RENATO BRITO BALEEIRO

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO
MICROAMBIENTE TUMORAL EM PACIENTES COM
NEOPLASIAS PULMONARES E SUA CORRELAÇÃO
COM A PRESENÇA DE MACRÓFAGOS E CÉLULAS
DENDRÍTICAS**

RENATO BRITO BALEEIRO

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO MICROAMBIENTE
TUMORAL EM PACIENTES COM NEOPLASIAS PULMONARES E
SUA CORRELAÇÃO COM A PRESENÇA DE MACRÓFAGOS E
CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Imunologia).

São Paulo

2007

RENATO BRITO BALEEIRO

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS NO MICROAMBIENTE
TUMORAL EM PACIENTES COM NEOPLASIAS PULMONARES E
SUA CORRELAÇÃO COM A PRESENÇA DE MACRÓFAGOS E
CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Imunologia).

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto

São Paulo

2007

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Baleeiro, Renato Brito.

Estudo da expressão de citocinas no microambiente tumoral em pacientes com neoplasias pulmonares e sua correlação com a presença de macrófagos e células dendríticas / Renato Brito Baleeiro. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Jose Alexandre Marzagão Barbuto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia dos tumores.

Versão do título para o inglês: Study of the expression of cytokines in the tumor microenvironment in lung cancer patients and their correlation with the presence of macrophages and dendritic cells.

Descritores: 1. Células dendríticas 2. Macrófagos 3. Neoplasias pulmonares 4. Citocinas 5. Imunohistoquímica 6. Câncer I. Barbuto, Jose Alexandre Marzagão II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB186/2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Renato Brito Baleeiro.

Título da Dissertação: Estudo da expressão de citocinas no microambiente tumoral em pacientes com neoplasias pulmonares e sua correlação com a presença de macrófagos e células dendríticas .

Orientador(a): Jose Alexandre Marzagão Barbuto.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 25 de outubro de 2005.

PARECER 676/CEP

Prezado Senhor,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua quinquagésima nona reunião, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "*Estudo da expressão de citocinas no micro-ambiente tumoral em pacientes com neoplasias pulmonares e sua correlação com a presença de macrófagos e células dendríticas*".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão**.

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilmo. Sr.
RENATO BRITO BALEEIRO
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

CENTRO DE TRATAMENTO E PESQUISA

**HOSPITAL
DO CÂNCER**

A. C. CAMARGO

São Paulo, 30 de novembro de 2005.

Ao

Dr. Renato Brito Baleeiro

Ref.: Projeto de Pesquisa n.º 742/05

"Estudo da expressão de citocinas no micro-ambiente tumoral em pacientes com neoplasias pulmonares e sua correlação com a presença de macrófagos e células dendríticas".

Prezado Doutor:

Seu projeto de pesquisa, acima mencionado, foi apreciado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital do Câncer em sua reunião de 29/11/2005. Os membros desta comissão aprovaram a realização deste estudo.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à secretaria do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa

C.C

Orientador: Dr. José Alexandre M. Barbuto

Responsável na instituição: Dr. Jefferson Luiz Gross

COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

Rua Prof. Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo – SP CEP 01509-900
PABX(011)2189-5000 ramal 1117 TELEFAX (011) 2189-5083 – e-mail: dirclinica@hcancer.org.br

Ao meu pai. Pessoa fundamental na minha escolha pelo estudo das neoplasias. Aliás, ninguém melhor do que ele, que lutou por dez anos contra essa doença, para me motivar em busca de sua compreensão.

In memoriam

A minha mãe Ana, ao meu padrasto Luís e ao meu irmão Nílton, que sempre acreditaram nos meus sonhos e me dão força para lutar por eles. Sobretudo, pela compreensão, paciência e o apoio incondicional que me proporcionaram mais esta realização.

A Andréia, meu amor, por compreender minha dedicação a este trabalho, e ter me dado todo seu apoio para que o mesmo pudesse ser realizado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, o Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto. Admiro-o não só pelo brilhante cientista, mas, sobretudo, pelo ser humano que é. Agradeço-o por sua paciência e entusiasmo na transmissão de sua experiência e conhecimento da Imunologia. Estou certo de que enriqueceram sobremaneira minha formação como pesquisador e como pessoa.

Aos professores Dr. Niels, Dra. Vera Calich e Dra. Vera Capelozzi pelas valiosas sugestões para meu trabalho, no exame de qualificação.

Ao meu amigo Japonês, o Marcio, que me acompanhou desde o início de minha trajetória no laboratório de Imunologia de Tumores. Uma pessoa que não mede esforços em ajudar os companheiros. Em especial, pelas sempre proveitosas e divertidas discussões sobre temas variados, e pelas caronas ao Hospital A.C Camargo, em busca de material para este trabalho.

A Patty pelo apoio desde os primeiros passos no laboratório.

Aos companheiros do laboratório, Alexandra, Ana Paula, Andréia, Bruno, Clara, Gabi, Graziela, Graziele, João Paulo, Marisa e Roberto pelo auxílio, quando necessário e, sobretudo pelo companheirismo e por me fazerem perceber que a vida não é só trabalho. Sim, às vezes a socialização pode ser agradável.

A Luciene, por quem tenho uma admiração especial. Foi quem me transmitiu as primeiras instruções no laboratório, sendo também fundamental para o início deste trabalho. Em especial por ser, para mim, um exemplo de competência, e a prova de que as grandes realizações são fruto de muito trabalho, planejamento e competência.

