

ANA PAULA SILVA DE AZEVEDO DOS SANTOS

**EFEITO DO MICROAMBIENTE TUMORAL SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS E FENOTÍPICAS DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS GERADAS *IN VITRO* A PARTIR
DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE VOLUNTÁRIAS
SAUDÁVEIS E DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Imunologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

São Paulo
2010

ANA PAULA SILVA DE AZEVEDO DOS SANTOS

**EFEITO DO MICROAMBIENTE TUMORAL SOBRE AS
CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS E FENOTÍPICAS DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS GERADAS *IN VITRO* A PARTIR
DE MONÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO DE VOLUNTÁRIAS
SAUDÁVEIS E DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre M. Barbutto

São Paulo
2010

RESUMO

Azevedo-Santos APS. Efeito do microambiente tumoral sobre as características funcionais e fenotípicas de células dendríticas geradas *in vitro* a partir de monócitos do sangue periférico de voluntárias saudáveis e de pacientes com câncer de mama. [tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2010

Células dendríticas (DCs) são as principais células apresentadoras de antígenos e as únicas capazes de dar início a uma resposta imune primária. As DCs são alvo de inúmeros processos capazes de afetar sua função em pacientes com câncer. No câncer de mama, o metabolismo anaeróbico, ação local dos estrógenos e o uso terapêutico de seus antagonistas são fatores comuns à boa parte das pacientes, que podem influenciar as DCs. Assim, o presente trabalho avaliou o perfil fenotípico de DCs em amostras tumorais das pacientes, a diferenciação de DCs a partir de células mononucleares derivadas do sangue periférico (PBMCs) das pacientes, comparou-se suas características fenotípicas e funcionais, investigou-se os efeitos de moduladores de estrógenos (tamoxifeno), da co-cultura com linhagens tumorais e de inibidores da p38 MAPK sobre as DCs, tanto de indivíduos sadios quanto de pacientes com câncer de mama ductal invasivo. Os resultados mostraram que há diferença na capacidade de geração, no fenótipo e na capacidade aloestimuladora das DCs derivadas de PBMCs de pacientes. As DCs de pacientes apresentaram maior produção de interleucina 10 e expressaram mais HSP27, enquanto que as DCs de voluntárias saudáveis apresentaram maior produção de Interferon-gama. A via p38 MAPK parece ser importante na diferenciação de monócitos em DCs, entretanto, estímulos estressantes podem ativar esta via e induzir a síntese de HSP27 inibindo este processo. O tratamento com tamoxifeno parece modular a expressão de algumas moléculas de membrana durante a diferenciação das DCs. Desta forma, os resultados sugerem que as DCs diferenciadas de PBMCs de pacientes com câncer de mama apresentam alterações fenotípicas e funcionais que são pelo microambiente tumoral.

Palavras-chave: Células Dendríticas. Cancer de mama. Microambiente tumoral.

ABSTRACT

Azevedo-Santos APS. Effect of the tumor microenvironment on the function and phenotype of dendritic cells generated *in vitro* from monocytes obtained from healthy volunteers and breast cancer patients. [Ph. D. thesis (Immunology)]. São Paulo (Brazil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Dendritic cells (DCs) are recognized as the most potent antigen-presenting cells and are uniquely able to initiate primary immune responses. Not surprisingly, they are targets of tumor evasion mechanisms, affecting their function in cancer patients. In breast cancer, the anaerobic metabolism, the action of estrogen antagonists are common factors to most patients, which can influence DC generation. Thus the aim of this work was to evaluate the frequency of DCs in tumor tissue. In addition, we evaluated the differentiation of DCs derived from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and compared the phenotypic and functional characteristics of these cells, the effects of selective estrogen receptor modulators (tamoxifen), the co-culture with tumor cell and the specific p38 MAPK inhibitor on DCs from healthy individuals and breast cancer patients. The results showed that patients' PBMCs were unable to generate phenotypically and functionally mature DCs when compared with healthy volunteers' DCs. DCs differentiated from patients' PBMCs presented larger production of interleukin 10 and higher expression of HSP27, while DCs derived from healthy volunteers' PBMCs presented higher production of Interferon-gamma. The p38 MAPK signaling pathway seems to be important in monocyte differentiation into DCs, and its activation by stress can induce the synthesis of HSP27, a protein that inhibits DC generation. The treatment with tamoxifen caused modulation of membrane DC markers' expression. Therefore, these results show that DCs derived from patients' PBMCs present phenotypic and functional alterations which can be caused by tumor microenvironment factors.

Key words: Dendritic cell. Breast cancer. Tumoral microenvironment.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos a Imunologia vem se consolidando, cada vez mais, como uma ciência complexa e intrigante. Deixando de ser vista apenas como um sistema de defesa contra microorganismos, o sistema imune pode ser explicado como um sistema celular e molecular organizado que apresenta um funcionamento complexo e diversificado, conferindo um equilíbrio interno responsável pela manutenção da integridade orgânica.

Com um maior conhecimento sobre os elementos que formam a imunidade e como eles atuam na preservação do próprio, a imunologia vem sendo aplicada, de forma crescente, nos estudos relacionados à carcinogênese. O câncer é uma doença genética, em que a célula tumoral, apesar de se originar da célula normal, se diferencia desta por apresentar mecanismos ineficientes de controle de proliferação celular, instabilidade gênica e cromossômica, desregulação nos mecanismos de apoptose, além de adquirir a capacidade de invasão e crescimento em locais distantes de sua origem (Bast, 2003). Assim, a Imunologia dos Tumores compreende os fenômenos relacionados às possíveis interações entre os diversos componentes do sistema imune e do tumor.

As alterações gênicas ocorridas nas células tumorais poderiam gerar diversos antígenos, teoricamente capazes de desencadear respostas imunes nos indivíduos onde elas ocorrem (revisto por Barbuto, 2004). Se isto é fato, seria de se esperar um papel significativo do sistema imune na biologia dos tumores. Esta proposição é a da teoria da vigilância imunológica, que, no entanto, não foi ainda definitivamente provada nem refutada.

Por outro lado, é importante notar que tumores estabelecidos apresentam inúmeros mecanismos de escape frente à resposta imune (Klein, 1976). Tal fenômeno indica a existência de uma pressão seletiva exercida pelo sistema imune

sobre as células tumorais, fazendo que apenas sobrevivam células capazes de burlar, de uma ou outra maneira a resposta imune dirigida contra elas (Lattime e Stutman, 1989).

