MARIANE BORGES DA SILVA

**Efeitos dos fatores tumorais derivados do melanoma canino
na geração e maturação de células dendríticas caninas:
estudo *in vitro***

São Paulo

2015

MARIANE BORGES DA SILVA

Efeitos dos fatores tumorais derivados do melanoma canino na geração e maturação de células dendríticas caninas: estudo *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientadora:

Prof^a. Dr^a Cristina de Oliveira Massoco Salles
Gomes

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3104
FMVZ

Silva, Mariane Borges da
Efeitos dos fatores tumorais derivados do melanoma canino na geração e maturação
de células dendríticas caninas: estudo *in vitro* / Mariane Borges da Silva. -- 2015.
77 f. :il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof^a. Dr^a Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes.

1. Células dendríticas. 2. Extrato tumoral. 3. Melanoma. 4. Imunofenotipagem.
5. Canino. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise funcional e fenotípica de células dendríticas caninas geradas *in vitro* e ativadas por diferentes estímulos biológicos", protocolado sob o nº 3139/2013, utilizando 10 (dez) cães, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes, foi aprovado em reunião de 16/10/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Functional and phenotypic analysis of canine dendritic cells generated *in vitro* and activated by various biological stimuli", protocol number 3139/2013, utilizing 10 (ten) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes, was approved in the meeting of day 16/10/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 17 de outubro de 2013.

Alice Maria Melville Paiva Della Libera
Vice-Presidente no exercício

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuvet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Mariane Borges da

Título: **Efeitos dos fatores tumorais derivados do melanoma canino na geração e maturação de células dendríticas caninas:** estudo *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico,

Aos meus pais,

Ao meu maior exemplo de luta, trabalho e competência. Ao meu maior e mais importante professor. Ao meu fã incondicional. Obrigada Daddy, Paptuska, Pai.

À melhor agitadora de torcida, cozinheira, líder da corrente positiva. Àquela que reza pela minha saúde, segurança, para que as células não contaminem, para que o citômetro não quebre e para que o -80°C fique estável... Dona Mara rocks!

À melhor orientadora da galáxia,

Você é a maior responsável pela conclusão dessa etapa. Cris, nem nos meus melhores sonhos poderia escolher uma orientadora melhor. Paciente para ensinar desde a teoria até a bancada. Sempre com um “Caaaaaalma, vai dar certo” pronto pra ser dito. Obrigada pelo carinho, amizade, preocupação, compreensão, risadas. Obrigado por ter aceitado uma clínica (de gatos!) por essência que resolveu se aventurar no mundo da ciência.

AGRADECIMENTOS

Ao homem que me mostrou como eu sou boa e como posso ser melhor, que me ama apesar do meu mau humor matinal, da loucura, da falta de tempo, do excesso de pêlos e de trabalho. Meu geofísico-mágico-programador-mecânico-amigo-namorado, muito obrigada.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Minha eterna e acolhedora casa. Chegar todos os dias e sentir esse cheiro único é tranquilizador.

Ao Departamento de Patologia e Toxicologia (VPT) que me proporcionou condições para que este trabalho fosse realizado.

Aos amigos do LADTOX (VPT-FMVZ-USP): Herculano, Vagner e Nicolle pela eterna disponibilidade, ajudas e risadas sem fim.

Aos amigos cultivados nos últimos anos na sala de pós, este que me proporcionaram ideias científicas, litros de risadas (mesmo quando a situação era motivo de choro): Natália, Thaisa, Gabi, Fernando, Luciana, Thiago, Paulinha, Daniel, Wandy, Rafa, Andressa.

Aos meus primeiros amigos feitos no mestrado: Jean, Camila, Yonara. Com vocês os primeiros passos foram menos temerosos e mais divertidos.

À Ludmilla, minha traficante oficial de *buffy coat* canino. Que parou pra pensar comigo meios de sumir com plaquetas, neutrófilos, bactérias. Que sempre tinha uma bolsa de sangue na manga pra me ceder. Valeu Lud!!

“Your time is limited, so don't waste it living someone else's life. Don't be trapped by dogma – which is living with the results of other people's thinking. Don't let the noise of others' opinions drown out your own inner voice. And, most important, have the courage to follow your heart and intuition. They somehow already know what you truly want to become. Everything else is secondary.”

Steve Jobs

RESUMO

SILVA, M.B. **Efeitos dos fatores tumorais derivados do melanoma canino na geração e maturação de células dendríticas caninas: estudo *in vitro***. [Effects of tumor derived factors canine melanoma in the generation and maturation of canine dendritic cells: an *in vitro* study]. 2015. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os cães são afetados por doenças inflamatórias e neoplásicas que compartilham diversas similaridades com as desordens em humanos, assim seu estudo representa um importante modelo animal para as condições humanas. As células dendríticas (DCs) representam a população mais potente de células apresentadoras de antígenos. As DCs representam também um novo alvo promissor de imunoterapia em cães; no entanto o uso terapêutico de DC caninas é restrito, dentre outros fatores, devido a falta de padronização nas técnicas de isolamento e limitado número de informações específicas da espécie a esse respeito. Este projeto tem por finalidade avaliar a geração de células dendríticas caninas geradas *in vitro* e ativadas por diferentes estímulos biológicos na presença e ausência de extrato tumoral de melanoma canino. Os resultados demonstraram que as DCs caninas geradas na presença de extrato tumoral em grandes concentrações apresentavam atividade funcional semelhante as DCs maduras.

Palavras-chave: Células dendríticas. Extrato tumoral. Melanoma. Imunofenotipagem. Canino.

ABSTRACT

SILVA, M. B. **Effects of tumor derived factors canine melanoma in the generation and maturation of canine dendritic cells:** an *in vitro* study.[Efeitos dos fatores tumorais derivados do melanoma canino na geração e maturação de células dendríticas caninas: estudo *in vitro*]. 2015. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Dogs are affected by inflammatory and neoplastic diseases that share many similarities with the disorders in humans, so their study is an important animal model for the human condition. Dendritic cells (DCs) are the most potent population of antigen presenting cells. DCs also represent a promising new target for immunotherapy in dogs; However, the therapeutic use of canine DC is restricted among others factors due to lack of standardization in isolation techniques and limited number of species-specific information in this regard. This project aims to assess the generation of canine dendritic cells generated *in vitro* and activated by different biological stimuli in the presence and absence of tumor extract of canine melanoma. The results showed that the canine DCs generated in the presence of high concentrations tumor extract showed similar functional activity of mature DCs.

Keywords: Dendritic cells. Tumor extract. Melanoma. Immunophenotyping. Canine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	A origem das células dendríticas.....	23
Figura 2 -	Ilustração do efeito tumoral sobre as DCs.....	30
Figura 3 -	Figura representativa da bolsa de sangue total (à esquerda) após a coleta e da mesma bolsa após a centrifugação sendo retirada os subcomponentes (à direita).....	36
Figura 4 -	Figura representativa das 4 camadas obtidas após centrifugação do sangue total sobre Ficoll-Paque densidade 1077.....	36
Figura 5 -	Modelo de plaqueamento do experimento de geração de células dendríticas <i>ex vivo</i>	38
Figura 6 -	Modelo de plaqueamento do experimento de maturação celular com LPS, Poly I:C ou CIP.....	39
Figura 7 -	Demonstração da seleção das populações de interesse a partir da confecção de gates.....	43
Figura 8 -	Procedimento de digestão tumoral.....	44
Figura 9 -	Fotomicrografia dos cultivos celulares pré e pós plaquetaférese.....	49
Figura 10 -	Fotomicrografia (aumento de 40x) de uma placa de cultura Mo-DC após 6 dias.....	51
Figura 11 -	Fotomicrografia (aumento de 40x) de uma placa de cultura Mo após 6 dias.....	52
Figura 12 -	Fotomicrografia das placas Mo (à esquerda) e Mo-DC (à direita).....	53
Figura 13 -	Dotplots representativos das células Mo (A e C) e Mo-DC imaturas (B e D) no terceiro dia de cultivo celular.....	55
Figura 14 -	Dotplots representativos das células Mo (A e C) e Mo-DC imaturas (B e D) no sétimo dia de cultivo celular.....	56
Gráfico 1 -	Porcentagem de fagocitose avaliada 24 horas após adição dos estímulos.....	59

Gráfico 2 - Representação gráfica dos índices de estimulação das células MO, DCs imaturas e maturadas com diferentes agentes.....	61
Gráfico 3 - Representação gráfica da porcentagem de fagocitose realizadas pelas DCs imaturas geradas na ausência e na presença de diferentes concentrações de fatores tumorais.....	63
Gráfico 4 - Representação gráfica das médias de intensidade de fluorescência da SaPI durante fagocitose realizadas pelas DCs imaturas geradas na ausência e na presença de diferentes concentrações de fator tumoral.....	63
Gráfico 5 - Representação gráfica dos IRL das DCs maturadas com LPS, Poly I:C e CIP.....	65
Quadro 1 - Fatores derivados de tumor que resultam na supressão de DCs.....	28
Quadro 2 Anticorpos utilizados na imunofenotipagem das células obtidas no cultivo celular.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tabela de rendimento do cultivo celular de monócitos.....	53
Tabela 2 -	MFI das DCs imaturas e maduras.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Células apresentadoras de antígenos
cDCs	Células dendríticas convencionais
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil ester
CIP	Coquetel plasmático inflamatório
CPDA-1	Citrato de sódio, fosfato, dextrose, adenina
CTLs	Linfócitos T citotóxicos
DCs	Células dendríticas
dL	Decilitro
DMSO	Dimetilsulfóxido
g	Gramas
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
iDCs	Células dendríticas imaturas
IFN- α	Interferon alfa
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IRL	Índice relativo de linfoproliferação
LMN	Linfomononucleares
LPS	Lipopolissacaridase
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
mDCs	Células dendríticas mielóides
MFI	Média de intensidade de fluorescência
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
mL	Mililitro
Mo	Monócitos
Mo-DC	Células dendríticas derivadas de monócitos
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline Solution</i>

pDCs	Células dendríticas plasmocitóides
PGF-2 α	Prostaglandina F-2 α
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SaPI	<i>Staphylococcus aureus</i> conjugado com iodeto de propídeo
TCR	Receptor de células T
TGF- β	Fator de crescimento tumoral
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
T _{reg}	Células T reguladoras
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	21
2.1.1	Histórico.....	21
2.1.2	Origem, Subpopulações e Funções.....	22
2.1.3	Estímulos que alteram a diferenciação das DCs e suas funções.....	25
2.1.4	DCs x Tumores.....	26
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	OBTENÇÃO CÉLULAS LINFOMONONUCLEARES	35
4.2	GERAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS <i>EX VIVO</i>	37
4.3	ENSAIO DE ATIVIDADE ALOESTIMULATÓRIA – MARCAÇÃO DE LINFÓCITOS COM CFSE.....	40
4.4	ENSAIO DE ATIVIDADE FAGOCÍTICA.....	41
4.5	IMUNOFENOTIPAGEM.....	41
4.6	OBTENÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS.....	43
4.7	OBTENÇÃO DOS FATORES TUMORAIS DE MELANOMA CANINO.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1	GERAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CANINAS <i>IN</i> <i>VITRO</i>	47
5.1.1	Obtenção de células linfomononucleares de animais sadios.....	47
5.1.2	Plaquetaférese.....	48
5.1.3	Congelamento e descongelamento de linfomononucleares.....	49
5.1.4	Cultura de células linfomononucleares para a geração de DCs.....	50

5.1.5	Rendimento da geração das DCs caninas em cultura de 6 dias de monócitos caninos.....	53
5.1.6	Caracterização fenotípica.....	54
5.1.6.1	Modificação fenotípica ao longo do cultivo celular das células Mo e Mo-DC.....	54
5.1.6.2	Maturação das DCs geradas.....	56
5.1.7	Caracterização funcional.....	58
5.1.7.1	Atividade fagocítica.....	59
5.1.7.2	Atividade aloestimulatória.....	60
5.2	AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FATORES DERIVADOS DE MELANOMA CANINO SOBRE AS DCS DERIVADAS DE MONÓCITOS.....	62
5.2.1	Caracterização funcional das DCs cultivadas na ausência e presença de fator tumoral de melanoma canino.....	62
5.2.1.1	Atividade fagocítica.....	62
5.2.1.2	Atividade aloestimulatória.....	64
6	CONCLUSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS.....	70

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O sistema imune é um dos mais complexos sistemas de organização celular do organismo. Sua complexidade se deve ao seu elaborado propósito: o reconhecimento de um repertório diferenciado de microorganismos e patógenos, a detecção de lesões neoplásicas originárias de uma gama de tecidos, e também a manutenção da tolerância periférica através da supressão de respostas contra tecidos normais (BENITEZ-RIBAS et al., 2012).