Às secretárias do departamento de Imunologia Eny, Jotelma e Valéria pela atenção e ajuda sempre que necessário.

Ao novo secretário do departamento de Imunologia, Amarildo, pelo auxílio.

As professoras Dra. Ísis Abrahansohn e Dra. Sônia Jancar, por compartilharem comigo sua experiência e extrema competência na transmissão do conhecimento imunológico aos alunos de graduação.

Aos professores do departamento de Imunologia, pelo conhecimento transmitido.

A Célia pelo auxílio na execução dos experimentos e companhia para as refeições.

Aos funcionários André, Maomé, Miltão e Otacílio, pela ajuda e momentos de descontração.

Ao Matheus pelo auxílio durante a monitoria PAE e, principalmente pelas conversas durante o cafezinho, nos intervalos das aulas.

Ao todos do departamento de Cirurgia Torácica do Hospital A.C. Camargo pela ajuda na coleta de material cirúrgico dos pacientes com câncer de Pulmão. Em especial, ao Jefferson, por sua disposição e entusiasmo na participação desse projeto.

Aos técnicos Ivan e Oziris do departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, pelo indispensável auxílio no processamento das amostras por Imunohistoquímica.

Ao Clóvis do departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo pelo auxílio na leitura das lâminas.

Ao Chefe do departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, o Prof. Dr. Fernando Soares, pela contribuição na realização deste trabalho.

A Carla e a Profa. Dra. Irma, do Laboratório de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da USP, pela gentileza de ceder os anticorpos para a detecção de IL-4 e TNF- α em nossas amostras.

A minha família. Um agradecimento especial a todos que tiveram que suportar os meus momentos de estresse durante esse período. Reconheço que não é tarefa para qualquer um.

Aos meus amigos Fábio, João Manoel, Leyva, Maria, Raquel, Sérgio e Vágner que, mesmo distantes, me dão aquela força, quando necessário.

Aos amigos e colegas do departamento de Imunologia: Adriana, Alexandra, Ana Paula (muito didática), Camila, Cíntia, Claudinha, Cristian, Cristiane (a Zunha), Edicildes (ou Edimara), Eduardo, Fernanda, Fernando, Gabi, Inês, Judite (conhecida também como Juliana), Mary (amiga da Edicildes), Marilu, Mayra, Rafael, Rogério Valois, Sandra, Sérgio (o “Culega”), Sheila, Silvana e Simone.

Aos meus críticos por continuamente me motivarem à busca pela perfeição.

Aos pacientes que aceitaram participar deste estudo. A Ciência depende de pessoas que, de alguma forma trabalham e se dedicam em prol de um conhecimento que, eventualmente não contemplarão.

As bibliotecárias do ICB-USP, pela gentileza e competência no auxílio com os trâmites da biblioteca.

A FAPESP pelo apoio financeiro ao meu projeto de Mestrado e ao Projeto Temático do laboratório.

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

A Deus, por me conceder a oportunidade e o privilégio de fazer o que mais gosto.

*“Não fale a respeito do que você tem
feito ou sobre o que você vai fazer.
Faça e deixe que isto fale por si
mesmo”.*

Martin Vanbee

RESUMO

BALEEIRO, R. B. Estudo da expressão de citocinas no microambiente tumoral em pacientes com neoplasias pulmonares e sua correlação com a presença de macrófagos e células dendríticas [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007.

O microambiente tumoral é um fator determinante da interação entre as neoplasias e o sistema imune. Dentre as maneiras pelas quais este microambiente pode influenciar esta interação, está sua capacidade de afetar a diferenciação de precursores em macrófagos ou em células dendríticas (DCs), o que parece depender também das citocinas aí presentes. Na presença de GM-CSF, IL-4 e TNF- α ocorreria a diferenciação em DCs, ao passo que a exposição à IL-6 e ao M-CSF favoreceria o aparecimento de macrófagos. Uma vez que DCs possuem um papel central na indução da resposta imune, o desvio da diferenciação de precursores para macrófagos no microambiente tumoral poderia ser um mecanismo de escape eficaz de tumores frente à resposta imune. Assim, o objetivo deste projeto foi o estudo comparativo entre tecido neoplásico e não-neoplásico, da frequência de DCs, macrófagos e mastócitos em amostras de 15 pacientes e da produção *in situ* das citocinas IL-4 e TNF- α , por análise imunohistoquímica de cortes de tecido. Nesses pacientes observamos maior quantidade de DCs (CD1a+ ou S100+), macrófagos (CD68+) e mastócitos (azul de toluidina+) no tecido neoplásico em relação ao tecido pulmonar. A frequência de células produtoras de IL-4 foi maior em tecido pulmonar, enquanto que um maior número de células produtoras de TNF- α foi encontrado no tecido neoplásico. Adicionalmente, verificamos a produção *in vitro* das citocinas IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF, M-CSF e TNF- α , por ensaio imunoenzimático de sobrenadante de cultura de células obtidas a partir de explantes teciduais de 17 pacientes, diferentes dos anteriores. Estas mesmas suspensões celulares foram submetidas à análise da presença de células positivas para moléculas de superfície de macrófagos e DCs, por citometria de fluxo. Nesta análise encontramos maior frequência de DCs maduras (CD14-CD80+CD86+) em tecido pulmonar não-neoplásico. Para as demais análises, todos os indivíduos apresentaram diferenças entre os tecidos pulmonar e neoplásico quanto a expressão dos marcadores e produção de citocinas, sem obedecer, entretanto, a padrões claros e com diferenças significativas. Nesta mesma análise, identificamos a expressão, por células tumorais ou do estroma pulmonar, do marcador CD83, característico de DCs ativadas em 10

