

Estimulação crônica do sistema imunológico em pacientes com câncer ginecológico e mama e linfócitos T auxiliares periféricos produtores de IL-12**Chronic stimulation of the immune system in patients with gynecological cancer and IL-12-producing peripheral helper T lymphocytes**

DOI:10.34117/bjdv6n11-284

Recebimento dos originais:08/10/2020

Aceitação para publicação:13/11/2020

Jéssica Ferreira Vieira

Mestre em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Instituição: Instituto de Pesquisa em Oncologia – UFTM

Endereço: Avenida Guilherme Ferreira, nº1940, 38022-200, São Benedito, Uberaba – MG, Brasil

E-mail: jessica.vieira@uftm.edu.br

Eddie Fernando Cândido Murta

Doutor em Medicina pela Universidade de São Paulo

Instituição: Disciplina de Ginecologia e da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e Instituto de Pesquisa em Oncologia - UFTM

Endereço: Avenida Getúlio Guaritá, s/n, 38025-440, Abadia, Uberaba – MG, Brasil

E-mail: eddiemurta@mednet.com.br

Rosekeila Simões Nomelini

Doutora em Patologia Ginecológica e Obstétrica pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Instituição: Departamento materno-infantil da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Endereço: Avenida Getúlio Guaritá, s/n, 38025-440, Abadia, Uberaba – MG, Brasil

E-mail: rosekeila@terra.com.br

Márcia Antoniazi Michelin

Doutora em Imunologia Básica e Aplicada pela Universidade de São Paulo

Instituição: Disciplina de imunologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e Instituto de Pesquisa em Oncologia – UFTM

Endereço: Avenida Guilherme Ferreira, nº1940, 38022-200, São Benedito, Uberaba – MG, Brasil.

E-mail: marcia.michelin@uftm.edu.br

RESUMO

O ambiente gerado pela estimulação crônica do sistema imune pode gerar plasticidade celular, seja localmente ou sistematicamente. Isso ocorre devido a mecanismos genéticos e epigenéticos que levam a uma diversidade de fenótipos e padrões de mecanismos imunológicos, que podem atuar em prognósticos e eficácias terapêuticas. Anteriormente, este grupo demonstrou que linfócitos T auxiliares poderiam expressar IL-12 em pacientes com câncer ginecológico e de mama avançado. Agora, no presente estudo, isolamos por citometria de fluxo as células T auxiliares positivas para IL-12 (Th IL-12+) no sangue periférico de 35 pacientes com câncer ginecológico e de mama avançado, e verificamos, por qPCR, a expressão gênica dos fatores de transcrição T-bet, GATA-3, ROR γ t e FoxP3 nesse fenótipo celular. Além do mais, analisamos *in vitro* se Th IL-12+ poderia ser induzida em amostras de pacientes não oncológicos, quando em contato com o soro obtido de amostras dos pacientes com câncer avançado. Assim, demonstramos que os subtipos tumorais, assim como a idade

das pacientes avaliadas nesse estudo, não influenciaram na presença de Th IL-12+. Demonstramos ainda que o fenótipo de estudo expressa o fator ROR γ t e que o soro de pacientes com câncer avançado é capaz de induzir a diferenciação de Th IL-12+. Portanto, esse trabalho fornece indícios de que os linfócitos T auxiliares produtores de IL-12 podem ser um tipo celular que ocorre em condições de estimulação crônica do sistema imune, e que se estudado de forma mais abrangente, pode vir a se tornar um possível indicador de prognóstico da cronicidade da doença. Porém, novas investigações são necessárias para entender os reais mecanismos moleculares e/ou epigenéticos que podem estar associados a esses linfócitos.

Palavras-chave :Imunologia, câncer, resposta imune, resposta antitumoral, interleucina-12.

ABSTRACT

The environment generated by chronic stimulation of the immune system can generate cellular plasticity, either locally or systematically. This occurs due to genetic and epigenetic mechanisms that lead to a diversity of phenotypes and patterns of immunological mechanisms, which can act in prognosis and therapeutic efficacy. Previously, this group demonstrated that helper T lymphocytes could express IL-12 in patients with advanced gynecological and breast cancer. Now, in this present study, we isolated IL-12 positive T cells (Th IL-12+) by peripheral blood from 35 patients with advanced gynecological and breast cancer by flow cytometry and verified, by qPCR, the gene expression of the transcription factors T-bet, GATA-3, ROR γ t and FoxP3 in this cell phenotype and we verified the relationship of this cell phenotype by tumor subtypes and the age of the patients. Furthermore, we analyzed in vitro whether Th IL-12+ could be induced in samples from non-cancer patients when in contact with the serum obtained from samples from patients with advanced cancer. Thus, we demonstrated that the tumor subtypes, as well as the age of the patients evaluated in this study, did not influence the presence of Th IL-12+. We also demonstrated that the study phenotype expresses the ROR γ t factor and that the serum of patients with advanced cancer is able to induce the differentiation of Th IL-12+. Therefore, this work provides evidence that the auxiliary T lymphocytes that produce IL-12 may be a cell type that occurs under conditions of chronic stimulation of the immune system, and that if studied more comprehensively, it may be a possible prognostic indicator of chronicity of the disease. However, further investigations are necessary to understand the real molecular and/or epigenetic mechanisms that may be associated with these lymphocytes.