Ao mesmo tempo em que protege o hospedeiro contra o desenvolvimento do câncer, o sistema imunológico pode ser “desligado” como, por exemplo, por células tumorais as quais reduzem a imunogenicidade, potencializando a evasão contra o sistema imune. A evasão tumoral reflete uma gama de influências do tumor sobre a competência imunológica, como: o processamento aberrante de antígenos pelas células tumorais, anergia e/ou eliminação das células T citotóxicas específicas tumorais, recrutamento de células inibitórias, o efeito barreira realizado pelo estroma tumoral e recrutamento de células T regulatórias. Demonstrou-se que as células dendríticas (DCs), descobertas por Steinman e colaboradores há aproximadamente 40 anos e consideradas as principais células apresentadoras de antígenos para iniciar a respostas imunes, não sejam recrutadas ou ativadas pelos tumores, tendo então sua função comprometida (PINZON-CHARRY et al., 2005).

As células dendríticas representam um grupo heterogêneo de células que servem como sentinelas do sistema imune, capazes de capturar e processar antígenos. Elas representam a mais potente população celular apresentadora de antígenos, iniciando respostas primárias de células T e possuem importante papel na imunidade de células B (STEINMAN, 2007).

Os cães são filogeneticamente mais próximos ao seres humanos do que os roedores, além de serem afetados por afecções neoplásicas e inflamatórias que compartilham diversas similaridade com as desordens humanas, como histiocitomas cutâneos, atopias, leucemias, melanomas (PAOLONI; KHANNA, 2008), representando assim um importante modelo animal não-murino para tais afecções.

As DCs representam um alvo promissor de imunoterapia em cães uma vez que o câncer canino também afeta de maneira supressiva as populações mielóides (WASSERMAN et al., 2012). No entanto, o uso terapêutico está restrito a

pouquíssimos estudos que foram realizados em cães, principalmente pela carência de padronização de técnicas de isolamento, além do limitado número de informações sobre suas características fenotípicas e morfológicas (TAMURA et al., 2008). Em especial, a contribuição para aumentar o conhecimento sobre a diferenciação de células dendríticas caninas sob a influência de fatores tumorais pode ser relevante para o aprimoramento de futuras imunoterapias derivadas de células dendríticas.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÉLULAS DENDRÍTICAS

2.1.1 Histórico

Em 1973, Steinman e Cohn, identificaram em camundongos uma população celular esplênica que se distinguia morfológicamente dos granulócitos e linfócitos. Esta foi nomeada por células dendríticas (DCs, do inglês *dendritic cells*) por possuir processos semelhantes a galhos que se estendiam e retraíam. Após longos estudos, Steinman aprimorou métodos de enriquecimento das culturas de DCs. Notou que as DCs expressavam em altos níveis o Complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II), ao contrário dos macrófagos que apresentavam baixa expressão de MHC II. Por causa da presença do MHC II nas DCs, decidiu-se por verificar se as mesmas poderiam estimular uma reação mista de leucócitos. Descobriu-se então que as DCs eram poderosas iniciadoras de imunidade, pelo menos 100 vezes mais potentes do que outras células apresentadoras de antígeno. Devido a importância destas células para o sistema imune e a relevante contribuição de sua pesquisa, em 2004 Steinman ganhou o prêmio Novartis em imunologia e em 2011 o Prêmio Nobel.

Em 1981, Kayo Inaba estabeleceu que respostas antígeno-específicas nas reações mistas de leucócitos eram desenvolvidas em agrupados de DCs e células T. A partir destes agrupados, pôde-se isolar as células T que tinham sido ativadas pelas DCs e então, estabelecer que elas mediavam o membro aferente da imunidade, por meio de células T auxiliares CD4⁺ restritas de MHC. Em paralelo, Steinman em parceria com Maggi Pack (1987) demonstraram que as DCs respondiam ao fator estimulante de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF) e que as DCs ricas em MHC II eram abundantes em áreas de tecidos linfóides periféricos, um local ideal para iniciar a imunidade com células T.

2.1.2 Origem, Subpopulações e Funções

As células dendríticas representam uma linhagem hematopoiética heterogênea de células que compreende subpopulações celulares que diferem na sua origem, localização, fenótipo e função (REIS E SOUZA, 2006; GALLO; GALLUCCI, 2013). Em geral, estas possuem capacidade de estimular a proliferação de células T, contudo na dependência do sinal recebido no microambiente tecidual as DCs podem apresentar um perfil tolerogênico e imunossupressivo (MA et al., 2012).

As DCs constituem uma população heterogênea e a caracterização desta célula se baseia na análise da combinação das características morfológicas, fenotípicas e funcionais. No homem há duas principais subpopulações – mieloides e linfoides. As DCs mieloides (mDCs - também chamadas de DC tipo 1 ou cDCs “convencionais”) originam-se dos mesmos precursores de neutrófilos e monócitos, enquanto DCs linfoides (tipo 2 ou pDCs “plasmocitoides”) originam-se de células tronco linfoides. Ambas populações são heterogêneas com subconjuntos que diferem nos marcadores de superfície, citocinas secretadas e suas funções (MELCHER et al., 2002). As pDCs tem por característica a habilidade de secretar grandes quantidades de IFN- α quando expostas a um estímulo antigênico viral (GROUARD et al., 1997). Funcionalmente estas células realizam pouca fagocitose, e são apresentadoras de antígeno pouco competentes, uma vez que expressam baixo MHC-II e, portanto são ineficientes na função de iniciar a resposta de linfócitos T CD4⁺ (REIZIS et al., 2011). Também há relatos que as pDCs exibem propriedades imunossupressoras e tolerogênicas, bloqueando a proliferação de células T *naïve* e células T CD4⁺ e CD8⁺, ativando os linfócitos Treg (MA et al., 2012). As mDCs por sua vez, expressam constitutivamente marcadores hematopoiéticos, como o CD45, MHC-II, BDCA1 (CD1c) e CD11c (SATPATHY et al., 2012).

Figura 1 - A origem das células dendríticas

Fonte: (TIZARD, 2000)

Em animais domésticos, as DCs mielóides – derivadas de monócitos – foram caracterizadas em porcos (PAILLOT et al., 2001), vacas (HOWARD et al., 1999), ovelhas (CHAN et al., 2002), cavalos (HAMMOND et al., 1999), gatos (BIENZLE et al., 2003) e cães (GOODEL et al., 1985; DE CARVALHO et al., 2006).

Em 2000, Hagglund et al. descreveram a geração de DCs caninas a partir de células $CD34^{+}$ selecionadas na medula óssea cultivadas com GM-CSF humano, ligante Flt3 e $TNF-\alpha$, sendo estas capazes de estimular a reação mista de leucócitos (MLR). Dois anos mais tarde, Catchpole e colaboradores geraram DCs caninas *in vitro* a partir de monócitos adquiridos de três cães acometidos com melanoma oral, neste estudo foi utilizado GM-CSF e Flt3 humano + IL-4 canino; estas células expressaram MHC II, CD1a e CD11c. Em 2003, Yoshida et al. reportaram a geração de DCs caninas na presença de fitohemaglutinina; estas células expressavam altos níveis de MHC II, CD11b e CD8, além de demonstrarem alta capacidade de fagocitar células tumorais.

Contudo, diferentemente como para o camundongo, nos cães a simples marcação com a leucointegrina CD11c ou CD1c não identifica exclusivamente as DCs ou as diferencia dos macrófagos e monócitos (GUTZWILLER et al., 2010). O que parece melhor caracterizar DCs caninas é uma taxa alta da relação de

expressão de CD11c/CD11b e uma baixa expressão de MHC II (GUTZWILLER et al., 2010).

Embora haja a divisão fenotípica em subpopulações de DCs, a divisão mais importante é a baseada no estado de maturação.

As DCs podem se encontrar em dois estados de maturação: imaturo e maduro. Apenas o estado maduro possui a capacidade de iniciar uma resposta imune. As imaturas são caracterizadas pela alta capacidade de capturar antígenos e processá-los, porém com baixa capacidade estimulatória de células T. Mediadores inflamatórios promovem a maturação e migração das DCs dos tecidos não linfóides para a circulação sanguínea ou linfática. Estas células migratórias alcançam órgãos linfóides secundários, e neste momento tornam-se DCs maduras, para tal, há uma notável mudança nas suas propriedades: as DCs perdem a habilidade de capturar antígenos e adquirem uma vasta capacidade estimulatória de células T. Sendo assim, as DCs maduras apresentam antígenos às células T *naïve*, antígenos estes capturados em tecidos periféricos (CELLA et al., 1997). Como estas células possuem um período de meia vida curta (aproximadamente 3-5 dias) em camundongos, a sua reposição ocorre continuamente, um processo dependente da citocina Flt3L (WASKOW et al., 2008). As DCs maduras apresentam maior expressão de moléculas de superfície como MHC II, e co-estimulatórias, como a CD40, CD80, CD83 e CD86, além de não apresentarem moléculas marcadoras de superfície como CD14 (monócitos), CD3 (células T), CD19/20/24 (células B), CD56 (células natural killer) e CD66b (granulócitos) (REIS E SOUSA, 2006).

As duas mais importantes habilidades das DCs são: (1) a capacidade de realizar amostragens de antígenos e migrar até o órgão linfóide permitindo com que as células T *naïve* entrem em contato com antígenos periféricos; (2) a habilidade das DCs traduzirem as informações microambientais para as células T responderem a tais antígenos – as DCs são 10 a 100 vezes mais potentes que os macrófagos ou células B no que diz respeito ao estímulo da proliferação de células T (INABA; STEIMAN, 1986). Os mecanismos usados pelas DCs para traduzir estes estímulos dependem do estado de maturação em que se encontram as DCs.

2.1.3 Estímulos que alteram a diferenciação das DCs e suas funções

Como já descrito, o fenótipo e, por conseguinte, a função das DCs dependem de fatores presentes no meio onde elas se encontram.

Demonstrou-se que a adição de citocinas inflamatórias – como o fator de necrose tumoral (TNF), produtos microbianos – como as lipopolisacarídeses (LPS) ou ligantes do CD40 (CD40L) podem induzir a um decréscimo agudo na habilidade de processar antígenos e ao mesmo tempo um aumento na capacidade de estimular células T, deixando claro que a maturação das DCs é regulada por sinais exógenos (SALUSTO; LANZAVECCHIA, 1994). A exposição das DCs imaturas ao estímulo da maturação leva a uma regulação positiva inicial de amostragem de antígenos que é seguido por uma diminuição rápida desta função, mudando para o estado maduro imunoestimulante.

