

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular
Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética

TESE DE DOUTORADO

**EXPRESSÃO DE HLA-G E DE SEUS
RECEPTORES EM CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE EM
PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER
RENAL**

Aluna de doutorado: Giovana Cechim
Orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Porto Alegre
Outubro de 2018

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**EXPRESSÃO DE HLA-G E DE SEUS
RECEPTORES EM CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE EM
PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER
RENAL**

GIOVANA CECHIM

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Orientador

Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto

Co-orientador

Porto Alegre

Outubro de 2018

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho contou com o apoio das seguintes agências e instituições:

Agências Financiadoras

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)

Instituição de Origem

Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética - Departamento de Genética

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Instituição Colaboradora

Serviço de Urologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

A minha família Ademar, Libana e Cláudia
pelo amor incondicional a mim dedicados.

“O mais bonito da ciência é que ela nunca tem fim”

Francisco M. Salzano

AGRADECIMENTOS

A Deus e a JC por tudo que sou e tenho.

Aos meus pais, Ademar e Libana, por todo amor e incentivo dedicados a mim de forma excepcional.

A minha irmã, Cláudia, por todo apoio e ajuda.

Aos meus avôs Aloísio e José pelo exemplo de vida e conselhos inesquecíveis.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Artur Bogo Chies, por toda ajuda e compreensão.

Ao Dr. Milton Berger pela colaboração que viabilizou a realização desse projeto.

Aos colegas e amigos do laboratório de Imunogenética Francis, Nadine, Jacqueline, Maria Cristina, Pri Vianna pelos momentos inesquecíveis dentro e fora do laboratório.

Ao colega Rafael Michita por toda ajuda nas coletas.

Aos mais que colegas de lab Joel e Valéria pela ajuda inestimável.

A Anne Martinelli pela amizade e por todo apoio técnico no laboratório.

Aos meus amados primos Clairton e Kiko pela grande ajuda na coleta e análise dos dados.

Aos meus queridos Vergínea e João Paulo por todo apoio emocional.

A Luiza pelos fantásticos conselhos.

Ao estimado Elmo pela ajuda nas questões burocráticas.

A CAPES e a FINEP pelo apoio financeiro.

Um MUITO OBRIGADO a todas as pessoas que literalmente doaram seu sangue para minha pesquisa. Sem a colaboração de vocês nada disso teria sido possível.

A todas as pessoas que ajudaram na realização deste trabalho de forma direta ou indireta.

MUITO OBRIGADO a todos!

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO.	20
2.0	JUSTIFICATIVA	42
3.0	OBJETIVOS.	45
3.1	Objetivo Geral.....	46
3.2	Objetivos Específicos.	46
4.0	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1	Casuística	48
4.2	Critérios de Seleção/Exclusão.....	48
4.3	Processamento das amostras de sangue e diferenciação dos monócitos em células dendríticas <i>in vitro</i>	49
4.4	Avaliação do Fenótipo de Membrana de células por Citometria de Fluxo....	50
4.5	Avaliação dos níveis de citocinas por Citometria de Fluxo	52
4.6	Análises Estatísticas.....	53
5.0	RESULTADOS	54
5.1	Avaliação fenotípica de células imunes de sangue periférico provenientes de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle.	55
5.1.1	Análise de monócitos de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle para a expressão dos receptores de HLA-G.....	58
5.1.2	Análise de linfócitos T de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle para a expressão dos receptores de HLA-G.....	61
5.1.3	Análise de células natural killer de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle para a expressão dos receptores de HLA-G.	64
5.1.4	Análise de linfócitos B de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle para a expressão do receptor de HLA-G.....	67
5.1.5	Análise de células dendríticas plasmocitóides de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle para a expressão dos receptores de HLA-G.	70

5.1.6	Análise do fenótipo de membrana de células dendríticas imaturas de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle.....	73
5.1.7	Análise do fenótipo de membrana de células dendríticas imaturas CD14 positivas de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle.....	74
5.1.8	Análise do fenótipo de membrana de células dendríticas imaturas CD14 negativas de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle.	77
5.1.9	Análise do fenótipo de membrana de células dendríticas maduras de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle.	82
5.2	Artigo Original “ <i>In vitro</i> generation of human monocyte-derived dendritic cells –methodological aspects in a comprehensive review”.....	89
5.3	Increased systemic IL-6 levels indicate inflammation as a determinant component in Renal Cell Carcinoma development.....	129
6.0	DISCUSSÃO	145
7.0	CONCLUSÃO	152
8.0	PERSPECTIVAS.	154
9.0	REFERÊNCIAS	156
10.0	ANEXOS.	171
10.1	Parecer Cosubstanciado do CEP.....	172
10.2	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Controle.....	176
10.3	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Paciente.	178

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCR	C-C receptor de quimiocinas
ccRCC	<i>clear cell Renal Cell Carcinoma</i> / Câncer renal de células claras
CD	<i>Cluster of differentiation</i> / Grupo de diferenciação
CR	Câncer Renal
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein / Antígeno 4 do linfócito T citotóxico
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> / Padrões Moleculares Associados a Danos
DCs	Células Dendríticas
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> / Fator de Crescimento de Colônia de Granulócito e Macrófago
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> / Antígeno Leucocitário Humano
iDC	Células Dendríticas imaturas
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ILT / LIR	<i>Immunoglobulin-Like Transcript</i> / Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor
KIR	<i>Killer Immunoglobulin-like Receptors</i> / Receptor do tipo imunoglobulina da célula NK
LB	Linfócito B
LC	<i>Langerhans Cells</i> / Células de Langerhans
LT	Linfócito T
LPS	Lipopolissacarídeo
mDC	Células Dendríticas maduras

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> / Complexo Principal de histocompatibilidade
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i> / Metaloproteinase Matriz
NK	<i>Natural Killer</i> / Células Assassinas Naturais
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> / Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> / Células Mononucleares do Sangue Periférico
pDC	Células Dendriticas plasmocitóides
PD	<i>Programmed Death</i> / Morte Programada
PD-L	<i>Programmed Death-Ligand</i> / Ligante de Morte Programada
PGE	Prostaglandina E
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i> / Receptores de Reconhecimento de Padrões
SFB	Soro Fetal Bovino
SI	Sistema Imune
TLR	<i>Toll Like Receptor</i> / Receptor do Tipo Toll
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> / Fator de Necrose Tumoral
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> / Factor de Crescimento Endothelial Vascular
VHL	<i>Von Hippel-Lindau</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Ilustração das fases descritas pela teoria da imunoedição.	33
Figura 2-	Representação do gene HLA-G e das isoformas das proteínas codificadas por ele.....	38
Figura 3-	Representação esquemática da estrutura dos receptores de HLA-G, LILRB1, LILRB2 e KIR2DL4.....	40
Figura 4-	Gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise dos dados de citometria de fluxo.....	57
Figura 5-	Exemplos de gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise das diferentes populações de monócitos quanto a expressão de receptores de HLA-G.....	59
Figura 6-	Exemplos de gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise das diferentes populações de linfócitos T quanto a expressão do receptor de HLA-G.....	62
Figura 7-	Exemplos de gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise da população de células NK quanto a expressão dos receptores de HLA-G.....	65
Figura 8-	Exemplos de gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise dos linfócitos B quanto a expressão do receptor de HLA-G.	68
Figura 9-	Exemplos de gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise da população de células dendríticas plasmocitóides quanto a expressão dos receptores de HLA-G.	71
Figura 10-	Gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise de marcadores em células dendríticas imaturas.	73
Figura 11-	Exemplos de gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise do fenótipo de membrana das células dendríticas imaturas.....	75

Figura 12- Exemplos de gráficos ilustrando os gates utilizados para a análise do fenótipo de membrana das células dendríticas imaturas.	78
Figura 13- Gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise da expressão de marcadores em células dendríticas maduras.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Classificação conforme características do tumor primário.....	28
Tabela 2-	Classificação de acordo com as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza.....	28
Tabela 3-	Classificação segundo a presença ou ausência de metástases à distância.	29
Tabela 4-	Anticorpos utilizados para análise celular por citometria de fluxo.	51
Tabela 5-	Características clínicas dos indivíduos avaliados por citometria de fluxo.	56
Tabela 6-	Avaliação das diferentes populações de monócitos quanto a expressão de receptores de HLA-G.....	60
Tabela 7-	Avaliação das diferentes populações de linfócitos quanto a expressão do receptor de HLA-G.....	63
Tabela 8-	Avaliação das células NK quanto a expressão de receptores de HLA-G.....	66
Tabela 9-	Avaliação da população de linfócito B quanto a expressão do receptor de HLA-G.....	69
Tabela 10-	Avaliação da população de células dendríticas plasmocitóides quanto a expressão de receptores de HLA-G.....	72
Tabela 11-	Avaliação do fenótipo de membrana da população de células CD14 positivas provenientes de culturas de células dendríticas imaturas geradas <i>in vitro</i> a partir de monócitos.....	76
Tabela 12-	Avaliação do fenótipo de membrana da população de células CD14 negativas provenientes de culturas de células dendríticas imaturas geradas <i>in vitro</i> a partir de monócitos.....	79

Tabela 13-	Avaliação do fenótipo de membrana (marcadores CD80 e CD83), da população de células CD14 negativas provenientes de culturas de células dendríticas imaturas geradas <i>in vitro</i> a partir de monócitos.....	80
Tabela 14-	Avaliação do fenótipo de membrana (marcadores CD80, CD86, HLA-DR, HLA-G, ILT2 e ILT4), da população de células CD14 negativas provenientes de culturas de células dendríticas imaturas geradas <i>in vitro</i> a partir de monócitos.....	81
Tabela 15-	Avaliação do fenótipo de membrana (marcadores HLA-DQ, HLA- G, ILT2 e ILT4), da população de células CD14 positivas provenientes de culturas de células dendríticas maduras geradas <i>in vitro</i> a partir de monócitos.....	85
Tabela 16-	Avaliação do fenótipo de membrana (marcadores HLA-DQ, HLA- DR, HLA-G, ILT2 e ILT4), da população de células CD14 negativas provenientes de culturas de células dendríticas maduras geradas <i>in vitro</i> a partir de monócitos.....	86
Tabela 17-	Avaliação do fenótipo de membrana (marcadores CD80 e CD83), da população de células CD14 negativas provenientes de culturas de células dendríticas maduras geradas <i>in vitro</i> a partir de monócitos.....	87
Tabela 18-	Avaliação do fenótipo de membrana (marcadores CD80, CD86, HLA-DR, HLA-G, ILT2 e ILT4), da população de células CD14 negativas provenientes de culturas de células dendrítica maduras geradas <i>in vitro</i> a partirde monócitos.....	88

RESUMO

Os tumores renais correspondem a 3% das neoplasias que acometem os seres humanos e apesar de representarem uma parcela pequena dentro do universo do câncer, sua incidência vem aumentando a cada ano. A inter-relação entre câncer e sistema imune já vem sendo há muito descrita e diversos estudos vem demonstrando que o sistema imune, em muitas situações, pode atuar como um promotor da neoplasia ao sustentar processos inflamatórios crônicos e ao contribuir para a seleção de células tumorais com baixa imunogenicidade.

O processo de apresentação antigênica realizado pelas células dendríticas constitui o passo inicial da geração da resposta imune adaptativa anti-tumoral. Nesse contexto, as moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade, particularmente o HLA-G, vem ganhando a atenção dos cientistas, pois apesar das funções do HLA-G no ambiente tumoral ainda não estarem completamente compreendidas, essa molécula parece favorecer uma tolerização do tumor pelas células do sistema imunes. Considerando que diversos tumores induzem a expressão das moléculas de HLA-G e de seus receptores como uma estratégia de evasão do sistema imunológico, é possível considerar que esse estado de tolerância possa ser revertido por intervenções imunoterapêuticas. A identificação e o conhecimento dos mecanismos envolvidos nos processos de tolerização tumoral, poderão ser utilizados em abordagens corretivas não só para o tratamento de tumores renais, mas também para diversas outras neoplasias.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo contribuir para a compreensão dos processos de evasão tumoral da resposta imune através da investigação das funções da molécula de HLA-G e de seus receptores na patogênese do câncer renal, bem como avaliar a presença de fatores pró-inflamatórios que também podem contribuir para a promoção e o desenvolvimento de neoplasias renais.

Os resultados obtidos indicam níveis significativamente elevados da citocina pro-inflamatória IL-6 em pacientes portadores de câncer renal em comparação aos

indivíduos controle. Tal resultado, pode ser um indicativo do papel promotor dessa citocina na patologia do câncer renal.

Na avaliação das células imunes, foi possível observar, nos pacientes de câncer renal, um aumento significativo no número de linfócitos T, tanto CD4 quanto CD8 positivos, que expressavam o receptor de HLA-G, ILT2. Isso pode ser um indicativo de que tais células estão mais suscetíveis a regulação negativa via HLA-G, sendo essa molécula um mecanismo de evasão tumoral em câncer renal.

ABSTRACT

Renal tumors correspond to 3% of the neoplasms that affect the human beings and although they represent a small portion within the universe of the cancer, their incidence is increasing every year. The interrelationship between cancer and the immune system has long been described and several studies have demonstrated that the immune system, in many situations, can act as a promoter of the neoplasm by sustaining chronic inflammatory processes and contributing to the selection of tumor cells with low immunogenicity.

The antigen presentation process performed by dendritic cells is the initial step in the generation of the anti-tumor adaptive immune response. In this context, the molecules encoded by the major histocompatibility complex, particularly HLA-G, have been gaining the attention of scientists, because although the HLA-G functions in the tumor environment are still not fully understood, this molecule appears to favor tumor tolerance by the immune system. Considering that several tumors induce the expression of HLA-G molecules and their receptors as a strategy of immune system evasion, it is possible to consider that this state of tolerance can be reversed by immunotherapeutic interventions. The identification and knowledge of the mechanisms involved in tumor tolerance processes can be used in corrective approaches not only for the treatment of renal tumors but also for several other neoplasms.

The aim of the present work was to contribute to the understanding of the tumor evasion processes from the immune response by investigating the functions of the HLA-G molecule and its receptors in the pathogenesis of renal cancer, as well as to evaluate the presence of pro-inflammatory factors that may also contribute to the promotion and development of renal neoplasms.

The results obtained indicate significantly elevated levels of IL-6 pro-inflammatory cytokine in patients with renal cancer compared to control subjects. Such a result may be an indicative of the role of this cytokine in the pathology of renal cancer. In the evaluation of immune cells, it was possible to observe, in renal

cancer patients, a significant increase in the number of CD4 and CD8 positive T lymphocytes expressing the HLA-G receptor, ILT2. This may be an indication that such cells are more susceptible to HLA-G negative regulation, which is a mechanism of tumor evasion in renal cancer.