Uma maneira de dificultar o reconhecimento antigênico das células neoplásicas pode ser observada, por exemplo, em células do tumor de mama, que apresentam modificações nos antígenos de superfície e na estrutura do glicocálix (Kim et al., 1975) além de liberarem enzimas, como colagenase, proteases, glicosidases e metaloproteinases, modificando a superfície e o meio próximo à célula tumoral (Bast, 2003).

O tumor pode, ainda, utilizar-se da resposta imune a seu favor, pois o processo inflamatório ativa células que podem criar um ambiente favorável a promoção de células pré-neoplásicas, além de liberar fatores de crescimento, induzir a angiogênese e remodelar da matriz extracelular propiciando o aparecimento de metástases (Coussens e Werb, 2002). Macrófagos associados ao tumor, embora possam matar as células tumorais quando ativados por interferons ou interleucinas (IL)- 2 e 12, também produzem fatores de crescimento, angiogênicos, linfogênicos, citocinas e proteases que potencializam a progressão do tumor, bem como podem produzir IL-10 que impede a resposta antitumoral mediada por células T (Brigati et al., 2002; Tsung et al., 2002; Schoppmann et al., 2002; Torisu et al., 2000). Em modelos murinos de carcinoma hepatocelular originado de hepatite colestática, foi observado que o fator nuclear κ B (NF- κ B), um importante fator celular que participa da inflamação, apresenta-se ativado nos hepatócitos em decorrência do processo inflamatório via liberação parácrina de Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α), causando efeitos anti-apoptóticos que podem estar relacionados aos mecanismos de progressão de tumores associados à inflamação crônica (Pikarsky et al., 2004).

Outro mecanismo descrito é a produção, no micro-ambiente tumoral, de citocinas como o Fator de Crescimento e Transformação (TGF) beta (Tada et al., 1991) ou IL-10, IL-4 e IL-5 (Yamamura et al., 1993), todas com atividade imunossupressora conhecida. Na verdade, o micro-ambiente tumoral apresenta uma série de outras características muito interessantes e capazes de afetar funcionalmente as células ali presentes. Uma destas características, extremamente frequente, e por isso explorada clinicamente para o diagnóstico por imagem da presença de lesões metastáticas, é a alta taxa de metabolismo anaeróbico de glicose, mesmo em condições de boa oxigenação do tumor (Semenza, 2001). Esta característica gera um micro-ambiente ácido e rico em lactato, que pode contribuir para a seleção de células tumorais mais invasivas e, portanto, capazes de promover o desenvolvimento de metástases (Gatenby e Gillies, 2004). Entretanto, este efeito selecionador sobre as células tumorais pode não ser a única consequência deste fenômeno, outros tipos celulares ali presentes podem ser afetados pelo mesmo.

De qualquer forma, embora não se possa delinear, com precisão, o papel da resposta imune em cada neoplasia, pode-se considerar que as interações entre sistema imune e tumores constituem um fator significativo na história natural destas doenças (Sellin, 1979). Assim, atualmente, a “*imunoedição*” define todas estas alterações induzidas pelo sistema imune e que participam da patogênese dos tumores (Dunn et al., 2002; Dunn et al., 2004; Reiman et al., 2007).

Dentre as várias células potencialmente presentes no micro-ambiente tumoral estão às células dendríticas (DCs). Estas se encontram amplamente distribuídas nos tecidos, principalmente na pele e nas mucosas, num estado “imaturo”, em que apresentam uma grande capacidade endocítica e fagocítica, realizando uma amostragem contínua do micro-ambiente onde se encontram (revisto por

Banchereau e Steinman, 1998; Banchereau et al., 2000; Mohamadzadeh e Luftig, 2004). Ao sofrerem determinados estímulos estas DCs imaturas sofrem um processo de maturação, apresentando, então, redução de sua capacidade endocítica e fagocítica, aumento na produção de citocinas inflamatórias e aquisição da capacidade de migração, principalmente através da expressão de receptores para quimiocinas, como o CCR7 (Caux et al., 1994; Yanagihara et al., 1998; Guermonprez et al., 2002). A expressão deste receptor permite que as DCs que captaram antígenos dirijam-se aos tecidos linfóides, mais especificamente para áreas de células T, onde são capazes de recrutar outras DCs e linfócitos, através da liberação de quimiocinas facilitando as interações celulares necessárias para o desenvolvimento de uma resposta específica eficiente (Adema et al., 1997; Sozzani et al., 1998; Sallusto et al., 1999; Kato et al., 2000). Além disso, a maturação das DCs também é caracterizada pelo aumento da expressão de moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC-cl II) e de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86 e CD40) em sua superfície, o que as torna capazes de ativar de forma efetiva linfócitos T em células efetoras ou de memória (Caux et al., 1994; Banchereau et al., 2000). Dependendo do tipo e do modo em que é ativada, as DCs são capazes de apresentar antígenos exógenos tumorais solúveis para linfócitos T “naive” tanto no contexto de moléculas de MHC-cl I quanto em moléculas de MHC-cl II (Nagata et al., 2002; Schnurr et al., 2005). Desta forma, frente aos tumores, as DCs parecem ter um papel essencial, uma vez que são capazes de processar e apresentar peptídeos tumorais para os linfócitos T citotóxicos (CTLs) via moléculas MHC-cl I, possibilitando assim, uma resposta antitumoral (Albert et al., 1998; Cutler et al., 2001). Novamente, também frente a

tumores de mama há relato de função semelhante das DCs (Neidhardt-Berard et al., 2004).

Entretanto, tem sido demonstrado que as DCs têm um papel relevante não só na indução de respostas imunes, como descrito acima, mas também na indução da tolerância periférica, sendo esta complementar à tolerância central, na função de preservação dos tecidos próprios. As DCs estão continuamente captando e processando antígenos, inclusive antígenos próprios, que, no contexto sem inflamação ou infecção, isto é, sem “sinais de perigo”, são apresentados às células T nos tecidos linfoides secundários pelas DCs em um estado imaturo e indutor de tolerância. Desta forma, o estado de maturação das DCs é determinante para indução de imunogenicidade ou tolerância (Steinman et al., 2000; Steinman et al., 2003). Frente a um tumor, a apresentação de antígenos tumorais por DCs imaturas pode induzir a deleção ou anergia de células T tumor-específicas nos linfonodos, impedido o desenvolvimento de uma resposta antitumoral eficiente. (Steinman et al., 2003).