As células apresentadoras de antígeno (APC) disparam sinais para determinar o destino das células T *naïve*. O primeiro sinal é fornecido através do receptor de células T (TCR), quando há ligação de um peptídeo a um MHC apropriado; este sinal sozinho pode promover a inativação de células T *naïve* por anergia, deleção ou cooptação, levando a tolerância. O segundo sinal é referido como coestimulação e é considerado um sinal acessório que, em conjunto com o primeiro sinal, induz imunidade. Por fim, o terceiro sinal refere-se aos sinais entregues a partir da APC para as células T, que determinam a sua polarização em uma célula efetora: células T auxiliares 1 (Th1), células Th2 ou linfócitos T citotóxicos (CTLs). A interleucina-12 (IL-12) é um exemplo de um mediador que fornece um terceiro sinal, podendo promover as células Th1 ou CTL. A CD80 e CD86 são referidos como "segundo sinal" e a IL-12 como "terceiro sinal" (REIS E SOUSA, 2006).

Sabe-se que as citocinas, tais como interleucina-12 (IL-12), IL-18 e IFN α , que são produzidos pelas DCs, podem predispor a ativação das células T. Estas citocinas podem agir diretamente nas células T recém-ativadas e sua produção por DCs é amplificada por sinais de *feedback* positivo que são fornecidos pelas células T em diferenciação (SPORRI; REIS E SOUSA, 2005).

2.1.4 DCs x Tumores

O sistema imune é capaz de detectar e eliminar as células malignas emergentes para prevenir a sua proliferação descontrolada, sendo esta característica denominada de imunovigilância (BURNET, 1970). As DCs desempenham um papel importante na vigilância imune do câncer e a habilidade das DCs gerarem respostas imunes antitumorais *in vivo* tem sido documentada em modelos animais (WASSERMAN et al., 2012). Células dendríticas podem ser usadas terapeuticamente para induzir regressão de tumores preexistentes. A imunização baseada em DCs requer que estas apresentem antígenos tumorais às células T do hospedeiro. Quando esta abordagem é utilizada, a vacina contém múltiplos antígenos, aumentando a probabilidade de induzir a imunidade a mais de um antígeno associado ao tumor (BERGMAN; WOLCHOK, 2008).

A indução de uma resposta eficaz contra tumores é dependente principalmente da imunidade inata e adaptativa coordenada pelas DCs. As etapas necessárias para a indução de uma resposta eficaz antitumoral incluem: (1) o reconhecimento de moléculas do tumor pelas DCs; (2) ativação das DCs com o recrutamento subsequente de tipos celulares não específicos, tais como macrófagos, eosinófilos, células NK; (3) captura de antígenos tumorais pelas DCs e apresentação às células T; (4) ativação e expansão das células T antígeno-específicas; (5) migração das células T antígeno-específicas para o local do tumor com morte das células tumorais. No entanto, o sistema imune falha na presença de neoplasias, presumivelmente devido à alterações em um ou mais mecanismos (BODEY, 2002).

Um envolvimento direto dos fatores derivados do tumor na supressão de DCs foi primeiramente sugerido por estudos que demonstraram que as DCs que infiltravam os sítios neoplásicos possuíam um fenótipo imaturo, enquanto que as DCs encontradas no estroma circundante possuíam fenótipo mais maduro. A infiltração de DCs em lesões tumorais primárias tem sido associada com a sobrevida dos pacientes humanos com neoplasias de cabeça, pescoço, nasofaringe, pulmão, bexiga, estômago (LOTZE, 1997).

As DCs que infiltram os tumores migram para linfonodos regionais e são capazes de apresentar os antígenos tumorais as células T *naïve*. Acredita-se que os

linfócitos T ativados contra antígenos tumorais específicos, localizados nos linfonodos, alcançam o tumor através de receptores-ligantes inflamatórios, resultando na sua proliferação e diferenciação em fatores citotóxicos (THOMPSON et al., 2010). Há ampla evidência de que a presença de DCs infiltrantes em tumores está associada a um prognóstico favorável nos pacientes humanos; esta observação sugere que um passo limitante para a resistência imunológica pode ser a capacidade das DCs infiltrativas de sobreviverem ao microambiente tumoral (LADANYI et al., 2007).

A associação entre uma baixa infiltração de DCs e a agressividade do câncer tem sido relatada. Facchetti et al. (1984) demonstraram que as células de Langerhans epidérmicas foram raramente encontradas em fragmentos de biópsia de melanomas malignos primários. No mesmo ano, Gatter et al. constataram que, em lesões benignas de pele, as células de Langerhans estavam presentes em grande número, enquanto que em tumores malignos, o número era reduzido ou ausente.

Esche et al. (1999) descreveram que fatores derivados de tumores poderiam induzir a apoptose de DCs em humanos e camundongos. Diversos fatores derivados de tumor podem diminuir a longevidade das DCs (PIZON-CHARRY et al., 2005; SHURIN; LOTZE, 2009). Assim, a eliminação de DCs funcionais no microambiente tumoral pode estar relacionada com a apoptose ou aumento do seu *turnover* (SHURIN et al., 1999).

As células tumorais liberam grandes quantidades de fatores pró-apoptóticos como citocinas, gangliosídeos, prostanóides e óxido nítrico que induzem apoptose das DCs, resultando na falha das células T em se tornarem plenamente ativadas para erradicarem as células tumorais – quadro1.

Quadro1 - Fatores derivados de tumor que resultam na supressão de DCs

Fatores	Efeitos	Referência
Citocinas		
IL-10	Diminuição da diferenciação, maturação e função	Kruger-Krasagakes et al., 1994 Allavena et al., 1998
IL-6	Diminuição da diferenciação e maturação	Menetrier-Caux et al., 1998
M-CSF	Inibição da diferenciação a partir de progenitores CD34+	Menetrier-Caux et al., 1998
GM-CSF	Geração de APC imaturas com papel inibitório	Bronte et al., 1999 Serafini et al., 2004
VEGF	Alteração da diferenciação de linhagens de DCs e acumulação de células imaturas com função inibitória	Gabrilovich et al., 1998
Outros Mediadores		
Gangliosídeos	Diminuição da diferenciação funcional e fenotípica; alteração na apoptose	Birkle et al., 2003
Prostanóides	Diminuição da maturação e atividade	Sharma et al., 2003
Óxido Nítrico	Indução da apoptose	Brune et al., 1999
Hialuronan	Indução da apoptose através da indução de óxido nítrico	Yang et al., 2002

As neoplasias podem interferir na maturação das DCs, por exemplo, na transição entre uma DC especializada na captura de antígenos para uma DC especializada na estimulação de células T.

Treglia (2008) demonstrou que pacientes humanos ictericos com câncer pancreático apresentavam deficiências na diferenciação de monócitos em DCs. Em

seu estudo houve menor produção de IL-12 e maior produção de IL-10 nas culturas de pacientes ictericos, identificando um perfil imunossupressor nesses pacientes.

Enk et al. (1997), conduziram estudos em humanos e demonstraram que fatores derivados de melanomas alteraram a função apresentadora de antígenos da DCs, induzindo sua tolerância em relação ao tecido neoplásico. Nas neoplasias malignas há o bloqueio da atividade imune anti-tumoral, promovendo o aparecimento de células T reguladoras (T_{reg}) e de fatores que apoiam a progressão do tumor, como a angiogênese intratumoral e o desenvolvimento de metástases (SHURIN et al., 2011). As propriedades tolerogênicas das DCs são atribuídas ao estado imaturo ou a condições específicas que elas são submetidas no ambiente tumoral. Níveis elevados de DCs imaturas foram encontrados no infiltrado tumoral, assim como no sangue periférico de paciente humanos com câncer de cabeça e pescoço; esse conjunto de DCs não proporciona adequados sinais co-estimulatórios e citocinas às células T, induzindo a tolerância através da proliferação ou anergia de linfócitos T $CD4^+$ $CD8^+$ ou por meio da geração de células T_{reg} , impedindo as respostas imunes através da produção de IL-10 e TGF- β (LIZEE et al., 2006). Wasserman et al. (2012) relataram que fatores solúveis de células tumorais suprimiram a ativação e função de DCs mielóides caninas, diminuindo a expressão de MHC II e CD80, além de diminuir a atividade fagocítica das DCs.

Recentemente constatou-se em roedores a presença de DCs que expressam altos níveis de MHC II e moléculas co-estimulatórias, porém não secretam citocinas, sendo assim, elas exibem propriedades tolerogênicas ao invés de estimuladoras, sendo referidas como DCs semi-maduras tolerogênicas (LUTZ; SCHULER, 2002). Além disso, a IL-10 produzida por estas DCs podem polarizar células T $CD4^+$ não responsivas após a exposição a antígenos e induzir as células T_{reg} a produzirem mais IL-10 (AKBARI et al., 2001).

Igualmente, parece existir populações de DCs imaturas, semi-maduras e totalmente maduras que utilizam diferentes mecanismo para a indução de tolerância imunitária e supressão imune (MA et al., 2012). Portanto, a presença de DCs imunossupressoras tolerogênicas controladas pelo microambiente tumoral desempenham um papel importante no apoio a progressão tumoral, limitando o sucesso das diferentes modalidades terapêuticas em pacientes com câncer. A figura 2 sintetiza o efeito tumoral sobre as DCs.

Figura 2 – Ilustração do efeito tumoral sobre as DCs

Fonte: (PIZON-CHARRY et al., 2005)

Legenda: As disfunções em DCs induzidas por tumores geram respostas imunes inefetivas. Na ausência de fatores derivados de tumor (painel superior), as DCs diferenciam-se e maturam-se apropriadamente. As DCs maduras aumentam sua capacidade de processar antígenos e expressam citocinas e moléculas co-estimulatórias essenciais para iniciar uma resposta imune efetiva. Sob a influência tumoral (painel inferior), as células imaturas, as DCs imaturas e as DCs apoptóticas são geradas e acumuladas. Embora as células imaturas pareçam não apresentar antígenos, elas podem suprimir a ativação das células T tumor-específicas através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estas células na ausência de adequada co-estimulação e citocinas, podem promover respostas Th2, induzindo anergia das células T efectoras, favorecendo a evasão tumoral.

Sabe-se também que fatores tumorais, além de alterar as funções das DCs já existentes, também interferem na diferenciação das células progenitoras em DCs nos humanos. Menetrier-Caux et al. (1998) descrevem em seu estudo que as linhagens tumorais produzem fatores solúveis que inibem a diferenciação de DC humanas a partir de células progenitoras CD34+ induzidas por GM-CSF, em particular as características fenotípicas como MHC II, CD1a, CD80, CD86 e funcionais de atividade aloestimulatória de linfócitos T CD4+. Tais efeitos foram observados quando as linhagens tumorais foram adicionadas à cultura do dia 0 ao dia 12 ou apenas durante o período de diferenciação (dia 6 ao dia 12). Péguet-

Navarro et al. (2003) cultivaram monócitos humanos junto a gangliosídeos derivados de melanoma e constataram alterações fenotípicas nas DCs geradas (embora a expressão de MHC II não tenha sido substancialmente alterada, houve diminuição da expressão de CD1a, CD54, CD80 e CD40).

A maioria dos estudos na área da imunologia dos tumores se baseia naqueles realizados em humanos e/ou roedores, e a produção de novos conhecimentos dos efeitos dos fatores derivados de neoplasias em células do sistema imune de pequenos animais pode alavancar esta área em medicina veterinária.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a geração de células dendríticas de cães saudáveis na presença de fatores derivados do melanoma canino.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Das células dendríticas derivadas de monócitos sanguíneos avaliar:

- A caracterização morfológicas ao longo do cultivo celular
- A caracterização fenotípica: MHC II, CD11c, CD80, CD86.
- A caracterização funcional: capacidade fagocítica e atividade aloestimulatória

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DE CÉLULAS LINFOMONONUCLEARES

Bolsas de sangue de doadores caninos provenientes de canis da região da grande São Paulo foram obtidas da doação do Banco de Sangue do HOVET-USP. Apenas animais saudáveis e com vacinação anual atualizada foram incluídos no presente estudo, sendo as amostras de sangue dos animais doadores previamente testadas contra os seguintes agentes infecciosos: *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia sp* e *Anaplasma sp* por meio do teste rápido Snap 4Dx Plus Test (Idexx Laboratories) e *Brucella canis* e *Leishmania sp*, por meio de sorologia plasmática.