de 11 pacientes analisados. Além do mais, constatamos que o sobrenadante de cultura de células tumorais é capaz de inibir a ativação de linfócitos por DCs alogênêicas, atividade que é suprimida por anticorpos anti-CD83. Esta observação acrescenta mais um fator, presente no microambiente, capaz de interferir na relação do sistema imune com as células neoplásicas. Nossos dados não só são compatíveis com um microambiente que não favorece a indução de uma resposta imune efetiva contra os tumores de pulmão (menor frequência de DCs maduras e expressão de CD83 por células que não são apresentadoras de antígenos), mas também evidenciam a complexidade das relações entre sistema imune e tumor, devendo ser considerados em estratégias para modificar o padrão dessas interações, como as abordagens imunoterapêuticas contra o câncer.

Palavras-Chave: Células Dendríticas, Macrófagos, Neoplasias Pulmonares, Citocinas, Imunohistoquímica, Câncer.

ABSTRACT

BALEEIRO, R. B. Study of the expression of cytokines in the tumor microenvironment in lung cancer patients and their correlation with the presence of macrophages and dendritic cells [Master Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2007.

The local microenvironment is probably a significant factor in the determination of the immune response pattern to tumors. DCs and macrophages can differentiate from monocytes, depending on the milieu, where cytokines, like interleukin (IL)-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induce DC differentiation and tumor necrosis factor (TNF)- α induces their maturation. On the other hand, cytokines such as IL-6, IL-10 and M-CSF favor monocyte differentiation toward macrophages while preventing the generation of DCs. Since DCs play a crucial role in the induction of an effective immune response, a local deviation toward macrophage differentiation could be an efficient mechanism of tumor evasion from the immune system. Thus, the aim of this work was to analyze the presence *in situ* of DCs (S100+ or CD1a+), macrophages (CD68+), mast cells (toluidine blue+) IL-4 and TNF- α within the microenvironment of primary lung carcinomas in 15 patients. Higher frequencies of both immature DCs (CD1a+ and S-100+) and macrophages were detected in the tumor-affected lung, when compared to the non-affected lung. Also, TNF- α -positive cells were more frequent, while IL-4-positive cells were less frequent in neoplastic tissues. In addition, we assessed the production the cytokines, IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF, M-CSF and TNF- α , by ELISA, in the supernatant of single cell suspensions prepared from tissues of 17 other patients, after 48 hours in culture. These cells were analyzed as to the frequency of DCs' and macrophages' marker-positive cells by flow cytometry. A higher frequency of phenotypically mature DCs (CD14-CD80+CD86+) was found in lung tissue compared to tumors. For the other parameters analyzed, no consistently significant differences were observed between the tumor affected and non-affected lung, though in individual patients clear differences were present. In the same analysis, we detected the expression of a DC maturation marker, CD83, on cells from tumor or stroma in 10 of the 11 patients analyzed. Moreover, we observed that there was an inhibitory effect in proliferation of T lymphocytes induced by allogeneic DCs when supernatant from tumor cell cultures was added into co-cultures, and this inhibitory effect was decreased in the

presence of anti-CD83. Such observation adds another factor, present in the microenvironment, capable of interfering in the interplay between the immune system and tumor cells. Our data are not only compatible with a local microenvironment that does not favor the induction of effective immune responses against lung cancer, but also show the complexity of tumor-immune system interactions, and should be considered in attempts to modify the pattern of these interactions, such as immunotherapeutic approaches to cancer.

Keywords: Dendritic Cells, Macrophages, Lung Cancer, Cytokines, Immunohistochemistry, Cancer.

LISTA DE ABREVIACES

Ac: Anticorpo
ADE: Adenocarcinoma
AET: [S(2-Aminoethyl)-Isothioronium Bromide Hydrobromide]
Ag: Antgeno
APC: Célula Apresentadora de Antgeno
BAL: Lavado Bronco-Alveolar
BCG: Bacilo de Calmette-Guerin
BDCA: Antígeno de Célula Dendrítica do Sangue
(bFGF): Fator de Crescimento de Fibroblastos
BSA: Soro-Albumina Bovina
CAC: Carcinoma Adenide Cístico
CCR: Receptor para Quimiocina
CD: "Cluster of Differentiation"
CE: Carcinoma Epidermóide
CFSE: Carboxy Fluoroscein Succinimidyl Ester
CGC: Carcinoma de Grandes Células
CN: Carcinoma Neuroendócrino
DCs: Células dendríticas
FasL: Ligante para Fas
Fc: Fragmento cristalizável da imunoglobulina
GM-CSF: Fator Estimulante de Colnias de Macrófagos e Granulócitos
HLA-DR: Molécula do MHC de classe II
Ig: Imunoglobulina
IL: Interleucina
IFN: Interferon
INCa: Instituto Nacional do Câncer
LN: Linfonodo
LPS: Lipopolissacarídeo
LB: Linfócito B
LC: Células de Langerhans
LT: Linfócito T
M-CSF: Fator Estimulante de Colnias de Macrófagos

