



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

**JOÃO ABRANCHES DE FIGUEIREDO SIMÕES DE CARVALHO**

***O PAPEL DAS CÉLULAS T REGULADORAS, DOS LIGANDOS BAFF E APRIL, E RECETORES BAFF-R E TACI, NO CANCRO E AUTOIMUNIDADE***

**ARTIGO CIENTÍFICO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA/MEDICINA INTERNA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:  
PROFESSORA DOUTORA ANA BELA SARMENTO CRUZ RIBEIRO  
PROFESSORA DOUTORA LELITA SANTOS**

**ABRIL 2014**

**O PAPEL DAS CÉLULAS T REGULADORAS, DOS LIGANDOS  
BAFF E APRIL, E RECEPTORES BAFF-R E TACI, NO CANCRO E  
AUTOIMUNIDADE**

**THE ROLE OF T REGULATORY CELLS, OF LIGANDS BAFF AND APRIL,  
OF THE RECEPTORS BAFF-R AND TACI ON CANCER AND  
AUTOIMMUNITY**

1 – CARVALHO J., 1 – OLIVEIRA G., 2,3,4 - GONÇALVES A.C., 5 - ALVES V., 5- SANTOS ROSA  
M., 4, 6- LELITA SANTOS AND 2,3,4-SARMENTO-RIBEIRO A.B.

1 - MEDICINE STUDENT, FACULTY OF MEDICINE, UNIVERSITY OF COIMBRA, PORTUGAL 2 -  
APPLIED MOLECULAR BIOLOGY UNIT AND UNIVERSITY CLINIC OF HEMATOLOGY,  
FACULTY OF MEDICINE, UNIVERSITY OF COIMBRA, PORTUGAL 3-CENTER FOR  
NEUROSCIENCE AND CELL BIOLOGY (CNC), UNIVERSITY OF COIMBRA, PORTUGAL 4 -  
CIMAGO - CENTER OF INVESTIGATION ON ENVIRONMENT GENETICS AND ONCOBIOLOGY,  
FACULTY OF MEDICINE, UNIVERSITY OF COIMBRA, PORTUGAL 5 - IMMUNOLOGY  
INSTITUTE, FACULTY OF MEDICINE, UNIVERSITY OF COIMBRA, PORTUGAL 6 - INTERNAL  
MEDICINE DEPARTMENT, UNIVERSITY HOSPITAL OF COIMBRA, PORTUGAL.

Parte deste trabalho foi apresentado, e premiado como Melhor Poster da Área de Fisiologia/Imunologia, no:

*7th YES - Young European Students – Meeting, 2012*

Sob a referência:

**ABNORMALITIES IN LYMPHOCYTE POPULATIONS IN AUTOIMUNE DISEASES  
– A PRELIMINARY STUDY**

1 – CARVALHO J\*, 1 – OLIVEIRA G\*, 2,3,4 - GONÇALVES A.C., 5 - ALVES V., 5- SANTOS ROSA M., 4, 6- LELITA SANTOS AND 2,3,4-SARMENTO-RIBEIRO A.B. \*BOTH AUTHORS CONTRIBUTED EQUALLY TO THIS WORK.

1 - Medicine student, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal 2 - Applied Molecular Biology Unit and University Clinic of Hematology, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal 3-Center for Neuroscience and Cell Biology (cnc), University of Coimbra, Portugal 4 - CIMAGO - Center of Investigation on Environment Genetics and Oncobiology, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal 5 - Immunology Institute, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal 6 - Internal Medicine Department, University Hospital of Coimbra, Portugal.

## Abreviaturas

Ac - Anticorpo

APC - Aloficocianina

APRIL – *A proliferation-inducing ligand*

BAFF – *B-cell activating factor*

BAFF-R - *B-cell activating factor receptor*

BCL-3 - *B-cell lymphoma-3*

BCL-X<sub>L</sub> - *B-cell lymphoma-extra large*

BCMA - *B-cell maturation antigen*

BFL-1/A1 - *BCL2-related protein A1*

CD – *Cluster of differentiation*

COX – *Ciclo-oxigenase*

CTL - *Controlos*

CTLA-4 – *Cytotoxic T lymphocyte antigen 4*

DAI – *Doença autoimune*

Fig. – *Figura*

FITC – *Isotiocianato de fluoresceína*

FLICE - *FAS-associated death domain protein (FADD)-like interleukin-1 beta-converting enzyme*

FLIP - *FLICE-like inhibitory protein*

FOXP3 – *Forkhead Box P3*

IFN- $\gamma$  – *Interferão  $\gamma$*

IL - *Interleucina*

IPEX - *Immunodeficiency, poliendocrinopathy and enteropathy X-linked syndrome*

I $\kappa$ B – Inibidor do NF- $\kappa$ B

JAK-STAT – *Janus kinase - Signal transducer and activator of transcription*

LES – Lupus eritematoso sistémico

Linf. - Linfócito

MHC – Complexo maior de histocompatibilidade

MIF – Média de intensidade de fluorescência

NEO – Doença neoplásica

NF- $\kappa$ B – *Nuclear factor kappa B*

NK – *Natural killer*

NKG2D - *Natural killer group 2, member D*

nTreg – Células T reguladoras naturais

PBS – *Phosphate buffered saline*

PE - Ficoeritrina

PE-Cy5 – Ficoeritrina-cianina

PerCP – Peridina de clorofila

Rel - *Reticuloendotheliosis viral oncogene homolog*

SP – Sangue periférico

TACI - *Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand*

(CAML) *interactor*

Tc – Célula T citotóxica

TGF – *Transforming growth factor*

Th – Célula T *helper*

TNF – Factor de necrose tumoral

TRAF – *TNF receptor associated factor*

Treg – Células T reguladoras

## Resumo

**Introdução:** Atualmente, verifica-se um aumento de incidência tanto de doenças oncológicas como de doenças auto-imunes na população em geral. Há diversos mecanismos celulares e vias de sinalização celular envolvidos na doença autoimune e oncológica, no entanto o NF- $\kappa$ B, os ligandos BAFF e APRIL e seus recetores, BAFF-R e TACI, e as células reguladoras T reguladoras são os mais preponderantes.

**Objetivos:** Com este trabalho pretende-se identificar e quantificar o NF- $\kappa$ B, os ligandos BAFF e APRIL e seus recetores, BAFF-R e TACI, e as células T reguladoras, em doentes com doenças auto-imunes e/ou neoplásicas, de modo a contribuir para clarificar o seu papel nestas patologias.

**Métodos:** Foram quantificadas as células T reguladoras (Treg) e avaliada a expressão do BAFF, BAFF-R, TACI e APRIL em doentes com doenças auto-imunes e/ou neoplásicas de modo a analisar o seu papel na fisiopatogenia destas doenças. O estudo foi efetuado em Sangue Periférico (SP) de 11 controlos saudáveis (CTL) e de 76 doentes, dos quais 21 com doenças auto-imunes (DAI), 47 com neoplasias (NEO) e 8 com ambas as patologias (DAI e NEO). Após a colheita do SP, procedeu-se à análise das diferentes populações linfocitárias, com identificação das células Treg, e avaliação da expressão do BAFF, BAFF-R, TACI e APRIL por citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais marcados com sondas fluorescentes. Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados pelo teste Anova, T-student e análise multivariada ( $p < 0.05$ ).

**Resultados:** Na análise dos resultados do linfograma, os linfócitos totais dos doentes DAI e dos doentes NEO encontravam-se diminuídos em comparação com os controlos. Observou-se diminuição significativa de linfócitos B nos doentes com DAI e

doença auto-imune e neoplásica (DAI+NEO) e aumento significativa dos linfócitos T dos doentes com DAI comparativamente aos controlos e aos doentes com neoplasia. As células nTreg dos indivíduos saudáveis (controlos) representam um pequeno nicho de células, no entanto, os diferentes grupos de doentes apresentam aumento significativo desta percentagem de células. Os doentes com neoplasia apresentam aumento da percentagem de células a expressar BAFF comparativamente aos controlos, contrariamente, os doentes com DAI+NEO e os doentes com DAI apresentam menor percentagem destas células. O recetor de superfície BAFF-R revelou maior percentagem de expressão nas células de doentes com DAI+NEO do que nas células dos controlos. A análise do ligando TACI revelou que o grupo de doentes com neoplasia se destacava dos restantes grupos de doentes devido à elevada percentagem de expressão. Por fim, a análise do ligando APRIL revelou que os grupos de doentes com DAI+NEO e os NEO apresentam cerca de 3 vezes mais células com expressão desta molécula comparativamente aos controlos.

**Discussão:** Nos doentes analisados verificou-se aumento significativo das células nTreg nos doentes com DAI, com doença neoplásica e principalmente nos doentes com DAI e neoplasia, possivelmente uma forma das patologias oncológicas gerarem um ambiente imunossupressor e uma tentativa do sistema imune dos doentes com DAI de suprimir a resposta inflamatória anómala. Considerando os ligandos BAFF, BAFF-R, TACI e APRIL, o grupo de doentes com neoplasia, revelou aumento substancial de expressão destes ligandos, revelando que podem ser mecanismos adquiridos de sobrevivência celular em doenças neoplásicas.

**Conclusão:** Comprovou-se que há distúrbios relevantes a nível dos linfócitos B e T, com alteração das suas populações em ambas as patologias. Além disso, os nossos resultados sugerem que as células T reguladoras e os ligandos e recetores relacionados

com o NF- $\kappa$ B, BAFF, APRIL e BAFF-R e TACI, respetivamente, podem participar na fisiopatologia das doenças auto-ímmunes e neoplásicas, podendo eventualmente constituir novos alvos terapêuticos para o tratamento destas patologias.

