírus e células tumorais (ZAMAI et al, 2007). Células NK ainda reconhecem células tumorais através de um grupo de proteínas identificadas que se ligam a um receptor denominado NKG2D, sobre células NK. Proteínas NKG2A, NKG2C e NKG2E possuem homologia de sequência entre si, estão presentes como heterodímeros com outra proteína (CD94) e reconhecem MHC I do tipo não clássicos, como a molécula conhecida como HLA-E (em humanos) ou QA1 (em camundongos) (revisto por RAULET, 2003). Células NK, quando estimuladas, são capazes de secretar uma grande variedade de citocinas e quimiocinas, incluindo Interferon – γ (IFN- γ). Em humanos estas são consideradas as principais células secretoras dessa citocina que é crucial para a mudança de perfil de resposta para Th1; induzindo ainda a produção de fator de necrose tumoral (TNF), GM-CSF (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos), proteína 1- α inflamatória de macrófagos (MIP-1 α) e RANTES (CCL-5) (WALDHAUER & STEINLE, 2008).

Outra população celular envolvida no combate tumoral, são as células NKT, uma subpopulação de linfócitos T, com marcadores restritos de receptores de células T (TCR), e marcadores de células NK, como o marcador NK 1.1. Essas células podem expressar citocinas tanto do perfil Th1 como do perfil Th2, e o reconhecimento de antígenos é dependente da molécula de CD1d, a qual associa-se a glicolipídeos e fosfolipídeos apresentando assim esses antígenos as células NKT. Por sua vez a eliminação da célula alvo se dá através do mecanismo perforina dependente (como nos linfócitos T citolíticos, CTL), (revisto por BRUTKIEWICZ & SRIRAM, 2002). Células NKT, em humanos, quando ativadas por α -GalCer (α -galactosilceramida), têm a capacidade de promover a lise direta de uma grande variedade de células tumorais. As respostas antitumorais podem ainda aumentar pela rápida liberação de grandes quantidades de citocinas que ativam as células NK e na sequência, ativam

também células T, células B, células dendríticas e monócitos. (NISHIMURA et al., 2000). As células NKT podem ser classificadas em 2 sub-tipos, NKT I (também conhecida como NKT invariante ou iNKT); que expressam CD8 α e uma cadeia semi-variante de TCR α com o segmento gênico V α 14J α 18 (V α 24J α 18 em humanos), bem como um repertório muito restrito TCR β (V β 8,7,2 em camundongo e V β 11 em humanos), todavia suas funções biológicas ainda não são bem descritas. Sabe-se que as células NKT I são as responsáveis pela atividade antitumoral dessa população celular; e NKT II (ou NKT variante) que diferente das NKT I, não expressam o segmento gênico V α 14J α 18 e não tem capacidade de reconhecer α -GalCer. Estudos recentes demonstraram que algumas células T $\gamma\delta$, são capazes de reconhecer antígenos apresentados pela molécula de CD1d, podendo ser consideradas componentes das células NKT tipo II (TERABE & BERZOFSKY, 2014).

Também podem estar envolvidas no combate tumoral as células dendríticas (DCs), que participam na imunidade inata, é a principal célula apresentadora de antígeno (APCs) do sistema imune, As DCs são consideradas as principais apresentadoras de antígenos devido a sua capacidade de realizar a apresentação de antígenos para células inexperientes (“naive”) do sistema imune. Por exemplo, DCs fazem apresentação de peptídeos antigênicos para os linfócitos T CD8, através da molécula de MHC-I e para os linfócitos T CD4 apresentando antígenos através da molécula de MHC-II; bem como a apresentação de antígenos derivados de lipídeos para as células NKT, pela molécula de CD1. Em humanos, as DCs podem ser divididas em 2 subgrupos: as células dendríticas convencionais (cDCs), que são originadas na medula óssea através de um progenitor mielóide comum, com uma alta capacidade de migrar para os tecidos, e quando entram em contato com antígenos e são co-estimuladas seguem para o linfonodo drenante atuando assim como apresentadoras de antígeno (BANCHEREAU et al, 2000). Outras são as células dendríticas plasmocitóides (pDCs), sendo assim denominadas devido ao seu formato semelhante ao de um plasmócito, também por serem geradas na medula óssea tanto por um progenitor mielóide como por um progenitor linfóide, apresentam o receptor endossomal TLR-7 (Toll-Like Receptor-7). Quando são ativadas ambas têm papel importante na tolerância imunológica, possuem uma capacidade de apresentação antigênica inferior aos da cDCs, entretanto quando

maturadas regulam intensamente seus níveis de MHC-I e MHC-2, e produzem elevados níveis de IFN do tipo 1 (TEL et al, 2013).

Alternativamente, uma abordagem interessante para o tratamento do melanoma, seria estimular a resposta imune inata de maneira rápida e duradoura para aumentar a atividade das populações celulares que participam no seu combate, amplificando assim a resposta antitumoral. Durante a última década, muito se tem estudado a respeito de diferentes receptores e sinalizadores da resposta a patógenos ou a diferentes estímulos como resposta de alarme em estímulos iniciais. Os receptores do tipo TLR são exemplos disso, esses receptores são receptores que reconhecem tanto de PAMPs (padrões moleculares associados ao patógeno), como de DAMPs (padrões moleculares associados a lesão), são expressos por diversas células da pele (como por exemplo os melanócitos e células de Langerhans). Os TLRs também são capazes de ativar o sistema imune inato através do fator de transcrição NFκB. (BURNS & YUSUF, 2014). Dentre os subtipos existentes de receptores tipo Toll, destaca-se o TLR-7, que são expressos em pDCs, e quando ativados induzem a produção vigorosa de Interferon do tipo 1, se tornou alvo direto em estudos envolvendo carcinomas.

O IMIQ é um creme de uso tópico; estimulante sintético dos receptores TLR-7 e TLR-8, capaz de modular a resposta imune inata e adquirida, induzindo a produção de diversas citocinas através da transcrição de NKκB, incluindo IFN do tipo 1, TNF-α, GM-CSF (fator estimulador de colônia de granulócito e macrófago), IL-6, IL-8 (WEEKS & GIBSON, 1994). O IMIQ mostrou-se eficaz no tratamento de câncer de células escamosas (HUANG et al, 2009), e o câncer basocelular (STARY et al, 2007). Apesar de seu mecanismo de ação não ser completamente elucidado, sabe-se que o IMIQ além dos efeitos citados, pode induzir a apoptose de células tumorais, por meio da ativação da proteína Bcl-2, e de proteases da família das caspases, uma vez que o mesmo encontra-se em altas concentrações (SCHÖN & SCHÖN, 2007). Ademais o creme também demonstrou propriedades anti-angiogênicas, mediante a regulação de mediadores anti-angiogênicos endógenos. (Li et al, 2005). O efeito anti-tumoral do IMIQ, foi demonstrado por (DROBITS, 2012), sendo que no local da aplicação, na camada mais externa da pele (epiderme), o creme induz uma apoptose de células da epiderme de maneira independente de TLR-7/MyD88, fazendo com

que células de Langerhans residentes estimulem a marginação de mastócitos na derme. Quando presente na derme, o IMIQ ativa os mastócitos pelo receptor TLR-7 e esse produz e libera a quimiocina CCL-2, por sua vez tal quimicida induz a inflamação, e migração de células de defesa como as pDCs. As pDCs ao chegarem ao local sofrem ativação dependente de TLR-7/MyD88 pelo creme o que induz a produção e liberação de interferon do tipo I, que pode atuar de maneira tanto autócrina, como de maneira parácrina nos receptores IFNAR1, estimulando as pDCs a produzir GZB, proporcionando dessa maneira o combate tumoral.

Hipótese e Objetivos

Hipótese

A hipótese é que a molécula de CD1 possui participação na resposta imune ao melanoma, mediada por células NKT e que o IMIQ é capaz de potencializar tal resposta.

Objetivo geral

Avaliar o fenótipo funcional da(s) população(ões) de células esplênicas e dos linfonodos drenantes, em camundongos que possuam a molécula da molécula de CD1 (ou não), que foram inoculados com células de melanoma. O objetivo inclui verificar o efeito do IMIQ será avaliado nos grupos experimentais, quantificando-se as células da imunidade inata e efetora envolvidas na resposta antitumoral.

Objetivos específicos

Comparar a expansão do melanoma nos diferentes grupos experimentais C57Bl/6: desprovidos de CD1 (C57Bl/6 CD1KO) e controles (C57Bl/6 WT). O critérios avaliados incluem exame físico, avaliação individual (tamanho) e a expansão tumoral *in vivo*.

Verificar a taxa de sobrevivência dos animais após injeção das células tumorais, com ou sem o tratamento com IMIQ.

Analisar as populações celulares que podem influenciar no crescimento tumoral. Populações celulares ativadas, existentes nas células esplênicas dos grupos experimentais que receberam o melanoma. Os grupos tratados ou não com IMIQ serão avaliados em cada caso para ativação esplênica de linfócitos e quantificação de DCs, células NK, NKT e células T.

Quantificar a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa, IFN-gama em grupos experimentais: tratados (ou não) com IMIQ, após estímulo *in vitro* com α CD3.

Investigar atividade funcional das células dendríticas e NKT, após estímulo *in vitro* com Con A e de antígenos tumorais, avaliando-se os níveis de GZB, nas células dendríticas.