M-CSF-R: Receptor para o M-CSF

MFI: Média de Intensidade de Fluorescência

MHC-I e II: Molécula do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I e classe II

mRNA: Ácido Ribonucléico Mensageiro

NK: Células Matadoras Naturais

NSCLC: Carcinoma de Pulmão de Células não Pequenas

PBMC: Células Mononucleares de Sangue Periférico

PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfatos

PDGF: Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

p-NPP: p-Nitrofenil-Fosfato

pT α : Cadeia Alpha do Receptor de Célula pré-T

SOCS: Supressor de Sinalização de Citocinas

STAT: Transdutor de Sinais e Ativador da Transcrição

TC: Tumor Carcinóide

TGF: Fator de Crescimento Transformador

Th: Linfócito T helper

TIL-B: Linfócito B Infiltrante de Tumor

TLR: Receptor do tipo Toll

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TNF-R: Receptor para o TNF

TRAIL: Ligantes Indutores de Apoptose Relacionados ao TNF

VEGF: Fator de Crescimento Endotélio-Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	22
2 OBJETIVOS.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS:	35
3.1 Casuística	35
3.2 Amostras Teciduais	35
3.3 Análise imunohistoquímica e histoquímica	36
3.4 Análise quantitativa dos marcadores	37
3.5 Obtenção das células tumorais	39
3.6 Avaliação do fenótipo de membrana por citometria de fluxo	40
3.7 Detecção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)	41
3.8 Isolamento de células mononucleares.....	42
3.9 Diferenciação de DCs e monócitos in vitro a partir de células mononucleares.....	43
3.10 Separação de linfócitos T para ensaio proliferativo	44
3.10.1 Preparação das hemácias de carneiro	44
3.10.2 Recuperação de linfócitos T.....	45
3.11 Tratamento de sobrenadante de células tumorais P9 com anticorpo anti-CD83	45
3.12 Avaliação da atividade aloestimuladora das DCs	46
3.13 Análise estatística	47

4 RESULTADOS.....	48
4.1 Estudo de amostras conservadas em blocos de parafina.....	48
4.1.1 Dados clínicos e demográficos dos pacientes selecionados para o estudo	48
4.1.2 Presença in situ de DCs imaturas (CD1a+ e S-100+), macrófagos (CD68+) e mastócitos (azul de toluidina+).....	49
4.1.3 Produção in situ de IL-4 e TNF-α	55
4.2 Estudo de amostras frescas	61
4.2.1 Dados clínicos e demográficos dos pacientes incluídos no estudo	61
4.2.2 Peso e rendimento celular dos fragmentos teciduais	62
4.2.3 Fenótipo de membrana das células do tecido pulmonar ou neoplásico	64
4.2.4 Identificação da população celular CD83+	85
4.2.5 Efeito do sobrenadante de células tumorais P9 sobre a proliferação de linfócitos T induzida por DCs alogênicas	88
4.2.6 Detecção, por ELISA, de citocinas em sobrenadante de cultura de células provenientes do tecido pulmonar ou neoplásico	90
5 DISCUSSÃO	97
6 CONCLUSÕES	114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
ANEXOS	129

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Neoplasias pulmonares são a maior causa de morte por câncer em países como o Brasil (segundo o Instituto Nacional do Câncer – INCa / www.inca.gov.br) e os Estados Unidos (segundo a American Cancer Society / www.cancer.org), e nem sempre as abordagens convencionais disponíveis para seu tratamento, tais como cirurgia, quimioterapia e radioterapia oferecem resultados satisfatórios, especialmente para pacientes em estágio avançado da doença. Frente a esta situação, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento de novas abordagens para seu tratamento, o que depende da melhor compreensão da biologia destas neoplasias. Nesse sentido, uma variedade de novas abordagens tem sido investigada na tentativa de assegurar uma maior sobrevida aos portadores dessa doença. Dentre elas, a vacinação, por sua especificidade contra alvos determinados parece ser uma estratégia atraente para o tratamento de tumores e tem sido cada vez mais explorada no contexto das neoplasias.

O papel do sistema imune no reconhecimento e eliminação de células tumorais, foi proposto por Paul Ehrlich no início do século passado. No final da década de 50 Burnet e Thomas reformularam as hipóteses de Ehrlich e propuseram o que hoje é conhecido como teoria da vigilância imunológica (BURNET, 1970). Essa teoria propõe que o sistema imune patrulha o organismo a procura de células transformadas, sendo capaz de reconhecer e destruí-las. Dessa forma a ocorrência de tumores seria um evento raro, proveniente de células que escaparam dessa vigilância.

Se por um lado, a ocorrência de regressão espontânea de tumores sem terapia, a heterogeneidade de progressão clínica da doença entre os pacientes com o mesmo tipo histológico e o isolamento de linfócitos infiltrantes de tumor (BELL,

1970; RUCKDESCHEL *et al.*, 1972; SHANKARAM *et al.*, 2001; WEI e HANG, 1989) são evidências que apontam para a existência de uma resposta imune contra as neoplasias e, portanto para uma vigilância imunológica, por outro lado há também dados que contradizem esta hipótese. Talvez os mais contundentes sejam o fato de tumores crescerem mesmo em indivíduos imunocompetentes e o de que indivíduos imunodeficientes não apresentarem aumento da incidência das neoplasias mais comuns no restante da população (GILL e BRYNES, 1989; PENN, 1991; VOLBERDING, 1989; WITTE e WITTE, 1988). Assim, apesar da grande quantidade de dados acumulados no estudo da resposta imune contra os tumores, não se pode aceitar nem rejeitar totalmente a teoria da vigilância imunológica, mas é-se obrigado a reconhecer a importância potencial do sistema imune na biologia das neoplasias.

