



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

ANA GABRIELA CARVALHO OLIVEIRA

**MECANISMOS CELULARES E MOLECULARES
ENVOLVIDOS NO CANCRO E AUTOIMUNIDADE
- O PAPEL DAS CÉLULAS T REGULADORAS, DO GENE FOXP-3
E DO NF-KB -**

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA/MEDICINA INTERNA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
PROF.^ª DOUTORA ANA BELA SARMENTO CRUZ RIBEIRO
PROF.^ª DOUTORA LELITA SANTOS**

MARÇO 2013

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre de Medicina, sob orientação científica da Prof.^a Doutora Ana Bela Sarmento Ribeiro e co-orientação da Prof.^a Doutora Lelita Santos.

Mecanismos celulares e moleculares envolvidos no cancro e autoimunidade - O papel das células T reguladoras, do gene FOXP3 e do NF-kB

*Cellular and molecular mechanisms involved in cancer and autoimmunity
–The role of regulatory T cells, FOXP3 gene and NF-kB*

Gabriela OLIVEIRA¹, João ABRANCHES¹, Ana Cristina GONÇALVES^{2,3,4}; Catarina GERALDES^{2,4,6}; Emília CORTESÃO^{2,4,6}; Isabel de SOUSA^{4,6}; José Pedro CARDA^{2,4,6}; Paulo TAVARES⁶; Vera ALVES⁵; Adriana TEIXEIRA^{4,6}; Manuel SANTOS ROSA^{4,5}; Lelita SANTOS^{4,7,8} e Ana Bela Sarmento RIBEIRO^{2,3,4}

1 – Estudante de Medicina, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, 2 – Clínica Universitária de Hematologia e Biologia Molecular Aplicada, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal 3- Centro de Neurociências e Biologia Celular (CNC), Universidade de Coimbra, Portugal 4 - CIMAGO – Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal 5 – Instituto de Imunologia, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal 6 – Departamento de Hematologia Clínica, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal, 7– Unidade Curricular de Introdução à Medicina, Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal 8- Serviço de Medicina Interna, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, Portugal.

Índice	Página
Abreviaturas	6
Resumo	8
Abstract	10
1. Introdução	12
1.1. O papel da IL-21 e da IL-17	13
1.2 Função do NF-kB	14
1.3 Importância das células T reguladoras	14
2. Objetivo	16
3. Material e métodos	17
3.1. Análise das populações linfocitárias	17
3.2. Quantificação das células T reg e avaliação da expressão do FOXP-3, NF-kB, IL-17 e IL-21	18
3.3. Análise estatística	19
4. Resultados	20
4.1. Identificação das células Treg e análise da expressão de FOXP-3	25
4.2. Análise da expressão de IL-21	27
4.3. Análise da expressão de IL-17	29
4.4. Análise da expressão de NF-kB	30
5. Discussão dos resultados	32
5.1. Análise das populações linfocitárias	33
5.2. Avaliação das células T reguladoras	36
5.3. Avaliação das Interleucinas 21 e 17	38
5.4. Análise do NF-kB	39
6. Conclusão	41
7. Agradecimentos	43
8. Referências bibliográficas	44

Abreviaturas

Ac – anticorpo;

AI – autoimunidade;

APC - alofocianina;

CD – *cluster of differentiation*;

CTL – controlo saudável;

CTLA-4 – *Cytotoxic T lymphocyte antigen 4*;

DAI – doença autoimune;

dts – doentes;

Fig. – Figura;

FITC – isotiocianato de fluoresceína;

FOXP3 – factor de transcrição forkhead box p3;

FT – factor de transcrição;

IL – interleucina;

INF – interferão;

iTreg – células T reguladoras adaptativas ou induzidas;

MIF – média de intensidade de fluorescência;

n – número de doentes;

NEO – neoplasia;

NK – células *natural killer*;

Nt – número total de doentes;

nTreg – células T reguladoras naturais;

PE – ficoeritrina;

PE – Cy5 – ficoeritrina-cianina;

PerCP – peridinina de clorofila;

SI – sistema imunitário;

SP – sangue periférico;

TC – linfócitos T citotóxicos;

TGF- β – *Transforming Growing Factor β* ;

TH – linfócitos T helper;

TNF- α – fator de necrose tumoral α ;

Treg – T reguladoras.

RESUMO

Introdução: Vários trabalhos científicos comprovam que existe uma *estreita relação* entre doenças autoimunes (DAI) e neoplásicas (NEO). De facto, em doentes submetidos a terapêutica imunossupressora, existe maior incidência de NEO. Por outro lado, em doentes submetidos a tratamentos antineoplásicos, observa-se maior predisposição para a ocorrência de DAI. Vários mecanismos moleculares e celulares têm sido descritos na relação entre autoimunidade e cancro, contudo o papel da Interleucina (IL)-21, da IL-17, do NF- κ B e das células T reguladoras (Treg), não está ainda totalmente clarificado.

Objectivo: Este trabalho tem como objetivo a quantificação das células T reguladoras (Treg) e a avaliação da expressão da IL-21, IL-17, do FOXP3 e do NF- κ B em doentes com doenças autoimunes e/ou neoplásicas.

Materiais e Métodos: O estudo foi efetuado em Sangue Periférico (SP) de doentes portadores de NEO, DAI e ambas as patologias (NEO/DAI) (total=76 doentes: 21 doentes com DAI; 47 doentes com NEO e 8 doentes com NEO/DAI e 7 controlos saudáveis (CTL)). Após a colheita de SP, procedeu-se à análise das diferentes populações linfocitárias, incluindo das células Treg (Treg naturais, nTreg, e induzidas, iTreg, através da marcação CD4⁺/CD127^{low}/CD25^{high} ou γ /FOXP3⁺, respetivamente), da expressão das IL-17 e IL-21, do NF- κ B e do FOXP3, por citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais marcados com sondas fluorescentes. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste Anova, T-student e análise multivariada ($p < 0,05$).

Resultados: Os nossos resultados mostram que os doentes com DAI, NEO e NEO/DAI, apresentam, em geral, diminuição da percentagem de todas as subpopulações linfocitárias quando comparados com controlos saudáveis. Todos os doentes, quer os portadores de DAI, de NEO e de NEO/DAI apresentam uma diminuição significativa da percentagem de células nTreg e aumento da iTreg que produzem FOXP3 relativamente aos indivíduos saudáveis (CTL), sendo de salientar que os doentes com DAI são os que apresentam uma diminuição mais significativa das células nTreg, enquanto que o aumento das células iTreg é mais acentuado nos doentes com NEO/DAI. Além disso, os doentes em geral apresentam aumento da percentagem de células Treg que expressam IL-21, IL-17 e NF- κ B. No entanto,

quando analisámos a população de doentes verificámos que os doentes com DAI são os que apresentam diminuição mais acentuada da expressão destas moléculas e de FOXP3, enquanto nos doentes com NEO se observou o contrário. Os doentes com ambas as patologias, NEO/DAI, são os que apresentam níveis de expressão de FOXP3 mais elevados em ambos os subtipos de células Treg.

Discussão: A baixa expressão de IL-21 e IL17, em doentes com DAI, pode estar relacionado com a eficácia da terapêutica imunossupressora instituída nestes doentes, o que, por outro lado, poderá favorecer o aparecimento de neoplasias. Além disso, a diminuição da expressão de FOXP3 nos doentes com DAI pode estar associado à diminuição da atividade das células Treg e, desta forma, contribuir para a perda de auto-tolerância antigénica e, conseqüentemente, para a autoimunidade. Por outro lado, a elevada ativação do NF- κ B em doentes com NEO pode contribuir para a activação de vias oncogénicas, podendo levar à perda da imunidade anti-tumoral e ao aumento da susceptibilidade para autoimunidade.

Conclusões: As alterações observadas nas subpopulações linfocitárias sugerem o envolvimento do sistema imunitário no processo neoplásico associado à autoimunidade, podendo as citocinas IL-21 e IL-17, os fatores de transcrição NF- κ B e FOXP3 e as células Treg desempenhar um papel importante.

Palavras Chave: Autoimunidade; Cancro; Células Treg; NF- κ B; FOXP3.

ABSTRACT

Background: Recent findings demonstrate that autoimmune diseases and cancer are closely related. In patients undergoing immunosuppression treatment, there is a higher incidence of cancer. Likewise, patients who are submitted to antineoplastic therapies have higher incidence of autoimmune diseases. There are several molecular and cellular mechanisms that seem to be involved simultaneously in the pathology of these diseases. However the role of cytokine 21 and 17, NF- κ B and regulatory T cells is not still completely understood.

Aim: The aim of this work is to quantify regulatory T cells (Treg) and to evaluate the expression of cytokines 21 and 17, FOXP-3 and NF- κ B in patients with autoimmune disease and/or cancer.

Methods: The study was carried out in peripheral blood of patients with autoimmune disease, cancer and both simultaneously (total=76 patients: 21 patients with autoimmune disease; 47 patients with cancer and 8 patients with both diseases and 7 healthy donors). Using flow cytometry, it was analysed, in peripheral blood, the major lymphocyte subpopulations, cytokines 21 and 17, NF- κ B, FOXP-3 and Treg (natural Treg, nTreg, and induced Treg, iTreg, through marking CD4⁺/CD127^{low}/CD25^{high} or γ /FOXP3⁺, respectively). The results obtained were analysed by Anova test, t-student test ($p < 0,05$).

Results: Our results show that all patients involved in this study have a decrease in the percentage of all lymphocyte subpopulations, when compared with healthy donors. All patients with DAI, NEO or NEO/DAI have an important decrease in the percentage of nTreg cells and an increase of iTreg cells that produce FOXP3, when compared with healthy donors, being patients with DAI the ones who have the lowest percentage of nTreg cells, while patients with NEO/DAI the ones who have the highest percentage of iTreg cells. On the other hand, patients, generally, present an increase in the percentage of Treg cells that generate IL-21, IL-17 and NF- κ B. Nevertheless, patients with DAI have the lowest expression of these molecules and FOXP3, while patients with NEO have the opposite. Patients with both diseases, NEO/DAI, have the highest expression of FOXP3 in both types of Treg cells.

Discussion: The smaller expression of cytokines 21 and 17 in patients with autoimmune diseases can be related to the efficiency of immunosuppression treatment received by these patients, which can contribute to the development of cancer. Likewise, in autoimmune diseases, its lower expression of FOXP3, which is related to lower regulatory T cells' activity, can also contribute to the breaking of antigenic self-tolerance and, consequently, to the development of autoimmunity. The higher expression of NF- κ B in patients with cancer can contribute to the activation of oncogenetic pathways, leading to the decrease of cancer immunity and to the increase of risk of autoimmunity.

Conclusions: The changes seen in lymphocyte subpopulations suggest the involvement of immunitary system in carcinogenesis associated with autoimmunity, in what cytokines 21 and 17, NF- κ B and Treg may play a crucial role.

Keywords: Autoimmunity; Cancer; T-reg; NF- κ B; FOXP3.

1. Introdução

O Sistema Imunitário (SI) é um dos principais responsáveis pela homeostasia do organismo humano, tendo a árdua tarefa de o proteger de antigénios patogénicos e, simultaneamente, de manter a necessária tolerância aos auto-antigénios, prevenindo o desenvolvimento de doenças oncológicas e autoimunes, respectivamente³.

O aumento da incidência de doenças neoplásicas nas doenças autoimunes (DAI) e *vice versa* tem sido alvo de várias investigações. A lesão celular repetida e a conseqüente aceleração da renovação celular nas DAI aumenta o risco de aparecimento de erros genéticos que podem condicionar o desenvolvimento de neoplasias (NEO). Assim, as NEO podem surgir a nível dos órgãos alvo das DAI, cujas células são repetidamente lesadas e renovadas. São exemplos o desenvolvimento de carcinoma do cólon em doentes com colite ulcerosa e o desenvolvimento de colangiocarcinoma em doentes com colangite esclerosante primária. Tem sido também verificado aumento da incidência de NEO em localizações diferentes dos órgãos alvo das DAI, explicado pela desregulação do SI, devido à própria doença e/ou aos efeitos da terapêutica imunossupressora ou imunomoduladora, frequentemente utilizadas para controlo da DAI. Verificam-se ainda casos de doenças autoimunes que surgem como síndromas paraneoplásicas, como por exemplo, a dermatomiosite e a polimiosite⁸.

Vários trabalhos científicos comprovam que além da estreita relação entre as DAI e o aparecimento de NEO, também existe uma relação entre NEO e o surgimento posterior de autoimunidade (AI). Assim, em doentes submetidos a terapêutica imunossupressora, existe uma maior incidência de NEO, assim como, em doentes submetidos a tratamentos antineoplásicos, uma maior predisposição para a ocorrência de DAI²⁷.

São vários os mecanismos moleculares e vias de sinalização celular envolvidos, simultaneamente, nos mecanismos de carcinogénese e AI, sendo de salientar o papel da interleucina (IL) 21, IL-17, do NF-κB e das células T reguladoras (Treg)^{5, 27}.

