Marisa Treglia

**Análise de células mononucleares mantidas em cultura em meio propicio para
geração de células dendríticas obtidas de pacientes com câncer de pâncreas**

São Paulo

2008

Marisa Treglia

Análise de células mononucleares mantidas em cultura em meio propício para geração de células dendríticas obtidas de pacientes com câncer de pâncreas

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Imunologia).

Área de Concentração:
Imunologia

Orientador:
Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto

São Paulo
2008

Marisa Treglia

Análise de células mononucleares mantidas em cultura em meio propício para geração de células dendríticas obtidas de pacientes com câncer de pâncreas

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Imunologia).

Área de Concentração:
Imunologia

Orientador:
Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto

São Paulo
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

RETIRAR NA BIBLIOTECA

FOLHA DE REPRODUÇÃO DO CERTIFICADO/PARECER DA COMISSÃO DE
ÉTICA

Dedicatória

A minha mãe, meu verdadeiro porto seguro.

A minha filha, que faz minha vida valer a pena.

A minha irmã,

Nós somos como água e vinho, mas um amor enorme nos ronda

Agradecimentos

Ao Prof. Dr José Alexandre M. Barbuto pela grande oportunidade de permanecer em seu laboratório por 9 anos, onde pude adquirir conhecimentos relevantes para minha vida profissional.

A Banca de qualificação: Dr André Luis Montagnini, Dr Niels Olsen Saraiva Câmara, Dr Karina Bastos, pelas sugestões.

Aos meus amigos novos e antigos do laboratório, por todos os bons momentos juntos.

A Patrícia Bergami por toda amizade anos.

A Célia por toda ajuda na realização deste projeto.

A Gabriela e Graziela, pela grande parceria dos últimos tempos.

A Andréia, Camila e Clara, grande amizade que nasceu no laboratório.

A Luciene Anselmo por ter aberto uma grande oportunidade na minha carreira na área pesquisa clínica.

A Simone Bernardino, pela grande ajuda na técnica de marcação intra-celular.

Ao João, estarei sempre torcendo muito por você.

A Jotelma, pela amizade e carinho.

Ao Dr Marcel Cerqueira César Machado, Dr José Eduardo Monteiro da Cunha, Dr José Jukemura, pelo interesse e colaboração deste trabalho.

Dr André Matheus Siqueira, pela ajuda fundamental na realização deste trabalho.

Lia Leite Capasso, por ter me ajudado em momentos tão difíceis da minha vida.

Aos pacientes, que gentilmente cederam material para realização deste trabalho.

Agradeço a todos que, de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

**Succes is the ability to continue
to move through total disaster**

Winston Churchiℓ

Resumo

RESUMO

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. 110 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Adenocarcinoma Pancreático é um tumor maligno com mau prognóstico, e por isso há necessidade de aperfeiçoamento ou criação de novas estratégias terapêuticas. A vacinação baseada em DCs é uma das abordagens mais promissoras, uma vez que as DCs são as células apresentadoras de antígenos (APCs) mais potentes e centrais para a indução e manutenção de uma resposta imune. Entretanto, em pacientes com câncer, a geração e a função de DCs podem ser deficientes, impondo um obstáculo para o sucesso de seu uso. Neste trabalho, nós descrevemos a geração *in vitro* de DCs a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) obtidas de pacientes ictericos com câncer de pâncreas e, também, o efeito do plasma icterico (PI) sobre as culturas de DCs de doadores saudáveis. PBMCs foram separadas do sangue obtido de 22 pacientes e 22 doadores saudáveis. Células aderentes foram cultivadas com GM-CSF e IL-4 (50ng/mL) por 7 dias. No 5o dia, TNF- α (50ng/mL) foi adicionado para a maturação das DCs. Culturas foram realizadas em 10% PI ou plasma normal (PN). Células não aderentes foram coletadas no 7o dia, marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD86, CD11c, CD14 e HLA-DR e analisados por citometria de fluxo. Células de pacientes, cultivadas em 10% de PI, quando comparadas com células de doadores saudáveis, cultivadas em 10% PN, apresentaram expressão reduzida ($p<0,05$) de CD86 e HLA-DR. É interessante observar que células geradas de PBMCs de pacientes não expressaram CD11c, diferente das células derivadas de doadores saudáveis. A presença de PI nas culturas dos doadores saudáveis causou uma significativa diminuição na porcentagem de expressão de células HLA-DR+, CD11c+, CD86. Finalmente, quando PBMCs de pacientes foram cultivadas em PN, houve um aumento na expressão de HLA-DR e CD86 ($p<0,05$). Os ensaios de proliferação demonstraram também que as células de pacientes ictericos tiveram capacidade aloestimuladora de linfócitos reduzida, quando comparada a de células de doadores

saudáveis. Estes dados indicam uma alteração importante na capacidade das células de pacientes se diferenciarem em DCs in vitro, um fenômeno que parece depender tanto de fatores solúveis presentes no plasma e sobre as próprias células.

Palavras-chave: Células dendríticas. Icterícia. Neoplasias pancreáticas.

Abstract

ABSTRACT

TREGLIA, M. **Dendritic cells (DC) generation from peripheral blood mononuclear cells obtained from jaundiced patients with pancreatic adenocarcinoma.** 2008. 110 f. Doctorate Thesis (Imunology). – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Pancreatic adenocarcinoma (PAdc) is an aggressive malignancy with poor prognosis, urging for improved or new therapeutic strategies. DC-based vaccination is one of such promising approaches. DC are the most potent antigen-presenting cells and central to the induction and maintenance of an immune response. However, in cancer patients DC generation and function may be deficient, imposing an obstacle to the success of their use. Here, we describe the *in vitro* generation of DC from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained from jaundiced patients with PAdc and, also, the effect of jaundiced plasma (JP) in the phenomenon. PBMC were separated from blood obtained from 10 patients and 10 healthy controls over a density gradient. Adherent cells were cultured with GM-CSF and IL-4 (50ng/mL) for 7 days. On the 5th day, TNF- α (50ng/mL) was added for DC activation. Cultures were performed in 10% JP or normal plasma (NP). Non-adherent cells were harvested at day 7, labeled with FITC- or PE-conjugated monoclonal antibodies against CD86, CD11c, CD14, HLA-DR and analyzed by flow cytometry. Patients' cells, cultured in 10% JP, compared to healthy donors' cells, cultured in 10% NP, had a significantly ($p < 0.05$) lower expression of CD86 and HLA-DR. It is noteworthy that cells generated from patients' PBMC did not express CD11c, while from those derived from healthy donors' cells did so. The presence of JP in healthy donors' cells cultures caused a significant decrease in the percentage of HLA-DR⁺, CD11c⁺ and CD86⁺ cells. Finally, when patients' PBMC were cultured in NP, a significant increase in HLA-DR and in CD86 expression occurred. MLR assays also demonstrated that cells from jaundice patients had decreased capacity to stimulate allostimulation of lymphocytes when compared to healthy donors. These data indicate a significant alteration in the patients' PBMC ability to differentiate into DC *in vitro*, a phenomenon

that seems to depend both on soluble factors present in plasma and on the cells, themselves.

Key-words: Dendritic cells. Jaundice. Pancreatic neoplasms.

LEGENDA DE FIGURAS

Figura 1 -	Para análise fenotípica das células obtidas após cultura, selecionamos uma região de células que exclui linfócitos e células mortas, levando em consideração tamanho e granulosidade , mantendo apenas células com características de DCs como descrito na literatura (BANCHEREAU et al., 2000; GUERMONPREZ et al., 2002; MACKENSEN et al., 1994; STEINMAN; HAWIGER; NUSSENZWIEG, 2003; TROMBETTA; MELLMAN, 2005).....	44
Figura 2 –	A região onde consideramos a porcentagem de proliferação (M2).....	47
Figura 3 -	Tamanho e granulosidade das células mononucleares que mantivemos em cultura para diferenciação e maturação em células dendríticas, após 2 horas de aderência	52
Figura 4 -	Dotplot representativo dos marcadores HLA-DR e CD14, dos monócitos dos controles e dos pacientes ictericos, que utilizamos para geração de DCs, após 2 horas de aderência das PBMC	53
Figura 5 -	Média de intensidade de fluorescência da molécula HLA-DR nos monócitos que utilizamos para iniciar nossas culturas para geração de células dendríticas, após 2 horas de aderência das PBMC	53
Figura 6 -	Média de intensidade de fluorescência dos marcadores CD11c e CD86 nos monócitos que utilizamos para realizar cultura de células dendríticas, após 2 horas de aderência das PBMC	54
Figura 7 -	Tamanho e granulosidade dos monócitos que foram tratados com GM-CSF e IL-4 e mantidos por 5 dias em cultura para diferenciação em células dendríticas	55
Figura 8 -	Dotplot representativo dos monócitos que foram tratados com GM-CSF e IL-4 e mantidos por 5 dias em cultura para diferenciação em células dendríticas	56
Figura 9 -	Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência das moléculas de superfície CD11c e CD86, dos monócitos que foram tratados com GM-CSF e IL-4 e mantidos por 5 dias em cultura para diferenciação em células dendríticas.....	56
Figura 10 -	Número de células recuperadas ao final da cultura de 7 dias.....	57

Figura 11 -	Fotografia de uma placa de cultura após retirada das células não aderentes no 7º dia. A – cultura de monócitos de doadores saudáveis na presença de plasma normal. B- cultura de monócitos de pacientes ictericos na presença de plasma de paciente	58
Figura 12 -	Dot Plot representativo das células que ficaram aderidas ao fundo da placa após 7 dias de cultura e em seguida, tratadas	58
Figura 13 –	Histograma representativo da média de fluorescência dos marcadores de membrana das células que estavam aderidas na placa, ao término do período de cultura e após tratamento com acutase. Realizamos marcação com anticorpos monoclonais anti-CD14, CD11c e HLA-DR.....	59
Figura 14 -	Os dot plots acima mostram tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células diferenciadas a partir de monócitos de doadores saudáveis (A) ou a partir de monócitos de pacientes ictericos (B)	60
Figura 15 -	Porcentagem de células dentro das regiões selecionadas no grupo controle e no grupo de pacientes ictericos com câncer de pâncreas. *p<0,05	61
Figura 16 -	Dot plots representativos da análise dos marcadores de superfície expressos (HLA-DR, CD11c e CD14) por células obtidos das culturas de monócitos de pacientes ictericos e de doadores saudáveis, sob condições para diferenciação e maturação de células dendríticas.....	62
Figura 17 -	Porcentagens das células positivas para os marcadores HLA-DR, CD11c e CD14, obtidas nos diferentes ensaios realizados com células de pacientes ictericos comparadas com seus respectivos controles	63
Figura 18 -	Dot plots representativos dos resultados obtidos das culturas de monócitos de pacientes anictéricos mantidos em meio de cultura suplementado com 10% de plasma autólogo, comparados aos controles, monócitos de doadores saudáveis mantidos com cultura com 10% de pool de plasma normal	64
Figura 19 -	Porcentagens de células positivas para HLA-DR, CD11c e CD14 obtidas nos diferentes ensaios realizados com monócitos de pacientes anictéricos mantidos em cultura suplementada com GM-CSF, IL-4 e TNF, acrescido de 10% de pool de plasma autólogo	65
Figura 20 -	Dot plots representativos das culturas de monócitos de pacientes ictericos mantidos em cultura na presença de “pool” de plasma icterico ou na presença de “pool” de plasma	

	normal	66
Figura 21 -	Porcentagens de células positivas para os marcadores HLA-DR, CD11c e CD14 obtidas nos diferentes ensaios realizados com células de paciente icterico mantidas em cultura com 10% de “pool” de plasma icterico ou 10% pool de plasma normal	67
Figura 22 -	Dot plot representativo dos resultados obtidos das culturas de monócitos de doadores saudáveis mantidos em meio de cultura com GM-CSF, IL-4, acrescido de 10% de pool de plasma icterico ou 10% de pool de plasma normal, além de TNF no 5º dia de cultura	68
Figura 23 -	Porcentagens dos marcadores HLA-DR, CD11c e CD14 obtidas nos diferentes ensaios realizados com monócitos de doadores saudáveis mantidos em meio de cultura suplementado com GM-CSF, IL-4 e TNF (adicionado no 5º dia de cultura), acrescido de 10% de pool de plasma icterico ou 10% de plasma normal	69
Figura 24 -	Dot plots representativos de FSC X CD86 analisados nos diferentes ensaios de diferenciação e maturação de células dendríticas obtidas a partir de monócitos de pacientes ictericos	70
Figura 25 -	Porcentagem de CD86 encontrada nas análises realizadas em conjunto com FSC nos diferentes ensaios de diferenciação e maturação de células dendríticas obtidas a partir de monócitos de pacientes ictericos	70
Figura 26 -	Dot plots representativos de células HLA-DR ⁺ CD86 ⁺ analisadas nos diferentes ensaios de diferenciação e maturação de células dendríticas obtidas a partir de monócitos de pacientes ictericos	71
Figura 27 -	Porcentagem de moléculas CD86 encontradas nas análises realizadas avaliando os marcadores de superfície CD86 e HLA-DR dos últimos 6 pacientes analisados. Nos diferentes ensaios utilizamos células de pacientes ictericos mantidas em cultura em meio propício para diferenciação de células dendríticas suplementados com pool de plasma normal ou pool de plasma icterico(*<p0,05).....	72
Figura 28 -	Porcentagem de CD86 encontradas nas análises realizadas avaliando o marcador de superfície CD86. Nos diferentes ensaios utilizamos células de pacientes ictericos mantidas em cultura em meio propício para diferenciação de células dendríticas suplementados com pool de plasma normal ou pool de plasma icterico (*<p0,05).....	73

Figura 29 -	Monócitos de doadores saudáveis mantidos em cultura para diferenciação e maturação de células dendríticas em meio suplementado com pool de plasma normal ou pool de plasma icterico.....	74
Figura 30 -	A)Células de doadores saudáveis B) Células de pacientes ictericos mantidas em cultura com plasma icterico C) Células de pacientes ictericos mantidas em cultura com plasma normal. Dados de um experimento representativo de 6.....	75
Figura 31 -	A) Células dendríticas de doadores saudáveis mantidos em cultura com 10% pool de plasma normal B) Células de doadores saudáveis mantidos em cultura com pool de plasma icterico.....	76
Figura 32 -	Avaliação da concentração de IL-12p40 no sobrenadante das culturas de monócitos de pacientes ictericos com câncer de pâncreas comparados ao sobrenadante das culturas de monócitos de doadores saudáveis.....	77
Figura 33 -	Avaliação da concentração de IL-12p70 no sobrenadante das culturas de monócitos de pacientes ictericos comparados ao sobrenadante das culturas de monócitos de doadores saudáveis.....	77
Figura 34 -	Avaliação da concentração de IL-10 no sobrenadante das culturas de monócitos de pacientes ictericos comparada à concentração de IL-10 no sobrenadante das culturas de monócitos de doadores saudáveis.....	78
Figura 35 -	Avaliação da concentração de IL-10 no sobrenadante das culturas de monócitos de pacientes ictericos comparada à concentração de IL-10 no sobrenadante das culturas de monócitos de doadores saudáveis.....	79
Figura 36 -	Avaliação da concentração de IL-12p70 no sobrenadante das culturas de monócitos de pacientes ictericos comparada à concentração de IL-12p70 no sobrenadante das culturas de monócitos de doadores saudáveis.....	80
Figura 37 -	Análise da expressão intracelular de STAT-1 em células de pacientes ictericos mantidas em cultura em meio propício para diferenciação de células dendríticas suplementado com pool de plasma icterico. Como controle positivo utilizamos DCs maturadas com LPS	81

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	26
2	OBJETIVOS	38
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	CASUÍSTICA	40
3.2	OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES	41
3.3	DOSAGEM DE BILIRRUBINA.....	41
3.4	OBTENÇÃO DO POOL DE PLASMA.....	41
3.5	CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES PARA GERAÇÃO DE DCs.....	42
3.6	AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE MEMBRANA POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	42
3.7	MARCAÇÃO INTRACELULAR PSTAT-1	44
3.8	SEPARAÇÃO DE LINFÓCITOS T PARA ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO.....	45
3.8.1	Preparação das hemácias de carneiro	45
3.8.2	Recuperação de linfócitos T	46
3.8.3	Avaliação de atividade aloestimuladora das DCs	47
3.9	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS.....	48
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
4	RESULTADOS	51
4.1	ANÁLISE DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES ICTÉRICOS.....	51
4.2	ANÁLISE DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES ICTÉRICOS MANTIDOS EM CULTURA POR 5 DIAS EM MEIO CONTENDO GM-CSF E IL-4	54

4.3	RENDIMENTO DA CULTURA DE 7 DIAS DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES ICTÉRICOS PARA MATURAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO EM CÉLULAS DENDRÍTICAS	57
4.4	OBSERVAÇÃO DO FUNDO DA PLACA AO MICROSCÓPIO, APÓS RETIRADA DAS CÉLULAS NÃO ADERENTES AO FINAL DA CULTURA.....	57
4.5	ANÁLISE DO FENÓTIPO DAS CÉLULAS ADERIDAS AO FUNDO DA PLACA.....	58
4.6	AVALIAÇÃO DOS MARCADORES HLA-DR, CD14 E CD11C NAS DCS GERADAS <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES ICTÉRICOS.....	59
4.7	AVALIAÇÃO DOS MARCADORES HLA-DR, CD14 E CD11C NAS DCS GERADAS <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES ANICTÉRICOS	63
4.8	AVALIAÇÃO DOS MARCADORES HLA-DR, CD11C E CD14 NAS DCS GERADAS <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES ICTÉRICOS MANTIDAS EM CULTURA COM “POOL” DE PLASMA NORMAL	65
4.9	AVALIAÇÃO DOS MARCADORES HLA-DR, CD11C E CD14 NAS DCS, GERADAS <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE MONÓCITOS DE DOADORES SAUDÁVEIS MANTIDAS EM CULTURA COM 10% DE “POOL” DE PLASMA NORMAL OU 10% DE “POOL” DE PLASMA ICTÉRICO	67
4.10	AVALIAÇÃO DO MARCADOR CD86 NAS DCS GERADAS <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES ICTÉRICOS.....	69
4.11	AVALIAÇÃO DO MARCADOR CD86 NAS DCS GERADAS <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES ICTÉRICOS MANTIDAS EM CULTURA COM “POOL” DE PLASMA NORMAL.....	72
4.12	AVALIAÇÃO DO MARCADOR CD86 NAS DCS GERADAS <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE MONÓCITOS DE DOADORES SAUDÁVEIS MANTIDAS EM CULTURA COM “POOL” DE PLASMA ICTÉRICO OU “POOL” DE PLASMA NORMAL	73
4.13	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ALOESTIMULADORA DAS DCS GERADAS A PARTIR DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES ICTÉRICOS COM CÂNCER DE PÂNCREAS.....	74
4.14	AVALIAÇÃO DE CITOCINAS PRESENTES NO SOBRENADANTE DO 7º DIA DAS CULTURAS DE DCS DIFERENCIADAS <i>IN VITRO</i> A	

	PARTIR DE MONÓCITOS DE PACIENTES ICTÉRICO	76
4.15	AVALIAÇÃO DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T QUE FORAM ESTIMULADOS COM DCS DIFERENCIADAS <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE MONÓCITOS DE PACIENTES ICTÉRICOS COM CÂNCER DE PÂNCREAS	78
4.16	AVALIAÇÃO INTRACELULAR DE STAT-1 FOSFORILADA NAS DCS DIFERENCIADAS <i>IN VITRO</i> A PARTIR DE MONÓCITOS DE PACIENTES ICTÉRICOS COM CÂNCER DE PÂNCREAS	80
5	DISCUSSÃO	83
6	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS	95
	ANEXOS	107

Introdução e Justificativa

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O câncer de pâncreas é o 4º tipo de neoplasia em incidência nos EUA. O índice de novos casos diagnosticados por ano é quase igual ao índice de mortalidade causada por esta doença. A taxa de sobrevivência é de cinco anos em menos de 5% dos pacientes (JEMAL et al., 2008). No Brasil, o câncer de pâncreas representa 2% de todos os tipos de câncer, sendo responsável por 4% do total de mortes por câncer (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2006).

