



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA



Luzimar de Araújo Costa Sampaio Neta

**EFEITO DO SOBRENADANTE DE CÉLULAS TUMORAIS SOBRE O FENÓTIPO,
PROLIFERERAÇÃO E MORTE CELULAR DE LINFÓCITOS HUMANOS**

São Luís

2018

Luzimar de Araújo Costa Sampaio Neta

**EFEITO DO SOBRENADANTE DE CÉLULAS TUMORAIS SOBRE O FENÓTIPO,
PROLIFERERAÇÃO E MORTE CELULAR DE LINFÓCITOS HUMANOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão, como pré-requisito para obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos

São Luís

2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Sampaio Neta, Luzimar de Araújo Costa.

Efeito do sobrenadante de células tumorais sobre o fenótipo, proliferação e morte celular de linfócitos humanos / Luzimar de Araújo Costa Sampaio Neta. - 2018.
36 f.

Orientador(a): Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos.
Monografia (Graduação) - Curso de Farmácia,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

1. Câncer. 2. Microambiente tumoral. 3. Sistema imune. I. Santos, Ana Paula Silva de Azevedo dos. II. Título.

Luzimar de Araújo Costa Sampaio Neta

**EFEITO DO SOBRENADANTE DE CÉLULAS TUMORAIS SOBRE O FENÓTIPO,
PROLIFERERAÇÃO E MORTE CELULAR DE LINFÓCITOS HUMANOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão, como pré-requisito para obtenção do grau de bacharel em Farmácia.

Aprovado em: _____ de _____ de _____

Nota: _____

Banca examinadora:

Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos – UFMA
Doutora em Imunologia

Profa. Dra. Rosimary de Jesus Gomes Turri – UFMA
Doutora em Imunologia

Profa. Dra. Mayara Cristina Pinto da Silva – UFMA
Doutora em Ciências da Saúde

São Luís

2018

*À minha avó Luzimar de Araújo Costa (in
memoriam), pelo exemplo de vida, de
profissional e pela criação.*

AGRADECIMENTOS

À minha avó Luzimar (*in memoriam*), por ter me proporcionado os meios de chegar até aqui.

À Eduardo Magalhães, meu companheiro de todas as horas, pelo apoio, compreensão e incentivo.

À minha mãe Arcângela, pelo carinho e incentivo.

À minha sogra Márcia Cristina, pelo auxílio e pelo apoio.

Aos amigos que fiz no curso de Farmácia, Ana Clara, Ana Paula, Carla Milena, Deane, Isaias, Jacqueline, Juliana, Laura Helena, Raissa, Rosimary, Rafaela, Tassiano, Wellaine, e Yasmim, que estiveram ao meu lado durante esses anos.

Às doadoras, sem as quais nada disso seria possível.

Aos integrantes do Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer e do Laboratório de Imunofisiologia, em especial às companheiras de laboratório que tanto me ajudaram, Mirtes e Sulayne.

À minha orientadora, Dra. Ana Paula Santos, por me mostrar o mundo científico, por sua atenção e paciência.

Às professoras que aceitaram compor a minha banca de TCC, Dra. Mayara Cristina, Dra. Rosimary Turri e Dra. Thiare Fortes.

A todos os professores que contribuíram para minha formação no curso de farmácia.

À Universidade Federal do Maranhão por proporcionar as vivências estudantis e científica.

À FAPEMA e ao CNPq pelo fomento indispensável para a realização da pesquisa.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho e que me apoiaram.

RESUMO

O câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo. Na prática, câncer é um termo genérico que se refere a mais de 200 doenças em que as células se dividem de forma anormal. Apesar da capacidade de induzir imunidade antitumoral, as células tumorais são capazes de evitar o mecanismo efetor imune e progredir no hospedeiro. A imunoterapia contra o câncer tem ganhado destaque pois busca reverter a imunossupressão causada pelo câncer, já que envolve o uso do sistema imunológico para rejeitar tumores ou prevenir sua recorrência. O presente estudo buscou avaliar a influência de fatores solúveis, produzidos por linhagem de tumor de mama, sobre a função e fenótipo de linfócitos humanos obtidos de doadoras saudáveis. Para isso, foi coletado sangue periférico de seis voluntárias saudáveis, do qual foram isolados linfócitos, que foram cultivados com ou sem sobrenadante de linhagem de célula tumoral MCF-7 e foram feitos o ensaio de linfoproliferação, fenotipagem e caracterização da morte celular. Os resultados mostraram que sobrenadante tumoral não afetou o fenótipo dos linfócitos significativamente e nem a capacidade proliferativa, mas foi capaz de reduzir a porcentagem de células mortas por apoptose e aumentar a porcentagem de células viáveis, indicando que os fatores solúveis de MCF-7 têm efeito anti-apoptótico.

Palavras-chave: Sistema imune. Câncer. Microambiente tumoral.

ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death worldwide. In practice, cancer is a generic term that refers to more than 200 diseases in which cells divide abnormally. Despite the ability to induce anti-tumour immunity, tumoral cells are able to prevent the immune mechanism from progressing in the host. Immunotherapy against cancer has as main objective to revert the immunosuppression caused by cancer, since it involves the use of the immune system to reject tumours or prevent their recurrence. The present study sought to evaluate the influence of soluble factors, produced by breast tumor lineage, the function and phenotype of human lymphocytes obtained from healthy donors. For this, peripheral blood was collected from six healthy volunteers, from which isolated lymphocytes were cultured with or without MCF-7 tumor cell lineage supernatant and the lymphoproliferation, phenotyping and characterization of cell death assays were performed. Results showed that tumor soluble factors did not affect the lymphocyte phenotype significantly or the proliferative capacity, but was able to reduce the percentage of dead cells by apoptosis and increase the percentage of viable cells, indicating that the soluble factors of MCF-7 have an anti-apoptotic effect.

Key words: Immune system. Cancer. Tumour microenvironment.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
3	OBJETIVOS	16
3.1	Objetivo Geral	16
4	Objetivos específicos	16
5	MATERIAL E MÉTODOS	17
5.1	Grupo de estudo	17
5.2	Obtenção de linfócitos do sangue periférico	17
5.3	Viabilidade celular por azul de tripan	18
5.4	Imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	18
5.5	Obtenção de sobrenadante tumoral	21
5.6	Cultura de linfócitos	21
5.7	Ensaio de linfoproliferação	21
5.8	Avaliação de morte celular por citometria de fluxo.....	22
5.9	Análise dos dados.....	24
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6.1	Imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	25
6.2	Proliferação	26
6.3	Caracterização da morte celular	27
7	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	30
	ANEXO A	33
	ANEXO B	36

1 INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo e estima-se que seja responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes em 2018, sendo que cerca de 1 em 6 mortes é devido ao câncer. Câncer de pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado são os tipos mais comuns de câncer em homens, enquanto mama, colorretal, pulmão, colo do útero e tireoide são os mais comuns entre as mulheres (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Na prática, câncer é um termo genérico que se refere a mais de 200 doenças em que as células se dividem de forma anormal, descontrolada e conseguem invadir outros tecidos. Ao mesmo tempo que compartilham certas características, essas doenças são extremamente diferentes em termos de sua origem genética e histopatológica, progressão, agressividade, prognóstico, tratamento e também resposta ao tratamento (SAITO *et al.*, 2015).

Apesar da capacidade de induzir imunidade antitumoral, as células tumorais são capazes de evitar o mecanismo efetor imune e progredir no hospedeiro. Os tumores contêm um repertório de células recrutadas, aparentemente normais, que contribuem para a aquisição de características marcantes ao criar o microambiente tumoral, já que as células tumorais são capazes de promover interações celulares e liberação de fatores solúveis que levam à imunossupressão e subversão da resposta imune (DEEPAK e ACHARYA, 2010; PALUCKA e COUSSENS, 2016).

A imunoterapia contra o câncer tem ganhado destaque pois busca reverter a imunossupressão causada pelo câncer, já que envolve o uso do sistema imunológico para rejeitar tumores ou prevenir sua recorrência. Resultados clínicos interessantes foram obtidos usando vacinas contra o câncer, terapias de células T adotivas e anticorpos que estimulam a atividade dos linfócitos T. Além disso, evidências crescentes sugerem que a imunidade adaptativa contribui para os benefícios clínicos de longo prazo de tratamentos anticâncer, como quimioterapia e radioterapia (COULIE *et al.*, 2014).

Um dos principais mecanismos de escape do tumor que limita o sucesso clínico da imunoterapia do câncer é a função inadequada do sistema imune do hospedeiro no contexto de um tumor em desenvolvimento. Portanto, a imunoterapia bem-sucedida do câncer, requer o entendimento da relação natural entre o sistema imune do hospedeiro e as células tumorais (DEEPAK e ACHARYA, 2010). Sendo assim, são importantes estudos para elucidar os mecanismos pelos quais as células tumorais são capazes de manipular o sistema imunológico para evadir a destruição.