1.1 O papel da IL-21 e da IL-17

A IL-21 é produzida por linfócitos T *helper* (TH), células *natural killer* (NK) e por células da linhagem Th17. Está envolvida numa interação recíproca entre vários tipos de células, conduzindo a efeitos no SI inato e nas respostas humoral e celular do SI adaptativo. Trata-se, portanto, de uma citocina imunomoduladora que vai ativar os mecanismos de resposta do SI com o intuito de combater especificamente um tumor, através da estimulação das próprias células NK, dos macrófagos, dos linfócitos B, com conseqüente produção de anticorpos (Ac) antitumorais, e dos linfócitos T citotóxicos (TC) (Fig. 1). No entanto, esta sua ação também predispõe para o desenvolvimento de DAI que resultam de uma elevação dos níveis séricos de imunoglobulinas, uma vez que esta IL estimula as células T γ/δ , a produção de auto-Ac pelos linfócitos B e de IL-17 (citocina pró-inflamatória) pelas células Th17⁷. Além disso, um estudo desenvolvido por Korn T *et al.* (2007) também evidenciou o papel da IL-21 no aumento das células Th17, com produção de IL17 e, conseqüentemente, diminuição das células Treg¹⁴. Portanto, as ações da IL21 podem levar a respostas autoimunes contra tecidos normais ou contra tecidos malignos. Deste modo, a IL-21 é uma citocina com potente atividade antitumoral, que se encontra associada ao desenvolvimento de DAI, o que constitui uma desvantagem como alvo terapêutico na prática clínica^{6,24,27,29}.

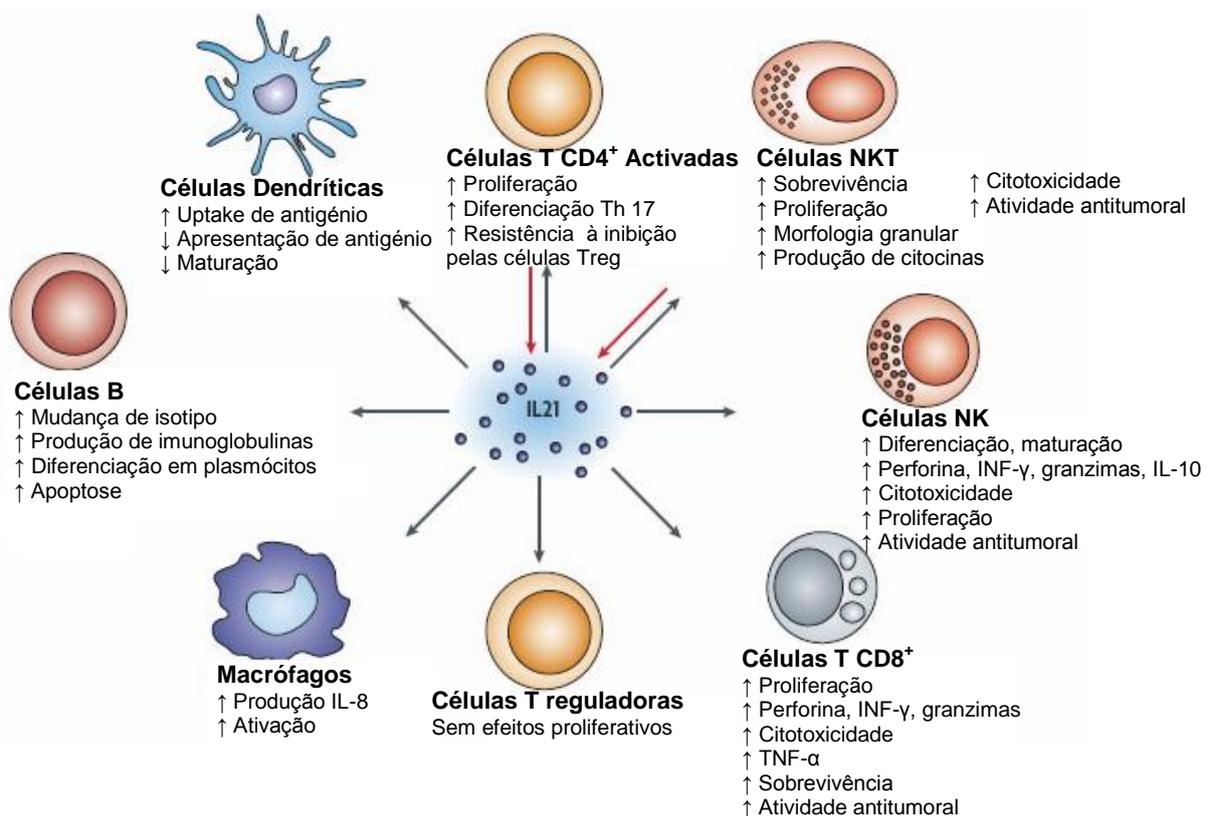


Figura 1 – Ações da IL-21. A IL-21 tem efeitos pleiotrópicos em múltiplas células-alvo. É produzida por múltiplas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e *Natural Killer* (NKT) (indicadas pelas setas vermelhas), constituindo um factor autócrino para estas células com os efeitos indicados, ou pode exercer vários efeitos positivos ou negativos em linhagens não produtoras de IL-21. (Adaptado de Spolski R e Leonard WJ, 2008; http://www.nature.com/nrd/journal/v7/n3/fig_tab/nrd2482_F1.htm).

1.2 Função do NF-κB

Por sua vez, o NF-κB, um fator de transcrição (FT) envolvido em múltiplos processos celulares, em particular na resposta inflamatória e na carcinogénese, poderá ter um papel central em muitas DAI e neoplásicas. O seu modo de ativação varia de acordo com o tipo de célula imunitária, com o seu estágio de ativação e de desenvolvimento. Nos linfócitos T periféricos, o NF-κB está inativo no citoplasma devido à sua ligação a proteínas inibitórias. No entanto, quando os linfócitos T são ativados por citocinas (ex: TNF-α), essas proteínas inibitórias sofrem fosforilação e ubiquitinação, com posterior degradação pelo proteasoma. Assim, o NF-κB fica livre, entra no núcleo, liga-se ao ADN dos linfócitos T e ativa a expressão de vários genes alvo, incluindo aqueles que codificam citocinas, como por exemplo a IL-2, o TNF-α e o IFN-β, entre outras. Além disso, também regula a expressão de genes anti-apoptóticos, o que é essencial para a proliferação de células T após exposição ao antígeno. Por outro lado, os monócitos e os linfócitos B expressam constitutivamente a forma ativa do NF-κB. Deste modo, a inibição da degradação das proteínas inibitórias permitiria manter inativo o NF-κB, com a consequente redução da produção de fatores de sobrevivência para as células T, reduzindo a autoimunidade, mas mantendo a imunidade anti-tumoral⁵. Por outro lado, a ativação do NF-κB não só está associado ao desenvolvimento de doenças autoimunes como de neoplasias¹⁰.

1.3 Importância das células T reguladoras

As células Treg são um subtipo de linfócitos T que expressam CD4, caracterizados pela expressão da molécula CD25 e do fator nuclear FOXP3²² e que

são especializados na supressão de respostas imunitárias descontroladas que podem ser prejudiciais para o Homem¹², através da indução da supressão das células T efectoras²². Embora as células Treg sejam, genericamente, consideradas células T com actividade imunossupressora, existem vários estudos acerca das populações de células Treg, que se diferenciam pelo seu desenvolvimento, fenótipo e função. São, assim, classificadas em células Treg naturais ou induzidas/adaptativas²⁸. As chamadas Tregs naturais representam 5 a 10% das células T CD4⁺ periféricas e expressam constitutivamente o receptor de cadeia α da IL-2 (CD25), sendo assim denominadas CD4⁺CD25⁺²². São produzidas naturalmente nos corpúsculos de Hassal no timo como uma subpopulação de células T funcionalmente distintas e maduras, e o seu desenvolvimento e função depende da expressão do fator de transcrição FOXP3 (factor forkhead box P3)²⁸. As células Tregs denominadas adaptativas ou induzidas, por sua vez são geradas na periferia a partir das células T naive após uma variedade de estímulos antigénicos ou em condições ditas tolerogénicas. Vários tipos de Tregs adaptativas têm sido descritos, incluindo as TR1, que produzem IL-10 e cuja função supressiva está bem documentada nas doenças alérgicas, autoimunes e transplante alogénico. Outras Tregs adaptativas citadas são as TR3 (produtoras de TGF- β), certas células T gama-delta CD4⁻CD8⁻, células T *natural killer* e células T CD8⁺CD28⁻²²⁻²³. Estudos recentes revelam a base celular e molecular de desenvolvimento e função das células Treg, assim como a implicação da desregulação destas células em doenças do foro imunológico²⁸ e neoplásicas⁴.

Assim, as células Treg clássicas (naturais) são um tipo de linfócitos T que expressam CD4 e CD25, um constituinte do recetor da IL-2, e o fator de transcrição FOXP3, elementos essenciais na diferenciação e função destas células. As proteínas codificadas por genes dependentes do FOXP3 contribuem para a atividade supressora das células Treg^{1,13}. A alteração destas células tem sido associada a DAI e NEO. No entanto, enquanto que nas DAI a diminuição das células Treg contribui para a falência do SI na proteção da sua autodestruição, nas NEO tem-se verificado o aumento destas células no SP de doentes com tumores sólidos. Além disso, a acumulação de células Treg na massa tumoral tem sido associada a pior prognóstico²⁷, enquanto que em linfomas se pode associar a um prognóstico mais favorável¹¹. Estas observações sugerem que a ação supressora das células Treg pode estar implicada na falência da atividade antitumoral do SI, e, desta forma,

contribuir para o desenvolvimento do cancro. Um dos mecanismos que pode influenciar a resposta imunitária é a modificação epigenética do FOXP3. No entanto, o papel das alterações epigenéticas, nomeadamente da alteração da metilação do FOXP3 nestas células continua em estudo¹⁸.

Apesar de alguns estudos evidenciarem isoladamente a relação entre a IL-21, a IL-17, o NF-κB e as células Treg, com o desenvolvimento de doenças autoimunes e neoplásicas, não está perfeitamente esclarecido qual a sua efetiva contribuição e de que modo poderão constituir marcadores celulares e moleculares comuns às doenças autoimunes e neoplásicas, de modo a identificar doentes em risco e novos alvos terapêuticos.

2. Objetivo: Neste sentido, o objetivo deste trabalho é quantificar as células T reguladoras (Treg) e avaliar a expressão das interleucinas (IL)-21 e IL-17 e dos fatores de transcrição FOXP3 e NF-κB, em doentes com doenças autoimunes e/ou neoplásicas. Deste modo esperamos contribuir para a identificação de “elos comuns” que possam constituir marcadores de diagnóstico precoce, com o intuito de facilitar o desenvolvimento de novos tratamentos dirigidos a estes alvos, que aumentem a imunidade tumoral e reduzam a autoimunidade subjacente²⁷.

3. Material e Métodos

O estudo foi efetuado em Sangue Periférico (SP) de 7 controlos saudáveis (CTL) e de 76 doentes, dos quais 21 com doenças autoimunes (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 Cólo-retal, Síndrome Mielodisplásica, Mieloma Múltiplo e Leucemia Mielóide Crónica) e 8 com ambas as patologias (doenças autoimunes 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 e quantificação das células Treg, e à avaliação da produção de citocinas (IL-21 e IL-17) e expressão do FOXP3 e NF- κ B por citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais marcados com sondas fluorescentes.

3.1 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 (Fig. 2). Assim, aproximadamente um milhão de leucócitos dos doentes e dos controlos saudáveis foram marcados com 25 μ 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, incubou-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, ressuspensas e analisadas num citómetro de fluxo FACSCalibur™ (BD Biosciences).

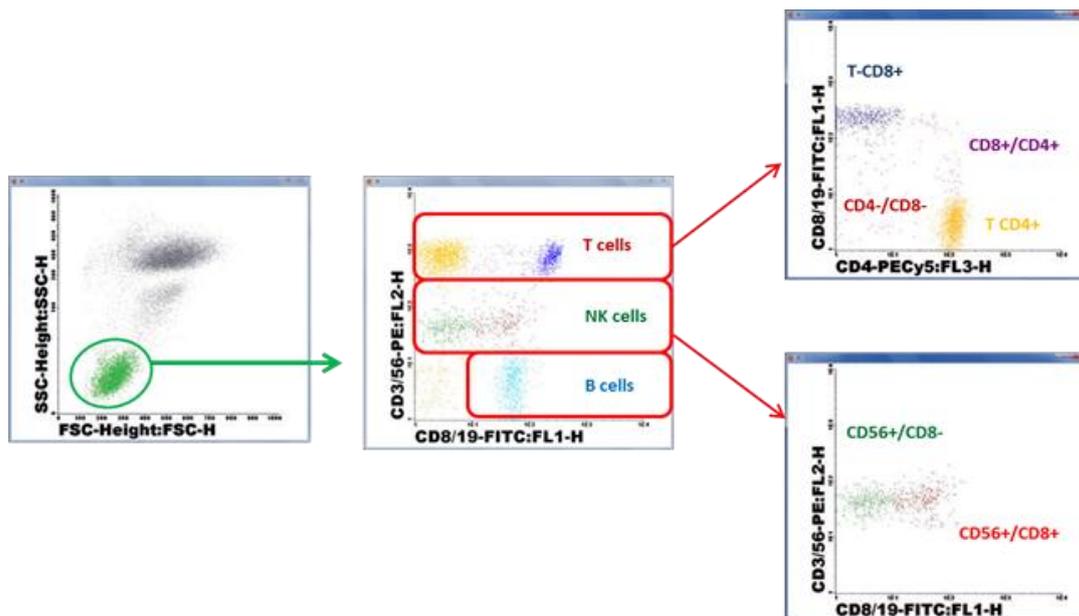


Figura 2 - Dot plots representativos da análise das diferentes populações linfocitárias.