Apesar de significantes avanços na nossa compreensão das bases moleculares da imunologia, muitos obstáculos ainda restam para traduzir este conhecimento em aplicação clínica para o tratamento de tumores sólidos, como o tumor de pulmão. As abordagens imunoterapêuticas para as neoplasias pulmonares vão desde estimulantes inespecíficos como o bacilo de Calmette-Guerin (BCG) (MATTHAY *et al.*, 1986) e citocinas (SCHILLER *et al.*, 1990; SCHILLER *et al.*, 1995), até as mais específicas, baseadas na imunização de pacientes com peptídeos ou células pulsadas com Ags tumorais (NENINGER *et al.*, 2005). Todas essas terapias têm gerado resultados promissores, mas ainda não completamente satisfatórios (NENINGER *et al.*, 2005; RAEZ *et al.*, 2005).

É notório, portanto, que para o desenvolvimento e aperfeiçoamento das abordagens imunoterapêuticas para as neoplasias, faz-se necessária uma melhor compreensão das interações do sistema imune e seus componentes com esses tumores. Nesse sentido, nosso laboratório desenvolveu estudo sobre a função,

distribuição e frequência de células dendríticas (DCs), monócitos e macrófagos no sangue e pulmão de pacientes portadores de câncer de pulmão (ANSELMO *et al.*, 2005), procurando estabelecer parâmetros determinantes da interação desses tumores com o sistema imune. Estes parâmetros têm relevância, pois estes tipos celulares, principalmente as DCs, estão envolvidos, não só na imunidade inata, mas também e de maneira central, no estabelecimento da resposta imune adquirida.

As primeiras DCs foram descritas por Paul Langerhans em 1868 na camada basal da epiderme (apud VERMAELEN e PAUWELS, 2005). Estas “Células de Langerhans” (LCs) apresentavam uma morfologia “dendrítica” com longos e ramificados prolongamentos interpostos entre as células epiteliais. Esta morfologia peculiar levou Paul Langerhans a considerar esse tipo celular como um neurônio. Somente, um século mais tarde, com os trabalhos de Steinman, após a descrição inicial de “um novo tipo de célula em órgãos linfóides de camundongos” (STEINMAN e COHN, 1973), essas células passaram a ser melhor caracterizadas. Subsequentemente foi mostrado que as DCs estão localizadas também no sangue (Van VOORHIS *et al.*, 1982), na medula óssea (EGNER *et al.*, 1993), e em diversos órgãos como o pulmão (SERTL *et al.*, 1986), intestinos (PAVLI *et al.*, 1996), fígado (PRICKETT *et al.*, 1988), coração (HART e FABRE, 1981), rins (HART *et al.*, 1981) e trato urogenital (HART e FABRE, 1981).

Na verdade, as DCs constituem uma população heterogênea, tanto em humanos como em camundongos, com diversas sub-populações, aparentemente com funções distintas (ARDAVÍN *et al.*, 2001; SHORTMAN e LIU, 2002). Devido ao fato de nosso estudo investigar as DCs humanas, nos limitaremos a uma descrição mais detalhada dessas células em humanos. Embora a classificação dessas células em sub-populações sofra variações entre os diversos autores, há um consenso de

que as DCs possam ser divididas em dois segmentos principais: o das DCs mielóides e o das DCs plasmocitóides (LIU, 2005). Também nos seres humanos essas células podem ser encontradas nos diversos tecidos, como sangue (DZIOANEK *et al.*, 2000; DZIOANEK, 2001) e pulmão (DEMEDTS *et al.*, 2005; VERMAELEN e PAUWELS, 2005), mas também podem ser obtidas por diferenciação *in vitro* a partir de diferentes precursores, desde que recebam os estímulos necessários para tal (CHAPUIS *et al.*, 1997; SALLUSTO e LANZAVECCHIA, 1994; ZHOU e TEDDER, 1996).

Monócitos do sangue periférico, bem como precursores hematopoiéticos CD34+ são dois tipos celulares que, recebendo estímulos apropriados, podem se diferenciar *in vitro* em DCs. Há indícios de que *in vivo*, no tecido, os monócitos, recém egressos do sangue, também tem o potencial de se diferenciar tanto em macrófagos como em DCs, dependendo dos fatores encontrados no ambiente durante sua migração do sangue para os tecidos periféricos (CHAPUIS *et al.*, 1997; SALLUSTO e LANZAVECCHIA, 1994; ZHOU e TEDDER, 1996).

Em contato com interleucina (IL)-4 e o fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), citocinas que poderiam ser produzidas por mastócitos teciduais (GALLI *et al.*, 2005), os monócitos diferenciam-se em DCs mielóides imaturas (CHAPUIS *et al.*, 1997; SALLUSTO e LANZAVECCHIA, 1994; ZHOU e TEDDER, 1996). As DCs mielóides encontradas no pulmão, e também aquelas encontradas no sangue, são caracterizadas por expressarem moléculas de classe II codificadas pelo complexo de histocompatibilidade principal (MHC-II), CD11c e não expressarem CD14. Mostrando a heterogeneidade das DCs, há autores que propõem a subdivisão das DCs mielóides em dois grupos, as de tipo 1 e as de tipo 2. Quando as DCs expressam a molécula BDCA-1, elas são identificadas

como DCs mielóides tipo 1 (DC1), ao passo que, quando expressam BDCA-3 são classificadas como DCs mielóides tipo 2 (DC2) (DEMEDTS *et al.*, 2005; DZIOONEK *et al.*, 2000). Finalmente, um outro subtipo de DC pode ser gerado em cultura pela adição do “fator de crescimento transformador” (TGF)- β ou da IL-15 juntamente com o GM-CSF aos monócitos, o que induz a diferenciação dos mesmos em células de Langerhans (GEISSMANN *et al.*, 1998; MOHAMADZADEH *et al.*, 2001). Essas células são caracterizadas pela expressão da molécula CD1a e uma lectina conhecida como langerina em sua superfície, além de possuírem em seu interior, elementos elétron-densos denominados grânulos de Birbeck (BIRBECK *et al.*, 1961; KASHIHARA *et al.*, 1986).