Considerando, assim, o papel fundamental das DCs no estabelecimento da resposta imune, o de únicas células apresentadoras de antígenos capazes de desencadear uma resposta imune primária (revisto por Banchereau e Steinman, 1998), é razoável esperar que estas células sejam, também, alvo dos mecanismos de escape tumoral. Confirmando esta hipótese, pode-se notar que DCs infiltradas em diversos tumores, (Ninomiya et al., 1999; Reichert et al., 2001; Dallal et al. 2002; Tourkova et al., 2004; Baleeiro et al., 2008) inclusive no de mama, apresentam alterações na expressão de marcadores de ativação, sendo seu número e estado funcional afetados dentro do micro-ambiente tumoral (Coventry et al., 2002; Coussens e Werb, 2002).

As alterações fenotípicas e funcionais sofridas pelas DCs podem ser causadas por vários fatores, como por exemplo, as citocinas produzidas no micro-ambiente tumoral, várias das quais têm efeito deletério sobre a função das DCs (Vassiliou et al., 2003; Kobie et al., 2003; Park et al., 2005), a produtos específicos de determinados tipos de câncer (McKallip et al., 1999; Makarenkova et al. 2003; Peguet-Navarro et al., 2003; Sharma et al., 2003; Monti et al., 2004) ou ainda, a características menos específicas de um ou outro tumor, mas comuns à maioria destes, como a acidez e o alto conteúdo de lactato do micro-ambiente (Gatenby e Gillies, 2004). Vários fatores de crescimento, incluindo IL10, TGF- β , Fator Estimulate de Colônia de Granulócitos (G-CSF), Fator de Crescimento de Hepatócitos (HGF) e Peptídio Intestinal Vasoativo (VIP) modulam a diferenciação das DCs favorecendo sua permanência num estado imaturo (Rutella et al., 2006). Recentemente, foi demonstrado que, o ácido láctico produzido por células de melanoma em cultura é capaz de modular o fenótipo das DCs, podendo, *in vivo*, teoricamente contribuir para o mecanismo de escape tumoral (Gottfried et al., 2006).

Assim, em condições estressantes como, variação de temperatura, estresse oxidativo ou exposição a drogas anticâncer, vias celulares de sobrevivência e de reorganização são ativadas, resultando na síntese de proteínas do tipo chaperonas chamadas de Proteínas de Choque Térmico (HSPs), principalmente a HSP27 e a HSP70 (Schmitt et al., 2007). Uma vez induzidas, as HSPs influenciam a agregação, o transporte e o dobramento de outras proteínas, como filamentos de actina do citoesqueleto, além de modular os mecanismos de apoptose resultando em estabilização celular frente ao dano causado pelo fator estressante (Schmitt et al., 2007; Kostengo e Moens, 2009). Há dados que indicam que o aumento de expressão desta chaperona se deve à ativação da via de sinalização da Proteína

Quinase Ativada por Mitógenos (MAPK) p38, que conduz à fosforilação e à ativação de diferentes fatores necessários para a realização da resposta celular ao estresse (Waskiewicz e Cooper, 1995; Beyaert et al., 1996).

As MAPKs são proteínas associadas a receptores celulares e são ativadas em resposta a estresse químico ou físico, induzindo vias de sinalização que regulam várias funções celulares como divisão, diferenciação, migração e apoptose (Chang, 2001). A p38MAPK é uma MAPK de 38kDa que apresenta no seu sítio de fosforilação um motivo conservado "TXY", onde T é a treonina, X é a Glicina e Y é a tirosina, podendo ser ativada por fatores estressantes e estímulos pró-inflamatórios (Freshney et al., 1994; Dong et al., 2002). Um piridinil imidazol, SB203580, pode ser usado como um inibidor específico para o estudo do papel fisiológico esta via de sinalização (Cuenda et al., 1995)

Na injúria nervosa, a HSP 25, um homólogo em camundongos da HSP27 humana, tem um papel central na regeneração e prevenção da morte do nervo, e sua indução também requer a via da p38MAPK (Murashov et al., 2001). Experimentos desenvolvidos em modelos animais têm demonstrado que a HSP27 e a HSP70 aumentam o potencial tumorigênico em células neoplásicas (Schmitt et al., 2007). Em monócitos foi descrito que a HSP27 bloqueia sua capacidade de diferenciação em DCs ou macrófagos e induz a síntese de IL-10 (De et al., 2000; Laudanski et al., 2007).

Assim, as DCs parecem ser um alvo relevante para os mecanismos de escape tumoral e, portanto, estratégias que conseguissem reverter estes defeitos funcionais das DCs seriam potencialmente eficazes na indução de respostas imunes antitumorais. Todavia, estas estratégias esbarravam, até há pouco tempo, com a dificuldade de obtenção de DCs, devido a processos de purificação trabalhosos e de

baixo rendimento (Steinman, 1981), que impediam o uso clínico destas células. Na última década, porém, após a descrição da possibilidade de diferenciação *in vitro* deste tipo celular a partir de monócitos do sangue periférico (Sallusto e Lanzavecchia, 1994), inúmeros protocolos têm sido desenvolvidos, procurando explorar as DCs na imunoterapia do câncer (Fukao, 2002; Gabilovich, 2002; Schuler et al., 2003; Barbuto et al., 2004; Nagaraj et al., 2004; O'Neill et al., 2004; Nencioni e Brossart, 2004; Banchereau e Palucka, 2005; Morse et al., 2005).

Todavia, é importante notar que as alterações funcionais não se restringem apenas as DCs presentes no micro-ambiente tumoral, mas também se manifestam sobre monócitos dos pacientes quando se tenta induzir sua diferenciação *in vitro*, como nosso laboratório demonstrou em portadores de diferentes neoplasias metastáticas (Neves et al., 2005) ou em pacientes com câncer de mama (Gervais et al., 2005). Embora estratégias alternativas, que buscam contornar estas alterações, venham sendo exploradas (Barbuto et al., 2004; Trefzer et al., 2005), o conhecimento dos mecanismos responsáveis por estas alterações torna-se fundamental para que se atinjam os resultados desejados no tratamento do câncer com DCs.