O principal mecanismo de proteção imune adaptativa contra tumores é a eliminação das células tumorais por linfócitos T citotóxicos (CD8⁺). Os linfócitos T auxiliares (CD4⁺) podem desempenhar um papel nas respostas imunes antitumorais ao proporcionar citocinas para a diferenciação de células T CD8⁺ *naive* em efetoras. Além disso, as células T auxiliares específicas para antígenos tumorais são capazes de secretar citocinas, como fator de necrose tumoral e interferon- γ , que podem aumentar a capacidade de reconhecimento de células neoplásicas por células T CD8⁺ (ABBAS *et al.*, 2015).

O presente estudo buscou avaliar a influência de fatores solúveis, produzidos por linhagem de tumor de mama, sobre a função e fenótipo de linfócitos humanos obtidos de doadoras saudáveis.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O sistema imune é considerado atualmente como responsável pela defesa do organismo e pela manutenção da homeostase, pois seus componentes são capazes não apenas de neutralizar e impedir a ação de patógenos, mas também de modular processos fisiológicos em desequilíbrio, buscando preservar o próprio (ABBAS *et al.*, 2015). Esse conceito abrangente foi lapidado ao longo do desenvolvimento da imunologia.

O termo "imunidade" é derivado da palavra latina "*immunitas*", que originalmente levava o conceito legal de isenção. Desde a Idade Antiga fora observado que alguns indivíduos que se recuperavam da doença estavam de algum modo "isentos" da recorrência. Assim, escrevendo sobre a praga de Atenas em 430 a.C., Tucídides relatara que o mesmo homem nunca fora atacado duas vezes pela doença, pelo menos não fatalmente. Logo, os primeiros conceitos de imunidade estavam intimamente relacionados com as teorias prevalecentes da doença (LI, 2010).

A origem da imunologia como ciência costuma ser atribuída a Edward Jenner, que observou, no fim do século XVIII, que a doença da varíola bovina, ou vaccínia, relativamente branda, parecia conferir proteção contra a doença da varíola humana, geralmente fatal. Em 1796, ele demonstrou que a inoculação de um preparado obtido de pústulas da varíola bovina poderia proteger contra a varíola humana. Jenner deu a esse procedimento o nome de vacinação (MURPHY, 2014).

Quando introduziu a vacinação, Jenner nada sabia a respeito dos agentes infecciosos que causam doenças. No final do século XIX as descobertas de Koch e de outros grandes microbiologistas estimularam a expansão da estratégia de vacinação de Jenner para outras doenças. Nos anos 1880, Louis Pasteur projetou vacina contra a cólera aviária, e desenvolveu uma vacina antirrábica. Tais triunfos levaram à busca dos mecanismos de proteção imunológica e ao desenvolvimento da ciência da imunologia. Assim, a imunologia desenvolveu-se como ramo da microbiologia, desenvolvendo-se a partir dos estudos das doenças infecciosas e das respostas do organismo a estas doenças (MURPHY, 2014).

Durante grande parte do século XX, o ceticismo era alto em relação à existência de uma resposta imune ao câncer em humanos e existiam dúvidas quanto à aplicabilidade aos seres humanos de informações derivadas de estudos de tumores murinos transplantáveis. A revisão de Woglom *et al.* (1929) comentando sobre imunoterapia e câncer concluiu que: "Seria tão difícil rejeitar a orelha direita e deixar a orelha esquerda intacta quanto imunizar contra o

câncer”. Mais tarde, a revisão de Hewitt *et al.* (1976) não relatou nenhuma evidência de resposta imune a 27 diferentes tumores espontâneos em camundongos.

A primeira indicação clara de que manipulações imunológicas poderiam causar a regressão de cânceres humanos invasivos estabelecidos veio de estudos sobre a administração de altas doses de IL-2 recombinante em humanos, sendo mostrada a regressão de tumores invasivos volumosos em pacientes com melanoma metastático, câncer renal e linfoma não-Hodgkin (ROSENBERG *et al.*, 1983).

A IL-2, uma citocina produzida por linfócitos T auxiliares, possui efeitos estimuladores imunológicos, incluindo a expansão de linfócitos após ativação por antígeno específico. Uma vez que a IL-2 não tem impacto direto nas células cancerígenas, seu efeito *in vivo* nos cânceres resulta da sua capacidade de expandir os linfócitos com atividade antitumoral (ROSENBERG, 2001).

O desenvolvimento de métodos de propagação de células T humanas de pacientes com câncer possibilitou a identificação de um antígeno próprio do melanoma: MAGE-1, evidenciando que o sistema imune é capaz de responder aos antígenos tumorais (VAN DER BRUGGEN *et al.*, 1991; TRAVERSARI *et al.*, 1992).

Esse achado impulsionou a descoberta de diversos antígenos tumorais conhecidos atualmente e a presença de antígenos tumor-específicos fornece uma justificativa para três abordagens para imunoterapia de câncer que estão atualmente em desenvolvimento: o uso de anticorpos estimuladores de células T, transferência adotiva de células T antitumorais e vacinação (COULIE *et al.*, 2014).

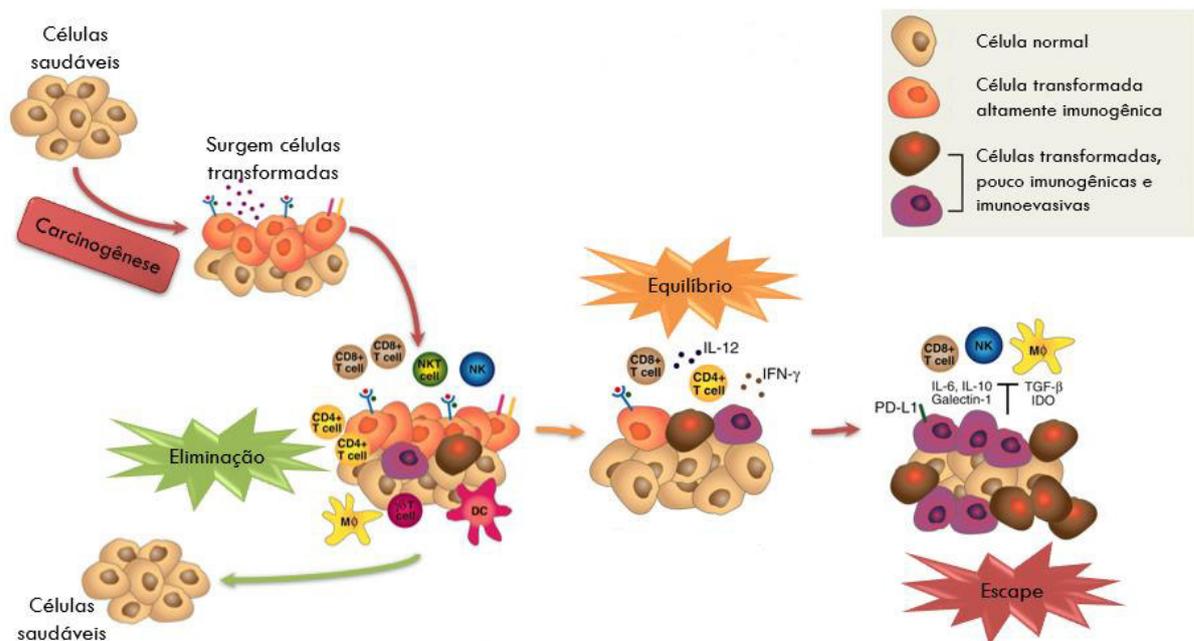
De acordo com conceito de vigilância imunológica, o sistema imune é capaz de reconhecer e destruir clones de células neoplásicas antes que se transformem em tumores e também é capaz de eliminar tumores depois de formados. Assim, indivíduos imunossuprimidos tem maior risco de desenvolver câncer, mas, mesmo em pessoas imunocompetentes, as células tumorais são capazes de evitar o sistema imune por vários mecanismos e resultar em câncer (KUMAR *et al.*, 2015).

São reconhecidas dez características principais do câncer, incluindo multiplicação ilimitada, evasão de supressores de crescimento, promoção de invasão e metástase, resistência à apoptose, estimulação da angiogênese, manutenção da sinalização proliferativa, desregulação do metabolismo energético celular, instabilidade genômica e mutação, inflamação associada ao tumor e evasão da destruição imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A explicação sobre a capacidade das células tumorais de evadir os mecanismos de destruição do sistema imune é demonstrada pela teoria da imunoedição do câncer. Considera-

se que o sistema imune do hospedeiro molda o destino do tumor em três fases: eliminação, equilíbrio e escape (ilustrado na Figura 1). Na primeira fase, denominada eliminação, as células transformadas são destruídas por um sistema imunológico competente. No entanto, células tumorais esporádicas podem conseguir sobreviver à destruição imune e então entrar em uma fase de equilíbrio, onde há coexistência entre as células imunes e as células tumorais, sendo estas controladas, mas não eliminadas. É possível que haja eliminação do tumor, contudo, outra possibilidade é que células imunes exerçam uma pressão seletiva sobre células neoplásicas e estas, imunologicamente esculpidas, entram na fase de escape da resposta imune e progridem com mecanismos de supressão ou subversão da resposta imune (DUNN *et al.*, 2004; SCHREIBER *et al.*, 2011; MITTAL *et al.*, 2014).

Figura 1 – Processo de imunoeedição do câncer.