Tabela 1 – Distribuição da amostra de doentes e controlos.

Nt=76 dts	Tipo de Patologia	N.º indivíduos
Análise das populações Linfocitárias	CTL	7
	NEO	47
	DAI	21
	NEO/DAI	8
Quantificação das células Treg e avaliação da expressão de IL-21, IL-17, FOXP-3 e NF-kB	CTL	4
	NEO	9
	DAI	7
	NEO/DAI	5

Nt: número total de doentes; dts: doentes; N.º: número de indivíduos utilizados; CTL: controlo saudável; NEO: doentes com neoplasia; DAI: doentes com doença autoimune; NEO/DAI: doentes com neoplasia e doença autoimune em simultâneo.

3.2 Quantificação das células Treg e avaliação da expressão do FOXP3, NF-kB, IL-17 e IL-21

Para a identificação e quantificação das células Treg e avaliação da expressão do FOXP3, do NF-kB, da IL-17 e da IL-21, as células dos doentes e dos

controles 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 diferentes populações celulares, em particular as células Treg naturais (clássicas) ($CD4^+$, $CD25^{high/alta}$ expressão e $CD127^{low/baixa}$ expressão) e as adaptativas (induzidas) ($CD4^+$, $CD25^-$ e $CD127^{low/baixa}$ expressão)¹⁸. Assim, incubou-se, aproximadamente, um milhão de células de sangue periférico dos doentes e dos controles com 1 µg de cada anticorpo monoclonal durante 15 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Seguidamente, adicionou-se 100 µL 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 µL de solução de permeabilização (IntraCell, Immunostep) e com 1 µg de anticorpo monoclonal anti-FOXP3-PE (BD Biosystems), anti-NF-κB-PE (BD Biosystems), anti-IL-17-PE (BioLegend) ou anti-IL-21-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.

3.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados pelo teste Anova, T-student e análise multivariada. Os valores representam a média ± desvio padrão. O nível de significância utilizado foi de 0,05, rejeitando-se a hipótese nula quando $p < 0.05$. O significado estatístico das diferenças entre as médias é indicado por *.

4. Resultados

A identificação das populações linfocitárias dos controlos (CTL) e dos doentes com neoplasia (NEO), com doença autoimune (DAI) e com as ambas as doenças (NEO/DAI), foi efetuada com base nas suas características imunofenotípicas, através da expressão de antigénios de superfície característicos (Fig. 3 a 6). Assim, os linfócitos B foram identificados pela marcação com CD19 (CD19⁺), os linfócitos T pela marcação com CD3 (CD3⁺) e as células *natural killer* pela dupla marcação CD3/CD56 (CD3⁻/CD56⁺). Seguidamente, procedeu-se à caracterização dos linfócitos T através da quantificação das subpopulações CD4⁺ (Linfócitos TH), CD8⁺ (Linfócitos TC), dos linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ e T CD4⁻/CD8⁻. Por fim, foram caracterizadas as subpopulações das células NK pela quantificação da expressão de CD8 (CD8⁺ e CD8⁻, correspondendo às células NK8⁺ e NK8⁻, respetivamente).

Inicialmente, analisou-se a percentagem de linfócitos nas amostras de sangue periférico (SP) dos doentes e controlos. Como se pode observar na Fig. 3, todos os doentes (NEO, DAI e NEO/DAI) apresentam diminuição da percentagem de linfócitos totais relativamente aos indivíduos controlo (25%±3%), sendo esta diferença estatisticamente significativa nos doentes com NEO (20%±9%) e com DAI (18%±8%). Nos doentes com NEO/DAI apenas se observa a mesma tendência (21%±8%).

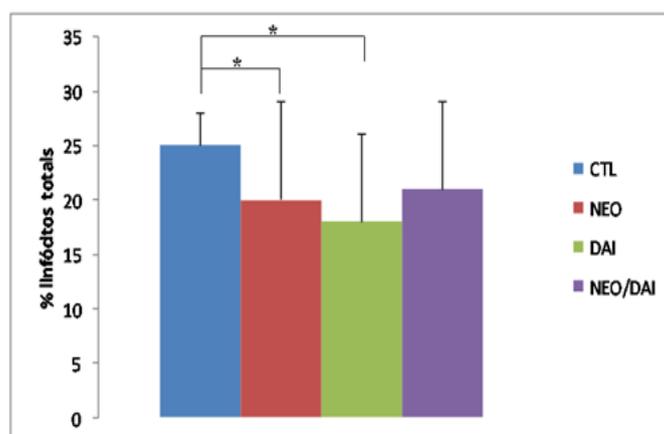


Figura 3 – Quantificação dos Linfócitos Totais no Sangue Periférico em controlos saudáveis (CTL), em doentes com neoplasia (NEO), com doença autoimune (DAI) e com ambas as patologias (NEO/DAI). Os resultados estão expressos em percentagem (%) e representam a média±desvio padrão (* p<0,05).

Seguidamente, procedeu-se à análise das diferentes populações linfocitárias, B, T e NK nos doentes e controlos (Fig. 4, 5 e 6, respetivamente).

Assim, e como representado na Fig. 4, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa da percentagem de linfócitos B no sangue periférico dos doentes com DAI ($9\% \pm 5\%$) e com NEO/DAI ($8\% \pm 6\%$), comparativamente aos indivíduos CTL ($16\% \pm 5\%$) e com NEO ($15\% \pm 17\%$).

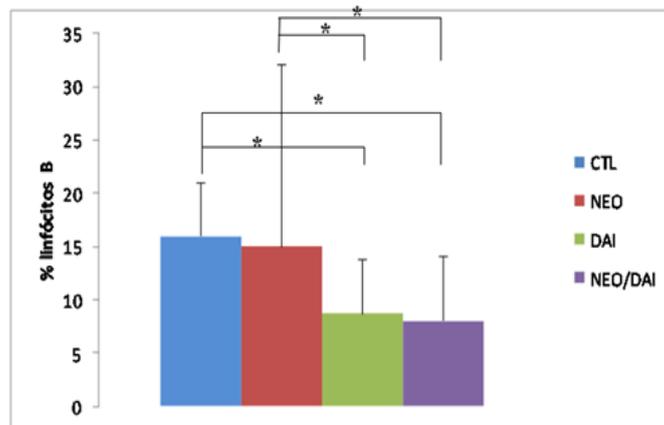


Figura 4 – Quantificação dos Linfócitos B no Sangue Periférico em controlos saudáveis (CTL), em doentes com neoplasia (NEO), com doença autoimune (DAI) e ambas as patologias (NEO/DAI). Os resultados estão expressos em percentagem (%) e representam a média±desvio padrão (* $p < 0,05$).

Por outro lado, observou-se um aumento estatisticamente significativo da percentagem de linfócitos T nos indivíduos com DAI ($76\% \pm 10\%$) em relação aos indivíduos CTL ($68\% \pm 5\%$) e com NEO ($65\% \pm 16\%$) (Fig. 5-A). Nos doentes com NEO/DAI observa-se a mesma tendência ($73\% \pm 14\%$). Contrariamente, nos doentes com neoplasia, a percentagem de linfócitos T tende a ser inferior à dos CTL e dos doentes com NEO/DAI.

A análise das subpopulações linfocitárias T revelou que os doentes com NEO apresentam um aumento da percentagem de células TH ($53\% \pm 19\%$) quando comparados com os doentes com DAI ($41\% \pm 8\%$) (Fig. 5-B). Por outro lado, a percentagem de linfócitos TH nos doentes com neoplasia ($53\% \pm 19\%$) é tendencialmente superior à observada nos controlos ($48\% \pm 11\%$), enquanto nos

doentes com NEO/DAI (49%±24%) é aproximadamente igual à observada nos indivíduos CTL, tal como podemos observar na Fig. 5-B.

Relativamente às células TC (Fig. 5-C), observou-se que os com NEO e NEO/DAI são os que apresentam uma maior percentagem destas células (30%±13% e 37%±20%, respetivamente), enquanto que nos doentes com DAI a percentagem é inferior (25%±10%) comparativamente aos CTL (29%±9%).

Apesar das diferenças percentuais encontradas, a razão entre os linfócitos TH e os linfócitos TC (Fig. 5-D) é idêntica, observando-se que a percentagem de linfócitos TH é cerca de duas vezes superior à percentagem de linfócitos TC, quer nos controlos saudáveis quer em todas as patologias estudadas.

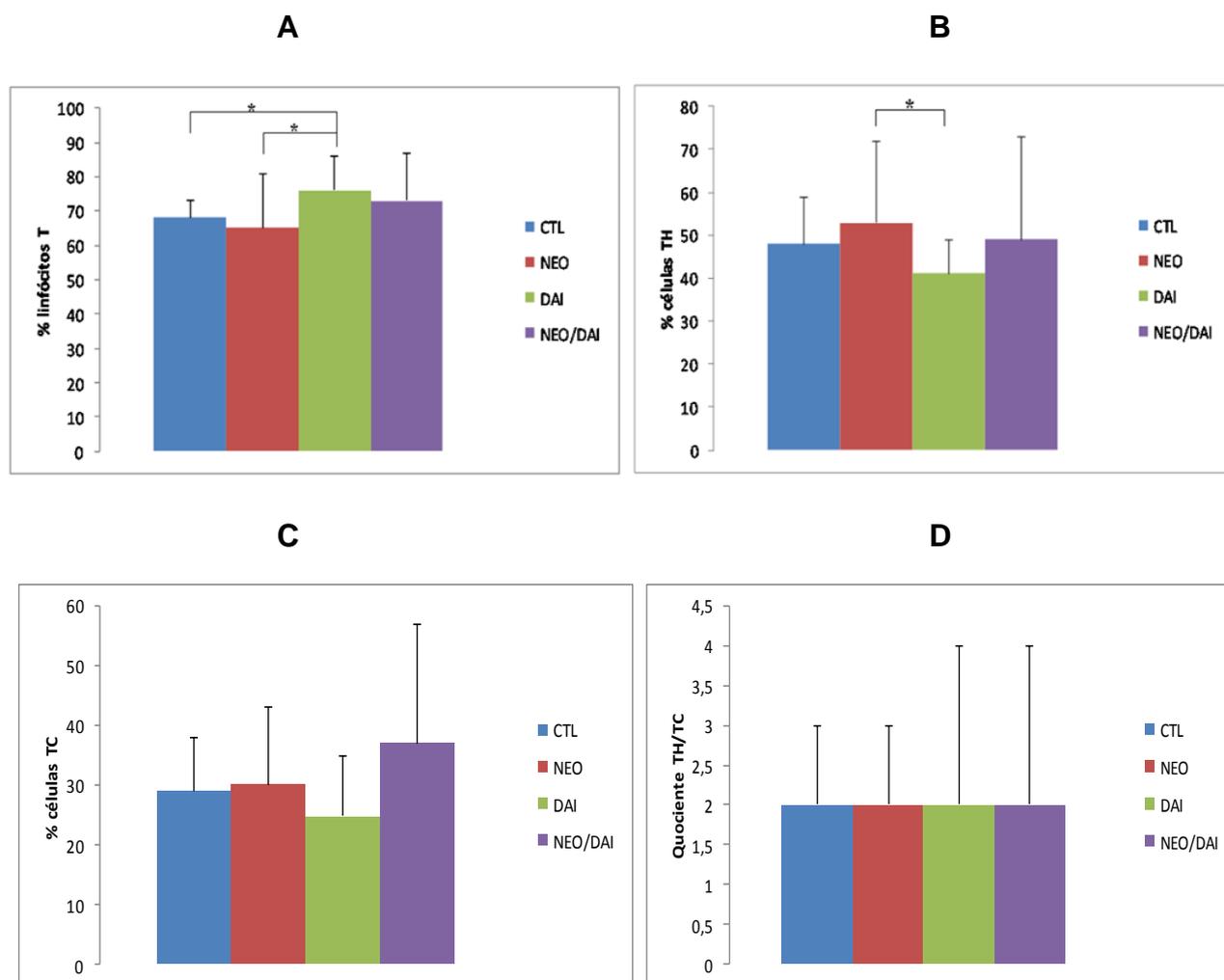


Figura 5 – Análise das subpopulações de linfócitos T no Sangue Periférico em controlos saudáveis (CTL) e em doentes com neoplasia (NEO), doença autoimune (DAI) e ambas as patologias (NEO/DAI). Em (A) está representada a percentagem de linfócitos T totais (CD3⁺), em (B) a percentagem de linfócitos T *helper* (TH, CD3⁺/CD4⁺), em (C) a percentagem de linfócitos T *citotóxicos* (TC, CD3⁺/CD8⁺) e em (D) o quociente TH/TC.

