

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MÁLVARO MACULAN SALIN

**ESTUDO DE ALTERAÇÕES EM CÉLULAS Treg E TH17 NO LINFONODO
DRENANTE DE ANIMAIS COM TUMORES**

PORTO ALEGRE
2014

MÁLVARO MACULAN SALIN

**ESTUDO DE ALTERAÇÕES EM CÉLULAS Treg E TH17 NO LINFONODO
DRENANTE DE ANIMAIS COM TUMORES**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia da Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Cristina Beatriz C. Bonorino

Porto Alegre
2014

AGRADECIMENTOS

Os dois últimos anos foram um grande desafio para mim. Antes jurava que sabia alguma coisa, mas ao entrar no mestrado descobri que não sabia porcaria nenhuma. Acho incrível como a gente tende a criar expectativas e projetos de A-Z....e as coisas não saem exatamente do jeito como planejamos. Isso quebra a zona de conforto e faz com que desafios sejam abraçados.

Várias pessoas foram muito importantes nesse processo:

Primeiramente, agradeço aos meus pais Hέλvio A. Salin e Iracema M. Salin e ao meu irmão Márcio R. M. Salin pelo apoio incondicional e compreensão que tiveram mesmo nos piores momentos.

À Maurília Peres que possui uma visão impar das coisas. Obrigado pelo apoio e por escutar as minhas angústias. De fato, tudo depende da forma como vemos ou queremos ver o que está a nossa volta. Amo você eternamente!

À minha enteada/filha Giselle N. Peres que é uma companhia inigualável de risadas.

À professora Cristina Bonorino pelas oportunidades oferecidas, grandes ensinamentos e infinita paciência.

À Ana Paula D. de Souza, Rafael F. Zanin e Bárbara N. Porto pelos conselhos e ajudas.

Aos ICs, técnica, mestrandos e doutorandos do lab por todo auxílio e conhecimentos compartilhados nesses anos.

Ao pessoal do lab 31 que sempre estiveram dispostos a nos ajudar.

À Andréa Wieck e Moisés E. Bauer pela ajuda em estatística.

Aos amigos Tom Leenhardt, Justine Lamonerie e Pedro Vargas que demonstraram na prática que um bom vinho e ótimas companhias amenizam significativamente os problemas^{***}.

Em especial, muito obrigado à Elisa S. Marczak pelas incontáveis ajudas, ensinamentos, dedicação, paciência e por sempre estar disposta a escutar-me. Sabemos que um dos experimentos que fizemos juntos resume todo o nosso esforço. Agradeço por tudo eternamente.

A todos que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento pessoal e/ou profissional.

Legenda: *** p<0,001

RESUMO

Melanoma é um dos tumores malignos mais agressivos, e sua incidência vem aumentando continuamente nos últimos anos. Geralmente em estágios iniciais, o tratamento para melanoma é local, por cirurgia, com razoável eficácia. Contudo, os tratamentos para melanoma em estágios avançados por quimioterapia têm benefícios limitados, prolongando a vida do paciente em poucos meses. Assim se faz necessária a busca por terapias mais efetivas para melanomas. Estudos mais recentes sugerem que a resposta imunológica tumoral realizada pelos subtipos de células T CD4⁺ auxiliares possuem papel importante no controle do câncer. Conforme o infiltrado tumoral de células Th17 e Treg e o perfil de citocinas que elas secretam no microambiente tumoral, pode-se sugerir atividades anti ou pró-tumorais exercidas por essas células. Neste estudo, nós investigamos os marcadores transcricionais de células T CD4⁺Foxp3⁺ e células T CD4⁺RORγt⁺ em linfonodos drenantes de animais com melanoma ao longo do crescimento tumoral e avaliamos se a ação combinada de cisplatina (*cis-diamino-dichloro-platin*, CDDP) com agonistas de TLR2 (Peptidoglicano) ou TLR3 (ácido *Polyribosilic-Polyribocytidilic*) ou TLR4 (Lipopolissacarídeo) podem alterar esses parâmetros. Os animais foram injetados com células de melanoma linhagem B16F10 e conforme a progressão tumoral os linfonodos drenantes tumorais (TDLN) foram excisados para análise de células Th17 e Treg por citometria de fluxo. Além disso, analisamos a sobrevida dos animais com a ação combinadas das terapias. Encontramos um aumento na porcentagem e número absoluto de células Th17 e Treg no TDLN conforme a progressão tumoral o qual foi condizente com estudos anteriores. Nossos resultados indicam que o tratamento apenas com cisplatina, promove o crescimento tumoral através do aumento de células Th17 e Treg. O tratamento de cisplatina com agonista de TLR2 diminui consideravelmente a porcentagem de células Th17 no TDLN. Demonstramos aqui que a combinação de terapias utilizando CDDP juntamente com agonistas de TLR3 ou TLR4, prejudica o crescimento tumoral e pode modular a frequência dessas células através da diminuição na porcentagem de células TCD4⁺Foxp3⁺. Adicionalmente, essa combinação também mostrou um modesto aumento na sobrevivência dos animais. Esses resultados mostram que agonistas de TLRs podem ser utilizados em combinação com cisplatina como potencial adjuvante capaz de induzir inibir o crescimento tumoral em modelo de melanoma murino.

Palavras-chave: células Th17; células Treg; cisplatina; agonistas de TLRs.

ABSTRACT

Melanoma is one of the most aggressive malignant tumors, and its incidence has been increasing steadily in recent years. Usually in the early stages, treatment for melanoma is local surgery with reasonable efficiency. However, treatments such as chemotherapies for advanced melanoma have limited benefits, prolonging the patient's life in a few months. Thus the search for more effective therapies for melanoma is necessary. More recent studies suggest that tumor immune response conducted by subtypes of CD4⁺ T helper cells subsets have an important role in cancer control. According to tumor infiltrating Th17 and Treg cells and the cytokines they secrete the tumor microenvironment profile may be suggested anti or pro-tumor activities or exerted by these cells. In this study, we investigated the transcriptional markers of CD4⁺Foxp3⁺ T cells and CD4⁺RORγt⁺ T cells in draining lymph nodes of animals throughout the melanoma tumor growth and evaluate whether the combined action of cisplatin (cis-diamino-dichloro-platin, CDDP) and TLR2 (peptidoglycan) or TLR3 (acid-Polyribosilic Polyribocytidilic) or TLR4 (lipopolysaccharide) agonists, can change these parameters. The animals were injected with melanoma cell line B16F10 and according tumor progression the tumor draining lymph node (TDLN) were excised for analysis of Treg and Th17 cells by flow cytometry. Furthermore, we analyzed the survival of animals treated with combined therapies. We found an increase in the percentage and absolute number of Th17 and Treg cells in TDLN according tumor progression, which was consistent with previous studies. Our results indicate that treatment with cisplatin promotes tumor growth by increasing Treg and Th17 cells. Treatment with CDDP plus TLR2 agonist significantly decreases the percentage of Th17 cells in TDLN. We demonstrated here, that combined CDDP and TLR3 or TLR4 agonist therapy impairs tumor growth and modulate the frequency of these cells by decreasing the percentage of CD4⁺Foxp3⁺ T cells. In addition, this combination also showed a modest increase in survival of the melanoma bearing mice. These results showed that TLRs agonists may be used in combination with cisplatin as a potential adjuvant capable impair tumor growth in melanoma bearing mice.

Keywords: Th17 cells, Treg cells, cisplatin, TLRs agonists.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	8
1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Características de tumores.....	8
1.2 A resposta imune e o crescimento tumoral	9
1.3 Células T CD4 ⁺	15
1.4 Células T regulatórias e tumores.....	17
1.5 Células Th17 e tumores.....	19
1.6 Tipos de terapias antitumorais atuais.....	21
1.7 Células T como alvo de imunoterapias antitumorais.....	24
2 OBJETIVO	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3 JUSTIFICATIVA	27
CAPÍTULO 2	28
Artigo científico.....	28
CAPÍTULO 3	52
Discussão geral e considerações finais.....	52
REFERÊNCIAS	55

FIGURAS

Figura 1.....	9
Figura 2.....	14
Figura 3.....	17

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características de tumores

A visão atual do câncer propõe que o tumor é mais do que uma massa celular com alta capacidade proliferativa, mas formado por distintos tipos celulares que interagem entre si e modulam ou são modulados pelas células tumorais e pelo microambiente em torno do tumor. Hanahan & Weinberg relacionam a ação de seis capacidades complementares adquiridas pelas células normais que as habilitam desenvolver características neoplásicas. Assim, sugerem que o aumento das capacidades proliferativas e metastáticas, resistência a morte celular, bloqueio sinais de supressão, formação de novos vasos e imortalidade são características essenciais adquiridas pelos tumores via distintos mecanismos durante o desenvolvimento tumoral (Hanahan, D. et al., 2000).

As mutações conferem as primeiras vantagens seletivas à subclones de células normais (Jones, P. A. et al., 2007). A partir dos estudos pioneiros de Fearon & Vogelstein em câncer colorretal que analisaram a variação da expressão gênica tumoral, foi possível identificar que a transformação de um tecido normal até o surgimento de um câncer ocorria em decorrência de um conjunto de mutações gênicas (Fearon, E. R. et al., 1990). Mutações nos genes APC e Kras podem auxiliar na proliferação tumoral e mutações nos genes DCC e p53 influenciam respectivamente nos mecanismos de reparo de DNA e supressão tumoral (Kohno, T. et al., 2000, Akkiprik, M. et al., 2007). O acúmulo gradual de mutações torna essas células mais suscetíveis tanto a estímulos proliferativos autócrinos quanto a inibição dos mecanismos supressores de crescimento. Além disso, o aumento da expressão de proteínas na superfície celular, as quais são responsivas a fatores de crescimento, também facilita a proliferação descontroladas das células do tumor (Hanahan, D. et al., 2011).

O aumento numérico das células tumorais é acompanhado de dois processos. Um deles é a atração/formação de novos vasos sanguíneos através da expressão de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) possibilitando que as células tumorais recebam mais oxigênio e nutrientes evitando assim eventos de hipóxia e restrição energética. (Pettersson, A. et al., 2000, Bergers, G. et al., 2003). Outro processo consiste em resistir à morte celular.

Em células normais, mecanismos apoptóticos são ativados quando há alterações que comprometam a funcionalidade celular (de Bruin, E. C. et al., 2008). Todavia, as células tumorais podem ativar a expressão de reguladores anti-apoptóticos como Bcl-2 e Bcl-x_L (Gobé, G. et al., 2002) ou ainda diminuir a expressão de fatores pró-apoptóticos como Bax (Rashmi, R. et al., 2005), Bim e Puma (Bean, G. R. et al., 2013). Um dos últimos passos do desenvolvimento tumoral envolve a formação de metástases nas quais células do tumor primário entram em vasos sanguíneos e disseminam-se para outros tecidos (Fidler, I. J. et al., 2003, Talmadge, J. E. et al., 2010).



Figura 1: Capacidades adquiridas pelas células normais que as habilitam desenvolver características neoplásicas facilitando a tumorigênese. (Adaptada; Hanahan, D. et al., 2011).

1.2 A resposta imune e o crescimento tumoral

Atualmente, incorporaram-se quatro novas características as quais facilitam a tumorigênese: a instabilidade genética, a promoção de ambiente inflamatório pró-tumoral, a desregulação energética e finalmente a evasão do sistema imune (Hanahan, D. et al., 2011). A atuação imunológica no controle, origem e desenvolvimento de neoplasias forneceu suporte para o conceito de imunovigilância no início do século XIX. Recentemente descobriu-se que células e tecidos são constantemente monitorados por células imunes e que reconhecimento de antígenos tumorais por APCs (*Antigen-Presenting Cells*) junto com a

atividade das células T podem gerar uma resposta antitumoral para a eliminação das células do tumor (Dunn, G. P. et al., 2002, Zitvogel, L. et al., 2006, Vesely, M. D. et al., 2011).

Associada a esse conceito está a definição de imunoeedição na qual o sistema imune exerce uma pressão seletiva sobre os tumores (Burnet, F. M. 1957, Thomas, L. 1959). O processo é constituído de três fases, denominado “os três Es da imunoeedição”. Inicialmente, o sistema imune reconhece as células transformadas e recruta células imunes e mediadores inflamatórios para iniciar uma resposta antitumoral caracterizando o processo designado de eliminação. Posteriormente, segue a fase de equilíbrio com o sistema imune, na qual células do tumor permanecem dormentes ou continuam a evoluir acumulando novas mutações selecionando células tumorais com baixa imunogenicidade. A última fase denomina-se de escape ou evasão, em que o tumor desenvolve-se em um ambiente propício para o seu crescimento subjugando o sistema imune além de facilitar a migração e sobrevivência de células cancerígenas (Kim, R. et al., 2007). Dessa forma, a tumorigênese compreende a interação complementar entre vários aspectos biológicos dentre eles o sistema imune que pode erradicar ou auxiliar na transformação de células normais em células tumorais (Vesely, M. D. et al., 2011).

A vigilância imunológica tumoral compreende a interação entre os sistemas imunes inato e adaptativo, agindo na identificação e destruição de células tumorais em formação. O sistema imune inato, apesar de não gerar uma resposta imunológica específica, possui a vantagem de induzir uma resposta rápida de reconhecimento tumoral (Gajewski, T. F. et al., 2013). Os macrófagos são provavelmente a primeira linha de defesa do sistema inato no controle do crescimento tumoral, produzindo TNF- α (*Tumor Necrosis Factor - α*) (Carswell, E. A. et al., 1975), e também fagocitam células tumorais em apoptose (Balkwill, F. et al., 2005, Mukhtar, R. A. et al., 2011). Dois tipos principais de macrófagos foram descritos associados a tumores. Macrófagos do subtipo M1 originam-se pelo estímulo de IFN- γ (*Interferon- γ*) (Vadiveloo, P. K. et al., 2000) e secretam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 (*Interlekin-12*) e IL-23 e baixos níveis de IL-10 (Marie, B. et al., 2005, Solinas G. et al., 2009). Os TAMs (*Tumor-Associated Macrophages*) do subtipo M1 podem estimular a expressão de galectina-3 em células de tumor de cólon promovendo maior infiltrado de TAMs e ainda induzir a amplificação da resposta imune através da produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos assim como auxiliar na destruição das células tumorais (Dumont, P. et al., 2008). Em linhagem tumorais de cânceres de próstata, ovário e mama, Ong e colaboradores demonstraram que os TAMs podem produzir citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias promovendo respostas antitumorais mediadas por

células T (Ong, S. M. et al., 2012). Por sua vez os TAMs-M2 têm características pró-tumorais, e são descritos posteriormente.

As células NK (*Natural Killer*) também são responsáveis pelo reconhecimento de células neoplásicas. Estas expressam baixos níveis de MHC (*Major Histocompatibility Complex*), assim as NKs reconhecem as células tumorais e secretam proteínas citotóxicas como perforinas e granzimas que induzem a apoptose tumoral (Mocikat, R. et al., 2003). Após a ativação, as células NKs produzem várias citocinas tais como IFN- γ , IL-10 e IL-13 (Trinchieri G. et al., 1995). O IFN- γ tem sido descrito como potencializador da citotoxicidade promovida pelas células NK contribuindo para a eliminação de metástases tumorais (Angiolillo, A. L. et al., 1995, Biron, C. A. et al., 1999). A expressão de TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) em células NK é dependente da expressão de IFN- γ por essas células e auxilia na função antimetastática das células NK (Takeda, K. et al., 2007).

As DCs (*Dendritic Cells*) constituem o elo entre o sistema imune inato e adaptativo. Durante a resposta imune, as DCs promovem o requerimento de três sinais para a diferenciação dos subtipos de células T CD4⁺: o primeiro sinal envolve a apresentação de antígenos complexados a uma molécula de MHC classe II na superfície celular, o qual será reconhecido pelo TCR (*T Cell Receptor*) formando a interação MHC-antígeno-TCR (Schwartz, R.H. et al., 1985). O segundo sinal é gerado através da interação entre moléculas co-estimulatórias da APC e a célula T (Jenkins, M. K. et al., 1990). Wang e colaboradores reportam que a resposta antitumoral pode ser mais efetiva se a apresentação de antígeno via MHC classe I for prolongada (Wang, R. et al., 2002). O terceiro sinal é executado através da secreção de citocinas pelas APCs (Steinman, R. M. et al., 1991). As DCs, logo após sua maturação, secretam altos níveis de IL-12 (Kalinski, P. et al., 1999) o qual é regulado por IFN- γ e CD40L regulando o desenvolvimento de células T antitumorais (Snijders, A. et al., 1998). A geração da resposta antitumoral eficiente depende da apresentação de antígenos tumorais para células T *naïve* as quais se diferenciam em células T efetoras (Nelson, D. J. et al., 2001). Além disso, a alta densidade de DCs maduras na periferia tumoral e no linfonodo drenante tumoral relaciona-se com a redução da incidência de metástases e ainda bom prognóstico para o paciente (Ladanyi, A. et al., 2007, Simonetti, O. et al., 2007).

Recentemente surgiram evidências de que o papel do sistema imune na progressão tumoral pode desempenhar funções diferentes do que defesa imunológica. A complexidade das interações celulares no microambiente tumoral pode resultar no recrutamento das mesmas células imunes que agem no controle do crescimento do tumor para promover esse

crescimento (Hanahan, D. et al., 2011). O efeito anti-inflamatório e imunossupressor gerado pela IL-10 pode favorecer o escape de células tumorais da vigilância imunológica. Essa citocina pode ainda suprimir a expressão de IL-12 (Matsuda, M. et al., 1994) e IFN- γ (Sica, A. et al., 2000). Citocinas como a IL -10 e o TGF- β são fundamentais para a estimulação de macrófagos do subtipo M2 com atividade pró-tumoral, que secretam IL-1 e IL-6, além das próprias IL-10 e TGF- β , e baixos níveis de IL-12 e IL-23 (Anderson, C. F. et al., 2002). Os TAMs-M2 podem secretar VEGF e MMP (*Matrix metalloproteinase-2*) que favorecem respectivamente a formação de novos vasos sanguíneos e a degradação da matriz celular para promover o surgimento de metástases (Giraud, E. et al., 2004).

As células NK também podem em determinados contextos contribuir para a progressão tumoral (Costello, R. T. et al., 2004, Rey, J. et al., 2009). As células tumorais que expressam menos ligantes de NKG2D dificultam a atividade citotóxica das células NK (Song, H. et al., 2006). Além disso, citotoxicidade das células NK também pode ser inibida quando um ligante de KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptors*) presente nas células NK reconhece a molécula HLA-G expressa em algumas células tumorais impedindo a apoptose do tumor (Bottino, C. 2004).

A produção de IL-10 (Aruga A. et al., 1997), VEGF (Gabrilovich, D. I. et al., 1999) e TGF- β (Wrzesinski, S. H. et al., 2007) por células tumorais pode bloquear a diferenciação e maturação das DCs. A migração das DCs para o linfonodo drenante sentinela é essencial para a diferenciação das células T. Contudo, a produção de IL-8 por células do tumor pode impedir a ligação de CCL19 (*Chemokine (C-C motif) ligand 19*) e CCL21 e assim auxiliar na retenção das DCs no infiltrado tumoral (Feijoo, E. et al., 2005). Esses mecanismos contribuem para menor apresentação de antígenos pelas DCs, resultando em diminuição da ativação de resposta T.