A descoberta do câncer de pâncreas ocorre normalmente em fase avançada da doença, devido à dificuldade de diagnosticar este tipo de doença no início, o que contribui para um mau prognóstico. Normalmente, no momento do diagnóstico já existem nódulos linfáticos comprometidos e metástases em outros órgãos. Apesar dos avanços nas técnicas cirúrgicas, esta modalidade terapêutica não conseguiu ainda melhorar a sobrevida destes pacientes, apenas 10-20% dos pacientes podem se beneficiar deste tipo de tratamento, as ressecções curativas estão em torno de 14% e a média de sobrevivência destes pacientes é de 15-19 meses (YEO, 1995).

Da mesma forma, a quimioterapia e a radioterapia não parecem ter efeitos satisfatórios (FARROW; EVRES, 2002) no tratamento de pacientes portadores deste tipo de neoplasia, justificando assim a busca de outras abordagens terapêuticas.

A imunoterapia é um tipo de tratamento que vem sendo bastante estudado em diferentes neoplasias. Este tratamento baseia-se na capacidade potencial do sistema imune de reconhecer e dirigir uma resposta contra as células tumorais. Há diversas abordagens da imunoterapia, específicas e inespecíficas, passivas e ativas (BLANKENSTEIN; QIN; UBERLA, 1991; HIRD et al., 1993; KWAK et al., 1992; MINEV; CHAVEZ; MITCHELL, 1999; RIBAS et al., 2003; RIZZO; SILVOTTI, 2003;

ROSENBERG; LIPSETT, 2001; WHITTINGTON; FAULDS, 1993), mas, frente ao câncer de pâncreas, praticamente todas têm sido ineficientes (GJERTSEN et al., 2001; JEROME; DOMENECH; FINN, 1993; MUKHERJEE et al., 2001; ROSENBERG; LIPSETT, 2003).

Estes insucessos, todavia, podem ser ocasionalmente interrompidos por resultados que reacendem o interesse neste tipo de tratamento. Schott et al. (1999) descreveram a geração de vacina com células dendríticas (DCs) em pacientes com câncer de pâncreas. Neste estudo, um paciente, que apresentava metástases no fígado dois anos após a retirada do tumor primário, foi vacinado com DCs derivadas de monócitos autólogos e pulsadas com células tumorais das metástases do fígado. Após a terceira dose da vacina, foi observada reação de hipersensibilidade contra um lisado de células tumorais e redução tumoral, avaliada através da dosagem de cromogranina A. Estes dados sugerem que uma ativação adequada do sistema imune poderia gerar resultados efetivos no tratamento do câncer de pâncreas.

Contribuindo para essa linha de raciocínio, diversos estudos na literatura indicam que o sistema imune do paciente com câncer é capaz de reconhecer tumores e montar uma adequada resposta tumor-específica. Entretanto, os tumores apresentam mecanismos de escape que lhes permitem atingir uma situação de equilíbrio com o sistema imune, afetando tanto mecanismos da imunidade inata, quanto da adquirida (BARBUTO, 1999; ZOU, 2005).

Um alvo importante destes mecanismos tumorais de escape da resposta imune parece ser a célula dendrítica (DC) (KATSENELSON et al., 2001; KUDELA et al., 2001; PEQUET-NAVARRO et al., 2003; ZOU, 2005). Esta célula tem importante papel no sistema imune, uma vez que é a principal célula apresentadora de antígenos. Todavia, um dos obstáculos de se estudar estas células é o fato de que

no sangue periférico total apenas 1% dos leucócitos são DCs.

Quando Sallusto e Lanzavecchia (1994) mostraram a possibilidade de gerar DCs *in vitro*, a partir de precursores de sangue periférico, criou-se a possibilidade de um estudo mais amplo deste tipo celular. As culturas de DCs são feitas inicialmente a partir de culturas de monócitos, cujo marcador característico é a molécula CD14, também presente nos macrófagos teciduais (ELKORD et al., 2005; SANTIN et al., 1999; ZIEGLER-HEITBROCK, 2000). A ausência (ou baixa expressão) deste marcador nas culturas obtidas a partir destes monócitos durante o processo de diferenciação *in vitro*, tem sido utilizada extensivamente como indicador da diferenciação em DCs (BANCHEREAU et al., 2000).

Uma outra molécula que pode ser encontrada na superfície das DCs é a CD11c. Esta é uma molécula de adesão celular da classe das integrinas e está presente também em neutrófilos e monócitos e se liga ao endotélio através de CD52 e proteínas da matriz extracelular. Funciona também como Receptor de Complemento do tipo 4 (CR4), o que reforça a sua importância também na imunidade inata. As DCs humanas plasmocitóides não expressam este marcador ou o expressam em baixa quantidade e portanto são CD11c⁻ ou CD11c^{low} (BANCHEREAU et al., 2000; COLONNA; TRINCHIERI; LIU, 2004; LIU, 2001; O'NEILL; ADAMS; BHARDWAJ, 2004). Os monócitos utilizados para diferenciação em DCs humanas (consideradas DCs mielóides, em humanos) aumentam a expressão de CD11c após tratamento com GM-CSF e IL-4, durante 7 dias de cultura *in vitro* (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994, 2001).

As DCs demonstram grande eficiência na captura, processamento e apresentação de antígenos (BANCHEREAU et al., 2000; SALLUSTO et al., 1995; STEINMAN; HAWIGER; NUSSENZWIEG, 2003). Além disso, esta célula parece ser

a única capaz de apresentar antígenos a linfócitos T "naïve" (MEHTA-DAMANI; MARLOWICZ; ENGLEMAN, 1994, 1995), sendo deste modo fundamental para o início de uma resposta imune efetora. Uma vez ativada pelo encontro de um antígeno ou aumento de citocinas pró-inflamatórias no microambiente, à medida em que elas migram para os linfonodos drenantes, elas diminuem a sua capacidade fagocitária e aumentam a expressão de moléculas necessárias para apresentação de antígenos capturados (como as moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade - MHC II), ao mesmo tempo em que aumentam a expressão de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) (TROMBETTA; MELLMAN, 2005).

Assim, para uma ativação eficiente dos linfócitos é necessária uma primeira sinalização, que ocorre pela interação do complexo MHC-peptídeo nas células apresentadoras de antígenos com receptores nos linfócitos T (TCR). Uma segunda sinalização ocorre quando as moléculas co-estimuladoras nas APCs se unem aos seus ligantes CD28 e CTLA-4 expressos nos linfócitos (GUERMONPREZ et al., 2002; YOUNG et al., 1992). Essa segunda sinalização é fundamental ainda para a manutenção da ativação do clone de linfócito T (YOUNG et al., 1992; revisto por BANCHEREAU et al., 2000; GUERMONPREZ et al., 2002). Por outro lado, a ausência da segunda sinalização pode levar este clone de linfócito T à anergia clonal, que se traduziria pela ausência de resposta proliferativa do linfócito T (HARDING et al., 1992). Alguns trabalhos têm sugerido também a participação das moléculas co-estimuladoras na definição do padrão de resposta do linfócito T (revisto por GREENWALD; FREEMAN; SHARPE, 2005), dependendo do padrão de citocinas no microambiente.

De maneira semelhante, a mudança da cinética de expressão de moléculas

de MHC favorece a apresentação de antígenos capturados no momento de sua ativação para linfócitos T virgens. O processo de maturação das DCs é acompanhado por eventos intracelulares que incluem a diminuição dos níveis de SOCS (Supressores de Sinalização de Citocinas) 2 e pSTAT6, assim como aumento nos níveis de SOCS1, SOCS2, SOCS3 e pSTAT1 (JACKSON et al., 2004). É interessante notar que esta maturação, ao mesmo tempo em que é estimulada pelo aumento de pSTAT 1 é também controlada pelo aumento, simultâneo de SOCS1 (SHEN et al., 2004).

Além de seu papel claro na apresentação de Ags aos linfócitos T, as DCs, dependendo, entre outros possíveis fatores, do perfil de citocinas por elas liberadas, podem, ainda, influenciar o padrão de resposta dos linfócitos. Assim, a produção de IL-12 por DCs favorece o desenvolvimento de linfócitos T helper de padrão 1 (Th1) ao passo que a ausência de produção de IL-12 pelas DCs, na presença de IL-4 e/ou IL-13 favoreceria uma resposta predominantemente mediada por linfócitos do tipo Th2. Em contrapartida, a produção de IL-10 pelas DCs pode favorecer o surgimento de linfócitos T reguladores (Treg), caracterizados pela expressão do fator de transcrição Foxp3 e pela produção de citocinas imunossupressoras como TGF- β e IL-10 (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKI, 2003; HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003; ZOU, 2005).

De acordo com esses aspectos, portanto, a modificação funcional das DCs pode ter conseqüências importantes sobre a resposta imune sendo até possível a indução de tolerância a um antígeno por ação das DCs (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; STEINMAN; HAWIGER; NUSSENZWIEG, 2003). Desta forma não é de surpreender o achado de que tumores podem impedir a maturação das DCs, bloqueando completamente o desenvolvimento de uma resposta anti-tumoral

(ALMAND et al., 2001; ENK et al., 1997), podendo levar inclusive a um quadro de imunossupressão (revisto por ZOU, 2005).

Quando se analisa pacientes com câncer de pâncreas, por exemplo, pode-se perceber mais um fator que pode piorar este quadro de imunossupressão: a icterícia. Esta ocorre como consequência do bloqueio das vias biliares, causada pelo crescimento do tumor e impedindo o fluxo normal da bile para o intestino, fenômenos que levam à colestase e à icterícia (MONSON; GUILLOU, 1989).

A icterícia é uma denominação clínica para definir a coloração amarelada da pele e das mucosas quando os níveis plasmáticos de bilirrubina aumentam e ela se deposita nos tecidos e fluidos intersticiais. O nível plasmático normal de bilirrubina total varia entre 0,8 e 1,0 mg/dL (SCHMID, 1978).

A bilirrubina é formada a partir da destruição de hemácias velhas (KAY, 1975; revisto por BIONDI et al., 2004) que perdem sua elasticidade e são fagocitadas pelas células do sistema mononuclear fagocitário do baço. A hemácia é degradada, a hemoglobina decomposta e o ferro transportado pela transferrina do plasma para ser reutilizado pela medula óssea na formação de novas hemácias. Na decomposição da hemoglobina, o anel heme é aberto, criando-se uma cadeia de quatro anéis pirrólicos, que constitui o substrato a partir do qual são formados os pigmentos biliares. A enzima hemoxigenase (HO-1) degrada heme em biliverdina, ferro divalente e CO. HO-1 é um gene de resposta de estresse cuja expressão é induzida por vários estímulos incluindo heme, metais pesados, citocinas inflamatórias e óxido nítrico. HO-1 é conhecida por seu efeito citoprotetor contra lesões oxidativas e inflamação (SKULINA et al., 1999). A indução de expressão de HO-1 por ativadores farmacológicos ou transferência de genes têm tido efeitos terapêuticos em várias condições do sistema imune,

incluindo transplante e desordens inflamatórias. A biliverdina e seu metabólito, a bilirrubina, são conhecidos por seus efeitos antioxidantes e imunossupressores (ARAUJO et al., 2003; CHAUVEAU et al., 2005; HANCOCK et al., 1998; SOARES et al., 1998; YAMASHITA et al., 2004).

A bilirrubina combina-se imediata e intensamente com a albumina plasmática que é a responsável pelo transporte da bilirrubina até o fígado, onde é chamada de indireta ou não conjugada. Esta é absorvida pela membrana celular hepática. Neste momento a bilirrubina é desligada da albumina e combina-se com outra proteína que a aprisiona no interior da célula. A maior parte desta bilirrubina irá conjugar-se com o ácido glicurônico para formar glicuroneto de bilirrubina. Uma menor porção irá se conjugar com sulfato e formar o sulfato de bilirrubina. São com estas formas que a bilirrubina é excretada nos canalículos biliares, por meio de um processo de transporte ativo (revisado por KAMISAKO et al., 2000; ORTEN, 1971; WHITMER; HAUSER; GOLLAN, 1984).

A bilirrubina que é excretada pelo fígado estará acompanhada de outros produtos tais como, sais biliares, colesterol, ácidos graxos, lecitina, sódio, potássio e cálcio e a esta secreção dá-se o nome de bile. A bile é então armazenada na vesícula biliar e será secretada quando ocorrerem o relaxamento do esfíncter de Oddi e contrações da vesícula biliar, que impulsionam a bile pelo ducto biliar comum até o duodeno. Estes eventos ocorrem durante a digestão, onde o sal biliar tem uma ação detergente sobre partículas de gordura, ajudando na absorção dos ácidos graxos, dos monoglicerídios e do colesterol (GEROLAMI; SARLES, 1977).

Quando este processo sofre alguma alteração, pode ocorrer a icterícia. Esta pode acontecer pela incapacidade do fígado de conjugar toda bilirrubina que ali chega, acarretando aumento da bilirrubina indireta na circulação ou pode ser provocada por obstruções das vias biliares. Esta última acarreta uma forma de icterícia denominada obstrutiva. Nesta, a bilirrubina direta é que se encontra aumentada na circulação, tecidos e fluidos intersticiais. A estagnação da bile gera

um refluxo não só da bilirrubina conjugada, mas também de sais biliares, sendo, portanto, melhor designada como “colestase”.

Enquanto há poucas evidências de um efeito tóxico da bilirrubina direta, uma série de dados correlacionam, o aumento da bilirrubina indireta a danos celulares. Estes danos podem ser observados no “kernicterus”, onde a bilirrubina indireta causa encefalopatia (revisto por KARP, 1979) interferindo com o metabolismo, despolarização e função transmissora neural (BHUTANI, 2001; CASHORE, 1990; HANSEN, 2001; OSTROW et al., 2004; VAZQUEZ et al., 1988). Mais recentemente foi também demonstrado que neurônios de ratos recém-nascidos sofrem apoptose quando cultivados na presença de bilirrubina indireta (GROJEAN et al., 2001).

O efeito tóxico da bilirrubina indireta também foi observado em outros tipos celulares. Brito et al. (1996) mostraram perda de fosfolipídios de membrana dos eritrócitos na presença deste pigmento, enquanto estudos realizados com hepatócitos murinos, mostraram que a bilirrubina é capaz de causar apoptose também nestas células (BIRD et al., 2002; SEUBERT et al., 2002).

Entretanto boa parte dos casos de icterícia são quadros obstrutivos, com predomínio, portanto, da bilirrubina direta. Nestes quadros observa-se também uma série de alterações funcionais no organismo destes pacientes (revisto por SCOTT-CONNER; GROGAN, 1994). Dentre as causas da icterícia obstrutiva, as neoplasias de vias biliares, papila e cabeça de pâncreas ocupam lugar de destaque. Estas afecções têm como única opção curativa, ou de eficácia paliativa, a cirurgia.

Pacientes ictéricos costumam apresentar taxa de mortalidade maior após tratamento cirúrgico, quando comparados a pacientes com câncer de pâncreas sem icterícia. A icterícia está associada à alta incidência de complicações pós-cirúrgicas

imediatas, sendo as mais comuns: a falência renal, a hemorragia gastrointestinal, a deiscência de corte cirúrgico, a formação de fístulas e a septicemia (ARMSTRONG et al., 1984; PAIN; CAHILL; BAILEY, 1985; PELLEGRINI et al., 1987). Estas complicações ocorrem em 30 a 65% dos pacientes e levam a uma mortalidade de 20-30% (POVOSKI et al., 1999).