### **Palavras-chave**

NF- $\kappa$ B; Células Treg; BAFF; APRIL; TACI; autoimuidade; cancro; neoplasia

## Abstract

**Introduction:** Now a day, it's verified that there is an increase of incidence in both oncologic and autoimmune diseases on general population. There are several cellular mechanisms and cellular pathways involved on autoimmune and oncologic pathologies, however, the NF- $\kappa$ B, the ligands BAFF and APRIL and their receptors BAFF-R and TACI and the T regulatory cells are the most preponderant.

**Objectives:** With this work we want to identify and quantify the NF- $\kappa$ B, the ligands BAFF and APRIL, their receptors BAFF-R and TACI, and the T regulatory cells on patients with autoimmune and/or oncologic diseases, so that we can contribute to clarify their role on these pathologies.

**Methods:** The T regulatory cells (Treg) were quantified and it was evaluated the expression of BAFF, BAFF-R, TACI and APRIL in patients with autoimmune and/or oncologic diseases so that his role could be assessed. The study was made on Peripheral Blood (SP) of 11 healthy controls (CTL) and of 76 patients, 21 with autoimmune diseases (DAI), 47 with cancers (NEO) and 8 with both diseases (DAI + NEO). After the SP harvest we proceeded to the analysis of the different lymphocytic populations, with identification of the Treg cells and evaluation of the expression of BAFF, BAFF-R, TACI and APRIL by flow cytometry using fluorescent bind monoclonal antibodies. The results were statistically analyzed by Anova, T-student and multivariate analysis ( $p < 0,05$ ).

**Results:** Upon the linfogram analysis, total lymphocytes from the DAI and NEO patients were decreased in comparison to the controls. It was observed a significant decline of the B lymphocytes on the DAI and DAI+NEO patients and an increase on T lymphocytes on DAI individuals when compared to healthy controls and NEO. The

Treg cells of the controls represented only and small amount of cells, however the different groups of patients presented a significant increase of these cells percentage. Patients with cancer had an increase on BAFF expressing cells comparing to controls, on the other hand, DAI+NEO and DAI individuals showed diminished percentage of these cells. The surface receptor BAFF-R revealed biggest expression on DAI+NEO's cells than in healthy controls' cells. The TACI analysis showed that the group with oncologic disease had high expression that stood alone from the rest of the groups. Finally the APRIL ligand analysis revealed that DAI+NEO and NEO groups of patients had three times more expression of this molecule than the controls.

**Discussion:** On the analyzed patients we verify an significant increase on Treg cells on DAI patients, individuals with oncologic disease and mainly on patients with both diseases, possibly a way of the oncologic pathologies create an immunosuppressor environment and an attempt of the immune system of the DAI patients to suppress the abnormal inflammatory response. Considering the ligands BAFF, APRIL and the receptors BAFF-R and TACI, the group of oncologic patients revealed a substantial increase on their expression, disclosing that they can be acquired mechanisms of cellular survival in oncologic diseases.

**Conclusion:** It was concluded that there are relevant disturbances on B and T lymphocytes, with change on their populations on both pathologies. Furthermore, our results suggest that the T regulatory cells and ligands and receptors related to NF- $\kappa$ B, BAFF, APRIL and BAFF-R and TACI, respectively, can participate on the fisiopathology of autoimmune and oncologic diseases, and eventually can compose new therapeutic targets to the treatment of these illnesses.

## **Keywords**

NF- $\kappa$ B; Treg cells; BAFF; APRIL; TACI; autoimmunity; cancer

## Conteúdo

Abreviaturas.....	3
Resumo .....	5
Palavras-chave .....	7
Abstract.....	8
Keywords.....	10
Introdução.....	12
Objetivo .....	15
Materiais e métodos.....	15
Análise das populações linfocitárias.....	16
Quantificação das células Treg e avaliação da expressão do BAFF, BAFF-R, TACI e APRIL.....	18
Análise estatística .....	19
Resultados.....	19
Análise das populações linfocitárias.....	19
Identificação das células T reguladoras.....	23
Análise da expressão de BAFF, BAFF-R, APRIL e TACI.....	24
Discussão .....	28
Análise das Populações Linfocitárias .....	30
Quantificação das células nT <sub>reg</sub> .....	33
Análise da expressão de BAFF, BAFF-R, APRIL e TACI.....	35
Conclusão .....	37
Bibliografia.....	38

## Introdução

O sistema imune é o responsável pela proteção do nosso organismo de patógenos tanto exógenos como endógenos, sendo altamente adaptativo tanto no reconhecimento antigénico como na resposta. (1) A homeostase imune define-se como a capacidade que o sistema imunitário tem de manter a tolerância aos auto-antígenos (*self*) ao mesmo tempo que reconhece antígenos patogénicos, prevenindo o desenvolvimento de infeções e doenças oncológicas, mas ao mesmo tempo de doenças autoimunes. (2) (3)

Os mecanismos celulares e vias de sinalização celular envolvidos na doença autoimune e oncológica são diversificados, no entanto o NF- $\kappa$ B e as células T reguladoras são os mais preponderantes. (4) (5) (6) (7) A família de fatores de transcrição nucleares NF- $\kappa$ B, nos mamíferos, é constituída por 5 membros, NF- $\kappa$ B<sub>1</sub> (p105/p50), NF- $\kappa$ B<sub>2</sub> (p100/p52), RelA (p65), RelB, e c-Rel. (8) Alguns destes fatores de transcrição encontram-se em todas as células do organismo, sendo fundamentais para o desenvolvimento normal do organismo, no entanto há outros que são expressos primordialmente em tecidos e células linfóides, contribuindo para a sua proliferação e sobrevivência ou contrariamente, para a sua morte celular programada. (9) (10)

A via do NF- $\kappa$ B é regulada pelo I $\kappa$ B (inibidor do NF- $\kappa$ B), sendo este constituído pelo I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , BCL-3 e os domínios do NF- $\kappa$ B<sub>1</sub> e NF- $\kappa$ B<sub>2</sub>, p105 e p100, respetivamente. Estas proteínas ligam-se aos membros da família do NF- $\kappa$ B formando dímeros e inibindo a sua migração para o núcleo e conseqüentemente a transcrição génica. A ativação do NF- $\kappa$ B ocorre por fosforilação conjuntamente com a ubiquitinação das proteínas reguladoras I $\kappa$ B o que conduz à degradação destas no proteasoma e à migração do NF- $\kappa$ B para o núcleo. (8)

Na maioria do tecido linfóide, a ativação deste grupo de proteínas induz a transcrição de moléculas anti-apoptóticas nomeadamente das vias do TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, BCL-X<sub>l</sub>, BCL-2-related protein A1 (BFL-1/A1) e FLICE-like inhibitory protein (FLIP). (8) Adicionalmente a sua ativação leva à proliferação e está envolvida na co-estimulação dos linfócitos T, à sua proliferação e *class-switching* dos linfócitos B. (11)

O BAFF (*B-cell-activating factor*) e o APRIL (*a proliferation-inducing ligand*) são ligandos da família do TNF (*Tumor Necrosis Factor*) que interagem com os seus recetores BAFF-R (*BAFF Receptor*), TACI (*transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand (CAML) interactor*), APRIL-R (*APRIL Receptor*) e BCMA (*B-cell maturation antigen*). Estes ligandos podem ser encontrados na forma de proteínas com domínios transmembranares (tipo II) ou como ligandos solúveis, obtidos por clivagem do original. São proteínas altamente específicas, no entanto, com funcionalidade redundante. Assim, o BAFF tanto pode ativar o receptor BAFF-R (*receptor*) como o TACI. O APRIL pode-se unir ao TACI e ao BCMA e ainda o BAFF pode-se ligar com baixa afinidade ao BCMA. Biologicamente a sua ativação origina respostas anti-apoptóticas bem como proliferação celular mediada primariamente pela ativação do NF- $\kappa$ B. (12)

Devido ao papel anti-apoptótico e proliferativo destes ligandos têm sido considerados proto-oncogénicos, participando no mecanismo de tumorigenese de diversos tipos de cancro patologias, entre os quais o cancro colo-retal e o mieloma múltiplo. No entanto, têm sido também implicadas no desenvolvimento de patologia auto-imune, nomeadamente de Lupus Eritematoso Sistémico (LES). (5) (13) (14)

As células T reguladoras (Treg) são um subtipo de linfócito T que expressa na sua superfície CD4 e CD25 e o fator transcrição nuclear FOXP3 (*Forkhead Box P3*).

(15) Há dois tipos de células Treg, naturais e adaptativas ou induzidas, no entanto, a sua função de supressão das células T efetoras através do bloqueio da sua ativação ou função são sobreponíveis. (16) As células Treg ditas naturais são produzidas no timo, nos chamados corpúsculos de Hassal, e expressam constitutivamente o recetor de cadeia  $\alpha$  da IL-2 (Interleucina 2), também denominado CD25. A IL-2 parece ser de extrema importância para o desenvolvimento de Treg pois a sua ausência em experiências com ratinhos leva a alterações graves nesta população de células. (2) (15) Muitos outros marcadores de superfície, recetores e fatores de transcrição são expressos pelas Treg, no entanto destaca-se um fator de transcrição específico, o *Forkhead Box P3* (FOXP3), que é fundamental para o desenvolvimento e função destas células. As Treg induzidas ou adaptativas são geradas periféricamente, quando expostas a estímulos específicos. Sabe-se por exemplo que células T naive, quando estimuladas num ambiente rico em TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor beta*) e IL-2, vão evoluir para Treg com expressão de FOXP3. (16) Alguns tipos de Treg induzidos incluem as TR1, que são células produtoras de IL-10, as TR3 produtoras de TGF- $\beta$ , as células gama-delta e mesmo as células CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>. Devido à diversidade de Treg induzidas, as células Treg naturais constituem apenas 5 a 10% das células reguladoras totais. (17)

As células reguladoras expressam assim alguns elementos fulcrais, o CD25, o CD4 e o FOXP3, necessário à sua função e desenvolvimento normal. As alterações, tanto nos genes como na expressão destas proteínas, conduzem à ineficiência da regulação imune, contribuindo tanto para o desenvolvimento de fenómenos auto-imunes como para a maior suscetibilidade para desenvolvimento tumoral. O excesso de ação ou do número de células Treg vai causar anergia do sistema imune, evitando a ativação imune. Este fenómeno é conhecido e explica a existência de Treg no microambiente de tumores sólidos, contribuindo para a sua evasão ao sistema imune. (18) (19) Por outro

lado, um decréscimo da ação destas células causa hiperatividade do sistema imune, contribuindo para doenças autoimunes. Um caso extremo desta hiperatividade é a síndrome IPEX (do inglês *Immunodeficiency, Poliendocrinopathy and enteropathy X-linked syndrome*), em que a deleção funcional no FOXP3 impede a formação de Treg criando assim um fenótipo de múltiplas doenças auto-imunes com sobrevivência média até aos 2 anos de idade. (2)

Como descrito anteriormente, existem diversos pontos comuns entre as doenças auto-imunes e as doenças neoplásicas que já foram avaliados isoladamente. No entanto, não foi investigado a interação entre estes diversos elementos, nem a sua utilidade como novos alvos terapêuticos. Finalmente, também não é conhecido o impacto da terapêutica atual utilizada nos diferentes tipos de doenças auto-imunes ou neoplásicas e de que forma podem afetar estes fatores e induzir melhoria clínica.