Importantes mecanismos de ativação imune envolvem receptores de padrão. Esse conceito tornou-se fundamental em imunologia desde que uma molécula homóloga ao receptor *Toll* foi identificada em *Drosophila* e designada como TLR (*Toll-like Receptor*). Análises funcionais revelaram que sua ativação é mediada pelo reconhecimento de PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) promovendo expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória (Medzhitov, R. et al., 1997). Ao longo das últimas décadas foram identificados 26 tipos de TLRs expressos em diferentes células imunes como DCs, macrófagos, granulócitos, células T, células B, células NK, mastócitos dentre outras (Kawai, T. et al., 2011). Os receptores TLR2 possuem como ligante natural lipopeptídeos, o ácido lipotécico e peptidoglicanos (PGN) os quais estão presentes em bactérias gram positivas

(Takeuchi, O. et al., 2001, Iwaki, D. et al., 2002). Por sua vez os receptores TLR3 são expressos em endossomos e detectam dsRNA (*Double-Stranded RNA*) (Alexopoulou, L. et al., 2001) e alguns derivados de RNA sintéticos como Poly(I:C) (*Polyribosilic-Polyribocytidilic acid*) (Matsukura, S. et al., 2006). O LPS (*Lipopolysacaride*) componente da parede celular de bactérias gram negativa é o ligante de TLR4 (Poltorak, A. et al., 1998). Os TLR 5, 7 e 9 possuem como ligantes flagelina (Hayashi, F. et al., 2001), RNA de fita simples (Hemmi, H. et al., 2002) e oligonucleotídeos-CpG (Hemmi, H. et al., 2000) respectivamente.

A geração de uma resposta imunológica específica e duradoura contra células tumorais é hoje um dos grandes desafios da terapia antitumoral. As células T CD8⁺ citotóxicas, constituintes do sistema imune adaptativo, originam-se nos linfonodos drenantes e quando ativadas migram para o sítio tumoral fazendo a lise do tumor através de perforinas (Santin, A. D. et al., 2000) A formação de células T CD8⁺ de memória tumores-específicas pode colaborar no impedimento da reincidência tumoral. Dessa forma, o aumento de células T CD8⁺ no infiltrado tumoral constitui um bom prognóstico de sobrevivência para os pacientes induzindo a regressão do tumor (Rosenberg, S. A. et al., 2011). Essa atividade antitumoral pode ser potencializada pelo o recrutamento de células T CD4⁺ para o infiltrado tumoral o qual pode fornecer ajuda para células T CD8⁺ através da produção de IFN- γ . (Quezada, S. A. et al., 2010, Fridman, K. M. et al., 2012, Donia, M. et al., 2012).

Apesar dos TLRs pertencerem a imunidade inata, vários relatos sugerem sua influência na imunidade adaptativa. Agonistas de TLR2 demonstraram prolongar a atividade das células T induzindo a expressão de moléculas anti-apoptóticas como Bcl-x_L e redução de moléculas pró-apoptóticas como Bim (Cottalorda, A. et al., 2006, Geng, D. et al., 2010). Outro estudo relata aumento da proliferação de células T CD8⁺ quando células T que possuem atividade supressora são ativadas agonistas de TLR2 (Zhang, Y. et al., 2011). A ativação de células T CD8⁺ também pode ser aumentada quando TLR3 liga-se ao seu agonista Poly(I:C) (Wang, Y. et al., 2010). Forte e colaboradores demonstraram em modelo de metástase pulmonar que um aumento da atividade antitumoral mediada pelas células T CD4⁺ após a administração de Poly(I:C) em animais (Forte, G. et al., 2012). Por sua vez, o aumento da expressão de TLR4 em PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) pode aumentar a expressão de IFN- γ auxiliando a resposta antitumoral mediada por células T CD4⁺ (Okamoto, M. et al., 2004). Nosso grupo recentemente demonstrou que a injeção intratumoral de LPS promove a regressão tumoral (Maito, F. L. D. M. et al., 2012). Além disso, a ativação de TLRs também pode induzir a morte direta de células tumorais levando à

regressão do tumor (Haimovitz-Friedman, A. et al., 1997, Salaun, B. et al., 2006, El Andaloussi, A. et al., 2006).

No entanto, outros estudos observaram que as funções de TLRs no desenvolvimento e progressão de vários tumores estão correlacionadas com a geração de processos inflamatórios crônicos. A ativação de NF- κ B leva ao aumento de citocinas como IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- α além de induz migração de células imunes para o sítio inflamatório devido a elevada produção de quimiocinas que mantêm a inflamação crônica e diminuem a expressão de fatores anti-apoptóticos (Pikarsky, E. et al., 2004, Philip, M. et al., 2004). Mais especificamente, a sinalização de TLR2 em células de câncer gástrico pode promover o crescimento tumoral pelo aumento da vascularização através da indução de COX-2, PGE₂ e IL-8 (Chang, Y. J. et al., 2005). Apesar dos efeitos antitumorais gerados pela administração de Poly(I:C), altas doses desse agonista podem causar falhas renais e coagulopatias em pacientes com câncer (Robinson, R. A. et al., 1976). Os efeitos pró-tumorais também são reportados pela ação de TLR4. O aumento da expressão desse receptor em células de câncer de mama está correlacionado o surgimento de um ambiente inflamatório crônico o qual propicia aumento da proliferação tumoral e menor atividade citotóxica das células NK (Yang, H. et al., 2010).

Esse duplo efeito dos TLRs sobre as células imunes e tumorais é indicativo da grande complexidade funcional desses receptores na biologia tumoral e que a função anti ou pró-tumoral é dependente do ligante, do tipo celular bem como do microambiente inflamatório gerado pela ativação desses TLR.

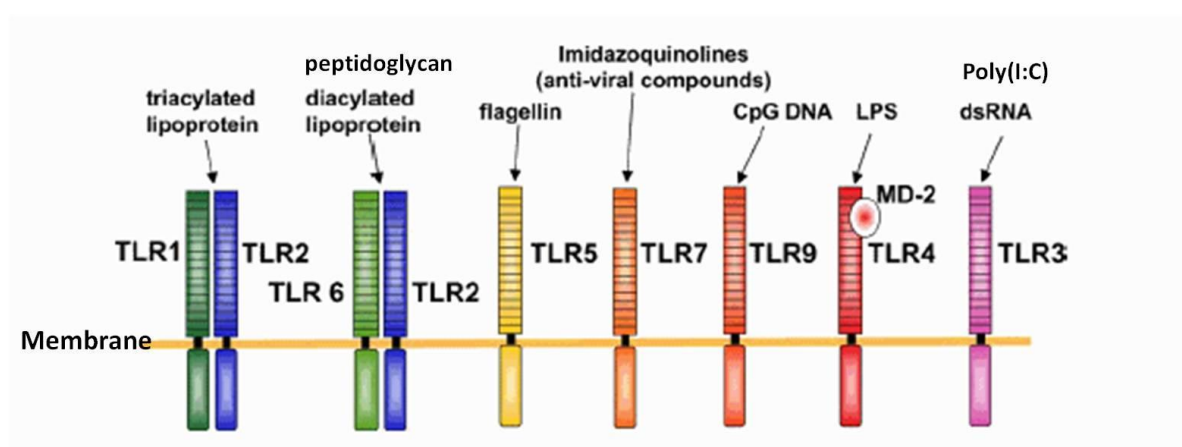


Figura 2: Toll-like receptors e seus respectivos ligantes. (Adaptada; Takeda, K. et al., 2004)

1.3 Células T CD4⁺

As células T CD4⁺ orquestram e coordenam vários eventos da resposta imune inata e adaptativa contra uma ampla variedade de patógenos e antígenos tumorais. A especialização funcional das distintas sub-populações de células T CD4⁺ é regulada pela expressão de fatores de transcrição específicos que são influenciados por sinais celulares e mediadores biológicos solúveis auxiliando na interação com outras células do sistema imune (Murphy, K. M. et al., 2010, Dobrzanski, M. J. 2013).

As primeiras caracterizações das diferentes populações de células T CD4⁺ foram demonstradas por Mosmann & Coffman em 1986, subdividindo em dois grupos designados de células Th1 (*T helper 1 cells*) e Th2. As células Th1 são caracterizadas pela potencial produção de IFN- γ , expressão de T-bet (*T-box transcription factor*) (Szabo, S. J. et al., 2000), indução da expressão de genes que codificam para o receptor de quimiocina CXCR3 e as quimiocinas CCL3 e CCL4 (Janner, R. G. et al., 2009). Embora IFN- γ seja considerada a citocina assinatura das células Th1, foi evidenciado que outras citocinas podem ser produzidas por essas células como IL-2, TNF- α (Gallego, A. et al., 2003) e IL-10 (Jankovic, D. et al., 2007). A diferenciação de Th1 é direcionada pela ativação da via STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription1*) (Afkarian, M. et al., 2002) e STAT-4 (Thierfelder, W. E. et al., 1996) os quais são respectivamente estimulados por IFN- γ e IL-12 disparando a transcrição de T-bet. A diferenciação em células Th1 garante a sua coordenação em respostas da imunidade celular contra patógenos intracelulares e relatos mais recentes sugerem que essas células estão correlacionadas com a eficiência da resposta imune antitumoral (Tosolini, M. et al., 2011, Lai, Y. P. et al., 2011).

Por sua vez, a diferenciação em células Th2 envolve a expressão de IL-4 por APCs que ativando STAT6 que juntamente com outros sinais de ativação permite a transcrição do gene regulador GATA3 (*GATA-binding protein 3*) (Zheng, W. et al., 1997). As células Th2 são caracterizadas pela produção de IL-4, IL-5 e IL-13 e responsáveis pela coordenação da imunidade humoral, respostas inflamatórias alérgicas (Kasakura, S. 1999) e ainda possuem atividade antitumoral através da infiltração de eosinófilos no tumor (Mattes, J. et al., 2003)

As células T regulatórias (Tregs) são outro subtipo de célula T CD4⁺ e possuem a habilidade de suprimir a atividade das células T efectoras (Mason, D. et al., 1998, Sakaguchi, S. 2000). Em indivíduos saudáveis, as Treg possuem papel crucial na manutenção da tolerância imune periférica, prevenindo a geração de autoimunidade através da limitação da

atividade das células T (Sakaguchi, S. et al., 2000, Olson, B. M. et al., 2013). De acordo com a sua origem as células Treg são subdivididas em Treg tímicas (tTreg) ou Treg periféricas (pTreg) (Abbas, A. K. et al., 2013). A primeira é produzida pelo timo e expressa CD25 e o fator de transcrição Foxp3 (*Forkhead box P3*) permitindo que essas células tenham capacidade supressora sobre a resposta imune inata e adaptativa (Fontenot, J. D. et al., 2003). As tTreg são geradas no timo através da seleção pelos timócitos em que o TCR com alta afinidade para antígenos próprios é direcionado a um fenótipo regulador, o que faz com que as tTreg sejam responsáveis pela manutenção da auto-tolerância (Sakaguchi, S. et al., 2008, Shevach, E. M. 2009). Em oposição as tTreg, as células pTreg são geradas em tecidos periféricos e desenvolvem o fenótipo regulatório sob estímulo do complexo MHC ligado ao peptídeo e de TGF- β (Lohr, J. et al., 2006). Estudos têm evidenciado que a geração de pTreg é favorecida quando há concomitantemente o estímulo de TGF- β (Liu, V. C. et al., 2007), IL-10 (Heckel, M. C. et al., 2011) e IL-35 (Collison, L. W. et al., 2010). Considerando a atividade imunossupressora das células Treg sobre as células T efetoras, tem sido observado que as Treg podem possuir um papel importante na carcinogênese e na imunidade tumoral de forma dependente da interação das Treg com outras células imunes e da dinâmica do ambiente tumoral (Wilke, C. M. et al., 2010, deLeeuw, R. J. et al., 2012).

Mais recentemente, um novo subtipo de célula T CD4⁺ foi identificado produzindo IL-17 e foi nomeado de células Th17. Além de IL-17, a qual promove a inflamação do tecido, foi observado que essas células também produzem IL-21 e IL-22 (Harrington, L. E. et al., 2005, Bettelli, E. et al., 2006). Diante de estímulos de IL-6 e IL-21 a rota de STAT3 é ativada permitindo a transcrição do gene regulador ROR γ t (*Retinoic acid receptor – RAR-related orphan receptor gamma T*) (Yang, X. O. et al., 2007). Um estudo em camundongos que não expressavam ROR γ t relatou que as células T *naïve* são incapazes de diferenciarem-se em células Th17 (Ivanov, I. I. et al., 2006). Da mesma forma, outros estudos em camundongos que não expressavam TGF- β demonstram falha na diferenciação de células T *naïve* em células Th17 e Treg e ainda foram detectados eventos de autoimunidade por consequência da descontrolada atividade de células Th1 (Veldhoen, M. et al., 2006). A expressão de Foxp3 e ROR γ t é induzida por TGF- β , contudo na presença da citocina pró-inflamatória IL-6 a transcrição do mRNA de Foxp3 é interrompida nas células T CD4 *naïve* o qual permite o início da diferenciação das células Th17 a qual está associada com o desenvolvimento de respostas inflamatórias auxiliando na eliminação de bactérias e fungos bem como em eventos de autoimunidade (Zhou, L. et al., 2008, Chen, Z. et al., 2011).

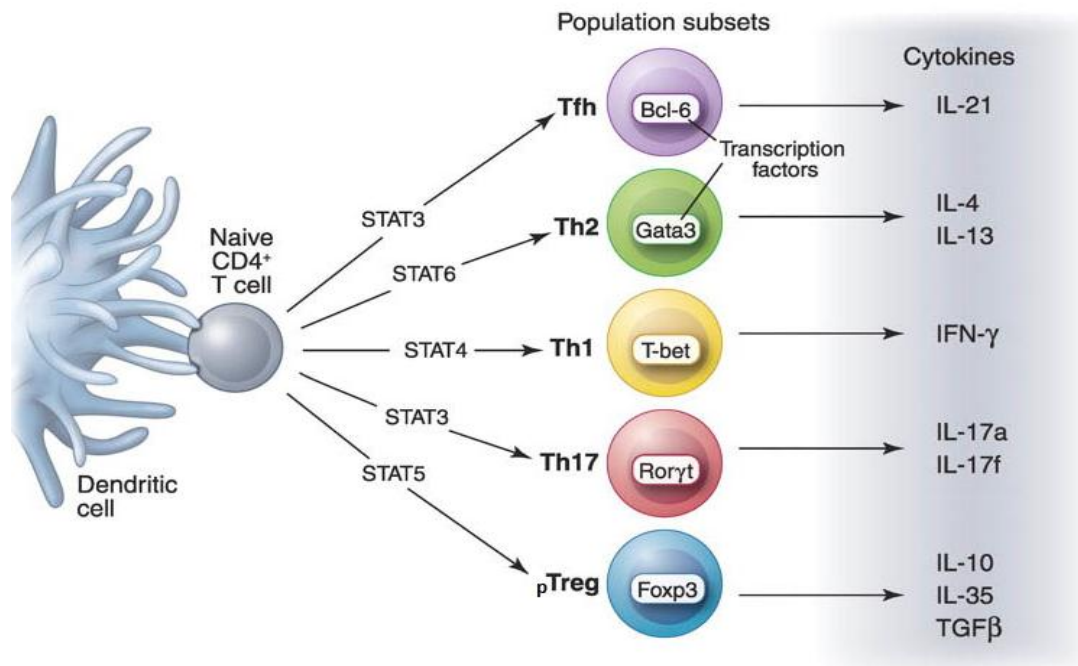


Figura 3: Diferenciação de células T CD4⁺ *naïve* em subtipos celulares apresentando os fatores canônicos para a transcrição e as produções de suas respectivas citocinas. (Adaptada; O'Shea, J. J. et al., 2010).

1.4 Células T regulatórias e tumores

As células tumorais disparam vários mecanismos imunossupressores para evitar ou desestabilizar a resposta mediada por células T (Dranke, C. G. et al., 2006, Rabinovich, G. A. et al., 2007). Sabe-se o tumor pode influenciar na imunidade tumoral através da expansão, recrutamento e ativação de células Treg (Sakaguchi, S. 2004). A modulação no recrutamento e ativação dessas células são uns dos grandes desafios no desenvolvimento de novas estratégias imunoterápicas para erradicar as células malignas (Pardoll, D. et al., 2004).

De forma geral, as células Treg são consideradas potentes inibidoras da resposta antitumoral através da sua atividade imunossupressora em células T CD4⁺ e CD8⁺ (Zou, W. 2006). Nos estágios iniciais do câncer, as células Treg estão concentradas na massa tumoral a qual gera a inibição local da resposta imune efetora facilitando a progressão sistemática da doença (Woo, E. Y. et al., 2001, Sasada, T. et al., 2003, Shen, L. S. et al., 2009). O aumento no número e maior funcionalidade das células Treg foram detectados no sangue periférico, no linfonodo drenante tumoral e no microambiente do tumor em pacientes com leucemia linfóide crônica (Beyer, M. et al., 2005), linfoma (Yang, Z. Z. et al., 2006) e câncer gástrico

avançado (Maruyama, T. et al., 2010). Em diferentes cânceres incluindo em melanoma humano foi reportado que o significativo aumento de células Treg está diretamente correlacionado com altos níveis de TGF- β indicando um mau prognóstico para os pacientes (McCarter, M. D. et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que a transferência adotiva de células Treg resulta na redução da resposta imune antitumoral em modelo murino confirmando o papel imunossupressor dessas células (Antony, P. A. et al., 2005).

Algumas pesquisas buscam explicar como e porque as células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ aumentam no infiltrado tumoral. Uma das possibilidades é que a proliferação das células tumorais fornece uma grande quantidade de auto-antígenos recrutando mais células Treg. (Nishikawa, H. et al., 2005). As condições inflamatórias no tumor também podem recrutar essas células. Curiel e colaboradores propõem que o tumor e os macrófagos do infiltrado tumoral produzam quimiocinas como a CCL22 a qual quimioatraem e recrutam células Treg. Ademais, demonstraram também que o bloqueio de CCL22 pode reduzir o infiltrado de células Treg em tumores de ovário (Curiel, T. J. et al., 2004). O aumento da expressão de CCR4 em células Treg em tumores de cólon pode auxiliar na redução da ativação de células Th1 no infiltrado tumoral (Svensson, H. et al., 2012). Também há relatos que a COX-2 (*Cyclooxygenase-2*) e a PGE₂ (*Prostaglandin E2*) estão envolvidas em eventos imunossupressores os quais são importantes na patogênese de câncer de pulmão de células não pequenas. Sugere-se que a inibição de COX-2 possa reduzir a frequência e a atividade de células Treg através da atenuação da expressão de Foxp3 em linfócitos no infiltrado tumoral (Sharma, S. et al., 2005). Além disso, a presença de IL-10 no microambiente tumoral pode induzir a baixa expressão de sinais co-estimulatórios (CD80 e CD86) e aumento da expressão de sinais co-inibitório como PD-L1 (*Programmed cell deathligand 1*) em DCs auxiliando na geração de células Treg (Tamura, H. et al., 2001, Subudhi, S. K. et al., 2004).

Para determinar o real impacto clínico que as células Treg possuem na progressão tumoral, tem sido proposta a análise da frequência e equilíbrio entre as populações de células Treg e as células T efectoras assim como se deve considerar a localização dessas células e o microambiente inflamatório nas quais estão inseridas (Galon, J. et al., 2006, Quezada, A. S. et al., 2011).