Os resultados estão expressos em percentagem (%) e representam a média±desvio padrão (* p<0,05).

Posteriormente, analisaram-se as subpopulações de linfócitos T $\alpha\beta$ (Fig. 6-A), que expressam CD4 e CD8 ($CD4^+/CD8^+$ - T^{++}), e de linfócitos T que não expressam nenhum destes marcadores, $\gamma\delta$ ($CD4^-CD8^-$ - T^{--}) (Fig. 6-B). Como se pode observar na Fig. 6-A, os indivíduos com DAI e NEO ($5\%\pm 5\%$ e $3\%\pm 2\%$, respectivamente) apresentam um aumento tendencial da percentagem de linfócitos T duplamente positivos (T^{++}) em comparação com os indivíduos CTL ($2\%\pm 2\%$). Por outro lado, os indivíduos com NEO/DAI apresentam aproximadamente 2 vezes mais linfócitos T^{--} ($14\%\pm 12\%$) relativamente aos doentes com DAI ($7\%\pm 5\%$) e aos controlos ($7\%\pm 2\%$) e cerca de três vezes mais que os doentes com NEO ($5\%\pm 4\%$).

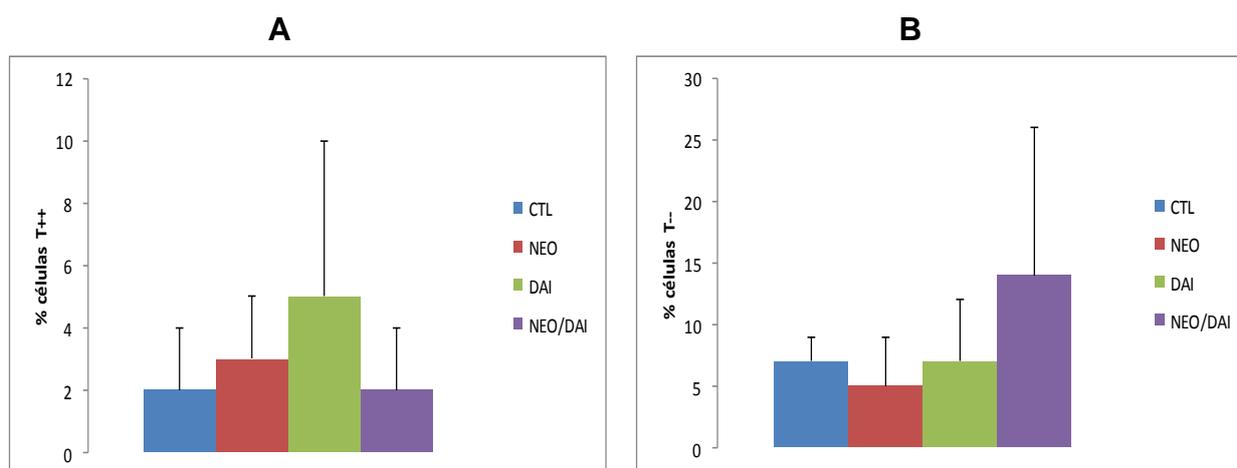


Figura 6 – Análise das subpopulações de linfócitos T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ no Sangue Periférico em controlos saudáveis (CTL) e em doentes com neoplasia (NEO), doença autoimune (DAI) e ambas (NEO/DAI). Em (A) está representada a percentagem de linfócitos T $\alpha\beta$ ($CD3^+/CD4^+/CD8^+$) e em (B) a percentagem de linfócitos T $\gamma\delta$ ($CD3^+/CD4^-/CD8^-$). Os resultados estão expressos em percentagem (%) e representam a média±desvio padrão (* p<0,05).

Por fim, analisou-se a população de células NK nos doentes com DAI, NEO e DAI/NEO (Fig. 7). Tal como se pode observar na Fig. 7-A, os indivíduos com NEO e com NEO/DAI apresentam uma percentagem de células NK superior ($20\%\pm 11\%$) ao observado nos doentes com DAI ($15\%\pm 7\%$) e nos controlos saudáveis ($16\%\pm 6\%$).

Quando analisámos as subpopulações das células NK, podemos constatar que os doentes com DAI e com NEO são os que apresenta menor percentagem de células NK CD8⁺ (DAI: 5%±3%; NEO: 12%±15%) no sangue periférico (Fig. 7-B), enquanto os doentes com NEO/DAI apresentam sensivelmente a mesma percentagem deste subtipo de células NK em relação aos controlos saudáveis (28%±19%). Por outro lado, neste estudo observou-se que os doentes com DAI apresentam cerca de um terço da percentagem de células NK CD8⁻ (DAI: 10%±6%) (Fig. 7-C) relativamente ao observado nos controlos saudáveis (CTL: 38%±23%) e que os doentes com neoplasia e doença autoimune (DAI/NEO) apresentam aproximadamente duas vezes mais células NK CD8⁻ (61%±30%) que os controlos, sendo os indivíduos com DAI os que apresentam menor percentagem desta células.

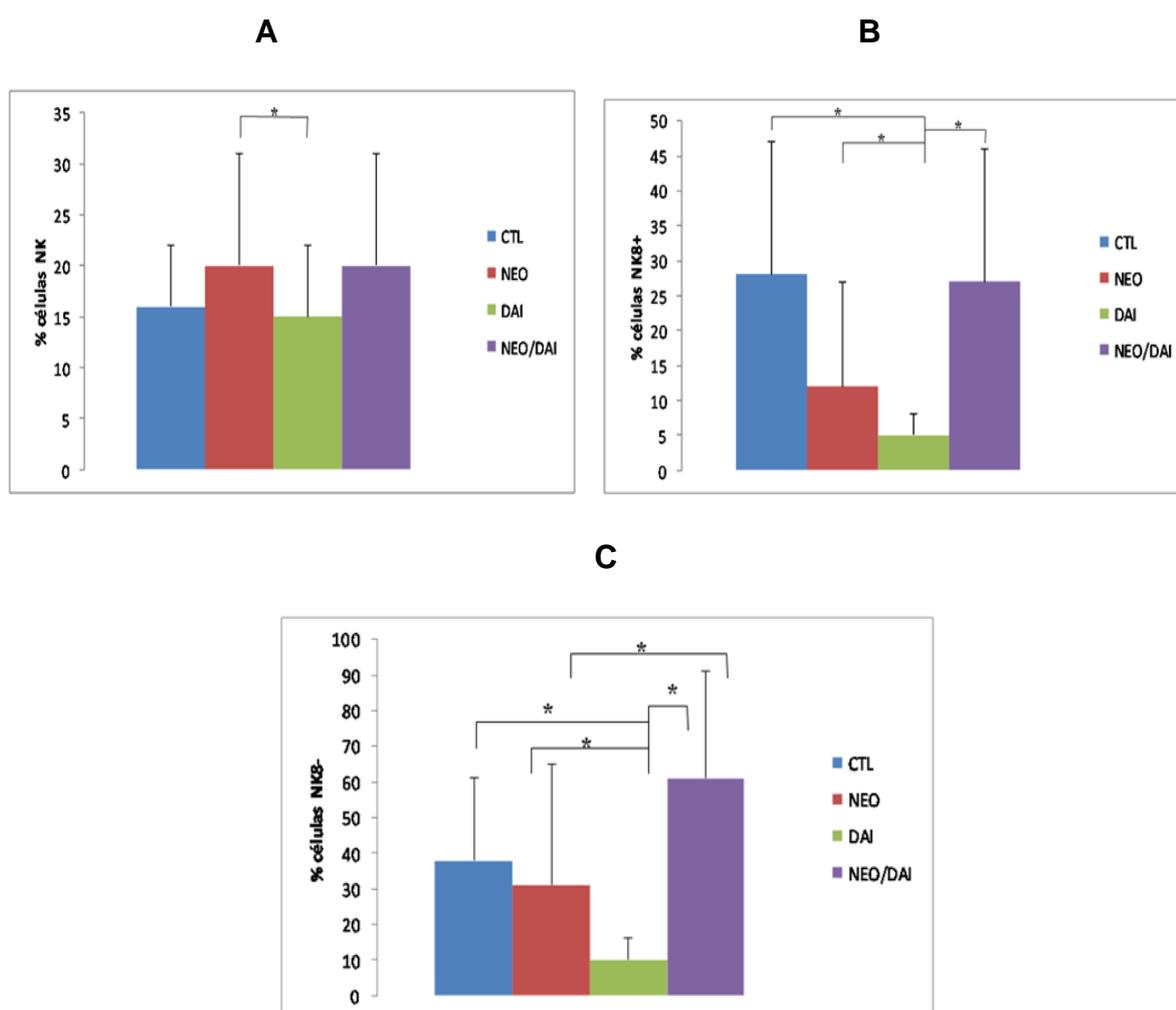


Figura 7– Análise das células *natural Killer* (NK) e das suas subpopulações no Sangue Periférico em controlos saudáveis (CTL) e em doentes com neoplasia (NEO), doença

autoimune (DAI) e ambas as patologias (NEO/DAI). Em (A) está representada a percentagem de células NK (CD3⁺/CD56⁺), em (B) a percentagem de células NK8⁺ (CD3⁺/CD56⁺/CD8⁺) e em (C) a percentagem de células NK8⁻ (CD3⁺/CD56⁺/CD8⁻). Os resultados estão expressos em percentagem (%) e representam a média±desvio padrão (* p<0,05).

4.1 Identificação das células Treg e análise da expressão de FOXP3

Para a identificação e quantificação das células Treg naturais (nTreg) consideraram-se as células que simultaneamente são CD4 positivas, CD25 de alta expressão, CD127 de baixa expressão e FOXP3 positivas (CD4⁺, CD25^{high}, CD127^{low} e FOXP3⁺) (Fig. 8-A). Por outro lado, as células Treg adaptativas ou induzidas (iTreg) foram consideradas CD4⁺, CD25⁻, CD127^{low} e FOXP3⁺ (Fig. 8-B).

Observando a Fig. 8-A, podemos verificar que todos os doentes, quer os portadores de DAI, de NEO e de NEO/DAI apresentam uma diminuição significativa da percentagem de células nTreg relativamente aos indivíduos saudáveis (CTL), sendo de salientar que os doentes com DAI são os que apresentam uma diminuição mais acentuada destas células. De fato, nos doentes com DAI a percentagem de nTreg é 8% ±18%, nos com NEO é 40% ± 22% e nos com NEO/DAI é 46% ± 19%, enquanto que nos controlos é de 64% ±4%, sendo as diferenças entre os diferentes grupos estatisticamente significativas.

Por outro lado, todos os doentes com as diferentes patologias (DAI, NEO e NEO/DAI) apresentam uma percentagem de células CD4⁺CD127^{low}CD25⁻ (iTreg) mais elevada em relação aos controlos saudáveis. No entanto, os doentes com NEO/DAI são os que tem uma percentagem mais elevada destas células (30% ± 6%), quer em relação aos controlos (5% ± 2%), quer em relação aos doentes com DAI (20% ± 12%) e com NEO (18% ± 10%) (Fig. 8-B).

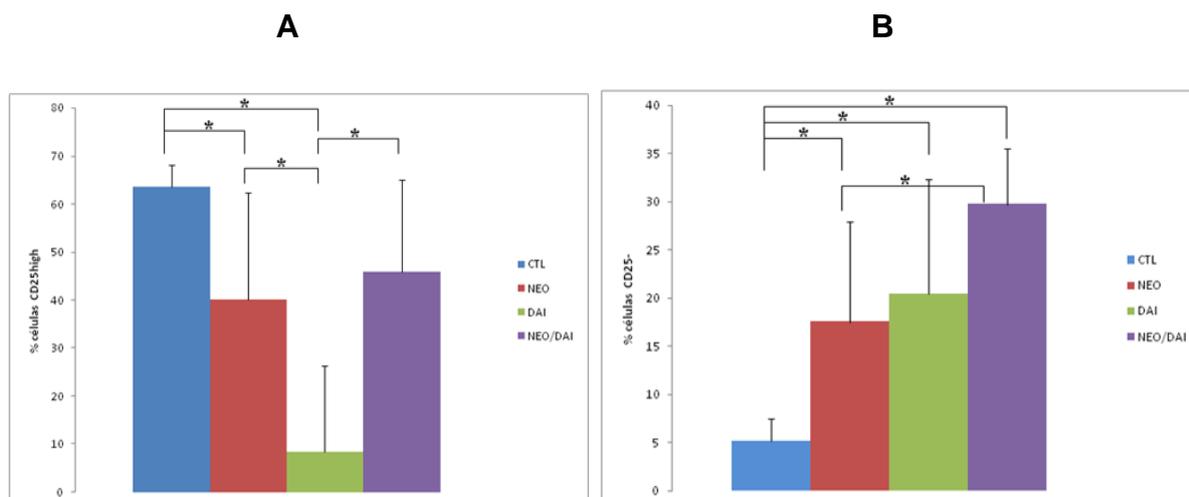


Figura 8 – Avaliação das células Treg em controlos saudáveis (CTL), em doentes com neoplasia (NEO), doença autoimune (DAI) e ambas as patologias (NEO/DAI). As células Treg naturais (nTreg), $CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$ (A), e as induzidas (iTreg), $CD4^+CD127^{low}CD25^-$ (B), foram identificadas no sangue periférico de controlos e doentes como descrito na seção de materiais e métodos. Os resultados são expressos em percentagem (%) e representam a média±desvio padrão (* $p < 0,05$).