1- INTRODUÇÃO

1.1 – Sistema Imune

O sistema imune (SI) desempenha diversas funções no organismo humano, como o reconhecimento do próprio e do não próprio, a identificação e eliminação de patógenos e o monitoramento e a manutenção da homeostasia (Abbas et al., 2011). Para que tais funções sejam desempenhadas apropriadamente diferentes populações celulares interagem de maneira complexa dando origem a diversos padrões de resposta. De modo geral, pode-se dividi-las em respostas inatas e respostas adaptativas. Enquanto as primeiras são consideradas como inespecíficas, as adaptativas caracterizam-se por sua especificidade e memória. Entretanto, para que a homeostasia do organismo seja mantida, torna-se necessário que os dois tipos de resposta trabalhem conjuntamente, muitas vezes sendo difícil atribuir um determinado fenômeno exclusivamente a um ou outro tipo de resposta. Além do mais, determinados componentes do sistema imune apresentam funções que os colocam claramente na interface entre a resposta inata e a adaptativa. Dentre esses componentes, destacam-se as células dendríticas.

1.1.2- Células Dendríticas (DCs)

As células dendríticas foram identificadas por Steinman e Cohn em 1973, trabalho posteriormente reconhecido com um prêmio Nobel em 2011 devido a sua importância para a ciência (Steinman e Cohn, 1973; Steinman, 2012). As DCs originam-se de precursores hematopoiéticos tanto linfóides quanto mielóides que podem gerar tanto células circulantes como os monócitos, que vão para os tecidos onde podem se diferenciar em DCs imaturas (iDCs), quanto células dendríticas propriamente ditas como as células dendríticas plasmocitóides (Banchereau et al., 2000; Guemnonprez et al., 2002). As DCs se distribuem por todo o organismo, concentrando-se principalmente na interface entre o meio externo e interno, isto é, nas mucosas e na pele característica esta que lhes valeu a identificação como verdadeiras sentinelas do sistema imune (Stockwin et al., 2000; Steinman et al., 2003; Ueno et al., 2007; Randolph et al., 2008; Merad et al., 2013; Worbs et al., 2016).

Apesar de sua grande heterogeneidade fenotípica e funcional, este tipo celular pode ser classificado em dois subtipos principais no ser humano: as DCs mielóides ou convencionais e as DCs plasmocitóides (Naik et al., 2008; Matsui et al., 2009). Também é possível categorizar essas células de acordo com sua localização – pele, pulmões, cérebro, órgãos linfóides - uma vez que sua função está intimamente ligada ao local onde ela se encontra (Wu e Liu, 2007). A partir desta classificação anatômica é possível dividir as DCs em células migratórias que circulam continuamente dos tecidos periféricos para os linfonodos através dos vasos linfáticos aferentes e em DCs residentes que são encontradas nos tecidos e, quando ativadas, migram para os linfonodos drenantes daquele tecido (Randolph et al., 2008; Segura et al., 2012; Merad et al., 2013; Pulendran, 2015).

Nesse sentido, também é comum classificar as DCs em relação a sua habilidade em dirigir a resposta imune através da apresentação diferencial de antígenos ou modulando o sistema imunológico através da secreção de citocinas (Heath e Carbone, 2001; Pulendran, 2015). Nesse caso, dois tipos celulares podem ser identificados: as células dendríticas imaturas e as células dendríticas maduras (mDC). As iDCs se caracterizam por apresentar grande capacidade endocítica/fagocítica, altos níveis de expressão das moléculas de membrana CCR1, CCR5, CCR6 e CD68, altos níveis intracelulares das moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade, baixos níveis de expressão das moléculas de membrana CCR7, CD40, CD54, CD58, CD80, CD86 e CD83, assim como ausência de expressão detectável de DC-LAMP (CD203). Já as mDC, apresentam as características diametralmente opostas as iDCs. Essas características têm impacto direto na função celular e no tipo de interação que as DCs estabelecem com as outras células do sistema imune, interações estas que serão discutidas no decorrer deste trabalho.

Atualmente, vários grupos vêm estudando e classificando as DCs, seus precursores e seus estágios de maturação de acordo com o seu perfil transcricional (Miller et al., 2012; Collin e Bigley, 2018). Estes estudos visam entender como ocorre a regulação do desenvolvimento e da diferenciação dos diferentes subtipos de células dendríticas. Independente da classificação escolhida, a nomenclatura utilizada para descrever as características e os subtipos dessas células envolve os

marcadores de membrana que elas expressam. Embora não haja consenso sobre o perfil completo de marcadores que efetivamente caracterizem uma determinada subpopulação de DCs algumas dessas moléculas de membrana já se tornaram clássicas para categorizar determinados subtipos, como, por exemplo, CD123 para células dendríticas plasmocitóides (pDC) e CD207 para células de Langerhans (LC).

Uma das principais funções das DCs é a apresentação de antígenos para os linfócitos T, através das moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade, dando início a resposta adaptativa. Diversas hipóteses buscam explicar os mecanismos pelas quais a ativação da resposta imune ocorre, sendo que um dos modelos utilizados atualmente propõe que um dano tecidual ou um sinal de perigo, por exemplo, faz com que as iDCs capturem antígenos presentes em seu microambiente. Para que esse processo de reconhecimento de dano tecidual/sinal de perigo ocorra, as DCs apresentam em sua superfície um repertório de receptores de reconhecimento de padrões (PRR – *Pattern Recognition Receptors*) que podem ser associados à dano (DAMPs - *Damage-Associated Molecular Patterns*) ou associados à patógenos (PAMPs - *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Como exemplo, pode-se citar as lecitinas tipo C, os receptores do tipo NOD (NLRs - *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*) e os receptores do tipo toll (TLR). A ativação diferencial desses receptores, nas DCs, promove uma modulação da resposta imune, uma vez que, essa ativação pode atuar como um sinal de maturação para essas células (Geijtenbeek e Kooyk, 2003). Em resposta ao estímulo de maturação, as iDCs migrariam para os órgãos linfoides secundários onde podem apresentar os antígenos capturados aos linfócitos T, iniciando assim uma resposta imune específica (Worbs et al., 2016).

O processo de maturação das DCs caracteriza-se por uma série de modificações como: diminuição da expressão de receptores endocíticos/fagocitários, aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 e CD40, aumento da expressão do marcador de maturação CD83, das moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHCII), do receptor de quimiocina CCR7 bem como secreção

de citocinas pró-inflamatórias (Caux et al., 1994; Zhou e Tedder, 1995; Banchereau e Steinman, 1998; Yanagihara et al., 1998; Banchereau et al., 2000).

Entretanto, no modelo citado, o papel das iDCs na fisiologia do sistema imune ainda não está completamente elucidado. Sabe-se que, em um estado basal, a maioria das DCs presentes em compartimentos periféricos possui um fenótipo imaturo e captura continuamente os antígenos ali presentes (Steinman et al., 2003; Wilson et al., 2004). Porém, devido à baixa expressão de moléculas co-estimuladoras, têm-se proposto que a interação de células T virgens com as iDCs resultaria na indução de tolerância seja de um modo intrínseco à célula T (anergia ou deleção) ou extrínseco (via células T reguladoras ou citocinas), (Steinbrink et al., 1997; Lutz; Schuler, 2002; Steinman et al., 2003; Fehérvári e Sakaguchi, 2004; Sakaguchi, 2004; Probst et al., 2005). Por outro lado, alguns estudos propõem a hipótese de que as mDCs e não as iDCs, estariam envolvidas na indução da tolerância através da estimulação de linfócitos T reguladores (Tregs), (Huang et al., 2000; Akbari et al., 2001; Scheinecker et al., 2002; Verhasselt et al., 2004; Barnejee et al., 2006). Outros trabalhos ainda sugerem que diferenças no estímulo de maturação resultariam em diferentes estágios de maturação da DC, induzindo diferentes padrões de resposta de linfócitos T. De fato, moléculas derivadas de produtos bacterianos, como o LPS (lipopolissacarídeo), ou virais, bem como citocinas pró-inflamatórias [TNF- α (fator de necrose tumoral- α) ou mesmo IFN- γ (interferon- γ)] e sinais celulares, como CD40-ligante, promoveriam a produção de citocinas inflamatórias, como a IL-12p70 e IFN- α , pelas DCs, induzindo, preferencialmente, um padrão de resposta do tipo T *helper* 1 (Th1) (Schulz et al., 2000; Vieira et al., 2000). Em contraste, outras moléculas “anti-inflamatórias”, como a IL-10, a prostaglandina E2 (PGE2) e corticosteróides poderiam induzir um padrão de resposta do tipo T *helper* 2 (Th2) (Kalinski et al., 1997; Faries et al., 2001) ou de Tregs (Cools et al., 2007; Li et al., 2007).

Os diversos tipos de resposta resultantes da interação das DCs (seja no estado imaturo quanto no maduro) com os linfócitos T, as torna alvos importantes para a modulação da resposta imune. Em tecidos neoplásicos, é possível observar que as DCs presentes apresentam diversas alterações fenotípicas quando comparadas às DCs obtidas de tecidos não-neoplásicos (Gabrilovich et al., 1997;

Baleeiro et al., 2008). É relevante ainda notar que, de maneira condizente com a presença da neoplasia em um indivíduo imunocompetente, estas alterações não correspondem àquelas que se esperaria encontrar em tecidos onde a ativação funcional das DCs estivesse dando origem a uma resposta adaptativa específica contra antígenos daquele microambiente, mas sim a alterações associadas ao estabelecimento de estados de tolerância aos mesmos antígenos (Nagaraj et al., 2009). Ainda mais intrigante é a observação de que não só as DCs de pacientes com câncer apresentam alterações, mas também DCs geradas *in vitro* a partir de monócitos do sangue periférico dos mesmos pacientes apresentam fenótipo e função alterados (Della Bella et al., 2003; Hasebe et al., 2005; Neves et al., 2005). Desta forma, percebe-se no portador de câncer, uma adaptação recíproca do sistema imune e do tecido neoplásico, embora esse, muitas vezes, expresse antígenos identificados pelo sistema imune do paciente, que acabam sendo por ele tolerados.

1.2.1- Câncer

Atualmente o câncer é uma das principais causas de morte no mundo tendo ocasionado o óbito de 8,8 milhões de pessoas em 2015 (WHO, 2018, Ferlay et al., 2015). Apesar das inúmeras pesquisas voltadas para o tratamento e cura dessa enfermidade, ainda há diversas neoplasias para as quais a chance de recuperação do paciente é muito pequena (WHO, 2012; American Cancer Society, 2018; American Society of Clinical Oncology, 2018). Devido à multifatorialidade dessa doença é importante considerar tanto os fatores genéticos quanto ambientais no desenvolvimento do câncer (Da costa, 2001; Weinberg, 2008; Joosten et al., 2018). Se por um lado em algumas neoplasias os fatores genéticos parecem ser decisivos (como no caso do Retinoblastoma com deleções do gene *pRB* e no câncer renal com a mutação do gene supressor de tumor *VHL*) é também verdade que fatores ambientais vem contribuindo consideravelmente para aumentar a incidência de diversos tipos de câncer (Jones, 2002; Kaelin, 2004; GLOBOCAN, 2012; Jemal et al., 2011). Assim, as campanhas preventivas concentram seus esforços em informar a população sobre os fatores de risco e em como evitá-los.

Entretanto, embora os avanços tecnológicos tenham proporcionado diagnósticos cada vez mais precoces, algumas neoplasias, como o câncer renal, costumam apresentar sintomas apenas quando já se encontram em estado avançado. Como consequência, a realidade dos pacientes portadores de câncer renal é uma gama limitada de opções terapêuticas.

1.2.2 - Câncer Renal (CR)

Os tumores renais correspondem a mais de 3% das neoplasias que acometem os seres humanos e apesar de representarem uma parcela pequena dentro do universo dos diferentes tipos de câncer, sua incidência vem aumentando a uma taxa de 2 - 4% ao ano (Chow et al., 1999, Ferlay et al., 2015; Hsieh et al., 2017). Os principais fatores apontados como de risco para o seu desenvolvimento são: fumo (aumento de risco em 50% para homens e 20% para mulheres), obesidade (24 – 34% para cada 5 Kg/m² acima do índice de massa corporal normal) e hipertensão (Rini et al., 2009; Chow et al., 2010). O pico de incidência ocorre entre a 5^a - 7^a décadas de vida e atinge o sexo masculino em uma proporção 1,5– 2 vezes maior que o sexo feminino (European Association of Urology, 2012).

O CR pode apresentar sintomas como sangue na urina, dor costovertebral além da presença de massa palpável no flanco, sintomas estes conhecidos como tríade clássica (Devita et al., 2011). Além disso, 20 - 30% dos pacientes desenvolvem sintomas paraneoplásicos como hipertensão, perda de peso, febre e anormalidade da função hepática (Sacco et al., 2009). Visto que muitas vezes as neoplasias renais não manifestam sintomas, 20 – 30% dos pacientes já apresentam metástases quando do diagnóstico (Rini et al., 2009; Ricketts e Linehan, 2018; Turajlic et al., 2018). Nos casos de tumores metastáticos, a sobrevida em cinco anos é de 10 - 25%, ou seja, bastante inferior em comparação a pacientes com tumores malignos localizados, cuja sobrevida em cinco anos é de mais de 90% (Motzer et al., 1999).

Há diversos sistemas de classificação para o CR. Um dos mais completos é a classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (WHO) que utiliza critérios patológicos e genéticos (Fuhrman et al., 1982; Bruder et al., 2004). O

subtipo mais frequente é o chamado carcinoma renal de células claras (ccRCC) que corresponde a 70 – 90% dos casos. O segundo subtipo mais frequente (10 – 15%) é o carcinoma papilar e em seguida tem-se o carcinoma renal cromóforo (4 - 5%) e os subtipos mais raros como o carcinoma dos ductos coletores e tumores não classificáveis que correspondem a 1% dos casos (Oosterwijk et al., 2011; Moch, 2012). Outro sistema de classificação de suma importância é o sistema TNM para o estadiamento de tumores malignos que foi desenvolvido por Pierre Denoix e atualmente é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), (Denoix, 1946; <https://www.uicc.org/resources/tnm>; <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/tnm2.pdf>). Este sistema, ilustrado nas Tabelas 1, 2 e 3, baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, de zero a quatro para as características do tumor primário, de zero a três para N e de zero ou um para M. Além das graduações numéricas, as categorias T e N podem ser sub classificadas em graduações alfabéticas (a, b, c). Tanto as graduações numéricas como as alfabéticas expressam o nível de evolução do tumor e dos linfonodos comprometidos. O símbolo "X" é utilizado quando uma categoria não pode ser devidamente avaliada. Quando as categorias T, N e M são agrupadas em combinações pré-estabelecidas ficam distribuídas em estágios que, geralmente, variam de I a IV. Estes estágios podem ser sub classificados em A e B, para expressar o nível de evolução da doença. A classificação clínica designada TNM (ou cTNM), tem por base as evidências obtidas antes do tratamento. A classificação patológica (classificação histopatológica pós-cirúrgica), designada pTNM, tem por base as evidências conseguidas antes do tratamento, complementadas ou modificadas pelas evidências adicionais obtidas através da cirurgia e do exame histopatológico. Os dados que serão apresentados em nosso trabalho experimental se referem à classificação pTNM.