CAPÍTULO 1: Artigo Científico: Avaliação do imiquimode sobre a resposta inata e o fenótipo funcional de linfócitos T durante o desenvolvimento do melanoma experimental.

Introdução

O câncer de pele é a neoplasia maligna com maior incidência no Brasil na última década em ambos os sexos, e o melanoma representa 4% dos casos de câncer de pele. Apesar do baixo percentual, o melanoma é um dos carcinomas de pele mais importantes, pois é fatal em 69% dos casos (LUIZ et al, 2012). O prognóstico dos pacientes com esse tipo tumoral depende muito da fase na qual o tumor foi descoberto, sendo que o melanoma quase sempre causa metástases, e a sobrevida é de até cinco anos após sua remoção (BAKOS et al, 2013). Dos mesmos autores, sabe-se que atualmente a quimioterapia e a radioterapia são os tratamentos convencionais utilizados, todavia, a intervenção cirúrgica para retirada completa do tumor é imprescindível (BAKOS et al, 2013). Diversas células participam no combate tumoral, dentre elas as células Natural Killer (NK); que reconhecem células que possuam ausência ou modificação na expressão da molécula de MHC de classe I. Células NK ainda reconhecem estruturas que especificamente fazem regulação positiva em células tumorais, incluindo moléculas de MHC classe I e que se ligam a um receptor denominado NKG2D, sobre células NK. Proteínas NKG2A, NKG2C e NKG2E possuem homologia de sequência entre si, estão presentes como heterodímeros com outra proteína (CD94) e reconhecem MHC I do tipo não clássicos, como a molécula conhecida como HLA-E (em humanos) ou QA1 (em camundongos) (revisto por RAULET, 2003). Células NKT, também envolvidas na atividade anti-tumoral, são uma subpopulação de células T que apresenta um repertório restrito de receptores de células T (TCR) e marcadores de células NK, como o NK1.1. Estas células são capazes de produzir ambas citocinas Th1 e Th2, reconhecem fosfolípidos e glicolípidos apresentados pela molécula CD1, e eliminam as células alvo do tumor através do mecanismo dependente de perforina (como as células NK e linfócitos T citolíticos ou CTL) (revisto por BRUTKIEWICZ & SRIRAM, 2002). As células NKT são capazes de potencializar a resposta anti-tumoral pela rápida liberação de grandes quantidades de citocinas que ativam as células NK e na sequência, ativam também células T, células B, células dendríticas e monócitos

(NISHIMURA et al., 2000). Por fim, as células dendríticas (DCs) quando estimuladas, produzem e liberam Interferon do tipo I, que atua de maneira autócrina e parácrina, induzindo a produção de GZB, promovendo assim atividade tumoricida (DROBITS, et al, 2012). Buscando por vias alternativas de tratamento e estimulação da resposta imune inata de maneira rápida, encontramos na literatura o creme de uso tópico estimulante do receptor tipo toll-7 (TLR-7), IMIQ, que se mostrou bastante eficaz no tratamento de câncer de células escamosas (HUANG et al, 2009), e tem elevada capacidade de ativação de DCs, causando apoptose independente de TLR-7 e MyD88 em células epiteliais. Em contato com a derme, o mesmo se liga ao TLR-7 em mastócitos, que libera agentes quimiotáticos, como CCL2, estimulado assim o recrutamento e ativação das DCs (DROBITS et al, 2012).

Materiais e métodos

Animais: C57Bl/6 selvagens (WT) e CD1KO (CD1 -/-)

Foram utilizados camundongos fêmeas, da linhagem C57Bl/6 com idade de 4 a 6 semanas, criados e mantidos no Biotério de animais isogênicos do Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz – Bahia, selvagens e nocautes para a molécula de CD1. Para experimentos com B16F0 injetados na orelha em associação com IMIQ, os procedimentos foram aprovados pelo Ceua, protocolo: CEUA-IGM 038/2009 e 016/2014. C57Bl/6 CD1-/- (CD1KO, PROCOPIO et al, 2002) foram cedidos pelo Dr Ricardo Gazzinelli (Centro de Pesquisas Rennée Rachou- Fiocruz-MG) e foram obtidas licenças pela Ceua (Protocolos CEUA-IGM L-026/09 e L-038/09 além do protocolo P-523/08, Ceua-Fiocruz-RJ).

Cultura de células de melanoma e inoculação em camundongos C57Bl/6

As células do tumor de linhagem, B16F0 foram descongeladas, colocadas em garrafas de cultura com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado e mantidos em estufa com temperatura de 37°C e concentração de 5% de CO₂. Diariamente as células foram observadas e quando necessário foram realizadas trocas do meio de cultura, apenas retirando o meio antigo e colocando novo, já que as células têm capacidade de aderir totalmente na garrafa. Este procedimento foi realizado até que as células se expandissem chegasse quantidade necessária para inoculação. Após isso as células foram removidas da garrafa de cultura utilizando Tripsina (solução da GIBCO 10x com 2,5% de tripsina) diluída em 10 ml de meio RPMI 1640, não suplementado com SFB, e incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente realizando leves batidas na garrafa para auxiliar o desprendimento das células. Ao perceber que grande parte das células começaram a se desprender do fundo da garrafa, as células foram retiradas e colocadas em tubos falcon de 50 ml aos quais foi adicionado RPMI 1640 suplementado com SFB, para que a tripsina fosse inibida. Em seguida os tubos foram centrifugados por 10 minutos à 259 G, o sobrenadante desprezado, e as células lavadas por duas vezes com PBS estéril.

Por fim, uma alíquota dessas células foi diluída em Trypan Blue, e realizada a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer, levando em consideração apenas as células vivas. O fator de correção da câmara foi aplicado, e a concentração de células ajustada para 5×10^4 células / 20 μ L de PBS.

Os camundongos foram anestesiados pela via intraperitoneal com 0,2 mL de solução Ketamina/Xilazina diluídos em água de injeção, na proporção de 1:1:3, tiveram os pelos próximos a região da orelha tricotomizados com um aparelho tricotomizador elétrico. Os pelos foram retirados com auxílio de uma gaze, e então com uma seringa de agulha insulínica realizou-se a inoculação das células na orelha de cada animal.

Crescimento tumoral e mortalidade

Os animais foram acompanhados diariamente, bem como o crescimento tumoral, que foi observado e medido com auxílio de um paquímetro, sendo adotado como padrão a maior dimensão aparente do tumor. Assim como o crescimento tumoral, a mortalidade também foi acompanhada diariamente depois da padronização. Após avaliações e repetições da sobrevivência novos grupos foram compostos para avaliações, sendo que animais que apresentaram ulcerações no local do tumor ou crescimento superior a 1.2 centímetro foram eutanasiados.

Tratamento com Imiquimode

No dia seguinte a inoculação, iniciou-se o tratamento nos animais, onde 10 μ L de IMIQ na concentração de 50mg/g foi aplicado no local do tumor, duas vezes ao dia, com intervalo de no mínimo quatro horas entre as aplicações, espalhando bem o creme para melhorar sua absorção pela pele, até o dia do sacrifício ou morte dos animais.

Cultura de células esplênicas e de linfonodos cervicais

Após 12 dias de tratamento com IMIQ, quatro animais de cada grupo (tratados e não tratados com IMIQ, foram sacrificados e então foi realizada a remoção do baço e do linfonodo drenante (linfonodo cervical) próximo ao local do tumor. O baço e o linfonodo drenante foram coletados e macerados, posteriormente lavados. Devido à baixa concentração de células do linfonodo drenante, a coleta de todos os linfonodos foi realizada para obtenção de uma maior quantidade de células em cada amostra. A seguir, foram colocadas em placas de cultura de tecidos contendo 2,5 µg/ml de Brefeldina A (Invitrogen), e anti-CD3 numa concentração de 5 µg/mL. Já as células esplênicas foram lavadas, ajustadas para a concentração de 10^7 células/ml, e as células colocadas em placas de cultura de tecidos com 2,5 µg/mL de Brefeldina A (Invitrogen), incubadas com: anti-CD3 5 µg/mL, Concanavalina A (Con A) 5 µg/mL, Con A mais o extrato de antígenos tumorais (Ags) na concentração de 25 µg/mL. O cultivo de células esplênicas foi mantido a 4°C por 8, 12, e 24 horas, após isso foram retirados e iniciou a marcação, e o de células do linfonodo drenante por 8 horas à 4°C.

Obtenção de extratos de antígenos tumorais

Células de B16F0 (obtidas como acima) foram colocadas em tubo falcon de 15 mL, lavadas por duas vezes com PBS estéril, o sobrenadante desprezado, 4 mL de solução NaCl à 0,9% estéril foram adicionados ao pellet. As células então foram levadas ao sonicador, e submetidas ao processo de lise, com 10 ciclos de 1 minuto, em uma amplitude de 40, e pulso de 2, com intervalos de 1 minuto durante cada ciclo. A concentração produzida de antígeno foi verificada no aparelho, Nanodrop que realiza uma razão entre em diferentes comprimentos de onda (420 para identificação de RNA e DNA, e entre 460 e 480 para detecção de proteínas) para determinar a concentração de proteínas da amostra (obteve-se uma razão de 1.3), e através de uma curva de diluição realizada (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256) foi determinada a concentração de antígenos na amostra.

Marcação de moléculas de superfície em esplenócitos e dLNs.