## **Objetivo**

O objetivo deste trabalho é quantificar as células T reguladoras (Treg) e avaliar a expressão e o papel do BAFF, BAFF-R, TACI e APRIL em doentes com doenças auto-imunes e/ou neoplásicas. Deste modo, espera-se contribuir para a identificação de vias de sinalização celular comuns a estas duas patologias que possam constituir marcadores de diagnóstico precoce, assim como facilitar o desenvolvimento de novos tratamentos dirigidos que procurem restaurar a homeostasia imune.

## **Materiais e métodos**

O estudo foi efetuado em Sangue Periférico (SP) de 11 controlos saudáveis (CTL) e de 76 doentes, dos quais 21 com doenças auto-imunes (DAI: Granulomatose de Wegener, Sarcoidose Ganglionar, Polimialgia Reumática, Esclerose Sistémica Difusa e

Limitada, Tiroidite Autoimune, Doença do Tecido Conjuntivo não diferenciada, Síndrome dos Anticorpos Fosfolipídicos, Artrite Psoriática, Doença de Behçet), 47 com neoplasias (NEO: Cancro Colo-retal, Síndrome Mielodisplásica, Mieloma Múltiplo e Leucemia Mielóide Crónica) e 8 com ambas as patologias (doenças auto-imunes e neoplásicas – NEO/DAI: concomitância de Mieloma Múltiplo com Polimialgia Reumática ou Artrite Reumatóide e concomitância de Síndrome Mielodisplásica com Polimialgia Reumática, Padrão Granular Fino Denso e Anemia Perniciosa), como representado na Tabela 1.

Após a colheita do SP, procedeu-se à análise das diferentes populações linfocitárias, com identificação das células Treg, e a avaliação da expressão do BAFF, BAFF-R, TACI e APRIL por citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais marcados com sondas fluorescentes.

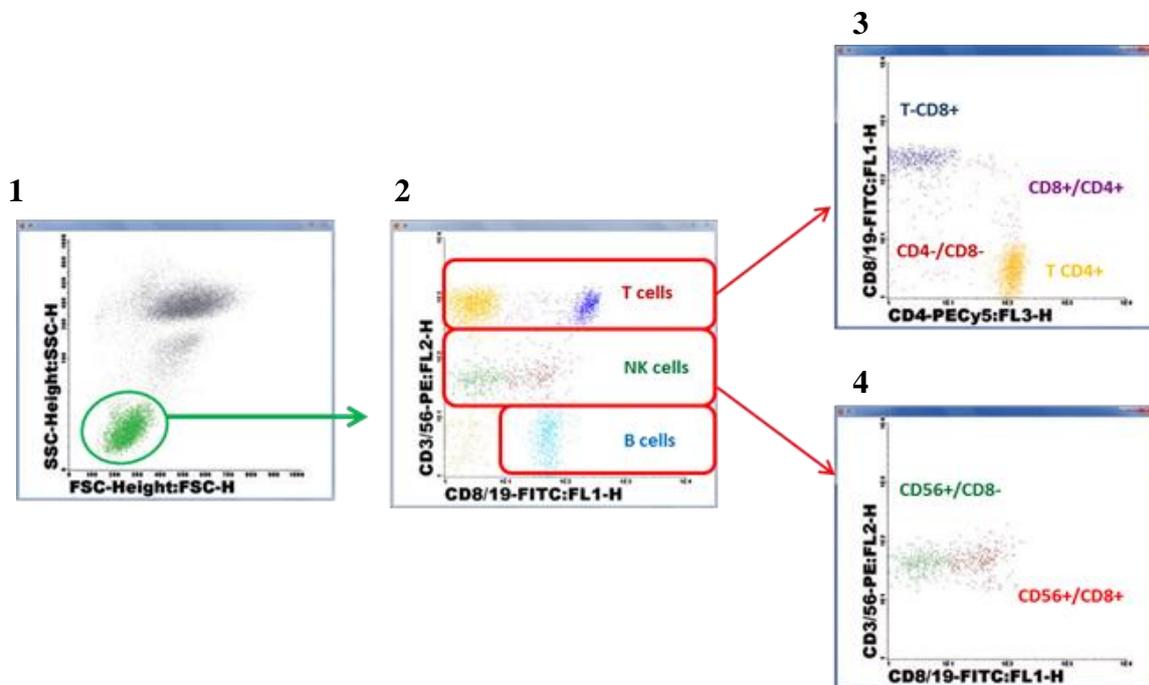
**Tabela 1** – Distribuição da amostra estudada

<b>Análise Realizada</b>	<b>Patologia</b>	<b>Número indivíduos</b>
Análise das Populações Linfocitárias	CTL	7
	DAI	21
	NEO	47
	DAI+NEO	8
Avaliação da expressão de BAFF, BAFF-R, APRIL e TACI.	CTL	11
	DAI	10
	NEO	25
	DAI+NEO	6

### **Análise das populações linfocitárias**

Para a análise das populações linfocitárias, recorreu-se a um *kit* comercial, *Lymphogram* (Cytognos), que permite analisar simultaneamente a distribuição total dos linfócitos T, B e Nk (Figura 1). Assim, aproximadamente um milhão de leucócitos dos

doentes e dos controlos saudáveis foram marcados com 25  $\mu$ L do *cocktail* de anticorpos do *Lymphogram* (anti-CD8/CD19 conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD3/CD56 conjugado com ficoeritrina (PE) e anti-CD4 conjugado com ficoeritrina-cianina 5 (PE-Cy5)) durante 15 minutos ao abrigo da luz. Seguidamente, incubaram-se as células com 2 mL de tampão de lise (BD BioSystems) durante 10 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Posteriormente, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) por centrifugação durante 5 minutos a 300 xg, ressuspendidas e analisadas num citómetro de fluxo FACSCalibur™ (BD Biosciences).



**Figura 1 – Exemplo da análise das populações linfocitárias com o *Lymphogram*.** A análise das populações linfocitárias iniciou-se pela seleção dos linfócitos com base no tamanho (FSC) e na complexidade (SSC) como identificado no *dot-plot* 1. Seguidamente, foram divididos em 3 grupos de células com base na intensidade de marcação para CD3 e CD56 (*dot-plot* 2). Células que não marcam CD3 nem CD56 mas que expressam CD19 representam as células B, o grupo que marca CD56 representa as células NK, e o grupo que expressa CD3 correlaciona-se com as células T. Por fim, faz-

se a divisão das células T segundo a sua expressão de CD4 ou CD8 (*dot-plot* 3) e das células NK consoante a presença ou ausência de CD8 na sua membrana (*dot-plot* 4).

### **Quantificação das células Treg e avaliação da expressão do BAFF, BAFF-R, TACI e APRIL**

Para a identificação e quantificação das células Treg e avaliação da expressão do NF- $\kappa$ B, BAFF, BAFF-R, TACI e APRIL, as células dos doentes e dos controlos foram inicialmente marcadas com os anticorpos anti-CD4 conjugado com peridina de clorofila (PerCP) (BD Biosystems), anti-CD25 conjugado com alofocianina (APC) (BD Biosystems) e anti-CD127-FITC (BD Biosystems), de modo a identificar as diferentes populações celulares, em particular as células Treg naturais (clássicas) ( $CD4^+$ ,  $CD25^{\text{alta expressão}}$  e  $CD127^{\text{baixa expressão}}$ ) e as adaptativas (induzidas) ( $CD4^+$ ,  $CD25^-$  e  $CD127^{\text{baixa expressão}}$ ). Assim, incubou-se, aproximadamente, um milhão de células de sangue periférico dos doentes e dos controlos com 1  $\mu$ g de cada anticorpo monoclonal durante 15 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Seguidamente, adicionou-se 100  $\mu$ L de solução de fixação (IntraCell, Immunostep) e incubou-se durante 15 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS por centrifugação durante 5 minutos a 300 xg. Depois, as células foram incubadas com 100  $\mu$ L de solução de permeabilização (IntraCell, Immunostep) e com 1  $\mu$ g de anticorpo monoclonal anti-BAFF-PE (Biolegend), anti-BAFF-R-PE (Biolegend), anti-TACI-PE (Biolegend) e anti-APRIL-PE (Biolegend) durante 15 minutos ao abrigo da luz. Por fim, as células foram lavadas com PBS, ressuspensas e analisadas num citómetro de fluxo. Foram adquiridas pelo menos 10.000 células através do programa CellQuest™ e os dados obtidos foram analisados usando o programa Paint-a-Gate 3.02.

## **Análise estatística**

Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados pelo teste Anova, T-student e análise multivariada. Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão (SD). O nível de significância utilizado foi de 0,05, rejeitando-se a hipótese nula quando  $p < 0.05$ .