Tabela 1 – Classificação conforme características do tumor primário.

T	Fator avaliado: Tumor Primário.
TX	Tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Não há evidência de tumor primário.
T1	Tumor com 7 cm ou menos em sua maior dimensão, limitado ao rim.
T1a	Tumor com 4 cm ou menos.
T1b	Tumor com mais de 4 até 7 cm.
T2	Tumor com mais de 7 cm em sua maior dimensão, limitado ao rim.
T3	Tumor que se estende às grandes veias ou que invade diretamente a suprarenal ou os tecidos perirrenais, porém aquém da fáscia de Gerota.
T3a	Tumor que invade diretamente a suprarenal ou os tecidos perirrenais ¹ , porém aquém da fáscia de Gerota.
T3b	Extensão macroscópica do tumor à(s) veia(s) ² renal(is) ou à veia cava, ou à sua parede, abaixo do diafragma.
T3c	Extensão macroscópica do tumor à veia cava, ou à sua parede, acima do diafragma.
T4	Tumor que invade diretamente além da fáscia de Gerota (inclusive extensão contígua à suprarenal ipsilateral).

Notas: 1 - Inclui a gordura da cavidade renal (peripélvica). 2 - Inclui ramificação segmentar (músculo-contido).

Tabela 2 – Classificação de acordo com as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza.

N	Fator avaliado: Linfonodos Regionais.
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0	Ausência de metástase em linfonodo regional.
N1	Metástase em um único linfonodo regional.
N2	Metástase em mais de um linfonodo regional.

Tabela 3 – Classificação segundo a presença ou ausência de metástases à distância.

M	Fator avaliado: Metástase à distância.
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada.
M0	Ausência de metástase à distância.
M1	Metástase à distância.

Embora, a maioria dos casos de CR pareça ocorrer de maneira esporádica, observa-se que aproximadamente 3% dos casos são de origem hereditária (Morris e Latif, 2017; Carlo et al., 2018; Maher, 2018). Diversas síndromes genéticas estão associadas com um risco aumentado para o desenvolvimento de carcinoma renal (Linehan et al., 2010; Bausch et al., 2013). Os portadores de translocações no cromossomo 3 e da síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL), por exemplo, apresentam um aumento no risco estimado de desenvolver ccRCC de aproximadamente 70% (Maher, 2018). Estudos indicam que a perda do braço curto do cromossomo 3 é o primeiro evento no desenvolvimento do ccRCC. A alteração mais comum (em 43% dos casos) é uma translocação desequilibrada entre o cromossomo 3 e cromossomo 5 com cromotripsia (Zbar et al., 1987; Ricketts e Linehan, 2018). Já no caso da síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL) tem-se o envolvimento do gene *VHL*, que é um gene supressor tumoral, e o seu produto, a proteína Von Hippel-Lindau (pVHL), (Gossage et al., 2015). Um dos alvos da ação da pVHL são as subunidades α dos fatores de transcrição induzidos por hipóxia HIFs (HIF-1a e HIF-2a, também conhecidos como EPAS1) e embora a correlação entre a desregulação das HIFs e o CR ainda não esteja completamente estabelecida, estudos sugerem que a ativação das HIFs seja um passo necessário para a oncogênese do CR, o que sugere um papel crucial dos genes de resposta a hipóxia (Kondo et al., 2002; Gossage e Eisen, 2010; Schödel et al., 2016).

Com relação ao tratamento das neoplasias renais, usualmente, a primeira etapa é a remoção cirúrgica. Em tumores localizados, a cirurgia pode inclusive

promover a cura e preservar parcialmente o órgão (Rini et al., 2009). Entretanto, para tumores metastáticos, além da cirurgia são necessárias terapias adjuvantes (Carlo et al., 2016; Steeg, 2016; Atkins et al., 2017; Joosten et al., 2018). É importante salientar que o CR se caracteriza pela baixa resposta à quimioterapia após a cirurgia obrigando, assim, os pacientes a buscar novas formas de tratamento (Rini et al., 2009; Devita et al., 2011; European Association of Urology, 2012; Fukumura et al., 2018).

Na literatura é possível encontrar relatos de casos sobre regressão espontânea do tumor e também regressão de metástases após a remoção cirúrgica do tumor primário (Snow e Schellhammer, 1982; Lokich, 1997). Embora raros (menos de 1%), esses casos veem sendo relacionados à resposta imune anti-tumoral tanto pelo aumento do número de linfócitos T específicos contra antígenos tumorais, quanto pela atividade das células NK (*Natural Killer*), (Kawai, 2004; Ricci e Cerchiari, 2010). Tais ocorrências indicam uma importante participação do sistema imune no combate ao CR (Devita et al., 2011).

Devido às evidências da ativa participação do sistema imune no combate à neoplasia renal, desde 1984 a utilização de citocinas, como a interleucina-2 (IL-2), passou a constituir uma alternativa terapêutica para esses pacientes (Rosenberg et al., 1987; Devita et al., 2011; Rosenblatt e Mcdermott, 2011). Estudos demonstraram resposta clínica em 16% dos pacientes além do tempo livre da doença ter alcançado a marca de mais de dez anos para 7 – 9% desses pacientes. Entretanto, os altos índices de toxicidade da IL-2 ainda constituem um forte entrave para a utilização desse agente. Já o IFN- α também aparece como outra citocina terapêuticamente usada com ação anti-tumoral nos casos de câncer renal, embora, como agente único, resultados de grandes estudos tenham gerado dados controversos (Medical Research Council Renal Cancer Collaborators, 1999; Dunn et al., 2006; Stein, 2012).

Atualmente, o padrão ouro de tratamento para o CR é a combinação de drogas imunoterápicas (anticorpos monoclonais humanizados) como agentes anti-angiogênicos e inibidores de *checkpoint* das células imunes (Mahoney et al., 2015; Gharwan e Groninger, 2016; Smyth et al., 2016). Diversos agentes com ação anti-angiogênica são utilizados destacando-se o bevacizumabe (Avastin®) - anti-VEGF

(*Vascular Endothelial Growth Factor*) além do Sorafenibe (Nexavar[®]) e do sunitinibe (Sutent[®]) que atuam como inibidores de tirosinas quinases (Carmeliet e Jain, 2011; Khan e Kerbel, 2018). Já na classe dos agentes inibidores de *checkpoint* das células imunes tem-se os anticorpos contra PD-L1 (*Programmed Cell Death Protein Ligand 1*) que incluem avelumab – nome comercial BAVENCIO[®]- e o atezolizumab - TECENTRIQ[®]. Anticorpos contra a proteína PD-1 (*Programmed Cell Death Protein 1*) como o nivolumab – OPDIVO[®] - e o pembrolizumab –KEYTRUDA[®] como também anticorpos contra a proteína CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4), Ipilimumab – comercializado sob o nome de YERVOY[®] (Mellman et al., 2011). Por mais que a lista de agentes imunoterápicos disponíveis para o tratamento das mais diversas neoplasias venha crescendo rapidamente, muitos pacientes não podem se beneficiar clinicamente desses recursos terapêuticos seja devido aos efeitos colaterais seja em função da refratariedade a essas terapias (Fridman et al., 2017; Chowell et al., 2018). Embora o conhecimento sobre o nosso sistema imune tenha sido enormemente ampliando nos últimos anos, a compreensão sobre os mecanismos de ação dessas drogas, as interações com o microambiente tumoral e o impacto geral promovido pela imunomodulação que elas ocasionam no organismo ainda é pequena, constituindo um grande desafio aos cientistas (Routy et al., 2018).

1.2.3- Câncer e Sistema Imune

A constatação da existência de uma inter-relação entre câncer e sistema imune é antiga e foi primeiramente considerada por Paul Ehrlich em 1909 ao publicar que o sistema imune seria capaz de impedir o crescimento de uma neoplasia (Ehrlich, 1909). Entretanto, somente após algumas descobertas como a da existência de antígenos tumorais específicos que a conceituação dessa relação começou a surgir (Klein, 1966). Burnet em 1957 formulou a hipótese chamada teoria da vigilância imunológica. Para Burnet (Burnet, 1957):

“It is by no means inconceivable that small accumulations of tumour cells may develop and because of their possession of new antigenic potentialities provoke an effective immunological reaction with regression of the tumour and no clinical hint of its existence.”

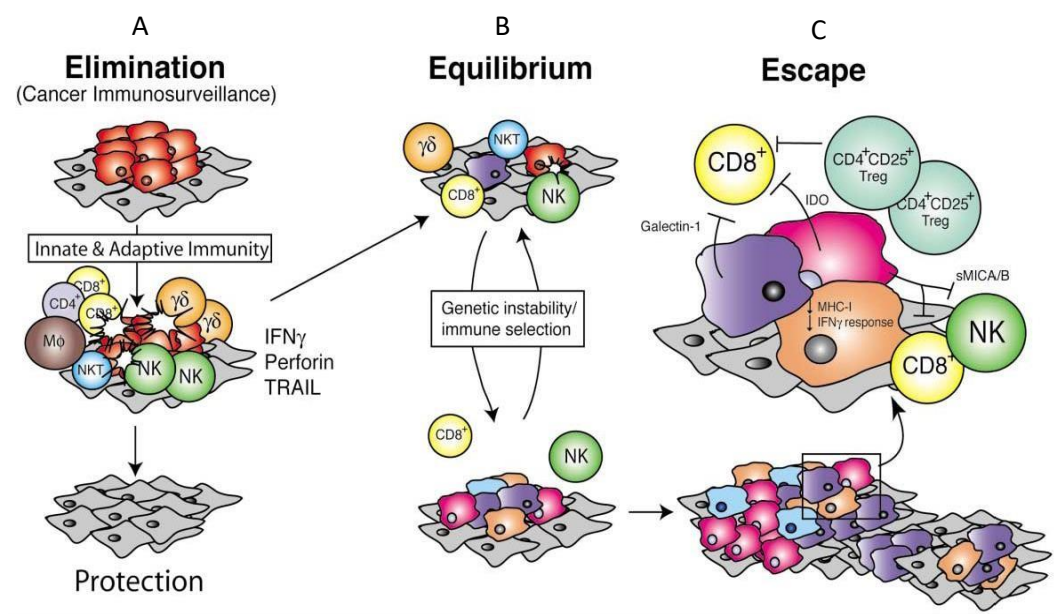
Devido a tais pensamentos, a hipótese foi definida como segue (Burnet, 1970):

“ [...] large, long-lived animals, like most of the warm-blooded vertebrates, inheritable genetic changes must be common in somatic cells and a proportion of these changes will represent a step toward malignancy. It is an evolutionary necessity that there should be some mechanism for elimination or inactivation such potentially dangerous mutant cells and it is postulated that this mechanism is of immunological character [...]”

Entretanto, paradoxalmente, com o avanço das pesquisas na área do câncer, cada vez mais trabalhos vem demonstrando que o sistema imune, em muitas situações, pode atuar como um promotor da neoplasia (Shankaran et al., 2001; Zou, 2006; Reiman et al., 2007; Facciabene et al., 2011) ao colaborar para a seleção de células tumorais de baixa imunogenicidade capazes de promover uma evasão a resposta imune. Devido a tais constatações, atualmente uma das teorias mais aceitas para explicar a inter-relação entre câncer e sistema imune é a teoria da imunoeedição (Schreiber et al., 2004 a,b). Conforme essa teoria, nosso sistema imune vigia constantemente (imunovigilância) o organismo em busca de células que apresentem características diferenciadas das demais e que as tornariam potencialmente perigosas como, por exemplo, a diminuição da expressão de moléculas de classe I codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade. A princípio todas essas células seriam eliminadas – fase de eliminação (figura 1, A), porém algumas dessas células transformadas justamente por possuírem características de baixa imunogenicidade ou de potencial tolerogênico escapariam da eliminação promovida pelo sistema imune e se estabeleceriam – fase de equilíbrio (figura 1, B), se desenvolvendo plenamente e originando tumores

malignos- fase de escape (figura 1, C), (Pardoll, 2003; Zitvogel et al., 2006; Lo Presti et al., 2018).

Figura 1 – Ilustração das fases descritas pela teoria da imunoeedição.



Células normais (representadas por quadrados cinza) ao receberem estímulos oncogênicos (radiação UV, infecção pelo papiloma vírus) podem sofrer transformações, tornando-se células tumorais (representadas em vermelho). Na fase de eliminação, o sistema imune pode erradicar as células transformadas em desenvolvimento e proteger o hospedeiro da formação de tumores) - figura 1,A.. Entretanto, se este processo não for bem sucedido, as células tumorais podem estabelecer um equilíbrio com o sistema imune, onde células variantes tumorais, por possuírem características como baixa expressão das moléculas de classe I codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade, sobrevivem aos mecanismos de eliminação utilizados pelo sistema imune figura 1,B. Essas células tumorais variantes podem multiplicar-se sem que o sistema imune consiga contê-las, tornando-se clinicamente detectável- fase de escape, figura 1,C (Adaptado de Dunn et al., 2002).

A comunicação entre o sistema imune e as células tumorais pode ocorrer basicamente de duas maneiras: a) através do contato célula – célula; b) pela liberação de citocinas, fatores solúveis e vesículas extracelulares (Riteau et al., 2003). É importante ressaltar que geralmente, no microambiente tumoral, a comunicação ocorre de diversas maneiras simultaneamente (De Palma et al.,

2017). A modulação do ambiente por citocinas pode favorecer tanto o crescimento quanto a morte tumoral (Dranoff, 2004; Dunn et al., 2006). Diversos estudos já demonstraram que a inflamação crônica promovida pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, pode atuar como um promotor de alguns tipos de neoplasia, como o câncer uterino e o de estômago (De Visser et al., 2006, Karin e Greten, 2005). Entretanto, para outros tipos de tumores como o melanoma, a resposta inflamatória é desejada, pois esta contribui para a eliminação das células cancerígenas (Grivennikov et al., 2010).