Após o cultivo as células foram adicionadas em placas de 96 poços, tendo 2×10^6 células por poço no caso dos esplenócitos, e 5×10^5 células por poço para células do linfonodo drenante. Realizou-se uma lavagem com tampão de citometria de fluxo (FACS) contendo PBS, 5% SFB inativado e 0,1% de azida sódica. Então todas as células foram incubadas com Fc block por 15 minutos à 4°C em tampão de FACS. Seguindo o protocolo, as células foram lavadas novamente com tampão de e os seguintes anticorpos monoclonais (também diluídos neste tampão de FACS foram utilizados para marcação: anti-CD11c Alexa488; anti-CD11b BIO; anti-CD8 α -PE-Cy5; anti-CD44- PE; anti-CD62L BIO; anti-CD8-FITC; anti-CD4- FITC; anti- $\alpha\beta$ -Alexa488; anti-NK 1.1-Pe; anti-TCR- $\alpha\beta$ FITC; anti-NK 1.1 BIO; anti-CD11c FITC; sendo incubados por 15 minutos a 4°C, novamente lavados com o tampão, então foi adicionado streptavidina PE cy 5.5 para marcação de anticorpos biotinilados, e novamente sendo incubados por 15 minutos a 4°C.

Marcação de citocina intracelular em células esplênicas e do dLN e leitura

Depois de realizada a marcação de superfície, as células foram incubadas por 15 minutos a 4°C com paraformaldeído a 1% para fixação da marcação. Seguidamente a membrana celular foi permeabilizada, utilizando o kit Cytofix/Cytoperm da BD bioscience, seguindo o protocolo do fabricante. Os anticorpos monoclonais a seguir foram diluídos em PermWash e utilizados para marcação: anti-IFN- γ PE, anti-TNF- α PE, anti-granzima B PE anti-perforina PE. As células foram ressuspendidas em 100 μ L de paraformaldeído a 1%, retiradas da placa, e colocadas em tubos para leitura de FACS contendo 400 μ l de paraformaldeído a 1%, para que a leitura pudesse ser realizada em citômetro de fluxo BD LSRFortessa (São Francisco, Califórnia, EUA). Foram adquiridos 10.000 eventos para células linfonodo drenante e 50.000 eventos para células do baço.

Análise estatística e avaliação dos dados

Para avaliação de dados, como tamanho tumoral, e quantidade de células optamos pelos testes, t de student (para dados paramétricos), e para dados não paramétricos o teste de Mann-Whitney. Já para avaliação de sobrevida o teste adotado foi o Log-Rank. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Para desenvolvimento e avaliação dos gráficos utilizamos o software GraphPad prism 6, já para as análises dos resultados da citometria de fluxo, o FlowJo Vx foi o software adotado.

Resultados

Padronização do modelo experimental

Nessa primeira fase experimental, tivemos como o objetivo estabelecer um padrão de sobrevida e de desenvolvimento tumoral, e como observado na Figura 1, nota-se que após a inoculação de células de melanoma na orelha dos camundongos houve rápido crescimento do tumor devido a boa vascularização do pavilhão auricular dos animais. O tumor apresentou em uma forma regular e esférica, com bordas bem definidas, e uma fácil visualização (Figura 1). Outra característica é que o animal tratado apresenta leve hiperemia no local de aplicação do creme (observação não demonstrada). Isto não foi observado no animal que não recebeu o tratamento.



Figura 1. Inoculação de B16F0 (células de melanoma) na orelha dos camundongos C57Bl/6. O tumor apresenta-se de forma regular e esférica, em um local onde a aplicação do *Imiquimod* pode ocorrer de maneira fácil. n = 10

Sobrevida dos camundongos C57Bl/6 inoculados com B16F0 após tratamento com IMIQ.

Como já descrito, o melanoma de células B16F0 é um tumor agressivo que resulta em baixa taxa de sobrevida dos camundongos inoculados. Pode-se constatar isso na Figura 2, onde a mortalidade dos animais se inicia com ambos os grupos, não tratados (Controle), e tratados (IMIQ) no décimo nono dia, e rapidamente a taxa de sobrevida nos dois os grupos vai reduzindo, até que chega a 100% de óbitos no dia 31, nos animais do grupo tratado (IMIQ). Para a realização da análise de sobrevida, animais não foram eutanasiados, a morte aconteceu devido ao desenvolvimento tumoral. Analisando o gráfico da figura 2, percebe-se essa agressividade do melanoma cutâneo. Em apenas 12 dias após o primeiro óbito, ocorreu a mortalidade total dos animais. Entretanto, animais que receberam o tratamento durante o desenvolvimento do melanoma, apresentaram um prolongamento na sua sobrevida. Isso acontece se os mesmos são comparados aos animais não tratados com IMIQ, sendo essa diferença significativa no teste de Log-rank, com o valor de $p=0,048$. Além disso houve diferença biológica, onde animais tratados tiveram extensão de 7 dias na sobrevida, comparando com o grupo que não recebeu tratamento.

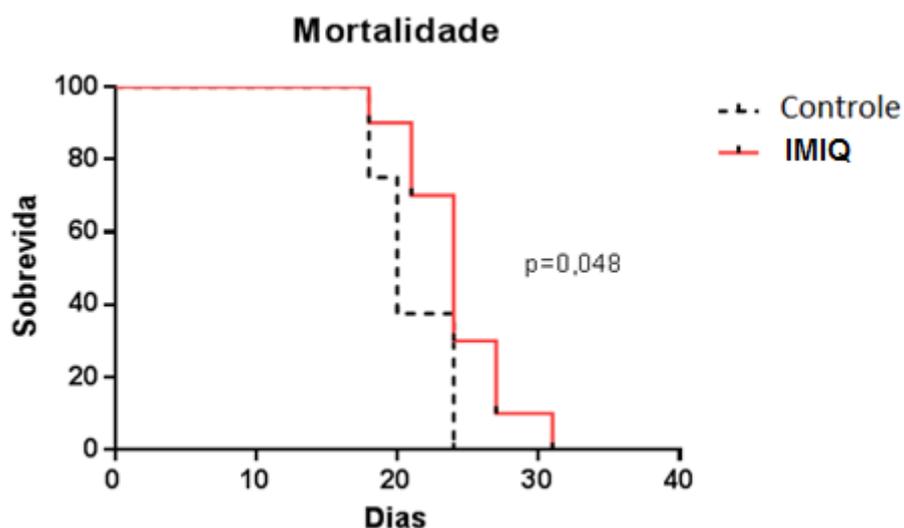


Figura 2: Sobrevida dos camundongos inoculados com B16F0 após tratamento com Imiquimode (IMIQ). Evolução da sobrevivência dos animais C57Bl/6 nos diferentes grupos experimentais, inoculados com B16F0 que não foram tratados e tratados com IMIQ. Log-rank test. n=10

Avaliação do tamanho do tumor em camundongos inoculados com células de melanoma e tratados com IMIQ

Seguindo para avaliação do tamanho tumoral, (Figura 3) é perceptível o rápido avanço tumoral no grupo de animais que não receberam o tratamento com IMIQ, sendo que em alguns dos animais, (a partir do décimo terceiro dia após inoculação), houve tumores maiores que 0,5 centímetro, comparados aos animais tratados demoram a apresentar 4 dias mais tardiamente esse padrão (Figura 3A). Quando comparamos a mediana de ambos os grupos, nota-se ainda mais a diferença na evolução tumoral, sendo que nos dias 17 e 20, há significância estatística com valor de $p=0,0286$ no teste de Mann-Whitney, nas duas situações. Isso reforça que o IMIQ, de fato potencializa uma resposta do sistema imunológico contra o avanço tumoral, promovendo a contenção, em uma fase inicial do desenvolvimento do melanoma.

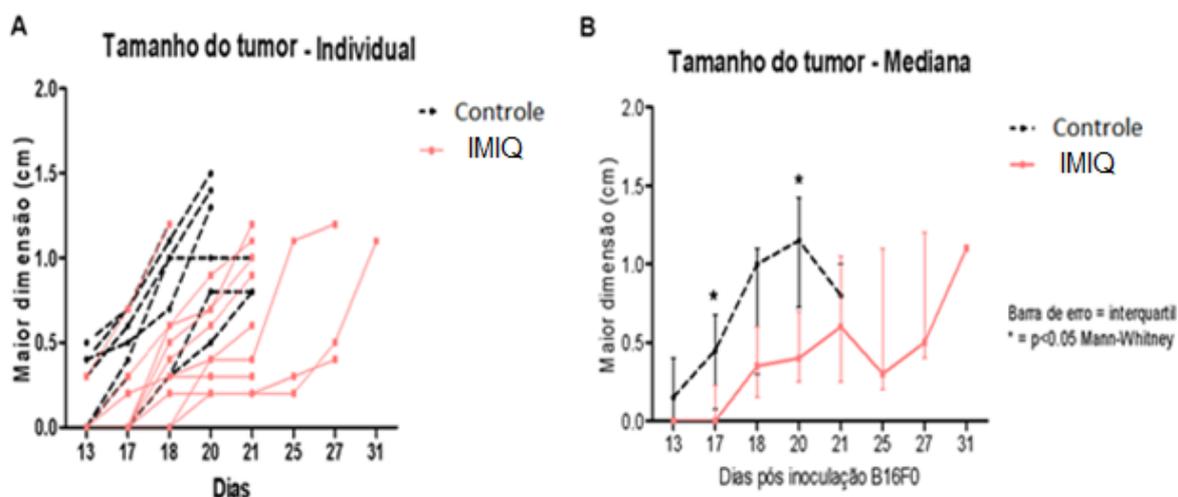


Figura 3: Em A Avaliação do tamanho do tumor em camundongos inoculados com células de melanoma e tratados com IMIQ. Em B – Avaliação do tamanho tumoral através da mediana, entre os diferentes grupos experimentais. Nota-se diferença significativa nos dias de tratamento 17 e 20. (*) Teste de Mann-Whitney $p = 0,0286$. $n=10$

O tratamento com IMIQ, reduz a população de células de memória central (CD4+ CD44+ CD62L+) no baço.