Keywords

Immunology, Cancer, Immune response, Antitumor Response, Interleukin-12.

1 INTRODUÇÃO

O principal mecanismo de erradicação do tumor na resposta imunológica antitumoral envolve linfócitos T citotóxicos (CTL; CD3+CD8+). Porém, os linfócitos T auxiliares (Th; CD3+CD4+), quando ativados, fornecem sinais para o desenvolvimento de T CTL. Os Th são caracterizados como células da resposta imunológica adaptativa, produtoras de diversas citocinas. Possuem a propriedade de se diferenciarem em subconjuntos distintos, a depender do padrão de estimulação recebido. Assim, os Th são parte essencial do desencadeamento de respostas imunológicas eficientes. O desequilíbrio entre seus diferentes clones pode levar ao desenvolvimento e/ou manutenção de processos patológicos específicos, como o câncer (FONSECA; DRANOFF, 2008).

Diferentes parâmetros são usados para diferenciar os subgrupos de linfócitos Th, como o perfil transcricional e as citocinas secretadas (MURPHY; STOCKINGER, 2010). Nesse contexto, T-bet é o principal fator de transcrição descrito na caracterização de linfócitos Th1 (LAZAREVIC; GLIMCHER; LORD, 2013), GATA-3 para Th2 (XIE *et al.*, 2015), ROR γ t para Th17 (ZHENG, 2013) e FoxP3 para os linfócitos T regulatórios (Treg) (RICCIARDELLI *et al.*, 2008).

Das diversas citocinas produzidas pelo sistema imunológico, a interleucina-12 (IL-12) é uma citocina crucial na diferenciação do fenótipo Th1, desempenhando papel regulador nas interações que ocorrem entre as células da resposta imune. Porém, não há estudos que demonstrem a secreção de IL-12 por células Th1, uma vez que sua fonte primária é observada em macrófagos ativados e células dendríticas (TRINCHIERI, 1995).

Anteriormente esse grupo demonstrou que pacientes com câncer em estágios avançados submetidos à imunoterapia com células dendríticas autólogas apresentavam expressão de IL-12 em linfócitos Th periféricos (RODRIGUES *et al.*, 2011). Um estudo adicional demonstrou que a IL-12 foi expressa e sintetizada por linfócitos Th de amostras de sangue periférico de pacientes com câncer ginecológico e de mama avançado. O mesmo foi observado em camundongos com tumores de mama induzidos pelo 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) (MICHELIN *et al.*, 2013).

No entanto, ainda não é claro se o sítio tumoral e a idade das pacientes, assim como outros possíveis fatores, não mencionadas nesse trabalho, possuem correlação com esse fenótipo celular. E mais, se o fato da estimulação crônica do sistema imune pela presença de células tumorais sustentaria a presença desse fenótipo. Também não há dados de qual subgrupo de Th está associado a essa produção de IL-12.

Vale ressaltar que a pesquisa básica da caracterização de células imunes pode favorecer o entendimento de possíveis adaptações ou heterogeneidade celular capazes de modular os mecanismos imunes. Essas informações a curto e médio prazo podem ser incorporadas como possíveis marcadores da atividade do sistema imune, auxiliando no manejo clínico adequado dos pacientes. Além de que, a verificação da rede transcricional é fundamental para entender como condições crônicas, como o câncer, podem atuar no sistema imunológico.

Diante dessas informações, o objetivo desse estudo foi avaliar a presença de células T auxiliares produtoras de IL-12 (Th IL-12+) e a sua expressão quanto aos fatores de transcrição T-bet, GATA-3, ROR γ t e FoxP3 em amostras de pacientes com câncer avançado. E ainda verificar se fatores séricos dos pacientes poderiam contribuir para o desenvolvimento desse fenótipo, visto que partimos da ideia de que a produção de IL-12 por linfócitos T auxiliares ocorre em situações de estimulação crônica do sistema imunológico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS***Sujeitos da pesquisa – pacientes e controles***

Amostras de sangue periférico foram coletadas de pacientes com câncer ginecológico e de mama em estágio avançado na Clínica de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) e Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON). Foram incluídas 35 pacientes (faixa etária entre 36 e 83 anos; média 58,02) com diagnóstico de câncer avançado e que não receberam tratamento ou que haviam finalizado o tratamento no mínimo há 2 meses. Os sítios primários dos tumores foram os seguintes: Cervical uterino (n=09), Endométrio (n=06), Ovário (n=05), Vulva (n=03) e Mama (n=12). As amostras do grupo controle foram obtidas de 15 doadoras, com idades entre 23 e 70 anos, sem histórico de processos patológicos nos últimos seis meses. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM (protocolo nº 683-2006) e todos os sujeitos envolvidos foram informados sobre as intenções da pesquisa e confirmaram a adesão por meio de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os procedimentos realizados no estudo estão de acordo com a Declaração de Helsinque (1964), com suas posteriores alterações.