## **Resultados**

### **Análise das populações linfocitárias**

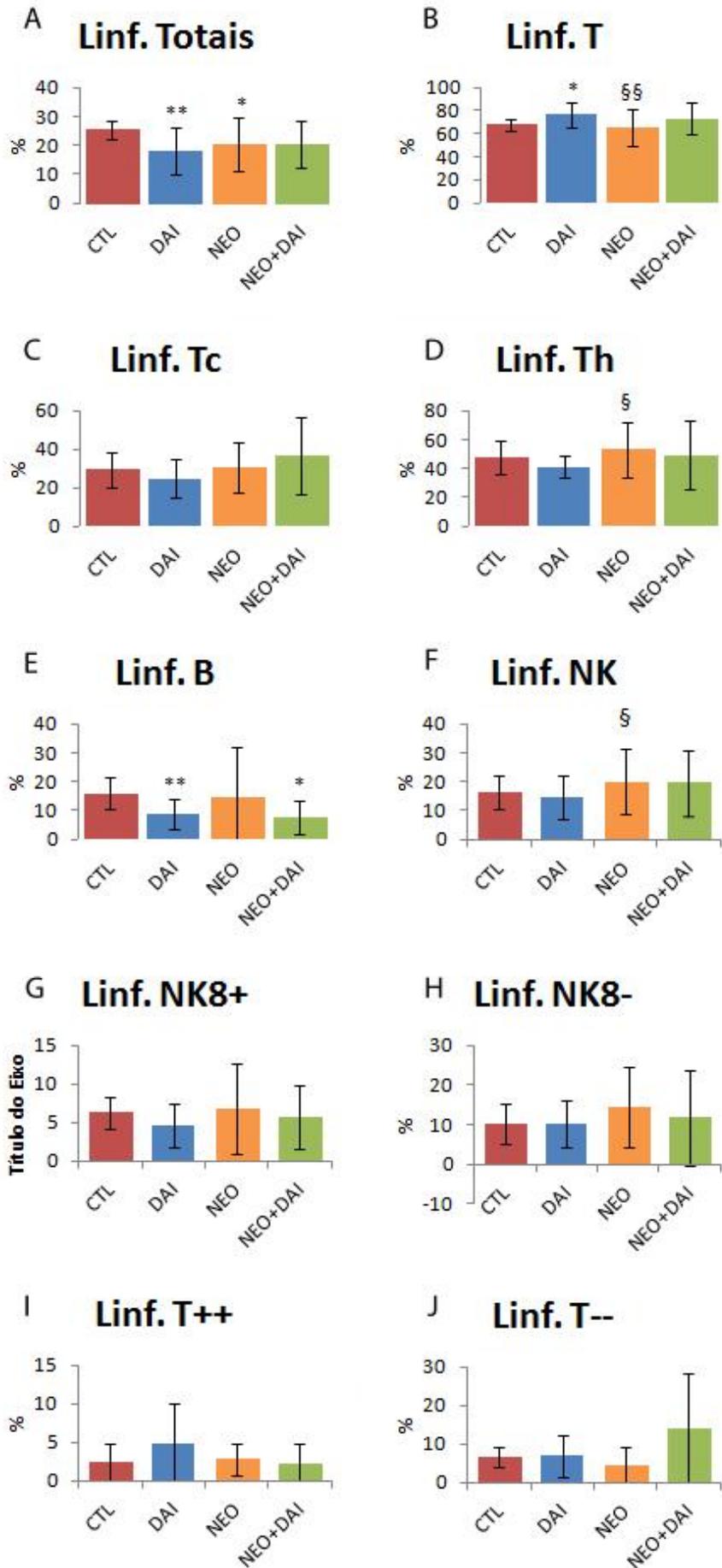
A identificação das várias populações linfocitárias nos indivíduos controlo (CTL), doentes com patologia neoplásica (NEO), autoimune (DAI) ou ambas (DAI+NEO) foi realizada através da identificação dos antígenos de superfície característicos de cada tipo celular, como representado na Figura 2. Desta forma, foram diferenciados os Linfócitos B através da sua expressão de CD19 (CD19+), os linfócitos T pela expressão de CD3 (CD3+), e as células *natural-killer* (NK) pela marcação com CD3/CD56 (CD3-/CD56+). De seguida, o subgrupo dos linfócitos T foi agrupado em diferentes conjuntos consoante a marcação com CD4 (CD4+) como células T *helper* (TH), com CD8 (CD8+) como células T citotóxicas (TC), com a dupla marcação CD4/CD8 (CD4+/CD8+) ou com ausência de marcação para estes antígenos (CD4-/CD8-).

Inicialmente, quantificou-se a percentagem de linfócitos totais encontrados no sangue periférico (SP) dos diferentes indivíduos (Figura 3-A), observando-se diminuição deste parâmetro nos 3 grupos de indivíduos doentes, em comparação com o controlo, existindo diferença estatística entre os controlos ( $25,37\% \pm 3,25\%$ ) e os doentes com doença auto-imune ( $17,97\% \pm 7,93\%$ ) e os doentes com neoplasia ( $20,3\% \pm 9,39\%$ ). Verificou-se nos doentes com doença auto-imune e neoplásica diminuição

dos linfócitos totais ( $20,42\% \pm 8,18\%$ ) relativamente aos controlos, no entanto sem diferenças estatísticas.

Seguidamente, as diferentes populações linfocitárias foram analisadas, nomeadamente as células B, T e NK. Relativamente à população de linfócitos B (Figura 2-E), observou-se diminuição significativa de linfócitos B nos doentes com DAI ( $8,69\% \pm 5,22\%$ ) e DAI+NEO ( $7,75\% \pm 5,67\%$ ) comparativamente ao grupo controlo ( $15,9\% \pm 5,4\%$ ). No entanto, a percentagem de linfócitos B nos doentes com neoplasia ( $14,76\% \pm 16,95\%$ ) é sensivelmente igual ao dos controlos. Considerando as células T (Figura 2-C), observou-se aumento significativo dos linfócitos T nos doentes com DAI ( $76,32\% \pm 10,37\%$ ), comparativamente aos controlos ( $67,79\% \pm 5,4\%$ ) e aos doentes com neoplasia ( $65,3\% \pm 15,83\%$ ). Os doentes com DAI e neoplasia apresentam aumento da percentagem deste tipo de linfócitos ( $72,87\% \pm 13,84\%$ ), não sendo, no entanto, estatisticamente significativo.

Adicionalmente, dentro da família dos linfócitos T, foram estudados os linfócitos T citotóxicos (Figura 2-C) e T *helper* (Figura 2-D). Os doentes com neoplasia apresentam tendência para aumento da percentagem de linfócitos T *helper* (TH) ( $52,94\% \pm 18,63\%$ ), relativamente aos controlos ( $47,71\% \pm 11,3\%$ ), contrariamente ao que se observou nos doentes com DAI ( $41,18\% \pm 7,9\%$ ) e com DAI e neoplasia ( $49,12\% \pm 23,72\%$ ). No entanto, as diferenças observadas entre os vários grupos em estudo apenas são significativas quando se comparou a percentagem de linfócitos TH nos doentes com DAI e neoplasia. Relativamente às células T citotóxicas (TC), observou-se tendência para aumento da percentagem destas células nos doentes com neoplasia ( $30,32\% \pm 12,81\%$ ) e com DAI e neoplasia ( $36,5\% \pm 19,71\%$ ), e tendência para diminuição nos doentes com DAI ( $24,83\% \pm 10,26\%$ ), comparativamente aos controlos ( $29,25\% \pm 9,45\%$ ), contudo sem significado estatístico.



**Figura 2** – Análise das populações linfocitárias do sangue periférico em controlos saudáveis (CTL), em doentes com doença auto-imune (DAI), em doentes com neoplasia (NEO) e em doentes com doença auto-imune e neoplasia (NEO+DAI). Os resultados estão expressos em percentagem (%) e representam a média± o desvio padrão. Significado estatístico relativamente aos controlos: \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\*  $p<0.001$ . Significado estatístico relativamente aos doentes com doença auto-imune: §  $p<0.05$ ; §§  $p<0.01$ ; §§§  $p<0.001$ . Significado estatístico relativamente aos doentes com doença neoplásica: θ  $p<0.05$ ; θθ  $p<0.01$ ; θθθ  $p<0.001$ .

Posteriormente foram identificadas as células T  $\alpha\beta$  que expressam concomitantemente CD4 e CD8, sendo assim designadas T<sup>++</sup>, e igualmente, as células T  $\gamma\delta$ , que são caracterizadas pela ausência de expressão destes marcadores, denominadas de T<sup>-</sup>. No caso das células T<sup>++</sup> (Figura 2-I), observou-se apenas aumento desta subpopulação nos doentes com DAI (4,75% ± 5,25%), comparativamente aos controlos (2,42% ± 2,32%). Por outro lado, observou-se que os doentes com doença autoimune e neoplasia apresentam valores mais elevados de linfócitos T<sup>-</sup> (14% ± 14,31) comparativamente aos outros grupos (CTL: 6,51% ± 2,53; DAI: 6,78% ± 5,51; NEO: 4,54% ± 4,52%), como se pode verificar na Figura 2-J.