Ao avaliarmos, através de citometria de fluxo; seguindo o protocolo descrito anteriormente na metodologia; a população celular presente no baço e no linfonodo drenante dos animais é possível notar que a população de linfócitos T CD4 total (Figura 4A) e de T CD8 α (Figura 4B) se apresenta de maneira ligeiramente inferior (sem demonstrar qualquer diferença estatisticamente significante) quando comparados com os animais que não foram tratados.

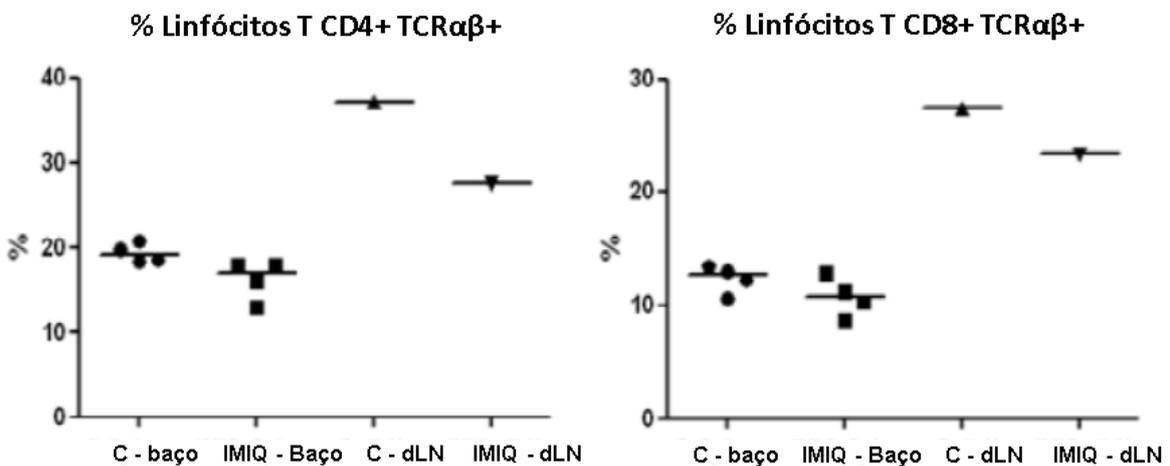


Figura 4. Em A – Células T CD4, comparação entre os grupos: controles não tratados (C) e tratados com IMIQ. Uma discreta diminuição na porcentagem dessas células no baço e no linfonodo drenante dos animais tratados com IMIQ comparado em animais não tratados, sem uma diferença estatisticamente significante. Em B – Células T CD8, comparação entre os grupos: controles não tratados (C) e tratados com IMIQ. Também ocorre uma discreta diminuição dessa população tanto no linfonodo drenante como no baço. n=4

Avaliando a população de linfócitos T CD4 de memória central (TCD4+ CD44+ CD62L+) os animais tratados exibem uma população dessas células inferior aos animais não tratados, como pode ser observado na figura 5, ($p=0,0286$). Há uma grande possibilidade dessa população celular ter se diferenciado em células T CD4 de memória efetora e ter migrado para o local do tumor mediante tratamento com o IMIQ. Isto é extremamente importante e que pode de fato estar contribuindo com a contenção do tumor, combatendo as células cancerígenas, aumento desta maneira a sobrevivência dos animais que foram tratados com IMIQ.

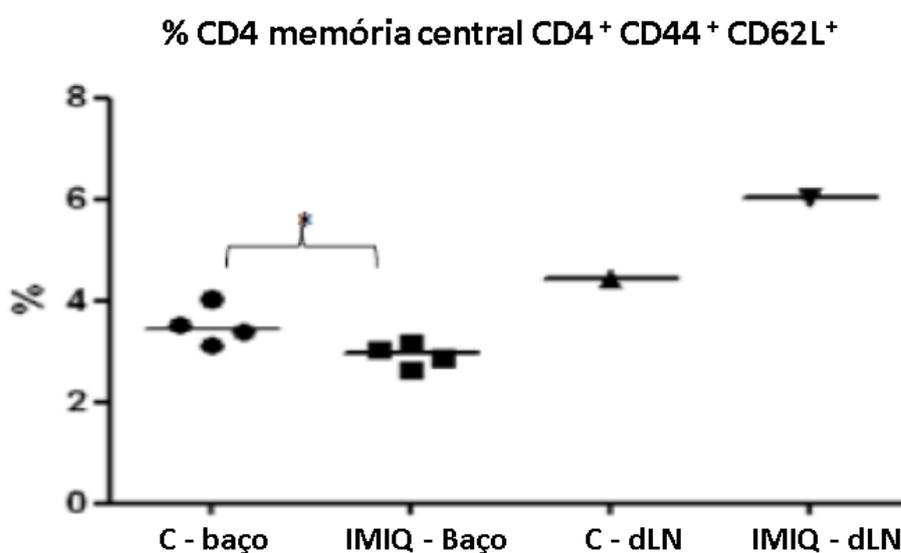


Figura 5 Células T CD4 de memória central: comparação entre os grupos: controles não tratados (C) e tratados com IMIQ. Uma diminuição significativa na porcentagem dessas células no baço de animais tratados com IMIQ comparado em animais não tratados. $p=0,0286$ no teste de Mann-Whitney. $n=4$

Investigando a população de determinadas células efetoras que possivelmente estão envolvidas no combate tumoral, notamos que algumas populações apresentaram-se em maior quantidade no grupo de animais que receberam o tratamento com IMIQ, se compararmos com o grupo de animais que não tiveram tratamento durante o desenvolvimento do tumor. Dentre essas populações de células efetoras, observamos um aumento significativo (tendo valor de $p=0,0286$ no teste de Mann-Whitney) na população de células dendríticas esplênicas (Figura 6A) e também de células NKT esplênicas (Figura 6B). Pode ser observado também nesses resultados que o aumento da população dessas células no baço, é acompanhado pela tendência de aumento no linfonodo drenante no grupo de animais tratados com IMIQ.

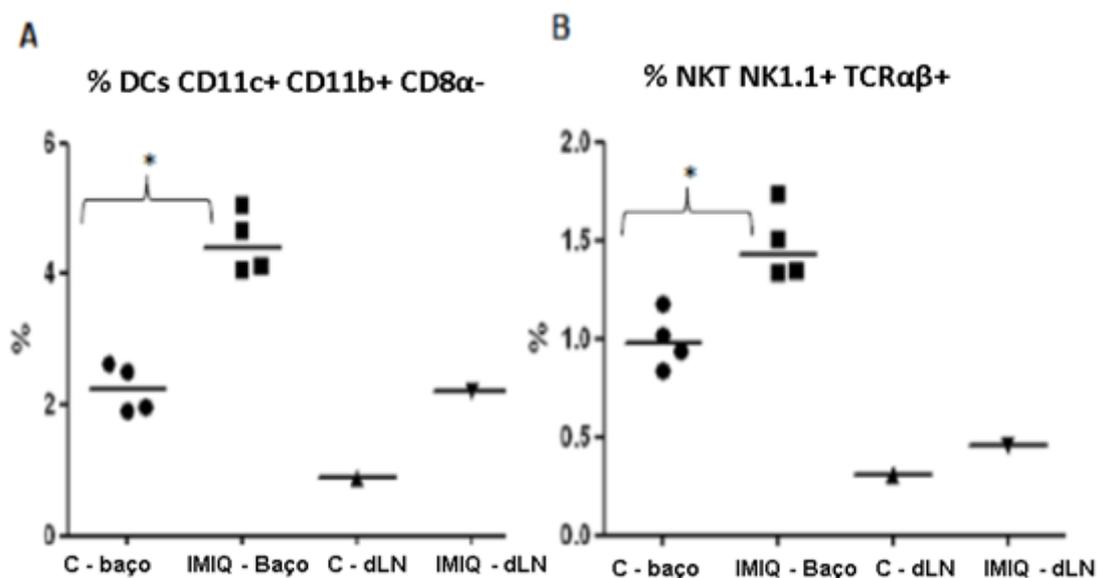


Figura 6: Em A – Quantificação de células dendríticas (CD11c+ CD11b+ CD8α), comparação entre os grupos: controles não tratados (C) e tratados com IMIQ. Nota-se aumento significativo na porcentagem dessas células em animais tratados com IMIQ, tanto no baço como no linfonodo drenante.

Em B – Número relativo de células NKT (NK 1.1+, TCRαβ+), comparação entre os grupos: controles não tratados (C) e tratados com IMIQ. Assim como ocorrido no aumento da porcentagem das células dendríticas no baço, e linfonodo drenante de animais tratados com IMIQ, ocorre também esse aumento na porcentagem de células NKT comparado em animais não tratados. $p=0,0286$, no teste de Mann-Whitney. $n=4$

Imiquimode é capaz de induzir a produção de IFN- γ e TNF- α em ensaios *in vitro* por linfócitos.