Posteriormente avaliamos o nível de expressão de FOXP3 nestes dois tipos de células Treg como representado na Fig. 9. Como podemos observar, os doentes com DAI em média não expressam FOXP3 nas células nTreg ($4MIF \pm 7MIF$) (Fig. 9-A) e nas células iTreg são os que apresentam menor expressão deste fator de transcrição ($14MIF \pm 4MIF$) (Fig. 9-B), sendo as diferenças estatisticamente significativas. Por outro lado, nos doentes com NEO e NEO/DAI a expressão de FOXP3 é superior em ambos os subtipos de células Treg, nTreg (NEO: $36MIF \pm 18MIF$ e NEO/DAI: $49MIF \pm 16MIF$) (Fig. 9-A) e iTreg (NEO: $35MIF \pm 24MIF$ e NEO/DAI: $41MIF \pm 20MIF$) (Fig. 9-B) em relação aos controlos saudáveis (CTL: $24MIF \pm 5MIF$).

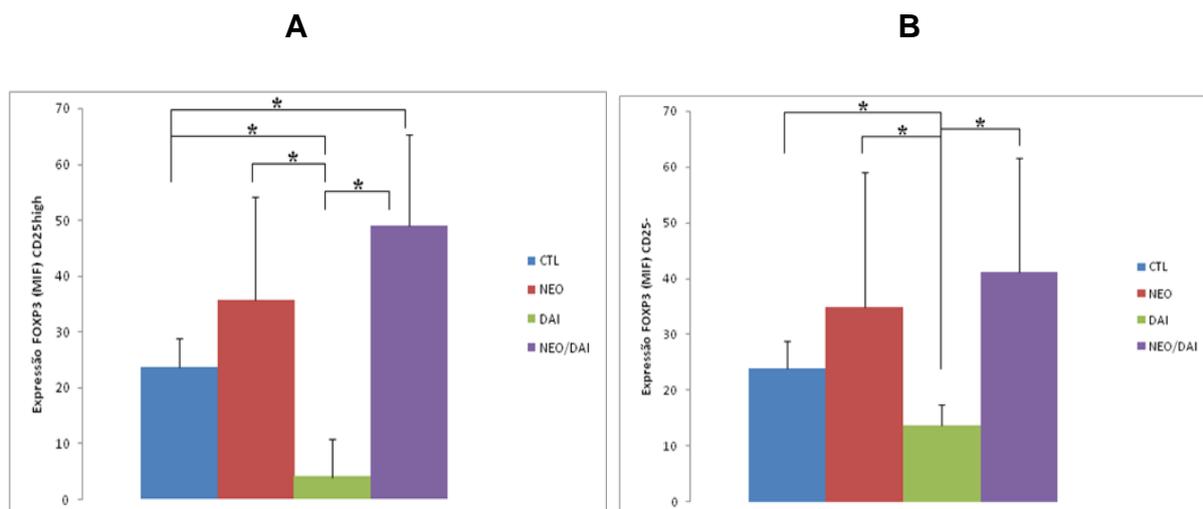


Figura 9 – Análise da expressão de FOXP3 em células Treg. Em (A) está representada a expressão de FOXP3 em células Treg naturais, $CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$, e em (B) em Treg induzidas, $CD4^+CD127^{low}CD25^-$, no sangue periférico de controlos saudáveis (CTL) e em doentes com neoplasia (NEO), doença autoimune (DAI) e ambas as patologias (NEO/DAI). Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média±desvio padrão (* $p < 0,05$).

4.2 Análise da expressão de IL-21

A percentagem de células T reguladoras naturais ($CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$) que expressam IL-21 (Fig. 10-A) é superior em todos os grupos de doentes estudados, quando comparado com o CTL ($3\% \pm 0,5\%$). No entanto, os doentes com NEO/DAI ($20\% \pm 5\%$) são os que apresentam maior percentagem de células nTreg que expressam esta citocina, seguido pelos doentes com DAI ($17\% \pm 21\%$) e com NEO ($14\% \pm 10\%$). Contudo, apenas nos doentes com NEO a percentagem de células iTreg, $CD4^+CD127^{low}CD25^-$, que expressa IL-21 é estatisticamente superior ($12\% \pm 8\%$), enquanto nos doentes com NEO/DAI é ligeiramente inferior ($0,42\% \pm 0,55\%$) (Fig. 10-C), quando comparado com os indivíduos CTL ($1\% \pm 0,23\%$). As células nTreg e iTreg dos doentes com DAI (Fig. 10-B e D, respectivamente) são as que apresentam menor expressão de IL-21, sendo esta expressão ($5MIF \pm 6MIF$) mais acentuadamente diminuída nas células nTreg (Fig. 10-B), enquanto que a expressão desta citocina por estas células nos doentes com NEO ($18MIF \pm 4MIF$) e com NEO/DAI ($17MIF \pm 1MIF$) são ligeiramente superiores aos observados nos indivíduos controlo ($15MIF \pm 2MIF$).

Por outro lado, nas células $CD4^+CD127^{low}CD25^-$ de todos os doentes estudados os níveis de expressão de IL-21 são inferiores (NEO: $15MIF \pm 6MIF$; DAI: $12MIF \pm 2MIF$; NEO/DAI: $14MIF \pm 1MIF$) relativamente ao dos indivíduos controlos ($19MIF \pm 4 MIF$) (Fig. 10-D).

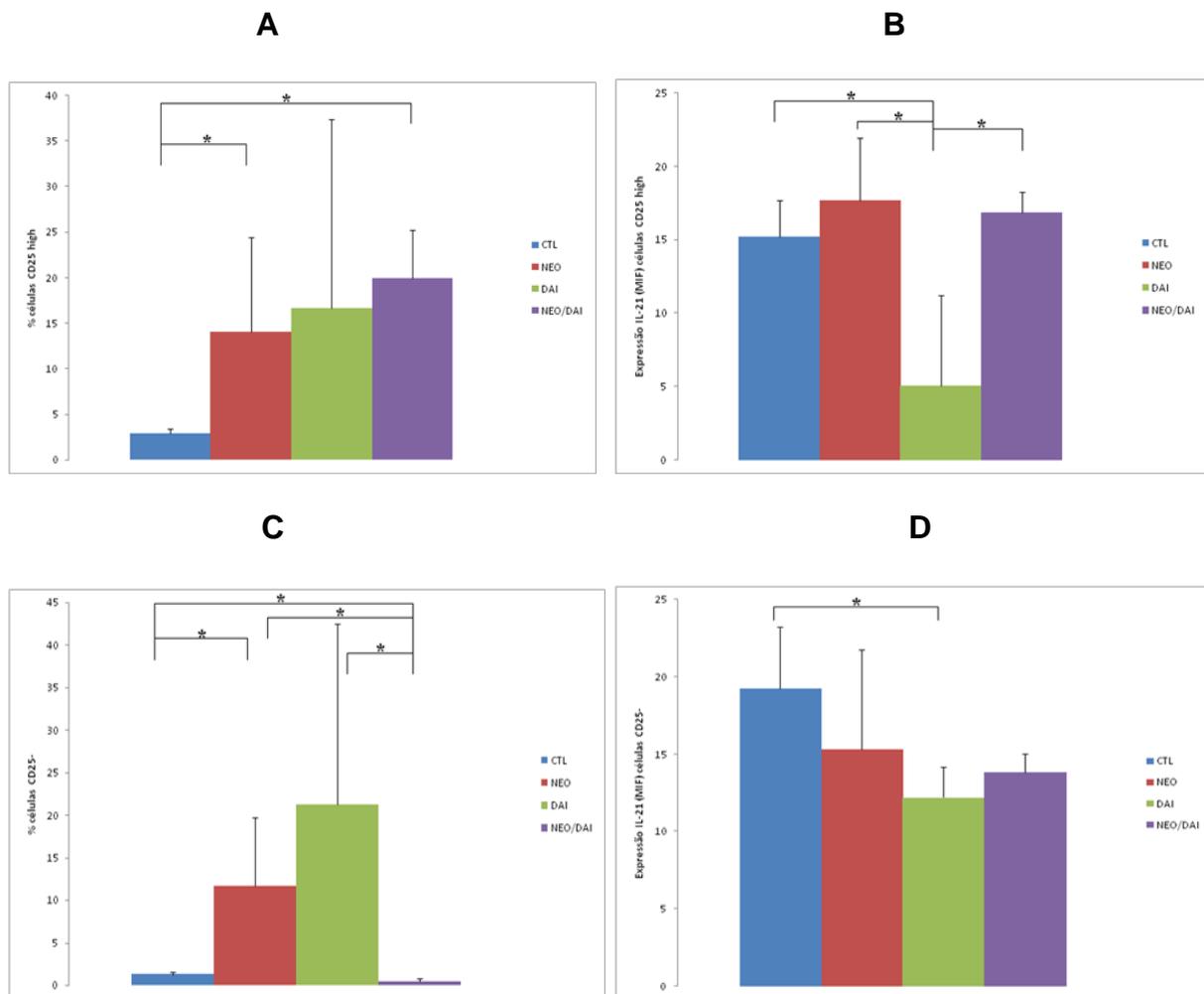
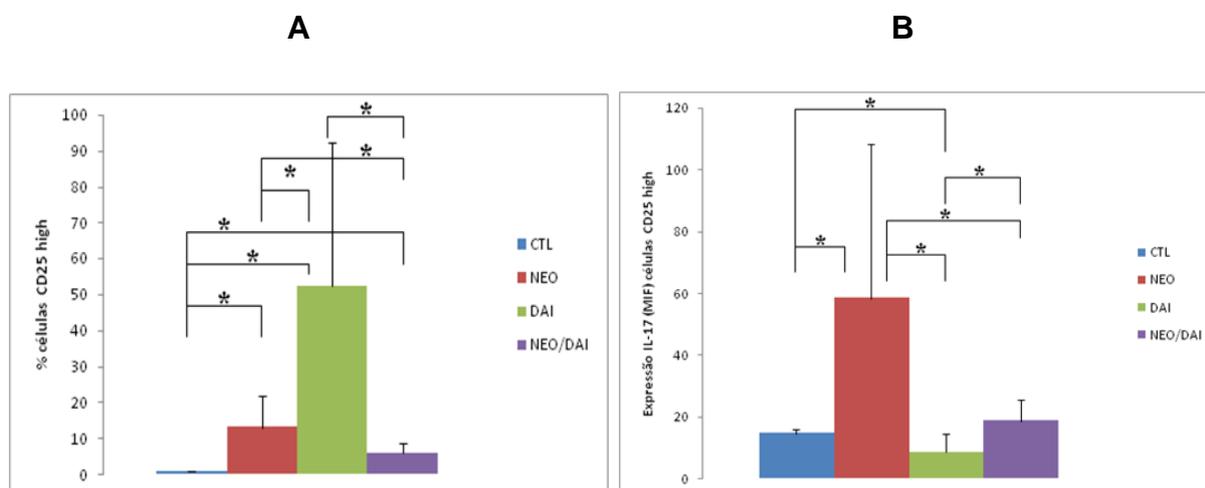


Figura 10 – Avaliação da percentagem (A, C) e níveis de expressão (B, D) de IL21 em células Treg, $CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$ (A, B) e $CD4^+CD127^{low}CD25^-$ (C, D), no sangue periférico de controlos saudáveis (CTL) e em doentes com neoplasia (NEO), doença autoimune (DAI) e ambas as patologias (NEO/DAI). Os resultados são expressos em percentagem (%) e em média de intensidade de fluorescência (MIF), respetivamente, e representam a média±desvio padrão (* $p < 0,05$).

4.3 Análise da expressão de IL-17

Da análise da Fig. 11-A, podemos concluir que os doentes com DAI são os que apresentam maior percentagem de células $CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$ que expressa IL-17 ($53\% \pm 40\%$), seguidos pelos doentes com NEO ($13\% \pm 9\%$) e NEO/DAI ($6\% \pm 3\%$), em relação aos controlos saudáveis ($1\% \pm 0,2\%$). Já os doentes com DAI são aqueles que apresentam menor expressão de IL-17 nas células nTreg ($9MIF \pm 6MIF$) (Fig. 10-B), sendo os indivíduos com NEO ($58MIF \pm 50MIF$) aqueles que apresentam maior expressão. Os indivíduos com NEO/DAI apresentam um valor de expressão que se assemelha ao do CTL ($19MIF \pm 7MIF$ e $15MIF \pm 1MIF$, respetivamente).