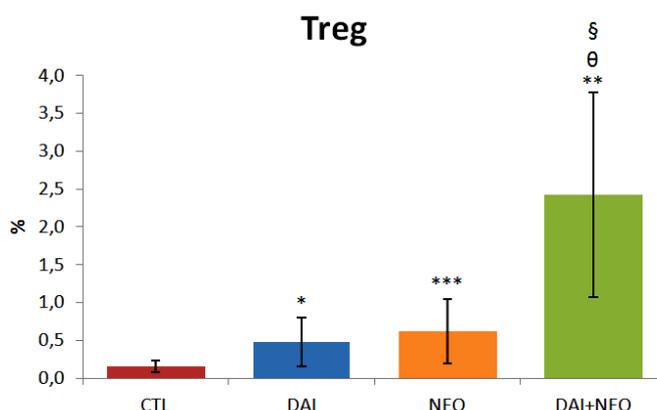
Por fim, identificou-se a população de células NK e respetivas subpopulações de células NK com expressão de CD8 (NK8<sup>+</sup>) e sem expressão de CD8 (NK8<sup>-</sup>). Considerando as células NK (Figura 2-F), verificou-se que tanto os doentes com neoplasia (19,89% ± 11,28%) como os doentes com DAI e NEO (19,5% ± 11,31%) apresentavam aumento deste grupo de células comparando com o CTL (16,27% ± 5,78). Por outro lado, os doentes com DAI apresentam menor percentagem de células NK (14,6% ± 7,54). No entanto, apenas o aumento de cerca de 5% das células NK nos doentes com neoplasia NEO comparativamente aos doentes com DAI se mostrou estatisticamente significativo. As subpopulações de células NK8<sup>+</sup> (Figura 2-G) e NK8<sup>-</sup>

(Figura 2-H) mostraram-se relativamente homogéneas nos diferentes grupos estudados constituindo cerca de 6% e 10% dos linfócitos totais, respetivamente, com exceção do grupo de doentes com neoplasia que apresenta ligeiro aumento das células NK8<sup>-</sup> (14,47% ± 10,24%), comparativamente com os controlos (10,04% ± 5,03%).

### Identificação das células T reguladoras

Para identificação e quantificação das células T reguladoras naturais (nTreg), estas foram consideradas como a população de células que, simultaneamente, expressam CD4, CD25 de alta expressão (CD25<sup>hi</sup>) e CD127 de baixa expressão (CD127<sup>low</sup>).

Como se pode observar na Figura 3, os indivíduos saudáveis (controlos) apresentam uma pequena quantidade de células nTreg (0,16% ± 0,08%). Por outro lado, os diferentes grupos de doentes apresentam aumento significativo da percentagem destas células (DAI: 0,47% ± 0,32%; NEO: 0,62% ± 0,42%; DAI+NEO: 2,43% ± 1,35%) comparativamente com o grupo controlo, sendo este aumento mais acentuado nos doentes com DAI e neoplasia (DAI+NEO). Para além disso, verificou-se também aumento significativo das células nT<sub>reg</sub> nos doentes com DAI e neoplasia quando comparados com os doentes com DAI e com neoplasia.



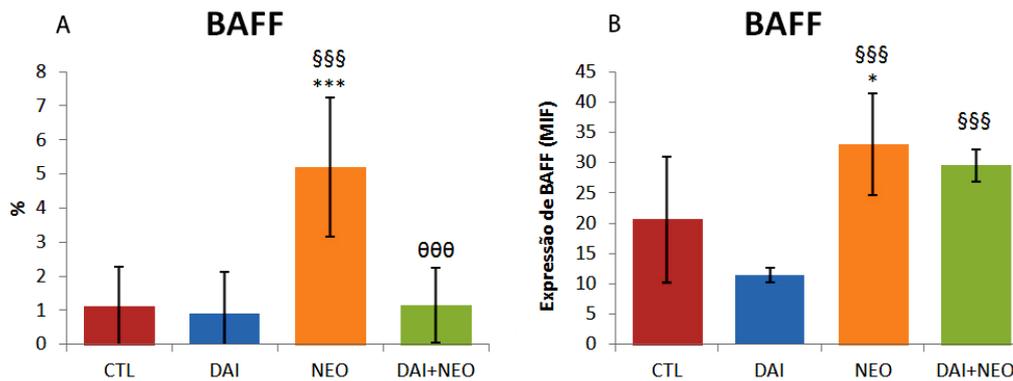
**Figura 3** - Análise da percentagem de células nTreg em controlos saudáveis (CTL), em doentes com doença autoimune (DAI), em doentes com neoplasia (NEO) e em doentes com doença autoimune e neoplasia (NEO+DAI). Os resultados estão expressos em percentagem (%) dos linfócitos totais e representam a média± o desvio padrão. Significado estatístico relativamente aos controlos: \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\*  $p<0.001$ . Significado estatístico relativamente aos doentes com doença autoimune: §  $p<0.05$ ; §§  $p<0.01$ ; §§§  $p<0.001$ . Significado estatístico relativamente aos doentes com doença neoplásica: θ  $p<0.05$ ; θθ  $p<0.01$ ; θθθ  $p<0.001$

### **Análise da expressão de BAFF, BAFF-R, APRIL e TACI**

A análise da expressão dos ligandos da família do TNF, BAFF e APRIL, e dos respetivos recetores, BAFF-R e TACI foi avaliada na subpopulação de células nTreg, identificadas como descrito anteriormente.

### **Análise da expressão de BAFF e BAFF-R**

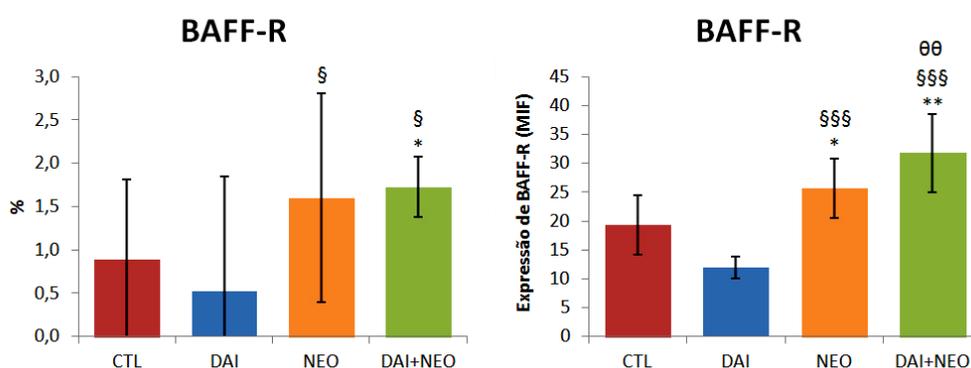
Na amostra estudada, como se pode verificar na Figura 4-A, observou-se que os doentes com neoplasia (NEO) são os que apresentam aumento mais acentuado da percentagem de células a expressar BAFF (5,19% ± 2,03%) comparativamente aos controlos (1,13% ± 1,16%). Contrariamente ao observado nos doentes com neoplasia (NEO), os doentes com DAI e neoplasia (DAI+NEO) e os doentes com DAI apresentam menor percentagem de células a expressar este ligando da família do TNF (1,14% ± 1,1% e 0,92% ± 1,21%, respetivamente). Para além da percentagem de células que expressam BAFF, os níveis de expressão desta molécula também se encontram aumentados nos doentes com neoplasia e com DAI e neoplasia e diminuídos nos doentes com DAI, comparativamente ao observado nos controlos (CTL: 20,66 ± 10,37 MIF; NEO: 32,97 ± 8,38 MIF; DAI+NEO: 29,54 ± 2,66 MIF; DAI 11,45 ± 1,22 MIF).



**Figura 4** - Análise da percentagem de células nTreg que expressa BAFF (A) e respetivos níveis de expressão (B) em controlos saudáveis (CTL), em doentes com doença autoimune (DAI), em doentes com neoplasia (NEO) e em doentes com doença autoimune e neoplasia (NEO+DAI). Os resultados representam a média±desvio padrão estando expressos em percentagem (%) de células nTreg que expressam BAFF em (A) e os níveis de expressão expressos em unidades arbitrarias de média de intensidade de fluorescência (MIF) em (B). Significado estatístico relativamente aos controlos: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Significado estatístico relativamente aos doentes com doença auto-imune: §  $p < 0.05$ ; §§  $p < 0.01$ ; §§§  $p < 0.001$ . Significado estatístico relativamente aos doentes com doença neoplásica: θ  $p < 0.05$ ; θθ  $p < 0.01$ ; θθθ  $p < 0.001$

Na Figura 5 está representada a análise da percentagem de células que expressam o recetor de superfície BAFF-R. Como podemos verificar nesta Figura, e em consonância com o resultado anterior, os doentes com DAI e neoplasia e os doentes com neoplasia apresentam maior percentagem de células que expressam BAFF-R ( $1,72\% \pm 0,35\%$  e  $1,6\% \pm 1,2\%$ , respetivamente) quando comparados com as células dos controlos ( $0,89\% \pm 0,92\%$ ), sendo a diferença estatisticamente significativa apenas no primeiro grupo. Contrariamente ao observado nos outros doentes, as células dos doentes com DAI apresentam menor percentagem de expressão ( $0,52\% \pm 1,32\%$ ) que as células dos controlos. Para além disso, observou-se também que a percentagem de células que expressam BAFF-R nos doentes com DAI é cerca de 3 vezes inferior à

observada nos doentes com neoplasia e nos doentes com DAI e neoplasia, sendo estas diferenças estatisticamente significativas. As mesmas tendências são observadas nos níveis de expressão deste recetor, ou seja, verificou-se aumento dos níveis de expressão de BAFF-R nos doentes com DAI e neoplasia ( $31,76 \text{ MIF} \pm 6,82 \text{ MIF}$ ) e nos doentes com neoplasia ( $25,65 \text{ MIF} \pm 5,12 \text{ MIF}$ ) e diminuição nos doentes com DAI ( $11,97 \text{ MIF} \pm 1,95$ ), comparativamente aos controlos ( $19,34 \text{ MIF} \pm 5,07 \text{ MIF}$ ).