Ensaio *in vitro*: cultura de células mononucleares de sangue periférico e soro

Amostras de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) dos controles saudáveis foram colocadas em meio de cultura com soro sanguíneo (BS), para investigação se fatores séricos das pacientes com câncer avançado estariam envolvidos na presença do fenótipo em análise. Os leucócitos foram separados por solução Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare®) e submetidos a duas lavagens em solução RPMI incompleta (Sigma-Aldrich®) a 805xg, 4°C por 10 minutos. As células foram incubadas em garrafas de cultura ($32,5 \times 10^6$ células em um volume de 7,5 mL) em solução RPMI completa (Sigma-Aldrich®) contendo 0,24% HEPES, 10% soro bovino fetal, 1% L-glutamina, 1% gentamicina/estreptomicina, 0,1% 2-mercaptoetanol, 0,22% de bicarbonato de sódio e 0,1% piruvato de sódio, e mantidos a 5% CO₂, a 37°C. Após 4 horas, 1/3 das culturas foram estimuladas com 300 µL de BS de controles saudáveis (BS-I), 1/3 estimuladas com BS de pacientes com câncer avançado (BS-II) e os restantes 1/3 não receberam nenhum tipo de estímulo (non-BS). As concentrações do BS não foram previamente averiguadas. Após 48h de incubação, as células foram submetidas protocolo de citometria de fluxo.

Citometria de fluxo

As amostras de sangue periférico dos pacientes e controles foram coletadas, o soro foi separado por centrifugação e mantido a -80°C até o uso nos experimentos *in vitro*. As células leucocitárias foram analisadas por citometria de fluxo (pacientes controles, pacientes com câncer avançado e os grupos das culturas celulares). Os dados foram adquiridos em FACSAria IIITM BD com princípio de

sorting (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). As marcações foram feitas com uso de anticorpos BD Pharmigen™; para marcações extracelulares utilizamos CD3 FITC e CD4 PerCP.Cy 5.5, e para marcações intracelulares utilizamos IL-12 PE. Os respectivos marcadores de isotipos também foram utilizados. As amostras CD3+CD4+IL-12+ dos pacientes com câncer ainda foram separadas, de acordo com instruções do equipamento, e posteriormente foram submetidas a extração e RNA, confecção cDNA e análise por qPCR.

Estratégia de Gating: os linfócitos foram inicialmente bloqueados com base no tamanho e granularidade (FSC x SSC). Na população de linfócitos foi selecionada uma *gate* para isolar as células CD3+. A partir dessa *gate*, uma análise CD4 vs. IL-12 foi determinada para avaliação das células duplamente positivas (aquisição de células T CD3+CD4+IL-12+).

Extrações de RNA e RT-qPCR (quantitative reverse transcription Polymerase Chain Reaction)

As células T CD3+CD4+IL-12+ de pacientes com câncer obtidas por *sorting* (FACS Aria IIITM BD com princípio de *sorting*), tiveram o RNA total isolado usando TRIzol® (Thermo Fisher Scientific®). O RT-qPCR foi realizado em ensaio de duas etapas. O DNA complementar (cDNA) foi obtido de acordo com o protocolo da Reverse Transcriptase SuperScript® II (Invitrogen®). A expressão gênica foi determinada utilizando GoTaq qPCR Master Mix with BRYT Green® (Promega®). β -actina foi utilizada como gene para a normalização da expressão do gene alvo. Os *primers* específicos usados foram: β -actina (temperatura anelamento: 60°C) - *forward*, GTGGGGCGCCCCAGGCACCA e *reverse*, CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC; T-bet (temperatura anelamento: 58°C) - *forward*, CGGCTGCATATCGTTGAGGT e *reverse* GTCCCCATTGGCATTTCCTC; GATA-3 (temperatura anelamento: 57.5°C) - *forward* TCATTAAGCCCAAGCGAAGG e *reverse* GTCCCCATTGGCATTTCCTC; ROR γ t (temperatura anelamento: 61°C) - *forward* GCAGCGCTCCAACATCTTCT e *reverse* ACGTACTGAATGGCCTCGGT; e FoxP3 (temperatura anelamento: 58°C) - *forward* CACCTGGCTGGGAAAATGG e *reverse* GGAGCCCTTGTCGGATGA. A sequência de *primers* foram obtidas em LIN et al., 2015 (LIN et al., 2015). A análise da expressão gênica foi realizada no 7900HT Fast Real-Time PCR (Life Technologies®) e os resultados analisados por SDS 2.4, Inc. software. Os dados foram expressos/representados por quantificação relativa.