Doze dias após a inoculação tumoral, 4 animais de cada grupo (tratados com IMIQ e não tratados com IMIQ) tiveram seus baços e linfonodos drenantes removidos, macerados, e as células obtidas foram postas em cultura. Para cada um dos grupos as células foram cultivadas em poços duplicados, sendo que em uma das duplicatas foi adicionado apenas o próprio meio de cultura, para controle, e na outra adicionamos 10 μ l de α CD3 na concentração de 5 μ /ml. A cultura foi mantida por doze horas a 4^o C. Após isso as células foram marcadas seguindo o procedimento já descrito na metodologia. Pode-se constatar que linfócitos T CD8 esplênicos e do linfonodo drenante de animais tratados, quando estimulados com α CD3 (quadrantes inferiores direito) aumentam a expressão da citocina pró-inflamatória IFN- γ (Figura 7) quando comparado com animais que receberam o mesmo estímulo em cultura, mas que no desenvolvimento do melanoma não recebeu o tratamento com IMIQ.

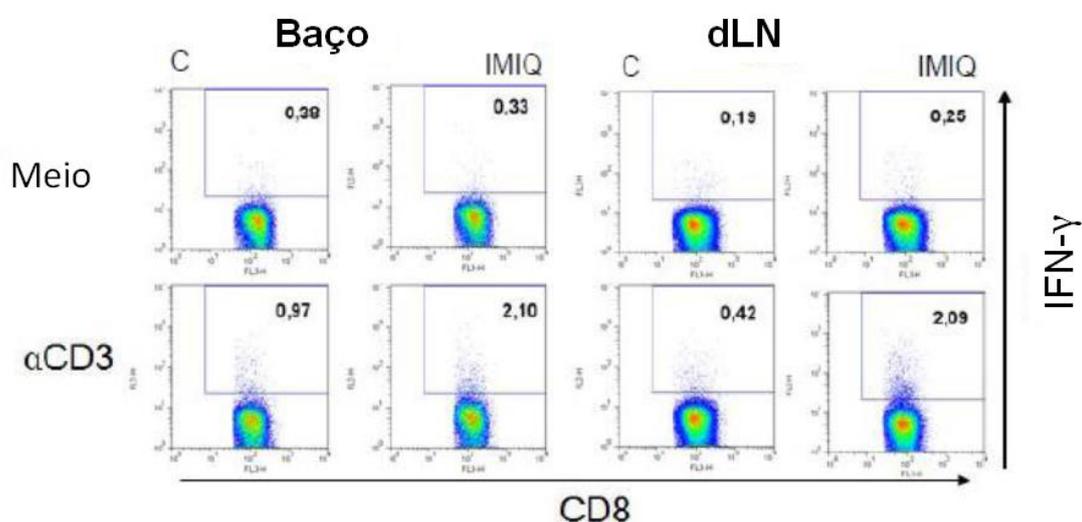


Figura 7 Produção de IFN- γ por Linfócitos T CD8, no baço e no linfonodo drenante, em animais tratados (IMIQ) e em animais não tratados (C), esplenócitos cultivados com meio (C), ou estimuladas com α CD3. Comparação de animais não tratados (esquerda), e animais tratados (direita). Quando estimulados com α CD3, gráficos inferiores, células do baço e do linfonodo drenante de animais tratados com IMIQ demonstraram aumento maior que os animais controle não tratados. n=4

CD4 e T CD8 de animais tratados que produzem TNF- α no linfonodo drenante, a estimulação com α CD3 aumenta muito a produção dessa citocina (quadrantes inferiores direito), também se compararmos com animais que não foram tratados e receberam o mesmo estímulo (quadrantes inferiores no lado esquerdo). Esses resultados demonstram que o tratamento com IMIQ é capaz de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias, para que ocorra uma maior atividade antitumoral.

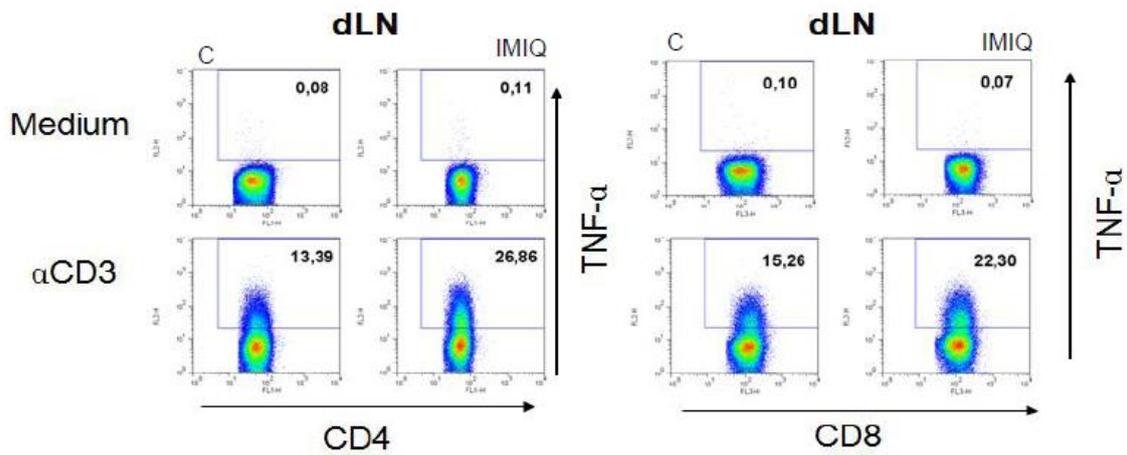


Figura 8: TNF- α produzido em cultura por Linfócitos T do linfonodo drenante em populações CD4+ (a esquerda) e CD8+ (a direita, em animais tratados (IMIQ) e em animais não tratados (C), quando estimulados com α CD3. Comparação de animais não tratados (esquerda), e animais tratados (direita). Quando estimulados com α CD3, plots inferiores, células do linfonodo drenante de tratados com IMIQ demonstraram aumento maior que os animais controle não tratados. n=4

As células NKT promovem a contenção do tumor e favorecem o aumento da sobrevida.

Percebendo o aumento na população de células NKT em resposta ao tratamento com IMIQ, resolvemos testar se essa população celular era responsável pela contenção do avanço tumoral e aumento da sobrevida dos animais. Para isso utilizamos camundongos *Knockout* para a molécula de CD1 (CD1KO), já que é uma molécula fundamental para que os linfócitos NKT reconheçam o antígeno e execute a sua função efetora. Repetimos o experimento de sobrevida e avaliação da expansão tumoral, além dos animais selvagens (WT) tratados e não tratados, foram adicionados os dois subgrupos dos animais *knockout* para molécula de CD1, CD1KO não tratados, e CD1KO tratados com IMIQ.

A figura 9A demonstra que animais CD1KO, independentemente de serem tratados ou não, apresentam sobrevida próxima aos animais selvagens (WT) que não receberam o tratamento com IMIQ. Além e comparando-se os grupos de animais tratados com IMIQ, percebemos que os animais selvagens e tratados apresentam uma sobrevida maior do que os animais CD1KO que também receberam o tratamento, sendo que essa diferença se mostrou significativa no teste de Log-rank ($p=0,014$). Averiguando o tamanho do tumor nos diferentes grupos (Figura 9B), e comparando-se a mediana (Figura 9C), é possível constatar que o tratamento com IMIQ em animais CD1KO não tem efeito algum no desenvolvimento do melanoma experimental, comparado aos tratados. Ademais, comparando os grupos que receberam B16F0 e foram tratados, nota-se uma diferença estatisticamente significativa no teste de Mann-Whitney, nos dias 12 ($p=0,0014$), 16 ($p=0,0048$) e 18 ($p=0,0078$). Esses dados sugerem que de fato, a população de linfócito NKT é a principal responsável pela contenção do avanço tumoral após o tratamento com IMIQ. Essa afirmativa é devida ao fato que o tratamento na ausência da molécula de CD1 (fundamental para o reconhecimento antigênico e posterior ativação da resposta efetora dessa população celular), não tem efeito: tanto sobre o aumento da sobrevida dos animais tratados, quanto na contenção do melanoma. Percebe-se que há maior desenvolvimento do tumor nos animais que não possuem a molécula CD1 do que em animais selvagens que não foram tratados.