Desde a década de 50, tem-se procurado correlacionar alterações do sistema imune com as complicações pós-cirúrgicas nos pacientes ictericos (HALPERN et al., 1957). Neste período, diversos estudos foram realizados tanto em humanos quanto em animais e foram descritas alterações funcionais de células tais como as “natural killer” (NK) (HIRAZAWA; HAZAMA; OKA, 1999; LANE et al., 1996), neutrófilos (ANDY et al., 1992; PLUSA; WEBSTER; PRIMROSE, 1996; TAKAOKA et al., 2001; TSUJI et al., 1999;), linfócitos T (BEMELMANS et al., 1992; THOMPSON et al., 1990; THOMPSON; RANJBAR; ROWLANDS, 1993; YUCEYAR et al., 1996). Apesar destas diversas alterações funcionais do sistema imune terem sido descritas nestes pacientes (revisto por JIANG; PUNTIS, 1997; SCOTT-CONNER; GROGAN, 1994) ainda não existe um consenso de como a icterícia é capaz de atuar nos mecanismos do sistema imune, especialmente as DCs.

Outras células cuja função parece estar alterada nos estados de icterícia obstrutiva são os macrófagos. Em ensaios de fagocitose *in vitro*, essas células apresentam diminuição da fagocitose de *Escherichia coli* (DING et al., 1994) e *in vivo*, diminuição da capacidade de depuração das células de Kupffer (KENNEDY et al., 1999). Além disso, em humanos, monócitos de sangue periférico apresentam, na vigência de icterícia, produção aumentada de TNF- α , IL-6, IL-1 e IL-12, e diminuição da expressão de HLA-DR quando estimulados com lipopolissacarídeos (LPS) (DING et al., 1994; JIANG; PUNTIS, 1997; PUNTIS; JIANG, 1996).

Em um estudo realizado em nosso laboratório, a liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion superóxido (O_2^-) e a fagocitose por PBMC de pacientes ictericos foram analisadas pré e pós-cirurgia com alívio da colestase. Pré-cirurgia, PBMC de 53 pacientes foram incapazes de liberar H_2O_2 , enquanto, pós-cirurgia, células de 10/38 pacientes o fizeram. Esta recuperação não se correlaciona com a bilirrubinemia. Quando cultivadas, na presença de plasma normal ou plasma icterico, PBMC de 12/12 pacientes liberaram H_2O_2 , mas em níveis menores, se na presença de plasma icterico. Esta diferença não ocorreu com PBMC de controles. PBMC, pré e pós cirurgia, produziram O_2^- , em níveis equivalentes aos de controles. A fagocitose de *E.coli* por PBMC de pacientes mostrou-se diminuída, mas, quando presente, esteve associada a maior atividade microbicida. Estes dados evidenciam alterações significativas, porém reversíveis da função monocitária de pacientes ictericos, que podem contribuir para sua maior susceptibilidade a complicações pós-operatórias (TREGLIA-DAL LAGO et al., 2006).

Alterações funcionais de monócitos ganham um novo interesse ao se considerar que estas células podem dar origem às DCs, como já mencionado (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994). Além disso, a liberação de H_2O_2 , que pode ser um produto do metabolismo oxidativo de monócitos, e portanto, indicativo de seu estado de ativação, tem efeito significativo sobre a diferenciação e maturação das DCs, pelo menos *in vitro*. Estudo realizado por Verhasselt, Goldman e willems (1998) mostrou que houve um aumento na expressão de HLA-DR e diminuição de CD40 em DCs diferenciadas na presença de H_2O_2 . Em condições semelhantes de cultura, um estudo realizado por Rutault et al. (1999) demonstrou que DCs expostas a H_2O_2 tiveram um aumento da expressão de moléculas do MHC de classe I e II, CD40, CD86 e diminuição de CD32. Além disso, estas células também apresentaram

funcionalmente uma maior capacidade de estimular linfócitos T.

Desta forma, torna-se intrigante o estudo da diferenciação de DCs a partir de monócitos de pacientes ictericos. Uma vez que estes monócitos parecem incapazes de produzir H_2O_2 (ao menos *in vitro*), poderiam estas células originar DCs funcionalmente diversas?

Diante das alterações observadas no fenótipo e função de monócitos de pacientes ictericos com câncer de pâncreas e visto que estas células são um dos precursores das DCs, uma possível hipótese para a imunossupressão encontrada nos pacientes ictericos, com câncer de pâncreas, pode ser o fato dos monócitos destes diferenciarem-se em DCs com baixa eficiência estimuladora.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Avaliar se monócitos de pacientes ictericos com câncer de pâncreas são capazes de se diferenciar em células com fenótipo e função de células dendríticas.

O fenótipo foi avaliado pela análise da expressão de marcadores de superfície e a função avaliada pela análise da capacidade aloestimuladora e secreção de citocinas.

Adicionalmente, foi estudado um possível mecanismo molecular envolvido neste processo de diferenciação.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

O protocolo deste projeto foi aprovado pela comissão de ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob nº156/05 e pela comissão de ética em pesquisa com seres humanos do Instituto de Ciências Biomédicas/USP sob nº614/CEP. Os pacientes deste estudo estavam em tratamento no Serviço de Cirurgia das Vias Biliares e Pâncreas do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e apresentavam diagnóstico de adenocarcinoma de pâncreas na presença ou não de icterícia.

Não houve restrição de idade ou sexo e foram excluídos os pacientes que apresentavam diabetes, doenças autoimunes, imunodeficiências ou que realizaram transfusão sanguínea nas quatro semanas anteriores à coleta. Todos os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido. Como controle, foi coletado sangue de doadores voluntários saudáveis e os ensaios foram realizados em paralelo aos ensaios dos pacientes.

Coletamos sangue periférico de 21 pacientes ictericos com câncer de pâncreas, 13 do sexo feminino e 8 do sexo masculino, com idade entre 33 e 82 anos e com níveis de bilirrubinemia variando entre 2,5 mg/dL e 28,7 mg/dL. Também coletamos material de 6 pacientes anictéricos com câncer de pâncreas, 3 do sexo feminino e 3 do sexo masculino, com idade entre 45 e 80 anos, bilirrubinemia <1,0 mg/dL.

3.2 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

Foram coletados 30 mL de sangue periférico com anticoagulante, ácido etileno tetraacético (EDTA) de cada indivíduo participante do estudo. Este material foi dividido em duas frações de 15mL e cada uma delas foi colocada em tubo de 50mL, foi adicionado em cada tubo 10 mL de PBS (Solução salina tamponada com fosfato) e esta mistura foi homogeneizada. No fundo dos tubos adicionamos 12 mL de Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla Sweden, densidade 1.007 +/- 0,001g/mL). O material foi centrifugado a 900g por 30 minutos a 18° C e a camada de células mononucleares formada na interface foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur. As células obtidas foram lavadas duas vezes com meio RPMI, (Gibco Brl – Life Technologies, Grand Island, NY), pH 7,2, com centrifugação 437G, por 10 minutos. O botão celular foi ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB) (Gibco Brl – Life Technologies) , pH 7,2, e a viabilidade celular testada com azul de trypan (0,4% em PBS) 1:1.

3.3 DOSAGEM DE BILIRRUBINA

A análise dos níveis séricos de bilirrubina foi realizada pelo Serviço de Bioquímica Clínica do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP.

3.4 OBTENÇÃO DO POOL DE PLASMA

Para obtenção do “pool” de plasma icterico, 2ml de sangue periférico foram separados da amostra colhida de cada paciente, e centrifugado por 10min a 290 G.

Após 10 coletas fizemos um “pool” de plasma icterico, que foi aliquotado em tubos de 1,5 mL, contendo 100µL cada tubo e mantidos a -20°C.

3.5 CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES PARA GERAÇÃO DE DCs

As células mononucleares foram obtidas como descrito e ajustadas para 5×10^6 células/mL em meio RPMI. Estas células foram plaqueadas em placa de cultura de 12 poços, por um período de 2 horas, em estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂ e saturada de água, a 37°C. Após este período, as células não aderentes foram removidas e as células aderentes foram cultivadas por 7 dias em meio RPMI, acrescido de 10% de pool de plasma normal ou pool de plasma icterico e suplementado com interleucina-4 (IL-4) e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (Peprotech, México). No terceiro dia, metade da concentração de citocinas utilizadas inicialmente foi adicionada as culturas. No quinto dia, foi adicionada citocina TNF- α (Peprotech, México) para maturação das células. A concentração das citocinas utilizadas foi 50ng/mL.

3.6 AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE MEMBRANA POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para determinação de seu fenótipo de membrana, as células obtidas após período de cultura foram marcadas com anticorpos monoclonais para as seguintes moléculas de superfície: CD1a (marcador de DC imaturas e/ou de Langerhans), CD11c (marcador de células de linhagem mielóide; monócitos, macrófagos e DCs mielóides), CD14 (marcador de monócitos e macrófagos), CD80 (molécula co-estimuladora), CD83 (marcador de DC ativada/madura), CD86 (molécula co-estimuladora), CD123 (marcador de DC plasmocitóide) e HLA-DR (molécula

codificada por genes do MHC de classe II). Todos os anticorpos foram adquiridos da BD Pharmingen (San Jose, California).

Ao término do período de cultura as células foram removidas da placa e centrifugadas a 290 G por 5 minutos a 4°C. A concentração das células foi ajustada para 2×10^5 e colocadas em tubo de 1,5 mL para avaliação do fenótipo. O anticorpo específico para a molécula de interesse foi diluída em 25µL de tampão para citometria em PBS contendo 0,5% de soroalbumina bovina (Life Technologies) e 0,02% de azida sódica (Sigma). Os anticorpos foram adicionados aos tubos de plástico 1,5 mL (Eppendorf) que continham as células que foram mantidas em cultura e incubadas por 20 min a 4°C, no escuro.

O primeiro grupo de células não recebeu marcação, o segundo foi marcado com HLA-DR - MHC-classe II, CD11c e CD14. No terceiro grupo, marcamos as células com CD86 e CD123 (em apenas 4 amostras). Este tipo de marcação foi utilizado nos primeiros 16 pacientes.

Nos últimos seis pacientes, realizamos uma marcação diferente. Uma vez que nossos resultados mostraram maior alteração nas moléculas HLA-DR, CD11c e CD86, resolvemos em uma única amostra avaliar estes três marcadores incluindo CD14.

Após o período de incubação, as amostras foram lavadas duas vezes com 200µL de tampão de citometria de fluxo e centrifugação a 209g por 5 min. Finalmente, as células foram ressuspensas em 200µL de tampão para citometria contendo 2% de paraformaldeído, para fixação das células. A aquisição e análise foram feitas em citometria de fluxo (FACScalibur – Becton Dickson, California, EUA), com o auxílio do “software” CellQuest. As regiões analisadas foram selecionadas de acordo com o descrito pela literatura (BANCHEREAU et al., 2000; GUERMONPREZ et al., 2002; MACKENSEN et al., 1994; STEINMAN et al., 1978; STEINMAN; HAWIGER; NUSSENZWIEG, 2003; TROMBETTA; MELLMAN, 2005), que caracterizam DCs por tamanho e granulosidade, como exemplificado na figura 1.

Nas culturas de células de pacientes ictericos com câncer de pâncreas mantidas em cultura com plasma icterico foi possível observar células aderidas ao fundo de placa ao término das culturas. Utilizamos acutase (Pfizer, gentilmente cedida pela Prof. Dra. Maria Regina D’Império Lima), para liberação destas células

aderentes (HO et al., 2004), e analisamos o fenótipo destas células utilizando anticorpos monoclonais mencionados acima.

Figura 1 - Para análise fenotípica das células obtidas após cultura, selecionamos uma região de células que exclui linfócitos e células mortas, levando em consideração tamanho e granulosidade, mantendo apenas células com características de DCs como descrito na literatura (BANCHEREAU et al., 2000; GUERMONPREZ et al., 2002; MACKENSEN et al., 1994; STEINMAN; HAWIGER; NUSSENZWIEG, 2003; TROMBETTA; MELLMAN, 2005)

3.7 MARCAÇÃO INTRACELULAR PSTAT-1

Após obtenção de suspensão contendo 1×10^6 células/mL, realizamos a marcação de membrana somente com anti-HLA-DR, conforme descrito acima. Antes da fixação das células com paraformaldeído, lavamos estas células com tampão de coloração (staining buffer) contendo 2% de soro fetal bovino, 0,1% de azida, 100mL de PBS (1x). A seguir, foi feita a permeabilização da membrana plasmática com a adição de 200µL de Cytofix/Cytoperm (Fixation/Permeabilization, Kit BD Biosciences®, San Jose, California, EUA) em temperatura ambiente por 30 minutos, protegido da luz. Após lavagem das células, realizamos a permeabilização da membrana nuclear utilizando 130µL/tubo de solução contendo 750µL de PBS 1x, 250µL de paraformaldeído 4%, 5µL de Tween 20 (Sigma®, Saint Louis, Missouri,

EUA), as células foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro.

Após lavagem das células com PBS gelado, prosseguimos a marcação com o anticorpo para o fator de transcrição nuclear STAT-1. As células foram incubadas por 1 hora e 30 minutos a 4°C no escuro, posteriormente lavadas com PBS gelado e fixadas com 2% de paraformaldeído, armazenadas a 4°C no escuro até análise por citometria de fluxo.

Em 2 experimentos realizamos cultura para geração de células dendríticas conforme o protocolo descrito no item 3.5. Entretanto, para maturação destas células utilizamos LPS na concentração final de 1 ug/mL, como controle positivo de expressão de STAT-1 (JACKSON et al., 2004).

3.8 SEPARAÇÃO DE LINFÓCITOS T PARA ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO

3.8.1 Preparação das hemácias de carneiro

Para recuperar linfócitos T dentro de uma população celular, foram preparadas hemácias de carneiro para formação de rosetas com linfócitos T (Saxon et al., 1976). As hemácias de carneiro foram colocadas em um tubo plástico estéril de 50 mL e centrifugadas a 900G durante 10 minutos a 20°C, a seguir, lavadas 2 vezes, com mesma centrifugação, em meio RPMI-1640 e mais duas vezes em tampão PBS, à temperatura ambiente. Estas hemácias foram tratadas com AET [S(2-aminoethy)-isothiuronium bromide hydrobromide] (Sigma Chemical Co.) a fim de mudar a carga elétrica das hemácias, possibilitando uma maior interação eletrostática com linfócitos T e a formação de rosetas estáveis. Para tanto, foram diluídos 0,5 g de AET em 12,5 mL de água bidestilada e deionizada, com ajuste final do pH para 9,0 utilizando-se NaOH 1,0 M (Reagen, RJ). Após passagem em filtro de

0,22 μm (Costar, Cambridge, MA), 8 mL de solução AET foram acrescentados a cada 2 mL de papa de hemácias de carneiro e mantidos durante 40 minutos a 37°C.

A seguir, foram efetuadas lavagens (centrifugações de 650 G durante 10 minutos) das hemácias, com tampão PBS pH= 7,2 gelado até obtenção de sobrenadante transparente. As hemácias foram, então, ressuspensas para se obter uma suspensão a 4% em R-10.

3.8.2 Recuperação de linfócitos T

As células mononucleares utilizadas neste ensaio foram obtidas a partir de um volume de 20 mL de um produto de leuco-redução de sangue periférico de doadores sadios. Estas células mononucleares foram congeladas a -80°C em meio de congelamento (90% de soro fetal bovino acrescido de 10% de DMSO). Um dia antes da realização do ensaio foram descongeladas e mantidas em estufa de CO₂ por 2 horas com atmosfera contendo 5% de CO₂ e saturada de água, a 37°C. Após este período, as células mononucleares não aderentes foram retiradas e utilizamos hemácias de carneiro pré-tratadas com AET (preparação AET-SRBC, numa proporção de 2(células):1(SBF):2 (hemácias). A solução foi centrifugada a 200G por 5 minutos a 4°C e, em seguida, incubada em gelo por 1 hora. Após esse período, o número de rosetas foi contado e a suspensão foi submetida à centrifugação sobre Ficoll-Paque (900G, 4°C, 35 minutos).

Após a centrifugação, os linfócitos estavam no “pellet”, no fundo do tubo, formando rosetas com as hemácias de carneiro modificadas. Os linfócitos T foram recuperados com tampão de lise de hemácias e as células lavadas em meio de cultura (R-10), com centrifugação a 290g, durante 10 minutos a 20°C.

3.8.3 Avaliação de atividade aloestimuladora das DCs

Para avaliar a capacidade estimuladora das células dendríticas geradas *in vitro* foi feita uma co-cultura das DCs irradiadas (1250 rads) com linfócitos T de doadores saudáveis obtidos pelo método de leuco-redução. A concentração de células utilizadas para realização do ensaio foi de 1×10^5 células/mL de células estimuladoras (DCs) para 3×10^6 de células respondedoras (linfócitos T), ressuspensas em meio RPMI acrescido de 10% SFB. Os linfócitos T foram incubados em tampão PBS-BSA 0,1% contendo $5 \mu\text{M}$ de Carboxy Fluorescein-diacetate Succinidyl Ester (CFSE) (Peprotech) (LYONS, 2000), no escuro a 37°C por 20 minutos, para incorporação do anticorpo. Após esta incubação, as células foram lavadas 2 vezes em meio RPMI suplementado com SFB, para retirar o excesso de corante não incorporado.

A co-cultura foi realizada em placa de 96 poços de fundo em U e foi mantida em estufa com atmosfera contendo 5% de CO_2 e saturada de água, a 37°C por 8 dias. A fluorescência foi analisada por citometria de fluxo (FACScalibur – Becton Dickson, Palo Alto, CA), com o auxílio do “software” CellQuest ou WinMDI (WWW.purdueuniversity.edu).