1.5 Células Th17 e tumores

Apesar da relação entre as células Th17 e a imunopatologia tumoral ainda ser muito controversa (Bronte, V. 2008, Munn, D. H. 2009), considera-se que as células Th17 constituem uma pequena população no sangue periférico de pacientes com câncer, porém são mais prevalentes no infiltrado tumoral e no linfonodo drenante tumoral sugerindo que as células Th17, através de uma resposta inflamatória, possam ser induzidas e/ou recrutadas para o microambiente do tumor (Kryczek, I. et al., 2007).

As células Th17 secretam grande quantidade de IL-17, todavia podem secretar outras citocinas. Su e colaboradores geraram clones de células Th17 a partir de linfócitos do infiltrado tumoral derivados de melanoma e cânceres de cólon e mama. Nesse trabalho foi evidenciado que os clones de células Th17 secretavam grande quantidade de IL-8 e TNF- α , moderada produção de IL-10 e TGF- β 1 assim como pequena quantidade de IL-6, mas não produziam IL-2, IL-4, IL-12 e IL-23 (Su, X. et al., 2010). Todavia, em sangue periférico de pacientes com câncer colorretal humano foi sugerido que além do aumento de células Th17 e Treg ao longo da progressão tumoral, as citocinas IL-1 β , IL-17 e IL-23 diminuem conforme o crescimento do tumor e que IL-6 apresenta o efeito oposto (Wang, J. et al., 2012). Desse modo, as variações nos perfis encontrados de citocinas secretados por células Th17 provenientes do infiltrado tumoral indicam que o tipo e o estágio de desenvolvimento do câncer são fatores relevantes para a modulação do microambiente tumoral.

O efeito antitumoral promovido pelas células Th17 é devido à indução da resposta inflamatória dessas células pela produção de IL-6 e IL-17 contribuindo para a redução do crescimento do tumor e impedindo a formação de metástases (Kryczek, I. et al., 2009a, Yang, L. et al., 2012). Em câncer de próstata (Sfanos, K. S. et al., 2008) e carcinoma escamoso de esôfago (Lv, L. et al., 2011) foi relatado uma correlação inversa entre a diferenciação de células Th17 e a progressão tumoral sugerindo um bom prognóstico para os pacientes. Em modelo de murino de câncer pancreático, Gnerlich e colaboradores demonstraram que a adição de IL-6 ao microambiente tumoral pode alterar o equilíbrio de células Th17. Assim, sugerem que o retardo da progressão do tumor e o aumento na sobrevivência dos animais são influenciados pela modulação de citocinas no microambiente tumoral a qual pode favorecer a diferenciação de células Th17 com atividade antitumoral (Gnerlich, J. L. et al., 2010).

Um dos mecanismos antitumorais utilizados pelas células Th17 envolve o recrutamento de DCs para o microambiente do tumor e para o linfonodo drenante tumoral.

As células Th17 podem estimular a expressão de CCL20 em células tumorais e promover a migração de DCs para o sítio tumoral de forma dependente de CCR6. Desse modo, as células T CD8⁺ são diferenciadas e ativadas pelas DCs mediando a resposta imune antitumoral (Martin-Orozco, N. et al., 2009). Outro mecanismo de ação das células Th17 contra o crescimento do tumor abrange a plasticidade dessas células. Muranski P. e colaboradores evidenciaram que células Th17-polarizadas tumores-específicas reduziram o estabelecimento de melanoma avançado em modelo murino uma vez que essas células não produziam mais IL-17 e gradualmente passam a expressar INF- γ demonstrando perfil semelhante às células Th1 (Muranski, P. et al., 2008). A produção de INF- γ por células Th17 pode induzir a expressão de CXCL9 e CXCL10 em células tumorais os quais auxiliam na migração de células T CD8⁺ e células NK para o infiltrado do tumor (Kryczek, I. et al., 2009b).

Apesar da habilidade das células Th17 de promover a resposta imune contra o tumor, tem sido observada a atividade pró-tumoral mediada por essas células. Uma correlação entre mau prognóstico e altos níveis de células Th17 são descritos em câncer de pulmão (Chen, X. et al. 2010) e gástrico (Zhang, B. et al., 2008) bem como em carcinoma pancreático (He, S. et al. 2011) e colorretal (Liu, J. et al. 2011, Tosolini, M. et al., 2011). Os mecanismos potenciais responsáveis pelas ações pró-tumorais parecem envolver a angiogênese e a indução de citocinas no microambiente tumoral resultando na promoção do crescimento do tumor (Numasaki, M. J. et al., 2003). A IL-17 é capaz de hiper-regular a produção de VEGF no que por sua vez induz a produção de TGF- β e ainda promove a formação de novos vasos no infiltrado tumoral (Jeon, S. H. et al., 2007, Huang, X. et al., 2003). A IL-17 também pode induzir a produção IL-6 e PGE₂ aumentando a expressão de ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) em células tumorais ativando a molécula STAT3 que induz fatores transcricionais oncogênicos os quais regulam genes pró-sobrevivência e pró-angiogênese (Wang, L. et al., 2009). Ademais, as células Th17 do infiltrado tumoral podem induzir a produção de IL-1, IL-8 e TNF- α facilitando o tráfego de neutrófilos e promovendo um ambiente inflamatório crônico o qual é favorável a progressão tumoral (Kryczek, I. et al., 2011).

Estudos mais recentes sugerem que a plasticidade das células Th17 pode também favorecer a progressão tumoral. Em cânceres de esôfago (Huang, C. et al., 2011), mama, cólon, ovário e melanoma (Su, X. et al., 2010) foi observada a presença de células Th17 que expressam Foxp3. O mecanismo de plasticidade dessas células é dependente de altas concentrações de IDO, ácido retinóico, IL-2 assim como do estímulo de antígenos tumorais

via TCR. As células Th17Foxp3⁺ passam a expressar menos ROR γ t e adquirem funções imunossupressoras (Martin, F. et al., 2012, Ye, J. et al., 2013). Dessa forma, as atividades anti e pró-tumoral das células Th17 são dependentes do tipo tumoral e das condições inflamatórias do microambiente do tumor.

1.6 Tipos de terapias antitumorais atuais

O desenvolvimento de novas terapias antitumorais, auxiliando num diagnóstico precoce e mais eficiente, tem sido um dos grandes avanços na área de oncologia. Esse progresso nas últimas décadas deve-se principalmente ao melhor entendimento da complexidade e dinâmica do desenvolvimento de neoplasias. A quimioterapia é uma das formas mais comuns para o tratamento de câncer. Atualmente, existem mais de 100 fármacos os quais variam amplamente sua composição e alvos na eliminação de células tumorais (Hoff, P. M. G. et al., 2013). A quimioterapia diferencia-se da secção cirúrgica e radioterapia por atuar de forma sistêmica no organismo, portanto ela não possui alvos tumores-específicos para eliminação exclusiva do tumor sem afetar as células normais (Chabner, B. A. et al., 2005, Crawford, S. et al., 2013). As drogas quimioterápicas visam inibir mecanismos de proliferação tumoral bloqueando o ciclo celular. Entretanto, essas drogas não são capazes de diferenciar o ciclo proliferativo de células de tecidos normais e tumorais, logo impedem a renovação de tecidos saudáveis gerando efeitos colaterais ao paciente (Zitvogel, L. et al., 2008). Dessa forma, a quimioterapia possui como principais objetivos estabelecer um controle na progressão tumoral e aliviar os sintomas causados por cânceres em estado avançado além de melhorar a qualidade de vida do paciente (Glimelius, B. et al., 1996, Zabernigg, A. et al., 2012).

Os agentes antimetabólicos como 5-fluorouracil afetam as células ao inibir a biossíntese de componente essenciais como o DNA e RNA bloqueando a síntese de ácidos nucleicos impedindo a mitose celular. O uso clínico desses agentes demonstrou-se mais eficiente em câncer colorretal (O'Connell, M. J. 1989), mama (Cameron, D. A. et al., 1994), ovário (Préfontaine, M. et al., 1996). As antraciclinas como doxorubicina e mitoxantrona são antibióticos antitumorais que interferem na síntese de DNA e proteínas atuantes especificamente sobre uma fase do ciclo celular. Os compostos alquilantes são capazes de ligarem-se ao DNA a fim de impedir a separação dos filamentos de DNA na dupla hélice (Teicher, B. A. et al., 1990). As antraciclinas podem ser utilizadas no tratamento de linfomas

(Arinaga, S. et al., 1986), leucemias (Smith, R. E. et al., 2003) e câncer de mama (Untch, M. et al., 2010).

As platinas formam um grupo de agentes alquilantes com amplo espectro de ação antineoplásica e são amplamente utilizadas no tratamento de diversos tipos de cânceres como linfomas, leucemias, sarcomas incluindo também câncer de pulmão, estômago, bexiga, testículo bem como em melanoma (Kelland, L. et al., 2007). A cisplatina (*cis-diamino-dichloro-platin*, CDDP) teve sua atividade antitumoral reconhecida por Rosenberg e colaboradores sendo considerada uma droga potente, mas com considerável toxicidade (Rosenberg, B. et al., 1965, Williams, C. J. et al., 1979). Os principais efeitos adversos incluem mielossupressão, nefrotoxicidade, náusea/vômito (Arany, I. et al., 2003) e ototoxicidade (Rademaker-Lakhai, J. M. et al., 2006). Posteriormente, novos compostos como carboplatina, oxaliplatina e satraplatina foram desenvolvidos e apresentaram menor toxicidade (Reed, E. et al., 2006, Capdevila, J. et al., 2008). Apesar da ampla utilização da cisplatina e seus análogos no tratamento de inúmeras neoplasias, em modelo de câncer de pulmão murino foi observado que a eficácia da cisplatina é limitada quando utilizada como monoterapia uma vez que o tumor desenvolve resistência à droga (Oliver, T. G. et al., 2010). Os mecanismos de resistência envolvem, por exemplo, o aumento na tolerância ao dano no DNA (Koberle, B. et al., 1997), o aumento dos níveis de proteínas de choque térmico minimizando os efeitos da cisplatina (Brozovic, A. et al., 2001) e ainda redução da captação da droga (Abbosh, P. H. et al., 2006). Entretanto, estudos clínicos apontam aumento de eficácia no tratamento e melhor prognóstico para os pacientes na combinação entre quimioterápicos ou quando estes são associados com neo-adjuvantes (Shah, G. D. et al., 2010) ou ainda com outros alvos terapêuticos (Perez, D. G. et al., 2009).

Algumas estratégias clínicas propõem o uso de agonistas de TLRs como vacina adjuvante para o tratamento de neoplasias (Warren, T. L. et al., 2002, Cheever, M. A. et al., 2008). Conforme visto anteriormente, a ativação desses receptores através de agonistas pode mediar tanto ativação de respostas antitumorais levando a regressão tumoral quando a eventos inflamatórios crônicos os quais promovem a progressão do tumor (Nogueras, S. et al., 2008, Shcheblyakov, D. V. et al., 2010). Sugere-se também que a escolha da rota de ativação e dosagem podem ser pontos cruciais para o tratamento do tumor (Pidgeon, G. P. et al., 1999, Akita, K. et al., 2002). A administração sistêmica de agonistas de TLRs pode aumentar os riscos de promoção do crescimento e sobrevivência da célula do tumor. Por outro lado, demonstra-se que uma aplicação local transcutânea ou intradérmica pode diminuir esses riscos (Xiao, H. et al., 2013). A dose recomendada do uso dos agonistas é

amplamente controversa, mas sugere-se que em alguns casos altas doses dos agonistas parecem ter um efeito antitumoral enquanto que baixas doses desses promovem o desenvolvimento do tumor (Kluwe, J. et al., 2009). Os agonistas de TLRs podem ser combinados com quimioterapias (Garay, R. P. et al., 2007), radioterapias (Apetoh, L. et al., 2007) ou ainda anticorpos monoclonais para melhorar sua eficácia (Liu, Y. et al., 2012).

A imunoterapia apresenta uma alternativa interessante para o tratamento do câncer uma vez que possui menor toxicidade quando comparada com a quimioterapia, alta especificidade e potencial para a geração de uma resposta de memória contra o tumor (Kirkwood, J. M. et al., 2012). Dada a importância das citocinas na comunicação intercelular no sistema imune, a qual pode influenciar na geração de uma resposta antitumoral, foi proposta inicialmente a aplicação delas como imunoterapia. A primeira citocina a se mostrar efetiva foi o INF- γ uma vez que possui ação antiangiogênica, estimula atividade de macrófagos, células NK, linfócitos T citotóxicos e diminui a regulação de oncogenes (Gutterman, J. U. et al., 1980, Beatty, G. L. et al., 2001). Os ensaios clínicos demonstram que os efeitos colaterais gerados pelo INF- γ como mialgias, letargias, perda de peso e indução de estados depressivos severos podem forçar a interrupção do tratamento (Jett, J. R. et al., 1994, Kirkwood, J. 2002, Smyth, M. J. et al., 2004). A IL-2 foi outra citocina proposta para ação imunoterápica. Essa foi descrita como fator essencial para o crescimento de célula T, importante molécula na expansão clonal de células T efetoras. Estudos experimentais em animais indicaram sua ação antitumoral (Mazumder, A. et al., 1984, Rosenberg, S. A. 1985). Todavia, ensaios clínicos indicaram alta toxicidade e inúmeros efeitos colaterais possuindo como principal alvo o pulmão (Atkins, M. B. et al., 1999). Dessa forma, o uso citocinas demonstrou-se restrito uma vez que elas possuem diferentes efeitos dependentes da sua concentração, da célula-alvo, da presença e ação de outras citocinas.

A transferência de anticorpos monoclonais para pacientes visa o reconhecimento de proteínas específicas expressas por determinados tumores. Esses induzem mecanismos efetores de lise celular ou ainda ativam células NK a qual leva a destruição de células tumorais (Bowles, J. A. et al., 2006). Ademais, os anticorpos monoclonais podem ainda bloquear o efeito de alguns receptores inviabilizando sua rota de ativação. O tratamento para melanoma em estágio inicial consiste na secção cirúrgica, todavia é pouco eficiente e com alto risco de recidiva (Kaufmann, R. 2000). A quimioterapia torna-se mais indicada para estágios avançados de melanoma, contudo também possui considerável risco de recidiva e prolonga a sobrevida dos pacientes em 6-9 meses (Bedikian, A. Y. et al. 2006, Luke, J. J. et al., 2013). Atualmente, a única terapia capaz de significativamente aumentar a sobrevida dos

pacientes é o uso de anti-CTLA-4 (Ipilimumab) (Ledford, H. 2011). A molécula CTLA-4 possui afinidade com CD80 e CD86 e esta ligação promove a anergia de células T, inibição da produção de IL-2 por células T impedindo sua proliferação. Quando o CTLA-4 é bloqueado, os receptores CD80 e CD86 ficam livres para se ligarem ao CD28 e iniciar a ativação e diferenciação de células T *naïve*. Os efeitos colaterais como dermatite, hepatite, vitiligo, nefrite e o alto custo ainda são alguns obstáculos para a ampla aplicação dessa terapia (Di Giacomo, A. M. et al., 2010). Estudos clínicos em andamento avaliam agora se a interação de Ipilimumab com adjuvantes é mais eficiente do que a monoterapia em pacientes com melanoma avançado (Ascierto, P. A. et al., 2011).

1.7 Células T como alvo de imunoterapias antitumorais

As imunoterapias antitumorais mediadas por células T ganharam força com a descoberta das células T CD8⁺ citotóxicas que exibem alta capacidade de reconhecer e destruir células malignas quando TAAs (*Tumor-Associated Antigens*) são apresentados via moléculas MHC de classe I (Rosenberg, S. A. 2001). A ACT (*Adoptive Cell Therapy*) consiste na retirada de uma biópsia tumoral a qual é incubada *in vitro* com altos níveis de IL-2 resultando na expansão de células com atividade antitumoral e posteriormente essas células são transferidas para o paciente (Leen, A. M. et al., 2007, Brenner, M. K. et al., 2010,). O sucesso clínico foi relatado em leucemia linfocítica crônica, linfomas e melanoma (Swan, N. Z. D. 2013). Um progresso significativo foi relatado utilizando células T CD8⁺ no tratamento de melanoma (Rosenberg, S. A. et al., 2009). Os ensaios clínicos demonstraram serem mais promissores quando a ACT é associada com a depleção linfocitária através de quimioterápicos com o intuito de eliminar o ambiente supressor e restabelecer as populações de células antitumorais (Dudley, M. E. et al., 2005, Dudley, M. E. et al., 2008).

Outra estratégia baseada na ACT tem demonstrado ser promissora. Essa consiste em modificar geneticamente as células T através de CARs (*Chimeric Antigen Receptors*) de superfície (Cartellieri, M. et al., 2010). Tais receptores artificiais são compostos por fragmentos de anticorpos monoclonais específicos de TAA e possuem domínio intracelular responsável pela sinalização e ativação da célula (Brenner, M. K. et al., 2010, Cartellieri, M. et al., 2010). A associação CAR-TAA é independente do reconhecimento do TCR e de moléculas de MHC, assim alguns mecanismos de evasão imune pelo tumor como a baixa

regulação de MHC podem ser eficientemente contornados (Seliger, B. 2008). A terapia com CARs ainda é limitada pelo alto custo, complexidade técnica para isolamento e expansão de clones de células T específicos para TAA (Cartellieri, M. et al., 2010). Um estudo em neuroblastoma (Park, J. R. et al., 2007) e outro em leucemia (Kalos, M. et al., 2011) utilizando células T CD8⁺ expressando CARs relataram que o tempo de vida dessas células é relativamente curto e a resposta antitumoral gerada por essas células foi parcial.

Considerando a importância das células T CD4⁺ no auxílio à atividade citotóxica gerada pelas células T CD8⁺, alguns estudos reportam que a ACT com ambos os subtipos de células T na geração de uma resposta imunológica antitumoral é mais eficiente do que a transferência de apenas de células T CD8⁺ (Moeller, M. et al., 2005, Wang, L. et al., 2007). Ademais, os mesmos estudos também observam que o tráfego de células T CD8⁺ para o sítio tumoral e maior sobrevivência dos animais quando há co-transferência dessas células (Marzo, A. et al., 2000, Swan, N. Z. D. 2013). O anticorpo anti-CTLA-4 também possui as células T CD4⁺ como alvo uma vez que facilita a geração da resposta Th1 e ainda auxilia na depleção de células Treg através do bloqueio de CTLA-4 expressos por essas células (Korman, A. J. et al., 2006, Peggs, K. S. et al., 2009, Tosti, G. et al., 2013). Dessa forma, a maior exploração desses tratamentos e a descoberta de novas estratégias antitumorais como alvo a modulação do sistema imune tem sido um dos principais interesses na geração de tratamentos efetivos contra o câncer.

Todos esses estudos indicam que a compreensão da diferenciação e ação das células T CD4⁺ é importante para o entendimento dos mecanismos imunológicos de controle tumoral. Assim, nós objetivamos analisar dois mecanismos transcricionais relevantes para a diferenciação e função de células T CD4⁺ em animais com tumores. Neste estudo, nós analisamos a variação da expressão de fatores de transcrição canônicos para dois tipos de linfócito T auxiliar, as células Treg e as Th17 em órgãos linfóides drenantes de animais com melanoma. Buscamos compreender o quanto o tumor pode influir na expressão desses fatores por células T nos linfonodos drenantes, e se essa influência pode ser revertida utilizando um tratamento combinado tendo como alvo não apenas o tumor, mas também a resposta imune.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Analisar modificações transcricionais relevantes para a diferenciação de células T CD4⁺ em animais com melanoma.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a variação na porcentagem e número de células T Foxp3⁺ e células T RORγt⁺ em linfonodos drenantes de animais com melanoma B16F10 ao longo do crescimento tumoral;
- Analisar a variação da expressão de Foxp3⁺ e RORγt⁺ em células T CD4⁺ de linfonodos drenantes de animais com melanoma B16F10 ao longo do crescimento tumoral;
- Correlacionar esses dados com o desenvolvimento do tumor;
- Determinar o efeito de terapia combinada (Cisplatina + LPS ou PGN ou Poly(I:C)) sobre esses parâmetros.