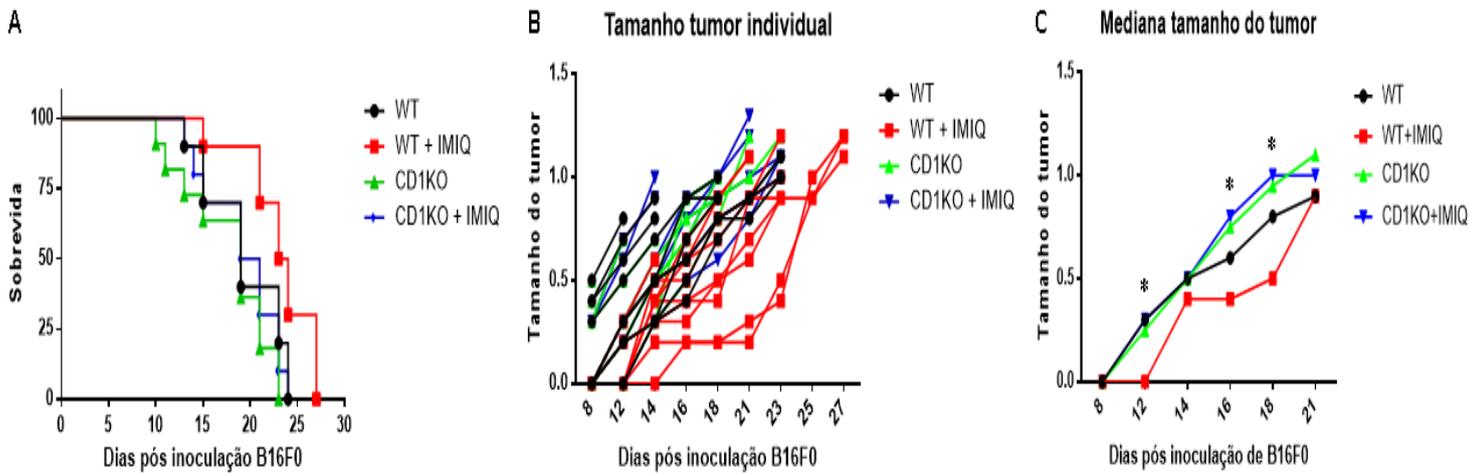


Figura 9: Em A - Sobrevida dos animais selvagens (WT) e desprovidos da molécula de CD1 (CD1KO), que receberam o tratamento (IMIQ) e que não receberam o tratamento. $p = 0,014$ no teste de Log Rank. Em B – Avaliação do tamanho tumoral em cada animal nos diferentes grupos. Em C – Tamanho tumoral avaliado pela mediana dos animais CD1KO e seus controles. Comparando a mediana em animais selvagens tratados com animais WT tratados obtêm-se valores significativos nos dias: 12 ($p=0,0014$), 16 ($p=0,0048$) e 18 dias ($0,0078$) no teste de Mann Whitney. $n=10$

Os antígenos tumorais promovem a redução da população de DCs produtoras de Granzima B em ensaios *ex vivo*.

Como o tratamento com IMIQ é capaz de promover o recrutamento de células dendríticas e estimular essa célula a desenvolver atividade antitumoral através da produção de GZB (Drobits et al, 2012), realizamos um cultivo de células esplênicas, obtidas pela remoção do baço em 4 animais de cada grupo (tratados e não tratados). Separamos então as células em subgrupos, sendo que os poços de cultura receberam diferentes estímulos para verificar essa produção: Con A, e Con A mais antígenos tumorais (Con A + Ags) e controle PBS. A figura 10 demonstra que dentre o grupo de células que receberam o mesmo estímulo, nota-se que as células de animais tratados com IMIQ, apresentam níveis discretamente elevados comparadas as células de animais não tratados.

Com esse experimento também foi possível observar que se compararmos o grupo de células de animais tratados que foram estimuladas com Con A, com o grupo de células de animais tratados que receberam estímulo tanto de Con A como dos antígenos tumorais, evidencia-se que a presença do antígeno tumoral inibe quase que totalmente a população de células dendríticas produtoras de GZB (Figura 10), apresentando diferença significativa no teste de Mann-Whitney ($p=0,0286$). A redução da população de células dendríticas produtoras de GZB, pode estar relacionada com o mecanismo de evasão tumoral, uma vez que se confrontarmos a população que recebeu PBS como controle com a população que recebeu Con A, esse estímulo tende a aumentar essa população celular, mas surte efeito totalmente oposto quando há a presença dos antígenos tumorais.

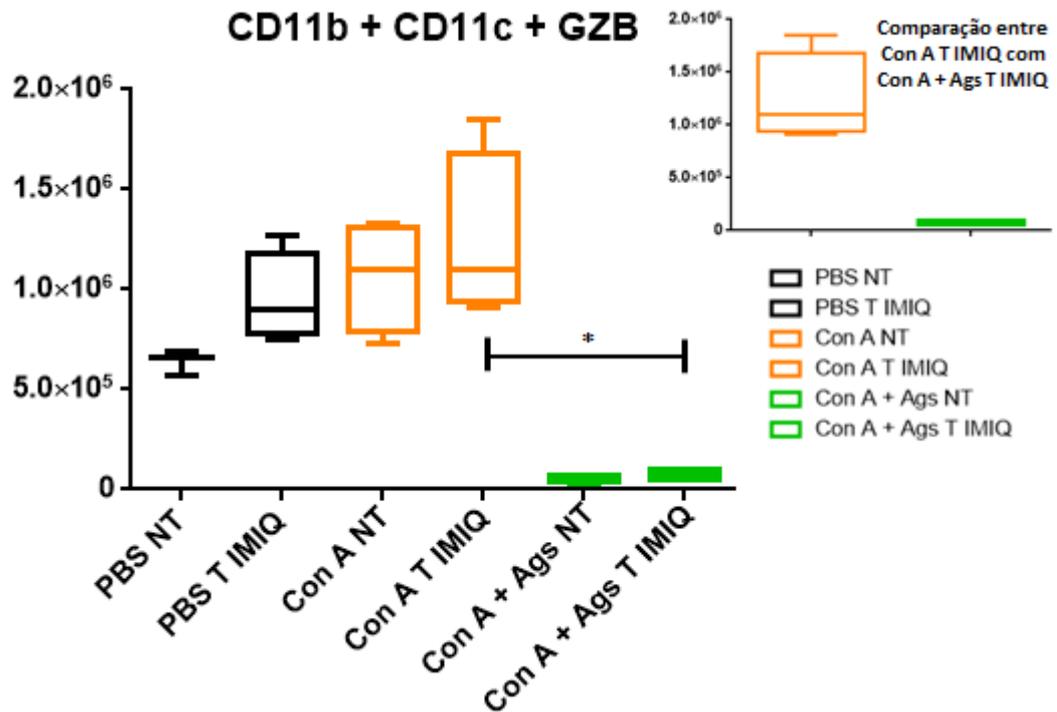


Figura 10: DCs que produzem Granzima B em cultura: em animais tratados (T IMIQ) e não tratados (NT), com diferentes estímulos, Con A, Con A mais antígenos tumorais (Con A + Ags), ou PBS (C). Comparação das DCs que produzem Granzima B em cultura no grupo de animais tratados (T IMIQ), que receberam estímulo com Con A com grupo de células que receberam o estímulo com Con A mais antígenos tumorais (Con A + Ags). $p = 0,0286$ no teste de Mann-Whitney. $n=10$

Discussão

Devido ao aumento frequente de novos casos de câncer ao redor do mundo, ao prognóstico ruim quando o mesmo se apresenta de maneira maligna, os efeitos adversos desagradáveis dos tratamentos convencionais existentes (radioterapia e quimioterapia), que por muitas vezes deixam os pacientes submetidos extremamente debilitados, torna-se necessário o desenvolvimento de novas terapêuticas que causem menores efeitos colaterais e desconforto aos portadores dessa patologia. Atualmente diversos estudos vêm sendo realizados para o desenvolvimento de métodos de intervenções mais eficazes e com efeitos colaterais mais amenos capazes de auxiliar, ou potencializar uma atividade imunológica mediante a resposta tumoral, com o intuito de conter o avanço desenfreado dessas células. Dentre essas terapias mais modernas, muito se tem pesquisado em humanos sobre a administração de anticorpos monoclonais, como por exemplo o Nivolumab; um anticorpo do tipo IgG4, que se liga no receptor PD-1, impedindo que o seu principal ligante (PDL-1) promova a interação com o sítio ativo de receptor, evitando que a célula do sistema imune entre em apoptose (revisto em WOLCHOK et al, 2013). Outros moduladores da resposta imunológica, como o creme de uso tópico estimulante do TLR-7, o IMIQ, demonstrou-se efetivo no combate ao câncer de células escamosas (HUANG et al, 2009) e basocelular (STARY et al, 2007). Assim por apresentar essa eficácia ao combate de tumores associados ao tecido epitelial, resolvemos avaliar se o mesmo possui essa eficácia no melanoma.

Na etapa inicial do nosso projeto realizamos a injeção das células B16F0 no dorso dos animais. A seguir, prosseguiu-se à padronização do modelo experimental de progressão do melanoma na orelha de camundongos, baseado em estudos que demonstraram eficácia no transplante de órgãos na para esse local, como desenvolvimento de coração retirado de camundongos neonatos, e de baço transplantados no pavilhão auricular de animais (CARDILLO et al, 1993; CARDILLO et al, 1996). Foram obtidos resultados que demonstraram excelente reprodutibilidade com uma elevada acurácia, já que todos os experimentos realizados demonstraram padrões de desenvolvimento tumoral, e sobrevida dos

animais muito semelhantes. Cumpre ressaltar também a facilidade para visualização do tumor na orelha, sendo capaz de ser visto desde muito pequeno, apresentando aspecto de um pequeno sinal de pele até a formação de uma massa mais densa, o que contribui muito para aferição do tamanho do tumor, que com assistência de um paquímetro o procedimento pode ser realizado em poucos segundos. Outro aspecto favorável no modelo experimental, é a facilidade para aplicação do creme na pele da orelha dos animais. Neste procedimento não há necessidade de nenhum equipamento para tal, bastando apenas realizar a contenção do camundongo de maneira convencional. Isto difere do modelo de melanoma no dorso dos animais que demonstrou ser extremamente agressivo, de difícil aferição do tamanho tumoral e tratamento (não mostrados).