Por outro lado, a resposta imune não depende apenas de fatores intrínsecos ao sistema imune, ou dependentes da presença do tumor no organismo, mas também de vários outros, fisiológicos ou não. Um deles que parece ter um papel relevante, é o sexo do indivíduo. Já foi demonstrado em experimentos com animais e em humanos que a resposta imune é diferente entre machos e fêmeas (Ansar Ahmed et al., 1985). Mulheres, em geral, apresentam respostas imunes, celular e humoral, mais intensas, são mais resistentes a certas infecções e sofrem mais com doenças autoimunes que os homens (revisado por Ansar Ahmed et al., 1985;

Bouman et al., 2005). Tais diferenças têm sido relacionadas aos hormônios sexuais femininos, principalmente aos estrógenos, que constituem uma família de hormônios derivados do colesterol. O 17β -estradiol (E2) é o estrógeno primário de origem ovariana, com maior atividade biológica, que pode ser convertido reversivelmente em estrona (E1) no próprio ovário, no fígado ou em outros tecidos. Ambos, E1 e E2, podem ainda ser convertidos, de maneira irreversível, em estriol (E3), forma com menor atividade hormonal e excretada na urina (Tamaoki, 1973; Kulig, 1994)). No metabolismo normal de estrógenos, a 17β -hidroxiesteróide-desidrogenase (17β -HSD), com seus diferentes tipos, parece ser a enzima responsável pela modulação dos níveis séricos de E1 e E2, desta forma controlando sua atividade biológica (Cheng e Zhou, 2000; Mindnich e Adamski, 2007).

Os estrógenos, principalmente o E2, provocam a maturação das células germinativas, estabelecem a “sincronização hormonal” para a ovulação, estabelecem condições necessárias para manutenção da gestação, influenciam no parto, na amamentação, e com o avançar da idade e a perda de folículos, sua menor produção ocasiona a menopausa (Miller, 1988).

Alguns tipos da 17β -HSD (tipos 1, 3, 5 e 7) catalisam a reação de redução do hormônio, convertendo E1 em E2 (mais bioativo) e, por sua vez, os tipos 2, 4 e 8 catalisam a reação oxidativa de E2 para E1 (Andersson e Moghrabi, 1997; Sasano et al., 2000). Desequilíbrios da atividade destes tipos da 17β -HSD poderiam resultar no aumento significativo de uma forma do hormônio em relação à outra causando, desta forma, importantes efeitos biológicos. Assim, é interessante notar que em tumores de mama hormônio-dependentes foi detectada maior expressão da 17β -HSD tipo 1 (Suzuki et al., 2000), o que, causando um aumento da produção de E2 no ambiente tumoral, provavelmente contribui para o crescimento do tumor. Também

em outras situações este desequilíbrio pode ocorrer como demonstrado em câncer de cólon, onde este mesmo predomínio, mais uma vez levando ao aumento relativo de E2 em relação a E1, parece contribuir para a patogênese da doença (English et al., 1999).

De qualquer modo, os tumores de mama mesmo já estabelecidos, apresentam, muito freqüentemente, uma dependência importante de estímulos hormonais (Vokaer, 1975; Doisneau-Sixou et al., 2003). Esta condição permite que se utilizem, em seu tratamento, antagonistas e inibidores hormonais com bons resultados clínicos (Fabian, 2001; Bentrem e Craig Jordan, 2002; Yue et al., 2005). Entre estes moduladores, um de uso amplo no tratamento de pacientes com câncer de mama é o tamoxifeno. Esta droga quimicamente definida como (*Z*)-2-[4-(1,2-difenilbut-1-enil)fenoxi]-*N,N*-dimetil-etanamina, foi desenvolvida a partir de estudos sobre a ação endócrina do trifeniletanol. Em meados de 1970, o tamoxifeno passou a ser usado no tratamento de câncer de mama devido sua capacidade de bloquear os receptores de estrógenos no tecido mamário (Jordan, 2006; Powles e Hickish, 1995; White, 1999).

No entanto, tanto os estrógenos quanto seus moduladores, como o tamoxifeno, atuam, também, sobre o sistema imune. Especificamente em DCs já foi demonstrada a presença de receptores para estrógeno, capazes de modular sua diferenciação, seu número e sua capacidade funcional (Polanczyk et al., 2004; Paharkova-Vatchkova et al., 2004). Dependendo da condição estudada, esta modulação poderia favorecer a diferenciação das DCs (Paharkova-Vatchkova et al., 2004) ou inibir determinadas funções destas células (Polanczyk et al., 2004). Em concordância com tal fato, também inibidores de estrógenos afetam a diferenciação de DCs, ao menos *in vitro*, de maneira geral inibindo este processo (Komi e Lassila,

2000). Aparentemente em desacordo com estes dados, mas confirmando a heterogeneidade dos efeitos de estrógenos sobre as DCs, Lang (2004) revê o efeito dos estrógenos sobre as DCs, sugerindo que sob o efeito destes hormônios, estas células se tornam estimuladoras preferenciais de linfócitos T do padrão Th2.

Assim, é possível enumerar vários fatores capazes de afetar a função de DCs em pacientes com câncer: pH e citocinas produzidas no micro-ambiente, produtos das células tumorais, hormônios produzidos localmente ou à distância e metabolizados localmente, drogas usadas no tratamento dos pacientes, e assim por diante. No presente trabalho, portanto, pretendemos aprofundar a análise dos efeitos de alguns fatores que participam da composição do microambiente tumoral, como a presença das células tumorais e seu fatores solúveis, moduladores de estrógenos (drogas de uso praticamente obrigatório em boa parcela das pacientes com tal neoplasia) e do pH ácido causado pela alta concentração de lactato no meio (condição comum à maioria das neoplasias) sobre as DCs, tanto de indivíduos saudáveis quanto de pacientes portadoras de carcinoma de mama ductal invasivo.

6 CONCLUSÕES

- As análises fenotípicas de células derivadas do tumor mostraram uma expressão de CD83 maior que outros marcadores de DCs, e pela imunohistoquímica, mostra a presença delas infiltradas no tumor em regiões intra e peritumorais.

- PBMCs de pacientes com câncer de mama operável e voluntárias saudáveis são capazes de diferenciar-se em DCs em cultura suplementada com IL4, GM-CSF e TNF- α , entretanto as DCs de pacientes apresentaram alterações fenotípicas e funcionais. Estes resultados podem estar relacionados a menor expressão de receptores para IL4 e GM-CSF nas PBMCs de pacientes.