3 JUSTIFICATIVA

A imunoterapia foi considerada a grande revelação em ciência no ano de 2013 (Couzin-Frankel, J. 2013). Desse modo, o entendimento da modulação de células imunes é essencial para a melhor compreensão de como os tumores conseguem escapar da imunovigilância e continuar progredindo. Particularmente, novas terapias antitumorais focam hoje na geração de respostas imunes de memória. Assim, consideramos importante estudar mecanismos relevantes para a diferenciação e função de células T CD4⁺ em animais com tumores. Neste estudo, nós analisamos a variação da expressão de fatores de transcrição canônicos para dois tipos de linfócito T auxiliar, as células Treg e as Th17 em órgãos linfóides drenantes de animais com melanoma. Buscamos compreender o quanto o tumor pode influenciar na frequência dessas populações, e se estas alterações podem ser revertidas utilizando um tratamento combinado de terapias tendo como alvo não apenas o tumor, mas também a resposta imune.

CAPÍTULO 2

Artigo Científico

Submetido à Melanoma Research

The combination of TLR agonists and cisplatin prevents tumor growth independently of T reg cell modulation

Running head: TLR agonists and cisplatin effects on CD4⁺ T cells in melanoma.

Málvaro Maculan Salin^{a,b,*}, Elisa Simon Marczak^{a,b,*}, Rodrigo Dornelles da Silva^{a,b}, Bárbara Nery Porto^c and Cristina Bonorino^{a,b}

a. Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Biomedical Research Institute, Pontífica Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil,

b. Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biosciences, Pontífica Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil,

c. Laboratory of Clinical and Experimental Immunology, Biomedical Research Institute, Pontífica Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil,

* These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Cristina Bonorino, Ph.D. Faculty of Biosciences, Institute of biomedical research, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6690, 2º andar. Porto Alegre, RS 90.610-000, Brazil.
cbonorino@puers.br

Disclosure

The authors report no conflict of interest in this work.

ABSTRACT

Melanoma is one of the most aggressive malignant tumors. In early stages of melanoma, local treatments such as surgery show reasonable efficiency. Chemotherapy treatment for advanced melanoma has several adverse events but usually prolongs the patient's life in a few months. Once the immune system is widely involved in tumors development, we evaluated the canonical transcriptional factors Foxp3 and ROR γ t in T cells of draining lymph nodes in melanoma bearing mice. We also evaluated whether the combined action of cisplatin (cis-diamino-dichloro-platin - CDDP) and TLR2 (Peptidoglycan), TLR3 (Acid-Polyribosilic Polyribocytidilic) or TLR4 (Lipopolysaccharide) agonists, could change these parameters. The animals were injected with B16F10 melanoma cell line and according tumor progression the TDLN were excised for Treg and Th17 cells analysis by flow cytometry. Our study shows an increase in the percentage and absolute number of Th17 and Treg cells according tumor progression. We show that cisplatin treatment alone, promotes tumor growth independently of T reg and Th17 cell modulation. Cisplatin and TLR2 agonist decreases the percentage of Th17 cells while CDDP plus TLR3 or TLR4 agonist therapy prevents tumor progression independently of these cells. These combined treatments also promote a modest increase in survival of melanoma bearing mice. We showed here that CDDP therapy combined with TLRs agonists prevents tumor growth independently of Treg cell modulation, in melanoma murine model and may be a potent therapeutic target for melanoma tumors.

Keywords: Th17 cells, Treg cells, cisplatin, TLRs agonists.

INTRODUCTION

Melanoma is one of the most malignant tumors, and its incidence has increased steadily in recent years [1]. In early stages of melanoma, local treatment such as surgery removal shows a favorable prognosis [2], but there is some possibility for relapse [3]. Currently, the only clinical therapy able to increase the survival of patients is the use of monoclonal antibody anti-CTLA-4 (Ipilimumab) [4]. However, blockade of CTLA-4 also results in proinflammatory effects that can induce autoimmune hyperactivity [5] and adverse events such as colitis and hepatitis [6].

Antigen-Presenting Cells (APC) such as dendritic cells (DCs), are necessary to initiate a T cell response. Constantly DCs recognize tumor antigens and through cytokine signaling induce CD4 T cells activation and differentiation [7,8]. Regulatory T cell (Treg) is a subtype of CD4⁺ T cells that express the transcription factor Forkhead box P3 (Foxp3) [9]. This subset is known to exert a suppressive effect on immune cells including effector T cells [10]. Studies on chronic lymphocytic leukemia [11], advanced gastric cancer [12], prostate cancer [13] and melanoma [14-16] detected increases of Treg cells in number and functionality in the peripheral blood, tumor-draining lymph node and microenvironment tumor, suggesting a poor prognosis for both patients and murine model. Th17 are CD4⁺ T helper cells characterized by production of IL-17 and the expression of transcription factor Retinoid-Acid Receptor-related Orphan Receptor gamma t (ROR γ t) [17]. Tumor-infiltrating Th17 cells and cytokine profile of these cells can modulate the tumor microenvironment by inducing antitumor effect, observed in prostate cancer and [18] esophageal squamous cell carcinoma [19], and protumoral effects, showed in lung [20] and colorectal cancer [21].

The cisplatin monochemotherapy (cis-diamino-dichloro-platin - CDDP) in advanced melanoma has limited clinical benefit [22]. The nephrotoxicity [23] and tumor resistance to apoptotic effects caused by cisplatin, usually limit its clinical use [24]. However, clinical studies indicate that combined immunochemotherapies [25,26] and immune adjuvants [27] can enhance treatment efficacy.

Toll-like receptors (TLR) are pattern-recognition receptors responding to microbial products such as bacteria, virus, and cells of host origin [28]. This feature can facilitate TLR-expressing innate immune cells to activate a T cell response [29]. The TLR2, TLR3 and TLR4 activation by PGN (Peptidoglycan), Poly(I:C) (Polyribosilic-Polyribocytidilic acid) and LPS (Lipopolysaccharide) agonists respectively, can induce apoptosis of tumor cells

and promote tumor regression [30, 31]. One of the mechanisms by which it occurs is the activation of signaling pathways that promote specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells antitumor immune response [32].

In this study, we investigated the dynamics of Foxp3⁺ and RORγt⁺ CD4⁺ T cells in the draining lymph nodes of mice with murine melanoma during tumor progression. Our results indicate that treatment with cisplatin only promotes tumor growth, however, did not alter the number of Foxp3⁺CD4⁺ T cells. We show here that this process can be reversed by TLR agonists, independently of decrease in Foxp3⁺CD4⁺ T cells number. These results indicate that combined therapy using TLR agonists are potent targets for tumor regression, but the pathways remains unknown.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Female C57BL/6 mice between 6-8 week-old were obtained from Central Biotery UFPEL (Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil). All animals were housed in vented racks and had free access to water and food in biotery of Center for Biological Experimental Models. In all procedures mice were anesthetized intraperitoneally with 100μl volume of PBS 34% ketamine (50mg/ml) (Cristália, Brazil) and 16% Xilazine (20mg/ml) (Syntec, Brazil). Experimental procedures followed the recommendations by the Ethics Committee for the Use of Animals of Pontíficia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA-PUCRS) under protocol CEUA 13/00329.

Cell lines and reagents

B16F10 melanoma cells (ATTC CRL-6475) were cultured in complete DMEM media (Gibco, Carlsbad, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Brazil). The culture was maintained at 37°C with 5% of CO₂ atmosphere. Cisplatin (LIBBS Pharmaceutical) was kindly provided by Hospital São Lucas da PUCRS (PUCRS, Brazil). Ultrapure LPS O111-B4 from *Escherichia coli* was purchased from Sigma-Aldrich Poly (I:C) and PGN from Invivogen.

Tumor injections and measurements of tumor growth

Mice were injected subcutaneously in both thighs with 2×10^6 B16F10 melanoma cells in 80 μ l of phosphate-buffered saline (PBS). Tumor growth was evaluated using a digital caliper every 3 days. Tumor volume was calculated using the following formula: Volume (mm^3) = (longest diameter) x (shortest diameter)²/2. Mice were sacrificed in a CO₂ chamber at different time points, depending on experiment procedure, and tumor draining lymph nodes were harvest for analysis.

Treatment

At day 9 after B16F10 injection, the animals were divided different treatment groups. One group received only 100 μ l PBS intraperitoneally and 50 μ l PBS intratumorally as a negative control. A second group received cisplatin (5mg/kg) intraperitoneally and 50 μ l PBS intratumorally. The other groups were treated with the same dose of cisplatin intraperitoneally and 500ng LPS, or 20 μ g Poly(I:C) or 10 μ gPGN intratumorally at a 50 μ l of final volume. At day 15 after tumor injection, the tumor-draining lymph node was excised and disrupted to obtain single cell suspensions. Cells were counted with Trypan blue and stained for flow cytometry analysis.

Flow cytometry

Cell suspensions from tumor draining lymph nodes were stained in order to evaluate T cell responses. Cells were stained for CD4 APC (RM4-5), Foxp3 PE (MF23) and ROR γ t (Q31-378) from BD Biosciences. Fc receptors were blocked (24G2 cell supernatant supplemented with 5% mouse serum and 5% rat serum) for 20 minutes and cells were stained for 30 minutes on ice with anti-CD4 APC. Foxp3 and ROR γ t staining was performed using Mouse Foxp3 Buffer Set (BD Biosciences), according to manufacturer's instructions. Cells were acquired on FACSCanto II (BD Biosciences) and BD FACSDiva software (BD Biosciences). Data obtained were analyzed using Flowjo software (version 7.6.5, TreeStar).

Statistical Analysis

The Two-Way ANOVA test followed by Bonferroni's post-test was used to compare difference among control group with tumor groups. The One-Way ANOVA test followed by Tukey's post-test was used to compare difference among tumor groups and also among treated groups. To verify tumor survival, the Kaplan-Meier analysis was used. Statistical analysis and graphs were performed using Graphpad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). Value of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Tumor-draining lymph node has increased CD4⁺ T cell levels during tumor progression

To establish the response of CD4⁺ T cells at the TDLN during tumor growth we analyzed the cellularity at different time points. We first characterized the tumor progression for our B16F10 lineage *in vivo* (Fig 1A-B). The results shown in Figure 1, indicate that the frequency of total cells in TDLN, increase significantly during tumor progression (Fig 1C). At day 5 after tumor injection we detected a significant increase in total lymphocytes number in tumor-bearing mice (Fig 1D). The analysis of tumor progression showed that in day 10 after tumor injection total lymphocytes number decrease and show a profile like the PBS group (no tumor), but, at day 15 after tumor injection total lymphocytes increase again (Fig 1D). These results didn't see for total lymphocytes at a percentage value. Analyzing CD4⁺ T cells in TDLN we observed a significant decrease in the percentage of this subset at day 5, 10 and 15 after tumor injection compared to PBS controls (Fig 1). However, the total number of this subset cells showed a significant increase at day 5 of analysis following a decrease of CD4⁺ T cells at day 10 (Fig 1D). At day 15 of tumor growth the number of total CD4⁺ T cells increases again. These results suggest that lymphocytes immune response had been modulate at the draining lymph node, but at the same time the tumor mass increased in size.

Tumor growth is accompanied by increase in the number of Foxp3⁺CD4⁺ T cells and RORγt⁺CD4⁺ T cells

Previous studies have demonstrated that tumor progression is accompanied by an immunosuppressive response of Treg cells [31, 32]. At the same time, the role for Th17 cell in tumor growth is unclear [33]. In the present study we asked how tumor growth could influence Treg and Th17 cells number in TDLN. We first characterized these subsets of cells at days 5, 10 and 15 after tumor injection in TDLN. We observed that Foxp3⁺CD4⁺ T cells both in percentage and absolute number increase significantly correlating with tumor size (Fig 2A). The percentage and total number of Foxp3⁺CD4⁺ T cells had a significant increase between at day 15 in tumor bearing mice compared with PBS control. Additionally, as shown in Figure 2B, the percentage and total number of RORγt⁺CD4⁺ T cells during tumor progression had a significant increase at day 15 of tumor growth comparing with PBS groups. The results presented here, indicate that there is a role for Treg cells and Th17 cells number according to tumor progression in TDLN. However, the increase in the number of Treg cells seems to be greater than the Th17 cells. To test this question, we analyzed the Foxp3⁺/RORγt⁺ ratio. Surprisingly, there was no dominance in Treg cells over Th17 cells in TDLN in our system comparing with PBS control groups, suggesting a role for both populations in advanced melanoma (Fig 2C). The mean fluorescence intensity (MFI) of transcription factors Foxp3 and RORγt was not significant when comparing the control group with the tumor group (Fig 2D).

The combination of TLR agonists and cisplatin prevents tumor growth

Cisplatin is one of the most used treatments in a variety of tumors. However, it is usually used combined with other treatments or immunological adjuvant [34]. The TLR agonists have show benefic effects in tumor treatments [30]. We investigated here the effect of cisplatin treatment only, and cisplatin treatment combined with TLR2 or TLR3 or TLR4 agonists in tumor size. To determine this question B16F10 cells were subcutaneously injected at concentration of 2×10^6 in C57Bl/6 mice, in both upper flank of the thighs. After nine days of tumor growth, when a solid tumor mass could be visualized at the site of injection, cisplatin was injected intraperitoneally in four tumor bearing mice groups or PBS in one group of tumor bearing mice as a control. Three groups were treated with LPS, or Poly (I:C) or PGN intratumorally as previously described (as shown on Fig 3A). We choose the TLR agonist doses reported to be efficient in developing antitumor effects [35,36]. To evaluate the influence on TLR agonist's effects we measured the tumor volume every 2

days. The tumor size in group treated with cisplatin only was similar as the control group (only B16F10 cells with no treatment). It was a surprising result since cisplatin is used in clinical patients for melanoma treatment. On the other hand, when tumor groups were treated with cisplatin combined with TLR3, or TLR4 agonists the tumor size decrease significantly in LPS and Poly(I:C) treated groups (Fig 3B). In PGN treated group, there is no significant difference in tumor size, but the tumor growth was lower compared to control groups (B16F10+PBS or B16F10+CDDP+PBS treated). These results were consistent with macroscopic appearance in different treatment groups (Fig 3C). The results showed a tumor-to-tumor variability within the same group in tumor weight at day 15. After tumor excision at day 15 we observed that groups that received combined therapy had small tumors in size (Fig 3D). These results suggest that combined therapy with immune system adjuvants like TLR agonists, may be a powerful alternative to prevent tumor growth.

Cisplatin plus PGN treatment increase the percentage of CD4⁺ T cells in TDLN

We asked then, if the treatment used in this study was able to modulate the number of lymphocytes in the TDLN. In our experiment, at day 15 after tumor injection, the draining lymph node was removed, and single cell suspensions were obtained for analysis. No significant difference was found between the numbers of lymphocytes in all treatments or control group (Fig 4A). These results indicated that the treatments used were not able to influence the total number of lymphocytes. We have previously shown that the percentage of CD4⁺ T cells at day 15 of tumor growth was significantly lower in tumor bearing mice compared with PBS group (Fig 1E). To investigate whether CD4⁺ T cells were modulated by the treatments, we analyzed percentage and total number of CD4⁺ T cells in TDLN from all treated or untreated groups. CD4⁺ T cells were significantly increased in percentage in cisplatin plus PGN treatment compared to cisplatin alone or cisplatin plus LPS groups (Fig 4B). The same trend could be seen in absolute numbers, although the differences were not significant. Increase of CD4⁺ T cells of cisplatin plus PGN treated group probably was due to the PGN injection effect once the use of cisplatin only decrease gently the CD4⁺ T cells in TDLN (Fig 4B). Taken together these data suggested that, although the number of CD4⁺ T cells in lymph node has increased with PGN treatment, this response was not most effective in preventing tumor growth compared with LPS and Poly(I:C) agonists, as show in figure 3.

Cisplatin treatment combined with TLR agonists prevents tumor growth independently of Foxp3⁺CD4⁺ T cells and RORγt⁺CD4⁺ T cells in vivo

Previous studies have showed that cisplatin treatment increase Treg cells [37]. This cells subset, constitute an important mechanism involved in poor effector anti-tumor response [38]. Here the use of cisplatin alone was accompanied by an increase of Foxp3⁺CD4⁺ T cells, but this was not significant (Fig 5A). At day 15 after tumor growth, for both percentage and absolute cell number in TDLN, we observed that when tumor bearing mice were treated with cisplatin or cisplatin plus TLR agonists, there was no difference on Foxp3⁺CD4⁺ T cells. To further investigate if treatments influence the Th17 response, we analyzed the RORγt⁺CD4⁺ T cells at the same time of Foxp3⁺CD4⁺ T cells. In this analysis the percentage of RORγt⁺CD4⁺ T cells decrease significantly in PGN treated group compared to cisplatin only or control group (only B16F10 cells with no treatment) (Fig 5B). We observed that there was no decrease in RORγt⁺CD4⁺ T cells in LPS and Poly(I:C) treatments groups. When the absolute numbers was analyzed we have seen the same as in percentage. The data of total number showed no difference in any treatment groups. These results suggested that antitumor immune response in TDLN of Treg and Th17 cells, had a role for tumor progression, and cisplatin treatment was not able to modulate this cells. They also pointed that intratumoral injection of TLR agonists may not lead to a decrease in Treg cells. Interestingly, the results of Foxp3⁺/RORγt⁺ ratio showed a dominant effect of Foxp3⁺CD4⁺ T cells over RORγt⁺CD4⁺ T cells in PGN treated group (Fig 5C). At the same time, the MFI of transcription factors Foxp3 and RORγt was not significant when comparing the control group with groups treated with the combination of cisplatin with TLRs agonists (Fig 5D). These data relate that the use of TLR 2 agonist prevents tumor growth even with the increase of T reg cells in TDLN.

Cisplatin treatment combined with TLR prolongs survival of tumor bearing mice

We also investigated whether cisplatin treatment only, or cisplatin combined with TLR agonists could prolong survival of tumor bearing mice. We proceeded as show in Figure 3A, to investigate the survival after the treatments. Interestingly we show that survival was increase in tumor bearing mice that received cisplatin combined with TLR 3 or 4 agonists (Fig 6). The group that received cisplatin only showed reduced survival. This data reveal that cisplatin monotherapy should be used with attention as presented in our results. On the other hand, TLR3 and TLR4 agonists prolonged survival of tumor bearing mice

treated with cisplatin demonstrating that the use of innate immune adjuvant could be used as antitumoral therapy.