Com baixas chances de cura em estágios mais avançados, o melanoma é considerado por SANDRU e colaboradores em trabalhos publicados no ano de 2014, um dos tumores mais agressivos e de evolução imprevisível dos já relatados, com uma mortalidade preocupante e tratamentos questionáveis nesses estágios. Além disso possui uma alta capacidade de causar metástases para diversos tipos de órgãos, principalmente pulmões, fígado, outros locais da pele, e sistema nervoso central. Apesar de toda essa agressividade o tratamento com IMIQ demonstrou a capacidade de promover uma extensão na sobrevida em cerca de 7 à 5 dias (respectivamente Fig 2 e 9A), com 7 dias a mais há aumento de sobrevida de 29,2% em relação aos ande aumento comparando aos animais que não receberam tratamento ($p=0,048$ Log-Rank). Esse resultado é relevante, pois o aumento da sobrevida em 7 dias evidencia extensão considerável, pois sem tratamento os animais sobrevivem cerca de 20 dias. Ressalta-se que o tempo máximo de vida do *Mus musculus* é de cerca de 1 ano e meio a 2 anos.

Ao realizar a aferição do tamanho tumoral nos diferentes grupos, com um auxílio de um paquímetro, juntamente com o acompanhamento da sobrevida dos animais tratados, para observarmos a taxa de expansão do melanoma. Como pode ser notado com análise da figura 3A, o tratamento com IMIQ, de fato é eficaz na contenção da progressão do melanoma em uma fase inicial, isso pode

ser devido ao fato da estimulação do TLR-7 pelo creme promover a migração de células efetoras aptas a desempenhar eficiente atividade antitumoral.

Com resultados promissores acerca do controle do desenvolvimento tumoral em animais tratados, seguimos para a avaliação das possíveis células do sistema imune. Verificou-se que entre os linfócitos T CD4 e T CD8 totais em animais tratados não apresentavam nenhuma alteração em seus números relativos, podendo ser observado na figura 4A e 4B. Entretanto ao avaliarmos a população de linfócitos T CD4 de memória central (Figura 5), percebe-se que o tratamento promove a redução dessa população no baço. As células T de memória central, são linfócitos T, que apresentam alta expressão dos marcadores de superfície celular CD44 e CD62L. Foi descrito que essas células possuem uma função efetora baixa, ou até mesmo inexistente, contudo são dotadas de uma capacidade de realizar uma rápida proliferação e diferenciar-se em linfócitos efetores, mediante a estimulação antigênica, e migrar para o local do antígeno específico (revisto por SALLUSTO et al, 2004). Isso pode indicar que a redução dessa população células T de memória central, seja devido a essas células estarem recebendo a apresentação de antígenos tumorais, diferenciando-se em células efetoras. Na sequência haveria possibilidade de que as mesmas possam migrar para o local do tumor, no sentido de executar suas funções efetoras sobre o tumor.

Os linfócitos T têm amplo papel na contenção do avanço tumoral, seja pela lise direta de células do tumor por linfócitos T CD8. São ainda capazes de reconhecer antígenos tumorais, apresentados por células apresentadoras de antígeno, através da molécula de MHC de classe I. Isto poderá decorrer após desenvolvimento de população T CD8+ específica, capaz de destruir células tumorais sem que seja necessário haver outra coestimulação. Juntamente com os linfócitos T CD4, essas células podem produzir e secretar citocinas, capazes de estimular as células tumorais apresentarem maior quantidade de moléculas de MHC classe I. Decorrente disto, pode haver maior sensibilidade a lise causada por linfócitos T CD8 secretando o TNF- α e o IFN- γ (DONIA et al, 2013). O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória, característica do perfil Th1 e pode ser secretada por células NK, NKT e principalmente linfócitos T CD4 revisto em SCHOENBORN e WILSON, no ano de 2007. A ausência de IFN- γ em alguns

modelos de câncer está associada a tumores agressivos, correlacionando esta citocina a papel na atividade antitumoral. INF- γ vem sendo utilizado em ensaios clínicos como uma forma terapêutica auxiliar ao tratamento com melanoma (revisto por PARKER et al, 2016). Os dados obtidos sobre a influência do IMIQ na produção dessa citocina podem ser observados na figura 7, sendo que os dados apontam uma maior proporção de linfócitos T CD8 presente no baço e no linfonodo drenante de animais que recebem o tratamento, quando estimulados com α CD3, *in vitro*. Estes mesmos linfócitos evidenciam uma produção elevada de IFN- γ comparadas aos animais que não foram tratados no decorrer do desenvolvimento tumoral.

Uma outra citocina que foi avaliada foi TNF- α , que pode ser secretada por células do sistema imune, como linfócitos T ativados, macrófagos e células de Langerhans ou por outras células como os queratinócitos. O TNF- α é uma citocina com diversas funções, exibe caráter geralmente pró-inflamatório capaz de induzir apoptose de diversas células tumorais, e estimular atividade citotóxica de macrófagos e células NK (revisto em BALKWILL, 2009). No nosso modelo experimental, TNF- α produzidos por linfócitos T CD4 e T CD8 presentes no linfonodo drenante, foi semelhante à produção de IFN- γ : ou seja, quando estimulados com α CD3, *in vitro*, houve maior produção de citocinas em animais tratados com IMIQ.

Ao serem avaliadas as possíveis populações envolvidas na atividade antitumoral e que poderiam estar elevadas numericamente no modelo experimental proposto, verificou-se que tanto as populações de células dendríticas, como as de células NKT apresentaram aumento significativo no baço de animais que foram tratados (Figura 6). Da mesma maneira que este aumento pode refletir que estas células esplênicas possam estar recebendo estímulos para que migrem em direção ao linfonodo drenante e auxiliem a atividade tumoricida, controlando seu avanço numa fase inicial de desenvolvimento. Diversos estudos demonstram a importância das células NKT no combate tumoral, induzindo a produção de IFN- γ , ou estimulando a atividade efetora de outras populações celulares, como linfócitos T CD8 e células NK. CROWE e colaboradores, em trabalho publicado em 2002 demonstraram que

camundongos deficientes de células NKT tinham maior susceptibilidade ao desenvolvimento de sarcoma.

As células NKT também estão envolvidas no processo de maturação das células dendríticas, pois em experimento utilizando α -Galactosilceramida (α GalCer) para estimulação da resposta por células NKT, animais que foram estimulados demonstraram elevados níveis de marcadores de maturação das DCs (como CD80, CD86, CD40 e MHC-II) comparados a animais controle. A maturação demonstrada foi independente de MyD88 ou sinalização via células NK, indicando que isso ocorreu mediante células NKT (FUJII et al, 2003). GORBACHEV e FAIRCHILD em estudo publicado no ano de 2006, também utilizando a estimulação com α GalCer, demonstram que as células NKT são importantes na maturação de DCs, concluindo que a ativação dessas células é importante na migração de linfócitos T CD8, e na indução do aumento de produção de IFN- γ pelas mesmas.

Como as células NKT podem ser responsáveis na contenção da expansão tumoral no nosso modelo experimental, resolvemos utilizar animais desprovidos da molécula de CD1 (CD1KO). A análise de sobrevida realizada comparando os grupos de animais selvagens (WT) com animais CD1KO (Figura 9A), demonstrou que os animais que não possuem a molécula de CD1, independentemente de receberem o tratamento com IMIQ ou não, apresentam uma sobrevida semelhante aos animais selvagens que não receberam tratamento. Se comparada ainda a sobrevida entre o grupo de animais selvagens tratados com IMIQ com o grupo de animais CD1KO também tratados, verifica-se diferença estatística (Log-Rank, $p=0,014$). Outra diferença observada é no desenvolvimento do tumor, se for avaliado o seu tamanho apresentado por esses diferentes grupos (Figura 9B), como demonstrado o tratamento com o IMIQ, não faz diferença no grupo de animais que não possuem a molécula de CD1. Estes dados contrastam com os do grupo de animais que apresentam essa molécula, aparentando um crescimento tumoral até mais rápido que animais selvagens que não receberam tratamento (Fig 9B comparados CD1KO tratados aos WT não tratados). Diferenças estatisticamente significantes foram obtidas (Mann-Whitney em animais selvagens e tratados com animais CD1KO tratados: dias

12, $p=0,0014$, 16 $p=0,0048$ e 18, $p=0,0078$). Esses dados corroboram com a teoria que realmente as células NKT são fundamentais para a contenção do desenvolvimento tumoral. Na ausência da principal molécula apresentadora de antígenos para essas células, o avanço tumoral se dá de maneira aparentemente mais rápida do que em animais que a possuem.

A interação das células NKT com as células dendríticas, é um outro fator de extrema importância para o contenção do avanço do tumor, principalmente no que se refere a atividade antitumoral de células dendríticas. A figura 10 mostrou que o tratamento com IMIQ parece estar induzindo o aumento da população de células dendríticas mielóides (CD11b+ CD11c+) que produzem granzima (GZB), *ex vivo*, independentemente dos estímulos utilizados. Entretanto a presença dos antígenos tumorais na cultura, reduz consideravelmente essa produção de GZB por esta população celular. Se compararmos as células de animais tratados que foram cultivadas com Con A com células de animais tratados cultivadas simultaneamente com Con A, e com os antígenos tumorais (Figura 10), nota-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,0286$ no teste de Mann-Whitney). A redução dessa população de células na presença de antígenos tumorais, pode ser um dos diversos mecanismos de evasão do sistema imunológico empregado pelas células tumorais em seu microambiente. Uma possibilidade é de que as mesmas sejam capazes de induzir a apoptose de células dendríticas. Como exemplo disso seriam os gangliosídeos; glicoesfingolípídeos associados a membrana gerados por diversos tipos diferentes de tumores, inclusive o melanoma cutâneo (PÉGUET-NAVARRO et al, 2003).