- DCs obtidas de PBMCs de pacientes apresentaram alterações fenotípicas com menor expressão de HLA-DR, CD11c e moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) e CCR7, reduz a capacidade aloestimuladora e apresenta um padrão de citocina imunossupressor

- Nos ensaios de co-cultura de DCs com linhagem tumoral (MCF-7 e SK-BR-3), a presença da célula tumoral e seus fatores solúveis modificaram na capacidade de maturação de DCs a partir de PBMCs, aumentaram a relação de células CD4⁺ para CD8⁺ e concentração de IL10 na co-cultura de DCs e linfócitos alogênicos.

- O pH ácido modificou a capacidade das PBMCs se diferenciarem em DCs nas pacientes, sugerindo maior sensibilidade a modificação do pH.

- O bloqueio da via da p38MAPK causou prejuízo no fenótipo e na produção de IFN- γ nas células das voluntárias.

- A HSP27 encontra-se mais expressa nas DCs diferenciadas de PBMCs de pacientes, podendo estar relacionado à via de ativação de estresse p38MAPK.

- A ausência do tumor nas pacientes tratadas com tamoxifeno apresentou melhora fenotípica e funcional das DCs, entretanto, a presença do tamoxifeno na cultura de DCs de pacientes com tumor não reverteu completamente as alterações fenotípicas e funcionais, sugerindo que a presença do tumor interfere na diferenciação de PBMCs em DCs.

- As alterações fenotípicas e funcionais observadas nas DCs podem ser provocadas pela presença de fatores que compõe o microambiente tumoral, atuando como um fator estressante capaz de influenciar negativamente a capacidade de geração de DCs competentes.

REFERÊNCIAS

Adema GJ, Hartgers F, Verstraten R, De Vries E, Marland G, Menon S, Foster J, Xu Y, Nooyen P, McClanahan T, Bacon KB, Figdor CG. Dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature*. 1997;387(6634):713-717.

Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*. 1998;392 (6671)86-89.

Moghrabi N, Andersson S. Physiology and molecular genetics of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Steroids*. 1997;62(7)143-147.

Ansar Ahmed S, Dauphinee MJ, Talal N. Effects of short-term administration of sex hormones on normal and autoimmune mice. *J Immunol*. 1985;134(1) 204-210.

Ansar Ahmed S, Penhale WJ, Talal N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases: mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol*. 1985;121(3)531-551.

Baleeiro RB, Anselmo LB, Soares FA, Pinto CA, Ramos O, Gross JL, Haddad F, Younes RN, Tomiyoshi MY, Bergami-Santos PC, Barbuto JA. High frequency of immature dendritic cells and altered in situ production of interleukin-4 and tumor necrosis factor-alpha in lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57(9)1335-1345.

Baleeiro RB, Bergami-Santos PC, Tomiyoshi MY, Gross JL, Haddad F, Pinto CA, Soares FA, Younes RN, Barbuto JA. Expression of a dendritic cell maturation marker CD83 on tumor cells from lung cancer patients and several human tumor cell lines: is there a biological meaning behind it? *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57(2)265-270.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.

Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(4)296-306.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673)245-252.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: [Http://www.icmje.org](http://www.icmje.org)[2007 May 22]

Bentrem DJ, Craig JV. Tamoxifen, raloxifene and the prevention of breast cancer. *Minerva Endocrinol.* 2002;27(2)127-139.

Bergami-Santos PC, Mariano M, Barbuto JA. Dual role of polymorphonuclear neutrophils on the growth of Ehrlich ascites tumor (EAT) in mice. *Life Sci.* 2004;75(2) 245-255.

Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Plaisance S, Lee JC, Haegeman G, Cohen P, Fiers W. The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J.* 1996;15(8)1914-1923.

Bharadwaj U, Li M, Zhang R, Chen C, Yao Q. Elevated Interleukin-6 and G-CSF in Human Pancreatic Cancer Cell Conditioned Medium Suppress Dendritic Cell Differentiation and Activation. *Cancer Res.* 2007;67(11)5479-5488.

Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update.* 2005;11(4)411-423.

Brandacher G, Winkler C, Schroecksadel K, Margreiter R, Fuchs D. Antitumoral activity of interferon-gamma involved in impaired immune function in cancer patients. *Curr Drug Metab.* 2006;7(6)599-612.

Brigati C, Noonan DM, Albini A, Benelli R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clin Exp Metastasis.* 2002;9(3)247-258.

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med.* 1994;180(4)1263-1272.

Caux C, Moreau I, Saeland S, Banchereau J. Interferon-gamma enhances factor-dependent myeloid proliferation of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1992;79(10)2628-2635.

Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001;410(1)37-40.

Cheng ZN, Zhou HH. Contribution of genetic variations in estradiol biosynthesis and metabolism enzymes to osteoporosis. *Acta Pharmacol Sin.* 2000;21(7)587-590.

Chomarat P, Dantin C, Bennett L, Banchereau J, Palucka AK. TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *J. Immunol.* 2003;171(5)2262-2269.

Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol.* 2000;1(6)510-514.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1)156-159.

Ciocca R, Calderwood SK. Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress & Chaperones.* 2005;10(2)86-103.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002;420(6917)860-867.

Coventry BJ, Lee PL, Gibbs D, Hart DN. Dendritic cell density and activation status in human breast cancer CD1a, CMRF-44, CMRF-56 and CD-83 expression. *Br J Cancer.* 2002;86(4)546-551.

Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR, Lee JC. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Letters.* 1995;364(1)229-233.

Cutler CW, Jotwani R, Pulendran B. Dendritic cells: immune saviors or Achilles' heel? *Infect Immun.* 2001;69(8)4703-4708.

Dallal RM, Christakos P, Lee K, Egawa S, Son YI, Lotze MT. Paucity of dendritic cells in pancreatic cancer. *Surgery.* 2002;131(2)135-138.

De AK, Kodys KM, Yeh BS, Miller-Graziano C. Exaggerated human monocyte IL-10 concomitant to minimal TNF- α induction by heatshock protein 27 (HSP27) suggests HSP27 is primarily an antiinflammatory stimulus. *J. Immunol.* 2000;165(7)3951-3958.

Doisneau-Sixou SF, Sergio CM, Carroll JS, Hui R, Musgrove EA, Sutherland RL. Estrogen and antiestrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2003;10(2)179-186.