A percentagem de células $CD4^+CD127^{low}CD25^-$ que expressam IL-17 (Fig. 11-C) é superior em todos os doentes, NEO ($19\% \pm 12\%$), DAI ($25\% \pm 22\%$) e NEO/DAI ($28\% \pm 36\%$) em relação aos indivíduos CTL ($2\% \pm 1\%$), embora esta diferença só seja estatisticamente significativa nos doentes com DAI e NEO. Por sua vez, a expressão de IL-21 (Fig. 11-D) por parte destas células é menor nos doentes com DAI ($12MIF \pm 6MIF$) do que nos CTL ($19MIF \pm 3MIF$) e do que nos que têm NEO ($24MIF \pm 10MIF$). Por outro lado, os doentes com NEO/DAI ($89MIF \pm 84MIF$) tendem a apresentar um aumento bastante significativo da expressão desta citocina.



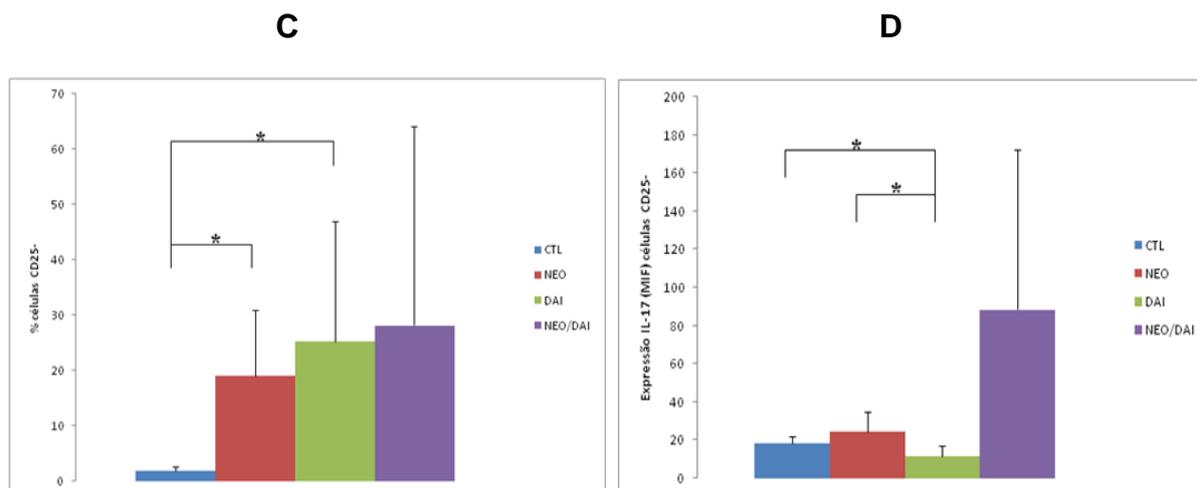


Figura 11 – Avaliação da percentagem (A, C) e níveis de expressão (B, D) de IL17 em células Treg, CD4⁺CD127^{low}CD25^{high} (A, B) e CD4⁺CD127^{low}CD25⁻ (C, D), no sangue periférico de controlos saudáveis (CTL) e em doentes com neoplasia (NEO), doença autoimune (DAI) e ambas as patologias (NEO/DAI). Os resultados são expressos em percentagem (%) e em média de intensidade de fluorescência (MIF), respetivamente, e representam a média±desvio padrão (* p<0,05).

4.4 Análise da expressão de NF-kB

Os doentes com DAI são os que apresentam uma percentagem mais elevada de células nTreg e iTreg (35%±35% e 25% ± 18%, respetivamente) que expressam NF-kB, relativamente aos outros tipos de doentes (NEO/DAI: 1%±2% e NEO: 4% ±2%) e controlos (CTL: 3% ±1%) (Fig. 12-A) e (NEO/DAI: 3%±1% e NEO: 4%±7%) e controlos (CTL: 3%±1%) (Fig. 12-C). Contudo, são os que apresentam menor expressão de NF-kB nas duas populações de Treg (Fig. 12-B e D), sendo negativa nas nTreg. Por outro lado, as células nTreg dos doentes com NEO são as que expressam mais NF-kB (23MIF ±21MIF) em relação aos doentes com NEO/DAI (13MIF ±1MIF) e aos CTL (16MIF ±4MIF) (Figura 12-B), observando-se a mesma tendência para as células iTreg (NEO: 30MIF±17MIF; NEO/DAI: 27MIF±11MIF; CTL: 27MIF±5MIF).

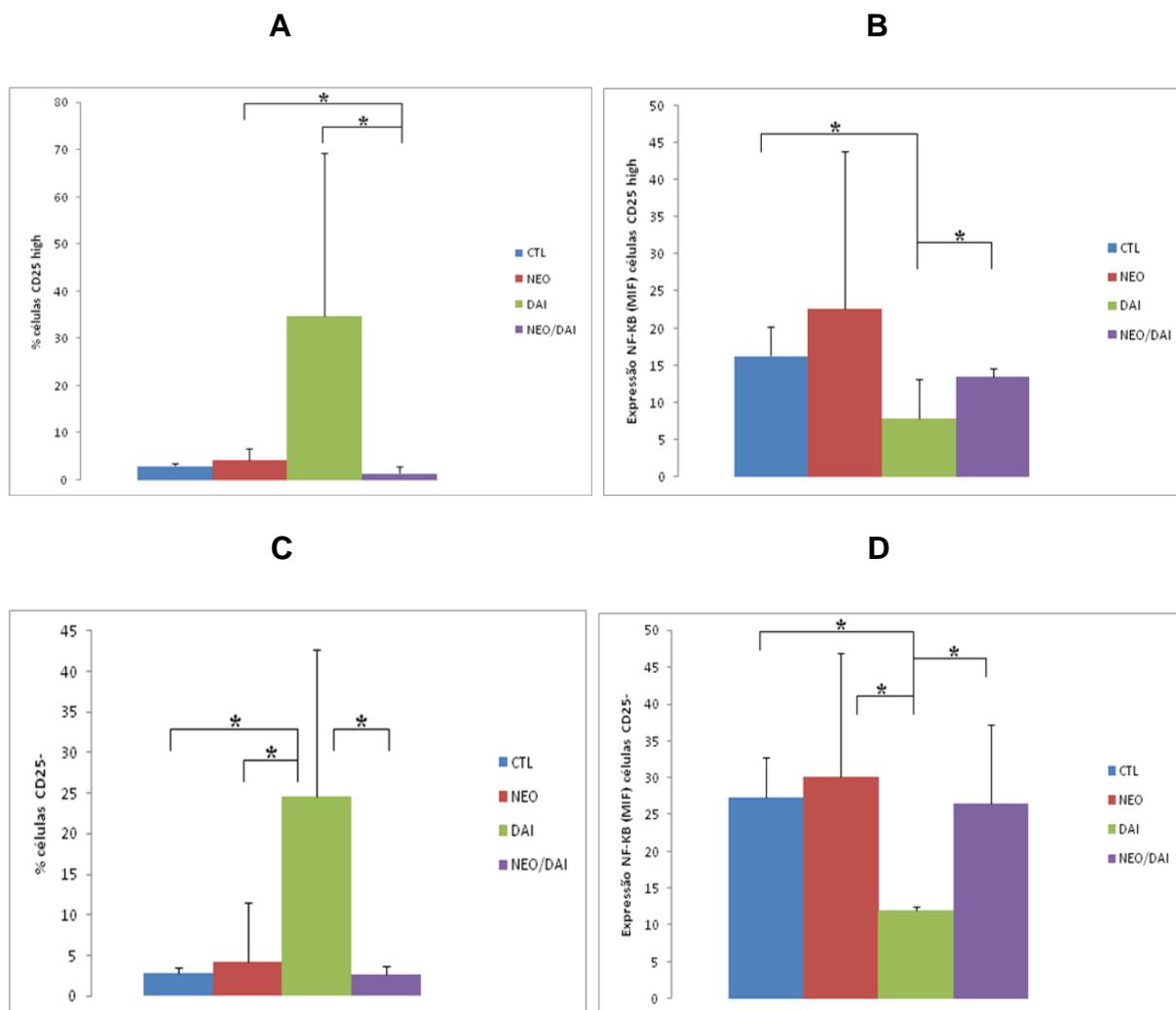


Figura 12 – Avaliação da percentagem (A, C) e níveis de expressão (B, D) de NF-κB em células Treg, CD4⁺CD127^{low}CD25^{high} (A, B) e CD4⁺CD127^{low}CD25⁻ (C, D), no sangue periférico de controlos saudáveis (CTL) e em doentes com neoplasia (NEO), doença autoimune (DAI) e ambas as patologias (NEO/DAI). Os resultados são expressos em percentagem (%) e em média de intensidade de fluorescência (MIF), respetivamente, e representam a média±desvio padrão (* p<0,05).

5. Discussão dos resultados

A associação entre doenças autoimunes e cancro tem sido evidenciada em vários estudos representando, segundo alguns autores, duas faces da mesma moeda. De facto, desde há várias décadas que é evidenciado o aumento da incidência de neoplasias linfóides em várias doenças autoimunes sistémicas, como por exemplo na Síndrome de Sjogren, Lupus Eritematoso Sistémico e Artrite Reumatóide^{4,27}. Por outro lado, na Esclerodermia, são mais comuns o cancro do pulmão, do esófago, da orofarínge e da mama. Nas miopatias inflamatórias, verifica-se aumento do risco tanto para cancros hematológicos como não hematológicos²⁷.

Apesar da relação entre doenças autoimunes e doenças neoplásicas ter sido alvo de grande interesse e investigação ao longo dos últimos anos, o conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares que ditam a estreita relação existente entre a autoimunidade e o cancro não é ainda totalmente conhecido.

Vários mecanismos a nível celular e molecular estarão implicados, envolvendo, entre outros, a participação das células dendríticas, das células T reguladoras (Tregs), de citocinas (como por exemplo a IL-21) e de múltiplas vias de sinalização celular que, por um lado, estarão envolvidos nos mecanismos de imunidade celular e humoral contra autoantígenos e, por outro, também fazem parte do complexo processo da carcinogénese.

Deste modo, a identificação dos mecanismos comuns envolvidos nas doenças autoimunes e cancerígenas pode permitir o diagnóstico precoce e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas dirigidas à interface cancro-autoimunidade.

Neste trabalho fomos analisar a percentagem de células T reguladoras (Treg) e avaliar a expressão das Interleucinas (IL)-21 e IL-17, e dos fatores de transcrição FOXP3 e NF- κ B, em doentes com doenças autoimunes (DAI), neoplásicas (NEO) e com ambas as patologias (DAI/NEO).

5.1 Análise das populações linfocitárias

Começámos por analisar as diferentes populações linfocitárias e verificámos que, os doentes com DAI, NEO e DAI/NEO, inseridos no estudo, evidenciam uma redução da percentagem de linfócitos totais, e em particular de linfócitos B, em relação a indivíduos saudáveis, o que pode favorecer o crescimento e a disseminação de tumores¹². Por outro lado, nos doentes com DAI, a linfopenia pode constituir um cofator para o desenvolvimento deste tipo de doenças, como descrito por outros autores¹⁷, sendo sempre necessário a ocorrência concomitante de um estímulo secundário, como por exemplo a produção aumentada de IL-21, a depleção de células Treg ou a inflamação tecidual, para que haja perda da auto-tolerância antigénica e, conseqüentemente, desenvolvimento de autoimunidade. Além disso, o aumento da percentagem de linfócitos T nestes doentes pode contribuir para a autorreactividade à custa da imunidade celular e não da humoral¹². Nas doenças neoplásicas, a diminuição de linfócitos B e T corrobora o estado de depressão imunitária encontrada neste tipo de doenças¹².

Apesar das células T *helper* (TH) e T *citotóxicas* (TC) poderem sofrer alterações significativas na presença de imunodeficiências, doenças autoimunes, entre outras, no nosso estudo apenas encontramos ligeiras alterações na sua percentagem, mantendo-se a sua relação ao nível do sangue periférico de cerca de 2:1¹², ou seja idêntica à dos indivíduos saudáveis.

As células TH são células estimuladoras do SI, pois incentivam o crescimento e a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, estimulam o sistema complemento, os macrófagos, as células T citotóxicas e os próprios linfócitos T. Por sua vez, as células TC têm atividade antitumoral, pois provocam a apoptose de células neoplásicas e infetadas por vírus. Estas células anómalas são identificadas pelas células TC através de um complexo formado pela ligação dos antígenos de superfície das células tumorais ao Complexo Major de Histocompatibilidade tipo 1. As células TC reconhecem e ligam-se a esse complexo, desencadeando a libertação de grânulos por exocitose, que, por sua vez, vão estimular a morte programada das células por apoptose^{12,21}. Assim, seria de esperar que a percentagem destas células se encontrasse diminuída nas doenças neoplásicas, pois a sua diminuição favorece a carcinogénese. Contudo, tal facto não se verifica nos resultados obtidos, pelo que seria necessário aumentar o número de doentes envolvidos no estudo, para

obtermos uma amostra melhor representativa da população. No entanto, a tendência observada para o aumento destas células nestes doentes pode constituir um fator predisponente para o desenvolvimento de DAI. A diminuição, tanto dos linfócitos TH como dos TC, nas doenças autoimunes fortalece ainda mais a questão da depressão imunitária ser importante para o desenvolvimento destas doenças¹⁷, além de poder contribuir para o desenvolvimento de neoplasias em doentes com DAI.