As bolsas de sangue total (capacidade para 450 mL) foram submetidas à centrifugação a 2700 rpm 7 min 22°C. Em seguida, a camada leucocitária (*buffy coat*) foi coletada em uma bolsa satélite com o auxílio de um extrator de plasma figura 3. O *buffy coat* foi diluído em tampão fosfato (PBS) até completar o volume de 30 mL e, após homogeneização, esta mistura foi adicionada sobre uma camada de Ficoll-Paque (Armersham Pharmacia Biotech, Upsalla Sweden, densidade 1077 +/- 0,001 g/mL) na proporção 2:1, sendo então realizada a centrifugação a 2100 rpm RT durante 20 minutos. Após a centrifugação, obteve-se 4 camadas distintas (Figura 4). A camada de células mononucleares foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur, e procedeu-se a lavagem em PBS por 3 vezes. A contagem celular bem como sua viabilidade foram realizadas em câmara de Neubauer com azul de Tripán.

Figura 3 - Figura representativa da bolsa de sangue total (à esquerda) após a coleta e da mesma bolsa após a centrifugação sendo retirada os subcomponentes (à direita)

Fonte: (SILVA, M. B., 2014)

Figura 4 - Figura representativa das 4 camadas obtidas após centrifugação do sangue total sobre Ficoll-Paque densidade 1077

Fonte: (SILVA, M. B., 2014)

As células obtidas foram então congeladas em solução criopreservante constituída por Soro Fetal Bovino + 10% DMSO, armazenadas em criotubos e mantidas em álcool isopropílico por 24 horas em freezer -80°C para posterior utilização em cultura celular.

4.2 GERAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS *EX VIVO*

As células mononucleares congeladas foram descongeladas em banho maria a 37°C por 30-60 segundos e imediatamente mergulhadas em meio RPMI 1640, pH 7,2 (Gibco Brl-Life Technologies, Grand Island, NY). Em seguida, procedeu-se a lavagem das células e o sedimento celular formado foi ressuspensionado em meio RPMI 1640 e uma nova separação em Ficoll-Paque (densidade 1077 +/-0,001 g/mL) foi realizada visando a eliminação de células mortas durante o processo de congelamento-descongelamento.

Para eliminar plaquetas e neutrófilos restantes no concentrado de linfomononucleares, realizou-se 3 centrifugações leves seriadas (260 g, 200 g e 160 g por 7 minutos à 4°C).

O sedimento celular obtido foi ressuspensionado em meio RPMI 1640 + 10% de SFB (denominado meio R-10).

Em placas de poliestireno de 12 poços, cada poço recebeu 1×10^7 células/mL e as diferentes condições de cultivo estão representadas na figura 5. As células foram incubadas a 37°C sob uma atmosfera de 5% CO₂ por 2 horas visando a aderência dos monócitos. O número de células a serem plaqueadas por poço e o tempo de aderência foram definidos após a realização de experimentos pilotos.

Após este período de aderência, o sobrenadante foi retirado e 2 mL de meio R-10 fresco foram adicionados nos poços controle (monócitos – Mo) ou 2 mL de DC-R10 (meio R10 acrescido de 33 ng de GM-CSF canino (cGM-CSF) e 50 ng de IL-4 canina (cIL-4) (R&D Systems) nos poços de Mo-DC. Nos poços denominados Mo-Tumor e DC-Tumor foram acrescentados 5, 50 ou 100 µg/mL de fator tumoral de melanoma canino.

Figura 5 - Modelo de plaqueamento do experimento de geração de células dendríticas *ex vivo*

Fonte: (SILVA, M.B., 2014)

Após tratar com GM-CSF e IL-4 no 1º, 3º e 6º dias de cultura, os monócitos foram mantidos em cultura até o 6º dia, quando as células foram coletadas com o auxílio de um *cell scraper*, contadas e uma parte foi avaliada fenotipicamente antes da adição dos estímulos de maturação. Outra parte das células foi colocada novamente em cultivo, em placas com 24 poços, a fim de receberem o estímulo de maturação, lá permaneciam por mais 24 horas (7º dia de cultivo celular). Após esse período, as células foram novamente coletadas, contadas e avaliadas fenotipicamente.

Para o estudo de maturação, as células no sexto dia de cultivo foram divididas em quatro poços: (1) sem estímulo de maturação; (2) 10 ug/ml de LPS (cepa 055:B5, Sigma); (3) 25 µg/ml de Poly I:C (Sigma); (4) 5% coquetel inflamatório plasmático (CIP) – figura 6. O chamado “coquetel inflamatório plasmático” foi oriundo do plasma de cadelas afetadas com piometra e em sepse grave gentilmente cedido pelo Dr. Augusto César Dias dos Santos. Dosagens prévias realizadas pelo pesquisador citado por meio de kit de ELISA detectaram as seguintes concentrações por mL de plasma: PGE-2α= 2000ng; IL-1=100ng; TNF-α=500ng; IL-6=200ng

(SANTOS, 2014).

Figura 6 - Modelo de plaqueamento do experimento de maturação celular com LPS, Poly I:C ou CIP

Fonte: (SILVA, M.B., 2014)

No dia 7, as células foram retiradas da cultura. Parte foi submetida à fenotipagem e ensaio de fagocitose e parte foi destinada ao ensaio de atividade aloestimulatória.

O rendimento da cultura foi calculado por meio da contagem celular de Mo-DCs obtidas ao final da cultura em relação ao número total de células mononucleares plaqueadas (número de Mo-DCs x 100/ número total de células mononucleares plaqueadas).

4.3 ENSAIO DE ATIVIDADE ALOESTIMULATÓRIA – MARCAÇÃO DE LINFÓCITOS COM CFSE

Para a avaliação da atividade aloestimulatória, utilizou-se o método de incorporação de CarboxyFluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE-DA), no qual as células marcadas podem ser cultivadas e a proliferação avaliada.

O CFSE liga-se de forma covalente a moléculas intracelulares através de um corante fluorescente – carboxifluoresceína. Quando uma célula previamente marcada entra em mitose, as células filhas recebem proporcionalmente a quantidade de moléculas marcadas com o fluoróforo, a partir de então a divisão celular consegue ser avaliada através de citometria de fluxo.

Os monócitos e Mo-DCs obtidos após cultivo celular de 7 dias foram submetidas ao co-cultivo com linfócitos para se determinar a capacidade linfoproliferativa destas células. As células respondedoras foram linfócitos alogênêicos.

Os linfócitos foram descongelados em banho-maria durante 30-60 segundos e imediatamente todo o volume foi colocado em tubo contendo meio RPMI e lavados em PBS por duas vezes. O *pellet* celular foi ressuspensionado em 1 mL de PBS, então, o tubo cônico do tipo Falcon foi deitado, uma gota de 110 µL de PBS foi pipetada na parede do tubo e nesta gota foi adicionado 1 µL de CFSE-DA a 5 mM. O tubo foi envolvido em papel alumínio e homogeneizado por inversão durante 5 minutos à temperatura ambiente (RT).

Após o período de marcação, as células foram lavadas com PBS + 5% de soro fetal bovino (300g RT por 5 minutos). Este procedimento foi repetido três vezes e as células foram ressuspensas em 270 µL de meio RPMI a 10% de Soro Fetal Bovino.

Foram plaqueadas em triplicata 1×10^4 células (monócitos ou DCs) + $2,7 \times 10^5$ linfócitos por poço.

A placa foi incubada por 5 dias à 37°C e 5% CO₂ e após este período as células foram avaliadas por citometria de fluxo.

Por meio das médias de intensidade de fluorescência, confeccionou-se um índice de estimulação, que foi calculado por: MFI dos linfócitos não estimulados/MFI dos linfócitos estimulados com as DCs.

4.4 ENSAIO DE ATIVIDADE FAGOCÍTICA

No sexto e sétimo dias de cultivo (pré e pós maturação), 2×10^5 células Mo e Mo-DC foram submetidas ao ensaio de fagocitose através de sua incubação com 30 μ L de SaPI (*Staphylococcus aureus* conjugado ao iodeto de propídeo) em PBS (volume final de 1 mL).

Os tubos foram mantidos 30 minutos sob agitação à temperatura de 37°C. Após este período, adicionou-se 2 mL de EDTA 3mM gelado e então procedeu-se lavagem com PBS. Por fim, as células foram ressuspensas em 300 μ L e avaliadas por citometria de fluxo.

4.5 IMUNOFENOTIPAGEM

Para a validação da geração de DCs realizou-se a imunofenotipagem nos dias 3 e 7 do cultivo. Para avaliação da maturação das DCs, a marcação foi realizada nos dias 6 (pré-maturação) e 24 horas após adição do agente estimulador – marcadores listados no quadro 2.

Antes do procedimento de marcação imunofenotípica das amostras, utilizou-se *Fc receptor blocking solution – Human trushtain Fc γ* (Biolegend ®) na proporção de 5 μ L para cada 100 μ L de suspensão celular e incubação das amostras a temperatura ambiente por 5 a 10 minutos conforme indicações do fabricante. Em seguida, utilizou-se os anticorpos descritos na Quadro 2, na proporção de 5 μ L de anticorpo para cada 100 μ L de suspensão celular, então as amostras foram incubadas por 30 minutos a 4°C protegidas da luz. Após esse período, as células foram lavadas e ressuspensas em 300 μ L de PBS em tubos de ensaio próprios para citometria de fluxo.

Após realizadas as devidas marcações, utilizou-se citômetro de fluxo (*Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA*) conectado ao computador (*Macintosh Apple, CA, USA*) para aquisição de dados. Foram adquiridos e analisados 10.000 eventos utilizando-se o software Cell Quest Pro (*Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA*).

Quadro2 - Anticorpos utilizados na imunofenotipagem das células obtidas no cultivo celular

Especificidade	Clone	Marcação	Fabricante
Rat anti-dog MHC class II	YKIX334.2	FITC	AbDSerotec
Mouse anti-dog CD11c	CA11.6A1	-	BioRad
Anti-mouse IgG1	RMG1-1	APC	Biolegend
Anti-mouse CD86	GL-1	PerCP	Biolegend
Anti-mouse CD80	16-10A1	PE	Biolegend

Para análise dos resultados obtidos, utilizou-se o *software TreeStar FlowJo* versão 7.6.5 para *Windows*. Neste *software*, obteve-se *dotplots* de tamanho x complexidade das células analisadas, em seguida selecionou-se um *gate* de análise abrangente, eliminando as células de baixa complexidade (abaixo de 400). A partir desta população selecionada, obteve-se um *dotplot* de fluorescência MHC II *versus* CD11c, onde a população de interesse era a do segundo quadrante (células duplo positivas para MHC II e CD11c ou MHC II⁺/CD11c⁺). Neste *dotplot* confeccionou-se dois novos *gates*: MHC II^{low} (intensidade de fluorescência entre 10¹ e 10²) e MHC II^{high} (intensidade de fluorescência acima de 10²) – figura 7. A partir destes *gates* obteve-se as MFI (intensidade média de fluorescência, unidades arbitrárias) dos parâmetros de fluorescência.

Figura 7 - Demonstração da seleção das populações de interesse a partir da confecção de gates

Fonte: (SILVA, M.B., 2014)

4.6 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS TUMORAIS

Durante cirurgia para extração de tumores primários e/ou metástases, partes dos melanomas foram selecionados e colocados em RPMI e partes em formol a 10% para confirmação do diagnóstico por exame histopatológico o qual foi realizado pelo médico veterinário responsável pelo atendimento clínico. Apenas amostras onde o diagnóstico foi o melanoma foram utilizadas no presente estudo.