Com o processo de carcinogênese asNa fase de eliminação, elementos inatos e adaptativos da imunidade trabalham em conjunto para destruir as células neoplásicas. Se essa fase for concluída, o hospedeiro permanecerá livre de câncer e a eliminação representará a extensão total do processo. Se, no entanto, eventuais células neoplásicas não forem destruídas na fase de eliminação, pode-se entrar na fase de equilíbrio, na qual seu crescimento é evitado por mecanismos imunológicos. Para isso células T, IL-12 e IFN-γ são necessários manter as células tumorais em um estado de dormência funcional. A edição da imunogenicidade do tumor ocorre na fase de equilíbrio. O equilíbrio também pode representar um estágio final do processo de imunodeficiência do câncer e pode restringir o crescimento de cânceres que ficarão ocultos durante toda a vida do hospedeiro. Entretanto, como consequência da constante pressão de seleção imune constante em células tumorais geneticamente instáveis mantidas em equilíbrio, podem surgir variantes de células tumorais que (1) não são mais reconhecidas pela imunidade adaptativa (variantes de perda de antígenos ou células tumorais que desenvolvem defeitos no processamento de antígenos ou apresentação), (2) tornarem-se insensíveis aos mecanismos efetores imunes, ou (3) induzem um estado imunossupressor dentro do microambiente tumoral. Essas células tumorais podem então entrar na fase de escape, na qual seu crescimento não é mais bloqueado pelo sistema imune, e assim emergem para causar doença clinicamente aparente.

Fonte: Schreiber *et al.* (2011) com modificações da autora.

As respostas imunes que são capazes de destruir as células tumorais são mediadas principalmente por células NK e linfócitos T citotóxicos. Os tumores evadem das respostas imunes através de vários mecanismos que incluem a redução da expressão de moléculas do MHC, crescimento seletivo de células que não expressam antígenos tumorais, produção de substâncias imunossupressoras solúveis, acoplamento dos receptores inibitórios nos linfócitos por seus ligantes expressos nas células tumorais, e a indução de células T regulatórias (SCHREIBER *et al.*, 2011; GAJEWSKI; SCHREIBER; FU, 2013).

O efeito da atividade das células tumorais sobre as células do sistema imune é múltiplo e pode incluir diversos mecanismos. A imunomodulação mediada pelo tumor possibilita que as células neoplásicas interferiram em cada passo da resposta inflamatória antitumoral. Não apenas a interação intercelular, mas também fatores solúveis tumorais dificultam a função efetora das células imunes envolvidas e as reprogramam como células caracterizadas por fenótipo regulatório e imunossupressor (ELINAV *et al.*, 2013).

A caracterização do microambiente tumoral em pacientes com câncer revela evidências de fenótipos imunológicos distintos com base na presença ou ausência de inflamação baseada em células T. Essas observações possibilitaram identificar biomarcadores preditivos para resposta a imunoterapias e estão orientando a identificação de novas intervenções imunoterapêuticas. Os tumores infiltrados de células T podem responder de forma ideal às terapias que visam interferir nos mecanismos inibitórios do sistema imunológico. Os tumores não infiltrados de células T podem requerer intervenções adicionais com o objetivo de promover uma inflamação ideal e ativação imune no microambiente tumoral (GAJEWSKI; SCHREIBER; FU, 2013).

A literatura relata que a análise do microambiente tumoral de pacientes com diversos tumores sólidos, como carcinoma de células renais, melanoma, câncer de ovário e câncer de mama revela infiltrados de linfócitos T (ZHANG *et al.*, 2003; KREIKE *et al.*, 2007; MAHMOUD *et al.*, 2011; RUSAKIEWICZ *et al.*, 2013). É presumido que inclui linfócitos T antígeno-específicos para o tumor, que tenham sido espontaneamente ativados em resposta ao crescimento tumoral, talvez por mecanismos de vigilância imunológica (GAJEWSKI *et al.*, 2013).

Em tumores com infiltrados de células T, as quimiocinas suportam o influxo de linfócitos T efetores CD8⁺, mas estas subsequentemente se tornam funcionalmente inibidas pelos efeitos das células tumorais. Em tumores não infiltrados de células T, há má expressão de quimiocinas e falta de infiltração de células T. Assim, os infiltrados tumorais de células T tem maior

capacidade de responder de forma ideal às terapias que visam reverter a imunossupressão (GAJEWSKI *et al.*, 2013).

Um mecanismo fundamental para o correto funcionamento do sistema imune é a apoptose. Durante os estágios iniciais da linfopoiese, a sinalização dos fatores de crescimento é um regulador essencial da homeostase, regulando a sobrevivência dos progenitores de linfócitos. Durante a diferenciação dos linfócitos, a apoptose assegura que os linfócitos expressem receptores funcionais de antígenos e é essencial para a eliminação de linfócitos autorreativos. Alterações na expressão ou função de moduladores de morte celular, podem resultar em condições patológicas, incluindo imunodeficiência, autoimunidade e câncer, tendo em vista que regulação da morte celular protege a responsividade dos linfócitos (OPFERMAN, 2008).

O Comitê de Nomenclatura em Morte Celular propôs que os pesquisadores deveriam definir uma célula como morta quando as seguintes características são observadas: (1) a célula perdeu a integridade da membrana plasmática; (2) a célula sofreu desintegração completa; (3) o que resta da célula foi fagocitada pelas células vizinhas *in vivo* (KROEMER *et al.* 2009).

Desta forma, estudos que busquem aprofundar os efeitos no fenótipo, função e sobrevivência dos linfócitos são importantes para entender a imunidade no contexto de câncer e possibilitar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência de fatores solúveis liberados por linhagem de células tumorais sobre a proliferação, fenótipo e morte de linfócitos, para contribuir com estudos acerca do microambiente tumoral.

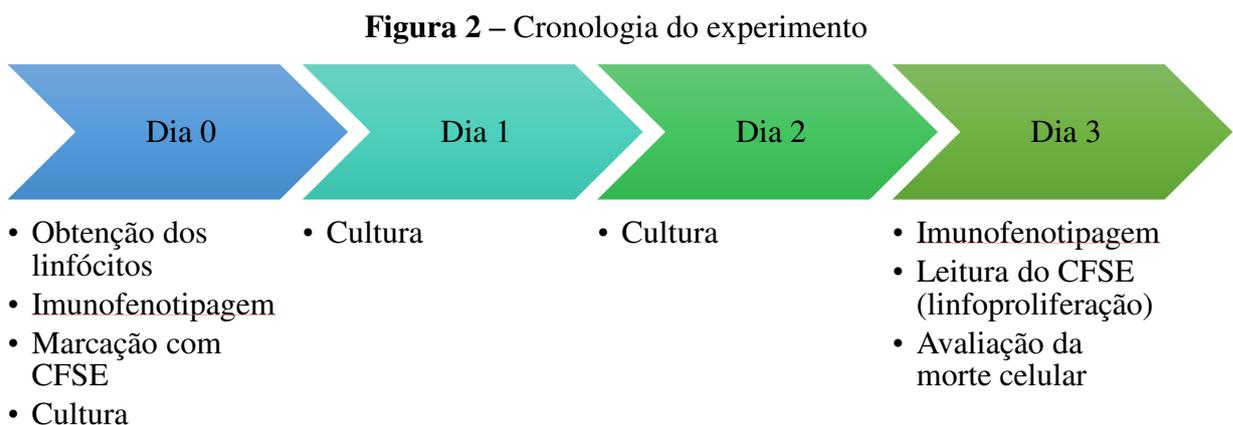
4 Objetivos específicos

- Isolar linfócitos de sangue periférico humano;
- Determinar o fenótipo dos linfócitos;
- Avaliar efeitos dos fatores solúveis de células tumorais sobre a proliferação de linfócitos;
- Caracterizar a morte celular dos linfócitos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Grupo de estudo

As seis voluntárias, com idade entre 22 e 40 anos, foram informadas sobre o intuito do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Maranhão. Foram critérios de inclusão sentir-se bem e com saúde, não possuir diagnóstico de doença crônica, concordar em participar da pesquisa e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMA, conforme o projeto n. 1.308.275 (Anexo1). Foram critérios de exclusão pacientes que não se enquadrarem nos critérios de inclusão acima descritos e/ou não concordarem assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A cronologia do experimento está ilustrada na (Figura 2)



Fonte: criada pela autora.

5.2 Obtenção de linfócitos do sangue periférico

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa em tubos a vácuo contendo EDTA como anticoagulante, obtendo-se um volume final médio de 7mL de sangue. Para obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) e isolamento dos linfócitos, em ambiente estéril (cabine de fluxo laminar), o sangue foi diluído com PBS (tampão de fosfato) na proporção de 1:1. Em um tubo cônico de 50mL, adicionou-se um volume de Ficoll® Paque Plus correspondente à quantidade de sangue coletada. O sangue diluído foi adicionado sobre a camada de Ficoll®.