Análise estatística

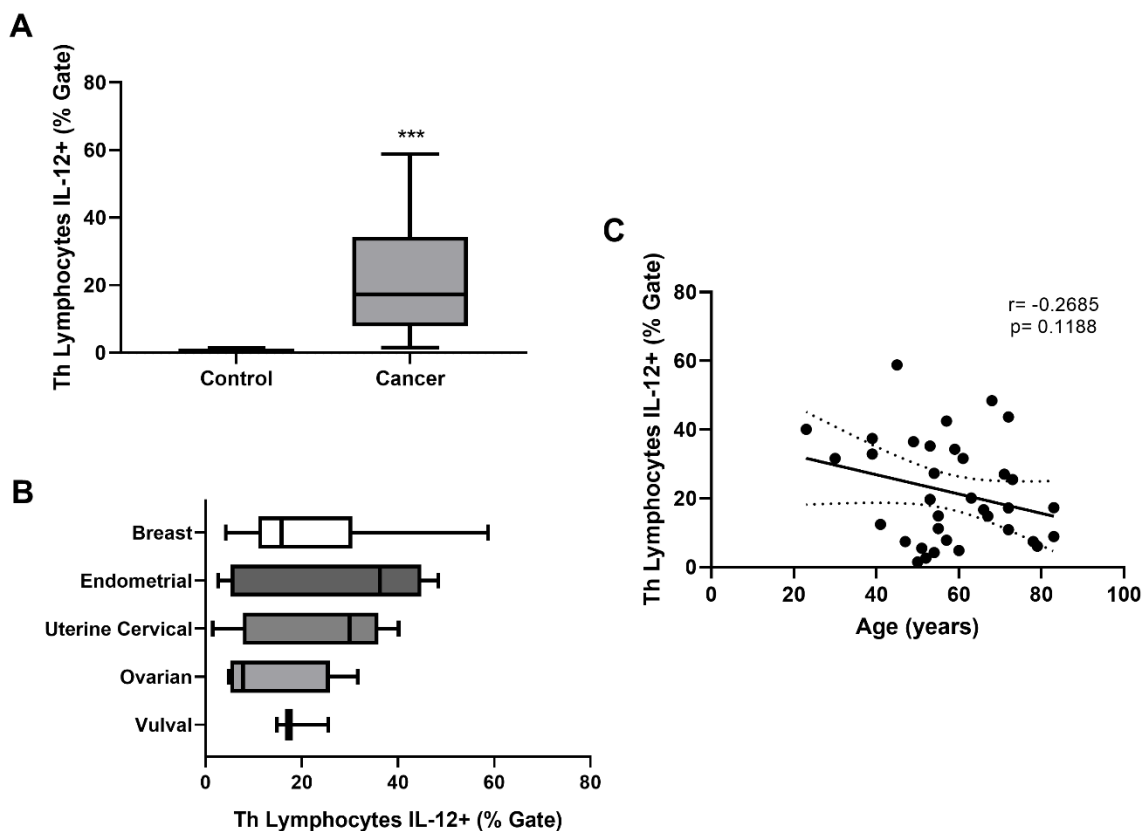
Para análises comparativas entre grupo controle e câncer foi utilizado *Mann-Whitney*. Para as análises entre os diferentes tipos de tumores do grupo câncer foi utilizado *Kruskal-Wallis* com pós teste de *Dunn*. Correlação de *Pearson* e regressão linear foram realizadas para determinar as correlações entre a porcentagem de *gate* de Th IL-12+ com a idade, e a expressão gênica de ROR γ t, apenas em pacientes com câncer. Para todas as análises, $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3 RESULTADOS

Linfócitos T auxiliares de pacientes com câncer em estágio avançado expressam IL-12 e o fator de transcrição ROR γ t

Inicialmente foi observada a presença de linfócitos Th IL-12+ em amostras de PBMC por citometria de fluxo. Observou-se que a porcentagem de *gate* de linfócitos T que expressam IL-12 foi significativamente maior em pacientes com câncer (17,30; 1,50 – 58,80) em comparação aos controles saudáveis (0,23; 0,01 – 1,38) ($p < 0,0001$; Figura 1A). Não foi observada significância na avaliação das porcentagens de *gate* entre os diferentes tipos de tumores que compunham o grupo câncer ($p = 0,6353$; Figura 1B). Na correlação entre percentual de Th IL-12+ e a idade das pacientes do grupo câncer não foi observada significância ($r = -0,2685$; $p = 0,1188$; Figura 1C). Esses achados nos levam a crer que o desenvolvimento/aparecimento de Th IL-12+ pode estar relacionado ao estágio avançado da doença e não algum subtipo específico de tumor, e tampouco a idade das pacientes.

Figura 1. Expressão de IL-12 por linfócitos T CD3+CD4+ no sangue periférico de pacientes com câncer e a influência da idade ou do tipo de câncer. A. Porcentagem da expressão de IL-12 em linfócitos T CD4+ obtidos de amostras de sangue periférico de pacientes com tumor e controles, com dupla marcação. B. Porcentagem de CD3+CD4+IL-12+ por subtipos de câncer analisados neste estudo ($p = 0,6353$). C. Correlação entre a idade do paciente e a porcentagem de CD3+CD4+IL-12+. *** $p < 0,0001$. IL-12, interleucina-12.