A região M2, conforme demonstrada na figura 2, foi a região onde consideramos a porcentagem de proliferação.

Figura 2 – **A região onde consideramos a porcentagem de proliferação (M2)**

3.9 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Ao final das culturas para maturação e diferenciação de células dendríticas e nos ensaios de proliferação de linfócitos T, realizamos ensaio para detecção das citocinas IL-10 e IL-12 no sobrenadante das culturas.

Para detecção de IL-10 e IL-12 dos sobrenadantes das culturas de DCs, utilizamos os kits DuoSets para citocinas (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Neste método, placas de 96 poços Maxisorp (Nunc) foram sensibilizadas com 100 µL por poço de Ac de captura para cada citocina, diluído em tampão PBS (pH 7,2) e mantidas a temperatura ambiente “overnight”. Após 3 lavagens com 400 µL/poço de tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20, pH 7,2), as placas foram bloqueadas com 300 µL/poço de tampão de bloqueio (PBS contendo 1% BSA, 5% de Sacarose e 0,05% de NaN_3) por 2h a temperatura ambiente. Em seguida, após 3 lavagens, as amostras e a curva-padrão foram incubadas por um período de 2h em temperatura ambiente. As amostras para dosagem foram diluídas 1:2 em tampão de diluição (tampão Tris contendo 0,1% de BSA, 0,05% de Tween 20, pH 7,2). Para a curva-padrão, as citocinas recombinantes foram incubadas em duplicatas de 50 µL por poço das diluições seriadas (fator 2 de diluição), conforme recomendações do fabricante. O período de incubação das amostras e da curva padrão foi de 2h a temperatura ambiente. Após três lavagens, foram adicionados 50 µL/poço de Ac de detecção (175 ng/mL diluído em tampão de diluição) e realizamos nova incubação por 2h a temperatura ambiente. Novamente a placa foi lavada 3 vezes e 50 µL/poço de estreptoavidina diluída em tampão de diluição foram adicionados e houve nova incubação de 20 min, no escuro, em temperatura ambiente. Após esse período e 3 lavagens, 50 µL/poço de substrato (H_2O_2 e tetrametilbenzidina, R & D System) foram adicionados, com incubação de 20 min, no escuro, em temperatura ambiente. Por fim, 50 µL/poço de H_2SO_4 (2N) foram acrescentados para interromper a reação e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm. O cálculo das concentrações foi feito com auxílio do “software” Softmax Pro, através da

equação de regressão linear com base na curva padrão e a análise de dados foi executada com auxílio do “software” Prisma.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar diferença entre os grupos de células mantidas em diferentes culturas (PN ou PI), inicialmente avaliamos se a distribuição dos nossos dados era normal (Gaussiana) ou não. Quando a distribuição era normal, utilizamos teste t pareado. Quando a distribuição não era normal utilizamos teste de Wilcoxon. Nos outros experimentos onde foram comparados pacientes em relação ao controle, quando os dados seguiam distribuição normal utilizamos teste t não pareado e quando a distribuição não era normal utilizamos teste de Mann-Whitney.

Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$. Todos os testes foram realizados com a ajuda do programa Graphpad Software Prism 3.0.

Resultados

5 RESULTADOS

Para facilitar a compreensão dos resultados, uma vez que todos os pacientes deste estudo tinham câncer de pâncreas, denominaremos os pacientes ictericos com câncer de pâncreas de pacientes ictericos e os pacientes anictéricos com câncer de pâncreas de pacientes anictéricos.

5.1 ANÁLISE DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES ICTÉRICOS

Coletamos sangue periférico de 22 pacientes ictericos e avaliamos os monócitos destes pacientes antes de iniciarmos nossas culturas. Entretanto, esta análise inicial foi realizada apenas nas últimas 6 amostras. Para isto, após separação das células mononucleares, mantivemos estas células por 2 horas em placa de cultura em meio RPMI suplementado com 10% de “pool” de plasma autólogo. Como controle, utilizamos células de doadores saudáveis, cujas culturas foram suplementadas com 10% de pool de plasma normal. Após período de duas horas de cultura, retiramos as células não aderentes e com auxílio de um “cell scraper” (BD Falcon, Mountain View, Califórnia, EUA) removemos as células aderentes. Desta maneira, pudemos avaliar o fenótipo dos monócitos que iniciamos nossas culturas para geração de DCs.

Figura 3 - Tamanho e granulosidade das células mononucleares que mantivemos em cultura para diferenciação e maturação em células dendríticas, após 2 horas de aderência

Nas 6 amostras que realizamos análise dos monócitos que iniciamos nossas culturas, não encontramos diferença de tamanho e granulosidade (como observado na figura 3, quando comparamos os monócitos dos doadores saudáveis com os monócitos dos pacientes ictericos).

Nesta mesma população de monócitos que mostramos acima, realizamos análise fenotípica. Para isto utilizamos anticorpos específicos para as moléculas de superfície HLA-DR, CD11c, CD14 e CD86. Na figura 4 podemos observar dotplot representativo para os marcadores HLA-DR e CD14. Onde podemos observar população HLA-DR⁺ e CD14⁺, nas populações de células de doadores saudáveis como nas populações de células de pacientes ictericos.

Figura 4 - Dotplot representativo dos marcadores HLA-DR e CD14, dos monócitos dos controles e dos pacientes ictericos, que utilizamos para geração de DCs, após 2 horas de aderência das PBMC

Nas amostras dos últimos 6 pacientes que avaliamos HLA-DR, pudemos notar que a média de intensidade de fluorescência desta molécula foi estatisticamente maior nos monócitos dos controles do que nos dos pacientes ictericos (Figura 5).

Figura 5 - Média de intensidade de fluorescência da molécula HLA-DR nos monócitos que utilizamos para iniciar nossas culturas para geração de células dendríticas, após 2 horas de aderência das PBMC

Os histogramas abaixo são representativos da média de intensidade de

fluorescência (MFI) que encontramos nas moléculas CD11c e CD86, na população HLA-DR⁺/CD14⁻ dos monócitos de doadores saudáveis e dos pacientes ictericos que iniciamos nossas culturas para geração de células dendríticas. Nos monócitos dos pacientes ictericos não observamos expressão de CD11c e pudemos observar a expressão deste marcador no controle. Enquanto isso, a MFI de CD86 é menor nos pacientes ictericos quando comparada ao controle (Figura 6).

Figura 6 - Média de intensidade de fluorescência dos marcadores CD11c e CD86 nos monócitos que utilizamos para realizar cultura de células dendríticas, após 2 horas de aderência das PBMC

5.2 ANÁLISE DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES ICTÉRICOS MANTIDOS EM CULTURA POR 5 DIAS EM MEIO CONTENDO GM-CSF E IL-4

Após tratar com GM-CSF e IL-4 no 1º dia de cultura, os monócitos foram mantidos em cultura até o 5º dia, quando as células foram coletadas com o auxílio de um “cell scraper” e avaliadas antes da adição do TNF, uma vez que nosso interesse era analisar estas células ao final do período de diferenciação, antes de maturação. Assim, realizamos no 5º dia de cultura a análise fenotípica das células

geradas (Figuras 7, 8, 9 e 10).

Figura 7 - Tamanho e granulosidade dos monócitos que foram tratados com GM-CSF e IL-4 e mantidos por 5 dias em cultura para diferenciação em células dendríticas

Na figura 5 está representada a população analisada dentro do gate, quanto aos parâmetros de tamanho e granulosidade. Que como observado tem tamanho e granulosidade aumentados em relação aos monócitos da figura 1.

Para análise dos marcadores de superfície da população dentro do gate da figura 5, utilizamos os anticorpos específicos para as moléculas HLA-DR, CD11c, CD14 e CD86. Na figura 6 podemos observar dotplot representativo para os marcadores HLA-DR e CD14. Não observamos expressão de CD14 nas células dos controles nem nas células dos pacientes ictéricos

Figura 8 - Dotplot representativo dos monócitos que foram tratados com GM-CSF e IL-4 e mantidos por 5 dias em cultura para diferenciação em células dendríticas

Na população $HLA-DR^+/CD14^-$, mostrada na figura 6, analisamos também a média de intensidade de fluorescência de CD11c e CD86, como mostrado na figura 7 abaixo. Onde novamente podemos observar a ausência da expressão de CD11c e a menor expressão de CD86 quando comparamos aos controles.

Figura 9 - Histograma representativo da média de intensidade de fluorescência das moléculas de superfície CD11c e CD86, dos monócitos que foram tratados com GM-CSF e IL-4 e mantidos por 5 dias em cultura para diferenciação em células dendríticas.

5.3 RENDIMENTO DA CULTURA DE 7 DIAS DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES ICTÉRICOS PARA MATURAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO EM CÉLULAS DENDRÍTICAS

Após o período de cultura de 7 dias retiramos as células da placa de cultura, coramos estas células com azul de trypan e contamos em câmara de Neubauer. O gráfico abaixo mostra o número de células ($\times 10^6$) presentes nos diferentes ensaios que realizamos, onde é possível notar um menor rendimento de células nas culturas de pacientes ictéricos quando comparamos aos controles.

Figura 10 - Número de células recuperadas ao final da cultura de 7 dias

5.4 OBSERVAÇÃO DO FUNDO DA PLACA AO MICROSCÓPIO, APÓS RETIRADA DAS CÉLULAS NÃO ADERENTES AO FINAL DA CULTURA

Ao final da cultura de 7 dias dos monócitos tratados com GM-CSF e IL-4 e mantidos em cultura para geração de células dendríticas, retiramos as células não aderentes para observar o fundo da placa de cultura com auxílio do microscópio óptico e estas células foram fotografadas. Na figura 9, podemos observar que nos poços onde realizamos cultura de monócitos de pacientes ictéricos com plasma

ictérico, ainda restavam células aderidas na placa. Nas culturas de monócitos de doadores saudáveis este mesmo fenômeno não foi observado (Figura 11).

Figura 11 - Fotografia de uma placa de cultura após retirada das células não aderentes no 7º dia. A – cultura de monócitos de doadores saudáveis na presença de plasma normal. B- cultura de monócitos de pacientes ictéricos na presença de plasma de paciente

5.5 ANÁLISE DO FENÓTIPO DAS CÉLULAS ADERIDAS AO FUNDO DA PLACA

As células que estavam aderidas ao fundo da placa foram tratadas com 200 µL de acutase por 20 minutos. Realizamos este procedimento com o intuito de soltar as células dos pacientes ictéricos que estavam aderidas na placa. A análise do fenótipo destas células mostrou que elas são positivas para os marcadores CD14, HLA-DR e CD11c. Este ensaio foi repetido quatro vezes (Figura 12).

Figura 12 - Dot Plot representativo das células que ficaram aderidas ao fundo da placa após 7 dias de cultura e em seguida, tratadas com acutase para sua remoção

A figura 13 abaixo mostra média de intensidade de fluorescência dos marcadores analisados (HLA-DR, CD11c e CD14) em células que ficaram aderidas e foram removidas com acutase. Estas células expressão HLA-DR e CD14 e não pudemos observar expressão de CD11c.

Figura 13 – Histograma representativo da média de fluorescência dos marcadores de membrana das células que estavam aderidas na placa, ao término do período de cultura e após tratamento com acutase. Realizamos marcação com anticorpos monoclonais anti-CD14, CD11c e HLA-DR

5.6 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES HLA-DR, CD14 E CD11C NAS DCS GERADAS *IN VITRO* A PARTIR DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES ICTÉRICOS

Células mononucleares não aderentes de pacientes ictericos foram mantidas por 7 dias em meio propício para diferenciação e maturação de DCs. As culturas de células dos pacientes ictericos foram suplementadas com 10% de plasma icterico autólogo. Como controle, realizamos ensaio com monócitos de doadores saudáveis, cujas culturas foram suplementadas com 10% de pool de plasma normal. Após o período de cultura, foram utilizados marcadores já descritos nos materiais e métodos, para avaliar o fenótipo das células geradas e a aquisição e análise destas células foram feitas por citometria de fluxo.

Na citometria de fluxo, os primeiros parâmetros avaliados consistiram na

análise de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Para isso, escolhemos uma região que excluía células mortas e linfócitos (Figura 1 do item Casuística e Métodos). A avaliação da região selecionada mostrou que células de pacientes ictéricos com câncer de pâncreas têm tamanho menor (MFI de FSC = $379,5 \pm 24,52$) quando comparadas com as dos controles (MFI de FSC = $539,7 \pm 21,93$). Quando analisamos a granulosidade destas células, foi possível notar que este parâmetro também foi menor (SSC = $379,3 \pm 37,25$) quando comparamos com os controles ($472,2 \pm 17,29$). As diferenças encontradas foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Na figura 14, podemos observar dot plots de eventos celulares representativo desses resultados.

A. Controle **B. Paciente**
Ictérico

Figura 14 - Os dot plots acima mostram tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células diferenciadas a partir de monócitos de doadores saudáveis (A) ou a partir de monócitos de pacientes ictéricos (B)

Também encontramos diferença estatisticamente significativa na porcentagem de células dentro das regiões selecionadas, mostrada na figura 15. Quando analisamos a população presente na região controle, observamos maior porcentagem de células ($52,41\% \pm 12,81$) quando comparada com a população presente na região de células dos pacientes ictéricos ($28,37\% \pm 18,7$) (Figura 15).

Figura 15 - Porcentagem de células dentro das regiões selecionadas no grupo controle e no grupo de pacientes ictericos com câncer de pâncreas. * $p < 0,05$

A figura 16 mostra análise das moléculas de superfície HLA-DR, CD14 e CD11c nas 22 amostras de pacientes ictericos, bem como seus respectivos controles. Foi possível observar que a porcentagem de células positivas para HLA-DR é estatisticamente menor ($p < 0,05$) quando comparadas ao controle. Não observamos expressão de CD14 e CD11c em nenhuma amostra de pacientes ictericos. Pudemos notar células positivas para CD11c somente nas amostras controles.

Figura 16 - Dot plots representativos da análise dos marcadores de superfície expressos (HLA-DR, CD11c e CD14) por células obtidos das culturas de monócitos de pacientes ictericos e de doadores saudáveis, sob condições para diferenciação e maturação de células dendríticas

As porcentagens de células positivas para cada marcador avaliado (HLA-DR, CD11 e CD14), nos pacientes ictericos ou nos doadores saudáveis, obtidas nos diferentes experimentos realizados, estão demonstradas na figura 17.

Legenda: * $p < 0,05$

Figura 17 - Porcentagens das células positivas para os marcadores HLA-DR, CD11c e CD14, obtidas nos diferentes ensaios realizados com células de pacientes ictericos comparadas com seus respectivos controles

5.7 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES HLA-DR, CD14 E CD11C NAS DCS GERADAS *IN VITRO* A PARTIR DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES ANICTÉRICOS

Coletamos sangue periférico de 6 pacientes anictéricos com câncer de pâncreas, separamos as células mononucleares por gradiente de concentração, deixamos estas células em cultura por 7 dias em meio propício para diferenciar e maturar DCs. Após o período de cultura, marcamos estas células com anticorpos monoclonais conforme já descrito e analisamos estas células por citometria de fluxo. Na figura 18, podemos observar os dot plots representativos dos nossos achados, onde foi possível notar uma porcentagem menor de expressão de HLA-DR, enquanto que a porcentagem de CD14 foi maior nas células dos pacientes anictéricos com câncer de pâncreas.

Figura 18 - Dot plots representativos dos resultados obtidos das culturas de monócitos de pacientes anictéricos mantidos em meio de cultura suplementado com 10% de plasma autólogo, comparados aos controles, monócitos de doadores saudáveis mantidos com cultura com 10% de pool de plasma normal

Na figura 19 podemos observar a porcentagem de células positivas para os marcadores avaliados. A análise estatística mostrou que pacientes anictéricos têm menor quantidade de células expressando HLA-DR e CD14 quando comparados ao controle. A expressão de CD14 foi maior nas amostras dos pacientes anictéricos com câncer de pâncreas.

Legenda: * $p < 0,05$

Figura 19 - Porcentagens de células positivas para HLA-DR, CD11c e CD14 obtidas nos diferentes ensaios realizados com monócitos de pacientes anictéricos mantidos em cultura suplementada com GM-CSF, IL-4 e TNF, acrescido de 10% de pool de plasma autólogo

5.8 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES HLA-DR, CD11C E CD14 NAS DCS GERADAS *IN VITRO* A PARTIR DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES ICTÉRICOS MANTIDAS EM CULTURA COM “POOL” DE PLASMA NORMAL

Uma vez que demonstramos que DCs de pacientes ictéricos geradas *in vitro* na presença de plasma autólogo ictérico apresentam fenótipo com redução da expressão dos marcadores HLA-DR, CD11c e CD14, nos perguntamos se a expressão desses marcadores, e portanto, a diferenciação em DCs poderia ser recuperada na ausência de plasma ictérico. Para tanto, realizamos cultura com monócitos de pacientes ictéricos, em meio contendo GM-CSF, IL-4, suplementado com 10% de “pool” de plasma normal e acrescido de TNF no 5º dia. Quando comparamos as células de pacientes ictéricos geradas em cultura com “pool” de

plasma icterico com as células de pacientes ictericos geradas em cultura com “pool” de plasma normal (Figura 20), foi possível observar aumento na expressão de HLA-DR e CD86 ($p<0,05$) nas DCs geradas na presença de “pool” normal. Entretanto, o tratamento com plasma normal não altera a expressão de CD11c pelas células dos pacientes ictericos.

Figura 20 - Dot plots representativos das culturas de monócitos de pacientes ictericos mantidos em cultura na presença de “pool” de plasma icterico ou na presença de “pool” de plasma normal

As porcentagens de células positivas obtidas nos ensaios realizados estão demonstradas na figura 21. Nas células de pacientes ictericos, mantidas em cultura com 10% de “pool” de plasma normal, foi possível detectar uma porcentagem maior de células positivas para HLA-DR quando comparada com células de pacientes ictericos mantidas em cultura com 10% de “pool” de plasma icterico ($p<0,05$).