DISCUSSION

The role of CD4⁺ cells in tumor immunity remains poorly understood. Otherwise, recent findings showed that adoptive cell therapy using CD4⁺ tumor-infiltrating lymphocytes, was able to mediate objective and durable tumor regressions in patients with metastatic melanoma [40]. We identified some aspects of these populations that we consider to be fundamentally important in tumor growth. Recently, a study in melanoma murine model found that Foxp3⁺CD4⁺ T cells increase in tumor infiltrate providing a poor prognosis [41]. Knol and colleagues (2001) showed that metastatic LN of melanoma patients with high Foxp3 expression, allows the identification of patients at high risk of recurrence [42]. Additionally, Th17 cells play an active role in inflammation [43] and appear to exert proinflammatory role in tumor microenvironment [44]. Our study confirms these findings by demonstrating the Treg cells and Th17 cells numbers in TDLN at different time points of melanoma tumor progression. We established that Foxp3⁺CD4⁺ T and RORγt⁺CD4⁺ T cells increased in percentage progressively according tumor growth, while in absolute number we showed that this increase is more evident at day 15 of tumor growth. These results suggest that a specialized response has been formed at TDLN where Treg cells and Th17 cells played a role for tumor progression. Moreover, the ratio Foxp3⁺/RORγt⁺ decrease during tumor progression. This data show that Th17 cells increase subtly at day 15 and that Treg cells did not have a suppressive effect on Th17 cell expansion. Thus, we demonstrate the kinetic distribution and relationship between Treg cells and Th17 cells. Both populations seem to cooperate for tumor growth.

Combined therapy has quickly emerged as an important alternative for tumor treatment [45]. Since it has been demonstrated that cisplatin has an effect on Treg cells [37], and this cell subset is involved in tumor immunosuppression [38], we hypothesized that this chemotherapy could have a negative effect in tumor treatment of melanoma when it is used without other adjuvant therapy. Our data confirm this hypothesis, since when CDDP was used alone, the tumor size increased compared to B16F10 control group. However, we also showed that tumor growth was independently of Foxp3⁺CD4⁺ T cells in melanoma model suggesting that this is not a tumor-mediated immunosuppression mechanism promoted by

this drug. Previous studies have shown that the use of CDDP in combination with other therapies showed a positive effect in patients with advanced melanoma [46].

Toll-like receptors have showed an antitumor effect [25,29,30]. Then, we asked if TLR agonists could be used as adjuvants in CDDP treatment of melanoma. To investigate this possibility we tested a melanoma murine model *in vivo*, in which we used CDDP combined with LPS, PGN or Poly(I:C) treatment. Cisplatin followed by TLR agonists treatment significantly reduced tumor growth and increased animal survival compared with cisplatin alone. We investigated whether TLR agonists as therapies against murine melanoma, affect pathways that are crucial for immune T cell response in this model. This question led us to consider the possibility that combined therapies help to optimize an efficient anti-tumor immune response. Cisplatin treatment combined with TLR agonist used in present study, showed as a therapy that was able to prevent tumor growth, but this effect was not through abrogating Treg and Th17 cells in TDLN. We show here that PGN treatment (a TLR2 agonist) was not able to decrease Foxp3⁺CD4⁺ T cells, but at the same time, the percentage of RORγt⁺CD4⁺ T cells decrease significantly in PGN group. Once the Treg/Th17 ratio was greater in this group, we concluded that there was a significant dominance of Treg cells over Th17 cells compared to all other treated or untreated group. Since the number of T reg cells did not increase, these data do not confirm the hypothesis that TLR2 suppresses immunity triggering expansion and function of regulatory T cells through induction of IL-10 [39,47]. Otherwise, we hypothesize that PGN agonist also may be acting through other mechanisms to prevent tumor growth, as example, triggering a Th1 antitumor effector response [48,49]. On the other hand in human hepatic cancer cells, triggering of TLR3 signaling could induce apoptotic effects [50]. Our results indicate that CDDP combined with Poly(I:C), a TLR 3 agonist, impaired tumor growth and prolonged survival of melanoma bearing mice. According our results, this effect may be due to pathways independently of Treg and Th17 cells. As showed by Maito et al (2012), the use of LPS intratumorally also had beneficial effects on tumor impairment [35]. Here we used this TLR4 agonist to verify if combined with CDDP we could have the same antitumoral effect. The results revealed that CDDP combined with LPS prevented tumor growth and prolonged survival in melanoma bearing mice. We also detected that Treg and Th17 cells number have not increased in this treatment. So, our findings indicate that combined therapy, with CDDP as chemotherapy drug (intraperitoneally), together with immune system adjuvants LPS, PGN and Poly(I:C) (intratumorally), were able to impair tumor growth independently of Treg and Th17 cells in TDLN of melanoma bearing mice.

Concluding, our results indicated that Th17 cells in TDLN play a role for tumor growth, probably exerting its inflammatory mechanism, while the role for Treg cells in tumor progression probably occur through its already described mechanism of inhibition antitumor immunity. Here we showed this data at TDLN in melanoma bearing mice model. In this context, TLR agonists can be used in combination with CDDP as potential antitumor therapeutic, however the pathways remain unknown but are independent of Treg and Th17 response.

REFERENCE

1. Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol* 2009; **27**: 3-9.
2. Kaufmann R. Surgical management of primary melanoma. *Clin Exp Dermatol* 2000; **25**: 476-481.
3. DeBloom JR and, Zitelli JA, Brodland DG. The invasive growth potential of residual melanoma and melanoma in situ. *Dermatol Surg* 2010; **36**: 1251-1257.
4. Ledford H. Melanoma drug wins US approval. *Nature* 2011; **471**: 561.
5. Di Giacomo AM, Biagioli M, Maio M. The emerging toxicity profiles of anti-CTLA-4 antibodies across clinical indications. *Semin Oncol* 2010; **37**: 499-507.
6. Attia P, Phan GQ, Maker AV, Robinson M, Quezado M, Yang JC, *et al.* Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 6043-6053.
7. Dobrzanski MJ. Expanding roles for CD4 T cells and their subpopulation in tumor immunity and therapy. *Frontiers in Oncology* 2013; **13**: 1-19.
8. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; **4**: 330-336.
9. Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol Rev.* 2011; **241**: 260-268.
10. Beyer M, Kochanek M, Darabi K, Popov A, Jensen M, Endl E *et al.* Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood* 2005; **106**: 2018-2025.
11. Maruyama T, Kono K, Mizukami Y, Kawaguchi Y, Mimura K, Watanabe M *et al.* Distribution of Th17 cells and FoxP3(+) regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer. *Cancer Sci* 2010; **101**: 1947-1954.
12. Tien AH, Xu L, Helgason CD. Altered immunity accompanies disease progression in a mouse model of prostate dysplasia. *Cancer Res* 2005; **65**: 2947-2955.
13. Hontsu S, Yoneyama H, Ueha S, Terashima Y, Kitabatake M, Nakano A *et al.* Visualization of naturally occurring Foxp3+ regulatory T cells in normal and tumor-bearing mice. *Int Immunopharmacol* 2004; **4**: 1785-1793.
14. Mohos A, Sebestyén T, Liskay G, Plótár V, Horváth S, Gaudi I *et al.* Immune cell profile of sentinel lymph nodes in patients with malignant melanoma - FOXP3+ cell density in cases with positive sentinel node status is associated with unfavorable clinical outcome. *J Transl Med* 2013; **43**: 1-11.

15. Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS *et al.* STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* 2007; **282**: 9358-9363.
16. Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH, Xu L, Thoburn CJ, DeMarzo AM *et al.* Phenotypic analysis of prostate infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 3254-3261
17. Lv L, Pan K, Li XD, She KL, Zhao JJ, Wang W *et al.* The accumulation and prognosis value of tumor infiltrating IL-17 producing cells in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2011; **6**: 1-7.
18. Chen X, Wan J, Liu J, Xie W, Diao X, Xu J. Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer* 2010; **69**: 348-354.
19. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G *et al.* Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 2011; **1**: 1263-1271.
20. Atkins, M. The role of cytotoxic chemotherapeutic agents either alone or in combination with biological response modifiers. In: Kirkwood, J., editor. *Molecular Diagnosis, Prevention & Therapy of Melanoma*, New York: 1997.
21. Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin* 2003; **23**: 460-464.
22. Oliver TG, Mercer KL, Sayles LC, Burke JR, Mendus D, Lovejoy KS. Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer. *Genes Dev* 2010; **24**: 837-852.
23. Tseng CW, Hung CF, Alvarez RD, Trimble C, Huh WK, Kim D *et al.* Pretreatment with cisplatin enhances E7-specific CD8+ T-Cell-mediated antitumor immunity induced by DNA vaccination. *Clin Cancer Rev* 2008; **14**: 3185-3192.
24. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, M D, Weber J, Garbe C *et al.* Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2011; **364**: 2517-2526.
25. Amos SM, Pegram HJ , Westwood JÁ, John, LB, Devaud C, Clarke CJ *et al.* Adoptive immunotherapy combined with intratumoral TLR agonist delivery eradicates established melanoma in mice. *Cancer Immunol Immunother* 2011; **60**: 671–683.
26. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; **2**: 675-680.
27. Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 2005; **560**: 11-18.

28. Li-sheng W, Ling-jia P, Li S, Yong S, Ya-li Z, Dian-yuan Z. The apoptosis of experimental colorectal carcinoma cells induced by peptidoglycan of bifidobacterium and the expression of apoptotic regulating genes. *Chin J Cancer Res* 1999; **11**: 184-187.
29. Wolska A, Lech-Marańda E, Robak T. Toll-like receptors and their role in carcinogenesis and anti-tumor treatment. *Cell Mol Biol Lett* 2009; **14**: 248-272
30. Kaczanowska S, Joseph AM, Davila E. TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* 2013; **93**: 847-846.
31. Turk MJ, Guevara-Patiño JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Sakaguchi S, Houghton AN. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med* 2004; **200**: 771-782.
32. Tien AH, Xu L, Helgason CD. Altered immunity accompanies disease progression in a mouse model of prostate dysplasia. *Cancer Res* 2005; **65**: 2947-2955.
33. Alizadeh D, Katsanis E, Larmonier N. The Multifaceted role of Th17 lymphocytes and their associated cytokines in cancer. *Clin Dev Immunol* 2013; **2013**: 1-11.
34. Luke JJ, Schwartz GK. Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma. *Clin Dermatol* 2013; **31**: 290-297.
35. Maito, FLDM, de Souza APD, Pereira P, Smithey M, Hinrichs D, Bower A *et al.* Intratumoral TLR-4 agonist injection is critical for modulation of tumor microenvironment and tumor rejection. *ISRN Immunology* 2012; **2012**: 1-11.
36. Oosterhoff D, Heusinkveld M, Loughheed SM, Kosten I, Lindstedt M, Bruijns SC *et al.* Intradermal delivery of TLR agonists in a human explant skin model: preferential activation of migratory dendritic cells by polyribosinic-polyribocytidylic acid and peptidoglycans. *J Immunol* 2013; **190**: 3338-3345.
37. Schuler PJ, Harasymczuk M, Schilling B, Saze Z, Strauss L, Lang S *et al.* Effects of adjuvant chemoradiotherapy on the frequency and function of regulatory T cells in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 6585-6596.
38. Adeegbe DO, Nishikawa H. Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Front Immunol*.2013; **4**: 1-14.
39. Suttmuller RP, den Brok MH, Kramer M, Bennink EJ, Toonen LW, Kullberg BJ *et al.* Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* 2006; **116**: 485-494.
40. Friedman KM, Prieto PA, Devillier LE, Gross CA, Yang JC, Wunderlich JR *et al.* Tumor-specific CD4+ melanoma tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunother* 2012; **35**: 400-408.

41. Jensen SM, Twitty CG, Maston LD, Antony PA, Lim M, Hu HM *et al.* Increased frequency of suppressive regulatory T cells and T cell-mediated antigen loss results in murine melanoma recurrence. *J Immunol* 2012; **189**: 767-776.
42. Knol AC, Nguyen JM, Quéreux G, Brocard A, Khammari A, Dréno B. Prognostic value of tumor-infiltrating Foxp3+ T-cell subpopulations in metastatic melanoma. *Exp Dermatol* 2011; **20**: 430-434
43. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008; **28**: 454-467.
44. Zou W, Restifo NP. Th17 cells in tumor immunity and immunotherapy. *Nat Rev* 2010; **10**: 248-256.
45. Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*.2012; **12**: 237-251.
46. Keilholz U, Punt CJ, Gore M, Kruit W, Patel P, Lienard D *et al.* Dacarbazine, cisplatin, and interferon-alfa-2b with or without interleukin-2 in metastatic melanoma: a randomized phase III trial (18951) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 6747-6755.
47. Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, van Krieken JH *et al.* Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* 2004; **172**: 3712-3718.
48. Imanishi T, Hara H, Suzuki S, Suzuki N, Akira S, Saito T. Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J Immunol* 2007; **178**: 6715-6719.
49. Biswas A, Banerjee P, Biswas T. Porin of *Shigella dysenteriae* directly promotes toll-like receptor 2-mediated CD4+ T cell survival and effector function. *Mol Immunol* 2009; **46**: 3076-3085.
50. Salaun B, Coste I, Risoan MC, Lebecque SJ, Renno T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol* 2006; **176**: 4894-4901.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. TDLN has increased CD4⁺ T cells levels during tumor progression. (A) Scheme of tumor cells injection and the day of T cells analysis in TDLN. (B) Kinetic of tumor growth. (C) TDLN cellularity. (D) Representative gate of lymphocytes, percentage and absolute number of lymphocytes in TDLN. (E) Representative gate of CD4⁺ T cells, percentage and absolute number of CD4⁺T cells in TDLN. White bars are the control group(PBS) and black bars are the tumor bearing mice groups. Error bars represent SEM. n= 3 mice per group. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Figure 2. Foxp3⁺CD4⁺ T cells and RORγt⁺CD4⁺ T cells increase in TDLN during tumor progression. (A) Representative gate of Foxp3⁺CD4⁺T cells, percentage and absolute number of Foxp3⁺CD4⁺T cells in the TDLN. (B) Representative gate of RORγt⁺CD4⁺T cells, percentage and absolute number RORγt⁺CD4⁺T cells in TDLN. (C) Ratio of percentage and absolute number of Foxp3⁺/RORγt⁺T cells. Error bars represent SEM. n= 3 mice per group. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Figure 3. Cisplatin treatment combined with TLR agonists prevents tumor growth *in vivo*. (A) Scheme showing treatment groups and TLRs agonists doses used (B) Kinetic of tumor growth of control group and treated groups (C) Tumor weight of control group and treated groups. (D) Representative image of tumor size in control group and treated groups. Error bars represent SEM. n= 3 mice per group. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Figure 4. Percentage of CD4⁺ T cells in TDLN increase in cisplatin plus PGN treated group. (A) Representative gate of lymphocytes, percentage and absolute number of lymphocytes in TDLN. (B) Representative gate of CD4⁺ T cells, percentage and absolute number of CD4⁺T cells in TDLN. White bars are the control group (PBS) and black bars are the tumor bearing mice groups. Error bars represent SEM. n= 3 mice per group. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Figure 5. Cisplatin treatment combined with TLR agonists prevents tumor growth independently of Foxp3⁺CD4⁺ T cells and RORγt⁺CD4⁺ T cells *in vivo*. (A) Representative gate of Foxp3⁺CD4⁺T cells, percentage and absolute number of Foxp3⁺CD4⁺T cells in the TDLN of control groups and treated groups. (B) Representative gate of RORγt⁺CD4⁺T cells, percentage and absolute number RORγt⁺CD4⁺T cells in TDLN of control groups and treated groups. (C) Ratio of percentage and absolute number

of Foxp3⁺/RORγt⁺T cells of control groups and treated groups. Error bars represent SEM. n= 3 mice per group. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Figure 6. Cisplatin treatment combined with TLR agonists prolongs survival of tumor bearing mice. Survival curve of animals in control group and treated groups. n= 3 mice per group.