O material foi centrifugado a 900g por 30 minutos, a 18°C. A camada de células mononucleares formada foi cuidadosamente retirada, colocada em outro tubo juntamente com PBS e centrifugada a 600g por 10 min. As células foram lavadas por mais duas vezes e centrifugadas a 300g e 200g, respectivamente, para eliminação das plaquetas. Entre a segunda e a terceira lavagem, retirou-se uma alíquota da suspensão de células para contagem e determinação da viabilidade celular em câmara de Neubauer com corante azul de tripan conforme o item 4.3.

Após a terceira lavagem, o *pellet* foi ressuscitado em meio RPMI 1640 suplementado 10% com soro fetal bovino (R-10) em quantidade suficiente para a concentração de 1×10^6 células/mL. As PBMCs foram colocadas em placas de plástico específicas para cultura de células, em estufa a 5% CO₂, a 37°C por 2h, para aderência.

Passado esse tempo, as células não-aderentes foram retiradas e contadas. As células aderentes foram consideradas monócitos e as não aderentes linfócitos. Separou-se então parte das não aderentes para análise fenotípica como descrito no item 4.4. O restante dos linfócitos foi destinado a cultura conforme o item 4.6. Ressalta-se que todo o procedimento foi feito em ambiente estéril para que não houvesse contaminação microbiana nas amostras.

5.3 Viabilidade celular por azul de tripan

Em 10µL da suspensão celular foram adicionados 10µL de azul de tripan a 0,4% para a observação e contagem em câmara de Neubauer por microscopia óptica. O corante azul de tripan permite detectar células inviáveis que, por apresentarem danos na membrana plasmática, permitem a incorporação do corante e coram-se em azul, diferentemente das células viáveis, com membrana plasmática íntegra, que bloqueia a passagem do corante, mantendo-se não-corada (MCATEER, 1994).

Para calcular a porcentagem de células viáveis (viabilidade) utilizou-se a equação abaixo.

$$Viabilidade (\%) = \frac{\text{células não coradas}}{\text{total de células}} \times 100$$

5.4 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Foram utilizadas alíquotas de 2×10^5 células e colocadas em microtubos plásticos de 1,5mL que foram centrifugadas por 1min, a 10500g para obtenção de um *pellet*. O sobrenadante foi descartado e a amostra lavada duas vezes com PBSA 1%. Foram adicionados os anticorpos

monoclonais comerciais específicos para os marcadores de interesse: CD3 (marcador de linfócitos T), CD4 (molécula do complexo TCR de linfócitos T auxiliares), CD8 (molécula do complexo TCR de linfócitos T citotóxicos) e CD28 (proteína expressa nas células T que fornece sinais co-estimulatórios necessários para a ativação e sobrevivência das células T).

Com o intuito de calibrar o equipamento antes da análise, também foram feitas monocatas marcadas cada um dos anticorpos e uma amostra foi deixada sem anticorpo algum (branco), mas passou por todas as outras etapas.

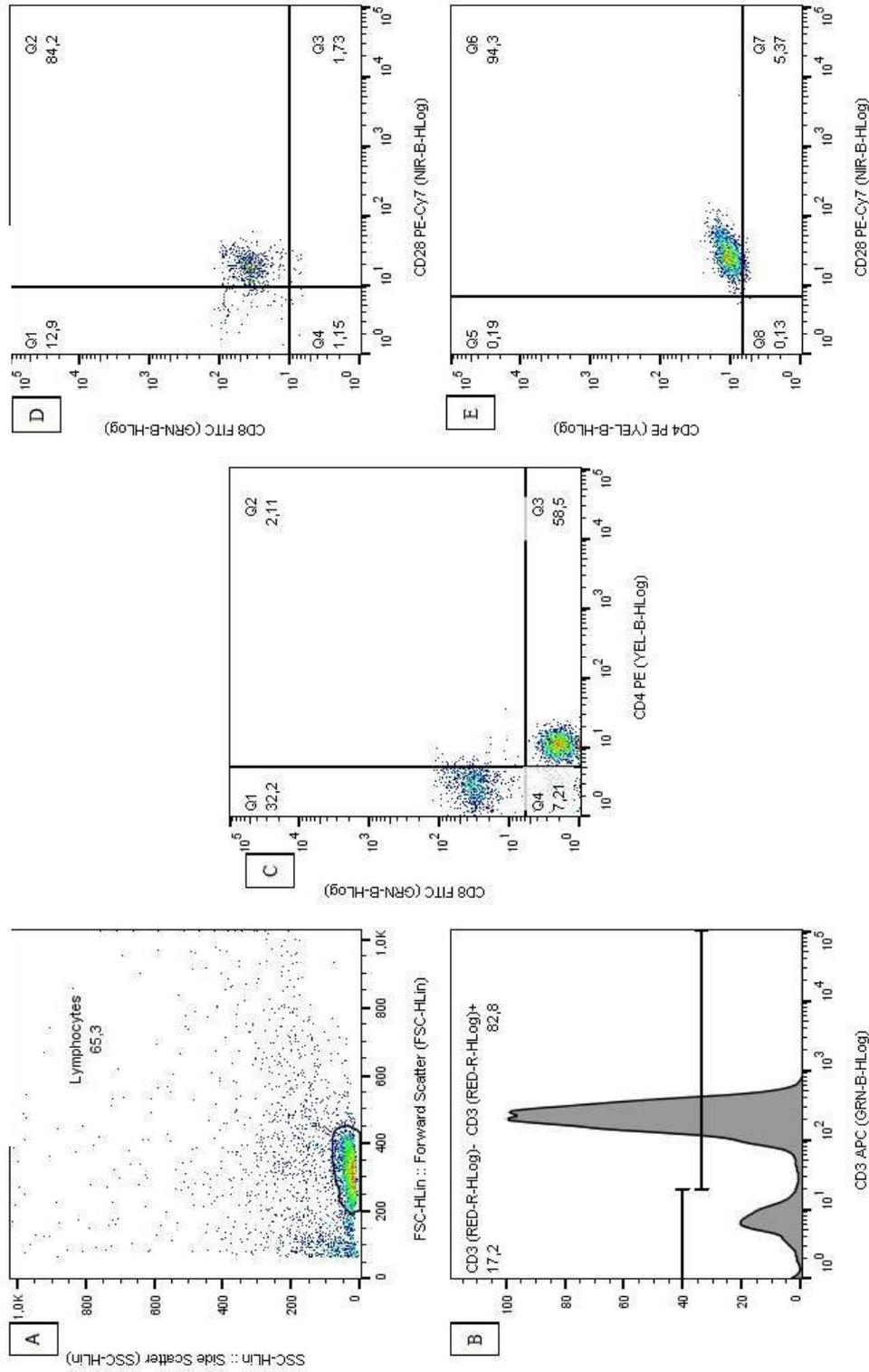
As amostras foram incubadas por 20 min a 4°C ao abrigo da luz. Após este período, o material foi lavado duas vezes com PBSA 1% e fixado com tampão contendo 4% de paraformaldeído, por 15 minutos. Após centrifugadas, as amostras foram ressuspensas em 200µL de PBSA 1% e armazenadas ao abrigo da luz em geladeira, a 4°C, por até sete dias, para que fosse feita a leitura por citometria de fluxo (Guava® easyCyte™ 8HT).

Para a análise, foram considerados os seguintes perfis fenotípicos:

- Linfócitos CD3+;
- Linfócitos CD3+ CD4- CD8+;
- Linfócitos CD3+ CD4- CD8+ CD28+;
- Linfócitos CD3+ CD4+ CD8-;
- Linfócitos CD3+ CD4+ CD8- CD28+.

Para isso, utilizando o software FlowJo, foram definidos *gates*, e avaliaram-se as populações, conforme mostra a Figura 3.

Figura 3 – Populações definidas na fenotipagem



A: população definida como linfócitos de acordo com o tamanho e a complexidade. B: dentro da população de linfócitos foram selecionados apenas os positivos para CD3, sendo que o critério de positividade previamente definido pelas amostras “branco” e marcada unicamente com CD3 (não mostrado). C: Considerando apenas as células positivas para CD3, definiu-se as populações levando em consideração os marcadores CD4 e CD8. D: Os eventos do quadrante 3 da figura 3 foram analisados quanto a expressão de CD8 e CD28. E: Os eventos do quadrante 1 da figura C foram analisados quanto a expressão de CD4 e CD28.

Fonte: dados da pesquisa.

5.5 Obtenção de sobrenadante tumoral

O sobrenadante foi obtido de células da linhagem MCF-7 (SOULE *et al.* 1973) provenientes do Laboratório de Imunologia Aplicada ao Câncer (UFMA), cultivadas até atingirem confluência de 80%. Para evitar restos celulares, o sobrenadante foi filtrado com filtro de seringa antes do uso.