Dong C, Davis RJ, Flavell RA. MAP kinases in the immune response. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:55-72.

Douin-Echinard V, Laffont S, Seillet C, Delpy L, Krust A, Chambon P, Gourdy P, Arnal JF, Guéry JC. Estrogen receptor alpha, but not beta, is required for optimal dendritic cell differentiation and [corrected] CD40-induced cytokine production. *J Immunol.* 2008;180(6)3661-3669.

- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002;3(11)991-998.
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoeediting. *Immunity.* 2004;21(2)137-148.
- Encabo A, Solves P, Mateu E, Sepulveda P, Carbonell-Uberos F, Minana MD. Selective generation of different dendritic cell precursors from CD34+ cells by interleukin-6 and interleukin-3. *Stem Cells.* 2004;22(5)725-740.
- English MA, Kane KF, Cruickshank N, Langman MJ, Stewart PM, Hewison M. Loss of estrogen inactivation in colonic cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(6)2080-2085.
- Fabian CJ. Breast cancer chemoprevention: beyond tamoxifen. *Breast Cancer Res.* 2001;3(2)99-103.
- Feili-Hariri M, Flores RR, Vasquez AC, Morel PA. Dendritic cell immunotherapy for autoimmune diabetes. *Immunol Res.* 2006;36(1-3)167-173.
- Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell.* 1994;78(6)1039-1049.
- Fukao T. Dendritic-cell-based anticancer vaccination: has it matured? *Trends Immunol.* 2002;23(5)231-232.
- Gabrilovich DI. Dendritic cell vaccines for cancer treatment. *Curr Opin Mol Ther.* 2002; 4(5)452-458.
- Gabrilovich DI, Corak J, Ciernik IF, Kavanaugh D, Carbone DP. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1997;3(3)483-490.
- Garrido C, Fromentin A, Bonnotte B, Favre N, Moutet M, Arrigo AP, Mehlen P, Solary E. Heat Shock Protein 27 Enhances the Tumorigenicity of Immunogenic Rat Colon Carcinoma Cell Clones. *Cancer Research.* 1998;58(23)5495-5499.
- Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer.* 2004;4(11)891-899.
- Gervais A, Levêque J, Bouet-Toussaint F, Burtin F, Lesimple T, Sulpice L, Patard JJ, Genetet N, Catros-Quemener V. Dendritic cells are defective in breast cancer

patients: a potential role for polyamine in this immunodeficiency. *Breast Cancer Res.* 2005;7(3)326-335.

Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S, Mueller-Klieser W, Hoves S, Andreesen R, Mackensen A, Kreutz M. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood.* 2006;107(5)2013-2021.

Guermontez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:621-667.

Hercus TR, Thomas D, Guthridge MA, Ekert PG, King-Scott J, Parker MW, Lopez AF. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease. *Blood.* 2009;114(7)1289-1298.

Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* 1992;176(6)1693-1702.

Ito T, Amakawa R, Inaba M, Ikehara S, Inaba K, Fukuhara S. Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. *J Immunol.* 2001;1(5)2961-2969.

Jacobs JF, Hoogerbrugge PM, De Rakt MW, Aarntzen EH, Figdor CG, Adema GJ, De Vries IJ. Phenotypic and functional characterization of mature dendritic cells from pediatric cancer patients. *Pediatr Blood Cancer.* 2007;49(7)924-927.

Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med.* 2000;192(9)1213-1222.

Jordan VC. Tamoxifen (ICI46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. *British Journal of Pharmacology.* 2006;147(Suppl 1)S269-76.

Kang SH, Kang KW, Kim KH, Kwon B, Kim SK, Lee HY, Kong SY, Lee ES, Jang SG, Yoo BC. Upregulated HSP27 in human breast cancer cells reduces Herceptin susceptibility by increasing Her2 protein stability. *BMC Cancer.* 2008;8:1-10.

Kato M, Neil TK, Fearnley DB, McLellan AD, Vuckovic S, Hart DN. Expression of multilectin receptors and comparative FITC-dextran uptake by human dendritic cells. *Int Immunol.* 2000;12(11)1511-1519.

- Kim U, Baumler A, Carruthers C, Bielat K. Immunological escape mechanism in spontaneously metastasizing mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975;72(3)1012-1016.
- Klein G. Mechanisms of escape from immune surveillance. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1976;44:135-136.
- Kobie JJ, Wu RS, Kurt RA, Lou S, Adelman MK, Whitesell LJ, Ramanathapuram LV, Arteaga CL, Akporiaye ET. Transforming growth factor beta inhibits the antigen-presenting functions and antitumor activity of dendritic cell vaccines. *Cancer Res*. 2003;63(8)1860-1864.
- Komi J, Lassila O. Nonsteroidal anti-estrogens inhibit the functional differentiation of human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2000;95(9)2875-2882.
- Kostenko S, Moens U. Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology. *Cell. Mol. Life Sci*. 2009;66(20)3289-3307.
- Kulig E. Estrogen receptor: structure and function in normal and neoplastic tissue. *Postepy Biochem*. 1994;40(4) 222-229.
- Lang TJ. Estrogen as an immunomodulator. *Clin Immunol*. 2004;113(3)224-230.
- Lattime EC, Stutman O. Tumor growth in vivo selects for resistance to tumor necrosis factor. *J Immunol*. 1989;143(12)4317-4323.
- Laudanski K, De A, Miller-Graziano C. Exogenous heat shock protein 27 uniquely blocks differentiation of monocytes to dendritic cells. *Eur. J. Immunol*. 2007;37(10)2812-2824.
- Liu T, Guevara OE, Warburton RR, Hill NS, Gaestel M, Kayyali US. Modulation of HSP27 alters hypoxia-induced endothelial permeability and related signaling pathways. *J Cell Physiol*. 2009;220(3)600-610.
- Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods*. 2000;243(1-2)147-154.
- Makarenkova VP, Shurin GV, Tourkova IL, Balkir L, Pirtskhalaishvili G, Perez L, Gerein V, Siegfried JM, Shurin MR. Lung cancer-derived bombesin-like peptides down-regulate the generation and function of human dendritic cells. *J Neuroimmunol*. 2003;145(1-2)55-67.

Margolese RG, Hortobagyi GN, Buchholz TA. The Breast. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, Bast Jr RC, Gansler TS, Holland JF, Frei III E, editors. *Cancer Medicine*. 5th ed. Ontario: BC Decker; 2003. p.1879-1970.