Figure 1

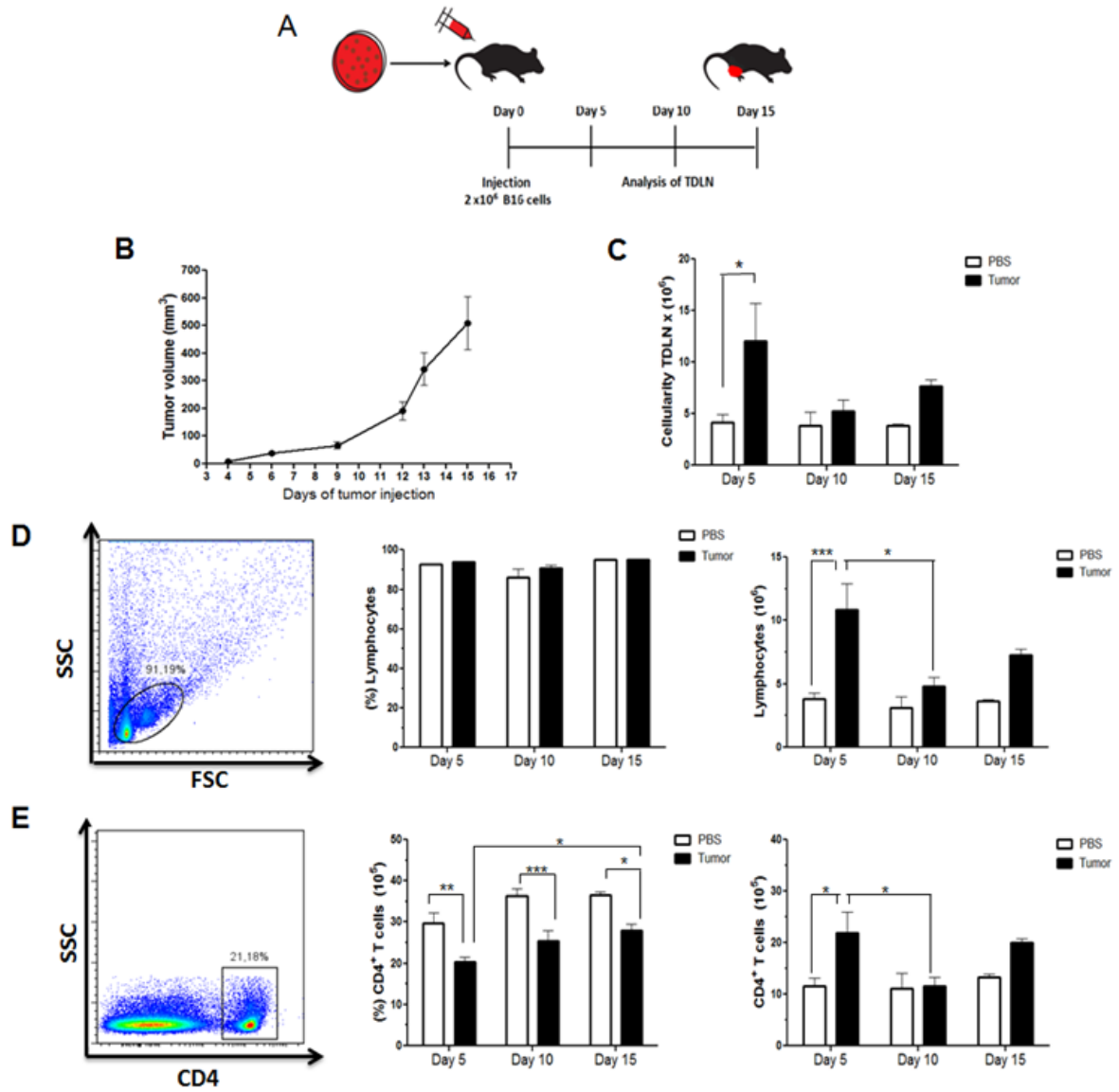


Figure 2

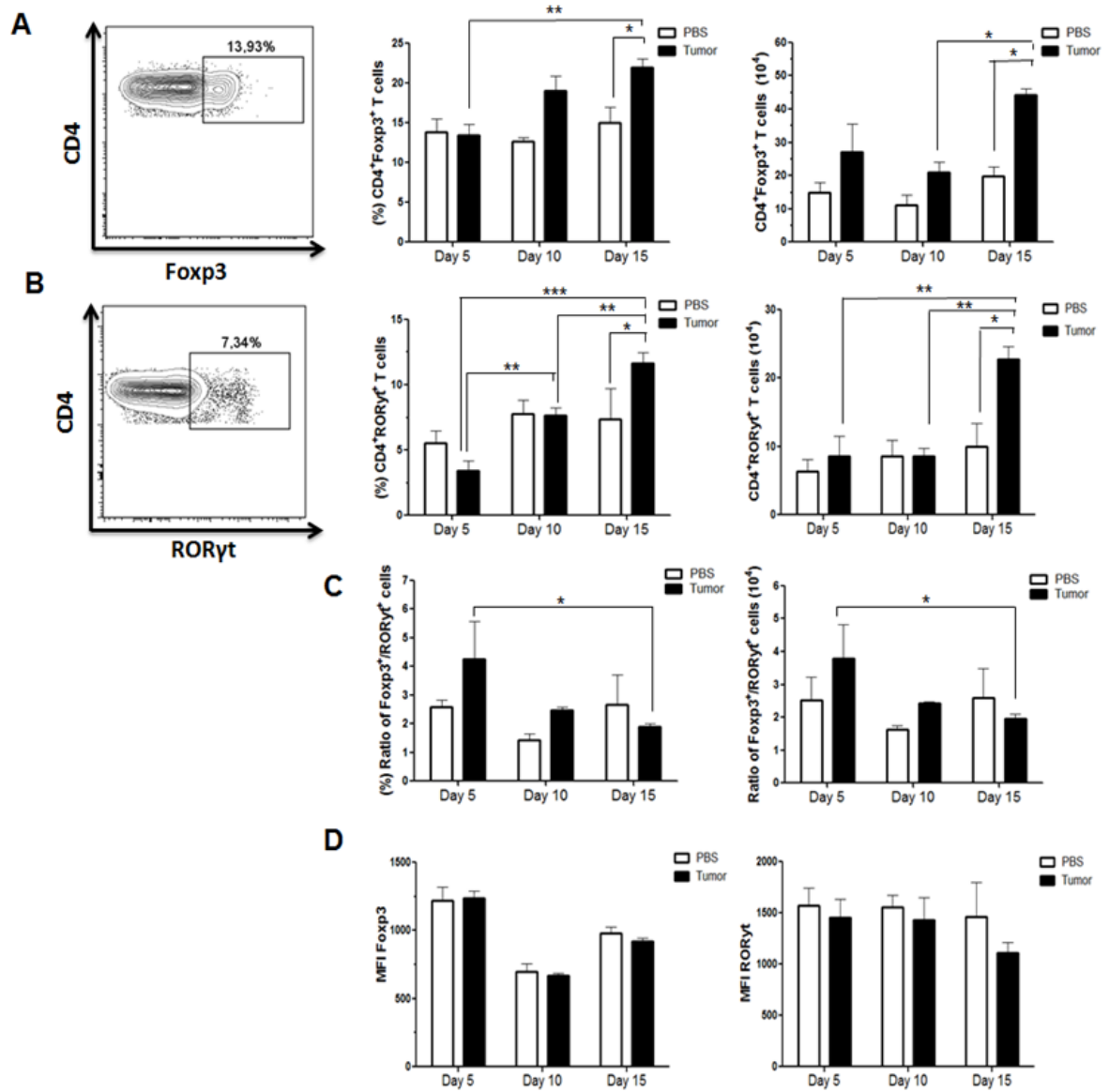


Figure 3

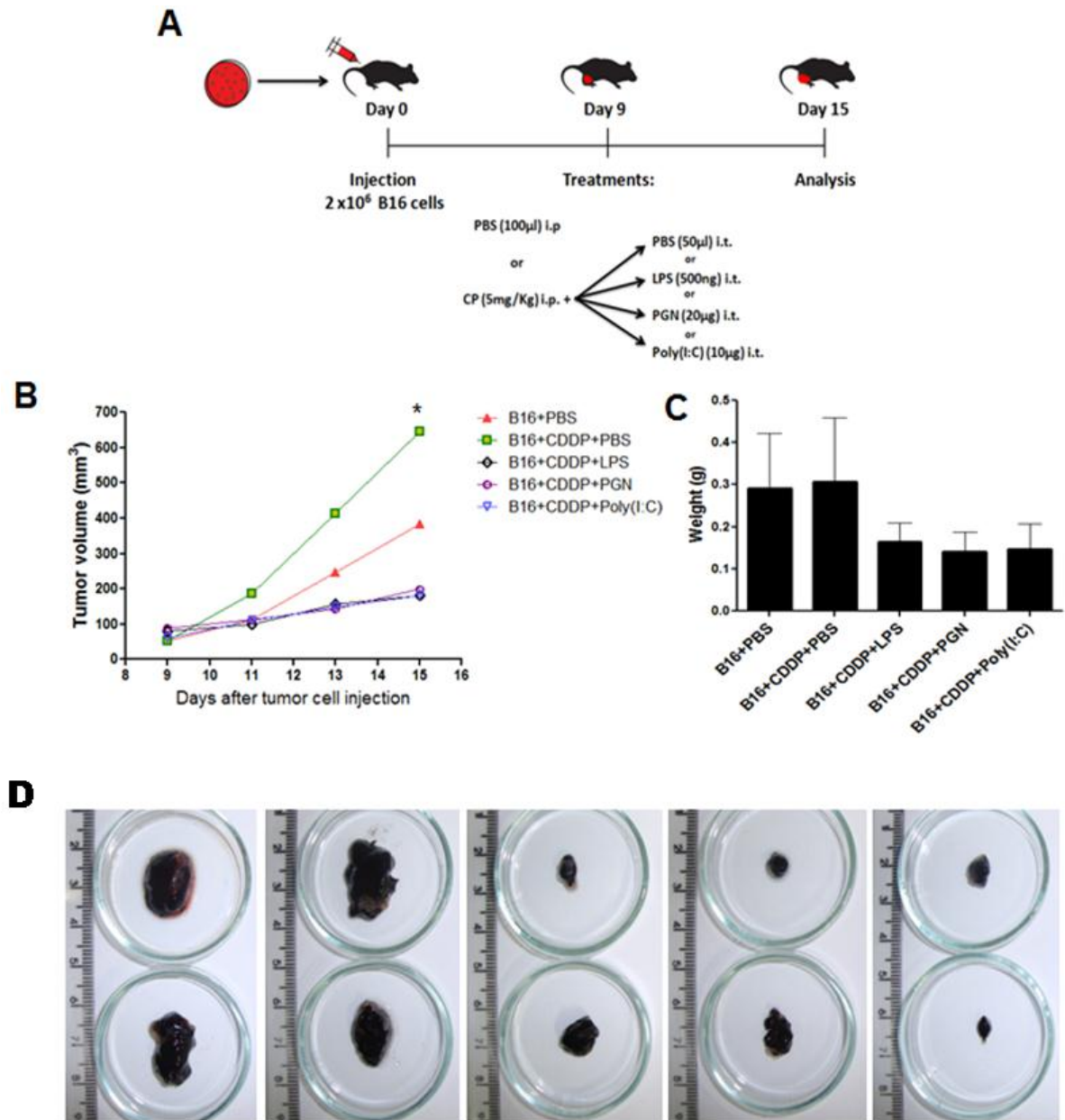


Figure 4

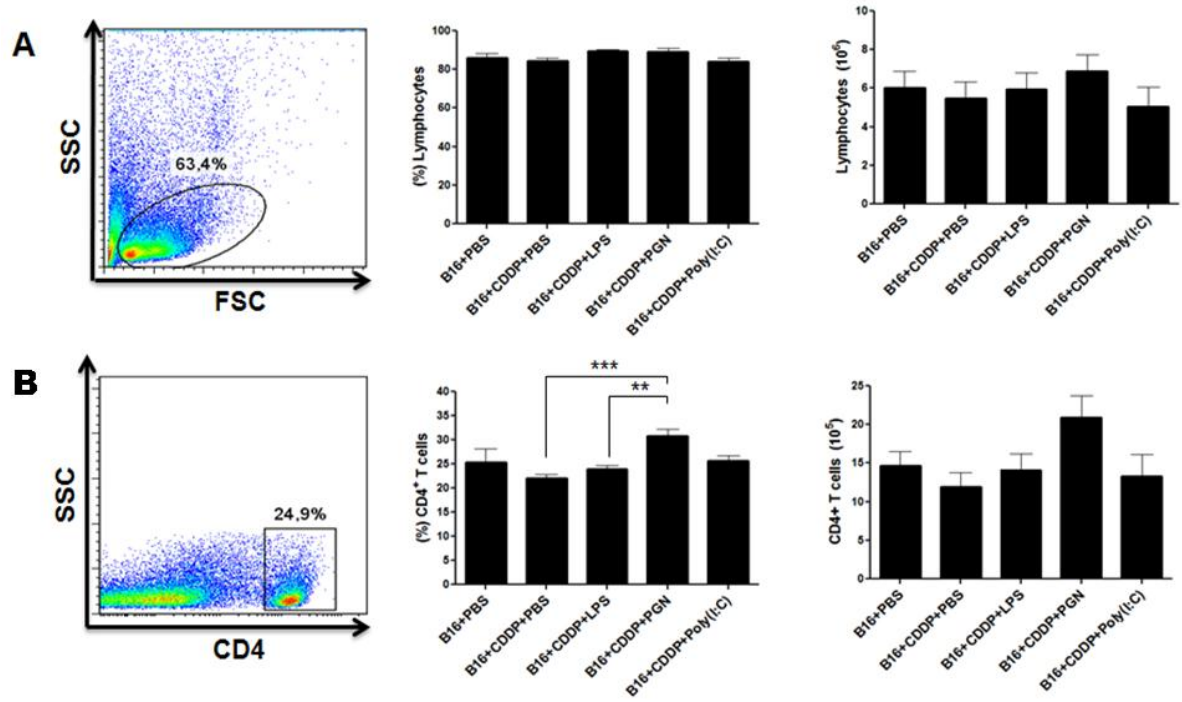


Figure 5

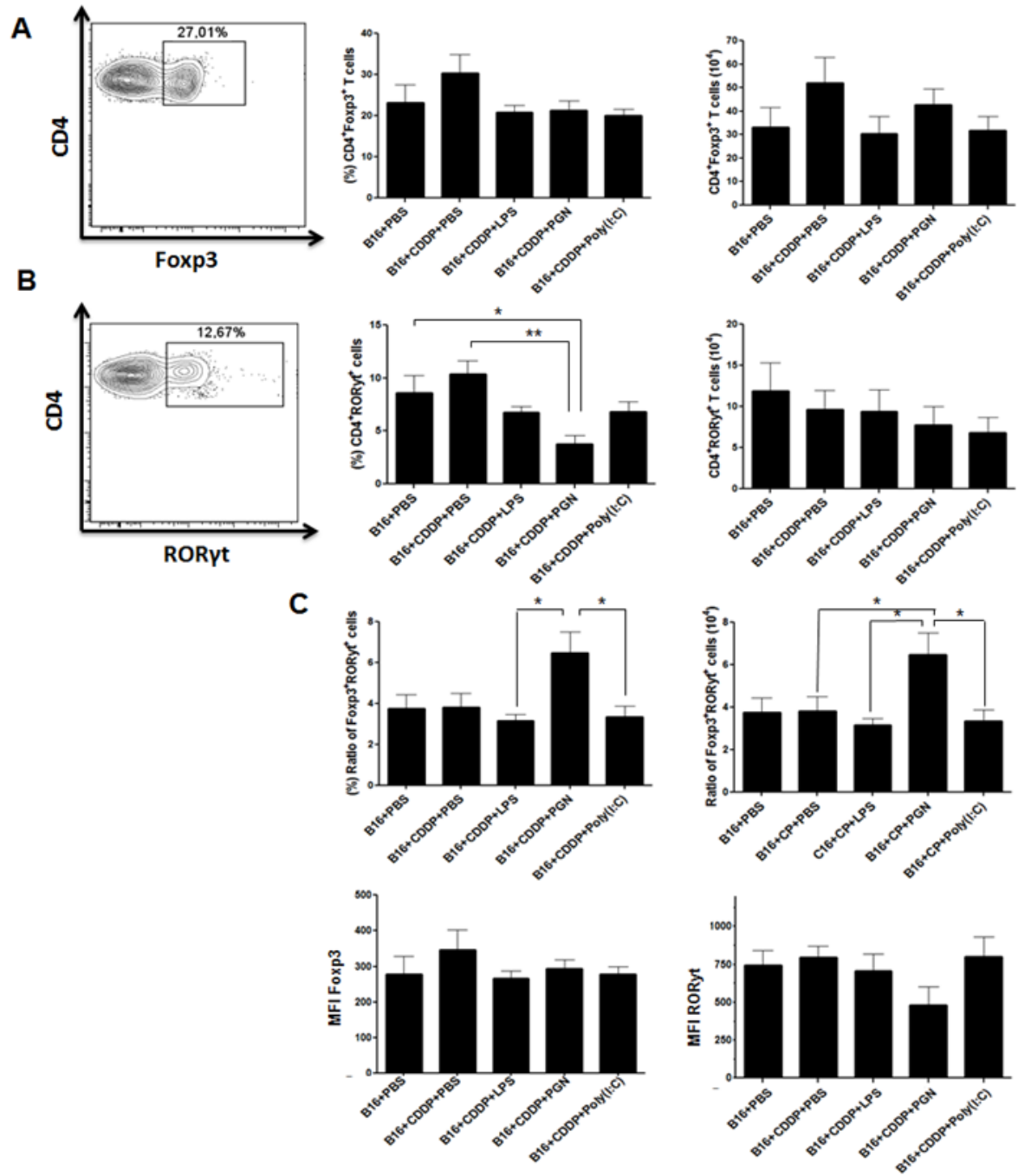
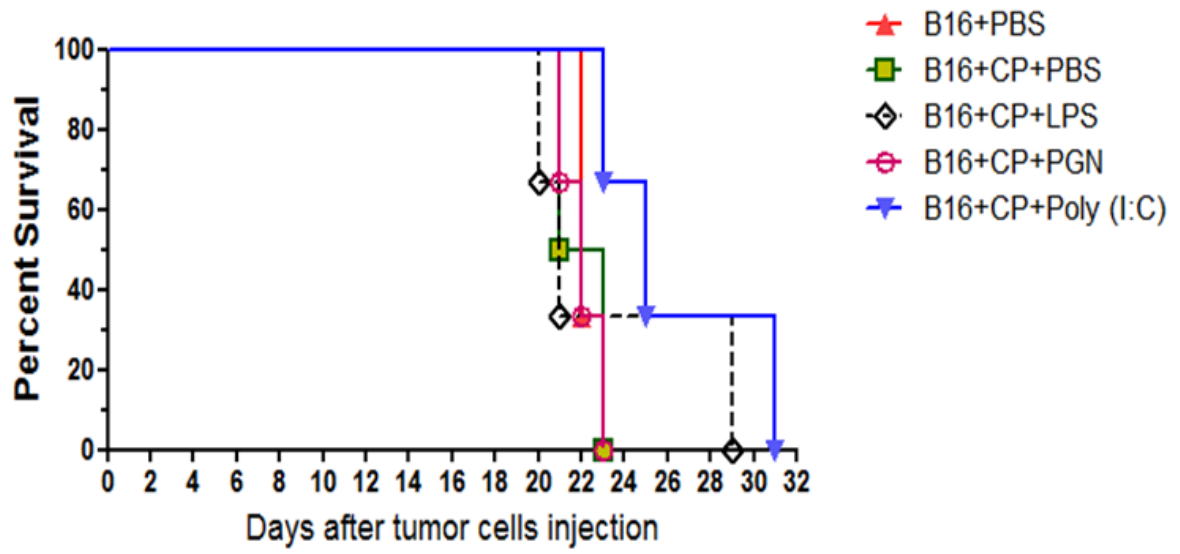


Figure 6



CAPÍTULO 3

Discussão geral e considerações finais

Diversos estudos demonstraram que a resposta mediada por células T CD4⁺ é essencial para auxiliar na formação da resposta imune antitumoral (Dranoff, G. et al., 1993, Levitsky, H. I. et al., 1994). Nesse estudo, nós analisamos o perfil de células Treg e Th17 no linfonodo drenante de animais com melanoma murino ao longo da progressão tumoral e se essas células poderiam ser moduladas pela ação combinada de terapias.

Em nosso estudo, inicialmente determinamos o comportamento das células Treg e Th17 ao logo do crescimento tumoral e observamos um aumento do número dessas células, sugerindo provavelmente a ativação da resposta imune no linfonodo drenante tumoral (TDLN). Entretanto, juntamente com este aumento de células houve um crescimento da massa tumoral.

Considerando que o infiltrado de células Treg e Th17 pode estar relacionado com crescimento tumoral, nós questionamos como ocorre a modulação dessas células no TDLN. Os resultados indicam que existe um progressivo aumento na porcentagem de células Treg e Th17, assim como em número absoluto e observamos um aumento súbito dessas células no dia 15 de crescimento tumoral. Além disso, o decréscimo na taxa de células Treg/Th17 indica uma predominância de células Treg no início do crescimento tumoral enquanto as células Th17 aumentam conforme a progressão tumoral. Desse modo, esses resultados sugerem que essas células progressivamente vão estabelecendo um ambiente imunossupressor e inflamatório crônico, o que pode estar impedindo a atividade da resposta imune efetora antitumoral mediada por outras células.

A monoquimioterapia com cisplatina apresenta benefícios limitados para o tratamento de melanoma em estágio avançado. Já foi demonstrado em modelo de câncer de pulmão que o tratamento crônico com cisplatina pode corroborar com a progressão tumoral (Oliver, T. G. et al., 2010). Todavia, vários estudos propõem a ação combinada de terapias como tratamento antitumoral. Assim, o uso de quimioterapias combinada com adjuvantes ou neoadjuvantes se torna uma potente alternativa antitumoral. Investigamos então, se a ação combinada de cisplatina com agonistas de TLRs poderia influenciar no crescimento tumoral assim como modular o perfil de células Treg e Th17.

Interessantemente observamos que a monoterapia com cisplatina favoreceu o crescimento tumoral. Esses resultados sugerem que o uso da cisplatina de forma

monoterápica em melanoma pode induzir um efeito pró-tumoral facilitando a progressão tumoral. O tratamento apenas com cisplatina induziu um aumento na porcentagem de células Treg e Th17, porém não foi significativo ao comparar com o grupo controle. A combinação de cisplatina com agonistas de TLRs retardou consideravelmente a progressão tumoral comparando com a monoterapia de cisplatina. Os exatos mecanismos responsáveis pelo aumento de Treg quando o tumor é tratado apenas com cisplatina ainda são desconhecidos. Contudo, tem sido proposto que quimioterapias possam induzir um estado inflamatório crônico o qual poderia favorecer o recrutamento de células Treg e Th17 e promover o crescimento tumoral (Lin, W. et al., 2007). Além disso, Schuler e colaboradores demonstram que as células Treg são mais resistentes a ação de cisplatina do que outras células T CD4⁺ facilitado o aumento de um microambiente imunossupressor no sítio tumoral (Schuler, P. J. et al., 2013). Nosso estudo demonstrou que a combinação de cisplatina com PGN aumenta consideravelmente a porcentagem de células T CD4⁺, mas demonstrou-se incapaz de conter o aumento de células Treg. A combinação de cisplatina com PGN diminuiu significativamente a porcentagem de células Th17 sugerindo uma dominância de células Treg sobre essas células. Acreditamos que o aumento de células TCD4⁺ no TDLN observado ao combinarmos cisplatina e PGN, pode ser devido ao aumento de outras células efetoras antitumorais. A estimulação de TLR2 já demonstrou ser importante para a ativação de células Th1, induzindo a produção de IFN- γ (Imanishi, T. et al., 2007) bem como aumentando a citotoxicidade de linfócitos T CD8⁺ (Cottalorda, A. et al., 2006).