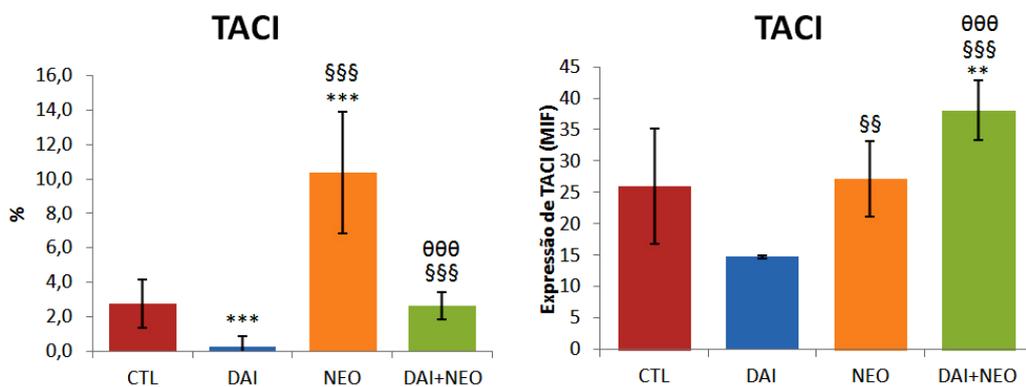


**Figura 5** - Análise da percentagem de células nTreg que expressa BAFF-R (A) e respetivos níveis de expressão (B) em controlos saudáveis (CTL), em doentes com doença autoimune (DAI), em doentes com neoplasia (NEO) e em doentes com doença autoimune e neoplasia (NEO+DAI). Os resultados representam a média±desvio padrão estando expressos em percentagem (%) de células nTreg em (A) e em unidades arbitrárias de média de intensidade de fluorescência em (B). Significado estatístico relativamente aos controlos: \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\*  $p<0.001$ . Significado estatístico relativamente aos doentes com doença auto-imune: §  $p<0.05$ ; §§  $p<0.01$ ; §§§  $p<0.001$ . Significado estatístico relativamente aos doentes com doença neoplásica: θ  $p<0.05$ ; θθ  $p<0.01$ ; θθθ  $p<0.001$

### Análise da expressão de TACI e APRIL

A análise do recetor TACI (Figura 6) revelou que o grupo de doentes com neoplasia se destacava dos restantes grupos de doentes devido à elevada percentagem de células nTreg que expressam este recetor, sendo a sua expressão cerca de 5 vezes

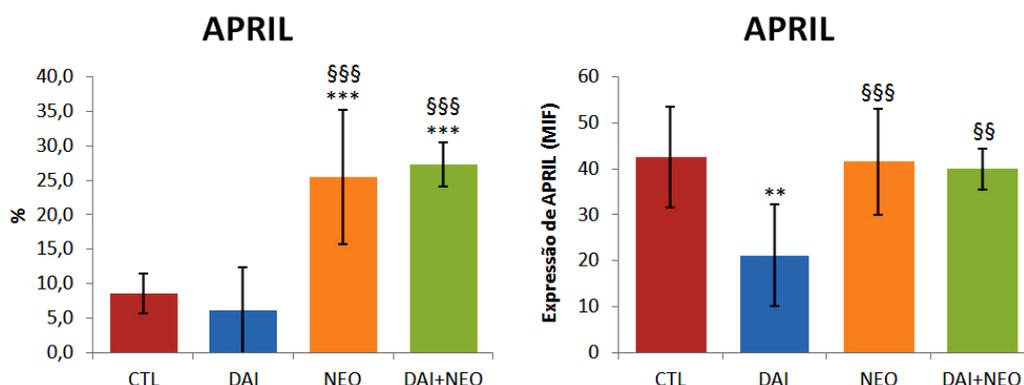
superior ao observado nos controlos (NEO: 10,37%  $\pm$  3,52%; CTL: 2,75%  $\pm$  1,39%). Por outro lado, verificou-se que os doentes com DAI se distinguem pela baixa percentagem de células que expressam TACI (0,26%  $\pm$  0,61%). No entanto, as células dos doentes com DAI e neoplasia são as que apresentam maiores níveis de expressão de TACI (DAI+NEO: 38,08 MIF  $\pm$  4,71 MIF), e as células dos doentes com DAI são as que apresentam menores níveis de expressão (14,74 MIF  $\pm$  0,2 MIF), comparativamente aos controlos (26 MIF  $\pm$  9,2 MIF).



**Figura 6** - Análise da percentagem de células nTreg que expressa TACI (A) e respetivos níveis de expressão (B) em controlos saudáveis (CTL), em doentes com doença autoimune (DAI), em doentes com neoplasia (NEO) e em doentes com doença autoimune e neoplasia (NEO+DAI). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão estando expressos em percentagem (%) de células nTreg em (A) e em unidades arbitrárias de média de intensidade de fluorescência em (B). Significado estatístico relativamente aos controlos: \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\*  $p<0.001$ . Significado estatístico relativamente aos doentes com doença auto-imune: §  $p<0.05$ ; §§  $p<0.01$ ; §§§  $p<0.001$ . Significado estatístico relativamente aos doentes com doença neoplásica: θ  $p<0.05$ ; θθ  $p<0.01$ ; θθθ  $p<0.001$

Por fim, a análise do ligando APRIL (Figura 7) revelou que os grupos de doentes com DAI e neoplasia (DAI+NEO) e com neoplasia (NEO) apresentam cerca de 3 vezes mais células com expressão desta molécula comparativamente aos controlos

(DAI+NEO: 27,32% ± 3,24%; NEO: 25,47%; CTL: 8,58% ± 2,94%). Tal como se tinha observado para os outros ligandos e receptores da família do TNF, as células dos doentes com DAI apresentam diminuição dos níveis de expressão de TACI, sendo cerca de metade do observado nas células dos doentes dos restantes grupos e controlos (DAI: 21,13 MIF ± 11,11 MIF; CTL: 42,59 MIF ± 10,9 MIF; NEO: 41,53 MIF ± 11,61 MIF; DAI+NEO: 39,94 MIF ± 4,54 MIF).



**Figura 7** - Análise da percentagem de células nTreg que expressa APRIL (A) e respetivos níveis de expressão (B) em controlos saudáveis (CTL), em doentes com doença autoimune (DAI), em doentes com neoplasia (NEO) e em doentes com doença autoimune e neoplasia (NEO+DAI). Os resultados representam a média±desvio padrão estando expressos em percentagem (%) de células nTreg em (A) e em unidades arbitrários de média de intensidade de fluorescência em (B). Significado estatístico relativamente aos controlos: \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\*  $p<0.001$ . Significado estatístico relativamente aos doentes com doença auto-imune: §  $p<0.05$ ; §§  $p<0.01$ ; §§§  $p<0.001$ . Significado estatístico relativamente aos doentes com doença neoplásica: θ  $p<0.05$ ; θθ  $p<0.01$ ; θθθ  $p<0.001$

## Discussão

Atualmente, verifica-se um aumento de incidência tanto de doenças oncológicas como de doenças auto-imunes na população em geral. As causas deste aumento tem sido alvo de diversas investigações, verificando-se que as patologias auto-imunes e

oncológicas estão relacionadas. (4) (20) Na verdade, alguns exemplos são o desenvolvimento de carcinoma do cólon em doentes com colite ulcerosa e o desenvolvimento de colangiocarcinoma em doentes com colangite esclerosante primária. Por outro lado, também se verifica que certas doenças auto-imunes têm risco acrescido de doença oncológica apesar da neoplasia não estar diretamente relacionada com o local primário de doença autoimune. Entre estas é de salientar, o aparecimento de doença linfoproliferativa em doentes com síndrome de Sjögren ou artrite reumatóide e o desenvolvimento de carcinoma brônquico ou cervical em doentes com Lúpus Eritematoso Sistémico (LES). (4) (21) Esta associação poderá estar relacionada com a desregulação do sistema imunitário que já não é capaz de manter a homeostasia, tanto devido à doença de base como ao tratamento contínuo com imunossuppressores. (20)

Na verdade, não são só as doenças oncológicas que se desenvolvem em terreno de doente autoimune, o inverso também foi verificado, com o diagnóstico de autoimunidade posteriormente ao tratamento oncológico. Verifica-se mesmo que há doenças auto-imunes que surgem como doenças paraneoplásicas, nomeadamente a dermatomiosite ou polimiosite, estando a doença oncológica associada a tais manifestações autoimunes. (22)

Diversas vias celulares e moleculares estão envolvidas nesta relação existente entre as doenças auto-imunes e as doenças neoplásicas, ainda assim, os mecanismos responsáveis pelo aparecimento destas patologias continuam a ser desconhecidos ou mal compreendidos. Uma das vias aqui tratadas é a via do NF- $\kappa$ B, cuja descoberta é atribuída a Ranjan Sem e David Baltimore em 1986 (23), e que se verificou este muito relacionada com a fisiopatologia das doenças que apresentam disfunção do sistema imune. Neste trabalho foram então avaliadas as populações de células T reguladoras e a expressão de ligandos e recetores da família do TNF (BAFF e APRIL e BAFF-R e

TACI, respetivamente) relacionados com o NF- $\kappa$ B em doentes com neoplasia (NEO), com doença auto-imune (DAI), com DAI e neoplasia (DAI+NEO) e em controlos.

### **Análise das Populações Linfocitárias**

Uma primeira fase de avaliação destes doentes passou por analisar as populações linfocitárias presentes no sangue periférico, comparando entre grupos a percentagem de linfócitos totais, linfócitos B, linfócitos T e subgrupos T *helper*, T citotóxicos, T duplos positivos e T duplos negativos, células NK e subtipo NKT e os linfócitos T reguladores.

Verificou-se que a percentagem de linfócitos totais foi menor nos indivíduos com neoplasia e com DAI do que nos controlos. Estes resultados estão de acordo com a literatura, suportando que a diminuição dos linfócitos, ou mesmo a linfopenia propriamente dita, podem fomentar o desenvolvimento de doenças neoplásicas, por imunossupressão relativa, ou auto-ímmunes por libertação de citoquinas pro-inflamatórias e proliferação de clones de células contra o *self*. (24) (25) No entanto, uma das reações adversas mais frequentes dos corticóides ou imunomoduladores é a leucopenia, colocando-se a hipótese que a linfopenia presente nas amostras possa ser consequência do seu tratamento e não apenas da doença.