No contexto de contato célula tumoral – célula imune, assim como ocorre em relação às citocinas, também é possível observar efeitos paradoxais. Um exemplo disso é a expressão de MHC I não clássico como o HLA-G (Human leukocyte antigen) pelas células tumorais. Esse processo induz tolerância às células HLA-G positivas quando do reconhecimento dessas moléculas pelas células NK (Cabestré et al., 1999). Um mecanismo de extrema importância para a regulação negativa da resposta anti-tumoral ocorre sobre os linfócitos infiltrantes no tumor. Para a ativação efetiva dos linfócitos T (LT), acredita-se que seja necessária uma sinalização composta por basicamente três sinais. O primeiro sinal consiste no reconhecimento do complexo MHC-peptídeo nas células apresentadoras de antígenos (APC) pelos receptores dos linfócitos T (TCR) específicos para este antígeno (Redmond et al., 2005). O segundo sinal ocorre com a interação de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) expressas pelas APCs com seus respectivos ligantes expressos nos LT (CD28 e CTLA-4) (Young et al., 1992; Guermontprez et al., 2002) e o terceiro sinal envolveria um contato celular direto ou citocinas ativadoras. Na ausência do sinal mediado pelas moléculas co-estimuladoras, os linfócitos podem se tornar anérgicos aos antígenos que estão sendo apresentados, ou podem ser eliminados, ou ainda podem se diferenciar em linfócitos T reguladores – Tregs - (Harding et al., 1992; Redmond et al., 2005; Becker et al., 2006). A interação APC – LT sem a sinalização completa, invariavelmente vai ocasionar uma desarticulação da resposta imune contra o tumor.

1.2.4- Câncer e inflamação

Atualmente o processo inflamatório é considerado um dos principais marcadores da biologia do câncer (Hanahan e Weinberg, 2011). A inflamação, em diversos tipos de neoplasia, e inclusive no CR, está relacionada com a promoção da proliferação e da sobrevivência de células tumorais, da formação de metástases bem como subversão da resposta imune (Mantovani et al., 2008; Grivennikov et al., 2010; Trinchieri, 2012). Diversos tipos tumorais apresentam abundância de células infiltradas e citocinas pró-inflamatórias em seus microambientes que em muitas neoplasias, assim como no CR, representam um fator prognóstico ruim para o paciente (Lin e Karin, 2007; Mantovani et al., 2008 Yoshida et al., 2002; Cuadros et al., 2014). Além disso, diversos estudos vêm demonstrando um aumento da capacidade de invasão das células tumorais quando em presença de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6. Essas citocinas parecem estimular uma remodelação tecidual através da regulação de proteínas de membrana como a E-caderina (importante molécula de adesão celular) bem como um aumento na produção e atividade das enzimas metaloproteinases (MMP), proteínas essas que estão envolvidas com a formação de metástases (Xie et al., 2004; Sullivan et al., 2009; Elinav et al., 2013; Cathcart et al., 2016).

Apesar da ação das citocinas ser restrita ao microambiente aonde foram secretadas, altos níveis sistêmicos podem ser encontrados em pacientes com câncer e apresentam relação com a progressão tumoral (Mantovani et al., 2008). Diversos trabalhos demonstraram que pacientes com CR apresentam níveis sistêmicos aumentados da citocina IL-6, fato associado a um prognóstico ruim uma vez que essa citocina pode promover a ativação de fatores de transcrição como STAT3 e NF- κ B além de aumentar a transcrição de HIF1 α e *VEGF* que colaborariam diretamente para a progressão tumoral (Yu et al., 2009; Santoni et al., 2015; Taniguchi e Karin., 2018).

1.3.1- Complexo Principal de Histocompatibilidade

O complexo principal de histocompatibilidade - *Major Histocompatibility Complex* - MHC, foi descoberto nas décadas de 1930 - 50. Peter Gorer e George Snell observaram que, diferentemente da rejeição observada em experimentos de enxerto de pele entre animais geneticamente diferentes, enxertos entre animais geneticamente idênticos não levavam à rejeição (Abbas et al., 2011). A capacidade de reconhecimento do próprio e do não próprio é uma característica essencial para que o sistema imune execute adequadamente suas funções e, nesse contexto, as moléculas que compõem o MHC participam ativamente apresentando às células imunes moléculas que serão reconhecidas como próprias ou não.

Em seres humanos os genes que codificam o complexo principal de histocompatibilidade estão localizados no braço curto do cromossomo 6 ocupando um grande segmento de DNA. O *locus* do MHC se estende por aproximadamente 3500 quilobases, ou seja, ocupa cerca de 4 centimorgans e contém mais de 200 genes. Esse conjunto de genes é um dos mais polimórficos entre os mamíferos e pode ser dividido em três classes principais: classe I, classe II e classe III (Mackay e Rosen, 2000; Abbas et al., 2011). Em humanos existem sete genes do MHC da classe I denominados *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-E*, *HLA-F*, *HLA-G* (figura 2A) e *HLA-H* que codificam moléculas nominadas da mesma forma. Os genes *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C* e as moléculas codificadas por eles, são classificados de classe I clássicos, enquanto os genes *HLA-E*, *HLA-F*, *HLA-G* e *HLA-H* e as moléculas codificadas por eles são classificados de classe I não clássicos. As moléculas de classe I clássicas são expressas na maioria das células do corpo humano, enquanto que as não clássicas apresentam uma distribuição limitada a determinados tipos celulares.

Há cinco genes do MHC de classe II: *HLA-DP*, *HLA-DQ* e *HLA-DR* - clássicos - e *HLA-DM* e *HLA-DO* - não clássicos. As moléculas codificadas pelos genes clássicos são expressas na superfície da membrana celular das células apresentadoras de antígenos que compreendem as células dendríticas, os macrófagos e os linfócitos B e T ativados. Já as moléculas *HLA-DM* e *HLA-DO*, que

são codificadas pelos genes de mesmo nome, encontram-se em compartimentos internos das APCs atuando no processamento de antígenos.

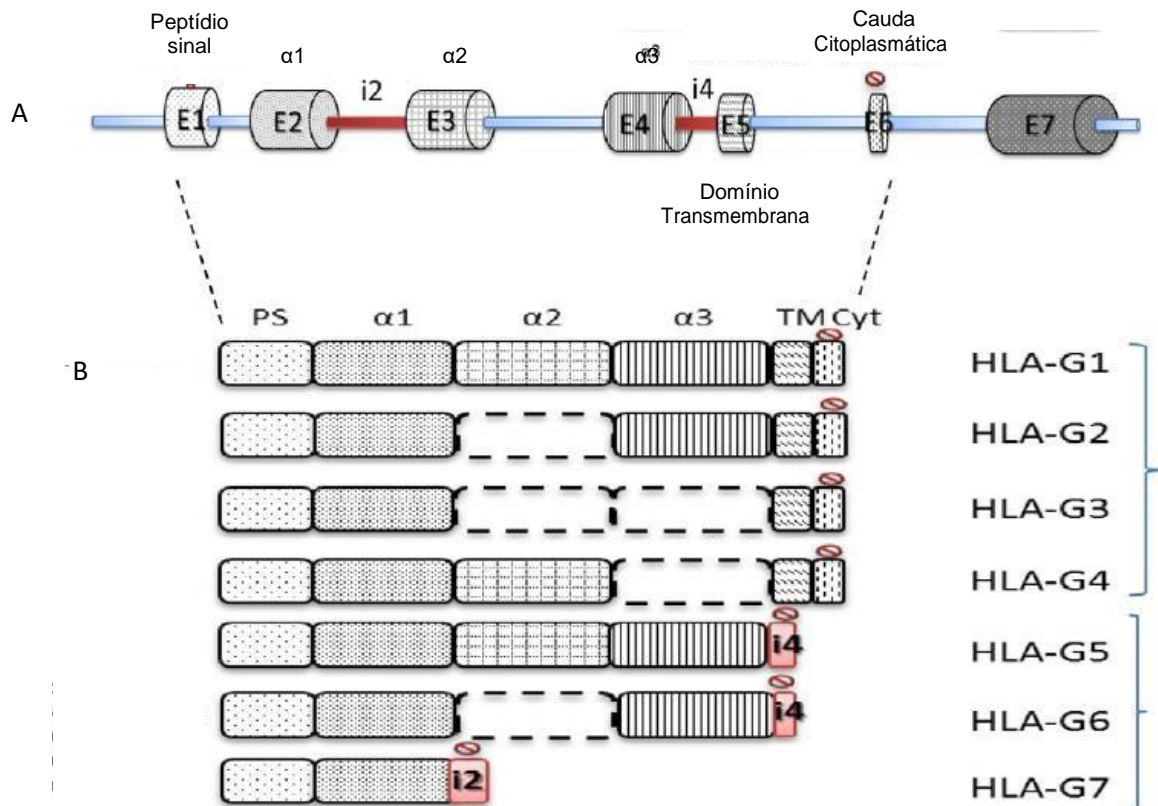
Diferentemente das moléculas de classe I e II codificadas pelo MHC, as moléculas de classe III não são proteínas de membrana e não estão relacionadas diretamente à apresentação antigênica embora participem do sistema imune. As moléculas codificadas pelos genes de classe III incluem diversas proteínas do sistema complemento como C2, C4a, C4b e fator H, além de citocinas inflamatórias, TNF- α e β e proteínas de choque térmico (Abbas et al., 2011).

1.3.2- Antígeno Leucocitário Humano - G (HLA-G)

A molécula de HLA-G apresenta uma expressão restrita à alguns tecidos. Em condições fisiológicas, a sua expressão ocorre em células do trofoblasto fetal, córneas, ilhotas pancreáticas, timo, precursores eritroides e endoteliais e em células-tronco mesenquimais (Carosella et al., 2015).

De acordo com *WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA-system* existem 56 alelos *HLA-G* que codificam 18 diferentes proteínas (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>). O transcrito primário de HLA-G gera sete diferentes RNA mensageiros por *splicing* alternativo, sendo que quatro codificam moléculas ligadas à membrana (HLA-G1, -G2, -G3, -G4) e três codificam moléculas solúveis (HLA-G5, -G6, -G7) - figura 2B.

Figura 2 – Representação do gene *HLA-G* e das isoformas das proteínas codificadas por ele.



⊘ Códon de parada (stop codon)

Representação esquemática do gene *HLA-G* (figura 2A). Representação esquemática das isoformas das proteínas formadas por *splicing* alternativo do gene *HLA-G* (figura 2B). (Adaptado de Carosella et al., 2015).

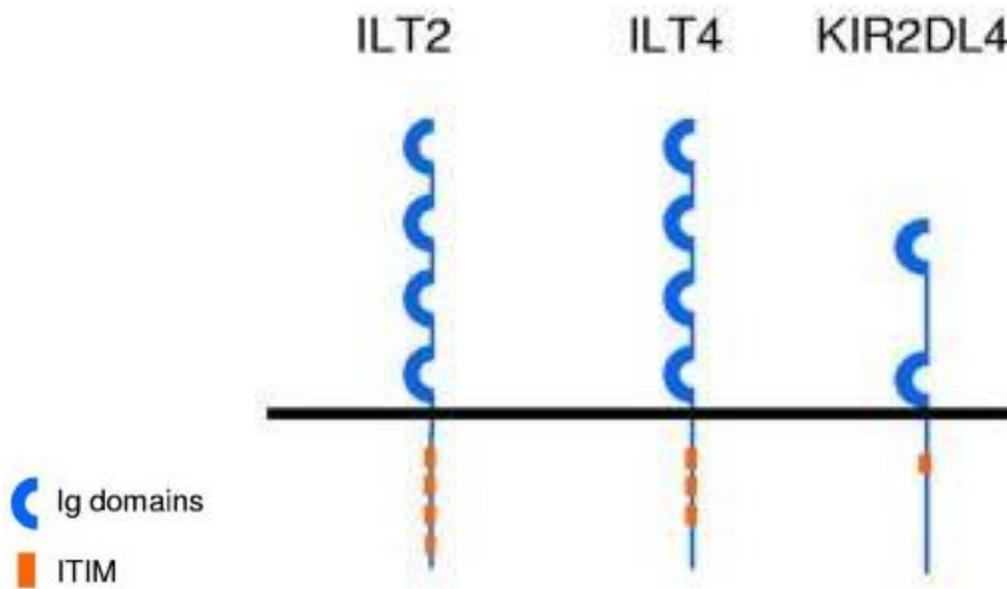
O HLA-G foi primeiramente descrito na interface materno-fetal onde, a sua forma solúvel (sHLA-G), desempenha um papel fundamental para a não rejeição do feto pela mãe (Ellis et al., 1987; Trowsdale e Betz, 2006). Além disso, o HLA-G parece exercer funções regulatórias do sistema imune, não estando envolvido com apresentação antigênica (Larsen, 2009). Diversos estudos sobre transplante de órgãos demonstram que uma expressão aumentada de HLA-G pelo enxerto está associada a uma maior aceitação do transplante e, conseqüentemente, ao aumento

da tolerância do receptor ao órgão transplantado (Poláková et al., 2015). Porém, também é possível observar a expressão dessa molécula em condições patológicas, como em doenças auto-imunes, doenças inflamatórias, infecções virais e, principalmente, em diversos tipos de neoplasias, como melanoma, câncer renal, câncer de pulmão e linfomas de células T (Lemaoult et al., 2005; Hu et al., 2010; Carosella et al., 2015). Há, inclusive, relatos de ascite (líquido na cavidade abdominal) ricos em HLA-G solúvel em neoplasias de ovário (Pistoia et al., 2007). As funções do HLA-G no ambiente tumoral ainda não estão completamente estabelecidas, mas alguns estudos apontam que sua expressão seja na superfície tumoral, seja na forma solúvel, no plasma dos pacientes, é um fator prognóstico ruim (Rouas-Freiss et al; 2014).

Um fenômeno importante para as funções do HLA-G é a trogocitose. Esse processo ocorre por contato direto entre células e promove troca de pedaços de membrana bem como de moléculas associadas entre as células que estão interagindo. Huang e colegas (Huang et al; 1999), descreveram primeiramente esse fenômeno em murinos onde células T adquiriram moléculas de MHC de APCs após a interação célula-célula. Entretanto, diversos trabalhos descreveram essa transferência de fragmentos de membrana contendo HLA-G de células tumorais para NKs, monócitos e células T (Caumartin et al., 2010; HoWangYin et al., 2010; Brown et al., 2012 a). É importante considerar, que as moléculas transferidas nesse processo permanecem funcionais, assim, a transferência de HLA-G para células do sistema imune, constitui um importante mecanismo de regulação (Brown et al., 2012 a,b).