5.6 Cultura de linfócitos

Os linfócitos foram cultivados com 200µL de veículo por três dias em placa de 96 poços (2×10^5 células por poço). Parte das células foram marcadas com carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) para o ensaio de linfoproliferação conforme o item 4.7. Os grupos foram os seguintes:

- Linfócitos + Meio R-10 (Ly+meio)
- Linfócitos + 70% Meio R-10 + 30% de sobrenadante de MCF7 (Ly+ST)
- Linfócitos marcados com CFSE + Meio R-10
- Linfócitos marcados com CFSE + 70% Meio R-10 + 30% de sobrenadante de MCF7
- Linfócitos marcados com CFSE + Meio R-10 + fitohemaglutinina
- Linfócitos marcados com CFSE + 70% Meio R-10 + 30% de sobrenadante de MCF7 + fitohemaglutinina

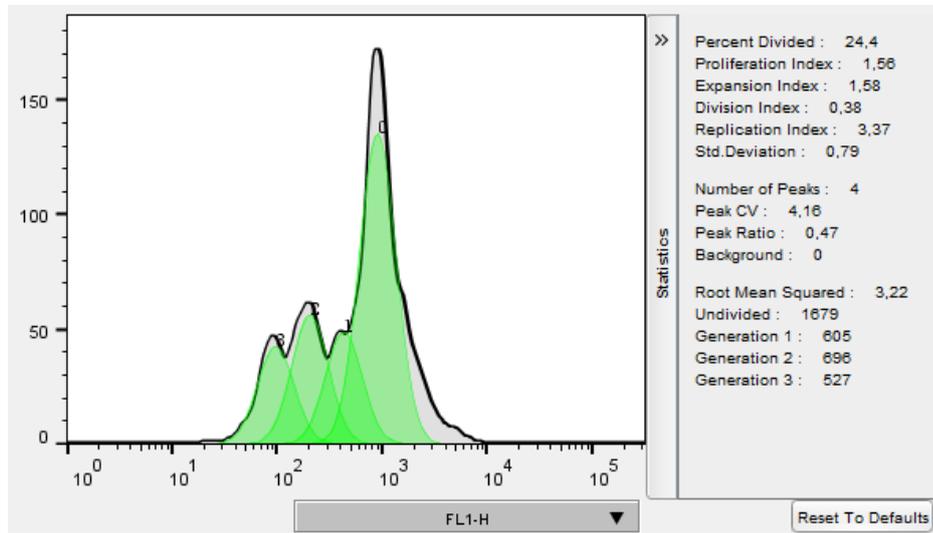
5.7 Ensaio de linfoproliferação

As células foram marcadas antes da cultura com CFSE – (Invitrogen, CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit), de acordo com as instruções do fabricante. Após o terceiro dia de cultura, as células marcadas com CFSE foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCallibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, U.S.A.) Como controle positivo foi utilizado o mitógeno fitohemaglutinina.

O CFSE é capaz de reagir com as aminas intracelulares, formando conjugados fluorescentes estáveis. A fluorescência das células marcadas se mantém durante o desenvolvimento celular. Quando ocorre divisão celular, a marcação é herdada pelas células-filhas, sendo que não é transferida para células adjacentes em uma população, então diferentes intensidades de fluorescência indicam diferentes gerações de células (TARIO JR *et al.*, 2012).

O *software* FlowJo, utilizado para analisar a proliferação, vale-se da intensidade de fluorescência emitida por cada célula e então calculada as medidas de proliferação, como exemplificado na Figura 4.

Figura 4 - Exemplo de análise da proliferação celular



O gráfico mostra as gerações de células de acordo com a intensidade de fluorescência. Os parâmetros calculados são disponibilizados ao lado do gráfico

Fonte: Dados da pesquisa avaliados pelo FlowJo

O índice de proliferação calculado pelo FlowJo é o número total de divisões dividido pelo número de células que entraram em divisão. Assim, o índice de proliferação leva em conta apenas as células que sofreram pelo menos uma divisão, ou seja, apenas as células responsivas são refletidas no índice de proliferação (ROEDERER, 2011).

5.8 Avaliação de morte celular por citometria de fluxo

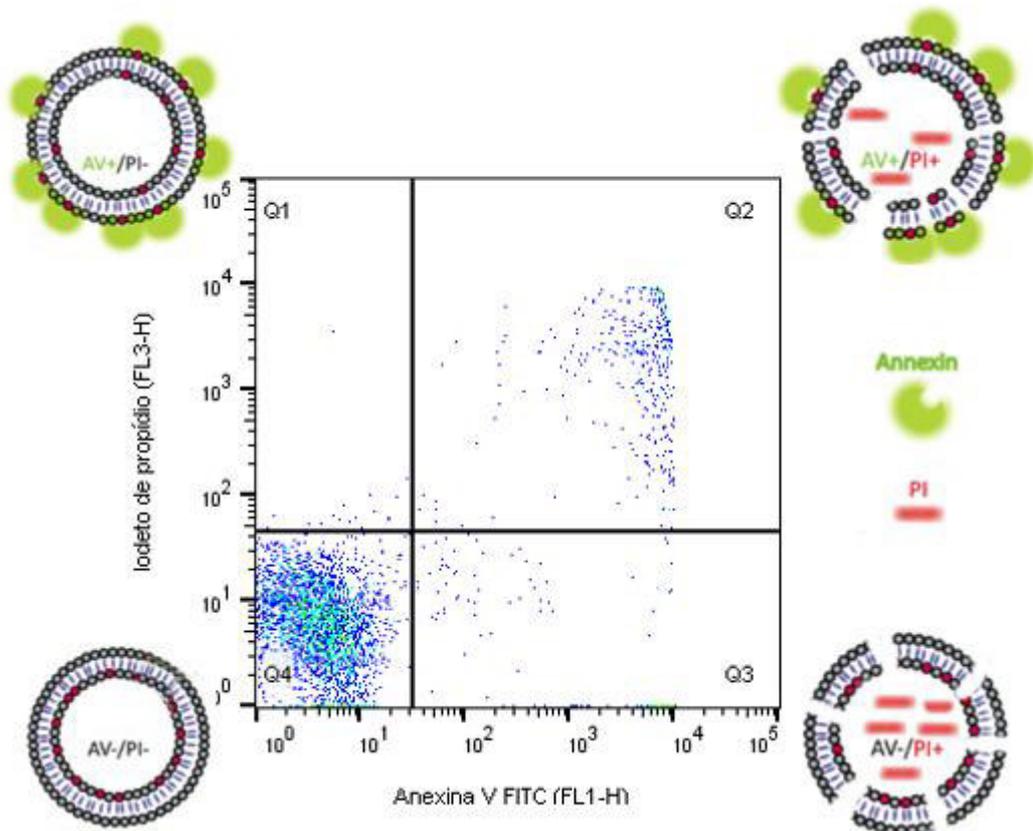
Após a cultura, parte das células sem CFSE foram destinadas a avaliação de morte celular. A anexina V é uma proteína placentária humana que se liga especificamente à fosfatidilserina na presença de cálcio. A anexina V conjugada com fluorocromo é uma ferramenta comumente usada para detectar e quantificar a exposição de fosfatidilserina, característica da assimetria de membrana plasmática. A detecção da anexina V deve ser combinada com o uso de reagentes de viabilidade celular, como iodeto de propídio (PI), que não é capaz de penetrar na membrana plasmática íntegra, podendo ser usados em conjunto para diferenciar células apoptóticas e necróticas. (VERMES *et al.*, 1995).

No presente estudo, foi utilizando o kit *Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit* (BD Pharmingen™), seguindo as instruções do fabricante. Após aquisição das células em citômetro de fluxo FACSCallibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, U.S.A.), as células foram selecionadas de acordo com seu tamanho e granulosidade.

A seleção das células marcadas com Anexina V-FITC/PI permitiu a distinção de grupos celulares (Figura 5), que foram classificados como:

- Anexina+ PI-: células em apoptose;
- Anexina+ PI+: células inviáveis, mortas por apoptose;
- Anexina- PI+: células inviáveis, mortas por necrose;
- Anexina- PI-: células viáveis.

Figura 5 – Marcação com Anexina V FITC e iodeto de propídio



A figura mostra um exemplo de leitura da marcação com Anexina V FITC (AV) e iodeto de propídio (PI). Ao lado de cada quadrante está ilustrado o estado das respectivas células. Q1: células em apoptose; Q2: células inviáveis, mortas por apoptose; Q3: células inviáveis, mortas por necrose; Q4: células viáveis.

Fonte: dados da pesquisa.