Matsuura K, Yamaguchi Y, Ueno H, Osaki A, Arihiro K, Toge T. Maturation of dendritic cells and T-cell responses in sentinel lymph nodes from patients with breast carcinoma. *Cancer*. 2006;106(6)1227-1236.

McKallip R, Li R, Ladisch S. Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response. *J Immunol*. 1999;163(7)3718-326.

Miller-Graziano CL, De A, Laudanski K, Herrmann T, Bandyopadhyay S. HSP27: an anti-inflammatory and immunomodulatory stress protein acting to dampen immune function. *Novartis Found Symp*. 2008;291:96-208.

Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev*. 1988;9(3)295-318.

Mindnich R, Adamski J. Functional aspects of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 1 determined by comparison to a closely related retinol dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007;104(3-5)334-339.

Mohamadzadeh M, Luftig R. Dendritic cells: In the forefront of immunopathogenesis and vaccine development - A review. *J Immune Based Ther Vaccines*. 2004;2(1)1-11.

Monti P, Leone BE, Zerbi A, Balzano G, Cainarca S, Sordi V, Pontillo M, Mercalli A, Di Carlo V, Allavena P, Piemonti L. Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL-10^{high}IL-12^{low} regulatory dendritic cell. *J Immunol*. 2004;172(12)7341-7349.

Moore KW, O'Garra A, De Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:165-90.

Morse MA, Chui S, Hobeika A, Lyerly HK, Clay T. Recent developments in therapeutic cancer vaccines. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005;2(2)108-113..

Murashov AK, Haq IU, Hill C, Park E, Smith M, Wang X, Wang X, Goldberg DJ, Wolgemuth DJ. Crosstalk between p38, Hsp25 and Akt in spinal motor neurons after sciatic nerve injury. *Mol Brain Res*. 2001;93(2)199-208..

Nagaraj S, Ziske C, Schmidt-Wolf IG. Dendritic cell, the immunotherapeutic cell for cancer. *Indian J Med Res*. 2004;119(4)133-138.

- Nagata Y, Ono S, Matsuo M, Gnjatic S, Valmori D, Ritter G, Garrett W, Old LJ, Mellman I. Differential presentation of a soluble exogenous tumor antigen, NY-ESO-1, by distinct human dendritic cell populations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(16)10629-10634.
- Nakahara T, Moroi Y, Uchi H, Furue M. Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement. *J Dermatol Sci*. 2006;42(1)1-11..
- Naik SH. Demystifying The development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol. Cell Biol*. 2008;86(5)439-452.
- Nalbandian G, Paharkova-Vatchkova V, Mao A, Nale S, Kovats S. The selective estrogen receptor modulators, tamoxifen and raloxifene, impair dendritic cell differentiation and activation. *J Immunol*. 2005;175(4)2666-2675.
- Neidhardt-Berard EM, Berard F, Banchereau J, Palucka AK. Dendritic cells loaded with killed breast cancer cells induce differentiation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Breast Cancer Res*. 2004;6(4)322-328.
- Nencioni A, Brossart P. Cellular immunotherapy with dendritic cells in cancer: current status. *Stem Cells*. 2004;22(4)501-513.
- Neves AR, Ensina LF, Anselmo LB, Leite KR, Buzaid AC, Câmara-Lopes LH, Barbuto JA. Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54(1)61-66.
- Ninomiya T, Akbar SM, Masumoto T, Horiike N, Onji M. Dendritic cells with immature phenotype and defective function in the peripheral blood from patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 1999;31(2)323-331.
- O'Neill DW, Adams S, Bhardwaj N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood*. 2004;104(8)2235-2246.
- Paharkova-Vatchkova V, Maldonado R, Kovats S. Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c+ CD11b(intermediate) dendritic cells from bone marrow precursors. *J Immunol*. 2004;172(3)1426-1436.
- Park SM, Kim S, Choi JS, Hur DY, Lee WJ, Lee MS, Choe J, Lee TH. TGF-beta inhibits Fas-mediated apoptosis of a follicular dendritic cell line by down-regulating the expression of Fas and caspase-8: counteracting role of TGF-beta on TNF sensitization of Fas-mediated apoptosis. *J Immunol*. 2005;174(10)6169-6175.

- Péguet-Navarro J, Sportouch M, Popa I, Berthier O, Schmitt D, Portoukalian J. Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J Immunol.* 2003;170(7)3488-3494.
- Pinzon-Charry A, Ho CS, Maxwell T, McGuckin MA, Schmidt C, Furnival C, Pyke CM, López JA. Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer. *Br J Cancer.* 2007;97(9)1251-1259.
- Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature.* 2004;23(7007)461-466.
- Polanczyk MJ, Jones RE, Subramanian S, Afentoulis M, Rich C, Zakroczymski M, Cooke P, Vandenbark AA, Offner H. T lymphocytes do not directly mediate the protective effect of estrogen on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 2004;165(6)2069-2077.
- Powles TJ, Hickish T. Tamoxifen Therapy and Carcinogenic Risk. *Journal of the National Cancer Institute.* 1995;87(18)1343-1345.
- Puig-Kröger A, Pello OM, Selgas R, Criado G, Bajo MA, Sánchez-Tomero JA, Alvarez V, del Peso G, Sánchez-Mateos P, Holmes C, Faict D, López-Cabrera M, Madrenas J, Corbí AL. Peritoneal dialysis solutions inhibit the differentiation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells: effect of lactate and glucose-degradation products. *J Leukoc Biol.* 2003;73(4)482-492.
- Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, Kraus E, Guinet E, Chalouni C, Caron D, Maliszewski C, Davoust J, Fay J, Palucka K. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J. Immunol.* 2000;165(1)566-572.
- Ratta M, Fagnoni F, Curti A, Vescovini R, Sansoni P, Oliviero B, Fogli M, Ferri E, Della Cuna GR, Tura S, Baccarani M, Lemoli RM. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood.* 2002;100(1)230-237.
- Reichert TE, Scheuer C, Day R, Wagner W, Whiteside TL. The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer.* 2001;91(11)2136-2147.
- Reiman JM, Kmiecik M, Manjili MH, Knutson KL. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin Cancer Biol.* 2007;17(4) 275-87.