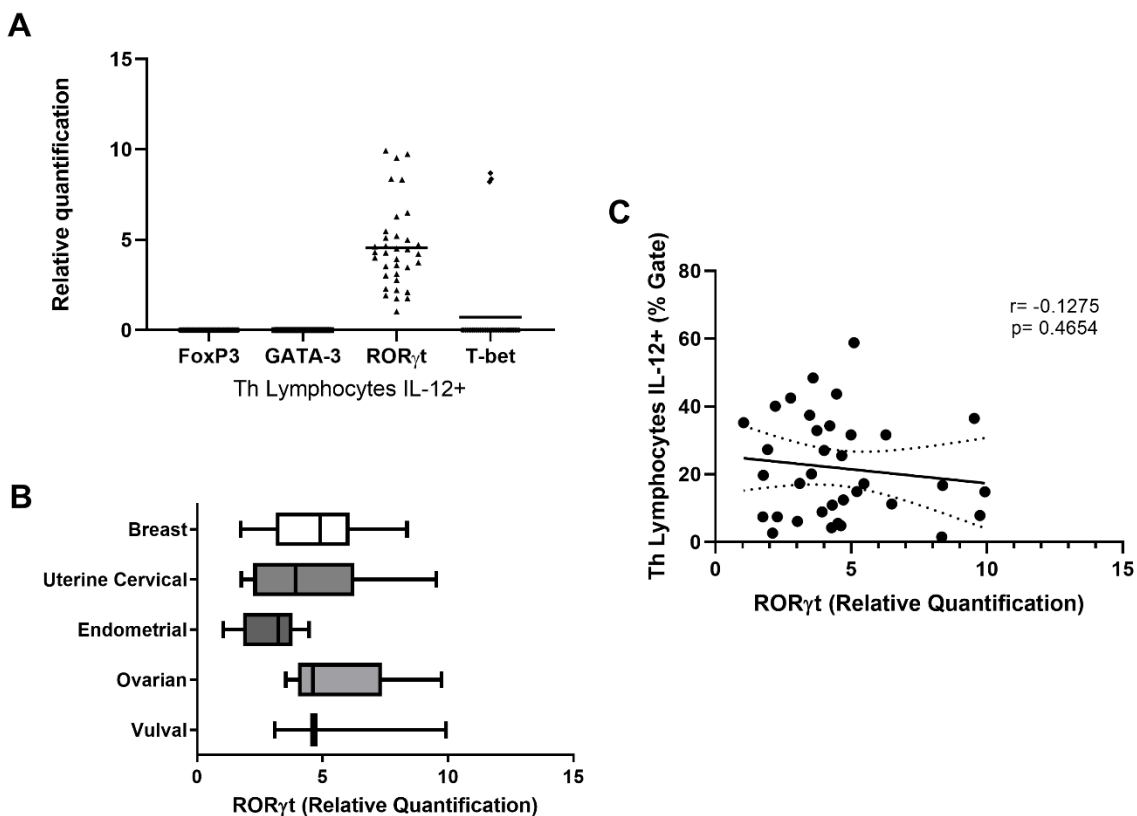


Os Th IL-12+ (CD3+CD4+IL-12+) identificados na citometria de fluxo no grupo câncer foram separados por *sorting* e submetidos a extração de RNA total para realização de RT-qPCR para os genes de fatores de transcrição chave de subtipos de Th, T-bet, GATA-3, FoxP3 e ROR γ t. Além das

citocinas secretadas por cada subtipo de Th, os fatores de transcrição são considerados marcadores moleculares dos diferentes fenótipos. β -actina foi utilizada como gene controle endógeno. Foi observado que todas as 35 amostras do grupo câncer expressavam o fator de transcrição ROR γ t (4,280; 1,033-9,928) e apenas três amostras expressavam o fator de transcrição T-bet. Nenhum nível de expressão gênica para os fatores de transcrição GATA-3 e FoxP3 foi detectado para essa técnica (Figura 2A).

Analisando os níveis de expressão de ROR γ t por cada grupo de tumores, não foi observada significância ($p=0,1517$; Figura 2B). Além disso, não foi observada significância na correlação entre ROR γ t e a porcentagem de Th IL-12+ ($r = -0,1275$, $p = 0,4654$; Figura 2C).

Figura 2. Expressão de ROR γ t por linfócitos T CD3+CD4+IL-12+ obtidos de pacientes com câncer e correlação com os subtipos. A. Quantificação relativa de FoxP3, GATA-3, ROR γ t, e T-bet de PBMC em pacientes com câncer. B. Quantificação relativa de ROR γ t pelos subtipos de câncer analisados neste estudo ($p=0,1517$). C. Correlação entre a quantificação relativa de ROR γ t e a porcentagem de CD3+CD4+IL-12. PBMC: células mononucleares do sangue periférico (do inglês: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*). Quantificação relativa representada por $\Delta\Delta$ Ct (Ct: Cycle Threshold).