5.9 Análise dos dados

As amostras para realizar os testes de imunofenotipagem, linfoproliferação e avaliação da morte celular foram feitas em duplicata, totalizando 12 amostras. Os dados obtidos por citometria de fluxo foram analisados com auxílio do software FlowJo[®] (versão 10.5.). Após processamento dos dados, utilizou-se o GraphPad Prism (versão 8.0.1) para realizar os testes estatísticos Anova seguido de teste Tukey para a fenotipagem e linfoproliferação e Anova seguido de Sidak para analisar os dados da morte celular.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

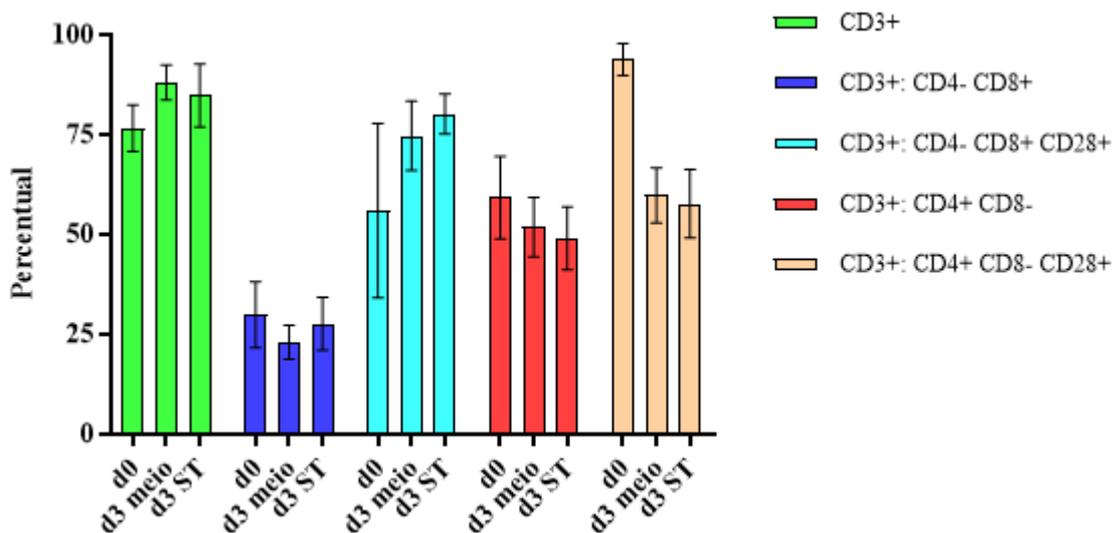
6.1 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Quanto a frequência de linfócitos CD3+ aumentou no grupo cultivado com meio R-10 (antes: $76,7 \pm 5,9\%$ e depois: $88,1 \pm 4,4\%$, $p=0,006$). Não houve diferença entre o cultivo com meio R-10 e tratado com sobrenadante tumoral.

Analisando a expressão de CD8, não houve diferenças na frequência de células positivas. No entanto, houve aumento da frequência de células CD8+ CD28+, o tempo de cultura provocou diferença na frequência de células no grupo cultivado com meio R-10 (antes: $56,04 \pm 21,8\%$, depois: $74,8 \pm 8,7\%$), $p < 0,0001$) e também no grupo cultivado com sobrenadante tumoral (antes: $56,04 \pm 21,8\%$, depois: $80,2 \pm 5,02\%$ $p < 0,0001$). Não houve diferença entre os grupos não-tratado (cultivado com meio R-10) e tratado com sobrenadante.

Em relação a CD4, não houve diferença quando analisado sozinho, nas células T. Quando analisadas as células CD4+ CD28+, notou-se que houve redução na frequência com o tempo de cultura (antes: $93,8 \pm 4\%$, depois: $59,9 \pm 6,9\%$) sendo que o grupo tratado com sobrenadante também apresentou menor frequência em relação ao valor antes do tratamento (antes: $93,8 \pm 4\%$, depois: $57,8 \pm 8,5\%$). Não houve diferença entre o grupo tratado e o não tratado (Figura 6).

Figura 6 – Fenótipo dos linfócitos



Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. N= 12 por grupo. Ly d0: linfócitos obtidos no dia 0; Ly+meio: linfócitos não tratados, cultivados com meio R-10 por três dias; Ly+ST: linfócitos tratados com sobrenadante tumoral por três dias.

Fonte: Criada pela autora a partir de dados da pesquisa utilizando o software GraphPad Prism.

Os linfócitos T requerem para ativação não somente o sinal específico de antígeno, que é liberado pelo receptor de antígeno após seu acoplamento com peptídeos antigênicos apresentados no contexto das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), mas também requer sinais secundários ou coestimulatórios fornecidos pelas APCs (LINSLEY e LEDBETTER, 1993).

A molécula CD28 de células T é um receptor para sinais coestimulatórios fornecidos pela molécula B7 na APC. O receptor CD28 é estimulado durante o contato de células T com células apresentadoras de antígeno – por meio da molécula B7. A inibição das interações B7-CD28 bloqueia as respostas, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Durante as respostas das células T aos antígenos, a estimulação do receptor CD28 pode ser necessária para prevenir a inativação clonal ou anergia (LINSLEY e LEDBETTER, 1993).

Usando modelos *in vitro*, Schwartz e colaboradores, já em 1987 mostraram que a apresentação de antígenos na ausência de co-estimulação de células T levou à inativação funcional ou à anergia clonal de células T. A estimulação de células T na ausência de coestimulação também pode levar à morte de células T induzida por ativação. Assim, as vias costimulatórias das células T determinam se o envolvimento do TCR resulta em ativação ou inativação imunológica.

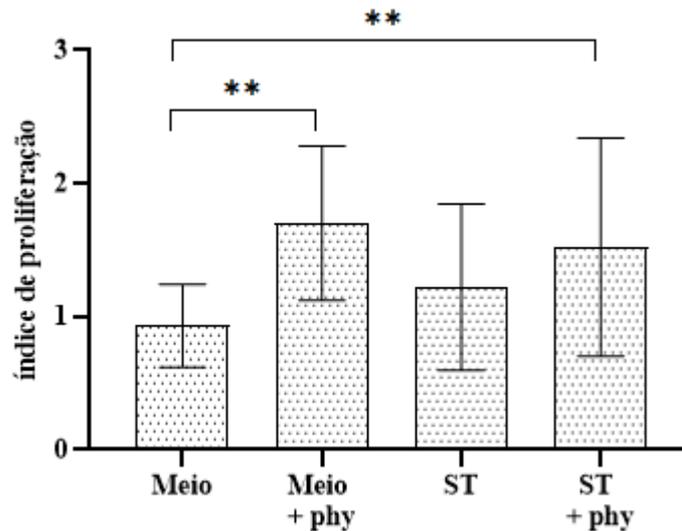
Diferentemente de outros membros da família das imunoglobulinas, cuja síntese e expressão de superfície são reguladas pela ativação celular, o CD28 é constitutivamente expresso tanto em células T CD4⁺ virgens quanto ativadas, mas sua expressão aumenta com a ativação. A expressão é influenciada pela taxa de síntese de proteínas, longevidade na superfície da célula, bem como mecanismos de endocitose que removem o receptor da superfície da célula (RIHA e RUDD, 2010).

As diferenças observadas no presente estudo indicam que o fator determinante para a mudança foi o tempo de cultura, e não o tratamento. Como a cultura não continha APCs, como células dendríticas, capazes de co-estimular os linfócitos, é plausível o fato de não haver variações fenotípicas relevantes entre os linfócitos tratados e não tratados.

6.2 Proliferação

A análise estatística dos dados mostrou que o índice de proliferação dos grupos estimulados com o controle positivo fitohemaglutinina, meio+phy ($1,7 \pm 0,6\%$) e ST+phy ($1,5 \pm 0,8$) foi maior que do grupo meio ($0,9 \pm 0,3\%$). As outras comparações não indicaram diferença estatística (Figura 7)

Figura 7 – Índice de proliferação de linfócitos mantidos em cultura por 3 dias



Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. N= 12 por grupo. Análise feita utilizando o software GraphPad Prism por Anova seguida de teste Tukey. ** $p < 0,0021$.

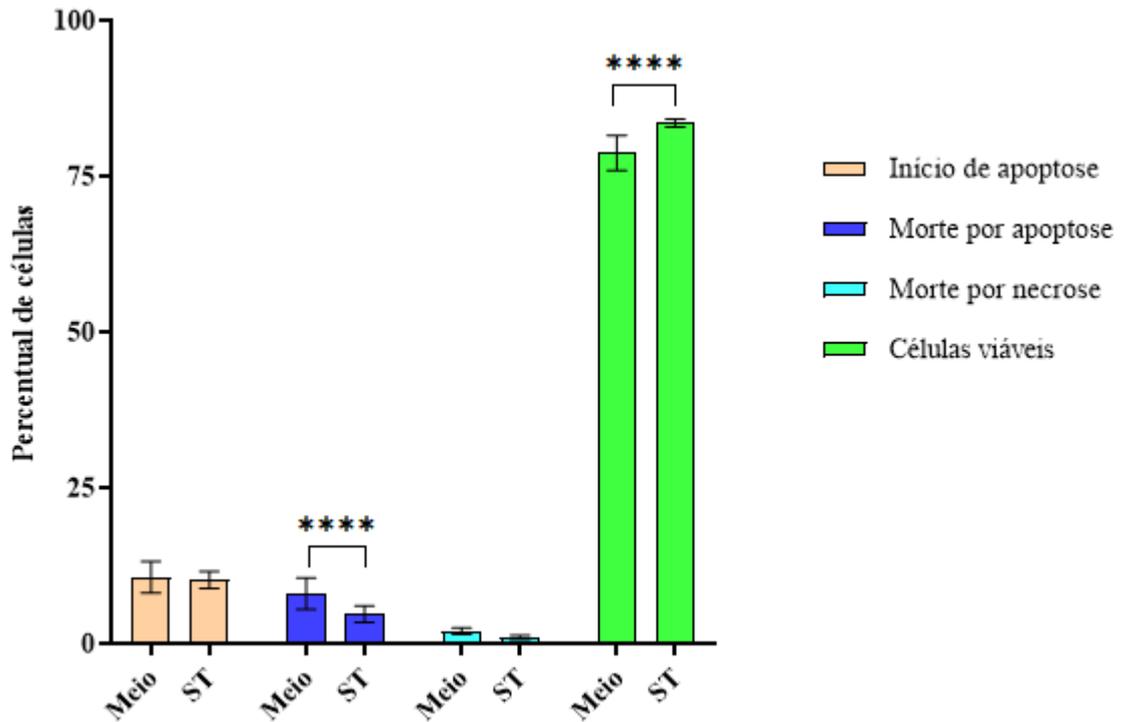
Fonte: Criada pela autora a partir de dados da pesquisa utilizando o software GraphPad Prism.