Outro achado de relevo foi a alteração dos linfócitos B e T. Considerando os doentes com DAI, a diminuição de linfócitos B e aumento dos T pode estar relacionada com o padrão de Th1 mais prevalente neste grupo de patologias. (26) O ambiente pró-inflamatório gerado por citoquinas como o Interferão  $\gamma$ , IL-2 e Fator de Necrose Tumoral (TNF)  $\beta$  leva a uma resposta predominantemente celular e com menor contribuição da imunidade humoral, padrão encontrado predominantemente em doenças autoímmunes. (27) Por outro lado, a celularidade B próxima do controlos associada a redução das células T demonstra uma resposta com polarização Th2 ou uma

imunossupressão relativa da resposta celular, estratégias utilizadas pelo tumor para reduzir a vigilância imunitária, nos grupos de doentes com neoplasia e de doentes com DAI e neoplasia. (27) (28)

Dentro do grande grupo de linfócitos T há células mais especializadas e com funções específicas, entre elas as Th e as Tc. As Th são células fundamentais a qualquer tipo de resposta imune adaptada e estruturada. São células que reconhecem os antígenos através de células apresentadoras de antígenos (APC) e que vão amplificar a resposta imunológica, estimulando outros componentes do sistema imune. (1) Nesta amostragem, o grupo de doentes com neoplasia demonstrou ter aumento da população de Th, possivelmente uma forma de imunomodulação criada pelo tumor, suportada por outros estudos que mostram que é comum a resposta Th2 no microambiente tumoral. (29) (30) Por outro lado, as células Tc são maioritariamente células efectoras, o seu objetivo prende-se com a identificação de antígenos de superfície específicos através do complexo major de histocompatibilidade (MHC) tipo I e posterior resposta com libertação de citocinas e mediadores que induzem lise e/ou morte celular. Este é um dos tipos de células envolvidos nas respostas contra células cancerígenas. Na nossa amostra verificamos que na verdade os doentes com neoplasia e os doentes com DAI e neoplasia apresentam valores semelhantes ao controlo. Neste caso, seria importante aumentar o tamanho da amostra e realizar testes de atividade dos linfócitos Tc de modo a poder tirar conclusões quanto à ação dos deste tipo de linfócitos nos doentes com patologia neoplásica. Já no caso dos doentes com DAI, tanto existe um decréscimo de Th como de Tc, sendo este resultado compatível com a redução linfocitária descrita na literatura e que aponta para uma das causas de doença auto-imune.

As células T duplamente positivas CD4/CD8 são células imaturas que existem primordialmente no timo e que posteriormente sofrem seleção e maturação para CD4+

(T<sub>h</sub>) ou CD8<sup>+</sup> (T<sub>c</sub>). Células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> periféricas ocorrem naturalmente nos indivíduos saudáveis em pequenas percentagens e vão aumentando com a idade. Verifica-se em certos estudos que estas células podem estar envolvidas na inflamação gerada nas doenças DAI. (31) Na nossa amostragem não houve diferença significativa entre o controlo e os outros grupos em estudo, apesar de haver um discreto aumento destas células nos doentes com DAI.

Pelo contrário, as células T duplamente negativas são maioritariamente células que apresentam o recetor de células T (TCR)  $\gamma\delta$  e assim não expressam nem CD4 nem CD8. Estas células são pró-inflamatórias e têm uma ação tanto citotóxica como de produção de citocinas, estando envolvidas em doenças auto-imunes, doenças neoplásicas e combate a infeções. (32) (33) Há também uma família pouco conhecida de células CD3 positivas e CD4/CD8 negativas que se comportam como células T reguladoras, comprovando-se que há vários tipos de células reguladoras que têm uma ação conjunta no sistema imune. (34) (35) Os nossos resultados revelam que apesar de não haver diferença estatística no grupo de doentes com DAI e neoplasia observa-se incremento desta população, possivelmente pela coexistência de duas patologias que acarretam estímulo inflamatório acrescido.

A família das células NK constitui uma importante arma do sistema imune contra as neoplasias. A sua ação é diversa, podendo ter função citotóxica ou de produção de citocinas que influenciam os diversos componentes do sistema imune, tanto da imunidade inata como da adquirida. O seu papel é especialmente importante quando os linfócitos T<sub>c</sub> deixam de conseguir atuar por perda do MHC nas células cancerígenas. (1) Estudos recentes mostram também que estas células podem ter um efeito importante na autoimunidade, podendo atuar como supressores por citólise dos próprios linfócitos auto-reativos ou como agravantes aumentando o ambiente pro-

inflamatório através de libertação de citocinas. (36) Nos dados obtidos, verificamos aumento das células NK nos doentes com neoplasia comparativamente aos doentes com DAI. O aumento desta população nos doentes com neoplasia pode representar uma certa reatividade residual do sistema imune contra o tumor, implicando que há reconhecimento deste como não-*self* apesar de não haver resposta efetiva. Já nos doentes com DAI a sua diminuição pode significar uma de duas realidades, ou diminuição pela própria fisiopatologia da doença auto-imune, na qual as células NK poderiam ser protetoras e anti-inflamatórias mas estão em baixa quantidade para ter impacto no equilíbrio imune ou, por outro lado, pode ser um efeito benéfico da terapêutica que vai suprimir a ação de células com potencial pró-inflamatório.

Há ainda um subgrupo de células NK que expressa CD8. Estes linfócitos NK T são aqueles que vão ter um papel particularmente citotóxico e fulcral na atividade contra neoplasias. (37) Contrariamente ao esperado, os doentes com doenças oncológicas revelaram uma quantidade semelhante desta família de células em relação aos controlos, assim como os doentes com DAI e neoplasia. A diminuição ténue destas células nos doentes com DAI é potencialmente explicada pelos efeitos da terapêutica nestas células. Tendo em conta que a medicação indicada para as doenças auto-imunes pode alterar as populações linfocitárias e que, nestes casos em concreto, pode ser uma variável a considerar, o desenvolvimento de um protocolo com análise das populações linfocitárias no sangue periférico antes e depois do início do tratamento seria da extrema importância.

### **Quantificação das células nTreg**

Diversos projetos de investigação atuais estão direcionados para a classificação e esclarecimento dos diversos subtipos e função das células T reguladoras. Um desses

tipos corresponde às células T reguladoras naturais que, como descritas anteriormente, são identificadas por serem CD4 positivas, terem alta expressão de CD25 e baixa expressão de CD127. As células nTreg, depois de estimuladas, atuam através da libertação de citocinas, entre as quais IL-10 e TGF- $\beta$ , ou através de contacto direto com a célula reativa.

A citocina inibitória mais importante libertada pelas nTreg é a IL-10. Esta molécula tem uma miríade de efeitos no sistema imune, dependendo da célula afetada e o ambiente envolvente, no entanto, parece que o efeito mais importante é o bloqueio do NF- $\kappa$ B intracelular e modulação da via JAK-STAT, suprimindo as células efetoras e diminuindo a libertação de citocinas do perfil Th1. (38) Adicionalmente, a IL-10 inibe a forma induzida da ciclo-oxigenase (COX), reduzindo a formação de tromboxanos e prostaglandinas. (39)

A TGF- $\beta$  é outra molécula fundamental para o mecanismo de ação dos nTreg, contudo, esta molécula não tem de atuar imperativamente a nível exócrino ou parácrino, estando também associada a contacto célula-célula. (40) Na verdade, estudos recentes demonstraram que o TGF- $\beta$  produzido pelas T reguladoras pode manter-se ligado à membrana celular e assim atuar por meio de contacto direto. As células do sistema imune têm recetores próprios para esta citocina e a sua ação inclui a supressão de exocitose de citocinas pro-inflamatórias, nomeadamente do IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e redução da expressão de proteínas de superfície como o IL2-R ou NKG2D, moléculas relacionadas com citotoxicidade e inflamação. O TGF- $\beta$  também atua em células CD4 positivas *naïve*, levando à formação de células reguladoras induzidas. (41)

Esta ação através do contacto com outras células não é só realizada através do TGF- $\beta$ , as células reguladoras também possuem outros recetores de superfície especializados para inibição por contato. Outro recetor importante é o CTLA-4, do

inglês *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*. Esta molécula atua nos recetores CD80/CD86 das APC gerando sinais supressores da imunidade.

Por fim, o mecanismo de ação das Treg também passa por inibição competitiva com as outras células do sistema imune. A existência de IL2-R de alta afinidade na superfície das células é útil para a sobrevivência das próprias mas também para originar um tampão celular para esta citocina, mobilizando a IL-2 para estas células e evitando que atue em outras células pro-inflamatórias. Igualmente, a existência de TCR também provoca o mesmo efeito de inibição competitiva quando se trata da apresentação antigénica pelas APC, levando à diminuição da resposta imune gerada. (41)

Nos doentes analisados verificou-se aumento significativo destas células nos doentes com DAI, com doença neoplásica e, principalmente, nos doentes com DAI e neoplasia quando comparando com controlos. Verificamos inclusivamente que se formam 3 níveis distintos, dependendo da quantidade de células nTreg existentes. Os controlos são o grupo que menor percentagem de nTreg apresenta. Observa-se então aumento significativo nos doentes tanto com DAI como com neoplasia, possivelmente uma forma das patologias oncológicas gerarem um ambiente imunossupressor e uma tentativa do sistema imune dos doentes com DAI de suprimir a resposta inflamatória anómala. Com maior percentagem de nT<sub>reg</sub> encontram-se os doentes com ambas as patologias, DAI e neoplasia, cujo aumento destas células pode significar um sinergismo entre as duas patologias.