As células T que expressam simultaneamente CD4 e CD8 ($\alpha\beta$) existem em indivíduos normais, como resultado de uma deficiência na seleção tímica. A tendência que se verifica nos resultados obtidos para a elevação da percentagem destas células em doentes com DAI corrobora a sua participação na fisiopatologia desta doença, pela sua atividade pró-inflamatória. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros estudos em várias doenças autoimunes, como por exemplo a tiroidite autoimune e a artrite reumatóide²⁶.

Os resultados demonstram também uma tendência para a elevação da percentagem destas células duplamente positivas (CD4+/CD8+) em doentes com NEO, o que está de acordo com a relação entre a resposta inflamatória e o desenvolvimento do cancro, além de poder contribuir para o despoletar de autoimunidade nestes doentes.

Da mesma forma, os linfócitos T que não expressam CD4 nem CD8 ($\gamma\delta$) também se encontram associados a estados pró-inflamatórios⁷ e, conseqüentemente, a doenças autoimunes. No nosso estudo não encontramos diferenças significativas na percentagem destas células nos indivíduos doentes em relação aos controlos. Apenas os doentes com ambas as patologias, DAI/NEO, possuem uma tendência para o aumento da percentagem destas células, o que poderá contribuir para a patogénese desta associação. Contudo, os mecanismos pró-inflamatórios destas células continuam por esclarecer¹².

As células NK pertencem ao SI inato e constituem a principal via efetora de resposta antitumoral. Apresentam atividade citotóxica não específica contra células infetadas por microrganismos patogénicos e tumores. Como produzem uma vasta gama de citocinas, a sua atividade não só influencia a imunidade inata como também a adaptativa, pois a produção de IFN- γ , por parte das células NK, pode afetar a participação dos macrófagos da imunidade inata, pela ativação da sua atividade fagocítica, bem como o equilíbrio TH₁ – TH₂ das células TH, pelos seus

efeitos inibitórios na expansão TH₂ e estimuladores das células TH₁, que estão implicadas em processos autoimunes¹². Contudo, estas células atingem a sua importância máxima quando as células TC deixam de ser capazes de reconhecer as células malignas, pela perda de expressão de moléculas do complexo major de histocompatibilidade³⁰. Portanto, seria de esperar que estas células se encontrassem diminuídas nas NEO e aumentadas nas DAI. Com os resultados que obtivemos, constatamos que a percentagem de células NK se encontra aumentada nos indivíduos com NEO em relação aos que têm DAI, o que pode traduzir um sistema imunitário inato ainda com alguma capacidade anti-tumoral⁷ e, desta forma, influenciando o prognóstico destes doentes. No entanto, esta elevação nos doentes com NEO também pode predispor para o desenvolvimento de DAI, uma vez que estas células estimulam as células TH₁.

Os subtipos de células NK apresentam maior ou menor atividade citotóxica consoante expressem à sua superfície CD8⁺ (NK8⁺) ou CD8⁻ (NK8⁻), respetivamente³¹. A citotoxicidade direta mediada pelas células CD8⁺ é de extrema importância para a regressão tumoral⁷. Assim, seria de esperar uma diminuição destas células nas doenças neoplásicas e, eventualmente, uma elevação nas doenças autoimunes, por causa da sua atividade pró-inflamatória. Os resultados demonstram uma diminuição destas células nos doentes com NEO, mas também nos doentes com DAI. Apesar destes últimos resultados não corroborarem a literatura, podem ser justificados pela eficácia da terapêutica imunossupressora que os doentes com DAI estão a fazer, e que tem como um dos objetivos reduzir as células com atividade pró-inflamatória. De modo a confirmar esta nossa hipótese de que a terapêutica imunossupressora induz diminuição das NK8⁺, seria importante estudar as populações NK ao diagnóstico e após tratamento imunossupressor. Os doentes com NEO/DAI tendem a apresentar uma percentagem de NK8⁺ semelhante à dos CTL, porém a percentagem de NK8⁻ nestes doentes parece ser significativamente elevada em relação às outras patologias.

5.2 Avaliação das células T reguladoras

Além das subpopulações linfocitárias já referidas, existe um grupo particular de linfócitos T CD4⁺ com capacidade reguladora ou supressiva, que expressa a proteína 3 da Forkhead box (FOXP3), representado pelas células T reguladoras (Tregs).

Estes linfócitos reguladores desempenham um papel importante na manutenção da tolerância imunológica ao *self* através da supressão de linfócitos T autorreativos, num processo que envolve o TGF- β , a IL-10 e moléculas inibidoras como o CTLA-4. Além disso, a sinalização da IL-2 parece ser necessária para a manutenção da integridade funcional das Tregs no tecido linfóide periférico¹⁶.

A redução dos níveis de Tregs desencadeia processos de autoimunidade²⁵. Contudo, a razão desta redução dos níveis de Tregs em algumas doenças autoimunes é ainda desconhecida. Por outro lado, estas células também regulam as respostas imunes antitumorais. De facto, as Tregs são detectadas em tumores malignos humanos e a sua depleção, embora aumente o risco de autoimunidade, melhora substancialmente a imunidade celular anti-tumoral em estudos pré-clínicos²⁰.

Assim as células Treg estão envolvidas na supressão da autoimunidade e na regulação da resposta imune ao cancro, o que as torna um alvo terapêutico apetecível.

Atualmente são descritos pelo menos dois tipos de Tregs, as naturais e adaptativas. As chamadas Tregs naturais (nTregs) expressam constitutivamente o receptor de cadeia α da IL-2 (CD25), e são identificadas habitualmente pelo fenótipo CD4⁺CD127^{low}CD25^{high}. As Tregs denominadas adaptativas ou induzidas são, entre outras, células T CD4⁻CD8⁻, células natural killer CD8⁺, podendo apresentar o fenótipo CD4⁺CD127^{low}CD25⁻²⁸.

As células Treg apresentam atividade supressora do SI, como referido. Esta supressão deve-se ao facto destas células estimularem a produção de AMPc que, por sua vez, inibe a proliferação e a diferenciação celular, à custa do bloqueio da proteína cinase A e do NF- κ B com consequente redução da produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-2 e o IFN- γ . Para além disto, estas células induzem a produção de citocinas que inibem o SI, como a IL-10 e o TGF- β . A IL-10 inibe a ativação das células apresentadoras de antigénios e é antagonista do IFN- γ . Já o TGF- β estimula a expressão do gene *FOXP3*, pelas próprias células Treg. Por sua

vez, o FOXP3 é fundamental para o desenvolvimento, manutenção e função supressora das Treg. Desta forma, a expressão deste gene deve estar aumentada nas doenças neoplásicas e diminuída nas doenças autoimunes²²⁻²³.

Os nossos resultados mostram que os doentes com DAI, NEO e NEO/DAI apresentam uma diminuição significativa da percentagem de células nTreg e aumento das iTreg relativamente aos indivíduos saudáveis (CTL) (Fig. 8) sendo de salientar que os doentes com DAI são os que apresentam uma diminuição mais acentuada das nTreg. Estes resultados estão de acordo com o descrito por outros autores em DAI como o Lúpus Eritematoso Sistémico², mas em desacordo com o observado por outros em doenças neoplásicas hematológicas^{15,32}.

Contudo, observando os resultados obtidos, constatamos que a percentagem de células CD4⁺CD25⁻ que expressa FOXP3 é maior nas doenças autoimunes do que nas doenças neoplásicas. Pelo contrário, a percentagem de células CD4⁺CD25^{high} que expressa FOXP3 é maior nas doenças neoplásicas do que nas DAI, embora em qualquer dos doentes se observe diminuição das células nTreg em relação a indivíduos saudáveis. De fato, a diminuição deste fator de transcrição pode conduzir à aquisição de um fenótipo de célula T efetora e, deste modo, contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes⁴. Por outro lado, estes resultados corroboram a existência de outros mecanismos envolvidos no cancro para além da imunossupressão e a perda da auto-tolerância por parte do SI nas DAI, devido à diminuição da expressão de FOXP3 pelas células Treg nestes doentes. Já os doentes que apresentam simultaneamente NEO/DAI apresentam uma elevação da percentagem e da expressão de FOXP3 pelas células CD4⁺CD25⁻, o que pode contribuir para a imunossupressão e desenvolvimento de neoplasias em doentes com DAI.

A eliminação das células Treg, que inibem a resposta a antigénios tumorais, pode facilitar o desenvolvimento de imunidade antitumoral. Por outro lado, a estimulação da atividade supressora das células Treg pode ser útil no tratamento de doenças alérgicas ou autoimunes, ou até mesmo na prevenção de órgãos/tecidos transplantados¹². Além disso, vários estudos sugerem que a avaliação das células Treg poderá ter um papel no prognóstico, de modo dependente do tipo de tumor, conferindo pior prognóstico em tumores sólidos²⁷, e um prognóstico mais favorável em linfomas¹¹.

5.3 Avaliação das Interleucinas 21 e 17

A IL-21 é uma citocina produzida por linfócitos T *helper* e por células NK⁹. Também as células CD4⁺CD25⁻ parecem ter um papel importante na produção desta citocina²⁷. Esta tem uma potente atividade antitumoral, mediada sobretudo pelas células NK e pelos linfócitos T citotóxicos, que produzem INF- γ . Além disso, está associada ao desenvolvimento de DAI, pela sua ação pró-inflamatória, mediada principalmente pela estimulação das células Th 17, pela produção de anticorpos autorreativos pelos linfócitos B e pela diminuição das células Treg^{6-7,24}. Portanto, seria de esperar que se tivesse observado aumento da expressão desta citocina nos doentes com elevada percentagem de células T *helper*, NK e CD4⁺CD25⁻. Observando atentamente os resultados obtidos, os doentes com NEO apresentam maior percentagem de células TH e NK do que os doentes com DAI. Logo os doentes com NEO terão, à priori, maior produção de IL-21 que os doentes com DAI, o que está de acordo com os resultados obtidos. Contudo, a expressão desta citocina ao nível destas células não foi alvo de análise neste trabalho.

Os doentes com NEO/DAI apresentam uma diminuição evidente da percentagem de células CD4⁺CD127^{low}CD25⁻ que expressam IL21. Este resultado pode estar relacionado com a instituição da terapêutica imunossupressora que, por sua vez, pode contribuir para o desenvolvimento de NEO. Já nos doentes com NEO, apesar da percentagem destas células ser inferior à dos doentes DAI, esta é bastante superior ao normal. Contudo a sua expressão parece diminuída, em relação aos controlos saudáveis, o que poderá favorecer o crescimento e disseminação tumoral.

Como a IL-21 é uma citocina com atividade pró-inflamatória, esta predispõe para o desenvolvimento de DAI, pelo que o tratamento imunossupressor tem por base a diminuição da produção desta citocina, razão pela qual se poderá encontrar diminuída nos doentes com DAI, o que pode favorecer, conseqüentemente, a carcinogénese. O aumento da expressão desta citocina pelos doentes com NEO, comparativamente às DAI, requer uma melhor avaliação, com aumento da amostra utilizada, que represente melhor os resultados apresentados pela população em geral. Esse aumento relativo pode, por sua vez, contribuir para o desenvolvimento de autoimunidade associada às NEO.

A IL-17 é uma citocina com ação pró-inflamatória, estimulada pela IL-21, pelo que seria de esperar encontrá-la aumentada nos doentes com aumento da expressão de IL-21⁷.

Considerando os resultados obtidos e sabendo que a expressão de IL-21 se encontra aumentada nos indivíduos com NEO e diminuída nos indivíduos com DAI, seria de esperar que a IL-17 apresentasse a mesma tendência, uma vez que a produção de IL-17 pelas células Th 17 é estimulada pela IL-21^{7,27}. Assim, observando os resultados obtidos para a IL-17, concluímos que esta manifesta a mesma apresentação, isto é, a sua expressão é sempre maior nos doentes com NEO do que nos doentes com DAI, tanto nas células CD4⁺CD25^{high} como nas CD4⁺CD25⁻. Este resultado favorece a questão da produção de IL-17 ser estimulada pela IL-21, no entanto contraria a literatura na medida em que a sua expressão, tal como a da IL-21, se encontra aumentada nos doentes com NEO. Este facto exige uma melhor avaliação desta citocina, com aumento da amostra de doentes que melhor represente a população em geral. Contudo, este aumento nos doentes com NEO pode favorecer o desenvolvimento posterior de DAI. Porém, a sua expressão encontra-se diminuída nos doentes com DAI, o que se pode dever à terapêutica imunossupressora instituída, constituindo um fator predisponente para o desenvolvimento de neoplasias.

5.4 Análise do NF-κB

O NF-κB é um FT que ocupa um papel central no desenvolvimento de doenças neoplásicas e autoimunes. Está envolvido em múltiplos processos celulares, em particular nas respostas imunoreguladoras e na carcinogénese, tendo um papel central em muitas doenças autoimunes e cancerígenas. Este factor encontra-se no citoplasma das células imunitárias em associação com proteínas acessórias. O seu modo de activação varia de acordo com o tipo de célula imunitária, com o seu estágio de activação e de desenvolvimento⁵.