A maior importância das DCs mielóides na resposta imune é, de acordo com dados da literatura, a apresentação de antígenos (Ags) aos linfócitos T, função em que parecem superar as outras células apresentadoras de antígenos (APCs) conhecidas (BANCHEREAU *et al.*, 2000; STEINMAN e WITMER, 1978, STEINMAN, 1991). Nos tecidos periféricos, as DCs encontram-se no estágio de DCs imaturas. No estágio imaturo, as DCs possuem uma série de mecanismos que as tornam muito eficientes na captura de antígenos, como a macropinocitose, receptores para porção Fc de imunoglobulinas, receptores do tipo lectinas e receptores para o reconhecimento de células apoptóticas (FADOK *et al.*, 1992; RUBARTELLI *et al.*, 1997) e necróticas (BASU *et al.*, 2000).

Quando as DCs capturam Ags e há o reconhecimento simultâneo de “sinais de perigo”, comumente associados aos patógenos, principalmente através de receptores do tipo “Toll-like receptors” (TLR) ou indiretamente através do efeito de citocinas inflamatórias (HERTZ *et al.*, 2001; MUZIO *et al.*, 2000; VISINTIN *et al.*, 2001), essas células passam por um processo de maturação, migrando para os

órgãos linfóides secundários. Nesse estágio, elas expressam altos níveis de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86), aumentam a expressão de moléculas de classe I codificadas pelo complexo de histocompatibilidade principal (MHC-I) e MHC-II e passam a expressar as moléculas CD83 (EGNER e HART, 1995; ZHOU *et al.*, 1992) e CCR7, ao mesmo tempo em que deixam de expressar CCR1, CCR5, CCR6 e CD68 (BANCHEREAU, 2000). A mudança da expressão dos receptores para quimiocinas, de CCR1, CCR5 e CCR6 para CCR7 favorece a migração destas células ativadas para as áreas timo-dependentes dos linfonodos (SALLUSTO *et al.*, 1999; SALLUSTO e LANZAVECCHIA, 2000). Da mesma forma, a mudança da cinética de expressão de moléculas do MHC favorece a apresentação dos Ags capturados no momento de sua ativação para os linfócitos T (LT) “naive” ou virgem (também atraídos para as mesmas áreas do linfonodo). Este 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, SOCS3 e pSTAT1 (JACKSON *et al.*, 2004). É interessante notar que esta maturação, ao mesmo tempo em que é estimulada – pelo aumento de pSTAT1 - 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 LT. 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 pelas DCs de IL-12, 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 (T reg), caracterizados pela expressão do fator de transcrição Foxp3 e pela produção de citocinas imunossupressoras como TGF- β e IL-10 (FONTENOT *et al.*, 2003; HORI *et al.*, 2003; ZOU, 2005). Mostrando a heterogeneidade do sistema, há ainda um outro padrão de resposta recentemente descrito, o de linfócitos do tipo Th17, caracterizado pela produção de IL-17 (STEINMAN, 2007), cuja ativação parece depender da presença de IL-23, que parece ter origem também nas DCs (BETTELLI *et al.*, 2007; KORN *et al.*, 2007).

Por outro lado, se cultivados na presença de IL-3 e CD40-ligante (CD40L), os monócitos diferenciam-se em DCs com morfologia e padrão de expressão de moléculas de superfície distintos, o que leva à sua classificação como DCs plasmocitóides. Este tipo celular caracteriza-se pela alta produção de interferons (IFNs) α e β frente a estímulos virais e microbianos (GROUARD *et al.*, 1997), pela ausência de CD11c em sua superfície (SIEGAL *et al.*, 1999) e pela expressão de CD123 (COLONNA *et al.*, 2004). As DCs plasmocitóides encontradas no sangue e pulmão ainda expressam em sua superfície as moléculas BDCA-2 e BDCA-4 (DEMEDTS *et al.*, 2005; LIU, 2005). A produção de IFN do tipo I por essas células frente a estímulos virais está relacionada à alta expressão de TLR 7 e TLR 9, moléculas ausentes nas DCs mielóides (DEMEDTS *et al.*, 2006; LIU, 2005). Comparadas às DCs mielóides, as DCs plasmocitóides humanas possuem uma capacidade de ativação de linfócitos T muito baixa. Esta baixa capacidade de ativação de linfócitos T é observada tanto em DCs plasmocitóides do sangue como nas presentes no pulmão (DEMEDTS *et al.*, 2006) ficando assim, a classificação destas células como “células dendríticas” no mínimo curiosa, uma vez que, em geral, considera-se a alta capacidade de apresentação antigênica como a principal característica das DCs.