Legenda: * p < 0,05

Figura 21 - Porcentagens de células positivas para os marcadores HLA-DR, CD11c e CD14 obtidas nos diferentes ensaios realizados com células de paciente icterico mantidas em cultura com 10% de "pool" de plasma icterico ou 10% pool de plasma normal

5.9 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES HLA-DR, CD11C E CD14 NAS DCS, GERADAS *IN VITRO* A PARTIR DE MONÓCITOS DE DOADORES SAUDÁVEIS MANTIDAS EM CULTURA COM 10% DE "POOL" DE PLASMA NORMAL OU 10% DE "POOL" DE PLASMA ICTÉRICO

Monócitos de doadores saudáveis foram mantidos em cultura para diferenciação e maturação de células dendríticas. As culturas foram acrescidas de 10% de "pool" de plasma normal ou 10% de "pool" de plasma ictericos, nosso objetivo foi avaliar a influencia do plasma icterico nas geração de células dendríticas (Figura 22).

Figura 22 - Dot plot representativo dos resultados obtidos das culturas de monócitos de doadores saudáveis mantidos em meio de cultura com GM-CSF, IL-4, acrescido de 10% de pool de plasma ictérico ou 10% de pool de plasma normal, além de TNF no 5º dia de cultura

As porcentagens de cada marcador encontrado nos ensaios realizados com monócitos de doadores saudáveis mantidos em cultura com GM-CSF, IL-4 e TNF (adicionado no 5º dia de cultura), acrescida de 10% de pool de plasma normal ou 10% de plasma ictérico, estão representadas na figura 23. Podemos notar que as porcentagens de células expressando HLA-DR, CD11c e CD86 foram significativamente menores ($p < 0,05$) nas culturas contendo pool de plasma ictérico quando comparadas com as porcentagens obtidas nas culturas contendo pool de plasma normal.

Figura 23 - Porcentagens dos marcadores HLA-DR, CD11c e CD14 obtidas nos diferentes ensaios realizados com monócitos de doadores saudáveis mantidos em meio de cultura suplementado com GM-CSF, IL-4 e TNF (adicionado no 5º dia de cultura), acrescido de 10% de pool de plasma ictérico ou 10% de plasma normal

5.10 AVALIAÇÃO DO MARCADOR CD86 NAS DCS GERADAS *IN VITRO* A PARTIR DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES ICTÉRICOS

Avaliamos o marcador CD86 em 22 amostras (Figura 24). Entretanto, apenas nas últimas 6 foi possível pareá-lo com HLA-DR, uma vez que utilizamos um painel diferente de marcadores para confirmarmos nossos achados iniciais. Esse painel foi o seguinte: HLA-DR, CD11c, CD14 e CD86. Desta maneira, nas primeiras 16 amostras iremos mostrar este marcador utilizando FSC (tamanho) como parâmetro de escolha da população de DCs, da mesma forma como mostrado na figura 12. Não mostraremos os outros marcadores que pareamos com CD86 nas primeiras 16 amostras, uma vez que não obtivemos diferença estatística (Anexos A, B e C).

Figura 24 -Dot plots representativos de FSC X CD86 analisados nos diferentes ensaios de diferenciação e maturação de células dendríticas obtidas a partir de monócitos de pacientes ictericos

Na figura 25 está demonstrada a porcentagem de células positivas para CD86. Estes valores foram obtidos das análises realizadas utilizando tamanho (FSC) e o marcador de interesse. Este parâmetro (FSCxCD86) foi utilizado nas 16 primeiras amostras dos ensaios realizados com monócitos de pacientes ictericos. Como mostrado na figura abaixo, células dendríticas dos pacientes ictericos com câncer de pâncreas apresentaram menor expressão de CD86 do que os doadores saudáveis ($p<0,05$).

Figura 25 -Porcentagem de CD86 encontrada nas análises realizadas em conjunto com FSC nos diferentes ensaios de diferenciação e maturação de células dendríticas obtidas a partir de monócitos de pacientes ictericos

Os dot plots representados na figura 26 das análises das 6 amostras de pacientes ictericos com seus respectivos controles saudáveis, para os marcadores HLA- DR/CD86.

Figura 26 - Dot plots representativos de células HLA-DR⁺CD86⁺ analisadas nos diferentes ensaios de diferenciação e maturação de células dendríticas obtidas a partir de monócitos de pacientes ictericos

Na figura 27 abaixo está demonstrada a porcentagem de células positivas para CD86 nas últimas 6 amostras em que utilizamos o painel de marcadores já citado, que nos proporcionou avaliar este marcador de interesse (CD86) junto com HLA-DR. Dessa maneira, nosso objetivo foi assegurar que a população analisada tivesse em sua superfície alguma molécula de superfície representativa de células dendríticas, uma vez que HLA-DR é um dos marcadores que indica que as células geradas têm características fenotípicas de células dendríticas. Os dados mostram que a expressão de CD86 nas células dos pacientes ictericos foi menor quando comparamos com as células dos doadores saudáveis.

Figura 27 - Porcentagem de moléculas CD86 encontradas nas análises realizadas avaliando os marcadores de superfície CD86 e HLA-DR dos últimos 6 pacientes analisados. Nos diferentes ensaios utilizamos células de pacientes ictericos mantidas em cultura em meio propício para diferenciação de células dendríticas suplementados com pool de plasma normal ou pool de plasma icterico(*<p0,05)

5.11 AVALIAÇÃO DO MARCADOR CD86 NAS DCS GERADAS *IN VITRO* A PARTIR DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES ICTÉRICOS MANTIDAS EM CULTURA COM “POOL” DE PLASMA NORMAL

Uma vez que observamos que pacientes ictericos apresentavam expressão reduzida de CD86, realizamos ensaio para verificar se essa expressão poderia ser aumentada na ausência de plasma icterico (plasma normal). Para tanto, monócitos de 16 pacientes ictericos foram mantidos em meio de cultura suplementado com citocinas, para diferenciação e maturação de células dendríticas e acrescido de 10% de plasma normal. A figura 28 mostra a porcentagem do marcador de superfície CD86 das células de pacientes ictericos na presença de plasma normal. A região de escolha foi a mesma mostrada na figura 22 (FSC x CD86). Como observado, a expressão de CD86 pelas DCs de pacientes ictericos aumenta quando mantidas em cultura na ausência de plasma icterico ($p < 0,05$).

Figura 28 - Porcentagem de CD86 encontradas nas análises realizadas avaliando o marcador de superfície CD86. Nos diferentes ensaios utilizamos células de pacientes ictericos mantidas em cultura em meio propício para diferenciação de células dendriticas suplementados com pool de plasma normal ou pool de plasma icterico (* $p<0,05$)

5.12 AVALIAÇÃO DO MARCADOR CD86 NAS DCS GERADAS *IN VITRO* A PARTIR DE MONÓCITOS DE DOADORES SAUDÁVEIS MANTIDAS EM CULTURA COM “POOL” DE PLASMA ICTÉRICO OU “POOL” DE PLASMA NORMAL

A figura 29 mostra a porcentagem do marcador de superfície CD86 nas regiões de escolha como mostrado na figura 22 (FSC x CD86), das células de doadores saudáveis. Estes monócitos foram mantidos em meio de cultura, suplementado com citocinas para diferenciação e maturação de células dendríticas, acrescido de 10% de “pool” de plasma icterico ou 10% de “pool” de plasma normal. Pudemos observar que as culturas contendo plasma icterico tiveram uma menor expressão de CD86 ($p<0,05$).

Figura 29 - Monócitos de doadores saudáveis mantidos em cultura para diferenciação e maturação de células dendríticas em meio suplementado com pool de plasma normal ou pool de plasma icterico

5.13 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ALOESTIMULADORA DAS DCS GERADAS A PARTIR DE MONÓCITOS DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES ICTÉRICOS COM CÂNCER DE PÂNCREAS

Uma vez que realizamos a análise fenotípica das células geradas *in vitro* a partir de monócitos de pacientes ictericos e verificamos menor expressão de HLA-DR e CD86 em algumas situações, este fenômeno sugere que a função dessas células também poderia estar alterada. Uma das maneiras de se avaliar esse parâmetro é demonstrar a capacidade destas células induzirem proliferação de linfócitos T alogênicos. Para isso, realizamos uma cultura mista de leucócitos (MLR, do inglês Mixed Leukocytes Reaction), utilizando como células estimuladoras DCs derivadas de monócitos do sangue periférico de paciente icterico com câncer de pâncreas mantidas em cultura com plasma icterico ou DCs derivadas de monócitos do sangue periférico de paciente icterico mantidas em cultura com plasma normal. Como células respondedoras, utilizamos linfócitos T de doador sadio. Como controle positivo, utilizamos DCs geradas a partir de monócitos de doadores saudáveis e utilizamos linfócitos T alogênicos de doadores sadios.

Na figura 30, podemos observar os histogramas representativos dos experimentos realizados, referentes aos ensaios de proliferação. Análise das porcentagens de proliferação, foram obtidas conforme descrito em materiais e métodos e demonstrada na figura 2. Nossos resultados mostraram que células geradas a partir de monócitos de pacientes ictericos mantidos em cultura com plasma icterico, apresentaram uma menor porcentagem de proliferação que os das células geradas a partir de monócitos de pacientes ictericos mantidas em cultura com plasma normal.

Figura 30 – A) Células de doadores saudáveis B) Células de pacientes ictericos mantidas em cultura com plasma icterico C) Células de pacientes ictericos mantidas em cultura com plasma normal. Dados de um experimento representativo de 6

Também foram realizados ensaios de proliferação com DCs (cultivadas com 10% de pool de plasma icterico ou 10% de pool de plasma normal) como células estimuladoras. Como células respondedoras utilizamos linfócitos T de doadores saudáveis. Na figura 31 podemos observar histograma representativo dos experimentos realizados. A análise dos dados mostra que células de doadores saudáveis mantidos em cultura com 10% pool de plasma icterico tem uma porcentagem de proliferação menor quando comparados a porcentagem de proliferação de células mantidas em cultura com 10% de pool de plasma normal.

Figura 31 –A) Células dendríticas de doadores saudáveis mantidos em cultura com 10% pool de plasma normal B) Células de doadores saudáveis mantidos em cultura com pool de plasma icterico

5.14 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS PRESENTES NO SOBRENADANTE DO 7º DIA DAS CULTURAS DE DCS DIFERENCIADAS IN VITRO A PARTIR DE MONÓCITOS DE PACIENTES ICTÉRICO

Monócitos de pacientes ictericos foram mantidos em cultura para diferenciação e maturação de DCs. Após o período de cultura avaliamos a presença de citocinas IL-10, IL-12p40 e IL-12p70 no sobrenadante, por ELISA. Os resultados obtidos nos ensaios estão demonstrados nas figuras 31, 32 e 33.

Na figura 32, é possível observar que a concentração de IL-12p40 detectada no sobrenadante de cultura de monócitos de pacientes ictericos apresentou-se diminuída na presença de plasma icterico, quando comparada à concentração de IL-12p40 detectada no sobrenadante das culturas realizadas com monócitos de doadores saudáveis, mantidos em cultura com pool de plasma normal. Também é possível observar nessa figura as concentrações de IL-12p40 presentes no pool de plasma normal ou de plasma icterico, que foram adicionados inicialmente às culturas.

Figura 32 - Avaliação da concentração de IL-12p40 no sobrenadante das culturas de monócitos de pacientes ictericos com câncer de pâncreas comparados ao sobrenadante das culturas de monócitos de doadores saudáveis

A figura 33 mostra a concentração de IL-12p70 encontrada no sobrenadante das culturas, realizadas com células de pacientes ictericos cultivados com plasma icterico ou com células de doadores saudáveis cultivadas com plasma normal. Podemos observar que não existe diferença na produção de IL-12p70, nas diferentes culturas.

Figura 33 -Avaliação da concentração de IL-12p70 no sobrenadante das culturas de monócitos de pacientes ictericos comparados ao sobrenadante das culturas de monócitos de doadores saudáveis

A figura 34 mostra a concentração de IL-10 no sobrenadante das culturas de monócitos de pacientes ictericos na presença de plasma icterico. Como controle, utilizamos culturas de monócitos de doadores saudáveis na presença de pool de plasma normal. A dosagem do sobrenadante das culturas de células de pacientes ictericos mostrou maior concentração de IL-10 quando comparados com as culturas de células de doadores saudáveis.

Figura 34 - Avaliação da concentração de IL-10 no sobrenadante das culturas de monócitos de pacientes ictericos comparada à concentração de IL-10 no sobrenadante das culturas de monócitos de doadores saudáveis

5.15 AVALIAÇÃO DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS DE PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T QUE FORAM ESTIMULADOS COM DCS DIFERENCIADAS *IN VITRO* A PARTIR DE MONÓCITOS DE PACIENTES ICTÉRICOS COM CÂNCER DE PÂNCREAS

Monócitos de pacientes ictericos foram mantidos em cultura para diferenciação e maturação de DCs, após o período de cultura utilizamos estas células para ensaio de proliferação de linfócitos T. Após período de cultura de 7 dias, retiramos o sobrenadante das culturas de proliferação e avaliamos presença de

citocinas IL-10 e IL-12p70 no sobrenadante, por ELISA. Os resultados obtidos nos ensaios estão demonstrados nas figuras 33 e 34. Podemos observar na figura 35 que houve uma tendência de aumento na presença de IL-10 no sobrenadante das co-culturas DCs/Linfócitos T nos ensaios alogênicos onde utilizamos células de pacientes ictericos

Figura 35 - Avaliação da concentração de IL-10 no sobrenadante das culturas de monócitos de pacientes ictericos comparada à concentração de IL-10 no sobrenadante das culturas de monócitos de doadores saudáveis

Podemos observar na figura 36 que a presença de IL-12p70 foi menor no sobrenadante das co-culturas de células de pacientes do que no sobrenadante das co-culturas de células de doadores saudáveis ($p < 0,05$).

Figura 36 - Avaliação da concentração de IL-12p70 no sobrenadante das culturas de monócitos de pacientes ictericos comparada à concentração de IL-12p70 no sobrenadante das culturas de monócitos de doadores saudáveis

5.16 AVALIAÇÃO INTRACELULAR DE STAT-1 FOSFORILADA NAS DCS DIFERENCIADAS *IN VITRO* A PARTIR DE MONÓCITOS DE PACIENTES ICTÉRICOS COM CÂNCER DE PÂNCREAS

Uma vez que observamos redução na expressão de alguns marcadores (HLA-DR, CD11c e CD86) em amostras de DCs de pacientes ictericos com câncer, resolvemos investigar um dos possíveis mecanismos envolvidos nesse fenômeno. De acordo com a literatura (JACKSON et al., 2004), STAT-1 é uma das vias de sinalização intracelular relacionada à maturação de células dendríticas, aumentando sua expressão na medida em que aumenta o tempo de cultura na presença de GM-CSF e IL-4. Desta forma, decidimos estabelecer uma correlação entre a expressão de STAT-1 de células mononucleares de pacientes ictericos com a alteração nos marcadores analisados (Figura 37). Após período de cultura de monócitos de pacientes ictericos para maturação e diferenciação de DCs, realizamos avaliação intracelular de STAT-1 fosforilada e avaliação extracelular de HLA-DR. Neste caso, HLA-DR foi escolhido como parâmetro de caracterização da população analisada. Como controle positivo de maturação de DCs, tratamos com LPS no 5º dia de cultura. Na figura 35, pode ser observado que a média de intensidade de

fluorescência (MFI) de STAT-1 nas células dos pacientes ictericos foi menor (38,5) quando comparamos com os controles, seja maturado com TNF (119) ou com LPS (63).

Figura 37 - Análise da expressão intracelular de STAT-1 em células de pacientes ictericos mantidas em cultura em meio propício para diferenciação de células dendríticas suplementado com pool de plasma icterico. Como controle positivo utilizamos DCs maturadas com LPS

Discussão

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliamos a diferenciação de células dendríticas *in vitro* a partir de monócitos do sangue periférico de pacientes com câncer de pâncreas, ictericos ou não. Foram estudados 22 pacientes ictericos e 6 pacientes anictéricos. Além disso, investigamos o efeito do plasma icterico e do plasma normal sobre a cultura para diferenciação das DCs *in vitro*. Usamos também células precursoras obtidas do sangue periférico de doadores saudáveis, como controle.

Nosso objetivo era verificar um possível efeito adicional da icterícia sobre o efeito imunossupressor do câncer de pâncreas, e especificamente, no fenótipo e função de células dendríticas, uma vez que estas células têm papel crucial no desenvolvimento de uma resposta imune efetora. Nossa hipótese apóia-se em dados documentados pela literatura de que vários fatores como deficiências no recrutamento, sobrevivência, diferenciação e maturação de DCs poderiam ser uma das causas da imunossupressão no câncer. Abundantes e recentes evidências mostram também que a diferenciação e maturação de DCs é profundamente inibida por fatores presentes no microambiente tumoral (DHODAPKAR; DHODAPKAR; PALUCKA, 2008; SCHULER et al., 2003; STEINMAN et al., 2003; ZOU, 2005). Entretanto, estudos avaliando a imunossupressão de pacientes com câncer de pâncreas ictericos ainda são escassos.

Nesse sentido, avaliamos, por análises em citometria de fluxo, o processo de diferenciação e maturação de DCs geradas *in vitro* a partir de monócitos do sangue periférico de pacientes ictericos. Assim, como mostrado na figura 1, os monócitos de pacientes ictericos apresentaram, antes do início da cultura para diferenciação e maturação de DCs, tamanho e granulosidade semelhantes aos dos controles saudáveis. Estes dados sugerem que possivelmente não há uma alteração morfológica dos precursores sanguíneos utilizados para diferenciação de DCs *in vitro* a partir de células dos pacientes ictericos.