Atualmente são conhecidos 5 receptores de HLA-G em humanos: LILRB1 (LIR1 ou ILT2 ou CD85J), LILRB2 (LIR2 ou ILT4 ou CD85D), KIR2DL4, CD8 e CD160. Entretanto, nesse estudo, somente os receptores LILRB1, LILRB2 e KIR2DL4 foram considerados.

Figura 3- Representação esquemática da estrutura dos receptores de HLA-G, LILRB1, LILRB2 e KIR2DL4.



(Adaptado de Carosella et al., 2011)

Os receptores ILT2 e ILT4 pertencem a família de receptores LILR (*Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor*). Os receptores LILRB caracterizam-se por serem glicoproteínas transmembrana do tipo I com domínios extracelulares do tipo *Ig-like* que interagem com seus ligantes. Já na porção citoplasmática, possuem Immunoreceptor Tyrosine-based Inibitory Motif (ITIM) sendo 4 ITIMs em ILT2 e 3 em ILT4. Apesar de ILT2/4 interagirem com moléculas de classe I codificadas pelo complexo principal de histompatibilidade, esses receptores apresentam uma maior afinidade pela molécula de HLA-G, sendo que formas dimerizadas de HLA-G induzem uma sinalização mais eficiente do que moléculas monoméricas quando da interação com ILT2 (Shiroishi et al, 2006 a, b). Além disso, também é descrito que esses receptores competem com CD8 pela ligação do MCHI (Shiroishi et al, 2003). Apesar da expressão fisiológica de HLA-G ser restrita a poucos tipos celulares, seus receptores são expressos por diversas células sanguíneas humanas.

O receptor ILT2 é expresso em monócitos, macrófagos, eosinófilos,

basófilos, células dendríticas, em algumas populações de células T e em grande parte das células B, além das células NK. Já o receptor ILT4 também é expresso em monócitos, macrófagos, basófilos, mastócitos, células dendríticas, células endoteliais, células tronco hematopoiéticas, mas não nas células da linhagem linfóide (Samaridis e Colonna, 1997, Trowsdale et al., 2015, Kang et al., 2016).

As células NK apresentam, também, um receptor próprio de HLA-G: KIR2DL4 (Rajagopalan e Long, 1999). Esse receptor está associado tanto à inibição quanto à ativação das funções citotóxicas dessas células (Borges e Cosman, 2000; Shiroishi et al., 2006). Já os receptores ILT2/4 atuam de maneira inibitória nas células que os expressam.

1.4.1- Câncer e Imunoterapia

Diversos estudos vêm demonstrando que a recuperação do estado de homeostasia e o consequente combate à neoplasia pelo sistema imune é possível através de intervenções imunoterápicas (Fecci et al., 2003; Barbuto et al., 2004; Neves et al., 2005). Dentre as diversas modalidades terapêuticas utilizadas na oncologia, a manipulação do sistema imune configura atualmente uma das mais cobiçadas pelas indústrias farmacêuticas (Imai e Takaoka, 2006; Mellman et al., 2011; Pardoll, 2012; Smyth et al., 2016). O aumento do conhecimento sobre os processos do sistema imune tem chamado a atenção para as inúmeras relações que são estabelecidas entre os tumores e os diferentes componentes desse sistema (Fishelson et al., 2003; Gajewski, 2004; Flavell et al., 2010). Entretanto, para que a imunoterapia aumente seu escopo clínico, é de crucial importância um maior entendimento do funcionamento do sistema imune tanto no seu estado natural quanto em situações de doença, mas, principalmente, o conhecimento da biologia das células dendríticas, astro central na montagem da resposta imune anti-tumoral.

2 - JUSTIFICATIVA

Cada vez mais evidências científicas dão suporte a hipóteses de que tanto o processo inflamatório quanto a evasão do sistema imune são acontecimentos necessários para o estabelecimento e o desenvolvimento de tumores (Mantovani et al., 2008; Grivennikov et al., 2010; Hanahan e Weinberg, 2011; Trinchieri, 2012).

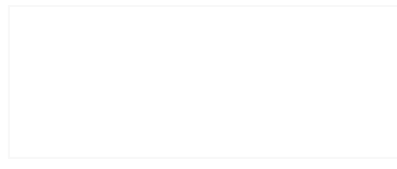
As células do sistema imune apresentam uma gama enorme de receptores que permitem a interação com as mais diversas moléculas e células. Assim, considerando que várias células desse sistema podem expressar tanto os receptores para a molécula HLA-G quanto a própria molécula de HLA-G em suas membranas plasmáticas, é possível hipotetizar que o câncer renal estaria promovendo a tolerização de seus antígenos pelo sistema imune, também, através da modulação da expressão das moléculas HLA-G e de seus receptores.

É válido considerar que o tumor, ao promover um microambiente pró-inflamatório (através da secreção de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo), vai atrair ainda mais células imunes para o seu microambiente. Uma vez que, essas células imunes poderiam ser reguladas de maneira negativa pelo tumor, via HLA-G, por exemplo, poderia se imaginar um microambiente rico em células imunes “desligadas” de suas funções anti-tumorais. Mais ainda, essas células imunes podem não só não combater as células tumorais, como, inclusive, induzir um fenótipo tolerogênico nas suas semelhantes. Assim, ao promover um microambiente inflamatório juntamente com a regulação negativa na função das células imunes, o tumor estaria promovendo sua tolerização perante o sistema que o permitiria crescer e se desenvolver plenamente.

Outro importante ponto a ser considerado é que o primeiro e mais essencial passo na montagem da resposta imune anti-tumoral é o processamento e a apresentação antigênica feito pelas DCs. Desta forma, é razoável considerar que o HLA-G poderia estar atuando sobre essas células, ou, ainda mais, sobre seus precursores sanguíneos, os monócitos, para corromper a resposta imune anti-tumoral e assim se desenvolver plenamente.

Considerando as evidências científicas sobre os fatos supracitados, o presente trabalho teve como objetivo investigar a molécula de HLA-G e de seus receptores na patogênese do câncer renal.

Para tanto, o trabalho apresenta diferentes abordagens: a primeira visa o estudo da expressão das moléculas de HLA-G e de seus receptores em células sanguíneas do sistema imune (monócitos, linfócitos B e T, células dendríticas plasmocitóides, células NK e células dendríticas diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos). A segunda abordagem está relacionada a investigação da contribuição do processo inflamatório para o desenvolvimento e progressão do câncer renal, através da avaliação de diversas citocinas séricas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A).



3- OBJETIVOS

3.1- Geral

Avaliar uma possível correlação entre os níveis de expressão de membrana dos receptores de HLA-G - ILT2, ILT4 e KIR2DL4 - em células sanguíneas de pacientes portadores de câncer renal com o estadiamento da doença. Da mesma maneira, analisar se os níveis sistêmicos de citocinas em pacientes portadores de CR se correlacionam com o desfecho clínico de tais pacientes.

3.2- Específicos

3.2.1- Obter e diferenciar monócitos de portadores de CR e de indivíduos controle em células dendríticas imaturas e células dendríticas maduras.

3.2.2- Obter e caracterizar o fenótipo de membrana das células mononucleares de sangue periférico de pacientes portadores de CR bem como de indivíduos controle, para os receptores de HLA-G - ILT2, ILT4 e KIR2DL4.

3.2.3- Caracterizar o fenótipo de membrana das células dendríticas imaturas e maduras geradas *in vitro* a partir de monócitos de pacientes portadores de CR e de indivíduos controle, para os receptores de HLA-G, ILT2, ILT4 e KIR2DL4.

3.2.4- Avaliar os níveis sistêmicos de citocinas em pacientes portadores de CR bem como de indivíduos controle através da técnica de CBA (Cytometric Bead Array).

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

Este trabalho conta com a aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, (426.290) e da Universidade Federal do Rio grande do Sul (598.874-0). As amostras de sangue de pacientes portadores de câncer renal foram obtidas no setor de urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e as amostras de sangue de doadores saudáveis foram coletadas no departamento de genética da universidade e na Unidade Básica de Saúde-centro, localizada no município de Bom Princípio, após o consentimento expresso dos doadores através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2 Crítérios de Seleção/Exclusão

Para este estudo foram selecionados indivíduos com idade acima de 18 anos, não transplantados, sem histórico de doenças autoimunes nem neoplasias. Os indivíduos incluídos no grupo “Pacientes” foram atendidos no serviço de urologia do HCPA e tiveram diagnóstico de câncer renal confirmado por análise histopatológica da peça realizada pelo serviço de patologia do próprio hospital. A coleta de sangue dos participantes desse grupo foi realizada durante o procedimento cirúrgico para a retirada da lesão renal pelo médico anestesista responsável.

Os indivíduos incluídos no grupo “Controle” foram recrutados através de chamamento de voluntários por contato via redes sociais eletrônicas. A coleta de material dos participantes desse grupo foi realizada por profissional habilitado no Departamento de Genética da UFRGS e na Unidade Básica de Saúde- centro, localizada no município de Bom Princípio.

Impreterivelmente todos os participantes autorizaram a sua participação nesse estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.3 Processamento das amostras de sangue e diferenciação dos monócitos em células dendríticas *in vitro*

Uma fração do sangue coletado dos participantes foi primeiramente centrifugado a 2000 rpm durante 5 min para separação da porção líquida (plasma) que foi armazenada em freezer a -80° C ou em nitrogênio líquido para posterior análise. Para purificação das células mononucleares o sangue foi diluído em solução de Hank's (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) na proporção de 1:1. Assim, 20 mL de sangue diluído foram colocados em tubo plástico cônico de 50 mL sobre 25 mL de Ficoll-Paque Plus® (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). O material foi centrifugado a uma velocidade de 900 g à temperatura de 18 °C por 30 min. A camada de células mononucleares formada foi retirada e colocada em novo tubo cônico de 50 mL para que os procedimentos de lavagem fossem efetuados. Foram feitas 3 lavagens de 10 min cada a 2000 rpm em solução de Hank's. O sedimento resultante foi coletado, quantificado por contagem em câmara de Neubauer e ressuspendido em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (GIBCO). As células foram plaqueadas em placas de 6 poços (TPP, Suíça) em uma concentração final de 1×10^7 células/2mL/poço. As células foram mantidas em estufa com atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ e saturada com água à temperatura de 37°C para aderência das células por 2 h. Após esse período, as células não aderentes foram removidas e a fração aderente foi mantida em cultura por mais 7 dias em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (10 000 U/mL de penicilina, 10 000 µG/mL de estreptomicina) acrescido da citocina IL-4 (PEPROTEC, Rocky Hill, NJ, USA) na concentração final de 50 nG/mL e do fator de crescimento GM-CSF - (PEPROTEC, Rocky Hill, NJ, USA) na mesma concentração para a diferenciação dos monócitos em DCs. No quinto dia de cultura as células foram ativadas pela adição de 500 nG/mL de LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). No sétimo dia as células foram coletadas da placa de cultura e sua viabilidade avaliada após teste de exclusão realizado com azul de Trypan 0,4%

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). As células viáveis foram contadas e ressuspensas em volume de meio de cultura adequado para os ensaios subsequentes.

4.4 Avaliação do Fenótipo de Membrana de células por Citometria de Fluxo

Para avaliação do fenótipo de membrana dos monócitos submetidos ao processo de diferenciação, as células foram coletadas das placas de cultura, em três momentos distintos: duas horas após o plaqueamento (monócitos), no 5º dia da cultura (células dendríticas imaturas) e no 7º dia de cultura (células dendríticas maduras). Já para a análise do fenótipo de membrana das células mononucleares de sangue periférico, uma alíquota de células foi separada após o procedimento de purificação em gradiente de densidade.

As células coletadas foram contadas em câmara de Neubauer e alíquotas de $1 - 2 \times 10^5$ células foram separadas em tubos plásticos de 1,5mL. Cada alíquota, foi lavada por 3 vezes em 250 µL de tampão PBS-BSA (PBS 1X suplementado com 0,5% de soro albumina bovina). As células foram incubadas com soro humano AB durante 10 minutos para bloqueio de sítios inespecíficos. Após o período de incubação, as células foram novamente lavadas e ao sedimento obtido foram adicionados os anticorpos correspondentes aos marcadores de interesse. As células permaneceram incubadas com os anticorpos durante 60 min. ao abrigo da luz em geladeira. Em seguida, as células foram novamente lavadas em 250 µL de tampão PBS-BSA. Por fim, as células foram ressuspensas em 300 µL de PBS-BSA contendo 2% de formaldeído para a fixação das mesmas. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (FACS ARIALL) com o auxílio do *software* DIVA e os dados obtidos foram analisados por meio do *software* Flowjo 7.2.5 (Tree Stars Inc.).

Tabela 4 – Anticorpos utilizados para análise celular por citometria de fluxo.

Molécula alvo	Clone	Isotipo	Fluorocromo	Empresa
CD11c	B-ly6	IgG1, κ	FITC	BD-Bioscience
CD14	M5E2	IgG2a, κ	PE-CY5	BD-Bioscience
CD14	M ϕ P-9	IgG2b, κ	PE	BD-Bioscience
CD14	MØP9	IgG2b, κ	PE-CSF	BD-Bioscience
CD16	3G8	IgG1, κ	PE	BD-Bioscience
CD16	3G8	IgG1, κ	PE-CSF	BD-Bioscience
CD19	HIB19	IgG1, κ	PE	BD-Bioscience
CD25	M-A251	IgG1, κ	APC-H7	BD-Bioscience
CD56	NCAM16.2	IgG2b, κ	PE-CY7	BD-Bioscience
CD80	L307.4	IgG1, κ	APC-H7	BD-Bioscience
CD80	L307.4	IgG1, κ	PE	BD-Bioscience
CD83	HB15e	IgG1, κ	APC	BD-Bioscience
CD85j (ILT2)	GHI/75	IgG2b, κ	FITC	Ex-Bio
CD85d (ILT4)	27D6	IgM	FITC	e-Bioscience
CD86	2331(FUN-1)	IgG1, κ	APC	BD-Bioscience
CD123	9F5	IgG1, κ	PE	BD-Bioscience
CD123	7G3	IgG2a, κ	PE-CY5	BD-Bioscience
CD127	HIL-7R-M21	IgG1, κ	PE	BD-Bioscience
CD158d (KIR2DL4)	181703	IgG2a	PE	RD
HLA-DR	G46-6	IgG2a, κ	PE-CY7	BD-Bioscience
HLA-DR	G46-6	IgG2a, κ	PE-CY5	BD-Bioscience
HLA-DQ	Tu169	IgG2a, κ	FITC	BD-Bioscience
HLA-G	87G	IgG2a	FITC	EXBIO

Tabela de anticorpos monoclonais, indicando a especificidade do anticorpo (molécula), o clone, o isotipo e o fluorocromo utilizados nos experimentos de citometria de fluxo.