Quanto à origem *in vivo* das DCs plasmocitóides também ainda não há um consenso. Embora as DCs plasmocitóides expressem o marcador mielóide CD123, a molécula CD11c, que é um marcador clássico de linhagem mielóide está ausente, além de outros como CD11b, CD13, CD14 e CD33. A idéia de que essas células teriam origem linfóide é apoiada por descobertas de que transcritos gênicos do receptor alpha de células pré-T (pT α), assim como rearranjo dos segmentos gênicos D-J da cadeia pesada de imunoglobulina poderem ser encontrados em DCs plasmocitóides (RISSOAN *et al.*, 2002; CORCORAN *et al.*, 2003). Além disso, a super-expressão dos fatores de transcrição dominante negativo Id2 e Id3 bloqueia o desenvolvimento de DCs plasmocitóides, linfócitos B e T, mas não o de DCs mielóides (SPITS *et al.*, 2000).

Os macrófagos, que também podem se originar dos mesmos precursores que as DCs, são células efetoras que produzem vários mediadores inflamatórios sendo excelentes fagócitos, mas, contrastando com as DCs, se mostram bem menos eficientes na apresentação de Ags que as DCs (STEINMAN e WITMER, 1978) e parecem ser incapazes de ativar linfócitos T naive (GANS, 1993). Com base no papel distinto desses tipos celulares, pode-se especular que um microambiente com baixa quantidade relativa de DCs poderia culminar em um déficit na capacidade de apresentação de Ags naquele microambiente.

Na verdade, há concordância entre diversos autores que a presença de DCs mielóides em infiltrados tumorais seria de vital importância para a eficácia do sistema imune em montar uma resposta efetiva contra os mesmos, associando-se a sua presença a um melhor prognóstico em diversas neoplasias (AUSTIN, 1993; BECKER, 1992; HUANG *et al.*, 1990; INOUE *et al.*, 1993; ISHIGAMI *et al.*, 1998; JOHNSON *et al.*, 2000; MAEHARA *et al.*, 1999; TSUJITANI *et al.*, 1992). O oposto

parece ocorrer com os macrófagos e também com as DCs plasmocitóides, sendo sua presença no microambiente tumoral frequentemente associada à indução de tolerância aos Ags tumorais e/ou pior prognóstico (VIGNAUD *et al.*, 1994; ZOU, 2001; ZOU, 2005). É interessante notar que a expressão de TLR9, característica das DCs plasmocitóides, é reduzida naquelas infiltrantes de tumor (HARTMANN, 2003), permitindo que se especule que a provável diminuição ou ausência de produção de IFN- α (uma consequência da sinalização via TLR9), participe da geração de um microambiente favorável ao desenvolvimento do tumor no local. Isto poderia ser devido não só à atuação do IFN na imunidade inata, pela ativação das células NK (COLONNA *et al.*, 2004), mas também por sua contribuição para a indução da resposta imune adaptativa por linfócitos do tipo Th1 (COLONNA *et al.*, 2004).

Por outro lado, há trabalhos mostrando que um dos fatores que pode conferir um comportamento mais agressivo ao tumor é, paradoxalmente, a presença de macrófagos. O macrófago apresenta capacidade de se locomover e invadir tecidos, e quando associado com a célula tumoral (o que pode ocorrer, ao menos *in vitro*, no câncer de mama, por exemplo), se não for capaz de matá-la, poderia facilitar a migração e a invasão de tecidos pela célula tumoral (NETTEN *et al.*, 1993). Outro mecanismo pelo qual esta mesma célula poderia facilitar o crescimento do tumor é por sua atividade angiogênica (SHIELD, 1992; WEIDNER *et al.*, 1991). Mais adiante será discutido com mais detalhes este papel do macrófago no micro-ambiente tumoral.

É relevante notar que Menetrier *et al.*, (1998) mostraram que diversas linhagens de células tumorais produzem IL-6 e M-CSF e que o sobrenadante de cultura destas células, quando adicionado à cultura de precursores hematopoiéticos CD34+ (que podem gerar tanto macrófagos como DCs), levam à diferenciação

preferencial de macrófagos. Assim, poder-se-ia propor que haja, no microambiente tumoral, um desvio da diferenciação dos monócitos, e/ou de precursores CD34+, para macrófagos, o que resultaria em um déficit na capacidade de apresentação de antígenos *in situ*, constituindo assim, um mecanismo eficaz de escape do tumor frente ao sistema imune.

Dados obtidos em nosso laboratório através de análise das populações celulares presentes no pulmão de pacientes portadores de neoplasias pulmonares, revelaram baixa frequência de DCs no tecido tumoral, ao passo que a frequência de macrófagos pareceu inalterada (ANSELMO *et al.*, 2005). Coerentemente, também pudemos observar uma deficiência fenotípica-funcional de DCs diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos de portadores de neoplasias avançadas (NEVES *et al.*, 2005). Estes e os demais dados da literatura aqui apresentados, portanto, nos levam a propor que a diferenciação de precursores comuns, nos pacientes estudados, estaria sendo desviada no paciente, ou mais especificamente no microambiente tumoral, para a linhagem macrofágica, provocando assim uma deficiência funcional na apresentação antigênica.