Conclusão geral

Pode-se concluir neste estudo que o IMIQ demonstra uma eficácia na contenção do desenvolvimento do melanoma, promovendo aumento nas populações de células NKT e dendríticas, estimulando também a produção de INF- γ por linfócitos T CD8 presentes no baço, e de TNF- α por linfócitos T CD4 e T CD8 presentes no linfonodo drenante desses animais. Ademais, na ausência da molécula de CD1 o tumor demonstra um desenvolvimento mais rápido e uma sobrevida menor, provando assim que as células NKT são as principais responsáveis pelo aumento da sobrevida e contenção no avanço do melanoma. As mesmas podem estar estimulando o recrutamento de DCs capazes de produzir GZB após o tratamento com o mitógeno. Finalmente, observou-se que a população de células DCs produtoras de GZB parece estar aumentada após o tratamento com IMIQ. Entretanto há inibição da produção de GZB por esta população celular, quando presença dos antígenos tumorais. Estes resultados indicam que na presença de antígenos tumorais DCs deixam de produzir GZB, mesmo após ativação através de Con A.

Os estudos aqui apresentados são um desafio para à busca de mecanismos de ativação das diferentes populações NKT (dependentes ou não de CD1) e a atividade anti-tumoral destes linfócitos. Pelos motivos expostos, a compreensão destes de mecanismos envolvem aspectos de instrução de células NK e NKT para o desenvolvimento de atividade anti-tumoral. Isto posto, o modelo descrito vai muito além de identificar e aprimorar a atividade anti-tumoral, pretendendo-se ainda gerar conhecimento a respeito da biologia de células NK e NKT.

Os resultados apresentados são promissores e indicativos da possibilidade que na presença de antígenos tumorais, DCs possam se tornar tolerôgenicas. Ainda que NKT dependentes de CD1 podem estar envolvidas na proteção contra o tumor. Em perspectivas futuras, o estudo de células NK e NKT no sistema experimental proposto é um elemento fundamental para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas futuras, baseadas na manipulação das populações celulares mencionadas neste trabalho.

Referências

BAKOS, L. et al. A melanoma risk score in a brazilian population. **An Bras Dermatol**, v. 88, n. 2, p. 226-232, 2013.

BALKWILL, F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 5, p. 361-371, 2009.

BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 18, n. 1, p. 767-811, 2000.

BRUTKIEWICZ, R. R.; SRIRAM, V. Natural killer T (NKT) cells and their role in antitumor immunity. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 41, n. 3, p. 287-298, 2002.

BURNS, E. M.; YUSUF, N. Toll-like receptors and skin cancer. **Front Immunol**, v. 5, n. 1, p. 1-4, 2014.

CARDILLO, F. et al. An age-related γ 6 T cell suppressor activity correlates with the outcome of autoimmunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Eur J Immunol**, v. 23, n. 1, p. 2597-2605, 1993.

CARDILLO, F. et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma Interferon and Interleukin 10: Role of NK cells. **Infect Immun**, v. 64, n., p. 128-134, 1996.

CROWE, N. Y.; SMYTH, M. J.; GODFREY, D. I. A critical role for Natural Killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 1, p. 119-127, 2002.

DONIA, M. et al. Methods to improve adoptive t-cell therapy for melanoma: Ifn-gamma enhances anticancer responses of cell products for infusion. **J Invest Dermatol**, v. 133, n. 2, p. 545-552, 2013.

DRAGHICIU, O. et al. Myeloid derived suppressor cells – An overview of combat strategies to increase immunotherapy efficacy. **Oncolmunology**, v. 4, n1

DROBITS, B. et al. Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 2, p. 575-585, 2012.

ERDEI, E.; TORRES, S. M. A new understanding in the epidemiology of melanoma. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 10, n. 11, p. 1811-1823, 2010.

FUJII, S. et al. Activation of Natural Killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. **J Exp Med**, v. 198, n. 2, p. 267-279, 2003.

GEORGE, D. D.; ARMENIO, V. A.; KATZ, S. C. Combinatorial immunotherapy for melanoma. **Cancer Gene Ther**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2016.

GORBACHEV, A. V.; FAIRCHILD, R. L. Activated NKT cells increase dendritic cell migration and enhance CD8+ T cell responses in the skin. **Eur J Immunol**, v. 36, n. 9, p. 2494-2503, 2006.

HUANG, S. J. et al. Imiquimod enhances ifn-gamma production and effector function of T cells infiltrating human squamous cell carcinomas of the skin. **J Invest Dermatol**, v. 129, n. 11, p. 2676-2685, 2009.

ILKOVITCH, D.; LOPEZ, D. M. Immune modulation by melanoma-derived factors. **Exp Dermatol**, v. 17, n. 12, p. 977-985, 2008.

LI, V. et al. Imiquimod as an antioangiogenic agent. **J Drugs Dermatol**, v. 4, n. 6, p. 708-717, 2005.

LIN, J. Y.; FISHER, D. E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 843-850, 2007.

LUIZ, O. C. et al. Ethnicity and cutaneous melanoma in the city of São Paulo, Brazil: A case-control study. **Plos One**, v. 7, n. 4, p. 1-7, 2012.

MACKIE, R. M.; HAUSCHILD, A.; EGGERMONT, A. M. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. **Ann Oncol**, v. 20, n. 6, p. 1-7, 2009.

NISHIMURA, T. et al. The interface between innate and acquired immunity: Glycolipid antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic t lymphocytes. **Int Immunol**, v. 12, n. 7, p. 987-994, 2000.

PARKER, B. S.; RAUTELA, J.; HERTZOG, P. J. Antitumour actions of Interferons: Implications for cancer therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 16, n. 3, p. 131-144, 2016.

PEGUET-NAVARRO, J. et al. Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 7, p. 3488-3494, 2003.

PROCOPIO, D. O. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins from *Trypanosoma cruzi* bind to CD1d but do not elicit dominant innate or adaptive immune responses via the CD1d/NKTcell pathway. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 7, p. 3926-3933, 2002.

RAULET, D. H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 10, p. 781-790, 2003.

SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance. **Annu Rev Immunol**, v. 22, n. 1, p. 745-763, 2004.

SANDRU, A. et al. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. **Journal of Medicine and Life**, v. 7, n. 4, p. 572-576, 2014.

SCHOENBORN, J. R.; WILSON, C. B. Regulation of Interferon- γ during innate and adaptive immune responses. **Advances In Immunology**, v. 96, n. 1, p. 41-101, 2007.

SCHÖN, M.; SCHÖN, M. The antitumoral mode of action of imiquimod and other imidazoquinolines. **Curr Med Chem**, v. 14, n. 6, p. 681-687, 2007.

STARY, G. et al. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. **J Exp Med**, v. 204, n. 6, p. 1441-1451, 2007.

STEINER, D. et al. Vitiligo. **An Bras Dermatol**, v. 79, n. 3, p. 335-351, 2004.

SU, Z. et al. Myeloid-derived suppressor cells in cancers and inflammatory diseases: Angel or demon? **Scand J Immunol**, v. 84, n. 5, p. 255-261, 2016.

TEL, J. et al. Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous ags to CD8 T cells despite lower ag uptake than myeloid dendritic cell subsets. **Blood**, v. 121, n. 3, p. 459-467, 2013.

TERABE, M.; BERZOFSKY, J. A. The immunoregulatory role of type i and type ii NKT cells in cancer and other diseases. **Cancer Immunol Immunother**, v. 63, n. 3, p. 199-213, 2014.

THOMPSON, J. F.; SCOLYER, R. A.; KEFFORD, R. F. Cutaneous melanoma. **The Lancet**, v. 365, n. 9460, p. 687-701, 2005.

VARGAS, P. et al. Immunization with antigen-pulsed dendritic cells significantly improves the immune response to weak self-antigens. **Immunobiology**, v. 211, n. 1-2, p. 29-36, 2006.

VILANOVA, C. M. et al. Epidemiological and histopathological profile of cutaneous melanoma at a center in northeastern brazil from 2000 to 2010. **An Bras Dermatol**, v. 88, n. 4, p. 545-553, 2013.

WALDHAUER, I.; STEINLE, A. NK cells and cancer immunosurveillance. **Oncogene**, v. 27, n. 45, p. 5932-5943, 2008.

WANG, H. Y.; WANG, R. F. Regulatory T cells and cancer. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 2, p. 217-223, 2007.

WEEKS, C.; GIBSON, S. Induction of interferon and other cytokines by imiquimod and its hydroxylated metabolite r-842 in human blood cells in vitro. **J Interferon Res**, v. 14, n. 2, p. 81-85, 1994.

WOLCHOK, J. D. et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. **N Engl J Med**, v. 369, n. 2, p. 122-133, 2013.

WOO, E. Y. et al. Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 9, p. 4272-4276, 2002.

ZAMAI, L. et al. NK cells and cancer. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 7, p. 4011-4016, 2007.