Os fragmentos tumorais foram fracionados ao tamanho máximo de 1 mm³, sendo estes submetidos à digestão por collagenase tipo IV em banho-maria à 37°C sob agitação durante o tempo mínimo de 1 hora. A solução resultante da digestão foi passada em filtro de nylon de 70 micras. Em seguida, a viabilidade foi

avaliada – com a utilização do Azul de Tripán – e o número total de células tumorais foi contabilizado. As células foram ajustadas para uma quantidade de 1×10^7 células/ml e foram mantidas congeladas em solução de soro fetal bovino + DMSO 10%, a -80°C até o momento de uso.

Figura 8 - Procedimento de digestão tumoral

Fonte: (SILVA, M. B., 2014)

Legenda: (1) tumor fresco fracionado em fragmentos de 2 mm. (2) digestão por colagenase. (3) *pellet* celular obtido após centrifugação. (4) aliquotas a serem congeladas.

4.7 OBTENÇÃO DOS FATORES TUMORAIS DE MELANOMA CANINO

Os criotubos contendo as células tumorais foram descongelados em banho maria a 37°C por 30-60 segundos e mergulhadas em PBS para posterior lavagem. Para uma ruptura das células tumorais as amostras foram submetidas a

seis ciclos de congelamento-descongelamento usando nitrogênio líquido, seguida por banho com água a 100° C e sonicação.

A solução de células tumorais foi submetida a centrifugação a 2000 g por 30 min visando a retirada de debris celulares. A concentração de proteína do sobrandante tumoral foi determinada utilizando o método de *Bradford*, segundo as instruções do fabricante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 GERAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CANINAS *IN VITRO*

5.1.1 Obtenção de células linfomononucleares de animais sadios

As células dendríticas caninas do presente estudo foram geradas a partir de monócitos isolados do sangue periférico. Além do sangue periférico, as DCs caninas também podem ser geradas *in vitro* a partir de células precursoras provenientes de aspirados da medula óssea (ISOTANI et al., 2006). A escolha para o uso de sangue periférico foi feito pela praticidade de obtenção do material.

O sangue total coletado foi mantido em anticoagulante CPDA-1, por este possuir propriedades preservativas de hemácias melhores que a heparina e o citrato isolado (SCOTT et al., 2005). Goodell et al. (1985) isolaram DCs caninas pela primeira vez por meio de sangue periférico coletado por punção venosa em seringa contendo preservativo livre de heparina. Catchpole et al. (2002) coletaram 20 ml de sangue canino em seringa heparinizada. A literatura não descreve a necessidade do uso de um anticoagulante específico para a coleta de sangue destinado ao cultivo e posterior geração de DCs. Verificou-se no presente estudo que o anticoagulante CPDA-1 não interferiu negativamente no cultivo celular, podendo ser utilizado de forma rotineira com este propósito.

Utilizou-se o *buffy coat* extraído das bolsas devido a não utilização de hemácias e/ou plasma canino para o cultivo, permitindo assim o uso dos concentrados de hemácias e dos concentrados plasmáticos resultantes da centrifugação pela rotina do Banco de Sangue HOVET-USP, que abastece o serviço de Cirurgia do mesmo hospital veterinário. Até onde sabemos não foi descrito em literatura o uso de *buffy coat* canino como sendo o ponto de partida de cultivo de DCs.

No *buffy coat* canino encontram-se as células mononucleares, como os monócitos. A habilidade dos monócitos diferenciarem-se em DCs foi demonstrada por Sallusto e Lanzavecchia (1994), que reportaram a geração de DCs humanas

imaturas a partir de monócitos de sangue periférico *in vitro* quando colocados em cultura com GM-CSF e IL-4.

A obtenção de células linfomononucleares utilizando-se solução de gradiente modificado como o Ficoll-Paque é de uso rotineiro em metodologias de cultivo celular a partir de amostras biológicas. Para a geração de DCs, Yoshida et al. (2003) fizeram uso de Histopaque densidade 1077 g/dL, assim como Isotani et al. (2006). Goodell et al. (1985) adicionaram limalha de ferro ao sangue total para separação celular. Catchpole et al. (2002) utilizaram Lymphoprep densidade 1077 g/dL. De Carvalho et al. utilizaram tanto Lymphoprep densidade 1077 g/dL (2004) quanto Ficoll-Paque diluído com PBS (2006) deixando-o em densidade 1070 g/dL com o intuito de eliminação residual de neutrófilos e eosinófilos. Realizou-se tal diluição do Ficoll-Paque no presente estudo, contudo não foram observadas diferenças de separação entre as densidades 1077 e 1070 g/dL, optando-se então pelo uso do Ficoll-Paque densidade 1077 g/dL.

5.1.2 Plaquetaférese

Nos primeiros experimentos realizados no presente estudo, após a centrifugação do sangue diluído no Ficoll-Paque, as células linfomonucleares (LMN) foram imediatamente colocadas em condições de cultivo celular. Observou-se então a presença de grande quantidade de plaquetas entremeadas as células linfomonucleares. Nestes experimentos iniciais, observou-se que os poços monócitos e os poços onde foram adicionados GM-CSF+IL-4 possuíam características semelhantes. Ammon et al. (1998) realizaram um estudo onde demonstraram que o co-cultivo de monócitos e plaquetas – provavelmente por meio de seus fatores – induziam a diferenciação de monócitos em macrófagos, justificando então o fato das culturas, mesmo na presença de GM-CSF e IL-4, apresentarem células com morfologia de macrófagos e não apresentarem uma ótima geração de células dendríticas. Sendo assim, optou-se por, após a centrifugação com Ficoll-Paque, realizar-se centrifugações leves seriadas (260 g, 200 g e 160 g) com o intuito de eliminar o restante de plaquetas presentes em meio as LMN. De Carvalho et al. (2006) realizaram duas centrifugações a 180 g em seus experimentos

de cultivo celular. A figura 9 demonstra a diferença do antes e depois da plaquetaférese.

Figura 9 – Fotomicrografia dos cultivos celulares pré e pós plaquetaférese

Fonte: (SILVA, M.B., 2014)

Legenda: Figura representativa do cultivo celular sem centrifugações leves e com grande quantidade de plaquetas (à esquerda) e com centrifugações leves e sem plaquetas (à direita). Objetiva 20x.

5.1.3 Congelamento e descongelamento de linfomononucleares

Como as bolsas de sangue rendiam *buffy coat* canino com grande número de células LMN (aproximadamente $3,5 \times 10^8$ células por animal), estas foram congeladas em criotubos para sua utilização posterior.

A princípio, as células foram ressuspensas em solução de criopreservante constituída por Soro Fetal Bovino + 10% DMSO, e em seguida os criotubos foram deixados em freezer -80°C . Contudo, observou-se que a viabilidade celular após o descongelamento era $<20\%$. Em vista disso, passou-se a realizar um congelamento em duas etapas: (1) os criotubos eram mantidos imersos em álcool isopropílico por 24h à temperatura de -80°C , (2) os criotubos foram retirados da imersão e deixados apenas sob temperatura de -80°C e/ou mantidos congelados no nitrogênio líquido. Com este novo procedimento de congelamento, a recuperação de células viáveis após o descongelamento ultrapassou 50%.

Manzur et al. (1972) propuseram dois mecanismos principais de danos celulares na criopreservação: (1) injúria de congelamento lento relacionada à exposição das células a alta concentração de soluto (como formações de gelo) no líquido residual, (2) injúria por congelamento rápido relacionada à formação de cristais de gelo no interior da célula. A injúria por congelamento rápido ocorre por não haver tempo hábil para o transporte de água através da bicamada lipídica da membrana celular, levando a formação de gelo dentro da célula (RUDOLPH; CROWE, 1985).

Esse aumento na taxa de viabilidade nas células recuperadas deve-se ao uso do álcool isopropílico, uma vez que este possibilita congelamento gradual e constante das suspensões celulares (1°C/minuto), evitando assim a injúria celular por congelamento rápido descrita por Manzur e colaboradores.

Antes do início do cultivo celular as células foram descongeladas em banho-maria a 37°C por até 2 minutos e imediatamente colocadas em meio R-10 e centrifugadas para a retirada do criopreservante.

5.1.4 Cultura de células linfomononucleares para a geração de DCs

Corroborando com Wang et al. (2007a), foi percebido que um tempo maior de aderência permitiu um maior rendimento ao final do cultivo. Eles mensuraram a expressão de CD14 (marcador de monócitos) em culturas onde o procedimento de aderência foi realizado e naquelas onde não foi, concluíram que os linfomononucleares aderentes possuíam altas expressões de CD14, sugerindo que o procedimento de aderência excluía os linfócitos da cultura e, conseqüentemente, a enriquecia com monócitos.

Ao fim de 6 dias de cultura, as células foram analisadas morfolologicamente sob microscopia óptica em contraste de fase. Nos poços Mo-DC encontravam-se células não aderentes, arredondadas (*ballon-like*), com prolongamentos citoplasmáticos ao longo de toda superfície celular, sendo estas compatíveis com as características usualmente descritas para DCs – figura 10 – estas células são semelhantes àquelas que Steiman identificou em 1973, e que nos últimos anos

outros pesquisadores como Ibisch (2005); De Carvalho (2006); Wang (2007a) e Sugiura (2010) e seus colaboradores detectaram em suas culturas.

Nos poços Mo, as células observadas eram arredondadas, aderentes ao fundo do poço e não apresentavam prolongamentos citoplasmáticos, sendo esta compatíveis com monócitos – figura 11.

Figura 10 - Fotomicrografia (objetiva de 40x) de uma placa de cultura Mo-DC após 6 dias

Fonte: (SILVA, M.B., 2014)

Legenda: Observa-se a presença de células com prolongamentos dendríticos em toda sua extensão (seta).

Figura 11 - Fotomicrografia (objetiva de 40x) de uma placa de cultura Mo após 6 dias

Fonte: SILVA MB, 2014.

Legenda: Observa-se a presença de células esféricas ao longo de toda placa, nestas não são evidenciados prolongamentos citoplasmáticos, sugerindo a diferenciação de monócitos em macrófagos.

Ao observar o aspecto das células dos poços ao menor aumento sob microscopia óptica em contraste de fase também foi possível observar diferença entre os cultivos – figura 12. Nos poços Mo, as células se dispunham de maneira uniforme ao longo da placa, conseguia-se observá-las de maneira individual, deixando poucos espaços livres entre as células. Por outro lado, nos poços Mo-DC as células apresentavam distribuição irregular ao longo da placa, formando grandes agrupamentos celulares, deixando vários espaços sem cobertura celular.

Figura 12 - Fotomicrografia da distribuição celular das placas Mo (à esquerda) e Mo-DC (à direita)

Fonte: (SILVA, M.B., 2014)

Legenda: Nota-se que a distribuição das células Mo é homogênea ao longo da placa, enquanto as células Mo-DC tendem-se a se agrupar em certos pontos da placa, formando grumos (Objetiva 20x)

5.1.5 Rendimento da geração das DCs caninas em cultura de 6 dias de monócitos caninos

Foram realizados 11 cultivos celulares com diferentes concentrações iniciais de monócitos, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Tabela de rendimento do cultivo celular de monócitos. Mo-DC: DC imaturas geradas após 7 dias de cultivo celular)

Experimento	Mo plaqueados	Mo-DC no 6º dia de cultivo	Rendimento
1	1×10^7	7.5×10^6	75%
2	1×10^7	3.96×10^6	39.6%
3	2×10^7	9.58×10^6	47.9%
4	2×10^7	1.04×10^7	52%
5	2×10^7	8.96×10^6	44.8%
6	2×10^7	6.24×10^6	31.2%
7	1×10^7	5.18×10^6	51.8%
8	9×10^6	1.7×10^6	19%
9	2×10^7	5.38×10^6	26.9%
10	9×10^6	4.35×10^6	48%
11	3×10^6	4.68×10^5	15.6%

O rendimento da cultura foi calculado por meio da contagem celular de Mo-

DCs obtidas ao final da cultura em relação ao número total de células mononucleares plaqueadas no primeiro dia de cultura (número de Mo-DCs x 100/ número total de células mononucleares plaqueadas). A média de rendimento dos experimentos realizados no presente estudo foi de 41%. Esta média encontra-se ligeiramente superior aos rendimentos encontrados por Yoshida et al. (2003) – 25%, e Bund et al. (2010) – 24%; semelhante à de Sugiura et al. (2010) – 37.3%; e altamente superior à de Wang et al. (2007a) – 6.32%.