Avaliamos também a expressão de marcadores de superfície destes monócitos antes do início da cultura de DCs. Como observado na figura 2, a MFI de HLA-DR foi menor nos pacientes ictericos quando comparada aos controles. Não

observamos diferenças na expressão de CD14 entre os dois grupos. Em relação à expressão de CD11c, pudemos observar a presença deste marcador em doadores saudáveis, o que não ocorreu nos pacientes ictericos. Efeito semelhante foi observado quanto à expressão de CD86, sendo menor nos pacientes ictericos do que nos controles.

Os resultados de nossa caracterização de monócitos de doadores saudáveis por citometria de fluxo são confirmados pelo trabalho de Banchereau et al. (2000), que verificaram que monócitos de sangue periférico de doadores saudáveis expressam CD14, HLA-DR, CD11c e CD86. Entretanto nos pacientes ictericos não encontramos expressão de CD11c, menor expressão de HLA-DR e CD86, que são confirmados por dados semelhantes aos encontrados em trabalho em melanoma (UGUREL et al., 2004).

Estes dados sugerem que monócitos de pacientes ictericos possuem alguma deficiência antes mesmo do início da cultura para diferenciação e maturação de DCs, quando comparados aos controles. Além disso, estes dados confirmam também os obtidos anteriormente em nosso laboratório, onde demonstramos que monócitos de pacientes ictericos apresentam deficiência na produção de H_2O_2 bem como redução na atividade fagocitária (TREGLIA-DAL LAGO et al., 2006).

Análise semelhante foi realizada também no 5º dia de cultura de monócitos para diferenciação de DCs, quando verificamos o fenótipo destas células antes de iniciar o processo de maturação. Em relação a tamanho e granulosidade, na figura 5, pudemos observar, tanto em pacientes ictericos quanto em doadores saudáveis que as células neste estágio são maiores do que as mostradas na figura 1, correspondentes ao 1º dia de cultura. Constatamos também que o número de células dentro das regiões (que definimos como de maior probabilidade de encontro de DCs) foi menor quando se tratava de células de pacientes ictericos, quando comparado ao número de células nessas regiões de células dos doadores saudáveis.

A análise fenotípica mostrou que as células dos pacientes ictericos perderam a expressão de CD14, o que mostra que elas mantinham a capacidade de se diferenciar em células dendríticas. Entretanto, a expressão de HLA-DR, CD11c e CD86 foi menor quando comparada aos controles. Estudo realizado por Palucka et al (1998) também mostrou que o fenótipo no 5º dia de cultura de células de

doadores saudáveis, realizada com protocolo semelhante ao nosso, apresentava aumento de HLA-DR e CD86, o que confirma o fenótipo das células de nossos controles, sugerindo a alteração fenotípica nas células dos pacientes ictericos. Adicionalmente, estes dados indicam que as células dos pacientes ictericos apresentam alguma deficiência, também possível de ser detectada no 5º dia, de diferenciação em células dendríticas.

Após análises do fenótipo das células no 1º e no 5º dia de cultura, realizamos análise no 7º dia, uma vez que o intuito era verificar a possibilidade de gerar células dendríticas maduras de pacientes ictericos com câncer de pâncreas.

No 7º dia de cultura foi feita contagem, por azul de trypan, das células presentes. O resultado da análise do número de células permitiu inferir que a viabilidade e o rendimento das culturas de pacientes ictericos foram menores quando comparados aos controles (Figura 8).

Nossos achados de que as células dos pacientes ictericos apresentaram menor tamanho (Figura 12), são compatíveis com a idéia de que este tamanho diminuído represente uma diminuição da área de superfície destas células, levando então à exposição de uma menor quantidade de moléculas de apresentação de antígenos, bem como de moléculas co-estimuladoras na superfície celular. A nossa observação referente à quantidade de DCs obtidas também foi encontrada, de maneira semelhante, por Yanagimoto et al. (2005), em trabalho realizado com DCs de sangue periférico de pacientes com câncer de pâncreas, no qual eles mostraram que o número e porcentagem de DCs nesses pacientes também foram menor que nos controles.

Em relação à análise fenotípica, como esperado, nas culturas de DCs dos pacientes ictericos e dos indivíduos saudáveis, não observamos a expressão de CD14. Por outro lado, em culturas de pacientes anictéricos, uma pequena porcentagem de DCs mostrou expressão deste marcador. Este dado está de acordo com o descrito por Bellone (2006), que demonstrou uma maior expressão de CD14 em estudo realizado com DCs geradas *in vitro* de pacientes com adenocarcinoma de pâncreas em estágio avançado ou metastático. Corroborando para estes dados, a análise do estadiamento dos nossos pacientes anictéricos mostra que eles estão em estágio mais avançado da doença do que os pacientes ictericos (dados em anexo), além de sugerir uma possível correlação com aumento de CD14.

De maneira semelhante à observada por Bellone (2006), o diagnóstico de câncer de pâncreas nos pacientes anictéricos normalmente é feito quando o tumor atingiu maior grau de estadiamento. Por outro lado, o diagnóstico de pacientes com câncer de pâncreas acompanhado de icterícia é normalmente feito mais precocemente, uma vez que, sendo um sinal clínico secundário ao câncer de pâncreas, a icterícia colabora para o diagnóstico em fase inicial da doença. Uma justificativa para o aumento de CD14 observado nas culturas celulares de pacientes anictéricos seria exatamente uma possível perda da capacidade de diferenciação de DCs *in vitro*, o que demonstra ser um mecanismo de escape tumoral *in vivo*.

Já a expressão dos marcadores HLA-DR e CD86 foi menor nas culturas de células dos pacientes icterícios quando comparada com expressão das células obtidas em culturas de células dos doadores saudáveis. Em células de pacientes anictéricos também observamos diminuição da expressão de HLA-DR. Desta maneira podemos especular, em uma análise inicial, que a diminuição da expressão da molécula HLA-DR esteja relacionada com a presença do tumor e não pelo fato destes pacientes serem icterícios.

A deficiência na expressão destes marcadores está de acordo com a literatura, que mostra que DCs obtidas de portadores de diferentes tipos de tumores podem ter baixa expressão de HLA-DR e CD86 (BROWN et al., 2004; CHAUX et al., 1997; GUNZER et al., 2001), CD86 (HASEBE et al., 2000; NEVES et al., 2004; SATTHAPORN et al., 2004). Entretanto, em estudos com pacientes de câncer de pâncreas e icterícia essas alterações ainda não foram bem esclarecidas.

Este padrão de expressão de moléculas de superfície pelas células obtidas nestas culturas levou-nos a suspeitar que as células geradas a partir de monócitos de pacientes icterícios talvez tivessem uma apresentação de antígenos deficiente, além das alterações detectadas já no 1º e no 5º dia de cultura. Assim, uma vez diminuída a expressão da molécula que apresenta peptídeos exógenos, MHC II, associada à baixa expressão também da molécula co-estimuladoras CD86, teríamos um fator adicional que poderia contribuir para que estas células tivessem um menor potencial de estimulação de linfócitos T e menor resposta imune efetora.

Confirmando nossos achados, a literatura tem mostrado que pacientes portadores de neoplasias parecem ter deficiência na diferenciação de monócitos em DCs, o que resulta na geração de células com uma menor expressão de moléculas

co-estimuladoras, quando comparadas com DCs geradas a partir de células mononucleares de indivíduos sadios (ALMAND et al., 2000; DHODAPKAR; DHODAPKAR; PALUCKA, 2008; HASEBE et al., 2000; NEVES et al., 2004; PINZON-CHARRY et al., 2005; SATTHAPORN et al., 2004; ZOU, 2005). Além disso, trabalho realizado por Kusmartsev e Gabrilovich (2006) mostrou que fatores de crescimento e citocinas nos pacientes com câncer suprimem DCs de origem mielóide.

De maneira semelhante, a avaliação da concentração de citocinas no sobrenadante das culturas de diferenciação de monócitos em células dendríticas, neste trabalho, mostrou uma menor produção de IL-12p40 e maior produção de IL-10 nos sobrenadante das culturas de pacientes ictericos, sugerindo que estas células teriam um perfil de secreção de citocinas imunossupressoras.

Nossas suspeitas quanto à menor capacidade destas células induzirem proliferação de linfócitos T foi confirmada quando realizamos ensaio de proliferação destas células de pacientes ictericos, como estimuladoras de reações alogênicas. Nestes ensaios, observamos que células dos pacientes ictericos tinham menor capacidade de induzir proliferação de linfócitos T do que as DCs derivadas de células de doadores saudáveis . Uma menor atividade funcional das células de pacientes com câncer também foi observada em outros estudos, que avaliou DCs geradas *in vitro* (PIEMONTE, 2000) ou DCs de sangue periférico (TAKAHASHI et al., 2006; YANAGIMOTO et al., 2005) de pacientes com câncer de pâncreas.

Muito provavelmente esta menor capacidade estimuladora das células dos pacientes ictericos estaria ocorrendo devido à menor expressão tanto de moléculas apresentadoras de antígenos, como de moléculas co-estimuladoras que são essenciais para a manutenção de resposta imune adquirida. Vale ressaltar que na ausência do segundo sinal, que é ativado pelas moléculas co-estimuladoras, os linfócitos tornam-se anérgicos ao antígeno em questão (HARDING et al., 1992).

Uma observação surpreendente foi a completa ausência de expressão de CD11c por células derivadas de monócitos de pacientes ictericos. Sabendo que células dendríticas plasmocitóides não expressam CD11c e expressam CD123 (Liu 2005), avaliamos também a expressão de CD123, nas células geradas partir de monócitos de pacientes ictericos (dados em anexo). A expressão desta molécula foi igual ao controle. Desta forma não podemos especular que DCs geradas de

monócitos de pacientes ictericos são células plasmocitoides.

Como células de pacientes anictéricos expressavam CD11c, em níveis equivalentes aos expressados por células de doadores saudáveis, é possível que a não expressão desta molécula estivesse relacionada à icterícia. De fato, a cultura de células de indivíduos saudáveis na presença de plasma icterico diminuiu significativamente a expressão de CD11c.

Na literatura, há a descrição da alteração da expressão, por neutrófilos de sangue periférico de pacientes com icterícia obstrutiva causada por tumor, das moléculas L-selectina, CD11a, CD11b e CD15. Os níveis basais de expressão de L-selectina, CD11a e CD15 estavam diminuídos e, frente a dois estímulos (LPS e FMLP), ocorreu uma resposta diminuída quanto à expressão de CD11b (PLUSA; WEBSTER; PRIMROSE, 1996). Entretanto, não há relatos de que células dendríticas ou monócitos de pacientes ictericos com câncer de pâncreas apresentem alteração na expressão de CD11c.

Ao final das culturas de células de pacientes ictericos com plasma autólogo (plasma icterico), ainda existiam células aderidas ao fundo da placa. Quando soltamos estas células e avaliamos seu fenótipo, observamos que elas tinham características de monócitos/macrófagos, CD14⁺HLA-DR⁺. Entretanto, em relação à expressão de CD11c observamos ausência desta molécula, indicando a incapacidade de monócitos de pacientes ictericos se diferenciarem em células dendríticas. Este fenômeno talvez explique o baixo rendimento das culturas de células de pacientes ictericos quando comparamos com as culturas de células de doadores saudáveis.

Olhando para alguns dos papéis do CD11c na resposta imune, podemos sugerir que talvez a ausência desta molécula esteja dificultando a entrada dos monócitos, precursores de DCs, no tecido. Como CD11c também pode atuar como receptor do sistema complemento, a ativação desta via pode estar comprometida, gerando uma resposta imune inata menos eficiente, sendo uma das conseqüências, a diminuição do processo de fagocitose. De acordo com essa hipótese, trabalho realizado em nosso laboratório mostrou que monócitos de pacientes ictericos possuem menor capacidade fagocitária do que monócitos de doadores saudáveis (TREGLIA-DAL LAGO et al., 2006).

Em ensaio realizado com monócitos de pacientes ictericos mantidos em cultura com plasma normal, não observamos recuperação da molécula CD11c. Sugerimos que esta deficiência poderia ser uma característica da célula progenitora no paciente icterico com câncer de pâncreas. Outra possível explicação seria a incapacidade dos anticorpos anti-CD11c de se ligarem à molécula. Talvez alguma substância presente no plasma icterico tenha a capacidade de interferir com esta ligação, uma vez que uma das atividades da bilirrubina (sais biliares) é solubilizar lipídios, o que então, desta maneira, poderia alterar a conformação desta molécula.

Outro indício de que fatores do plasma icterico podem ser responsáveis pelas alterações encontradas é o fato de células de doadores saudáveis terem a expressão de HLA-DR, CD11c e CD86 diminuída quando as culturas foram suplementadas com pool de plasma icterico. A atividade aloestimuladora também foi diminuída nesta situação.

Contribuindo para este raciocínio, quando mantivemos células de pacientes ictericos em cultura suplementada com plasma normal, foi possível observar a recuperação das moléculas que estavam diminuídas (HLA-DR e CD86) e também da capacidade aloestimuladora. Desta maneira podemos especular que a recuperação das moléculas HLA-DR e CD86 melhora a capacidade estimuladora dos linfócitos T. Trabalho realizado por Takahashi et al. (2006) mostrou que DCs de sangue periférico de pacientes com tumor de pâncreas têm menor capacidade estimuladora quando comparados ao controle, e esta função é restabelecida após a retirada do tumor. Quando analisamos a concentração de citocinas no sobrenadante de proliferação, foi possível notar uma tendência de maior produção de IL-10 e menor concentração de IL-12 p70 nas culturas com células de pacientes ictericos.

Analisando o conjunto de nossos dados podemos especular que os fatores imunossupressores existentes no plasma dos pacientes ictericos estão relacionados tanto ao fato destes pacientes serem portadores de neoplasias como ao fato deles estarem ictericos.

Em nenhum momento podemos desconsiderar que os tumores apresentam mecanismos de escape que lhes permitem atingir uma situação de equilíbrio com o sistema imune afetando tanto mecanismos da imunidade inata, quanto da adquirida (BARBUTO, 1999).

Todavia, pacientes ictericos costumam apresentar taxa de mortalidade maior após tratamento cirúrgico quando comparados a pacientes com câncer de pâncreas sem icterícia, que está associada à alta incidência de complicações pós-cirúrgicas (ARMSTRONG et al., 1984; PAIN; CAHILL; BAILEY, 1985; PELLEGRINI, 1987).

Podemos então concluir que a icterícia é um fator adicional para alterar o sistema imune. Neste contexto, foram realizados diversos estudos que avaliaram o sistema imune na presença de icterícia tanto em humanos quanto em animais e foram descritas alterações funcionais de células tais como “natural killer” (NK) Hirazawa, Hazama e Oka, (1999) e Lane et al., 1996, neutrófilos (ANDY et al., 1992; PLUSA; WEBSTER; PRIMROSE, 1996; TAKAOKA et al., 2001; TSUJI et al., 1999; YANAGITANI et al., 1998), linfócitos T (BEMELMANS et al., 1992; THOMPSON et al., 1990; THOMPSON; RANJBAR; ROWLANDS, 1993; YUCEYAR et al., 1996). Apesar destas diversas alterações funcionais do sistema imune terem sido descritas nestes pacientes (revisto por JIANG; PUNTIS, 1997; SCOTT-CONNER; GROGAN, 1994), nestes trabalhos não existe um consenso de como a icterícia é capaz de atuar nos mecanismos do sistema imune.

É importante considerarmos que os monócitos de pacientes ictericos que utilizamos para gerar células dendríticas já apresentavam alterações fenotípicas, detectadas no 1º dia de cultura, bem como estudo realizado em nosso laboratório que mostrou que monócitos de pacientes ictericos, independentemente de ter alguma neoplasia, não produziam H_2O_2 e tinham menor atividade fagocitária (TREGLIA-DAL LAGO et al., 2006). Desta forma iniciamos uma cultura com monócitos que já estavam de certa maneira alterados.

Relembrando nossos achados mais significativos, células geradas a partir de monócitos de pacientes ictericos tiveram menor expressão de HLA-DR e CD86, além de ausência de expressão de CD11c. As DCs geradas a partir de monócitos de doadores saudáveis geradas na presença de pool de plasma icterico tiveram menor expressão das moléculas HLA-DR e CD86. Estes dados de fenótipo de superfície alterado podem ser correlacionados com as situações onde houve menor aloestimulação, aumento na produção de IL-10 e diminuição de IL-12 p70 ou diminuição de IL-12 p40.