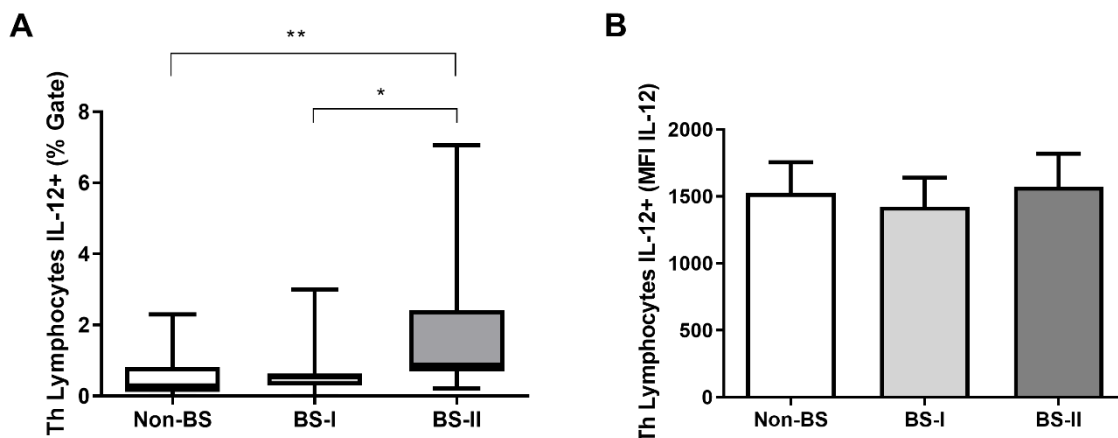
Os fatores séricos em pacientes com câncer avançado podem induzir a diferenciação de linfócitos T CD3+CD4+ IL-12+

Buscando entender as condições que Th IL-12+ estão presentes, foi realizada a incubação de PBMC de doadores saudáveis com o soro dos pacientes do grupo câncer desse estudo. Desta forma, PBMC dos doadores saudáveis foram mantidas em cultura por 48h, sob três diferentes condições: non-

BS (células sem nenhuma estimulação com soro), BS-I (células estimuladas com soro de pacientes saudáveis) e BS-II (células estimuladas com soro de pacientes com câncer avançado). Em seguida, as células foram avaliadas por citometria de fluxo para os marcadores CD3, CD4 e IL-12.

Foi observado um aumento significativo na porcentagem de Th 12+ em BS-II (0,88; 0,2 – 7,05) em comparação com BS-I (0,53; 0 - 30) e non-BS (0,30; 0 - 2,29) ($p=0,0029$; Figura 3A). Esses resultados sugerem que a presença de fatores séricos em pacientes com câncer avançado pode induzir a diferenciação de Th IL-12+. Na análise da intensidade média de fluorescência (MFI) da IL-12 não foram encontradas alterações significativas ($p=0,9260$; Figura 3B).

Figura 3. Indução *in vitro* de IL-12 pelos linfócitos T CD4+ em PBMC de doadores saudáveis com soro de pacientes com câncer. A. Porcentagem de linfócitos T CD3+CD4+IL-12+. B. Intensidade de fluorescência de IL-12 representada por MFI. ** $p=0,0029$. MFI: Intensidade Média de Fluorescência (do inglês: *Mean Fluorescence Intensity*). Non-BS: controle negativo, com células sem incubação com soro; BS-I: controle positivo, com células incubadas com soro de pacientes saudáveis; BS-II: células incubadas com soro de pacientes com cancer avançado. PBMC: células mononucleares do sangue periférico (do inglês: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*).



4 DISCUSSÃO

As diferentes interações entre células imunes e células tumorais não são totalmente compreendidas. Neste trabalho e em outros desenvolvidos pelo grupo, foi demonstrado que as células T auxiliares possuem capacidade de expressar IL-12 intracelularmente. Então, de acordo com os resultados aqui demonstrados, foi observado que a porcentagem desses linfócitos é maior em pacientes com câncer avançado em comparação a indivíduos saudáveis. Na análise da expressão gênica, observou-se ainda que T auxiliares produtoras de IL-12 expressam o fator de transcrição ROR γ t, com exceção de três amostras, que além de ROR γ t também expressam T-bet.

A resposta imune antitumoral em vários tipos de carcinomas é mediada por IL-12, sendo essa citocina uma potencial candidata em imunoterapias tumorais, por ativar tanto respostas imunes inatas quanto adquiridas. No entanto, não há relação da produção de IL-12 com ROR γ t. Na realidade, estudos demonstraram que a IL-12 regula a expressão de ROR γ t negativamente (LAZAREVIC; GLIMCHER; LORD, 2013; LEXBERG *et al.*, 2008; MUKASA *et al.*, 2010), o que não justificaria situação em via

oposta, já que a maioria das produções de citocinas acontece também por uma alça de retroalimentação.