4.5 Avaliação dos níveis de citocinas por Citometria de Fluxo

Os níveis de citocinas contidas no sangue periférico dos participantes da pesquisa foram medidos através do kit *Human Th1/Th2/Th17* (CBA - Cytometric Bead Array), (BD Biosciences, San Jose, CA, USA, Catálogo número: 560484). Através desse kit é possível detectar simultaneamente as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A. Para a realização desse ensaio, foi utilizado o plasma dos participantes da pesquisa. As análises das amostras foram feitas conforme instruções do fornecedor do kit. O *software* FCAP Array (BD Biosciences) foi utilizado para avaliar os dados obtidos no citômetro de fluxo (FACS ARIAIII) com o auxílio do *software* DIVA (BD Biosciences).

4.6 Análises Estatísticas

Os dados de fenotipagem das células foram primeiramente, testados para normalidade (distribuição Gaussiana) através dos testes de D'Agostino e Pearson ou Shapiro-Wilk. Para as comparações entre os grupos "Pacientes" e "Controle", foram realizadas análises através do teste t (teste paramétrico para análise dados com distribuição normal) ou teste U de Mann-Whitney (teste não paramétrico para análise de dados sem distribuição normal). Já as comparações envolvendo proporções, foram feitas através do teste de qui-quadrado de Pearson com correção de Yates. Considerando as múltiplas comparações, os valores de p foram corrigidos através do método Benjamini-Hochberg FDR (*False discovery rate*). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

Os dados sobre os níveis de citocinas foram primeiramente analisados para o tipo de distribuição utilizando o teste t não pareado que demonstrou que esses dados apresentam uma distribuição não normal. Devido a isso, utilizaram-se testes

não paramétricos. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para comparações envolvendo três grupos e o teste de Mann-Whitney U para comparações entre dois grupos. Os dados de idade foram analisados com o teste t não pareado, demonstrando uma distribuição normal. Já a proporção de sexo entre os grupos, foi analisada através do teste de qui-quadrado de Pearson com correção de Yates. O valor de $p < 0,05$ foi definido como sendo estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram feitas empregando-se os *softwares* GraphPad Prisma 7.0 (GraphPad Software Inc, USA) e WINPEPI (Abramson, 2011).

6 – DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliou-se a influência da molécula de HLA-G e de seus receptores em células do sistema imune de pacientes portadores de câncer renal. Para tanto, foram utilizadas as técnicas de cultura celular e de citometria de fluxo. O sangue dos participantes do estudo foi processado e o plasma foi utilizado em estudos de citocinas enquanto que as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram avaliadas em ensaios de imunofenotipagem.

As PBMCs obtidas foram divididas para a realização de dois estudos distintos. Uma fração foi utilizada para obtenção de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos *in vitro*. A segunda fração das PBMCs, foi utilizada para fenotipagem das células sanguíneas imunes (células dendríticas plasmocitóides, células NK, linfócitos B e T e monócitos). As células sanguíneas imunes foram analisados quanto a expressão dos receptores de HLA-G - ILT2, ILT4 e KIR2DL4 - bem como da expressão da própria molécula de HLA-G. As células dendríticas diferenciadas a partir dos monócitos *in vitro* foram avaliadas para a expressão dos receptores ILT2 e ILT4, além de serem analisadas quanto a marcadores associados à diferenciação, como CD14, bem como marcadores relacionados ao estado de maturação/ativação de células dendríticas como CD80, CD83, CD86 e HLA-DR.

Desde a primeira descrição de diferenciação de monócitos de sangue periférico em células dendríticas *in vitro* feita por Sallusto and Lanzavecchia, em 1994 (Sallusto e Lanzavecchia, 1994), a quantidade de recursos tecnológicos que podem ser empregados na técnica de diferenciação aumentou consideravelmente. Com o crescente conhecimento sobre a biologia dessa célula, também aumentou a utilização dessas células, as quais passaram a ser utilizadas em protocolos clínicos. Entretanto, toda essa diversidade de recursos gera dificuldades para comparar os estudos, pois as células apresentam características diferentes. Assim, considerando a importância da geração *in vitro* de células dendríticas a partir de monócitos sanguíneos para o estudo da biologia das DCs, acrescentou-se ao estudo uma revisão bibliográfica intitulada “ *In vitro* generation of human monocyte-derived dendritic cells – a review of

methodological aspects” que aborda os diferentes aspectos metodológicos utilizados nas técnicas de obtenção de DCs *in vitro*.

As células dendríticas apresentam uma morfologia típica (semelhante a uma estrela) bem como expressam marcadores específicos que remetem a sua função de célula apresentadora de antígenos, como níveis elevados de moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC), baixos níveis de CD14 e interação com os linfócitos graças à expressão de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 e CD83 (Banchereau et al., 2000; Théry e Amigorena, 2001).

Como as DCs são diferenciadas a partir de monócitos e visto que os monócitos são as únicas células circulantes do sangue que expressam altos níveis do marcador CD14 em sua membrana (Auffray et al., 2009), é possível utilizar como um indicador de diferenciação dos mesmos a diminuição tanto da expressão quanto do número de células que expressam a molécula CD14. Visto que o processo de diferenciação dos monócitos em DCs *in vitro* ocorre durante os primeiros cinco dias da cultura, a quantidade de células positivas para esse marcador deveria ser baixa, indicando que monócitos foram diferenciados com sucesso. Entretanto, se observa, nos pacientes, nos dados das culturas de mDCs, um número considerável de células positivas para CD14, enquanto que, nas culturas de iDCs essa população é pouco numerosa. É necessário considerar dois aspectos ao analisar esses dados. Primeiramente é crucial ressaltar que as células avaliadas no quinto dia de cultura (iDCs) e as células avaliadas no sétimo dia de cultura (mDCs) são provenientes de poços diferentes da placa de cultura e por isso estão suscetíveis a variações nas condições experimentais o que pode ter provocado as diferenças encontradas. Entretanto, também é preciso ressaltar que dentro dos grupos, tanto controles quanto pacientes, é possível identificar indivíduos que apresentavam altas níveis de diferenciação (ou seja, um número muito baixo de células expressando CD14) bem como indivíduos que não diferenciaram suas células, demonstrando uma variação natural dentro da população já esperada. Na tentativa de minimizar o impacto de tais variações nos resultados, propõe-se uma subdivisão dos indivíduos dentro de seus grupos, classificando-os de acordo com a quantidade de células CD14 positivas.

Ainda sobre monócitos submetidos ao processo de diferenciação *in vitro*, que permaneceram positivos para a molécula CD14, chama a atenção, a expressão do receptor ILT2. Enquanto nas iDCs observa-se uma expressão elevada nos controles, nas mDCs ocorre uma reversão, que apesar de pequena e não significativa estatisticamente, remete a estudos que demonstram a regulação negativa promovida por HLA-G sobre o processo de diferenciação dos monócitos em DCs, que ocorre em portadores de diversos tipos de neoplasias.

Na análise dos dados das culturas de iDCs e mDC, nas células que expressavam os receptores de HLA-G, ILT2 e ILT4, considerando tanto as células CD14⁻ quanto a população CD14⁻ CD80⁺ CD86⁺, é possível notar um maior número (estatisticamente não significativa) de células positivas para ILT4 nos controles. Isso pode estar refletindo um mecanismo fisiológico de indução de tolerância. Para um maior esclarecimento da questão, serão realizadas análises considerando apenas o grupo controle. Na população celular CD14⁻, o trabalho investigou, de maneira exploratória, a ocorrência do isotipo HLA-DQ, que segundo a literatura é o segundo isotipo mais frequente das moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade após o isotipo HLA-DR. As moléculas testadas nos ensaios estão diretamente relacionadas a apresentação antigênica visto que é através delas que os antígenos, inclusive os tumorais, são apresentados para a molécula de TCR dos linfócitos T. Embora a função dos diferentes isotipos ainda não esteja completamente esclarecida, alguns trabalhos tem associado a apresentação antigênica feita via diferentes isotipos a diferentes polarizações da resposta dos LT. Além disso, vale lembrar que o receptor ILT2 parece interagir diretamente com as de MHC durante a sinapse imunológica. Assim, nas condições experimentais utilizadas, não foi possível constatar diferença significativa no número de células que expressavam a molécula HLA-DQ ou a duplo positividade HLA-DQ/HLA-DR. Vale ressaltar que o N amostral pequeno, não permitiu maiores análises.

Considerando ainda os resultados de fenotipagem nas populações de iDCs e das mDCs, foram analisadas a positividade das células para as moléculas co-estimuladoras na população CD14⁻ de maneira separada (CD14⁻CD80⁺, CD14⁻CD83⁺ e CD14⁻CD86⁺) e também conjunta (CD14⁻CD80⁺CD83⁺ e CD14⁻CD80⁺CD86⁺). Nas populações duplo positivas, foram avaliados HLA-G, HLA-

DR, ILT2 e ILT4. Nas culturas de iDCs, a positividade das células para as moléculas CD80 e CD86 mostraram uma distribuição normal e a avaliação dos valores de média, mostram uma elevação (não significativa) no número de células CD86 positivas nos indivíduos controles. Já nas culturas de mDCs, a positividade das células para os marcadores CD80 e CD86 também apresentaram uma distribuição normal sendo que a positividade das células para o marcador CD80 mostrou uma elevação (não significativa) no grupo dos pacientes.

É possível observar que as moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (marcadas nos experimentos com o anticorpo contra HLA-DR) apresentaram uma distribuição normal e, embora seja esperado um aumento na expressão após o processo de maturação, os valores nos pacientes permaneceram quase sem alteração. Já no grupo controle ocorreu uma diminuição do número de células. Aqui novamente, é necessário ressaltar que essa diferença pode ser devido ao desenho experimental, como mencionado anteriormente. A expressão da molécula de HLA-G nessa população não foi avaliada devido ao baixo N amostral.

Os resultados que chamaram a atenção foram vistos nas análises de células que expressam os receptores de HLA-G na população de células CD14⁻CD80⁺CD86⁺. Embora as diferenças não sejam significativas, o número de células que expressam ILT2 foram regulados negativamente pelo processo de maturação em ambos os grupos, porém nas iDCs, chamam a atenção, visto que, as iDCs não são consideradas boas células estimuladoras de linfócitos e a baixa quantidade de células expressando moléculas co-estimuladoras resultaria na indução de anergia do linfócito. Já com relação ao o número de células que expressam o receptor ILT4, nota-se uma diferença no grupo controle, onde é possível observar uma modulação positiva desse pelo processo de maturação o que acentuou ainda mais as diferenças de expressão entre os grupos.

Ainda sobre as culturas de mDCs, observa-se um aumento no número de células que expressam a molécula CD83, bem como da duplo positividade CD80⁺CD83⁺. Essa diferença também ocorre nas iDCs, porém só há significância estatística nas populações de mDC. Tal resultado, remeteu a uma busca na literatura para um maior entendimento da função dessa molécula no processo de apresentação antigênica. Diversos estudos atribuem a essa

molécula um papel desinibição do estado de maturação das DCs e, embora sua função exata não seja conhecida, ela parece ser necessária para a interação DC-LT (Lechmann et al, 2011). Entretanto, ela também parece estar relacionada com a indução de tolerância pelo linfócito T ao antígeno apresentado quando no seu estado solúvel (Boussiotis et al, 1994). Há uma literatura farta de estudos que demonstram a secreção de CD83 solúvel (sCD83) por tumores como uma estratégia de evasão do sistema imune. Entretanto, a secreção de sCD83, por DCs ativadas e linfócitos B, parece ser um mecanismo fisiológico de controle da resposta imune, visto que em indivíduos saudáveis baixos níveis dessa molécula são encontrados no soro (Hock et al, 2001.). Entretanto, em diferentes patologias, esse mecanismo parece estar desequilibrado, visto que, há relatos da ocorrência de uma maior liberação dessa molécula, pelas DC, inibindo a proliferação linfocitária e conseqüentemente induzindo tolerância ao antígeno apresentado. Há evidências de que a atividade da própria DC estaria sendo regulada por esse mecanismo, visto que, a molécula de sCD83 parece bloquear o processo de maturação da DC (Lechmann et al, 2001). Assim, considerando as evidências demonstradas na literatura, sugere-se que o aumento significativo da expressão de CD83 nas MDDC de pacientes de CR, esteja correlacionado com a secreção dessa molécula, uma vez que, a forma solúvel de CD83 é proveniente da clivagem da proteína de membrana CD83 (Lechmann et al, 2011).

Outro resultado que chamou atenção foi a maior expressão do receptor ILT2 nas duas subpopulações de linfócitos T (CD4 e CD8) dos pacientes. Na literatura há diversos relatos sobre tumores (de diversos tipos) que expressam HLA-G em suas membranas e também liberam HLA-G solúvel em seu microambiente (Rouas-Freiss et al., 2005; Carosella et al., 2015). A molécula de ILT2 em LT parece atuar de duas maneiras diferentes colaborando para a indução de um estado de tolerância nessas células. Através da simples interação de HLA-G - ILT2, sendo o HLA-G na forma solúvel ou de membrana, e através de um outro mecanismo descrito por Shiroishi e colegas (Shiroishi et al., 2003). No estudo conduzido por Shiroishi foi demonstrado que em uma situação de apresentação de superantígeno, a molécula de ILT2 pode se co-localizar com o TCR no local de formação da sinapse imunológica e poderia estar funcionando como um co-receptor inibitório ora bloqueando a ligação de CD8 com o MHC I

ora interagindo diretamente com o complexo MHC-peptídeo promovendo a geração de linfócitos T regulatórios (Colonna et al., 1997; Shiroishi et al., 2003; Gregori et al., 2010; Banchereau et al., 2012). Apesar dos antígenos tumorais não se caracterizarem como superantígenos, é razoável supor que no contexto dos pacientes avaliados nessa tese, a maior expressão do receptor ILT2 nos de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ pode estar tornando essas células mais vulneráveis a mecanismos regulatórios via HLA-G.