Enquanto que a sua inativação se encontra associada à diminuição de autoimunidade, com manutenção de imunidade antitumoral⁵, a sua activação contribui para a carcinogénese e autoimunidade^{5,10}. Assim, seria de esperar encontrar um aumento da sua expressão nas doenças neoplásicas e autoimunes.

Observando os resultados que obtivemos, podemos constatar que os doentes com NEO apresentam uma tendência para o aumento da expressão de NF-kB nas células CD4⁺CD25^{high} e CD4⁺CD25⁻ em relação ao CTL. Pelo contrário, os doentes com DAI, apresentam tendência oposta, o que poderá estar relacionado com o fato destes doentes estarem a fazer terapêutica imunossupressora e/ou anti-inflamatória. De fato, este tipo de terapêutica, poderá contribuir para a diminuição da ativação do NF-kB e, desta forma, diminuir os estímulos inflamatórios. No entanto, a percentagem de células CD4⁺CD25⁻ e CD4⁺CD25^{high} que expressa NF-kB, está aumentada nos doentes DAI. Estes resultados sugerem a contribuição do FT NF-kB para a fisiopatologia da doença neoplásica e autoimune.

Deste modo, a inibição da degradação das proteínas inibitórias, que normalmente se encontram acopladas ao NF-kB, permitiria manter inactivo este FT, com consequente redução da produção de factores de sobrevivência para as células T, o que reduz a autoimunidade, mantendo a imunidade tumoral.

6. Conclusão

Vários estudos têm comprovado a existência de uma relação entre doenças autoimunes e doenças neoplásicas ao longo dos últimos anos. Na patogênese das doenças autoimunes e malignas parece existir processos paralelos muito semelhantes, pois certas doenças autoimunes podem manifestar-se como síndromes paraneoplásicas e várias doenças neoplásicas cursam com doenças autoimunes. Assim, este será mais um campo para investigação nesta área⁸.

Com este trabalho podemos concluir que a linfopenia é um estado comum tanto às doenças neoplásicas como às doenças autoimunes, podendo ser igualmente encontrada em doentes portadores de ambas as doenças. Esta linfopenia, no caso das doenças autoimunes, por si só, não é capaz de despoletar AI, constituindo apenas um cofator de um estímulo primário, como sendo o aumento da IL-21 e IL-17, a diminuição das células Treg ou a ativação do NF-κB.

Esta linfopenia afeta de um modo geral todos os tipos celulares sanguíneos nas DAI, o que poderá também estar relacionado com a terapêutica imunossupressora nestes doentes que, por sua vez, poderá ser responsável pelo desenvolvimento de neoplasias em doentes com DAI. Além disso, o aumento de células pró-inflamatórias nas doenças neoplásicas pode constituir um fator predisponente para o desenvolvimento de autoimunidade subsequente.

Os nossos resultados mostram que os doentes com DAI, NEO e NEO/DAI apresentam uma diminuição significativa da percentagem de células nTreg e aumento das iTreg relativamente aos indivíduos saudáveis (CTL) sendo de salientar que os doentes com DAI são os que apresentam uma diminuição mais acentuada das nTreg. Estes resultados estão de acordo com a diminuição da expressão de FOXP3 observada nestes doentes. A diminuição deste fator de transcrição pode conduzir à aquisição de um fenótipo de célula T efetora e, deste modo, contribuir para o desenvolvimento de doenças autoimunes. Por outro lado, estes resultados corroboram a existência de outros mecanismos envolvidos no cancro para além da imunossupressão e a perda da auto-tolerância nas DAI, devido à diminuição da expressão de FOXP3 pelas células Treg nestes doentes. Nos doentes com NEO/DAI a elevação da percentagem e da expressão de FOXP3, tanto pelas células

CD4⁺CD25⁻ como pelas CD4⁺CD25^{high} poderá contribuir para a imunossupressão e desenvolvimento de neoplasias em doentes com DAI.

Os resultados obtidos também sugerem que a produção de IL-17 está intimamente relacionada com a da IL-21, como já demonstrava a literatura, pois a elevação de IL-21 é acompanhada por elevação de IL-17, dentro da mesma patologia. Além disso, a IL-21 está aumentada nos doentes com NEO relativamente aos doentes com DAI, sugerindo que esta citocina poderá ser responsável pelo desenvolvimento de DAI, numa fase posterior, em doentes com NEO. Já a diminuição relativa nos doentes com DAI poderá estar relacionada com a instituição, nestes doentes, de terapêuticas imunossupressoras.

De igual modo, a diminuição da expressão de NF-kB pelas células Treg nos doentes com DAI poderá estar relacionado com o facto destes doentes estarem a fazer terapêutica imunossupressora e/ou anti-inflamatória. Por outro lado, o aumento de NF-kB nos doentes com NEO corrobora a participação deste FT no desenvolvimento de cancro. Estes resultados sugerem a contribuição do NF-kB na fisiopatologia da doença neoplásica e autoimune, constituindo um alvo terapêutico bastante promissor, pois a sua inativação poderá constituir uma forma de tratamento, uma vez que reduz a AI, mantendo a imunidade tumoral.

Assim, as alterações observadas nas subpopulações linfocitárias sugerem o envolvimento do sistema imunitário no processo neoplásico associado à autoimunidade, podendo as IL-21 e IL-17, os fatores de transcrição NF-kB e FOXP3 e as células Treg desempenhar um papel importante.

No entanto, para a obtenção de resultados mais fidedignos será necessário aumentar o tamanho da amostra de doentes utilizada, para que esta represente melhor a população em geral.

A associação entre doenças autoimunes e neoplasias é cada vez mais frequente na prática clínica. Sendo a doença maligna uma das principais causas de morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos, implicando elevados custos aos sistemas de saúde e equipas multidisciplinares para sua abordagem, o rastreio e diagnóstico precoce da malignidade nos doentes com doenças autoimunes, é fundamental para um melhor prognóstico⁸.

7. Agradecimentos

À Prof.^a Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro, pela oportunidade que me deu e pela prontidão demonstrada em aceitar o meu pedido para desenvolver este projeto no laboratório de Biologia Molecular. Pela orientação dada e pelo estímulo à aprendizagem e incentivo à investigação na área da carcinogénese e autoimunidade em Portugal.

À Prof.^a Doutora Lelita Santos, pela atenção, disponibilidade e co-orientação.

A ambas, pelo apoio técnico e científico e pela dedicação que demonstraram ao longo de todo o trabalho, com as mais pertinentes críticas e correcções.

À Dr.^a Ana Cristina Gonçalves, pela incomparável colaboração na colheita e análise estatística dos dados deste trabalho.

À Dr.^a Vera Alves que tão bem soube fomentar o gosto pela imunologia e pelo apoio prestado na colheita dos dados.

Ao meu colega de curso, João Abranches, pelo companheirismo e colaboração na recolha de dados para a concretização deste trabalho de investigação.

Com particular carinho, aos meus pais, José e Rosa, e ao Daniel, pelo apoio incondicional ao longo desta minha árdua caminhada.

Às minhas amigas de curso e de vida.

8. Referências Bibliográficas

1. Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of Regulatory T Cells and FOXP3 in Human Diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120. 2007; 2; 227–35.
2. Cava AL. T-regulatory cells in systemic lupus erythematosus. *SAGE Journals*. 2008; 17; 421-425.
3. Chorny A, Gonzalez-Rey E, Ganea D, Delgado M. Vasoactive Intestinal Peptide generates CD4+CD25+regulatory T cells in vivo – Therapeutic Applications in Autoimmunity and Transplantation. *Journal of Leucocyte Biology* 78. 2005; 6; 1327-38.
4. Cristaldi E, Malaguarnera G, Rando A and Malaguarnera M. A Possible Link Between Autoimmunity and Cancer (cap 20). In *Autoimmune Disorders - Pathogenetic Aspects*, edited by Clio P. Mavragani. Publisher InTech, 2011: 31 pp.
5. Dale E, Davis M, Faustman DL. A Role for Transcription Factor NF- κ B in Autoimmunity: Possible Interactions of Genes, Sex, and the Immune Response. *Advances in Physiology Education* 30. 2006; 4; 152-8.
6. Datta S, Sarvetnick NE. IL-21 Limits Peripheral Lymphocyte Numbers Through T Cell Homeostatic Mechanisms. *PLoS ONE* 3. 2008; 9.
7. Davis ID, Skak K, Smyth MJ, Kristjansen PEG, Miller DM, Sivakumar PV. Interleukin-21 Signaling: Functions in Cancer and Autoimmunity. *Clinical Cancer Research* 13. 2007; 23; 6926–32.
8. Fortes D, Marques MI, Gomes P, Salamanca P. Doenças autoimunes e neoplasias. Tese de Mestrado da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.
9. Jang E, Cho SH, Park H, Paik DJ, Kim JM, Youn J. A positive feedback loop of IL-21 signaling provoked by homeostatic CD4+CD25- T cell expansion is essential for the development of arthritis in autoimmune K/BxN mice. *The journal of immunology*. 2009; 182; 4649-56.
10. Karin M. NF- κ B as a critical link between inflammation and cancer. *CSH perspectives*. 2009.

11. Ke X, Wang J, Li L, et al. Roles of CD4+CD25(high) FOXP3+ Tregs in lymphomas and tumors are complex. *Front Biosci* 2008. 13: 3986-4001.
12. Kindt T. *Imunologia De Kuby*. 2008; 6.
13. Klimenko OV. Regulation of Immune Responses, Apoptosis, and Tumorigenesis by Separate FOXP-3-dependent Genes: Connection with Clinical Manifestations. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*. 2011; 6; 412-417.
14. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, et al. IL-21 Initiates an Alternative Pathway to Induce Proinflammatory T(H)17 Cells. *Nature*. 2007; 448; 484-7.
15. KR MR, L K, J S, R H. Flow Cytometric Phenotyping and Analysis of T Regulatory Cells in Multiple Myeloma Patients. *Klin Onkol*, 2011; 24; S30-S33.
16. Kretschmer K, Apostolou I, Jaeckel E, et al. 2006. Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunol Rev*. 212:163-169.
17. Krupica T, Fry TJ, Mackall CL. Autoimmunity During Lymphopenia: a Two-hit Model. *Clinical Immunology* 120. 2006; 2; 121–8.
18. Lal G, Zhang N, van der Touw W, Ding Y, Ju W, Bottinger EP, et al. Epigenetic Regulation of Foxp3 Expression in Regulatory T Cells by DNA Methylation. *The Journal of Immunology* 182. 2009; 1; 259–273.
19. Liu W, Putnam A L., Xu-yu Z, Szot G L., Lee M R., Zhu S, Gottlieb P A., Kapranov P., Gingeras T R., Fazekas G B, Clayberger C, Soper D M., Ziegler F., and Bluestone J A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *JEM* 2006. Vol. 203, No. 7: 1701–1711.
20. Loddenkemper C, Hoffmann C, Stanke J, et al. 2009. Regulatory (FOXP3+) T cells as target for immune therapy of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Cancer Sci*. 100(6):1112-1117.
21. Martinho A, Barros P, Barros P. A diversidade de linfócitos T e a sua importância na resposta imunitária celular específica. Évora, 2004.

22. Melo KM, Carvalho BTC. Células T regulatórias: mecanismos de acção e função nas doenças humanas. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatol.* 2009.
23. Miyara M and Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *TRENDS in Molecular Medicine* 2007, Vol.13 No.3: 108-116.
24. Moroz A, Eppolito C, Li Q, Tao J, Clegg CH, Shrikant PA. IL-21 Enhances and Sustains CD8⁺ T Cell Responses to Achieve Durable Tumor Immunity: Comparative Evaluation of IL-2, IL-15, and IL-21. *The Journal of Immunology* 173. 2004; 2; 900-9.
25. O'Garra A, Vieira P. 2004. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med.* 10:801-805.
26. Parel Y, Chizzolini C. CD4⁺CD8⁺ double positive (DP) T cells in health and disease. *Elsevier autoimmunity reviews* 3. 2003; 215-20.
27. Roque ACCA. Autoimunidade e cancro vs cancro e autoimunidade. Tese de Mestrado da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. 2009
28. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T and Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* 2008,133 (30): 775-787.
29. Spolski R, Leonard WJ. The Yin and Yang of Interleukin-21 in Allergy, Autoimmunity and Cancer. *Current Opinion in Immunology* 20. 2008; 3; 295-301.
30. Torrezini T, Athanazio DA. Imunovigilância e imunoedição de neoplasias: implicações clínicas e potencial terapêutico. 2007.
31. Wajchman HJ, Pierce CW, Varma VA, Issa MM, Petros J, Dombrowski KE. Ex vivo expansion of CD8⁺CD56⁺ and CD8⁺CD56⁻ Natural Killer T cells specific for MUC1 Mucin. *Cancer research.* 2004; 64; 1171-180.
32. WU CO, Qing X, WU SY, Zhu H, Zhou HY. Immunophenotype and increased presence of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Oncology Letters*, 2012; 3; 421-424.