Embora ROR γ t seja descrito como um fator de transcrição em células Th17, junto a ROR α (YANG *et al.*, 2007), vale ressaltar que a expressão de citocinas por um perfil celular não é apenas determinada por reguladores únicos e específicos (YANG *et al.*, 2008). E mesmo que já se tenha demonstrado a plasticidade dos linfócitos T auxiliares, incluindo Th17 e o fator ROR γ t, nenhum caso ainda os correlacionam com a síntese de IL-12. Pois o observado é que essa citocina inibe esse fator. No entanto, vale ressaltar que o câncer modifica o hospedeiro sistematicamente, desencadeando mecanismos que não são claros.

Em três amostras foi verificada expressão simultânea de ROR γ t e T-bet. Alguns estudos mostram que a capacidade de Th17 em se diferenciar em Th1 ocorre em alguns microambientes, consequentemente mudando o perfil de citocinas que é secretado por essas células (LAZAREVIC; GLIMCHER; LORD, 2013). Quando as células Th17 respondem a IL-12, elas são convertidas em um fenótipo Th17/Th1 que expressa ROR γ t, T-bet, CXCR3, CCR6, CD161 e IL-23R. A presença contínua de IL-12 converte células Th17/Th1 em um fenótipo Th1 (semelhante a Th1). No entanto, esse mecanismo ainda não foi totalmente descrito (COSMI *et al.*, 2008; LAZAREVIC; GLIMCHER; LORD, 2013; WANG, Yan *et al.*, 2014).

Nas buscas junto à literatura não foram encontrados dados referentes a expressão de IL-12 em Th. Porém ainda não é possível afirmar que T auxiliares produtoras de IL-12 estão presentes apenas em pacientes com câncer ginecológico e de mama avançados. Esses achados levantam o questionamento se essa observação está relacionada a outras doenças crônicas, ou ainda se pode ser uma forma que o sistema imune articulou para adaptar-se à atividade tumoral ou até mesmo um marcador da exaustão do sistema imune.

Assim, quando os leucócitos de doadores saudáveis são incubados com o soro de pacientes com câncer avançado, foi observada uma diferenciação marcante de células Th produtoras de IL-12. O mesmo não foi encontrado em culturas estimuladas com soro de indivíduos saudáveis. Esses dados indicam a presença de alguns fatores séricos em pacientes com câncer, capazes de promover a diferenciação do fenótipo T CD3+CD4+IL-12 + *in vitro*.

Kuka *et al.* demonstraram que TCR $\alpha\beta$ + de células de baço de camundongos e sangue periférico humano (expressando CD11c e MHC II) expressaram IL-12 quando estimulados com ativadores policlonais (KUKA; MUNITIC; ASHWELL, 2012). No entanto, é importante considerar que as culturas deste trabalho foram realizadas com leucócitos totais e não apenas linfócitos, o que pode indicar que algum outro mecanismo possa ter influenciado na geração de Th produtoras de IL-12.

Apesar de estudos indicarem a influência da idade nas interações do sistema imune, (DJIKIĆ *et al.*, 2014; FRANCESCHI *et al.*, 2007; FÜLÖP *et al.*, 2016; WANG, Ying *et al.*, 2019; WILSON *et*

al., 2017), nos dados desse trabalho não foi estabelecida uma relação entre idade (envelhecimento) e a presença de células Th produtoras de IL-12. Também não foi observada diferença estatística na porcentagem do fenótipo entre os tipos de tumores. Isso leva a crer que não é o tipo de tumor, mas o estágio avançado da doença, que leva ao aparecimento da célula estudada.

Estudos têm demonstrado que processos patológicos crônicos, como o câncer, fazem com que as células T sejam expostas a sinais inflamatórios persistentes. Isso está associado ao declínio da função das células T, levando a um estado alterado de diferenciação, denominado depleção das células T. Esse estado se manifesta com várias características, como perda progressiva das funções efetoras, regulação positiva de múltiplos receptores inibitórios, expressão alterada de fatores de transcrição e alterações metabólicas (WHERRY; KURACHI, 2015).

A compreensão de como ocorre a coordenação transcricional da exaustão de células T, e de como as redes transcricionais podem mudar ao longo do tempo, avançou no âmbito da epigenômica. Principalmente para entender em que contexto atuam os fatores de transcrição, afinal, ainda não existem dados sobre o panorama epigenético para células T depletadas (WHERRY; KURACHI, 2015). A questão real é se a abordagem de reprogramação mudaria as funções como sabemos. Embora este seja um ponto importante, a forma dessa abordagem pode ser um desafio para implementação/interpretação na clínica (WHERRY, 2011; WHERRY; KURACHI, 2015). No entanto, a análise de outros tipos de tumores é necessária.

5 CONCLUSÃO

Os dados evidenciam de que a estimulação crônica do sistema imunológico leva à ocorrência do fenótipo de estudo, linfócitos Th produtores de IL-12. Algumas questões ainda precisam ser respondidas, como o papel desse fenótipo frente a atividade tumoral (adaptação ou escape). Vale ressaltar que estudos prospectivos adicionais devem ser considerados, assim como a correlação com outros dados, como outros tipos de cânceres, outras fases do desenvolvimento tumoral e até mesmo outras doenças. É necessário ainda estudos para compreensão da função da IL-12 e o papel de ROR na relação da expressão dessa citocina.