A fitohemaglutinina, é amplamente utilizada com fins de estimulação mitótica em linfócitos humanos (MOVAFAGH *et al.* 2011). O fato dos índices de proliferação das amostras com fitohemaglutinina terem sido maiores demonstra que o ensaio funcionou e de fato não há diferença entre os grupos não-tratado e tratado com sobrenadante tumoral.

6.3 Caracterização da morte celular

Quando analisados os grupos meio e ST, observou-se que haviam mais células mortas por apoptose no grupo não tratado do que no grupo tratado com sobrenadante tumoral (respectivamente: $8,2 \pm 2,6\%$ e $4,9 \pm 1,3\%$; $p < 0,0001$). No grupo tratado com sobrenadante tumoral haviam mais células viáveis do que no grupo não tratado (respectivamente: $83,7 \pm 0,6\%$ e $78,9 \pm 2,8\%$; $p < 0,0001$) (Figura 8).

A morte celular ocorre quando uma célula falha em manter funções vitais essenciais e pode ser não programada, no caso de lesão ou trauma, ou programada, como em processos como apoptose e autofagia. A morte celular pode ser classificada de acordo com sua aparência morfológica (como apoptótica ou necrótica), critérios enzimáticos (com ou sem envolvimento de proteases distintas), aspectos funcionais (programados ou não programados) ou características imunológicas (imunogênicas ou não imunogênicas) (GALLUZZI *et al.*, 2012).

Figura 8 – Caracterização da morte celular

Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. N= 12 por grupo. Teste Anova seguido de teste Sidak. ****p<0,0001.

Fonte: Criada pela autora a partir de dados da pesquisa utilizando o software GraphPad Prism

A apoptose é um tipo de morte celular programada que é crítica para numerosos processos fisiológicos normais. Um sinal precoce de apoptose é a perda de assimetria de membrana celular, em que resíduos de fosfatidilserina incorporados na membrana plasmática interna tornam-se exteriorizados e sinalizam fagocitose (VERMES *et al.*, 1995). Em contraste com a necrose, a célula apoptótica não provoca uma resposta inflamatória e as células são afetadas pela apoptose individualmente *in vivo* (GALLUZZI *et al.*, 2012).

A menor quantidade de células apoptóticas no grupo tratado com sobrenadante tumoral, sugere que os fatores solúveis das células MCF7 teve efeito anti-apoptótico sobre os linfócitos, em concordância com a literatura que indica a produção de fatores anti-apoptóticos por células da linhagem MCF7, como proteínas da família Bcl-2 e survivina (SIDDIQA *et al.*, 2008; HWANG *et al.* 2016).

7 CONCLUSÃO

O sobrenadante tumoral não teve efeito sobre o fenótipo dos linfócitos e nem sobre a capacidade proliferativa, mas foi capaz de reduzir a porcentagem de células mortas por apoptose e aumentar a porcentagem de células viáveis, indicando que os fatores solúveis de MCF7 têm efeito anti-apoptótico sobre os linfócitos.

O estudo possibilitou esclarecer o efeito do sobrenadante tumoral da linhagem MCF7 diretamente sobre os linfócitos, ajudando a esclarecer dados de pesquisas em andamento que buscam traçar estratégias para a imunoterapia do câncer.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew HH; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 1-36.
- ABCAM. Apoptosis Tools for cell death series 1
- AZIMI, Farhad et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. **Journal of clinical oncology**, v. 30, n. 21, p. 2678-2683, 2012.
- BLANK, Christian; GAJEWSKI, Thomas F.; MACKENSEN, Andreas. Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune evasion: implications for tumor immunotherapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 54, n. 4, p. 307-314, 2005.
- BUI, Jack D.; SCHREIBER, Robert D. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes?. **Current opinion in immunology**, v. 19, n. 2, p. 203-208, 2007.
- COULIE, Pierre G. et al. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 2, p. 135, 2014.
- DRAKE, Charles G.; JAFFEE, Elizabeth; PARDOLL, Drew M. Mechanisms of immune evasion by tumors. **Advances in immunology**, v. 90, p. 51-81, 2006. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol* 2002; 3: 999–1025.
- DUNN, Gavin P.; OLD, Lloyd J.; SCHREIBER, Robert D. The three Es of cancer immunoediting. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 329-360, 2004.
- ELINAV, Eran et al. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 13, n. 11, p.759-771, 24 out. 2013.
- GAJEWSKI, Thomas F.; SCHREIBER, Hans; FU, Yang-Xin. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. **Nature immunology**, v. 14, n. 10, p. 1014, 2013.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HEWITT, H. B.; BLAKE, E. R.; WALDER, A. S. A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin. **British journal of cancer**, v. 33, n. 3, p. 241, 1976.
- HWANG, Hyundoo et al. Human breast cancer-derived soluble factors facilitate CCL19-induced chemotaxis of human dendritic cells. **Scientific reports**, v. 6, p. 30207, 2016.
- Jenkins, M. K., Pardoll, D. M., Mizuguchi, J., Quill, H., Schwartz, R. H. 1987. T cell responsiveness in vivo and in vitro: Fine specificity of induction and molecular characterization of the unresponsive state. *Immunol. Rev.* 95: 1 1 3-35

KHONG, Hung T.; RESTIFO, Nicholas P. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. **Nature immunology**, v. 3, n. 11, p. 999, 2002.

KREIKE, Bas et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 5, p. R65, 2007.

KROEMER, G. *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ** v. 16, p. 3–11, 2009.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abbas; ASTER, Jon C. **Robbins: Patologia Básica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. p. 161-214.

LI, James T. A History of Immunology. **JAMA**, v. 303, n. 22, p. 2298-2298, 2010.

LINSLEY, Peter S.; LEDBETTER, Jeffrey A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. **Annual review of immunology**, v. 11, n. 1, p. 191-212, 1993.

MAHMOUD, Sahar MA et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 29, n. 15, p. 1949-1955, 2011.

MCATEER, DJM. **Basic cell culture: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1994.

MITTAL, Deepak et al. New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. **Current opinion in immunology**, v. 27, p. 16-25, 2014.

MOVAFAGH, Abolfazl et al. The significance application of indigenous phytohemagglutinin (PHA) mitogen on metaphase and cell culture procedure. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 10, n. 4, p. 895, 2011.

MURPHY, Kenneth. **Imunobiologia de Janeway**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NAGARSHETH, Nisha; WICHA, Max S.; ZOU, Weiping. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 9, p. 559, 2017.

OPFERMAN, J. T. Apoptosis in the development of the immune system. **Cell death and differentiation**, v. 15, n. 2, p. 234, 2008.

RIHA, Pavel; RUDD, Christopher E. CD28 co-signaling in the adaptive immune response. **Self/nonsel**, v. 1, n. 3, p. 231-240, 2010.

ROEDERER, Mario. Interpretation of cellular proliferation data: avoid the panglossian. **Cytometry Part A**, v. 79, n. 2, p. 95-101, 2011.

ROSENBERG, Steven A. et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. **New England journal of medicine**, v. 313, n. 23, p. 1485-1492, 1985.

ROSENBERG, Steven A. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 380, 2001.

RUSAKIEWICZ, Sylvie et al. Immune infiltrates are prognostic factors in localized gastrointestinal stromal tumors. **Cancer research**, 2013.

SAITO, Renata de Freitas et al. **Fundamentos de oncologia molecular**. São Paulo: Editora Atheneu, 2015.

SCHREIBER, Robert D.; OLD, Lloyd J.; SMYTH, Mark J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565-1570, 2011.

SIDDIQA, Aisha et al. Expression of HER-2 in MCF-7 breast cancer cells modulates anti-apoptotic proteins Survivin and Bcl-2 via the extracellular signal-related kinase (ERK) and phosphoinositide-3 kinase (PI3K) signalling pathways. **BMC cancer**, v. 8, n. 1, p. 129, 2008.

TARIO JR, Joseph D. et al. Optimized staining and proliferation modeling methods for cell division monitoring using cell tracking dyes. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 70, 2012.

TRAVERSARI, Catia et al. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. **Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 5, p. 1453-1457, 1992

VAN DER BRUGGEN, Pierre et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. **Science**, v. 254, n. 5038, p. 1643-1647, 1991.

VERMES, István et al. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. **Journal of immunological methods**, v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.

WOGLOM, Wm H. et al. Immunity to Transplantable Tumours. **Cancer review**, v. 4, p. 129-214, 1929.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 16 set. 2018.