Talvez uma possível explicação para os nossos achados seja um aumento da enzima hemoxigenase (HO-1), que está envolvida na metabolização de biliverdina

em bilirrubina, que reduz a expressão de MHC-II nas células endoteliais (WU et al., 2005). Trabalho mais específico com células dendríticas em modelo animal mostra que o aumento da expressão de HO-1 inibe a maturação de células dendríticas (CHAUVEAU et al., 2005). Estudo realizado por Jackson et al. (2004) mostra que HO-1 atenua significativamente a via de STAT-1, uma molécula importante na maturação das DCs. Nossa avaliação de STAT-1 nas células de pacientes ictericos mostrou uma menor expressão desta molécula intracelular quando comparamos aos controles. Desta forma, um possível mecanismo para os nossos achados poderia ser o aumento de HO-1 e como consequência, a diminuição de STAT-1, levando a uma incapacidade de monócitos de pacientes ictericos maturarem em DCs

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Desta forma, podemos concluir que os monócitos de pacientes ictericos com câncer de pâncreas, utilizados para gerar DCs já apresentavam significativas alterações de fenótipo de membrana, que foram mantidas até o 7º dia de cultura. Este fenótipo pode ser correlacionado com as alterações funcionais destas células, avaliadas pela atividade aloestimuladora e secreção de citocinas. Podemos concluir que monócitos de pacientes ictericos, mantidos em cultura para geração de DCs não apresentam fenótipo nem função características de células dendríticas.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALMAND, B.; CLARK, J. I.; NIKITINA, E.; VAN BEYNEN, J.; ENGLISH, N. R.; KNIGHT, S. C.; CARBONE, D. P.; GABRILOVICH, D. I. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. **J. Immunol.**, v. 166, n. 1, p. 678-689, 2001.
- ANDY, O. J. JR.; GROGAN, J. B.; GRISWOLD, J. A.; SCOTT-CONNER, C. E. Peritoneal neutrophil chemotaxis is impaired in biliary obstruction. **Am. Surg.**, v. 58, n. 1, p. 28-31, 1992.
- ARAUJO, J. A.; MENG, L.; TWARD, A. D.; HANDCOCK, WW.; ZHAI, Y.; LEE, A.; ISHIKAWA, K.; IYER, S.; BUELOW, R.; BUSUTTIL, R. W.; SHIH, D. M. Systemic rather than local heme oxygenase -1 overexpression improves cardiac allograft outcomes in a new transgenic mouse. **Journal Immunology**, v. 171, n. 3, p. 1572-1580, 2003.
- ARMSTRONG, C.; DIXON, J. M.; TAYLOR, T. V.; DAVIES, G. C. Surgical experience of deeply jaundiced patients with bile duct obstruction. **Br. J. Surg.**, v. 71, n. 3, p. 234-238, 1984.
- BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y. J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA, K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu Rev Immunol.**, v. 18, p. 767-811, 2000.
- BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-252, 1998.
- BARBUTO, J. A. M. Bases Fisiopatológicas da Cirurgia. In: YOUNES, R. N.; BIROLINI, D. **Imunologia do cancer**. São Paulo: Lemar, 1999. cap. 47, p. 481-490.
- BELLONE, G.; CARBONE, A.; SMIRNE C.; SCIRELLI, T.; BUFFOLINO, A.; NOVARINO, A.; STACCHINI, A.; BERTETTO, O.; PALESTRO, G.; SCARPA, A.; EMANUELLI, G.; RODECK, U. Cooperative induction of a tolerogenic dendritic cell phenotype by cytokines secreted by pancreatic carcinoma cells. **J. Immunol.**, v. 177, n. 5, p. 3448-3460, 2006.
- BEMELMANS, M. H.; GOUMA, D. J.; GREVE, J. W.; BUURMAN, W. A. Cytokines tumor necrosis factor and interleukin-6 in experimental biliary obstruction in mice. **Hepatology**, v. 15, n. 6, p. 1132-1136, 1992.
- BHUTANI, V. K. Neonatal hyperbilirubinemia and the potential risk of subtle neurological dysfunction. **Pediatr. Res.**, v. 50, n. 6, p. 679-680, 2001.
- BIONDI, C. S.; COTORRUELO, C. M.; ENSINCK, A.; RACCA, L. L.; RACCA, A. L. Use of the erythrophagocytosis assay for predicting the clinical consequences of immune blood cell destruction. **Clin. Lab.**, v. 50, n. 5-6, p. 265-270, 2004.

BIRD, M. A.; LANGE, P. A.; SCHRUM, L. W.; GRISHAM, J. W.; RIPPE, R. A.; BEHRNS, K. E. Cholestasis induces murine hepatocyte apoptosis and DNA synthesis with preservation of the immediate-early gene response. **Surgery**, v. 131, n. 5, p. 556-563, 2002.

BLANKENSTEIN, T.; QIN, Z.; UBERLA, K. Tumor suppression after tumor cell-targeted tumor necrosis factor via gene transfer. **J. Exp. Med.**, v. 173, n. 5, p. 1047-1052, 1991.

BRITO, M. A.; SILVA, R. M.; MATOS, D. C.; SILVA, A. T.; BRITES, D. T. Alterations of erythrocyte morphology and lipidic composition by hyperbilirubinemia. **Clin. Chim. Acta**, v. 249, n. 1-2, p. 148-165, 1996.

BROW, R.; MURRAY, A.; POPE, B.; SZE, D. M.; GIBSON, J.; HO, P. J.; HART, D.; JOSHUA, D. Either interleukin-12 or interferon γ can correct the dendritic cell defect induced by transforming growth factor β in patients with melanoma. **Br. J. Haematol.**, v. 125, n. 6, p. 743-748, 2004.

CASHORE, W. J. The neurotoxicity of bilirubin. **Clin. Perinatol.**, v. 17, n. 2, p. 437-447, 1990.

CHAUVEAU, C.; REMY, S.; ROYER, P. J.; HILL, M.; TANGUY-ROYER, S.; HUBERT, F. X.; TESSON, L.; BRION, R.; BERIOU, G.; GREGOIRE, M.; JOSIEN, R.; CUTURI, M. C.; ANEGON, I. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cells maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. **Blood**, v. 106, n. 5, p. 1694-1702, 2005.

CHAUX, P.; FAVRE, N.; BONNOTTE, B.; MOUTET, M.; MARTIN, M.; MARTIN, F. Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 Expression. A role in the immune tolerance to antigenic tumors. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 417, p. 524-528, 1997.

COLONNA, M.; TRINCHIERI, G.; LIU, Y. J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. **Nat Immunol.**, v. 5, n. 12, p. 1219-1226, 2004.

COVENTRY, B.; HEINZEL, S. Cd1a in human cancers: a new role for an old molecule. **Trends Immunol.**, v. 25, n. 5, p. 242-248, 2004.

DING, J. W.; ANDERSSON, R.; SOLTESZ, V.; WILLEN, R.; BENGMARK, S. Obstructive jaundice impairs reticuloendothelial function and promotes bacterial translocation in the rat. **J. Surg. Res.**, v. 57, n. 2, p. 238-245, 1994.

DHODAPKAR, M. V.; DHODAPKAR, K. M.; PALUCKA, A. K. Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance. **Cell Death. Differ.**, v. 15, n. 1, p. 39-50, 2008.

ELKORD, E.; WILLIAMS, P. E.; KYNASTON, H.; ROWBOTTOM, A. W. Human monocyte isolation methods influence cytokine production from *in vitro* generated dendritic cells. **Immunology**, v. 114, n. 2, p. 204-212, 2005.

ENK, A. H.; JONULEIT, H.; SALOGA, J.; KNOP, J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. **Int. J. Cancer**, v. 73, n. 3, p. 309-316, 1997.

FARROW, B.; EVRES, B. M. Inflammation and the development of pancreatic cancer. **Surg. Oncol.**, v. 10, n. 4, p. 153-169, 2002. Review. 5

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **Nat Immunol.**, v. 4, n. 4, p. 330-336, 2003.

GEROLAMI, A.; SARLES, J. C. Biliary secretion and motility. **Int. Rev. Physiol.**, v. 12, p. 223-2256, 1977.

GJERTSEN, M. K.; BUANES, T.; ROSSELAND, A. R.; BAKKA, A.; GLADHAUG, I.; SOREIDE, O.; ERIKSEN, J. A.; MOLLER, M.; BAKSAAS, I.; LOTHE, R. A.; SAETERDAL, I.; GAUDERNACK, G. Intradermal ras peptide vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor as adjuvant: Clinical and immunological responses in patients with pancreatic adenocarcinoma. **Int. J. Cancer**, v. 92, n. 3, p. 441-450, 2001.

GREENLEE, R. T.; HILL-HARMON, M. B.; MURRAY, T.; THUN, M. Cancer statistics. **CA Câncer. J. Clin.**, v. 51, n. 1, p. 15-36, 2001. Erratum in: *CA Cancer J Clin.*, v. 51, n. 2, p. 144, 2001.

GREENWALD, R. J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. The B7 family revisited. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 515-548, 2005.

GROJEAN, S.; LIEVRE, V.; KOZIEL, V.; VERT, P.; DAVAL, J. L. Bilirubin exerts additional toxic effects in hypoxic cultured neurons from the developing rat brain by the recruitment of glutamate neurotoxicity. **Pediatr. Res.**, v. 49, n. 4, p. 507-513, 2001.

GUERMONPREZ, P.; VALLADEAU, J.; ZITVOGEL, L.; THÉRY, C.; AMIGORENA, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 621-667, 2002.

GUNZER, M.; JANICH, S.; VARGA, G.; CRABBE, S. Dendritic cells and tumor immunity. **Semin. Immunol. Review**, v. 13, n. 5, p. 291-302, 2001.

HALPERN, B. N.; BIOZZI, G.; NICOL, T.; BILBEY, D. L. Effect of experimental biliary obstruction on the phagocytic activity of the reticulo-endothelial system. **Nature**, v. 180, n. 4584, p. 503-504, 1957.

HANCOCK, W. W.; BUELOW, R.; SAYEGH, M. H.; TURKA, L. A. Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. **Nat. Med.**, v. 4, n. 12, p. 1392-1396, 1998.

HANSEN, T. W. Bilirubin brain toxicity. **J. Perinatol.**, v. 21, p. S48-51, 2001. Supplement 1. Discussion S59-62

HARDING, F. A.; MCARTHUR, J. G.; CROSS, J. A.; RAULET, D. H.; ALLINSON, J. P. CD28-mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. **Nature**, v. 356, n. 6370, p. 607-609, 1992.

HASEBE, H.; NAGAYAMA, H.; SATO, K.; ENOMOTO, M.; TAKEDA, Y.; TAKAHASHI, T. A.; HASUMI, K.; ERIGUCHI, M. Dysfunctional regulation of the development of monocyte-derived dendritic cells in cancer patients. **Biomed. Pharmacother.**, v. 54, n. 6, p. 291-298, 2000.

HIRAZAWA, K.; HAZAMA, S.; OKA, M. Depressed cytotoxic activity of hepatic nonparenchymal cells in rats with obstructive jaundice. **Surgery**, v. 126, n. 5, p. 900-907, 1999.

HIRD, V.; MARAVEYAS, A.; SNOOK, D.; DHOKIA, B.; SOUTTER, W. P.; MEARES, C.; STEWART, J. S.; MASON, P.; LAMBERT, H. E.; EPENETOS, A. A. Adjuvant therapy of ovarian cancer with radioactive monoclonal antibody. **Br J Cancer**, v. 68, n. 2, p. 403-406, 1993.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Fox p3. **Science**, v. 299, p. 1057-1061, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativas de câncer no Brasil**. 2006. Disponível em: <www.inca.gov.br>. Acesso em: 18 abr. 2007.

JACKSON, S. H.; YU, C. R.; MAHDI, R. M.; EBONG, S.; EGWUAGU, C. E. Dendritic cell maturation requires STAT1 and is under feedback regulation by suppressors of cytokine signaling. **J. Immunol.**, v. 172, n. 4, p. 2307-2315, 2004.

JEMAL, A.; THUN, M. J.; WARD, E. E.; HENLEY, S. J.; COKKINIDES, V. E.; MURRAY, T. E. Mortality from leading causes by education and race in the United States, 2001. **Am. J. Prev. Med.**, v. 34, n. 1, p. 1-8, 2008.

JEROME, K. R.; DOMENECH, N.; FINN, O. J. Tumor-specific cytotoxic T cell clones from patients with breast and pancreatic adenocarcinoma recognize EBV-immortalized B cells transfected with polymorphic epithelial mucin complementary DNA. **J. Immunol.**, v. 151, n. 3, p. 1654-1662, 1993.

JIANG, W. G.; PUNTIS, M. C. Immune dysfunction in patients with obstructive jaundice, mediators and implications for treatments. **HPB Surg.**, v. 10, n. 3, p. 129-142, 1997.

KAMISAKO, T.; KOBAYASHI, Y.; TAKEUCHI, K.; ISHIHARA, T.; HIGUCHI, K.; TANAKA, Y.; GABAZZA, E. C.; ADACHI, Y. Recent advances in bilirubin metabolism research: the molecular mechanism of hepatocyte bilirubin transport and its clinical relevance. **J. Gastroenterol.**, v. 35, n. 9, p. 659-664, 2000.

KARP, W. B. Biochemical alterations in neonatal hyperbilirubinemia and bilirubin encephalopathy: a review. **Pediatrics**, v. 64, n. 3, p. 361-368, 1979.

KATSENELSON, N. S.; SHURIN, G. V.; BYKOVSKAIA, S. N.; SHOGAN, J.; SHURIN, M. R. Human small cell lung carcinoma and carcinoid tumor regulate dendritic cell maturation and function. **Mod. Pathol.**, v. 14, n. 1, p. 40-45, 2001.

KAY, M. M. Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 72, n. 9, p. 3521-3525, 1975.

KENNEDY, J. A.; CLEMENTS, W. D.; KIRK, S. J.; MCCAIGUE, M. D.; CAMPBELL, G. R.; ERWIN, P. J.; HALLIDAY, M. I.; ROWLANDS, B. J. Characterization of the Kupffer cell response to exogenous endotoxin in a rodent model of obstructive jaundice. **Br. J. Surg.**, v. 86, n. 5, p. 628-633, 1999.

KUDELA, P.; SCHWARCZOVA, Z.; SEDLAK, J.; BIZIK, J. Conditioned medium from HeLa cells enhances motility of human monocyte-derived dendritic cells but abrogates their maturation and endocytic activity. **Neoplasma**, v. 48, n. 5, p. 382-388, 2001.

KUSMARTSEV, S.; GABRILOVICH, D. I. Effect of tumor-derived cytokine and growth factors on differentiation and immune suppressive features of myeloid cells in cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 25, n. 3, p. 323-331, 2006.

KWAK, L. W.; CAMPBELL, M. J.; CZERWINSKI, D. K.; HART, S.; MILLER, R. A.; LEVY, R. Induction of immune response in patients with B-cell lymphoma against the surface immunoglobulin idiotype expressed by their tumour. **N. Engl. J. Med.**, v. 327, n. 17, p. 1209-1215, 1992.

LANE, D. R.; JOSHI, P.; GROGAN, J. B.; NIE, C. H.; SCOTT-CONNER, C. E. Suppression of natural killer cell activity in biliary obstruction. **Am. Surg.**, v. 62, n. 4, p. 259-262, 1996.

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 263-266, 2001.

LIU, Y. J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 255-258, 2001.

LIU, Y. J.; KANZLER, H.; SOUMELIS, V.; GILLIET, M. Dendritic cells lineage, plasticity and cross-regulation. **Nat Immunol.**, v. 2, n. 7, p. 585-589, 2001.

LYONS, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometry measurement of CFSE dye dilution. **J. Immunol. Methods**, v. 243, n. 1-2, p. 147-254, 2000.

MACKENSEN, A.; HERBST, B.; KÖHLER, G.; WOLFF-VORBECK, G.; ROSENTHAL, F. M.; VEELKEN, H.; KULMBURG, P.; SCHAEFER, H. E.; MERTELSMANN, R.; LINDEMANN, A. Delineation of the dendritic cell lineage by generating large numbers of Birbeck granule-positive Langerhans cells from human peripheral blood progenitor cells in vitro. **Blood**, v. 86, n. 7, p. 2699-2707, 1995.

MEHTA-DAMANI, A.; MARKOWICZ, S.; ENGLEMAN, E. G. Generation of antigen-

specific CD4⁺ T cell lines from naive precursors. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, n. 5, p. 1206-1211, 1995.

MEHTA-DAMANI, A.; MARKOWICZ, S.; ENGLEMAN, E. G. Generation of antigen-specific CD8⁺ CTLs from naive precursors. **J. Immunol.**, v. 153, n. 3, p. 996-1003, 1994.

MINEV, B. R.; CHAVEZ, F. L.; MITCHELL, M. S. Cancer vaccines: novel approaches and new promise. **Pharmacol. Ther.**, v. 81, n. 2, p. 121-139, 1999.

MONSON, J. R.; GUILLOU, P. J. Immunological perspectives on pancreatic cancer and jaundice. **Hepatogastroenterology**, v. 36, n. 6, p. 437-441, 1989.

MUKHERJEE, P.; GINARDI, A. R.; MADSEN, C. S.; TINDER, T. L.; JACOBS, F.; PARKER, J.; AGRAWAL, B.; LONGENECKER, B. M.; GENDLER, S. J. MUC1-specific CTLs are non-functional within a pancreatic tumor microenvironment. **Glycoconj J.**, v. 18, n. 11-12, p. 931-942, 2001.

NEVES, A. R.; ENSINA, L. F.; LEITE, K. R.; BUZAID, A. C.; CAMARA-LOPES, L. H.; BARBUTO, J. A. M. 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 Immunotherapy**, v. 54, n. 1, p. 61-66, 2005.

O'NEILL, D. W.; ADAMS, S.; BHARDWAJ, N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. **Blood**, v. 104, n. 8, p. 2235-2246, 2004.

ORTEN, J. M. Metabolism of hemoglobin and bile pigments. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v. 1, n. 2, p. 113-124, 1971.

OSTROW, J. D.; PASCOLO, L.; BRITES, D.; TIRIBELLI, C. Molecular basis of bilirubin-induced neurotoxicity. **Trends Mol. Med.**, v. 10, n. 2, p. 65-70, 2004.

PAIN, J. A.; CAHILL, C. J.; BAILEY, M. E. Perioperative complications in obstructive jaundice: therapeutic considerations. **Br J. Surg.**, v. 72, n. 12, p. 942-945, 1985.

PALUCKA, K. A.; TAQUET, N.; SANCHEZ-CHAPUIS, F.; GLUCKMAN, J. C. Dendritic Cells as the Terminal Stage of Monocyte Differentiation. **J. Immunol.**, v. 160, p. 4587-4595, 1998.

PEGUET-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.**, v. 170, n. 7, p. 3488-3494, 2003.