A ativação de TLR3 em melanoma pode induzir a morte e impedir a proliferação dessas células (Salaun B. et al., 2007). Recentemente foi demonstrado que o uso de terapia adotiva de células combinado com agonistas de TLR3 e TLR9 aumenta a produção de IFN- γ e auxilia na redução de melanoma murino (Amos, S. M. et al., 2011). No presente estudo, demonstramos que a injeção intratumoral de Poly(I:C) combinada com cisplatina induz um considerável retardo do crescimento tumoral e prolonga a sobrevida dos animais. Além disso, demonstramos que a combinação dessas terapias, mantém os níveis de Treg e Th17 moderados ao compararmos com a monoterapia com cisplatina. Um estudo demonstrou que a citotoxicidade em camundongos é dose dependente do aumento de LPS quando combinado com cisplatina (Rademaker-Lakhai, J. M. et al., 2006). Nosso grupo recentemente demonstrou que o uso intratumoral de LPS, agonista de TLR4, em melanoma murino pode prejudicar o crescimento tumoral (Maito, F. L. D. M. et al., 2012). Neste estudo demonstramos que a combinação de cisplatina com LPS pode prolongar a sobrevida dos animais e também manter níveis moderados de Treg e Th17. Portanto, demonstramos

que a combinação de cisplatina com agonistas de TLRs é capaz de diminuir os efeitos pró-tumorais que a monoterapia com cisplatina induziu em melanoma murino.

Para compreendermos melhor o real impacto da combinação de cisplatina com agonistas de TLR, pretendemos futuramente tratar os tumores apenas com os agonistas de TLRs para verificar se o efeito observado foi pertinente a associação, ou pode ser um efeito somente do agonista de TLR. Além disso, pretendemos explorar se a modulação nos subtipos de células TCD4⁺ do TDLN aqui relatados, também se ocorre no infiltrado tumoral.

O presente estudo também fornece suporte para estudos em andamento no nosso grupo. Atualmente, estamos estabelecendo a metodologia do uso de tetrâmeros MHC classe II em nosso laboratório a qual permite a detecção direta de células T CD4⁺ antígeno-específicas por citometria de fluxo. Essa técnica baseia-se na interação altamente específica entre o peptídeo complexado ao MHC e o receptor de célula T correspondente e será futuramente a mais utilizada para avaliação de eficácias de imunização, substituindo a análise de produção de anticorpos que é realizada hoje. Dessa forma o presente estudo também fornece suporte para avaliarmos através de tetrâmeros o papel da especificidade nos subtipos de células T CD4⁺ do TDLN e se a frequência dessas células pode ser modulada com o uso de agonistas de TLRs.

Desse modo, o entendimento da modulação dos subtipos de células T CD4⁺ é essencial para a melhor compreensão de como os tumores conseguem escapar da imunovigilância e continuar progredindo. Observamos que a combinação de cisplatina com agonistas de TLRs pode induzir uma resposta imune capaz de dificultar a progressão tumoral e prolongar ainda que brevemente, a sobrevida dos animais.

REFERÊNCIAS

- Abbas AK, Benoist C, Bluestone JA, Campbell DJ. Regulatory T cells: recommendations to simplify the Nomenclature. *Nat Immunol* 2013; **14**: 307-308.
- Abbosh PH, Montgomery JS, Starkey JA, Novotny M, Zuhowski EG, Egorin MJ et al. Dominant-negative histone H3 lysine 27 mutant derepresses silenced tumor suppressor genes and reverses the drug-resistant phenotype in cancer cells. *Cancer Res* 2006; **66**: 5582-5591.
- Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY et al. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2002; **3**: 549-557.
- Akita K, Okuno M, Enya M, Imai S, Moriwaki H, Kawada N et al. Impaired liver regeneration in mice by lipopolysaccharide via TNF-alpha/kallikrein-mediated activation of latent TGF-beta. *Gastroenterol* 2002; **123**: 352-364.
- Akkiprik M, Ataizi-Çelikel C, Düşünceli F, Sönmez O, Güllüoğlu, BM et al. Clinical Significance of p53, K-ras and DCC Gene Alterations in the Stage I-II Colorectal Cancers. *J Gastrointest Liver Dis* 2007; **16**: 11-17.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; **413**: 732-738.
- Amos SM, Pegram HJ, Westwood JA, John LB, Devaud C, Clarke CJ. Adoptive immunotherapy combined with intratumoral TLR agonist delivery eradicates established melanoma in mice. *Cancer Immunol Immunother.* 2011; **60**: 671-683.
- Anderson, CF Mosser, DM. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage *J Leukoc Biol* 2002; **72**: 101-106.
- Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S et al. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med* 1995; **182**: 155-162.
- Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarlı A, Finkelstein SE, Speiss PJ, Surman DR, et al. CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4(+) T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* 2005; **174**: 2591-601.
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007; **13**: 1050-1059.
- Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin* 2003; **23**: 460-464.
- Arinaga S, Akiyoshi T, Tsuji H. Augmentation of the generation of cell-mediated cytotoxicity after a single dose of adriamycin in cancer patients. *Cancer Res* 1986; **46**: 4213-4216.

- Aruga A, Aruga E, Tanigawa K, Bishop DK, Sondak VK, Chang AE. Type 1 versus type 2 cytokine release by Vbeta T cell subpopulations determines in vivo antitumor reactivity: IL-10 mediates a suppressive role. *J Immunol* 1997;**159**: 664–673
- Ascierto PA, Marincola FM, Ribas A. Anti-CTLA4 monoclonal antibodies: the past and the future in clinical application. *J Transl Med* 2011; **9**: 1-5.
- Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol* 1999; **17**: 2106-2015.
- Balkwill F, Charles K A, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 2005; **7**: 211-217.
- Bean GR, Ganesan YT, Dong Y, Takeda S, Liu H, Chan PM et al. PUMA and BIM are required for oncogene inactivation-induced apoptosis. *Sci Signal* 2013; **6**: 1-13.
- Beatty GL, Paterson Y. IFN- γ -Dependent Inhibition of Tumor Angiogenesis by Tumor-Infiltrating CD4⁺ T Cells Requires Tumor Responsiveness to IFN- γ . *J Immunol* 2001; **166**: 2276-2282.
- Bedikian AY, Millward M, Pehamberger H, Conry R, Gore M, Trefzer U et al. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 4738-4745.
- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 401-410.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; **441**: 235-238.
- Beyer M, Kochanek M, Darabi K, Popov A, Jensen M, Endl E et al. Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood* 2005; **106**: 2018-2025.
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; **17**: 189-220.
- Bottino C, Moretta L, Pende D, Vitale M, Moretta, A. Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from natural killer cells. *Mol Immunol* 2004; **41**: 569-575.
- Bowles JA, Wang SY, Link BK, Allan B, Beuerlein G, Campbell MA, et al. Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab. *Blood* 2006; **108**: 2648-2654.
- Brenner MK, Heslop HE. Adoptive T cell therapy of cancer. *Curr Opin Immunol* 2010; **22**: 251-257.
- Bronte V. Th17 and cancer: friends or foes? *Blood* 2008; **112**: 214.

- Brozovic A, Simaga S, Osmak M. Induction of heat shock protein 70 in drug-resistant cells by anticancer drugs and hyperthermia. *Neoplasma* 2001; **48**: 99-103.
- Burnet FM. Cancer-a biological approach. *Brit Med J* 1957; **1**: 841-847.
- Cameron DA, Gabra H, Leonard RC. Continuous 5-fluorouracil in the treatment of breast cancer. *Br J Cancer* 1994; **70**: 120-124.
- Capdevila J, Elez E, Peralta S, Macarulla T, Ramos FJ, Tabernero J. Oxaliplatin-based chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; **8**: 1223-1236.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel R L, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; **72**: 3666-3670.
- Cartellieri M, Bachmann M, Feldmann A, Bippes C, Stamova S, Wehner R et al. Chimeric Antigen Receptor-Engineered T Cells for Immunotherapy of Cancer. *J Biomed Biotechnol* 2010; **2010**: 1-13
- Chabner BA, Roberts TG. Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* 2005; **5**: 65-72.
- Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Chen CC. *Helicobacter pylori* induced invasion and angiogenesis of gastric cells is mediated by cyclooxygenase-2 induction through TLR2/TLR9 and promoter regulation. *J Immunol* 2005; **175**: 8242-8252.
- Cheever MA. Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers. *Immunol Rev* 2008; **222**: 357-368.
- Chen X, Wan J, Liu J, Xie W, Diao X, Xu J. Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. *Lung Cancer* 2010; **69**: 348-354.
- Collison LW, Chaturvedi V, Henderson AL, Giacomini PR, Guy C, Bankoti J, et al. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat. Immunol.* 2010; **11**: 1093-1101.
- Costello RT, Fauriat C, Sivori S, Marcenaro E, Olive D. NK cells: innate immunity against hematological malignancies?" *Trends Immunol* 2004; **25**: 328-333.
- Cottalorda A, Vershelde C, Marcais A, Tomkowiak M, Musette P, Uematsu S. TLR2 engagement on CD8 T cells lowers the threshold for optimal antigen-induced T cell activation. *Eur J Immunol* 2006; **36**: 1684-1693.
- Couzin-Frankel J. Cancer Immunotherapy. *Science* 2013; **342**: 1432-1433.
- Crawford S. Is it time for a new paradigm for systemic cancer treatment? Lessons from a century of cancer chemotherapy. *Front Pharmacol* 2013; **4**: 1-18.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; **10**: 942-949.

- de Bruin EC, Medema JP. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treatment Rev* 2008; **34**: 737-749
- deLeeuw RJ, Kost SE, Kakal JA, Nelson BH. The prognostic value of Foxp3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of literature. *Clin. Cancer Res* 2012; **18**: 3022-3029.
- Di Giacomo AM, Biagioli M, Maio M. The emerging toxicity profiles of anti-CTLA-4 antibodies across clinical indications. *Semin Oncol* 2010; **37**: 499-507.
- Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; **90**: 3539-3543.
- Dobrzanski MJ. Expanding roles for CD4 T cells and their subpopulation in tumor immunity and therapy. *Frontiers in Oncology* 2013; **13**: 1-19.
- Donia M, Hansen M, Sendrup SL, Iversen TZ, Ellebaek E, Andersen MH. Methods to improve adoptive T-cell therapy for melanoma: IFN-gamma enhances anticancer responses of cell products for infusion. *J Invest Dermatol* 2012; **133**: 545-552.
- Dranke CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol* 2006; **90**: 51-81.
- Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 2346-2357.
- Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U, et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 5233-5239.
- Dumont P, Berton A, Nagy N, Sandras F, Tinton S, Demetter P et al. Expression of galectin-3 in the tumor immune response in colon cancer. *Lab Investigation*; **88**: 896-906.
- Dunn G, Bruce AT, Ikeda, H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; **3**: 991-998.
- El Andaloussi A, Sonabend AM, Han Y, Lesniak MS. Stimulation of TLR9 with CpG ODN enhances apoptosis of glioma and prolongs the survival of mice with experimental brain tumors. *Glia* 2006; **54**: 526-535.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; **61**: 759-767.
- Feijoo E, Alfaro C, Mazzolini G, Serra P, Penuelas I, Arina A. Dendritic cells delivered inside human carcinomas are sequestered by interleukin-8. *Int J Cancer* 2005; **116**: 275-281.
- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**: 453-458.

- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*2003; **4**: 330-336.
- Forte G, Rega A, Morello S, Luciano A, Arra C, Pinto A, Sorrentino R. Polyinosinic-polycytidylic acid limits tumor outgrowth in a mouse model of metastatic lung cancer. *J Immunol* 2012; **188**: 5357-5364.
- Friedman KM, Prieto PA, Devillier LE, Gross CA, Yang JC, Wunderlich JR et al. Tumorspecific CD4+ melanoma tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunother* 2012; **35**: 400-408.
- Gabrilovich DI, Ishida T, Nadaf S, Ohm JE, Carbone DP.. Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 2963-2970.
- Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*2013; **14**: 1014-1022.
- Gallego A, Vargas JA, Castejón R, Citores MJ, Romero Y, Millán I et al. Production of intracellular IL-2, TNF-alpha, and IFN-gamma by T cells in B-CLL. *Cytometry B Clin Cytom* 2003; **56**: 23-29
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; **313**:1960-1964.
- Garay RP, Viens P, Bauer J, Normier G, Bardou M, Jeannin JF. Cancer relapse under chemotherapy: why TLR2/4 receptor agonists can help. *Eur J Pharmacol* 2007; **563**: 1-17
- Geng D, Zheng L, Srivastava R, Riker AI, Velasco-Gonzales C, Markovic SN et al. Amplifying TLR-MyD88 signals within tumor-specific T-cells enhances antitumor activity to suboptimal levels of weakly-immunogenic tumor-antigens. *Cancer Res* 2010; **70**: 7442-7454.
- Giraud E, Inoue M, Hanahan D. An amino-bisphosphonate targets MMP-9-expressing macrophages and angiogenesis to impair cervical carcinogenesis. *J Clin Invest* 2004; **114**: 623-633.
- Glimelius B, Hoffman K, Sjöden PO, Jacobsson G, Sellström H, Enander LK. Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer. *Ann Oncol* 1996; **7**: 593-600.
- Gnerlich JL, Mitchem JB, Weir JS, Sankpal NV, Kashiwagi H, Belt BA et al.. Induction of Th17 cells in the tumor microenvironment improves survival in a murine model of pancreatic cancer. *J Immunol* 2010; **185**: 4063-4071.
- Gobé G, Rubin M, Williams G, Sawczuk I, Buttyan R. Apoptosis and expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in renal cell carcinomas. *Cancer Invest*2002; **20**: 324-332.
- Gutterman JU, Blumenschein GR, Alexanian R, Yap HY, Buzdar AU, Cabanillas F. Leukocyte interferon-induced tumor regression in human metastatic breast cancer, multiple myeloma, and malignant lymphoma. *Ann Intern Med* 1980, **93**: 399-406.

- Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Bayoumy S, Garzotto M, McLoughlin M, Gallily R, et al. Lipopolysaccharide induces disseminated endothelial apoptosis requiring ceramide generation. *J Exp Med* 1997; **186**: 1831-1841
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell Review* 2011; **144**: 646-674.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; **100**: 57-70.
- Harrington, LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2000; **56**: 1123-1132.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; **410**: 1099-1103.
- He S, Fei M, Wu Y, Zheng D, Wan D, Wang L et al. Distribution and Clinical Significance of Th17 Cells in the Tumor Microenvironment and Peripheral Blood of Pancreatic Cancer Patients. *Int J Mol Sci* 2011; **12**: 7424-7437.
- Heckel MC, Wolfson A, Slachta CA, Schwarting R, Salgame, P, Katsetos CD, et al. Human breast tumor cells express IL-10 and IL-12p40 transcripts and proteins, but do not produce IL-12p70. *Cell Immunol* 2011; **266**: 143-153.
- Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88- dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002; **3**: 196-200.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; **408**: 740-745.
- Hoff, GP M, Katz, Chammas R, Filho OV, Novis SY. Tratado de oncologia. 1 edn. Atheneu, 2013.
- Huang X, Lee C. Regulation of stromal proliferation, growth arrest, differentiation and apoptosis in benign prostatic hyperplasia by TGF- β . *Front Biosci* 2003; **8**: 740-749.
- Huang C, Fu ZX. Localization of IL-17⁺Foxp3⁺ T cells in esophageal cancer. *Immunol Invest* 2011; **40**: 400-412.
- Imanishi T, Hara H, Suzuki S, Suzuki N, Akira S, Saito T. Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J Immunol* 2007; **178**: 6715-6719.
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 2006; **126**: 1121-1133.
- Iwaki D, Mitsuazawa H, Murakami S. The extracellular toll-like receptor 2 domain directly binds peptidoglycan derived from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* 2002; **277**: 24315-24320.

Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M. Conventional T-bet⁺Foxp3⁻ Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med* 2007; **204**: 274-283.

Janner RG, Townsend M J, Jackson I, Sun K, Bouwman RD, Young R A et al. The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of T-cell differentiation through a shared set of target genes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2009; **106**: 17876-17881.

Jenkins MK, Burrell E, Ashwell JD. Antigen presentation by resting B cells. Effectiveness at inducing T cell proliferation is determined by costimulatory signals, not T cell receptor occupancy. *J Immunol* 1990; **144**: 1585-1590.

Jeon, S. H., Chae, B. C., Kim, H. A. Seo, G. Y. Seo, D. W Chun, G. T et al. Mechanisms underlying TGF-1-induced expression of VEGF and Flk-1 in mouse macrophages and their implications for angiogenesis. *J Leukocyte Biol* 2007;**81**: 557-566.

Jett JR, Maksymiuk AW, Su JQ, Mailliard JA, Krook JE, Tschetter LK. Phase III trial of recombinant interferon gamma in complete responders with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1994; **12**: 2321-2326.

Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; **128**: 683-692.

Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN- γ and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells. *J. Immunol* 1999; **162**: 3231-3236.

Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Gripp, SA, Bagg A, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 2011; **3**: 1-11.

Kasakura S. A role for T-helper type 1 and type 2 cytokines in the pathogenesis of various human diseases. *Rinsho Byori* 1998; **46**: 915-921.

Kaufmann R. Surgical management of primary melanoma. *Clin Exp Dermatol* 2000; **25**: 476-481.

Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 2011; **27**: 637-650.

Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**: 573-584.

Kim R, Emi M, Tanabe T. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007; **12**: 1-14.

Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol* 1996; **14**: 7-17.

- Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; **62**: 309-335
- Kluwe J, Mencin A, Schwabe RF. Toll-like receptors, wound healing, and carcinogenesis. *J Mol Med* 2009; **87**: 125-138.
- Koberle B, Grimaldi KA, Sunters A, Hartley JA, Kelland LR, Masters JR. DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. *Int J Cancer* 1997; **70**: 551-555.
- Kohno T, Sato T, Takakura S, Takei K, Inoue K, Nishioka M et al. Mutation and expression of the DCC gene in human lung cancer. *Neoplasia* 2000; **2**: 300-305.
- Korman AJ, Peggs KS, Allison JP. Checkpoint blockade in cancer immunotherapy. *Adv Immunol* 2006; **90**: 297-339.
- Kryczek I, Wei S, Szeliga W, Vatan L, Zou W. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* 2009a; **114**: 357-359.
- Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwaijri S, Szeliga W, Kolls J et al. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J Immunol* 2007; **178**: 6730-6733.
- Kryczek I, Wu K, Zhao E, Wei S, Vatan L, Szeliga W et al. IL-17+ regulatory T cells in the microenvironments of chronic inflammation and cancer. *J Immunol* 2011; **186**: 4388-4395.
- Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 2009b; **114**: 1141-1149.
- Ladanyi A, Kiss J, Somlai B, Gilde K, Fejos, Z, Mohos A et al. Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol Immunother* 2007; **56**: 1459-1469.
- Lai YP, Jeng C, Chen S. The role of CD4+ T cells and tumor immunity. *ISRN Immunology* 2011; **2011**: 1-6.
- Ledford H. Melanoma drug wins US approval. *Nature* 2011; **471**: 561.
- Leen AM, Rooney CM, Foster AE. Improving T cell therapy for cancer, " *Ann Rev Immunol* 2007; **25**: 243-265.
- Levitsky HI, Lazenby A, Hayashi RJ, Pardoll DM. In vivo priming of two distinct anti-tumor effector populations: the role of MHC class I expression. *J Exp Med* 1994; **179**: 1215-1224.
- Lin W, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007; **117**: 1175-1183.