ZHANG, Lin et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. **New England journal of medicine**, v. 348, n. 3, p. 203-213, 2003.

ANEXO A

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/MA



Continuação do Parecer: 1.308.275

de expressão gênica apresenta grande potencial para a identificação de marcadores moleculares e vêm contribuindo para o desenvolvimento de novas terapias em uma série de cânceres humanos. Neste sentido, propomos, por meio de análises de array-CGH, alteração no número de cópias (CNA), miRNAs, e análise de expressão gênica e

protéica, a identificação de marcadores moleculares em tumores penianos de pacientes provenientes do Estado do Maranhão, normalmente diagnosticados em estágios clínicos avançados, onde o risco de recorrência tumoral é elevado. Os perfis genômicos observados serão validados através de análises gênicas específicas e funcionais, incluindo as principais vias de sinalização celular identificadas. Estas análises podem, futuramente, contribuir para a redução da taxa de mortalidade por estes tumores, pela predição do prognóstico em uma fase inicial do atendimento clínico, bem como pela escolha adequada do tratamento, propiciando uma resposta terapêutica satisfatória.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar alterações genômicas e na expressão gênica e proteica em câncer de pênis, buscando a identificação de marcadores moleculares para este tipo de tumor.

Objetivo Secundário:

- Caracterizar os portadores de carcinomas penianos do Estado do Maranhão para o desenvolvimento de um registro epidemiológico específico para os homens do estado, a fim de identificar os principais fatores de risco e promover e incentivar ações preventivas.
- Identificar a presença de papilomavírus humano (HPV) e genotipar os subtipos virais.
- Identificar o perfil de alterações genômicas através do método de array-CGH.
- Identificar o perfil de expressão de miRNAs.
- Identificar alterações no número de cópias gênicas (CNA) por meio de qPCR.
- Integrar os dados de alterações de número de cópias de DNA com os de expressão de miRNA nas mesmas amostras tumorais.
- Avaliar alterações na expressão de genes específicos por meio de RT-PCR.
- Identificar, por citometria de fluxo e imunohistoquímica, variações na expressão de proteínas relacionadas às alterações genéticas detectadas nas células tumorais.
- Correlacionar as alterações observadas com parâmetros clínico-patológicos dos pacientes (tipo histológico, grau de estadiamento, tamanho do tumor), incluindo dados de seguimento clínico (tempo livre da doença, recorrência tumoral, sobrevida, entre outros).

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho
 Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética CEP: 65.080-040
 UF: MA Município: SAO LUIS
 Telefone: (98)3272-8708 Fax: (98)3272-8708 E-mail: cepufma@ufma.br

Continuação do Parecer: 1.308.275

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Este projeto confere riscos mínimos aos pacientes uma vez não será realizada nenhuma intervenção direta ou indireta para fins exclusivos desta pesquisa, mas somente aquelas previstas para o diagnóstico e tratamento dos sujeitos da pesquisa. As amostras biológicas a serem utilizadas serão provenientes de procedimentos cirúrgicos prescritos para os casos com diagnóstico clínico e anatomopatológico de câncer de pênis. A coleta dos fragmentos de tumor não implicará em riscos adicionais no tratamento ou na cirurgia, e nem tampouco, em aumento no tempo de operação ou extensão da mesma. Sob o aspecto emocional, os pacientes serão informados pela equipe médica, que sua participação na pesquisa não terá nenhuma influência sobre seu tratamento, de modo que eles devem se sentir livres para escolher entre participar ou não da pesquisa. Assim, é garantida a continuidade do acompanhamento, tratamento, assistência integral e orientação dos pacientes independentemente destes concordarem ou não em participar da pesquisa.

É garantida a manutenção do sigilo e da privacidade dos participantes da pesquisa durante todas as fases da pesquisa. Todos os dados da paciente são absolutamente confidenciais e, portanto, serão comunicados somente à paciente ou ao médico que a acompanha. As amostras biológicas, bem como as informações clínico-laboratoriais serão codificadas para registro em programa computacional específico, cuja acesso somente é possível através de senha de identificação única. Os resultados das análises genéticas para fins de divulgação científica sempre serão feitos considerando-se o grupo amostral, e não individualmente. Esses procedimentos garantem a confidencialidade e a privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização dos participantes da pesquisa, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de auto estima, de prestígio e/ou de aspectos econômico-financeiros, conforme previsto na resolução nº466, de 12 de dezembro de 2012.

Benefícios:

O material biológico será processado para análise de alterações moleculares e este trabalho deverá produzir resultados que não beneficiarão diretamente o sujeito da pesquisa, mas contribuirá para produção de conhecimento sobre a patologia para futuras investigações sobre possíveis marcadores genéticos moleculares diagnósticos e prognósticos. Os resultados obtidos nesta pesquisa serão comparados aos já existentes na

literatura científica e serão tornados públicos, sejam eles favoráveis ou não.

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho
 Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética CEP: 65.080-040
 UF: MA Município: SAO LUIS
 Telefone: (98)3272-8708 Fax: (98)3272-8708 E-mail: cepufma@ufma.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MARANHÃO/MA**



c Continuação do Parecer: 1.308.275

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa esta muito bem elaborada com um forte referencial teórico bons objetivos excelentes materiais e métodos, e demais elementos necessários ao bom andamento do projeto de pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados e estão de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

Recomendações:

Todas as recomendações foram acatadas e corrigidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram acatadas ou esclarecidas e corrigidas pela pesquisadora e estão de acordo com a resolução 466/12 do CNS.

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_DO_PROJETO_246615.pdf	29/10/2015 15:48:44		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTALIME.pdf	29/10/2015 15:46:25	SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTAGYLEANES.pdf	29/10/2015 15:46:04	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTALABGEM.pdf	29/10/2015 12:37:35	SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CARTALabimunofisiologia.pdf	29/10/2015 12:31:36	SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTAAAnaPaula.pdf	29/10/2015 12:29:12	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaMartaBelfort.pdf	29/10/2015 12:23:47	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTALEUDIVAN.pdf	29/10/2015 12:23:15	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Outros	RESPOSTAAOPARECERcapeniano.pdf	28/10/2015 19:20:31	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Outros	FichaSujeitodapesquisa.pdf	28/10/2015 18:57:15	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito
Declaração de Instituição e	Anuenciainstituicao.pdf	28/10/2015 18:56:25	SILMA REGINA FERREIRA	Aceito

Endereço: Avenida dos Portugueses, 1966 CEB Velho
 Bairro: Bloco C, Sala 7, Comitê de Ética CEP: 65.080-040
 UF: MA Município: SAO LUIS
 Telefone: (98)3272-8708 Fax: (98)3272-8708 E-mail: cepufma@ufma.br

Página 04 de 05

Telefone: (98)3272-8708 Fax: (98)3272-8708 E-mail: cepufma@ufma.br

Página 05 de 05

ANEXO B

	ESTADO DO MARANHÃO FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIO		Processo UNIVERSAL-00971/17
	IDENTIFICAÇÃO DO OUTORGANTE		
NOME: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA E AO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO (www.fapema.br)			
LEGISLAÇÃO: LEI COMPLEMENTAR Nº 060 DE 31 DE JANEIRO DE 2003.			
ENDEREÇO: Rua Perdizes, nº 05, Qd 37,		BAIRRO / CEP: Jardim Renascença / 65075-340	
RESPONSÁVEL: Alex Oliveira de Souza		CARGO: DIRETOR-PRESIDENTE	
IDENTIFICAÇÃO DO OUTORGADO			
NOME: ANA PAULA SILVA DE AZEVEDO DOS SANTOS			
CPF: 717.120.543-68		IDENTIDADE: 187860120010	
BANCO: Brasil		Nº AGÊNCIA: 0020-5	Nº CONTA: 88119-8
INSTITUIÇÃO: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO			
DEPARTAMENTO: Departamento de Ciências Fisiológicas			
ENDEREÇO: Rua das Siriemas n.16 apt 501		BAIRRO: RENASCENÇA II	CIDADE: SÃO LUÍS
CEP: 65075-390		U.F.: MARANHÃO	FONE FIXO 9323529818
ENDEREÇO ELETRÔNICO: apsazevedo@yahoo.com.br			
IDENTIFICAÇÃO DO AUXÍLIO			
SOLICITAÇÃO: UNIVERSAL-00971/17		VIGÊNCIA: 13/09/2017 a 13/09/2019	
MODALIDADE: UNIVERSAL - APOIO A PROJETO DE PESQUISA - UNIVERSAL		EDITAL: EDITAL FAPEMA Nº 31/2016 - UNIVERSAL	
TÍTULO DO PROJETO: AVALIAÇÃO DE FATORES MOLECULARES E CELULARES EM TUMORES PENIANOS			
ÁREA / SUBÁREA : Ciências Biológicas / GENÉTICA E IMUNOLOGIA			
VALOR DO AUXÍLIO A SER PAGO			
DATA LIMITE - RELATÓRIO TÉCNICO / PRESTAÇÃO DE CONTAS		NÚMERO DE PARCELA(S)	VALOR TOTAL
13/10/2019		02	R\$ 49.281,02

TERMO: 016000/2017