As análises dos níveis sistêmicos de citocinas no plasma dos participantes do estudo revelaram um aumento significativo nos níveis de IL-6 nos pacientes em comparação com o grupo controle. Esse resultado corrobora a hipótese de que a inflamação pode estar contribuindo de maneira importante para o desenvolvimento e progressão do CR. Na literatura, há evidências de que essa citocina pró- inflamatória, poderia estaria promovendo a proliferação celular, bem como o processo de migração e invasão das células tumorais ao colaborar para a ativação de fatores de transcrição como o STAT3 e o NF- κ B (Yu et al., 2009; Taniguchi and Karin., 2018). Além disso, há descrições sobre a possível modulação do processo de angiogênese, no CR, através do aumento da expressão de HIF1 α e VEGF (Santoni et al., 2015). É digno de nota que o paciente que apresentou os maiores níveis de IL-6 também foi o único em nossa amostra que apresentava metástase linfonodais. Isso corrobora a associação de uma maior capacidade invasiva de células tumorais e a citocina pró- inflamatória IL-6. Assim, torna-se possível sugerir que a medida dos níveis plasmáticos de IL-6 em pacientes com câncer renal metastático pode ser considerada como uma abordagem complementar para avaliar e/ou prever a progressão do CR.

7 – CONCLUSÃO

Nas investigações conduzidas durante a realização desse trabalho, a hipótese de que o processo inflamatório estaria contribuindo para o desenvolvimento do câncer renal parece ser verdadeira. A ocorrência de metástases linfonodais no paciente que apresentou o maior índice de IL-6, juntamente com diversas descrições na literatura médica, parece ser um indicativo de que há uma correlação dos níveis sistêmicos dessa citocina com o desfecho clínico de tais pacientes.

Entretanto, para um maior entendimento sobre o papel da inflamação no CR, mais estudos são necessários.

Com relação a hipótese de correlação entre os níveis de expressão de membrana dos receptores de HLA-G, ILT2, ILT4 e KIR2DL4 em células sanguíneas de pacientes portadores de câncer renal com o estadiamento da doença, esse estudo não confirmou a hipótese.

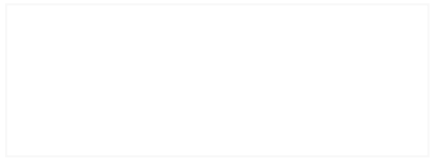
8 – PERSPECTIVAS

Após a análise dos resultados obtidos nesse trabalho, considera-se importante para a conclusão do tema a realização de estudos adicionais como:

- Medição de HLA-G solúvel e de CD83 no plasma dos participantes do estudo.

- Imunohistoquímica para o receptor de IL-6 e para a molécula de HLA-G nas peças de tumor dos pacientes avaliados nesse estudo.

- Aprofundar as análises nos dados de citometria de fluxo, utilizando, inclusive, ferramentas de bioinformática.



9 – REFERÊNCIAS

Abbas, A.K ; Lichmann, A.H ; Pillai, S. *Imunologia celular e molecular*. 2011. 7ª ed, Rio de Janeiro. Elsevier. 592 p.

Akbari, O., et al., 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* 2, p: 725-731.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em: < <http://www.cancer.org> >. Acesso em: 01 set. 2017.

AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY. Disponível em: < <http://www.asco.org>>. Acesso em: 01 set. 2017.

Atkins, M. B., et al., 2017. Immune checkpoint inhibitors in advanced renal cell carcinoma: experience to date and future directions. *Ann. Oncol.* 28, p:1484-1494.

Baleeiro, R. B; Barbuto, J. A., 2008. Local secretion/shedding of tumor-derived CD83 molecules as a novel tumor escape mechanism. *Mol. Immunol.* 45, p: 3502-3504.

Banchereau, J; Steinman, R. M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392, p:245-252.

Banchereau, J., et al., 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767-811.

Banchereau, J., et al 2012. Immunoglobulin-like transcript receptors on human dermal CD14+ dendritic cells act as a CD8-antagonist to control cytotoxic T cell priming. *Proc. Nat.l Acad. Sci. U. S. A.* 109, p:18885-90.

Banerjee, D.K., et al., 2006. Expansion of FOXP3 high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood.* 108, p:2655-2661.

Barbuto, J.A., et al., 2004. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer. Immunol Immunother.* 53, p:1111-1118.

Bausch B, et al., 2013. Renal cancer in von Hippel-Lindau disease and related syndromes. *Nat. Rev. Nephrol.* 9, p:529-538.

Becker C, et al, 2006. Regulatory T cells: present facts and future hopes. *Med. Microbiol. Immunol.* 195, p:113-124.

Borges L, Cosman D, 2000. LIRs/ILTs/MIRs, inhibitory and stimulatory Ig-superfamily receptors expressed in myeloid and lymphoid cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, p.209-17.

Boussiotis VA, et al, 1994. Blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: a means to induce tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* 6, p:797–807.

Brown R et al, 2012. Trogocytosis generates acquired regulatory T cells adding further complexity to the dysfunctional immune response in multiple myeloma. *Oncoimmunology.* 9, p:1658-1660. a

Brown R et al, 2012. CD86+ or HLA-G+ can be transferred via trogocytosis from myeloma cells to T cells and are associated with poor prognosis. *Blood.* 10, p:2055-63. b

Bruder E., et al., 2004. Morphologic and molecular characterization of renal cell carcinoma in children and young adults. *Am. J. Surg. Pathol.* 28, p:1117-1132.

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

Burnet F. M., 1957. Cancer - a biological approach. *British Medical Journal.* p.841-847,

Cabestré, F. A., et al 1999. HLA-G expression in human melanoma cells: protection from NK cytotoxicity. *J. Reprod. Immunol.* 43, p: 183-193.

Caux C, et al., 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* 180, p:1263-1272.

Carlo M. I, et al., 2016. Checkpoint inhibitors and other novel immunotherapies for advanced renal cell carcinoma. *Nat. Rev. Urol.* 13, p:420-431.

Carlo M.I, et al., 2018. Prevalence of Germline Mutations in Cancer Susceptibility Genes in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. *JAMA Oncol.* 5.

Carmeliet P, Jain R.K, 2011. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 10, p:417-427.

Carosella E.D, et al., 2011. The tolerogenic interplay(s) among HLA-G, myeloid APCs, and regulatory cells. *Blood.* 25, p: 6499-6505.

Carosella E.D, et al., 2015. HLA-G: An Immune Checkpoint. *Molecule. Adv. Immunol.* 127, p:33-144.

Cathcart J.M, et al., 2016. Interleukin-6 increases matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) levels via down-regulation of p53 to drive cancer progression. *Oncotarget.* 7, p:61107-61120.

Caumartin J et al., 2010. Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. *EMBO J.* 5, p:1423-33.

Chow W. H, et al., 1999. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA.* 5, p: 1628-1631.

Chow W, 2010. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat. Rev. Urol.* 7, p. 245-257.

Colonna M, et al. 1997. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J. Exp. Med.* 186, p:1809–1818.

Cools N, et al. 2007. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J. Leukoc. Biol.* 82, p:1365-1374.

Cuadros T, et al. 2014. HAVCR/KIM-1 activates the IL-6/STAT-3 pathway in clear cell renal cell carcinoma and determines tumor progression and patient outcome. *Cancer Res.* 74, p:1416-1428.

Chowell D, et al, 2018. Patient HLA class I genotype influences cancer response to checkpoint blockade immunotherapy. *Science.* 359, p:582-587.

Collin M, Bigley V, 2018. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* 154, p: 3-20.

Da Costa LT, et al, 2001. Return of de-differentiation: why cancer is a developmental disease. *Curr. Opinion. Oncol.* 13, p.58–62.

Della Bella S, Gennaro M, Vaccari M, Ferraris C, Nicola S, Riva A, Clerici M, Greco M, Villa ML. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer.* 2003 Oct 20;89(8):1463-72.

Denoix PF, 1946. Enquete permanent dans les centres anticancereaux. *Bull Inst. Nat. Hyg.* 1, p: 70-75.

De Palma M, et al, 2017. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 17, p:457-474.

Devita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer Principles and practice of Oncology*, 2011. 9aed. Filadélfia, Lippincott Williams & Wilkins. 3235 p.

De Visser KE, et al, 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer.* 6, p.24-37.

Dranoff, G. 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 4, p.11- 22.

Dunn G, 2006. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immunol.* 6, p.836-48.

Ehrlich P, 1909. Über den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 5, p. 273–290.

Elinav E, et al, 2013. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat. Rev. Cancer.* 13, p:759-771.

Ellis SA, et al, 1987. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology.* 4, p: 595-601.

European Association of Urology. Disponível em: < [http: / www.uroweb.org](http://www.uroweb.org)>. Acesso em: 02 jun. 2018.

Facciabene A, et al, 2011. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature.* 13, p. 226-230.

Faries MB, et al, 2001. Calcium signaling inhibits interleukin-12 production and activates CD83(+) dendritic cells that induce Th2 cell development. *Blood.* 98, p:2489-2497.

Fecci PE, et al, 2003. The history, evolution, and clinical use of dendritic cell-based immunization strategies in the therapy of brain tumors. *J. Neurooncol.* 64, p:161-176.

Fehérvári Z, Sakaguchi S, 2004. Control of Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int. Immunol.* 16, p:1769-1780.

Ferlay J, et al, 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer.* 136, p:359-386.

Fishelson Z, et al, 2003. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol. Immunol.* 40, p:109-123.

Flavell RA, et al, 2010. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat. Rev. Immunol.* 10, p:554-567.

Fridman WH, et al, 2017. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14, p:717-734.

Fuhrman S, et al 1982. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 6, p: 655-663.

Fukumura D, et al, 2018. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, p:325-340.

Gabrilovich DI, et al, 1997. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 3, p:483-490.

Gabrilovich DI, 2004. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat. Rev. Immunol.* 4, p:941-952.

Geijtenbeek TB, Van Kooyk Y, 2003. Pathogens target DC-SIGN to influence their fate DC-SIGN functions as a pathogen receptor with broad specificity. *APMIS.* 111, p:698-714.

Gharwan H, Groninger H, 2016. Kinase inhibitors and monoclonal antibodies in oncology: clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 13, p:209-227.

GLOBOCAN. Disponível em: < <http://www.globocan.iarc.fr> >. Acesso em: 01 jun. 2018.

Gossage L, Eisen T, 2010. Alterations in VHL as potential biomarkers in renal-cell carcinoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7, p: 277-288.

Gossage L, et al, 2015. VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat. Rev. Cancer.* 15, p:55-64.

Gregori S, et al, 2010. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood.*

116, p935–944.

Grivennikov, S.I, et al, 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 19, p:883-99.

Guermonprez P, et al, 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20, p:621-667.

Hanahan D, Weinberg RA, 2001. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144, p:646-674.

Harding FA, et al, 1992. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*. 356, p:607-609.

Hasebe H, et al, 2000. Dysfunctional regulation of the development of monocyte-derived dendritic cells in cancer patients. *Biomed. Pharmacother.* 54, p:291-298.

Heath WR, Carbone FR, 2001. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 1, p:126-134.

Hock BD, et al, 2001. A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes, and is detectable in normal human sera. *Int. Immunol.* 13, p: 959–967.

HoWangYin KY et al, 2010. Different functional outcomes of intercellular membrane transfers to monocytes and T cells. *Cell Mol Life Sci.* 7, p:1133-45.

Hsieh JJ, et al, 2018. Genomic classifications of renal cell carcinoma: a critical step towards the future application of personalized kidney cancer care with panomics precision. *J. Pathol.* 244, p:525-537.

Hu B, et al, 2010. Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 14, p.21635-40.

Huang JF, et al, 1999. TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells. *Science*. 5441, p:952-954.

Huang FP, et al, 2000. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.* 191, p:435-444.

Imai K, Takaoka A, 2006. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Rev. Cancer.* 6, p:714-727.

- Jemal A, et al, 2011. Global cancer statistics. *Cancer J. Clin.* 61, p.69-90.
- Joosten SC, et al, 2018. Epigenetics in renal cell cancer: mechanisms and clinical applications. *Nat. Rev. Urol.* 15, p:430-451.
- Jones PA, Baylin SB, 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 3, p.415-28.
- Kaelin WG, et al, 2004. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and kidney cancer. *Clin. Cancer Res.* 15, p 6290S-5S.
- Kaliński P, et al, 1997. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J. Immunol.* 159, p:28-35.
- Kang X, et al, 2016. Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: Immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors. *Cell Cycle.* 15, p.25-40.
- Karin M, Greten FR, 2005. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 5, p:749-759.
- Kawai K, et al, 2004. Enhancement of T cell proliferative response against autologous cancer cells of a metastatic renal cell carcinoma patient after unexplained regression. *J. Urol.* 11, p.1130-1132.
- Khan KA, Kerbel RS, 2018. Improving immunotherapy outcomes with anti-angiogenic treatments and vice versa. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, p:310-324.
- Klein G, 1966. Tumor antigens. *Annu. Rev. Microbiol.* 20, p.223-252.
- Kondo K, et al, 2002. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell.* 1, p:237-246.
- Kurts C, et al, 2010. Cross-priming in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 10, p: 403-414.
- Larsen MH, Hviid TV, 2009. Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. *Hum. Immunol.* 70, p.1026-34.
- Lechmann M, et al 2001. The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J. Exp. Med.* 194, p:1813–1821.
- Lechmann M, et al, 2002. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for

maturation. *Trends Immunol.* 23, p:273-275.

Lemaoult J, et al, 2005. Immuno-tolerogenic functions of HLA-G: relevance in transplantation and oncology. *Autoimmun. Rev.* 4, p.503-509.

Lutz MB, Schuler G, 2002.. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 23, p:445-449.

Li L, et al, 2007. Hepatoma cells inhibit the differentiation and maturation of dendritic cells and increase the production of regulatory T cells. *Immunol. Lett.* 3114, p:38-45.

Lin WW, Karin M, 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.* 117, p:1175-1183.

Linehan WM, et al, 2010. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nat. Rev. Urol.* 7, p:277-285.

Lokich J, 1997. Spontaneous regression of metastatic renal cancer. Case report and literature review. *Am. J. Clin. Oncol.* 20, p.416-418.

Lo Presti E et al, 2018. $\gamma\delta$ T Cells and Tumor Microenvironment: From Immunosurveillance to Tumor Evasion. *Front. Immunol.* 9, p:1395.

Mackay I, Rosen FS, 2000. The HLA system- First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 7, p. 702-709.

Maher ER, 2019. Hereditary renal cell carcinoma syndromes: diagnosis, surveillance and management. *World J. Urol.* 21.

Mahoney KM, et al, 2015. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, p:561-584.

Mantovani A, et al, 2008. Cancer-related inflammation. *Nature.* 454, p:436-444.

Matsui T, et al, 2009. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J. Immunol.* 182, p:6815-6823.