5.1.6 Caracterização fenotípica

O interesse desse estudo foi analisar estas células ao longo da cultura e para isso as células foram avaliadas no dia 3 e 7 e 24 horas após maturação.

5.1.6.1 Modificação fenotípica ao longo do cultivo celular das células Mo e Mo-DC

Foi realizada marcação imunofenotípica das células Mo e Mo-DC nos dias 3 e 7 do cultivo para identificar modificações fenotípicas nas células cultivadas.

A figura 13 demonstra o perfil fenotípico das células no dia 3 do cultivo. Por meio de um gráfico de tamanho x granulosidade, pode-se observar no cultivo de Mo-DC células de maior tamanho em relação ao cultivo Mo. Observou-se também a formação de duas populações distintas nas culturas: MHC II^{low} e MHC II^{high}. As células Mo-DC apresentam, ainda que de maneira discreta, uma maior porcentagem de células MCH II^{high}. Em relação ao dia 7 (Figura 14), as células Mo-DC apresentavam maior quantidade de células na população MHC II^{high} e maior MFI em relação aos poços Mo.

Percebeu-se que este perfil fenotípico não foi constante ao longo das culturas realizadas. Acreditamos que esta variabilidade fenotípica se deve a variação individual dos cães doadores, uma vez que as condições de cultivo eram as mesmas.

Figura 13 - *Dotplots* representativos das células Mo (A e C) e Mo-DC imaturas (B e D) no terceiro dia de cultivo celular

A

B

C

D

Fonte: (SILVA, M.B., 2014)

Figura 14 - *Dotplots* representativos das células Mo (A e C) e Mo-DC imaturas (B e D) no sétimo dia de cultivo celular

Fonte: (SILVA, M.B., 2014)

5.1.6.2 Maturação das DCs geradas

O processo de maturação é complexo e é caracterizado pelo aumento na expressão dos níveis de MCH II e moléculas co-estimatórias, que juntas promovem alterações importantes no processamento e apresentação de antígenos, comportamento migratório e capacidade de induzir e modular células T, B e NK (LÉON et al., 2005).

O chamado “coquetel inflamatório plasmático” (CIP) foi oriundo do plasma de

cadelas afetadas com piometra e em sepse grave. Por ser uma inflamação/infecção uterina importante, há liberação de grandes concentrações plasmáticas de PGF-2 α (HAGMAN et al., 2006), TNF- α e IL-6 (FRANSSON, 2003). Processos inflamatórios geram um coquetel de citocinas que também podem afetar as funções do sistema imune. Fransson (2003) demonstrou que cadelas com piometra possuem altas concentrações plasmáticas de IL-6, TNF α e proteína C reativa, estando elas em síndrome da resposta inflamatória sistêmica.

Wang et al. (2007b) realizaram dois ensaios de maturação de DCs caninas, um utilizando LPS e outro TNF- α . Após o período de incubação, analisaram a eficácia da maturação e o perfil de citocinas liberadas após maturação. Concluíram que tanto o LPS quanto o TNF- α induziram maturação das DCs. Embora as alterações fenotípicas celulares causadas por ambos agentes indutores de maturação fossem semelhantes, os estímulos geraram diferentes respostas aloestimulatórias de células T – o LPS promoveu liberação de citocinas que promovem atividade Th1 enquanto as DCs maturadas por TNF- α produziram citocinas que promovem atividade Th2.

Cella et al. (1999) realizaram a maturação de DCs humanas com Poly I:C, LPS, TNF- α e IFN- α . Concluíram que a Poly I:C promove aumento e expressão MHC II, CD80, CD86, CD83 – fenótipo característico de DCs maduras humanas – de maneira tão efetiva quanto TNF- α e LPS.

Apesar dos estudos supracitados terem obtidos respostas significantes em relação a maturação, este estudo não foi conclusivo neste aspecto. As alterações fenotípicas esperadas pós maturação não foram encontradas. A tabela 2 demonstra que as MFI pré e pós maturação.

Tabela 2 - MFI das DCs imaturas e maduras

Doador 1	MHC II	CD11c	CD80	CD86
DC imatura	21,8	27	6,79	2,03
DC LPS	19	46,3	6,95	1,82
DC Poly I:C	21,9	26	6,57	1,98
Doador 2				
DC imatura	12,4	14,1	1,51	16,5
DC LPS	11,9	14,4	1,37	17,2
DC Poly I:C	12,3	15,6	1,5	18,3
DC CIP	12,2	14,4	1,24	14,7

Gutzwiller et al. (2010) confirmaram que as DCs caninas expressam CD1c, CD11c, MHC II, CD80, CD86 e CD40. Contudo o estudo comparativo de monócitos e macrófagos, demonstraram que nenhum marcador tipicamente usado pra diferenciar DCs de monócitos/macrófagos incluindo CD1c, CD11b, CD11c, e CD14 permite identificar DCs caninas quando utilizados isoladamente. Um critério funcional importante das DCs relacionado ao seu papel na imunidade inata é a resposta para muitos ligantes TLR em termos de maturação e produção de citocinas. Usando este critério, eles demonstraram que Mo-DCs estimuladas com LPS em contraste com os macrófagos, aumentam a expressão de MHC II, CD80, CD40.

Um obstáculo encontrado no presente estudo foi a marcação imunofenotípica de maneira eficiente.

Uma hipótese para baixa marcação é a formação de grandes agregados celulares nos cultivos de Mo-DC. Estes agregados são de difícil separação. Sendo assim, a superfície livre para marcação com anticorpos é menor nos agregados celulares quando comparados com a superfície total somada das células individualmente, diminuindo consequentemente a MFI das culturas.

Outra hipótese é a marca e o tipo dos anticorpos. O anticorpo MHC II utilizado no presente estudo é rat anti-dog (Serotec®), enquanto outros pesquisadores utilizaram anti-human (Bioscience®) e anti-mouse (Serotec®), há ainda pesquisadores que utilizaram anticorpos produzidos na Universidade da Califórnia pelo grupo de pesquisa de Peter Moore. O mesmo ocorre com os anticorpos CD80 e CD86, que no presente estudo foram utilizados anti-mouse enquanto em outros estudo foi utilizado anti-human ou anti-canine. Quanto ao CD11c, o anticorpo utilizado era primário, necessitando de um anticorpo secundário para marcação; este segundo passo pode influenciar a marcação, embora tenha sido utilizado três diferentes anticorpos secundários até optar-se pelo anti-mouse IgG1-APC (Biolegend®).

5.1.7 Caracterização funcional

Com intuito de iniciar as respostas de células T, as DCs precisam passar pelo processo de maturação, esta inclui alterações funcionais. A caracterização

adequada das DCs caninas deve incluir, além da descrição morfológica e fenotípica, as análises funcionais de atividade fagocítica e aloestimulatória de células T *naïve*.

5.1.7.1 Atividade fagocítica

A atividade fagocítica das células cultivadas foi realizada por meio da incubação com SaPI.

A média das porcentagens de fagocitose das células Mo e Mo-DCs no 6º dia de cultivo (iDCs) e 24 horas pós adição dos estímulos de maturação está representada no gráfico 1.

Após 24 horas do tratamento das DCs imaturas com LPS/Poly I:C/CIP, as células demonstram queda na capacidade de internalizar o antígeno, sinalizando a maturação das DCs. No entanto, semelhante à fenotipagem foi observada uma grande variabilidade entre os experimentos.

Gráfico 1 – Porcentagem de fagocitose avaliada 24 horas após adição dos estímulos

Fonte: (SILVA, M.B., 2014)

A redução da atividade fagocítica com o processo de maturação foi descrita

por Sallusto et al. (1995) para DCs humanas e Isotani (2006); Wijewardana (2006) e Wang (2007b) para DCs caninas, fato este também visto nas DCs caninas deste estudo.

5.1.7.2 Atividade aloestimulatória

Neste estudo, a partir de 3 experimentos foi observado que os macrófagos demonstraram menor capacidade de aloestimulação em relação as DCs maturadas com LPS/Poly I:C/CIP – Gráfico 2. Observa-se não haver diferença de atividade aloestimulatória das DCs maturadas com CIP em relação àquelas com LPS ou Poly I:C, apesar de apenas um animal ter demonstrado uma queda significativa após a maturação com CIP. Apesar de não termos o conhecimento de todos os componente presentes neste coquetel plasmático, sugerimos que o TNF- α , IL-1, IL-6 e PGE-2 α tenham sido os agentes promotores desta maturação uma vez que os níveis foram respectivamente: 25 ng, 5 ng, 10 ng e 100 ng (SANTOS, 2014). Até onde sabemos, este é o primeiro trabalho que utilizou esta abordagem no processo de maturação de DCs caninas. Contudo, em humanos, esta abordagem é realizada desde 1997 (JONULEIT et al., 1997), tanto que este coquetel é conhecido como coquetel de citocinas ou “Coquetel Jonuleit”. Este coquetel foi proposto para maturar DCs. Jonuleit et al. (1997) descrevem que a PGE-2 α reforça a maturação das DCs humanas desde que estas células estejam num ambiente pró-inflamatório (na presença de IL-1, TNF- α e LPS) e seja adicionada ao cultivo após o 5º dia, caso contrário a PGE-2 α irá inibir por completo a maturação das DCs. A concentração das citocinas e do PGE-2 α utilizadas no cultivo do presente estudo não são discrepantes dos estudos realizados com DCs murinas (KIMA et al., 2010)

Gráfico 2 - Representação gráfica dos índices de estimulação das células MO, DCs imaturas e maturadas com diferentes agentes

Fonte: (SILVA, M. B., 2014)

Legenda: IRL = Índice relativo de linfoproliferação

A atividade aloestimulatória baseia-se na capacidade das DCs em induzir a ativação e proliferação de células T, principalmente células T CD4+, que serve como um ensaio funcional para determinação da apresentação de antígenos (BANCHEREAU; STEIMAN, 1998).

Assim como os humanos e roedores, a atividade aloestimulatória em cães pode ser realizada por meio do co-cultivo das DCs com linfócitos, seguido pela medição da proliferação celular realizada por meio da incorporação do CFSE-DA aos linfócitos e avaliação da divisão celular por citometria de fluxo (WIJEWARDANA et al., 2006; WANG et al., 2007b; GUTZWILLER et al., 2010).

Banchereau e Steiman (1998) demonstraram em roedores que as DCs possuem capacidade aloestimulatória maior que macrófagos, da mesma forma que os achados encontrados neste estudo em cães.

A partir do momento em que os estudos morfológicos e funcionais demonstraram estamos gerando células dendríticas caninas prosseguimos para os estudos subsequentes para averiguar os efeitos dos fatores tumorais na geração e maturação destas células.

5.2 AVALIAÇÃO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FATORES DERIVADOS DE MELANOMA CANINO SOBRE AS DCS DERIVADAS DE MONÓCITOS

As DCs circulantes ou infiltradas nos tumores de pacientes com câncer parecem ser fenotípica e funcionalmente deficientes. Os tumores de forma geral produzem um grande número de fatores imunossupressivos que bloqueiam a maturação de células-tronco CD34+ e monócitos em DCs (GABRILOVICH et al., 1996).

O presente estudo avaliou a geração de DCs caninas derivadas de monócitos quando pulsadas com diferentes concentrações de fatores derivados de melanoma canino.