- Rui Z, Jian-Guo J, Yuan-Peng T, Hai P, Bing-Gen R. Use of serological proteomic methods to find biomarkers associated with breast cancer. *Proteomics*. 2003;3(4)433–439.
- Rutella S, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood*. 2006;1(9)1435-1440.
- 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. *J Exp Med*. 1994;179(4)1109-1118.
- Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, Forster R, Burgstahler R, Lipp M, Lanzavecchia A. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol*. 1999;29(5)1617-1625.
- Sasano H, Suzuki T, Takeyama J, Utsunomiya H, Ito K, Ariga N, Moriya T. 17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human breast and endometrial carcinoma. A new development in intracrinology. *Oncology*. 2000;59(1) 5-12.
- Saxon A, Feldhaus J, Robins RA. Single step separation of human T and B cells using AET treated srbc rosettes. *J Immunol Methods*. 1976;12(3-4)285-288.
- Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff GE, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007;81(1)15-27.
- Schoppmann SF, Birner P, Stöckl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K, Kerjaschki D. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol*. 2002;161(3)947–956.
- Schnurr M, Chen Q, Shin A, Chen W, Toy T, Jenderek C, Green S, Miloradovic L, Drane D, Davis ID, Villadangos J, Shortman K, Maraskovsky E, Cebon J. Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood*. 2005;105(6)2465-2472.
- Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(2)138-147.
- Sellin D. Tumour immunology. *Prax Klin Pneumol*. 1979;33(1)341-349.
- Semenza GL. Regulation of hypoxia-induced angiogenesis: a chaperone escorts VEGF to the dance. *J Clin Invest*. 2001;108(1)39-40.

- Sharma S, Stolina M, Yang SC, Baratelli F, Lin J, Atianzar K, Luo J, Zhu L, Lin Y, Huang M, Dohadwala M, Batra RK, Dubinett SM. Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function. *Clin Cancer Res.* 2003;9(3)961-968.
- Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonecchi R, Mantovani A. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol.* 1998;161(3)1083-1086.
- Steinman RM. Dendritic cells. *Transplantation.* 1981;31(3)151-155.
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973;137(5)1142-1162.
- Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The Induction of Tolerance by Dendritic Cells That Have Captured Apoptotic Cells. *J. Exp. Med.* 2000;191(2)411–416.
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2003;21:685-711.
- Stojadinovic A, Mittendorf EA, Holmes JP, Amin A, Hueman MT, Ponniah S, Peoples GE. Quantification and phenotypic characterization of circulating tumor cells for monitoring response to a preventive HER2/neu vaccine-based immunotherapy for breast cancer: a pilot study. *Ann Surg Oncol.* 2007;14(12)3359-3368.
- Sun Q, Kong CT, Huang FP, Chan LC. Aberrant dendritic cell differentiation initiated by the Mll-Een fusion gene does not require leukemic transformation. *J Leukoc Biol.* 2008;83(1)173-180.
- Suzuki T, Moriya T, Ariga N, Kaneko C, Kanazawa M, Sasano H. 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in human breast carcinoma: a correlation to clinicopathological parameters. *Br J Cancer.* 2000;82(3)518-523.
- Tada T, Ohzeki S, Utsumi K, Takiuchi H, Muramatsu M, Li XF, Shimizu J, Fujiwara H, Hamaoka, T. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J Immunol.* 1991;146(3)1077-1082.
- Tamaoki B. Steroidogenesis and cell structure. Biochemical pursuit of sites of steroid biosynthesis. *J Steroid Biochem.* 1973;4(1)89-118.

- Toritsu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, Nishioka Y, Sone S, Kuwano M. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF α and IL-1 α . *Int J Cancer*. 2000;85(2)182–188.
- Tourkova IL, Yamabe K, Foster B, Chatta G, Perez L, Shurin GV, Shurin MR. Murine prostate cancer inhibits both in vivo and in vitro generation of dendritic cells from bone marrow precursors. *Prostate*. 2004;59(2)203-213.
- Trefzer U, Herberth G, Wohlan K, Milling A, Thiemann M, Sharav T, Sparbier K, Sterry W, Walden P. Tumour-dendritic hybrid cell vaccination for the treatment of patients with malignant melanoma: immunological effects and clinical results. *Vaccine*. 2005;23(17-18)2367-2373.
- Tsung K, Dolan JP, Tsung YL, Norton JA. Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection. *Cancer Res*. 2002;62(17)5069–5075.
- Uemura Y, Liu TY, Narita Y, Suzuki M, Matsushita S. 17 Beta-estradiol (E2) plus tumor necrosis factor-alpha induces a distorted maturation of human monocyte-derived dendritic cells and promotes their capacity to initiate T-helper 2 responses. *Hum Immunol*. 2008;69(3)149-157.
- Vassiliou E, Jing H, Ganea D. Prostaglandin E2 inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Immunol*. 2003;223(2)120-132.
- Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(7)543-555.
- Vokaer R. Role of hormones in the genesis of breast cancer. *J Gynecol Obstet Biol Reprod*. 1975;4(2)189-197.
- Warburg O. On the facultative anaerobiosis of cancer cells and its use in chemotherapy. *Munch Med Wochenschr*. 1961;103:2504–2506.
- Waskiewicz AJ, Cooper JA. Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Current Opinion in Cell Biology*. 1995;7(6)798-805.
- White INH. The Tamoxifen dilemma. *Carcinogenesis*. 1999;20(7)1153-1160.
- Yamamura M, Modlin RL, Ohmen JD, Moy RL. Local expression of antiinflammatory cytokines in cancer. *J Clin Invest*. 1993;91(3)1005-1010.

Yanagihara S, Komura E, Nagafune J, Watarai H, Yamaguchi Y. EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J Immunol.* 1998;161(6)3096-3102.

Yue W, Wang JP, Li Y, Bocchinfuso WP, Korach KS, Devanesan PD, Rogan E, Cavalieri E, Santen RJ. Tamoxifen versus aromatase inhibitors for breast cancer prevention. *Clin Cancer Res.* 2005;11(2 Pt 2)925s-930s.

Zhou BP, Li Y, Hung MC. HER-2/Neu signaling and therapeutic approaches in breast cancer. *Breast Dis.* 2002;15:13-24.

Integrative Cancer Biology Program. (Cancer Cell Collection Home Page). Lawrence Berkeley National Laboratory. Berkeley. Disponível em: <http://icbp.lbl.gov/breastcancer/celllines.php> [visitado em 15 de julho de 2008].