PELLEGRINI, C. A.; ALLEGRA, P.; BONGARD, F. S.; WAY, L. W. Risk of biliary surgery in patients with hyperbilirubinemia. **Am. J. Surg.**, v. 154, n. 1, p. 111-117, 1987.

PIEMONTE, L. Generation and functional characterization of dendritic cells from

patients with pancreatic carcinoma with special regard to clinical applicability. **Cancer Immunol. Immunotherapy**, v. 49, n. 10, p. 544-550, 2000.

PINZON-CHARRY, A.; HO, C. S.; LAHERTY, R.; MAXWELL, T.; WLAKER, D.; GARDINER, R. A.; O'CONNOR, J.; PYKE, C.; SCHIMIDT, C.; FURNIVAL, C.; LOPES, J. A. A population of HLA-DR immature cells accumulates in the blood cell compartment of patients with different types of cancer. **Neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 1112-1122, 2005.

PLUSA, S.; WEBSTER, N.; PRIMROSE, J. Obstructive jaundice causes reduced expression of polymorphonuclear leucocyte adhesion molecules and a depressed response to bacterial wall products in vitro. **Gut**, v. 38, n. 5, p. 784-787, 1996.

POVOSKI, S. P.; KARPEH, M. S. JR.; CONLON, K. C.; BLUMGART, L. H.; BRENNAN, M. F. Preoperative biliary drainage: impact on intraoperative bile cultures and infectious morbidity and mortality after pancreaticoduodenectomy. **J. Gastrointest. Surg.**, v. 3, n. 5, p. 496-505, 1999.

PUNTIS, M. C.; JIANG, W. G. Plasma cytokine levels and monocyte activation in patients with obstructive jaundice. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 11, n. 1, p. 7-13, 1996.

RIBAS, A.; BUTTERFIELD, L. H.; GLASPY J. A.; ECONOMOU, J. S. Current development in cancer vaccines and cellular immunotherapy. **J. Clin Oncol.**, v. 21, n. 12, p. 2415-2432, 2003.

RIZZO, S.; SILVOTTI, M. G. Potentiated autologous tumor cell and peripheral blood lymphocyte lysate vaccination. **Mol. Biotechnol.**, v. 25, n. 1, p. 31-35, 2003.

ROCHA LIMA, C. M.; CENTENO, M. D. Update on pancreatic cancer. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 14, n. 4, p. 424-430, 2002.

ROSENBERG, L.; LIPSETT, M. Biotherapeutic approaches to pancreatic cancer. **Expert. Opin. Biol. Ther.**, v. 3, n. 2, p. 319-337, 2003.

ROSENBERG, S. A. Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. **J. Intern. Med.**, v. 250, n. 6, p. 462-475, 2001.

RUTAUULT, K.; ALDERMAN, C.; CHAIN, B. M.; KATZ, D. R. Reactive oxygen species activate human peripheral blood dendritic cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, n. 1-2, p. 232-238, 1999.

SAKAGUCHI, S.; ONO, M.; SETOGUCHI, R.; YAGI, H.; HORI, S.; FEHERVARI, Z.; SHIMIZU, J.; TAKAHASHI, T.; NOMURA, T. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. **Immunol Rev.**, v. 212, p. 8-27, 2006.

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. **J. Exp. Med.**, v. 182, n. 2, 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, Sallusto. **J. Exp. Med.**, v. 179, n. 4, p. 1109-1118, 1994.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Exploring pathways for memory T cell generation. **J. Clin. Invest.**, v. 108, n. 6, p. 805-806, 2001.

SANTIN, A. D.; HERMONAT, P. L.; RAVAGGI, A.; CHIRIVA-INTERNATI, M.; CANNON, M. J.; HISERODT, J. C.; PECORELLI, S.; PARHAM, G. P. Expression of surface antigens during the differentiation of human dendritic cells vs macrophages from blood monocytes *in vitro*. **Immunobiology**, v. 200, n. 2, p. 187-204, 1999.

SATTHAPORN, S.; ROBINS, A.; VASSANASIRI, W.; EL-SHEEMY, M.; JIBRIL, J. A.; CLARK, D.; VALERIO, D. Dendritic cells are dysfunction in patients with operable breast cancer. **Cancer Immunol. Immunotherapy**, v. 200, p. 187-204, 2004.

SCHEN, L.; EVEL-KABLER, K.; STROBE, R.; CHEN, S. Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. **Nat. Biotech.**, v. 22, n. 12, p. 1546-1553, 2004.

SCHMID, R. Bilirubin metabolism: state of the art. **Gastroenterology**, v. 74, n. 6, p. 1307-1312, 1978.

SCHOTT, M.; SEISSLER, J.; FELDKAMP, J.; VON SCHILLING, C.; SCHERBAUM, W. A. Dendritic cell immunotherapy induces antitumour response in parathyroid carcinoma and neuroendocrine pancreas carcinoma. **Horm. Metab. Res.**, v. 31, n. 1, p. 662-664, 1999.

SCHULER, G.; SCHULER-THURNER, B.; STEINMAN, B. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 15, n. 2, p. 138-147, 2003.

SCOTT-CONNER, C. E.; GROGAN, J. B. The pathophysiology of biliary obstruction and its effect on phagocytic and immune function. **J. Surg. Res.**, v. 57, n. 2, p. 316-336, 1994.

SEUBERT, J. M.; DARMON, A. J.; EL-KADI, A. O.; D'SOUZA, S. J.; BEND, J. R. Apoptosis in murine hepatoma hepa 1c1c7 wild-type, C12, and C4 cells mediated by bilirubin. **Mol. Pharmacol.**, v. 62, n.2, p. 257-264, 2002.

SHEN, L.; EVEL-KABLER, K.; STRUBE, R.; CHEN, S. Y. Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. **Nat. Biotechnol.**, v. 22, n. 12, p. 1546-1553, 2004.

SELING, P. A. CD-restricted T cells: T cells with a unique immunological niche. **Clin. Immunol.**, v. 96, n. 1, p. 3-10, 2000.

SKULINA, D.; OWCZAREK, D.; CIECKO-MICHALSKA, I.; SZCZEPANSKI, W.; TETNOWSKI, J.; GARLICKA, M.; JANAS-SKULINA, U. The influence of ursodeoxycholic acid on some biochemical, immunologic and histopathologic parameters in patients with primary biliary. **Przegl. Lek.**, v. 56, n. 3, p. 201-204, 1999.

SOARES, M. P.; LIN, Y.; ANRATHER, J.; CSIZMADIA, E.; TAKIGAMI, K.; SATO, K.; GREY, S. T.; COLVIN, R. B.; CHOI, A. M.; POSS, K. D.; BACH, F. H. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. **Nat. Med.**, v. 4, n.9, p. 1073-1077, 1998.

STEINMAN, R. M.; HAWIGER, D.; NUSSENZWIEG, M. C. Tolerogenic dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 21, p. 684-711, 2003.

STEINMAN, R. M.; WITMER, M. D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leucocyte reaction in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 7, n. 10, p. 5132-5136, 1978.

TAKAHASHI, K.; TOYOKAWA, H.; TAKAI, S.; SATOI, S.; YANAGINOMOTO, H.; TERAOKA, K.; ARAKI, H.; KNOW, A. H.; KAMIYAMA, Y. Surgical influence of pancreatectomy on the function and count of circulating dendritic cells in patients with pancreatic cancer. **Cancer Immunol. Immunotherapy**, v. 55, n. 7, p. 775-784, 2006.

TAKAOKA, M.; KUBOTA, Y.; TSUJI, K.; YAMAMOTO, S.; OGURA, M.; YANAGITANI, K.; SHIMATANI, M.; SHIBATANI, N.; INOUE, K. Human neutrophil functions in obstructive jaundice. **Hepatogastroenterology**, v. 48, n. 37, p. 71-75, 2001.

THOMPSON, R. L.; HOPER, M.; DIAMOND, T.; ROWLANDS, B. J. Development and reversibility of T lymphocyte dysfunction in experimental obstructive jaundice. **Br. J. Surg.**, v. 77, n. 11, p. 1229-1232, 1990.

THOMPSON, R. L.; RANJBAR, S.; ROWLANDS, B. J. T-lymphocyte transformation in experimental obstructive jaundice: the role of serum-suppressive factors. **World J. Surg.**, v. 17, n. 6, p. 783-785, 1993.

TREGLIA-DAL LAGO, M.; JUKEMURA, J.; MACHADO, M. C.; DA CUNHA, J. E.; BARBUTO, J. A. Phagocytosis and production of H₂O₂ by human peripheral blood mononuclear cells from patients with obstructive jaundice. **Pancreatology**, v. 6, n. 4, p. 273-278, 2006.

TROMBETTA, E. S.; MELLMAN, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 975-1028, 2005.

TSUJI, K.; KUBOTA, Y.; YAMAMOTO, S.; YANAGITANI, K.; AMOH, Y.; TAKAOKA, M.; OGURA, M.; KIN, H.; INOUE, K. Increased neutrophil chemotaxis in obstructive jaundice: an in vitro experiment in rats. **J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 14, n. 5, p. 457-463, 1999.

UGUREL, S.; UHLIG, D.; PFÖHLER, C.; TILGEN, W.; SCHADENDORF, D.; REINHOLD, U. Down-regulation of HLA class II and costimulatory CD86/B7-2 on

circulating monocytes from melanoma patients. **Cancer Immunol Immunother.**, v. 53, n. 6, p. 551-559, 2004.

VÁSQUEZ, J.; GARCÍA-CALVO, M.; VALDIVIESO, F.; MAYOR, F.; MAYOR, F. JR. Interaction of bilirubin with the synaptosomal plasma membrane. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 3, p. 1255-1265, 1988.

VERHASSELT, V.; GOLDMAN, M.; WILLEMS, F. Oxidative stress up-regulates IL-8 and TNF-alpha synthesis by human dendritic cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, n. 11, p. 3886-3890, 1998.

WARSHAW, A. L.; GU, Z. Y.; WITTENBERG, J.; WALTMAN, A. Preoperative staging and assesment of resectability of pancreatis cancer. **Arch. Surgery**, v. 125, n. 2, p. 230-233, 1990.

WHITMER, D. I.; HAUSER, S. C.; GOLLAN, J. L. Mechanisms of formation, hepatic transport, and metabolism of bile pigments. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 152, p. 29-52, 1984.

WHITTINGTON, R.; FAULDS, D. Interleukin-2. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in patients with cancer. **Drugs**, v. 46, n. 3, p. 446-514, 1993.

WU J.; MA, J.; FAN, S. T.; SCHILTT, H. J.; TSUI, T. Y. Bilirubin derived from heme degradation suppress MHC class II expression in endothelial cells. **Biochem. Biophys Res. Commum.**, v. 338, n. 2, p. 890-896, 2005.

YAMASHITA, K.; MCDAID, J.; OLLINGER, R.; TSUI, T. Y.; BERBERAT, P. O.; USHEVA, A.; CSIZMADIA, E.; SMITH, R. N.; SOARES, M. P.; BACH, F. H. Biliverdin, a natural product of heme catabolism, induces tolerance to cardiac allografts. **FASEB J.**, v. 18, n. 6, p. 765-767, 2004.

YANAGIMOTO, H.; TAKAI, S.; SATOI, S.; TOYOKAWA, H.; TAKAHASHI, K.; KNOW, A. H.; KAMIYAMA, Y. Impaired function of circulating dendritic cells in patients with pancreatic cancer. **Clin. Immunol.**, v. 114, n. 1, p. 52-60, 2005.

YANAGITANI, K.; KUBOTA, Y.; TSUJI K.; YAMAMOTO, S.; AMOH, Y.; TAKAOKA, M.; OGURA, M.; INOUE, K. Influence of biliary obstruction on neutrophil chemotaxis. **J. Gastroenterol.**, v. 33, n. 4, p. 536-401, 1988.

YEO, C. J. Management of complications following pancreaticoduodenectomy. **Surg. Clin. North. Am.**, v. 75, n. 5, p. 913-924, 1995.

YOUNG, J. W.; KOULOVA, L.; SOERGEL, S. A.; CLARK, E. A.; STEINMAN, R. M; DUPONT, B. The B7/bb1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4⁺ T lymphocytes by human blood dendritic cells *in vitro*. **J. Clin. Invest.**, v. 90, n. 1, p. 229-237, 1992.

YUCEYAR, H.; KOKULUDAG, A.; COKER, A.; ERSOZ, G.; KESKINOGLU, A.; GULER, A.; CAVUSOGLU, H. The serum levels of soluble interleukin-2 receptor

levels in patients with obstructive jaundice. **Hepatogastroenterology**, v. 43, n. 10, p. 949-953, 1996.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. Definition of human blood monocytes. **J. Leukoc. Biol.**, v. 67, n. 5, p. 603-606, 2000.

ZOU, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 5, n. 4, p. 263-274, 2005.

ANEXO A – Pacientes Ictéricos com câncer de Pâncreas

Pacientes	Idade	Sexo	Diagnóstico	Estadiamento	Tempo de Icterícia	BT (mg/dl)	BD (mg/dL)	BI (mg/dL)	Leucócitos /(mm ³)	Monócitos /(mm ³)
1	55	M	Adenocarcinoma de Pâncreas	T4N1M1	24 sem.	3,8	2,0	1,6	8.100	960
2	33	M	Adenocarcinoma de Pâncreas	T2N1M0	2 sem.	3,1	2,4	0,7	20.180	ND
3	46	F	Adenocarcinoma de Pâncreas	T3N1M1	16 sem.	4,8	3,3	1.5	9.500	ND
4	53	F	Adenocarcinoma de Pâncreas	T3N1M0	1 sem.	8,4	6,2	2,2	5.430	ND
5	73	F	Adenocarcinoma de Pâncreas	T4N1M0	3 sem.	18,0	13,6	4,4	10.276	ND
6	60	M	Adenocarcinoma de Pâncreas	T3N2M0	12 sem	12,9	9,6	3,3	5060	ND
7	77	M	Adenocarcinoma de Pâncreas	T3N1M1	6 sem.	18,0	13,6	4,4	ND	ND
8	48	M	Adenocarcinoma de Pâncreas	T4N1M0	1 sem.	8,0	6,2	2,2	ND	ND
9	56	M	Adenocarcinoma de Pâncreas	T3N2M0	4 sem.	14,0	9,2	4.8	ND	ND
10	58	M	Adenocarcinoma de Pâncreas	T4N1M0	7 sem.	21,7	16,0	5,7	15.120	ND
11	68	M	Adenocarcinoma de Pâncreas	T3N1M1	8 sem.	28,7	19,0	23,2	10.900	230
12	77	F	Adenocarcinoma de Pâncreas	T4N2M0	4 sem.	6,8	2,6	4,2	7.620	189
13	79	F	Adenocarcinoma de Pâncreas	T3N1M1	9 sem.	19,0	12,3	6,7	13.070	60

Pacientes	Idade	Sexo	Diagnóstico	Estadiamento	Tempo de Icterícia	BT (mg/dl)	BD (mg/dL)	BI (mg/dL)	Leucócitos /(mm ³)	Monócitos /(mm ³)
14	50	M	Adenocarcinoma de Pâncreas	T2N2M1	12 sem.	6,3	4,3	2,0	11.400	740
15	68	F	Adenocarcinoma de Pâncreas	T2N1M1	3 sem.	21,7	16,6	5.1	ND	ND
16	66	M	Adenocarcinoma de Pâncreas	T3N0M1	8 sem.	24,7	19,6	4.8	ND	ND
17	54	F	Adenocarcinoma de Pâncreas	T3N1M0	10 sem.	18,3	13,7	4.6	5.430	ND
18	47	M	Adenocarcinoma de Pâncreas	T3N2M1	6 sem.	17,9	13,4	4,5	9.486	ND
19	60	M	Adenocarcinoma de Pâncreas	T3N1M1	24 sem	2,5	1,57	0,93	13.500	ND
20	82	F	Adenocarcinoma de Pâncreas	T3N1M0	4 sem.	12,2	9,4	2,8	ND	ND
21	76	M	Adenocarcinoma de Pâncreas	T2N1M0	1 sem.	19,6	16,5	3,1	4.210	ND
22	58	F	Adenocarcinoma de Pâncreas	T1N2M0	3 sem.	17,6	15,4	2,2	10.800	ND

ANEXO B – Pacientes Anictéricos com câncer de Pâncreas

Pacientes	Idade	Sexo	Diagnóstico	Estadiamento	BT (mg/dl)	BD (mg/dL)	BI (mg/dL)	Leucócitos /(mm ³)	Monócitos /(mm ³)
1	64	F	Adenocarcinoma de Pâncreas	T4N2M1	0,4	0,1	0,3	7.890	ND
2	46	M	Adenocarcinoma de Pâncreas	T3N1M2	0,5	0,1	0,4	9.720	ND
3	60	F	Adenocarcinoma de Pâncreas	T3N1M1	0,3	0,2	0,1	11.390	ND
4	66	M	Adenocarcinoma de Pâncreas	T3N1M2	0,3	0,1	0,2	ND	ND
5	80	F	Adenocarcinoma de Pâncreas	T4N2M2	0,6	0,3	0,3	7.830	ND
6	51	F	Adenocarcinoma de Pâncreas	T3N1M1	0,2	0,1	0,1	ND	ND

ANEXO C - Análise da expressão de CD80 e CD1a nas células de pacientes ictericos mantidas em cultura para diferenciação e maturação em células dendríticas, comparadas com as células dos doadores saudáveis.

Grafico representativo da expressão das moléculas CD80 e CD1a analisadas nos diferentes ensaios de diferenciação e maturação de células dendríticas obtidas a partir de monócitos de pacientes ictericos.

Em quatro amostras de pacientes ictericos foi avaliada a expressão de CD123, não sendo detectada a expressão deste marcador em nenhuma das análises realizadas.

Histograma representativo da expressão de CD123 analisada nas células de pacientes ictericos mantidas em cultura para diferenciação e maturação de DCs.