AGRADECIMENTOS

O trabalho foi financiado por meio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (n° 302011/2015-3); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (n° Rede 11/14); e Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (n° 255/2012).

REFERÊNCIAS

COSMI, Lorenzo *et al.* Human interleukin 17–producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 205, n. 8, p. 1903–1916, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20080397>

DJKIĆ, Jasmina *et al.* Age-associated changes in rat immune system: Lessons learned from experimental autoimmune encephalomyelitis. **Experimental Gerontology**, [s. l.], v. 58, p. 179–197, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.08.005>

FONSECA, Catia; DRANOFF, Glenn. Capitalizing on the Immunogenicity of Dying Tumor Cells. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 1603–1608, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-2245>

FRANCESCHI, Claudio *et al.* Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. **Mechanisms of Ageing and Development**, [s. l.], v. 128, n. 1, p. 92–105, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.11.016>

FÜLÖP, Tamas *et al.* The Role of Immunosenescence in the Development of Age-Related Diseases. **Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 84–91, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27103044>

KUKA, Mirela; MUNITIC, Ivana; ASHWELL, Jonathan D. Identification and characterization of polyclonal $\alpha\beta$ -T cells with dendritic cell properties. **Nature Communications**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1223, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms2223>

LAZAREVIC, Vanja; GLIMCHER, Laurie H.; LORD, Graham M. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 777–789, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri3536>

LEXBERG, Maria H. *et al.* Th memory for interleukin-17 expression is stable in vivo. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 38, n. 10, p. 2654–2664, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/eji.200838541>

LIN, Ze-Wei *et al.* The Expression Levels of Transcription Factors T-bet, GATA-3, ROR γ t and FOXP3 in Peripheral Blood Lymphocyte (PBL) of Patients with Liver Cancer and their Significance. **International Journal of Medical Sciences**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 7–16, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/ijms.8352>

MICHELIN, Márcia A. *et al.* Peripheral Helper Lymphocytes Produce Interleukin 12 in Cancer Patients. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, [s. l.], v. 7, p. CMO.S11292, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4137/CMO.S11292>

MUKASA, Ryuta *et al.* Epigenetic Instability of Cytokine and Transcription Factor Gene Loci Underlies Plasticity of the T Helper 17 Cell Lineage. **Immunity**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 616–627, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.04.016>

MURPHY, Kenneth M.; STOCKINGER, Brigitta. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 674–680, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni.1899>

RICCIARDELLI, Ida *et al.* Anti tumour necrosis- α therapy increases the number of FOXP3 +

regulatory T cells in children affected by Crohn's disease. **Immunology**, [s. l.], v. 125, n. 2, p. 178–183, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02839.x>

RODRIGUES, Cláudia M. *et al.* The Role of T Lymphocytes in Cancer Patients Undergoing Immunotherapy with Autologous Dendritic Cells. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, [s. l.], v. 5, p. CMO.S6927, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4137/CMO.S6927>

TRINCHIERI, Giorgio. Interleukin-12: A Proinflammatory Cytokine with Immunoregulatory Functions that Bridge Innate Resistance and Antigen-Specific Adaptive Immunity. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 251–276, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.13.040195.001343>

WANG, Yan *et al.* The Transcription Factors T-bet and Runx Are Required for the Ontogeny of Pathogenic Interferon- γ -Producing T Helper 17 Cells. **Immunity**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 355–366, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.002>

WANG, Ying *et al.* Aging of the immune system causes reductions in muscle stem cell populations, promotes their shift to a fibrogenic phenotype, and modulates sarcopenia. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 1415–1427, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.201800973R>

WHERRY, E. John. T cell exhaustion. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 492–499, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ni.2035>

WHERRY, E. John; KURACHI, Makoto. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 486–499, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri3862>

WILSON, Daisy *et al.* Frailty and sarcopenia: The potential role of an aged immune system. **Ageing Research Reviews**, [s. l.], v. 36, p. 1–10, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.01.006>

XIE, Feng *et al.* The infiltration and functional regulation of eosinophils induced by TSLP promote the proliferation of cervical cancer cell. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 364, n. 2, p. 106–117, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.04.029>

YANG, Xuexian O. *et al.* STAT3 Regulates Cytokine-mediated Generation of Inflammatory Helper T Cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 282, n. 13, p. 9358–9363, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.C600321200>

YANG, Xuexian O. *et al.* T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors ROR α and ROR γ . **Immunity**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 29–39, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.016>

ZHENG, Song Guo. Regulatory T cells Versus Th17: Differentiation of Th17 Versus Treg, Are They Mutually Exclusive? *In: IL-17, IL-22 AND THEIR PRODUCING CELLS: ROLE IN INFLAMMATION AND AUTOIMMUNITY*. **Basel: Springer Basel**, 2013. p. 91–107. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0522-3_6