Os fatores tumorais – nas concentrações de 5, 50 ou 100 µg/ml – foram adicionados aos poços no primeiro dia de cultivo celular após a retirada das células não aderentes. Durante o cultivo as células foram avaliadas funcionalmente, através dos ensaios de fagocitose e atividade aloestimulatória.

5.2.1 Caracterização funcional das DCs cultivadas na ausência e presença de fator tumoral de melanoma canino

As DCs caninas cultivadas com fator tumoral foram avaliadas funcionalmente por meio da atividade fagocítica e aloestimulatória de células T *naïve*.

5.2.1.1 Atividade fagocítica

No presente estudo comparou-se a atividade fagocítica das DCs geradas na presença do extrato tumoral.

Os resultados demonstram que o fator tumoral de melanoma, apesar de não ter sido observada uma diferença estatisticamente significativa (provavelmente

devido ao n baixo), em altas concentrações (50 e 100 $\mu\text{g/mL}$) interferiu na capacidade fagocítica das DCs imaturas geradas, podendo indicar que os fatores tumorais realizaram uma maturação nas DCs – gráficos 3 e 4.

Gráfico 3 - Representação gráfica da porcentagem de fagocitose realizadas pelas DCs imaturas geradas na ausência e na presença de diferentes concentrações de fatores tumorais

Fonte: (SILVA, M.B., 2014)

Gráfico 4 - Representação gráfica das médias de intensidade de fluorescência da SaPI durante fagocitose realizadas pelas DCs imaturas geradas na ausência e na presença de diferentes concentrações de fator tumoral

Fonte: (SILVA, M.B., 2014)

5.2.1.2 Atividade aloestimulatória

O presente estudo avaliou a atividade aloestimulatória das DCs maduras cultivadas na ausência e na presença do extrato tumoral de melanoma em diferentes concentrações.

Para tal avaliação se estabeleceu o Índice Relativo de Linfoproliferação - IRL. Este índice foi calculado a partir da divisão do índice absoluto dos co-cultivos das DCs cultivadas com extrato tumoral (MFI linfócitos não estimulados/MFI do co-cultivo linfócitos e DCs) pelo índice absoluto dos co-cultivos das DCs cultivadas na ausência de fatores tumorais.

O gráfico 5 demonstra que as DCs maturadas com LPS, Poly I:C e CIP tiveram capacidade aloestimulatória semelhante, contudo a concentração de fator tumoral de melanoma alterou os IRL. As concentrações de 50 e 100 µg/ml apresentaram maior atividade aloestimulatória, apontando que possivelmente o fator tumoral foi um fator adicional de maturação das DCs.

Gráfico 5 - Representação gráfica dos IRL das DCs maturadas com LPS, Poly I:C e CIP

C

Fonte: (SILVA, M.B., 2014)

Os resultados dos ensaios de fagocitose e atividade aloestimulatória de linfócitos sugeriram que os monócitos co-cultivados com fator tumoral de melanoma geraram DCs com atividade funcional semelhante às DCs maduras, de maneira semelhante a Kiertscher et al. (2000). Eles avaliaram o efeito de sobrenadantes tumorais – provenientes de carcinoma renal, melanoma, tumores de mama e de pulmão – adicionados ao cultivo de monócitos humanos. Seus dados demonstraram que os monócitos cultivados junto ao sobrenadante tumoral aumentaram a expressão de marcadores de superfície de APC (CD80, CD86, CD40 e MHC II) e desenvolveram capacidade aloestimulatória semelhante à DC madura, contudo, essas DCs geradas perderam a capacidade de produzir IL-12, não adquiriram total capacidade aloestimulatória e rapidamente entraram em apoptose.

Chiang et al. (2011) cultivaram DCs humanas com lisado tumoral e também obtiveram capacidade estimulatória de células T. Miwa et al. (2012) corroboram a hipótese que o lisado tumoral promove a maturação de DCs *in vitro*.

Contudo, os resultados contrariam Menetrier-Caux et al. (1998) que descrevem que as linhagens tumorais inibem a diferenciação dos monócitos em DCs, alterando suas características fenotípicas e funcionais.

No presente estudo por não ter havido a determinação de citocinas provenientes do sobrenadante do co-cultivo de Mo-DCs e linfócitos alogênêicos não podemos determinar qual a o perfil de modulação que as Mo-DCs sofreram na presença dos fatores tumorais. Devido a heterogeneidade de subpopulações de DCs, DCs maduras podem apresentar um perfil efector ou tolerogênico, sendo isto determinado pelas citocinas secretadas (MA et al., 2012).

O desenvolvimento do presente estudo demonstrou que a geração de DCs caninas é exequível, apesar da grande variabilidade individual observada entre as culturas. Desde o início dos cultivos de DCs caninas feitos por Goodell em 1985 até atualmente, não foi estabelecido um protocolo ótimo de geração de DCs caninas *in vitro*. Portanto, os trabalhos que visam um maior conhecimento da relação das DCs e tumor, bem como sua utilização na imunoterapia devem sofrer um aprimoramento em relação as técnicas de cultivo e um avanço dos marcadores que definem as subpopulações DCs caninas.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- As DCs caninas podem ser geradas *in vitro* por meio do uso de *buffy coat* extraído de bolsas de sangue na presença de cGM-CSF e cIL-4.
- Foram geradas diferentes subpopulações de DCs caninas, sendo as duas mais evidentes MHC II^{low}/CD11c⁺ e MHC II^{high}/CD11c⁺.
- DCs derivadas de monócitos sanguíneos foram geradas mesmo na presença de fatores tumorais derivados de melanoma canino.
- Devido a grande variabilidade entre as amostras não foi possível concluir se os fatores derivados do melanoma canino interferem no processo de maturação de DCs.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AKBARI, O.; DEKRUYFF, R.H.; UMETSU, D.T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. **Natural Immunology**, v. 2, p.725-31, 2001.

ALLAVENA, P.; PIEMONTI, L.; LONGONI, D. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 28, p.359–69, 1998.

AMMON, C.; KREUTZ, M.; REHLI, M.; KRAUSE, S.W.; ANDREESEN, R. Platelets induce monocyte differentiation in serum-free coculture. **Journal of Leukocyte Biology**, v.63, p.469-476,1998.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**,v. 392, p. 245–252, 1998.

BENITEZ-RIBAS, D.; BORRÀS, F. E.; DEL VAL, M.; LASARTE, J. J.; MARAÑÓN, C.; MARTÍN-GAYO, E.; SAROBE, P. Dendritic cells: nearly 40 years later. **Imunología**, v. 31, n. 2, p. 49-57, 2012.

BERGMAN, P. J.; WOLCHOK, J. D. Of mice and men (and dogs): development of a xenogeneic DNA vaccine for canine oral malignant melanoma. Review Article. **Cancer Therapy**, v. 6, p. 817–826, 2008.

BIENZLE, D.; REGGETI, F.; CLARK, M.E.; CHOW, C. Immunophenotype and functional properties of feline dendritic cells derived from blood and bone marrow. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 96, p. 19-30, 2003.

BIRKLE, S.; ZENG, G.; GAO, L.; YU, R.K.; AUBRY, J. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. **Biochimie**, v. 85, p. 455–63, 2003.

BODEY, B. Spontaneous regression of neoplasms: new possibilities for immunotherapy. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 2,p. 459–76, 2002.

BRONTE, V.; CHAPPELL, D.B.; APOLLONI, E. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. **Journal of Immunology**, v. 162, p.5728–5737, 1999.

BRUNE, B.; VON KNETHEN, A.; SANDAU, K.B. Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 6, p. 969–75, 1999.

BUND, D.; BUHMANN, R.; GÖKMEN, F.; KREMSER, A.; DREYSSIG, J.; KOLB, H. J.; SCHMETZER, H. M. Canine-DCs using different serum-free methods as an approach to provide an animal-model for immunotherapeutic strategies. **Cellular immunology**, v. 263, n. 1, p. 88–98, 2010.

BURNET, F.M. The concept of immunological surveillance. **Experimental Tumor Research**, v. 13, p. 1-27, 1970.

CATCHPOLE, B.; STELL, A.J.; DOBSON, J.M. Generation of blood-derived dendritic cells in dogs with oral malignant melanoma. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, p. 238, 2002.

CELLA, M.; SALIO, M.; YOICHI, S.; LANGEN, H.; JULKUNEN, I.; LANZAVECCHIA, A. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 5, p. 821-829, 1999.

CELLA, M.; SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 9, p. 10-16, 1997.

CHAN, S.S.; MCCONNELL, I.; BLACKLAWS, B.A. Generation and characterization of ovine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. **Immunology**, n. 107, p. 366-72, 2002.

CHIANG, C.L.; HAGEMANN, A.R.; LESKOWITZ, R.; MICK, R.; GARRABRANT, T.; CZERNIECKI, B.J.; KANDALAFT, L.E.; POWELL, D.J.; COUKOS, G. Day-4 myeloid dendritic cells pulsed with whole tumor lysate are highly immunogenic and elicit potent anti-tumor response. **Plos One**, v. 6, n. 12, p. 1-12, 2011.

DE CARVALHO, C. M.; BONNEFONT-REBEIX, C.; CHABANNE, L. Dendritic cells in different animal species: an overview. **Pathologie Biologie**, v.54, p. 85-93, 2006.

DE CARVALHO, C. M.; BONNEFONT-REBEIX, C.; PICANDET, S.; BERNAUD, J.; PHOTHIRATH, P.; CHABANNE, L.; MARCHAL, T. Evaluation of elutriation and magnetic microbead purification of canine monocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 101, n.3-4, p. 171-8, 2004.

ENK, A.H.; JONULEIT, H.; SALOGA, J.; KNOP, J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. **International Journal of Cancer**, v. 73, p. 309-316, 1997.

ESCHE, C.; LOKSHIN, A.; SHURIN, G.V.; GASTMAN, B.R.; RABINOWICH, H.; WATKINS, S.C.; LOTZE, M.T.; SHURIN, M.R. Tumor's other immune targets: dendritic cells. **Journal Leukocyte Biology**, v. 66, p. 336-344, 1999.

FACCHETTI, F.; DE WOLF-PEETERS, C.; DE GREEF, H.; DESMET, V.J. Langerhans cells in various benign and malignant pigment-cell lesions of the skin. **Archives of Dermatology Research**, v. 276, p. 283-7, 1984.

FRANSSON, B.A. **Systemic inflammatory response in canine pyometra**. 2003. 49 p. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, 2003.

GABRILOVICH, D.; ISHIDA, T.; OYAMA, T. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. **Blood**, v. 92, p.4150-4166, 1998.

GABRILOVICH, D.; CIERNIK, I. F.; CARBONE, D. P. Dendritic cells in antitumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts. **Cellular Immunology**, v. 170, p. 101, 1996.

GALLO, P.M.; GALLUCCI, S. The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p.138, 2013.

GOODELL, E.M.; BLUMENSTOCK, D.A.; BOWERS, W.E. Canine dendritic cells from peripheral blood and lymph nodes. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.8, p. 301–310, 1985.

GROUARD, G.; RISSOAN, M. C.; FILGUEIRA, L.; DURAND, I.; BANCHEREAU, J.; LIU, Y. J. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. **The Journal of Experimental Medicine**, v.185, n.6, p.1101-1111, 1997.

GUTZWILLER, M.; MOULIN, H.; ZURBRINGEN, A.; ROOSJE, P.; SUMMERFIELD, A. Comparative analysis of canine monocyte- and bone-marrow-derived dendritic cells. **Veterinary Research**, v.41, p.40, 2010.

HÄGGLUND, H.G.; MCSWEENEY, P.A.; MATHIOUDAKIS, G.; BRUNO, B.; GEORGES, G.E.; GASS, M.J.; MOORE, P.; SALE, G.E.; STORB, R.; NASH, R.A. Ex vivo expansion of canine dendritic cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. **Transplantation**, v.70, p.1437–1442, 2000.