- Liu J, Duan Y, Cheng X, Chen X, Xie W, Long H et al. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; **407**: 348-354.
- Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4 CD25 T cells into CD4 CD25 T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J. Immunol* 2007;**178**: 2883-2892.
- Liu Y, Zeng G. Cancer and Innate Immune System Interactions: Translational Potentials for Cancer Immunotherapy. *J Immunother* 2012; **35**: 299-308.
- Lohr J, Knoechel B, Abbas AK. Regulatory T cells in the periphery. *Immunol Rev* 2006; **212**: 149-162.
- Luke JJ, Schwartz GK. Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma. *Clin Dermatol* 2013; **31**: 290-297.
- Lv L, Pan K, Li XD, She KL, Zhao JJ, Wang W et al. The accumulation and prognosis value of tumor infiltrating IL-17 producing cells in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2011; **6**: 1-7.
- Maito, FLDM, de Souza APD, Pereira P, Smithey M, Hinrichs D, Bouwer A et al. Intratumoral TLR-4 agonist injection is critical for modulation of tumor microenvironment and tumor rejection. *ISRN Immunology* 2012; **2012**: 1-11.
- Marie B, Benot D, Jean-Louis M. Macrophage polarization in bacterial. *J Immunol* 2008; **181**: 3733-3739.
- Martin F, Apetoh L, Ghiringhelli F. Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF- β -dependent immunosuppressive activity? *Trends Mol Med* 2012; **18**: 742-749.
- Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, Yang XO, Yamazaki T, Lu S et al. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* 2009; **31**: 787-798.
- Maruyama T, Kono K, Mizukami Y, Kawaguchi Y, Mimura K, Watanabe M et al. Distribution of Th17 cells and FoxP3(+) regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer. *Cancer Sci* 2010; **101**: 1947-1954.
- Marzo A, Kinnear BF, Lake RA, Frelinger JJ, Collins EJ, Robinson BWS, et al. Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol* 2000; **165**: 6047-6055.
- Mason D, Powrie F. Control of immune pathology by regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 1998; **10**: 649-655.
- Matsuda M, Salazar F, Petersson M, Masucci G, Hansson J, Pisa P et al., Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allospecific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *J Exp Medicine* 1994; **180**: 2371-2376.
- Matsukura S, Kokubu F, Kurokawa M, Kawaguchi M, Ieki K, Kuga H et al. Synthetic double-stranded RNA induces multiple genes related to inflammation through Toll-like

- receptor 3 depending on NF-kappaB and/or IRF-3 in airway epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 2006; **36**: 1049-1062.
- Mattes J, Hulett M, Xie W, Hogan, S, Rothenberg ME, Foster P, et al. Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells and eosinophils and STAT6-dependent process. *J Exp Med* 2003; **197**: 387-393.
- Mazumder A, Rosenberg SA. Successful immunotherapy of natural killer-resistant established pulmonary melanoma metastases by the intravenous adoptive transfer of syngeneic lymphocytes activated in vitro by interleukin 2. *J Exp Med* 1984; **159**: 495-507.
- McCarter MD, Baumgartner J, Escobar GA, Richter D, Lewis K, Robinson W et al. Immunosuppressive dendritic and regulatory T cells are upregulated in melanoma patients. *Ann Surg Oncol* 2007; **14**: 2854-2860.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; **388**: 394-397.
- Mocikat R, Braumüller H, Gummy A, Egeter O, Ziegler H, Reusch U. Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 2003; **19**: 561-569.
- Moeller M, Haynes NM, Kershaw MH, Jackson JT, Teng MWL, Street SE, et al. Adoptive transfer of gene-engineered CD4+ helper T cells induces potent primary and secondary tumor rejection. *Blood* 2005; **106**: 2995-3003.
- Mosmann, TR, Cherwinski, H, Bond, MW, Giedlin, MA, Coffman, RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; **136**: 2348-2357.
- Mukhtar RA, Nseyo O, Campbell M J, Esserman LJ. Tumor-associated macrophages in breast cancer as potential biomarkers for new treatments and diagnostics. *Exp Rev Mol Diag* 2011; **11**: 91-100.
- Munn DH. Th17 cells in ovarian cancer. *Blood* 2009; **114**: 1134-1135.
- Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* 2008; **112**: 362-73.
- Murphy KM, Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol* 2010; **11**: 674-680.
- Nelson DJ, Mukherjee S, Bundell C, Fisher S, van Hagen D, Robinson B. Tumor progression despite efficient tumor antigen cross-presentation and effective "arming" of tumor antigen-specific CTL. *J Immunol* 2001; **166**: 5557-5566.
- Nishikawa H, Kato T, Tawara I, Saito K, Ikeda H, Kuribayashi IK et al. Definition of target antigens for naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J Exp Med* 2005; **201**: 681-686.

- Nogueras S, Merino A, Ojeda R, Carracedo J, Rodriguez M, Martin-Malo A, et al. Coupling of endothelial injury and repair: An analysis using an in vivo experimental model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; **294**: 708-713.
- Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 2003; **10**: 2620-2627.
- O'Connell MJ. A phase III trial of 5-fluorouracil and leucovorin in the treatment of advanced colorectal cancer. A Mayo Clinic/North Central Cancer Treatment Group study. *Cancer* 1989; **63**: 1026-1030.
- Okamoto M, Furuichi S, Nishioka Y, Oshikawa T, Tano T, Ahmed SU, et al. Expression of toll-like receptor 4 on dendritic cells is significant for anticancer effect of dendritic cell-based immunotherapy in combination with an active component of OK-432, a streptococcal preparation. *Cancer Res* 2000; **64**: 5461-5470.
- Oliver TG, Mercer KL, Sayles LC, Burke JR, Mendus D, Lovejoy KS. Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer. *Genes Dev* 2010; **24**: 837-852.
- Olson BM, McNeel DG. Monitoring regulatory immune responses in tumor immunotherapy clinical trials. *Frontiers in Oncology* 2013; **3**:1-11.
- Ong SM, Tan YC, Beretta O, Jiang D, Yeap WH, Tai JJ, Wong WC et al. Macrophages in human colorectal cancer are pro-inflammatory and prime T cells towards an anti-tumour type-1 inflammatory response. *Eur J Immunol* 2012; **42**: 89-100.
- O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2010; **327**: 1098-102.
- Pardoll D, Allison J. Cancer immunotherapy: breaking the barriers to harvest the crop. *Nat Med* 2004; **9**: 887-892.
- Park JR, DiGiusto DL, Slovak M, Wright C, Naranjo A, Wagner J, et al. Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Mol Ther* 2007; **15**: 825-833.
- Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ, Allison JP. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti CTLA-4 antibodies. *J Exp Med* 2009; **206**: 1717-1725.
- Perez DG, Suman VJ, Fitch TR, Amatruda T, Morton RF, Jilani SZ, et al. Phase 2 trial of carboplatin, weekly paclitaxel, and biweekly bevacizumab in patients with unresectable stage IV melanoma: a North Central Cancer Treatment Group study, N047A. *Cancer* 2009; **115**: 119-127.
- Pettersson A, Nagy JA, Brown LF, Sundberg C, Morgan E, Jungles S et al. Heterogeneity of the angiogenic response induced in different normal adult tissues by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Lab Investigation*. 2000; **80**: 99-115.
- Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol* 2004; **14**: 433-439.

- Pidgeon GP, Harmey JH, Kay E, Da Costa M, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ. The role of endotoxin/lipopolysaccharide in surgically induced tumour growth in a murine model of metastatic disease. *Br J Cancer* 1999; **81**: 1311-1317.
- Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004; **431**: 461-466.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; **282**: 2085-2088.
- Préfontaine M, Donovan JT, Powell JL, Buley L. Treatment of refractory ovarian cancer with 5-fluorouracil and leucovorin. *Gynecol Oncol* 1996; **61**: 249-252.
- Quezada SA, Peggs KS, Simpson TR, Allison JP. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunol Rev* 2011; **24**: 104-118.
- Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X et al. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med* 2010; **207**: 637-650.
- Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunossuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**: 267-296.
- Rademaker-Lakhai JM, Crul M, Zuur L, Baas P, Beijnen JH, Simis YJ et al. Relationship between cisplatin administration and the development of ototoxicity. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 918-924.
- Rashmi R, Kumar S, Karunagaran, D. Human colon cancer cells lacking Bax resist curcumin-induced apoptosis and Bax requirement is dispensable with ectopic expression of Smac or downregulation of Bcl-XL. *Carcinogenesis* 2005; **26**: 713-723.
- Reed E. Cisplatin carboplatin and oxaliplatin, in cancer chemotherapy and biotherapy – principles and practice. 5 th Philadelphia: Lippincott Williams & Williams, 2006.
- Rey J, Veuillen C, Vey N, Bouabdallah R, Olive, D. Natural killer and $\gamma\delta$ T cells in haematological malignancies: enhancing the immune effectors. *Trends Mol Med* 2009; **15**: 275-284.
- Robinson RA, DeVita VT, Levy HB, Baron S, Hubbard SP, Levine AS. A phase I-II trial of multiple-dose polyriboinosic-polyribocytidylic acid in patients with leukemia or solid tumors. *J Nat Cancer Inst* 1976; **57**: 599-602.
- Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 1965; **13**: 698-699.
- Rosenberg SA, MuléJJ, Spiess PJ, Reichert CM, Schwarz SL. Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the systemic administration of high-dose recombinant interleukin 2. *J Exp Med* 1985; **161**: 1169-1188.
- Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME,. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2008, **8**: 299-308

- Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ et al. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2011; **17**: 4550-4557.
- Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001; **411**: 380-384.
- Sakaguchi S. Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases. *Curr Opin Immunol* 2000; **12**: 684-690.
- Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; **22**: 531-562.
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; **133**: 775-787.
- Salaun B, Coste I, Risoan MC, Lebecque SJ, Renno T. TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. *J Immunol* 2006; **176**: 4894-4901.
- Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Bellone S, Pecorelli S, Roman JJ. Interleukin-10 increases Th1 cytokine production and cytotoxic potential in human papillomavirus-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 2000; **74**: 4729-4737.
- Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 2003; **98**: 1089-1099.
- Schuler PJ, Harasymczuk M, Schilling B, Saze Z, Strauss L, Lang S et al. Effects of adjuvant chemoradiotherapy on the frequency and function of regulatory T cells in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2013; **19**: 6585-6596.
- Schwartz RH. T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 1985; **3**: 237-261.
- Seliger B. Different regulation of MHC Class I antigen processing components in human tumors. *J Immunotoxicol* 2008; **5**: 361-367.
- Sfanos KS, Bruno TC, Maris CH, Xu L, Thoburn CJ, DeMarzo AM et al. Phenotypic analysis of prostate infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin Cancer Res* 2008; **14**: 3254-3261
- Shah GD, Socci ND, Gold JS, Wolchok JD, Carvajal RD, Panageas KS, et al. Phase II trial of neoadjuvant temozolomide in resectable melanoma patients. *Ann Oncol* 2010; **21**: 1718-1722.
- Sharma S, Yang SC, Zhu L, Reckamp K, Gardner B, Baratelli F et al. Tumor cyclooxygenase-2/prostaglandin E2-dependent promotion of FOXP3 expression and CD4+CD25+ T regulatory cell activities in lung cancer. *Cancer Res* 2005; **65**: 5211-5220.
- Shcheblyakov DV, Logunov DY, Gintsburg AL. Toll-Like Receptors (TLRs): The Role in Tumor Progression. *Acta Naturae* 2010; **2**: 21-29.

- Shen LS, Wang J, Shen DF, Yuan XL, Dong P, Li MX et al. CD4⁺CD25⁺ CD127(low/-) regulatory T cells express Foxp3 and suppress effector T cell proliferation and contribute to gastric cancers progression. *Clin Immunol* 2009; **131**: 109-118.
- Shevach EM. Mechanisms of Foxp3⁺ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009; **30**: 636-645.
- Sica A, Saccani A, Bottazzi B, Polentarutti N, Vecchi A, van Damme J et al. Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF- κ B activation in tumor-associated macrophages. *J Immunol* 2000; **164**: 762-767.
- Simonetti O, Goteri G, Lucarini G, Rubini C, Stramazzotti D, Lo Muzio L et al.. In melanoma changes of immature and mature dendritic cell expression correlate with tumor thickness: an immunohistochemical study. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007; **20**: 325-333.
- Smith RE, Bryant J, DeCillis A, Anderson S. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after doxorubicin-cyclophosphamide adjuvant therapy for operable breast cancer: the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Experience. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 1195-204.
- Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: The roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 2006; **90**: 1-50.
- Snijders A, Kalinski P, Hilkens CM, Kapsenberg ML. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol* 1998; **10**: 1593-1598.
- Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 2009; **86**: 1065-1073.
- Song H, Kim J, Cosman D, Choi I. Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression. *Cell Immunol* 2006; **239**: 22-30.
- Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine* 2011; **29**: 3341-3355.
- Steinman RM, Young JW. Signals arising from antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol* 1999; **3**: 361-372.
- Su X, Ye J, Hsueh EC, Zhang Y, Hoft DF, Peng G. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *J Immunol* 2010; **184**: 1630-1641.
- Subudhi SK, Zhou P, Yerian LM, Chin RK, Lo JC, Anders RA. Local expression of B7-H1 promotes organ-specific autoimmunity and transplant rejection. *J Clin Invest* 2004; **113**: 694-700.
- Svensson H, Olofsson V, Lundin S, Yakkala C, Björck S, Börjesson L et al. Accumulation of CCR4⁺ CTLA-4^{hi} FOXP3⁺CD25^{hi} Regulatory T Cells in Colon Adenocarcinomas Correlate to Reduced Activation of Conventional T Cells. *PLOS one* 2012; **7**: 1-11.

- Swan NZD. Adoptive Cell Therapy: CD4+ and CD8+ T Cells and the Cells that Educate Them. *J Undergrad Life Sci* 2013; **7**: 1-3.
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang, X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 2000; **100**: 655-669.
- Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S et al. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med* 2001; **7**: 94-100.
- Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; **16**: 3-9.
- Takeuchi O, Kawai T, Mühlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A et al. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int. Immunol* 2001; **13**: 933-940.
- Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* 2010; **70**: 5649-5669.
- Tamura H, Dong H, Zhu G, Sica GL, Flies DB, Tamada K et al. B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function. *Blood* 2001; **15**: 1809-1816.
- Teicher BA, Herman TS, Holden SA, Wang YY, Pfeffer MR, Crawford JW et al. Tumor resistance to alkylating agents conferred by mechanisms operative only in vivo. *Science* 1990; **247**: 1457-1461.
- Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT et al. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature* 1996; **382**: 171-174.
- Thomas L. Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States .ed. Lawrence, H. S. New York: Hoeber-Harper, 1959.
- Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 2011; **1**: 1263-1271.
- Tosti G, Coccorocchio E, Pennacchioli E. Anti-cytotoxic T lymphocyte antigen-4 antibodies in melanoma. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2013; **6**: 245-256.
- Trinchieri G. Natural killer cells wear different hats: effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis. *Semin Immunol* 1995; **7**: 83-88.
- Untch M, Muscholl M, Tjulandin S, Jonat W, Meerpohl HG, Lichinitser M et al. First-line trastuzumab plus epirubicin and cyclophosphamide therapy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer: cardiac safety and efficacy data from the herceptin, cyclophosphamide, and epirubicin (HERCULES) trial. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 1473-1480.
- Vadiveloo PK, Vairo G, Hertzog P, Kola I, Hamilton JA. Role of type I interferons during macrophage activation by lipopolysaccharide. *Cytokine* 2000; **12**: 639-1646

Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006; **24**: 179-189.

Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011; **29**: 235-271.

Wang J, Xu K, Wu J, Luo C, Li Y, Wu X. The changes of Th17 cells and the related cytokines in the progression of human colorectal cancers. *BMC Cancer* 2012; **12**: 1-10.

Wang L, Shu S, Disis ML, Plautz GE. Adoptive transfer of tumor-primed, in vitro-activated, CD4+ T effector cells (TEs) combined with CD8+ TEs provides intratumoral TE proliferation and synergistic antitumor response. *Blood* 2007; **109**: 4865-4876.

Wang L, Yi T, Kortylewski M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6- Stat3 signaling pathway. *J Exp Med* 2009; **206**: 1457-1464.

Wang R, Wang HY. Enhancement of antitumor immunity by prolonging antigen presentation on dendritic cells. *Nat Biotechnol* 2002; **20**: 149-154.

Wang Y, Cella M, Gilfillan S, Colonna M. Cutting edge: polyinosinic:polycytidylic acid boosts the generation of memory CD8 T cells through melanoma differentiation-associated protein 5 expressed in stromal cells. *J Immunol* 2010; **184**: 2751-2755.

Warren TL, Weiner GJ. Synergism between cytosine-guanine oligodeoxynucleotides and monoclonal antibody in the treatment of lymphoma. *Semin Oncol* 2002; **29**: S93-S97.

Wilke CM, Wu K, Zhao E, Wang G, Zou W. Prognostic significance of regulatory T cells in tumor. *Int. J. Cancer* 2010; **127**: 748-758.

Williams CJ, Whitehouse JM. Cisplatin: a new anticancer agent. *Br Med J* 1979; **1**: 1689-1691.

Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G et al. Regulatory CD4+CD25+ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Research* 2001; **61**: 4766-4772.

Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 5262-70.

Wu C, Wang S, Wang F, Chen Q, Peng S, Zhang Y. Increased frequencies of T helper type 17 cells in the peripheral blood of patients with acute myeloid leukemia. *Clin Exp Immunol* 2009; **158**: 199-204.

Xiao H, Peng Y, Hong Y, Huang L, Guo ZS, Bartlett DL et al. Local administration of TLR ligands rescues the function of tumor-infiltrating CD8 T cells and enhances the antitumor effect of lentivector immunization. *J Immunol* 2013; **190**: 5866-5873.

Yang ZZ, Novak AJ, Stenson M J, Witzig TE, Ansell SM, Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2006; **107**: 3639-3646.

- Yang H, Zhou H, Feng P, Zhou X, Wen H, Xie X et al. Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;**29**: 1-8.
- Yang L, Qi Y, Hu J, Tang L, Zhao S, Shan B. Expression of Th17 cells in breast cancer tissue and its association with clinical parameters. *Cell Biochem Biophys* 2012; **62**: 153-159.
- Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS et al. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem*. 2007; **282**: 9358-9363.
- Ye J, Livergood RS, Peng G. The role and regulation of human Th17 cells in tumor immunity. *Am J Pathol* 2013;**182**: 10-20.
- Zabernigg A, Giesinger JM, Pall G, Gamper E, Gattlinger K, Wintner LM et al. Quality of life across chemotherapy lines in patients with cancers of the pancreas and biliary tract. *BCM Cancer* 2012; **12**: 1-8.
- Zhang B, Rong G, Wei H, Zhang M, Bi J, Ma L. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **374**: 533-537.
- Zhang Y, Luo F, Cai Y, Liu N, Wang L, Xu D et al. TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells. *J Immunol* 2011; **186**: 1963-1969.
- Zheng W, Favell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for TH2 cytokine gene expression in CD4 T cell. *Cell* 1997; **89**: 587-596.
- Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, Shen Y, Du J et al. TGF- β -induced Foxp3 inhibits TH17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. *Nature* 2008; **453**: 236-240.
- Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**: 59-73.
- Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**: 715-727.
- Zou W. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2006; **6**: 295-307.