### **Análise da expressão de BAFF, BAFF-R, APRIL e TACI**

Como descrito anteriormente, o BAFF, BAFF-R, APRIL e TACI fazem parte da família do TNF e a sua função inclui a ativação do NF- $\kappa$ B e ativação de mecanismos de sobrevivência celular, mediados essencialmente pela BCL-2 e BCL-X<sub>L</sub>. A expressão

destas moléculas já foi admitida como sendo uma das formas de sobrevivência de determinadas neoplasias podendo estar envolvidas na etiologia das doenças auto-imunes. (12) (13)

Neste estudo verificou-se que a sua expressão estava significativamente alterada em relação aos indivíduos controlo. Considerando o ligando BAFF, os grupos foram homogéneos, excluindo o grupo de doentes com neoplasia, que revelou aumento substancial de expressão deste ligando. Já o recetor BAFF-R revela maior expressão nos grupos de doentes com neoplasia e com DAI e neoplasia. Estes resultados coincidem com a literatura, revelando que BAFF e BAFF-R podem ser mecanismos adquiridos de sobrevivência celular em doenças neoplásicas. (13) (14)

Quanto ao TACI, a expressão revelou-se mais uma vez aumentada no grupo de doentes com neoplasia, no entanto com diminuição dos seus níveis nos doentes com DAI. Estes dados estão de acordo com publicações recentes que apontam assim para que o TACI seja mais um fator protetor da doença oncológica, e possivelmente, um alvo terapêutico. (42) Quanto à doença auto-imune, apesar da literatura apontar para um possível envolvimento desta molécula em doenças auto-imunes relacionadas com as células B, os resultados são discrepantes. (43)

Finalmente, o APRIL, revela uma tendência curiosa, encontrando-se aumentado nos dois grupos compostos por doentes com doença oncológica e por doentes com DAI. Mais uma vez, o APRIL torna-se uma via adotada pelo tumor para manter a sua sobrevivência, suportando a literatura atual. (14) Quanto aos doentes com DAI, os níveis encontram-se, de novo, similares aos dos controlos, não revelando a sua possível ação nesta patologia.

## Conclusão

Com o conhecimento atual é fácil concluir que tanto a doença neoplásica como autoimune são multifatoriais e que, possivelmente, partilham muitos mecanismos comuns. Cada vez mais se acredita que o principal fator causador de doença é uma desregulação do equilíbrio pró e anti-inflamatório. Com este trabalho, verificou-se que a linfopenia é uma situação existente tanto na doença oncológica como neoplásica e pode ser uma das causas de patologia. Adicionalmente comprovou-se que há distúrbios relevantes a nível dos linfócitos B e T, com alteração das suas populações em ambas as patologias. Demonstrou-se que as células Treg são uma família de células alterada nas doenças e que a sua função pode estar afetada. Já quanto aos ligandos do TNF relacionados com a via do NF- $\kappa$ B, evidenciou-se que nos doentes com doenças oncológicas e com dupla patologia, DAI e NEO, havia uma sobre-expressão destes recetores com ativação desta via, ao contrário dos doentes com DAI onde se provou que há na verdade um decréscimo de atividade. Concluiu-se que o APRIL é eficaz a diferenciar doença autoimune isolada de neoplasia ou em casos de dupla patologia e que o seu uso como marcador de doença neoplásica deverá ser avaliado num estudo posterior. Igualmente se verifica que o BAFF-R diferencia doentes com neoplasia e doentes com DAI e neoplasia de doentes com DAI isolado, apesar de menos significativo.

Tendo em conta as alterações encontradas neste trabalho e descritas na literatura é importante a realização de um estudo com grande amostragem, com populações distintas pré e pós terapia, para validar adicionalmente estes resultados e avaliar o uso de marcadores como o BAFF-R e APRIL no diagnóstico precoce e sobrevivência dos doentes e, eventualmente, com alvos terapêuticos para o tratamento de cancro e doenças auto-ímmunes.

## Bibliografia

1. **Kindt, Thomas J., Osborne, Barbara A. e Goldsby, Richard A.** *Kuby Immunology, Sixth Edition*. 2010.
2. **Sakaguchi, Shimon, et al.** Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*. 133, 2008.
3. **Cava, A La.** T-regulatory cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 17, 2008.
4. **Cristaldi, Erika, et al.** A Possible Link Between Autoimmunity and Cancer. [autor do livro] Clio P. Mavragani. *Autoimmune Disorders – Pathogenetic Aspects*. 2011.
5. **Wang, Guihua, et al.** APRIL Induces Tumorigenesis and Metastasis of Colorectal Cancer Cells via Activation of the PI3K/Akt Pathway. *PLoS ONE*. 8, 2013.
6. **Dolcet, Xavier, et al.** NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch*. 2005.
7. **Koizumi, Mitsuhito, et al.** Increased B Cell-Activating Factor Promotes Tumor Invasion and Metastasis in Human Pancreatic Cancer. *PLoS ONE*. 8, 2013.
8. **Caamaño, Jorge e Hunter, Christopher A.** NF- $\kappa$ B Family of Transcription Factors: Central Regulators of Innate and Adaptive Immune Functions. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*. 2002.
9. **Hoesel, Bastian e Schmid, Johannes A.** The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*. 2013.
10. **BEINKE, Soren e LEY, Steven C.** Functions of NF- $\kappa$ B1 and NF- $\kappa$ B2 in immune cell biology. *Biochem. J*. 2004.
11. **Castigli, Emanuela, et al.** TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 201, 2005.

12. **Bossen, Claudia e Schneider, Pascal.** BAFF, APRIL and their receptors: Structure, function and signaling. *Immunology*. 18, 2006.
13. **Novak, Anne J., et al.** Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood*. 2004.
14. **Moreaux, Jérôme, et al.** BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood*. 2004.
15. **Beissert, Stefan, Schwarz, Agatha e Schwarz, Thomas.** Regulatory T Cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 126, 2006.
16. **Yadav, Mahesh, Stephan, Stephen e Bluestone, Jeffrey A.** Peripherally induced Tregs – role in immune homeostasis and autoimmunity. *Frontiers in Immunology*. 2013.
17. **Melo, Karina Mescouto e Carvalho, Beatriz Tavares Costa.** Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. *e função nas doenças humanas*. 2009, Rev. bras. alerg. imunopatol, Vol. 32.
18. **Burocchi, Alessia, Colombo, Mario P. e Piconese, Silvia.** Convergences and divergences of thymus- and peripherally derived regulatory T cells in cancer. *Frontiers in Immunology*. 2013.
19. **Zheng, Shu, et al.** How to detour Treg cells in T cell-based antitumor immune therapy. *OncoTargets and Therapy*. 2013.
20. **Grivennikov, Sergei I., Greten, Florian R. e Karin, Michael.** Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*. 140, 2010.
21. **Kiss, Emese, Kovacs, Laszlo e Szodoray, Peter.** Malignancies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews*. 9, 2010.
22. **Zampieri, S., Valente, M. e Adami, N.** Polymyositis, dermatomyositis and malignancy: a further intriguing link. *Autoimmun Rev*. 9, 2009.

23. **Sem, Ranjan e Baltimore, David.** Multiple Nuclear Factors Interact with the Immunoglobulin Enhancer Sequences. *Cell.* 46, 1986.
24. **Baccala, Roberto e Theofilopoulos, Argyrios N.** The new paradigm of T-cell homeostatic proliferation-induced autoimmunity. *TRENDS in Immunology.* 26, 2005.
25. **Jr, Tom Krupica, Fry, Terry J. e Mackall, Crystal L.** Autoimmunity during lymphopenia: A two-hit model. *Clinical Immunology.* 120, 2006.
26. **Liblau, Roland S., Singer, Steven M. e McDevitt, Hugh O.** Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmuned diseases. *Immunology Today.* 16, 1995.
27. **Romagnani, Sergio.** T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Annals of Allergy, Asthma & Immunology.* 85, 2000.
28. **Ruffell, Brian, et al.** Lymphocytes in cancer development: Polarization towards pro-tumor immunity. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* 21, 2010.
29. **Osawa, Emi, et al.** Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *Int. J. Cancer.* 118, 2006.
30. **Shurin, Michael R., et al.** Th1/Th2 balance in cancer, transplantation and pregnancy. *Springer Semin Immunopathol.* 1999.
31. **Parel, Yann e Chizzolini, Carlo.** CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmunity Reviews.* 3, 2004.
32. **Viey, Emilie, et al.** Phosphostim-Activated  $\gamma\delta$  T Cells Kill Autologous Metastatic Renal Cell Carcinoma. *J Immunol.* 174, 2005.
33. **Maeda, Yoshinobu, et al.** Critical role of host  $\gamma\delta$  T cells in experimental acute graft-versus-host disease. *Blood.* 106, 2004.
34. **Fischer, Karin, et al.** Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4- CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood.* 105, 2005.

35. **Thomson, Christopher W., Lee, Boris P. e Zhang, Dr. Li.** Double-negative regulatory T cells. *Immunologic Research*. 36, 2006.
36. **Perricone, Roberto, et al.** NK cells in autoimmunity: A two-edg'd weapon of the immune system. *Autoimmunity Reviews*. 7, 2008.
37. **Kaer, Luc Van.** NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Current Opinion in Immunology*. 19, 2007.
38. **NCBI.** IL10 interleukin 10 gene database. *IL10 interleukin 10 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI*. [Online] NCBI, 3 de Março de 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3586>.
39. **G, Sikka, et al.** Interleukin 10 knockout frail mice develop cardiac and vascular dysfunction with increased age. *Exp Gerontol*. 48, 2013.
40. **Fehérvári, Zoltán e Sakaguchi, Shimon.** A paragon of self-tolerance: CD25+CD4+ regulatory T cells and the control of immune responses. *Arthritis Res Ther*. 6, 2004.
41. **Nizar, S., et al.** T regulatory cells, the evolution of targeted immunotherapy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010.
42. **Moreaux, Jérôme, et al.** The level of TACI gene expression in myeloma cells is associated with a signature of microenvironment dependence versus a plasmablastic signature. *BLOOD*. 2005.
43. **Gross, Jane A., et al.** TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease. *NATURE*. 404, 2000.