Medical Research Council Renal Cancer Collaborators, 1999. Interferon- α and survival in metastatic renal carcinoma: early results of a randomised controlled trial. *Lancet.* 2, p.14-17.

Mellman I, et al, 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 480, p:480-489.

Merad M, et al, 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31, p:563-604.

Miller JC, et al, 2012. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* 13, p:888-899.

Moch H, 2012. An overview of renal cell cancer: Pathology and genetics. *Semin. Cancer Biol.* 23, p.3-9.

Morris MR, Latif F, 2017. The epigenetic landscape of renal cancer. *Nat. Rev. Nephrol.* 13, p:47-60.

Motzer RJ, et al, 1999. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 17, p.2530-2540.

Nagaraj S, et al, 2009. Regulatory myeloid suppressor cells in health and disease. *Cancer Res.* 69, p:7503-7506.

Naik SH, 2008. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol Cell Biol.* 86, p:439-452.

Neves AR, et al, 2005. Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. *Cancer Immunol. Immunother.* 54, p:61-66.

Oosterwijk E, et al, 2011. Basic research in kidney cancer. *Eur. Urol.* 60, p.622-633.

Pardoll D, 2003. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu. Rev. Immunol.* 21, p :807-839.

Pardoll D, 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer.* 12, p:252-264.

Pistoia AV, et al, 2007. Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? *Seminars in Cancer Biology.* 17, p. 469–479.

Poláková K, et al, 2015. Analysis of HLA-G expression in serum and biopsy samples of kidney transplant recipients. *Immunobiology*. 220, p.533-537.

Probst HC, et al, 2005. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat. Immunol.* 6, p: 280-286.

Pulendran B, 2015. The Varieties of Immunological Experience: Of Pathogens, Stress, and Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 33, p: 563–606.

Rajagopalan S, Long EO, 1999. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J. Exp. Med.* 7, p: 1093-1100.

Randolph GJ, et al, 2002. The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J. Exp. Med.* 4, p: 517-27.

Randolph GJ, et al, 2008. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 26, p:293-316.

Redmond WL, et al, 2005. Distinct requirements for deletion versus anergy during CD8 T cell peripheral tolerance in vivo. *J. Immunol.* 174, p:2046-2053.

Reiman JM, et al, 2007. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin. Cancer Biol.* 17, p.275-287.

Ricci SB, Cerchiari U, 2010. Spontaneous regression of malignant tumors: Importance of the immune system and other factors. *Oncol. Lett.* 1, p.941-945.

Ricketts CJ, Linehan WM, 2016. The origin, evolution and route to metastasis of clear cell RCC. *Nat. Rev. Nephrol.* 6.

Rini BI, et al, 2009. Renal cell carcinoma. *Lancet.* 28, p.1119-1132.

Riteau B, et al., 2003. Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. *Hum. Immunol.* 11, p:1064-1072.

Rosenberg SA, et al, 1987. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.* 9, p.889-897.

Rosenblatt J, Mcdermott DF, 2001. Immunotherapy for renal cell carcinoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 25, p.793-812.

Rouas-Freiss N, et al, 2005. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res.* 65, p:10139-10144.

Rouas-Freiss N, et al, 2014. The dual role of HLA-G in cancer. *J. Immunol. Res.* 2014, p.1-10.

Routy B, et al, 2018. The gut microbiota influences anticancer immunosurveillance and general health. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, p:382-396.

Sacco E, et al, 2009. Paraneoplastic syndromes in patients with urological malignancies. *Urol. Int.* 83, p.1-11.

Samaridis J, Colonna M, 1997. Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. *Eur. J. Immunol.* 27, p.660-665.

Santoni M, et al, 2015. Role of STAT3 pathway in genitourinary tumors. *Future Sci. OA.* 1, p:FSO15.

Schreiber DR, et al, 2004a. The Three ES of Cancer Immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22, p:329–360.

Schreiber DR, et al, 2004b. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*, 21, p.137–148.

Sakaguchi S, 2004. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 22, p :531-562.

Scheinecker C, et al, 2002. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J. Exp. Med.* 196, p :1079-1090.

Schödel J, et al, 2016. Hypoxia, Hypoxia-inducible Transcription Factors, and Renal Cancer. *Eur. Urol.* 69, p:646-657.

Shankaran V, et al, 2001. IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 410, p.1107-1111.

Shiroishi M, et al, 2003. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, p:8856-8861.

Shiroishi M, et al, 2006a. Structural basis for recognition of the nonclassical MHC

molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 31, p.16412-16417.

Shiroishi M, et al, 2006b. Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer. J. Biol. Chem. 15, p: 10439-10447.

Steege PS, 2016. Targeting metastasis. Nat. Rev. Cancer. 16, p:201-218.

Steinbrink K, et al, 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. J. Immunol. 159, p:4772-4780.

Stein WD, et al, 2012. Analyzing the pivotal trial that compared sunitinib and IFN- α in renal cell carcinoma, using a method that assesses tumor regression and growth. Clin. Cancer Res. 15, p.2374-2381.

Smyth MJ, et al, 2016. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. Nat. Rev. Clin. Oncol. 13, p.143-158.

Schulz O, et al, 2000. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. Immunity. 13, p:453-462.

Segura E, et al, 2012. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. J. Exp. Med. 209, p:653-660.

Steinman RM, Cohn ZA, 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J. Exp. Med. 137, p:1142-1462.

Steinman, R. M; Hawiger, D; Nussenzweig, M. C., 2003. Tolerogenic dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. 21, 685- 711.

Steinman RM, 2012. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. Annu. Rev. Immunol. 30, p: 1-22.

Stockwin LH, et al, 2000. Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. Immunol. Cell Biol. 78, p:91-102.

Schulz O, et al, 2000. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. Immunity. 13, p:453-462.

Snow RM, Schellhammer PF, 1982. Spontaneous regression of metastatic renal cell carcinoma. Urology. 20, p.177-181.

Sullivan NJ, et al, 2009. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene*. 28, p:2940-2947.

Taniguchi K, Karin M, 2018. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat. Rev. Immunol.* 18, p:309-324.

Trinchieri G, 2012. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. *Annu. Rev. Immunol.* 30, p:677-706.

Trowsdale J, Betz AG, 2006. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nat. Immunol.* 3, p: 241-246.

Trowsdale J, et al, 2015. Surveillance of cell and tissue perturbation by receptors in the LRC. *Immunol. Rev.* 267, p.117-136.

Turajlic S, et al, 2018. Kidney cancer: The next decade. *J. Exp. Med.* 14.

Ueno H, et al, 2007. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Rev.* 219, p:118-142.

Verhasselt V, et al, 2004. Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4^{pos} T cells by human mature autologous dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 34, p:762-772.

Vieira PL, et al, 2000. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J. Immunol.* 164, p:4507-4512.

Weinberg, RA. *A biologia do câncer*. 2008. Porto Alegre: Artmed. 864p

Wilson NS, Villadangos JA, 2004. Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. *Immunol. Cell Biol.* 82, p:91-98.

World Health Organization. Disponível em: <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> >. Acesso em 01 set. 2017.

Worbs T, 2016. Dendritic cell migration in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 17, p:30-48.

Wu L, Liu YJ, 2007. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity*. 26, p:741-750.

Xie TX, et al, 2004. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene*. 23, p:3550-3560.

Yanagihara S, et al, 1998. EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J. Immunol*. 161, p:3096-3102.

Yoshida N, et al, 2002. Interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and interleukin-1beta in patients with renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer*. 86, p:1396-1400.

Young JW, et al, 1992. The B7/BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4+ T lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro. *J. Clin. Invest*. 90, p:229-237.

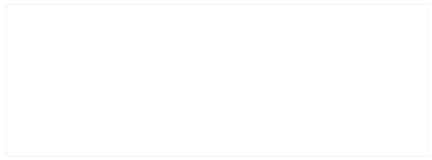
Yu H, et al, 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer*. 9, p:798-809.

Zbar B, et al, 1987. Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature*. 327, p:721-724.

Zhou LJ, Tedder TF, 1995. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J. Immunol*. 154, p:3821-3835.

Zitvogel L, et al, 2006. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol*. 6, p:715-727.

Zou W, 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol*. 6, p. 295-307.



10 – ANEXOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Correlação entre a expressão de moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade em células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes portadores de câncer renal e sua resposta linfocitária

Pesquisador: MILTON BERGER

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 11858512.3.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA / UFRGS

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO
Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA / UFRGS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 480.137

Data da Relatoria: 31/10/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa foi aprovado no CEP do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Número do Parecer: 426.290). Foi enviado para análise no CEP da UFRGS pelo motivo de inclusão do nome do co-participante JOSÉ ARTUR BOGO CHIES.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto de pesquisa propõe avaliar uma possível correlação entre os isotipos de HLA (HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ) expressos em monócitos de pacientes portadores de câncer renal com o tipo de resposta linfocitária desenvolvida por tais pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram apresentados os riscos e os benefícios da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo CEP do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farroupilha

CEP: 90.040-060

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4085

E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

Continuação do Parecer: 480.137

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram anexados. Porém, como um servidor da UFRGS foi incluído como co-participante, recomenda-se a inclusão de folha de rosto devidamente assinada pelo representante legal da UFRGS.

Recomendações:

Recomenda-se aprovação do projeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Como o projeto de pesquisa tem aprovação do CEP do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS, o CEP da UFRGS reitera a aprovação. Para a completa documentação do projeto de pesquisa, recomenda-se aos pesquisadores a inclusão nos termos de apresentação obrigatória de folha de rosto devidamente assinada pelo representante legal da UFRGS.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 05 de Dezembro de 2013

Assinador por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farroupilha

CEP: 90.040-060

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4085

E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLE -

ESTUDO: Correlação entre a expressão de moléculas de classe II codificadas pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade em células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes portadores de câncer renal e sua resposta linfocitária

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você. Este estudo visa um melhor entendimento sobre a função das diferentes moléculas que participam dos processos de defesa do organismo contra o câncer renal. Caso você aceite participar desse estudo, os procedimentos envolvidos serão os seguintes:

- I) Será feita 1 (uma) coleta de 30 mL de sangue periférico (± 2 colheres de sopa).
- II) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o tratamento podendo apenas causar um pequeno incômodo, dor, no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue).
- III) A participação neste projeto não tem objetivo de tratamento, bem como não acarretará qualquer despesa para você.
- IV) Você terá a liberdade de desistir ou de interromper a participação neste estudo no momento em que desejar sem necessidade de qualquer explicação; a desistência não causará nenhum prejuízo à sua saúde ou ao bem estar físico e não interferirá no atendimento ou tratamento médico que está sendo realizado na instituição.
- V) Nessa pesquisa serão estudadas as chamadas células dendríticas (DC) e as células T (linfócitos) que são células que fazem parte do sistema de proteção do organismo. As características dessas células como, por exemplo, moléculas de membrana, bem como as suas interações são o objeto desse estudo.
- VI) Os resultados obtidos durante este estudo serão divulgados em publicações científicas sem que seus dados pessoais sejam mencionados, ou seja, seu nome não aparecerá nas publicações decorrentes do estudo.
- VII) Solicitamos a sua autorização para acessar os dados do seu prontuário, pois estes são necessários para a avaliação do seu sistema de defesa.
- VIII) Caso você desejar, poderá pessoalmente tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa:
() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- IX) Você não terá benefícios diretos pela participação neste estudo, mas poderá contribuir para o avanço do conhecimento sobre o assunto.

X) Se você tiver alguma dúvida poderá contatar o pesquisador responsável, Dr. Milton Berger, através do telefone 3359 8286 ou Farm. Giovana Cechim através do telefone 33086737.

XI) O comitê de ética em pesquisa do HCPA poderá ser contatado através do telefone 33597640.

XII) Você assinará este termo em duas vias e receberá uma delas.

Eu,.....(nome)
abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo “Correlação entre a expressão de moléculas de classe II codificadas pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade em células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes portadores de câncer renal e sua resposta linfocitária”. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Porto Alegre, de de 20

Assinatura do(a) paciente

Nome e assinatura do responsável pela aplicação do TCL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PACIENTE -

ESTUDO: Correlação entre a expressão de moléculas de classe II codificadas pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade em células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes portadores de câncer renal e sua resposta linfocitária.

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você. Este estudo visa um melhor entendimento sobre a função das diferentes moléculas que participam dos processos de defesa do organismo contra o câncer renal. Caso você aceite participar desse estudo, os procedimentos envolvidos serão os seguintes:

- I) Será feita 1 (uma) coleta de 30 mL de sangue periférico (± 2 colheres de sopa).
- II) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o tratamento podendo apenas causar um pequeno incômodo, dor, no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue).
- III) Durante a cirurgia, será feita a coleta de uma pequena parte do tumor retirado.
- IV) A participação neste projeto não tem objetivo de tratamento, bem como não acarretará qualquer despesa para você.
- V) Você terá a liberdade de desistir ou de interromper a participação neste estudo no momento em que desejar sem necessidade de qualquer explicação; a desistência não causará nenhum prejuízo à sua saúde ou ao bem estar físico e não interferirá no atendimento ou tratamento médico que está sendo realizado na instituição.
- VI) Nessa pesquisa serão estudadas as chamadas células dendríticas (DC) e as células T (linfócitos) que são células que fazem parte do sistema de proteção do organismo. As características dessas células como, por exemplo, moléculas de membrana, bem como as suas interações são o objeto desse estudo.
- VII) Os resultados obtidos durante este estudo serão divulgados em publicações científicas sem que seus dados pessoais sejam mencionados, ou seja, seu nome não aparecerá nas publicações decorrentes do estudo.
- VIII) Solicitamos a sua autorização para acessar os dados do seu prontuário, pois estes são necessários para a avaliação do seu sistema de defesa.
- IX) Caso você desejar, poderá pessoalmente tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa:
 - () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
 - () Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

X) Você não terá benefícios diretos pela participação neste estudo, mas poderá contribuir para o avanço do conhecimento sobre o assunto.

XI) Se você tiver alguma dúvida poderá contatar o pesquisador responsável, Dr. Milton Berger, através do telefone 3359 8286 ou Farm. Giovana Cechim através do telefone 33086737.

XII) O comitê de ética em pesquisa do HCPA poderá ser contatado através do telefone 33597640.

XIII) Você assinará este termo em duas vias e receberá uma delas.

Eu,.....(nome)
abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo “Correlação entre a expressão de moléculas de classe II codificadas pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade em células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes portadores de câncer renal e sua resposta linfocitária”. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Porto Alegre, de de 20

Assinatura do(a) paciente

Nome e assinatura do responsável pela aplicação do TCL