HAGMAN, R.; KINDAHL, H.; LAGERSTEDT, A-S. Pyometra in bitches induces elevated plasma endotoxin and prostaglandin F2 α metabolite levels. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.47, n.1, p.55-68, 2006.

HAMMOND, S.A.; HOROV, D.; MONTELARO, R.C. Functional characterization of equine dendritic cells propagated ex vivo using recombinant human GM-CSF and recombinant IL-4. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.71, p.197-214, 1999.

HOWARD, C.J.; BROOKE, G.P.; WERLING, D.; SOPP, P.; HOPE, J.C.; PARSONS, K.R. Dendritic cell in cattle: phenotype and function. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.72, p.119-124, 1999.

IBISCH, C.; PRADAL, G.; BACH, J. M.; LIEUBEAU, B. Functional canine dendritic cells can be generated in vitro from peripheral blood mononuclear cells and contain a cytoplasmic ultrastructural marker. **Journal of immunological methods**, v.298, n.1-2, p.175–182, 2005.

INABA, K.; NAKANO, K.; MURAMATSU, S. Cellular synergy in the manifestation of accessory cell activity for in vitro antibody response. **Journal of Immunology**, v.127, p.453-461, 1981.

INABA, K.; STEIMAN, R.M. The immunologic properties of purified Langerhans cells: distinct requirements for the stimulation of unprimed and sensitized T lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v.164, p.605-613, 1986.

ISOTANI, M.; KATSUMA, K.; TAMURA, K.; YAMADA, M.; YAGIHARA, H.; AZAKAMI, D.; ONO, K. Efficient generation of canine bone marrow-derived dendritic cells. **The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science**, v.68, n.8, p.809-14, 2006.

JONULEIT, H.; KÜHN, U.; MÜLLER, G.; STEINBRINK, K.; PARAGNIK, L.; SCHMITT, E. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. **European Journal of Immunology**, v.27, p.3135-42, 1997.

KIERTSCHER, S.M.; LUO, J.; DUBINETT, S.M.; ROTH, M.D. Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. **Journal of Immunology**, v.164, p.1269-1276, 2000.

KIMA, H. J.; KIM, H.; LEEB, K.; BAEK, E. J.; KIM, H. Two-step maturation of immature DCs with proinflammatory cytokine cocktail and poly(I:C) enhances migratory and T cell stimulatory capacity. **Vaccine**, v.28, p.2877-2886, 2010.

KRUGER-KRASAGAKES, S.; KRASAGAKIS, K.; GARBE, C. Expression of interleukin 10 in human melanoma. **British Journal of Cancer**, v.70, p.1182-1185, 1994.

LADANYI, A.; KISS, J.; SOMLAI, B.; GILDE, K.; FEJOS, Z.; MOHOS, A.; GAUDI, I.; TIMAR, J. Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. **Cancer Immunology Immunotherapy**, v.56, p.1459-1469, 2007.

LÉON, B.; LÓPEZ-BRAVO, M.; ARDAVÍN, C. Monocyte-derived dendritic cells. **Seminars in Immunology**, v. 1, p.313-318, 2005.

LIZEE, G.; RADVANYI, L.G.; OVERWIJK, W.W.; HWU, P. Improving antitumor immune responses by circumventing immunoregulatory cells and mechanisms. **Clinical Cancer Research**, v.12, p.4794-4803, 2006.

LOTZE, M.T. Getting to the source: dendritic cells as therapeutic reagents for the treatment of patients with cancer. **Annals of Surgery**, v.226, p.1-5, 1997.

LUTZ, M.B.; SCHULER, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? **Trends in Immunology**, v.23, p.445-449, 2002.

MA, Y.; SHURIN, G.V.; GUTKIN, D.W.; SHURIN, M.R. Tumor associated regulatory dendritic cells. **Seminars in Cancer Biology**, v.22, p.298-306, 2012.

MANZUR, P.; LEIBO, S. P.; CHU, E.H.Y. A two factor hypothesis of freezing injury. **Experimental Cell Research**, v.71, p.345-355, 1972.

MELCHER, A.; BATEMAN, A.; HARRINGTON, K.; AHMED, A.; GOUGH, M.; VILE, R. Dendritic cells for the immunotherapy of cancer. **Clinical Oncology**, v.14, n.3, p.185–192, 2002.

MENETRIER-CAUX, C.; MONTMAIN, G.; DIEU, M.C. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. **Blood**, v.92, p.4778–91, 1998.

MIWA, S.; NISHIDA, H.; TANZAWA, Y.; TAKATA, M.; TAKEUCHI, A.; YAMAMOTO, N.; SHIRAI, T.; HAYASHI, K.; KIMURA, H.; IGARASHI, K.; MIZUKOSHI, E.; NAKAMOTO, Y.; KANEKO, S.; TSUCHIYA, H. TNF-alpha and tumor lysate promote the maturation of dendritic cells for immunotherapy for advanced malignant bne and soft tissue tumors. **Plos One**, v.7, p. 1-8, 2012.

PACK, M.D.; OLIVIER, W.; VALINSKY, J.; SCHULER, G.; STEINMAN, R.M. Granulocyte/macrophage colony– stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 166, p.1484-98, 1987.

PAILOT, R.; LAVAL, F.; AUDONNET, J.C.; ANDREONI, C.; JUILLARD, V. Functional and phenotypic characterization of distinct porcine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. **Immunology**, v.102, p.396-404, 2001.

PAOLONI, M.; KHANNA, C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. **Nature Reviews Cancer**, v.8, p. 147–156, 2008.

PÉGUET-NAVARRO, J.; SPORTOUCH, M.; POPA, J.; BERTHIER, O.; SCHMITT, D.; PORTOUKALIAN, J. Gangliosides from human melanoma tumor impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. **Journal of Immunology**, v.170, p.3488-3494, 2003.

PIZON-CHARRY, A.; MAXWELL, T.; LÓPEZ, J.A. Dendritic cell dysfunction in cancer: A mechanism for immunosuppression. **Imunology & Cell Biology**, v.83, p.451-461, 2005.

REIS E SOUSA, C. Dendritic cells in a mature age. **Nature**, v.6, p.476-483, 2006.

REIZIS, B.; COLONNA, M.; TRINCHIERI, G.; BARRAT, F.; GILLIET, M. Plasmacytoid dendritic cells: one-trick ponies or workhorses of the immune system? **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 558-565, 2011.

RUDOLPH, A.S.; CROWE, J.H. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, thehalose and proline. **Cryobiology**, v.22, p.367-377, 1985.

SALLUSTO, F.; CELLA, M.; DANIELI, C.; LANZAVECCHIA, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the

major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. **Journal of Experimental Medicine**, v.182, p.389–400, 1995.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **Journal of Experimental Medicine**, v.179, n.4, p.1109-1118, 1994.

SANTOS, A.C.D. **Avaliação da predisposição genética e fatores preditivos para o desenvolvimento do choque séptico em cadelas acometidas por piometra**. 2014. 148f. Tese de doutorado apresentada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 2014.

SATPATHY, A. T.; ALBRING, J. C.; EDELSON, B. T.; KRETZER, N. M.; BHATTACHARYA, D.; MURPHY, T. L.; MURPHY, K. M. Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 6, p. 1135-1152, 2012.

SCOTT, K. L.; LECAR, J.; ACKER, J. P. Biopreservation of red blood cells: past, present, and future. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 19, n. 2, p.127-142, 2005.

SERAFINI, P.; CARBLEY, R.; NOONAN, K.A.; TAN, G.; BRONTE, V.; BORRELLO, I. High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. **Cancer Research**, v.64, p.6337–6343, 2004.

SHARMA, S.; STOLINA, M.; YANG, S.C. Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function. **Clinical Cancer Research**, v.9, p.961–8, 2003.

SHURIN, M.R.; ESCHE, C.; LOKSHIN, A.; LOTZE, M.T. Apoptosis of dendritic cells. In: THOMSON, A. W. **Dendritic Cells**. San Diego: Academic Press, p. 673-692, 1999.

SHURIN, M.R.; LOTZE, M. T. Dendritic cells in cancer: emergence of the discipline. In: SHURIN, M.; SALTER, R. **Dendritic Cells in Cancer**. New York, Springer. 2009

SHURIN, M.R.; NAIDITCH, H.; ZHONG, H.; SHURIN, G.V. Regulatory dendritic cells: new targets for cancer immunotherapy. **Cancer Biology Therapy**, v.11, p.988-992, 2011.

SPÖRRI, R.; REIS E SOUSA, C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. **Nature Immunology**, v.6, p.163–170, 2005.

STEINMAN, R. M. Dendritic cells: understanding immunogenicity. **European Journal of Immunology**, v. 37, p.53–60, 2007. Suppl. 1.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 137, n. 5, p. 1142-62, 1973.

SUGIURA, K.; WIJEWARDANA, V.; FUJIMOTO, M.; AKAZAWA, T. Effect of IL-12 on canine dendritic cell maturation following differentiation induced by granulocyte-macrophage CSF and IL-4. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.137, p.322-326, 2010.

TAMURA, K.; YAMADA, M.; ISOTANI, M.; ARAI, H.; YAGIHARA, H.; ONO, K.; WASHIZU, T.; BONKOBARA, M. Induction of dendritic cell-mediated immune responses against canine malignant melanoma cells. **Veterinary Journal**, v.175, p.126–129, 2008.

THOMPSON, E.D.; ENRIQUEZ, H.L.; FU, Y.X.; ENGELHARD, V.H. Tumor masses support naive T cell infiltration, activation, and differentiation into effectors. **Journal of Experimental Medicine**, v.207, p.1791-1804, 2010.

TIZARD, I.R. **Veterinary Immunology**: an introduction. Elsevier: 2010. 552 p. Cap. 10, p. 92.

TREGLIA, M. **Análise de células mononucleares mantidas em cultura em meio propício para geração de células dendríticas obtidas de pacientes com câncer de pâncreas**. 2008. 110f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

WANG, Y.S.; CHI, K.H.; LIAO, K.W.; LIU, C.C.; CHENG, C.L.; LIN, Y.C.; CHENG, C.H. Characterization of canine monocyte-derived dendritic cells with phenotypic and functional differentiation. **Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire**, v.71, n.3, p.165–74, 2007a.

WANG, Y.S.; CHI, K.H.; CHU, R.M. Cytokines profiles of canine monocyte-derived dendritic cells as a function of lipopolysaccharide- ou tumor necrosis factor- α -induced maturation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.118, p.186-198, 2007b.

WASKOW, C.; LIU, K.; DARRASSE-JÈZE, G.; GUERMONPREZ, P.; GINHOUX, F.; MERAD, M.; SHENGELIA, T.; YAO, K.; NUSSENZWEIG, M. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. **Nature Immunology**, v. 9, n. 6, p. 676-83, 2008.

WASSERMAN, J.; DIESES, L.; VANGUNDY, Z.; LONDON, C.; CARSON, W.E.; PAPENFUSS, T.L. Suppression of canine myeloid cells by soluble factors from cultures canine tumor cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.145, p.420-430, 2012.

WIJEWARDANA, V.; SUGIURA, K.; OICHI, T.; FUJIMOTO, M.; AKAZAWA, T.; HATOYA, S.; INABA, M. Generation of canine dendritic cells from peripheral blood monocytes without using purified cytokines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.114, n.1-2, p.37–48, 2006.

YANG, T.; WITHAM, T.F.; VILLA, L. Glioma-associated hyaluronan induces apoptosis in dendritic cells via inducible nitric oxide synthase: implications for the use of dendritic cells for therapy of gliomas. **Cancer Research**, v.62, p.2583–91, 2002.

YOSHIDA, H.; MOMORI, Y.; TAGA, N.; IDE, K. Generation of canine dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 65, n.6, p.663-669, 2003.