Como mecanismos possíveis para explicar tal fenômeno, poderíamos propor a produção de fatores solúveis “pró-macrófago”, como as citocinas IL-6 e/ou M-CSF (como já foi mostrado ocorrer em alguns tumores – (MENETRIER *et al.*, 1998; YAMAJI *et al.*, 2004; ZOU, 2005)) ou a diminuição da produção de fatores “pró-DCS” ou, ainda, a presença de fatores bloqueadores da ação de citocinas favoráveis ao aparecimento de DCs. Neste último mecanismo, por exemplo, seria possível incluir a produção de anticorpos anti-TNF- α por linfócitos B infiltrantes de tumor (TIL-B), fenômeno constatado por Barbuto *et al.*, (1995). Adicionalmente a isso, podem ser produzidas, no microambiente tumoral, substâncias de ação reguladora, como a IL-

10, que impediriam a diferenciação e maturação de DCs (ÁVILA-MORENO *et al.*, 2006; GABRILOVICH *et al.*, 1996; GABRILOVICH, 2004; SATO *et al.*, 2003; ZOU, 2005).

É intrigante observar que, enquanto a maioria dos dados da literatura mostra uma deficiência fenotípica-funcional nas DCs geradas a partir de monócitos de pacientes com câncer (MERAD *et al.*, 1997; NEVES *et al.*, 2005), há relato (SUZUKI *et al.*, 2001) que mostra a geração de DCs de pacientes com câncer, com características fenotípicas e funcionais semelhante aquelas de doadores saudáveis. Embora com cautela, este dado poderia ser aceito como indicador da diminuição da produção de fatores capazes de induzir a diferenciação de DCs a partir de seus precursores nos pacientes. Assim, a diminuição da frequência de DCs nos pacientes poderia ser também secundária a uma diminuição da frequência de células produtoras das citocinas GM-CSF, IL-4 e TNF- α , como os mastócitos, ou, eventualmente, a uma alteração “intrínseca” na produção das citocinas GM-CSF, IL-4 e TNF- α .

Além destes possíveis mecanismos que dificultariam a diferenciação, ainda há outros que parecem atuar na maturação das DCs. Uma deficiência na maturação e uma diminuição da longevidade de DCs foram descritas em células expostas *in vitro* a sobrenadante de cultura células neoplásicas (MAKARENKOVA *et al.*, 2003). Ocorrendo no microambiente tumoral, este fenômeno poderia contribuir, inegavelmente à perturbação da resposta imune anti-tumoral, uma vez que a apresentação por DCs imaturas parece ocasionar um desvio da resposta frente aos antígenos ali presentes, de uma resposta efetora para uma resposta de tolerância (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998). Tal fenômeno ocorrendo, provocaria uma alteração significativa nas maneiras de abordar o sistema imune de portadores de

neoplasias, uma vez que seria muito diferente tentar induzir uma resposta imune contra antígenos ainda não apresentados apropriadamente de tentar modificar uma resposta imune desviada para tolerância no sentido de uma resposta “efetora”, dirigida à eliminação do estímulo antigênico.

Considerando, portanto, a importância das DCs na indução da resposta imune contra os Ags tumorais e do padrão desta resposta, e o microambiente como importante fator no desenvolvimento dessas células, desenvolveu-se este estudo. Nele se procurou caracterizar o microambiente tumoral, não só quanto a frequência de DCs e macrófagos, mas também da presença de fatores conhecidos por influenciar sua diferenciação no tecido, assim como no estado de maturação das DCs.

2 OBJETIVOS

Considerando o microambiente tumoral como fator determinante na indução de imunidade contra tumores, o presente projeto se propôs a investigar possíveis mecanismos capazes de determinar o perfil de diferenciação intra-tumoral de precursores de macrófagos e DCs nestes dois tipos celulares, assim como o estado de maturação das DCs intra-tumorais. Especificamente pretendeu-se, em tecido pulmonar não-acometido por neoplasia e em neoplasias do mesmo indivíduo, analisar:

- A presença, *in situ*, de macrófagos (células CD68+), DCs imaturas (células CD1a+ e S-100+) e mastócitos (azul de toluidina+) ;
- A presença/produção das citocinas IL-4 e TNF- α *in situ* e IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF, M-CSF e TNF- α em sobrenadante de culturas celulares destes tecidos;
- A presença e frequência, por citometria de fluxo, de células positivas para as moléculas de membrana CD1a, CD11c, CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, CD123, CCR7 e HLA-DR;
- A correlação entre o perfil de citocinas e de mastócitos encontrados nos tecidos com a frequência de DCs e macrófagos nos mesmos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Para a realização do estudo em amostras de tecidos fixados em blocos de parafina (*in situ*), a casuística foi composta por 15 pacientes e para o estudo dos tecidos frescos, de outros 17 pacientes, selecionados do Hospital A.C Camargo, tendo preenchido os seguintes critérios:

- Pacientes portadores de carcinoma pulmonar primário de células não pequenas (NSCLC);
- Pacientes submetidos à cirurgia para remoção desta neoplasia;
- Pacientes que concordaram previamente com sua inclusão no estudo, assinando termo de consentimento (Anexo 1).

Nos 15 pacientes do estudo *in situ*, a frequência de DCs e macrófagos, bem como a presença das citocinas IL-4 e TNF- α foi investigada por análise imunohistoquímica a partir de tecidos conservados em blocos de parafina. Nos 17 pacientes, nos quais foi estudado tecido fresco, a frequência de DCs e macrófagos foi analisada por citometria de fluxo, e a presença de citocinas detectada por ensaio imunoenzimático (ELISA), em sobrenadantes de culturas celulares obtidas após digestão enzimática de fragmentos de tecido pulmonar ou neoplásico depois de 48 horas de cultivo.

3.2 Amostras teciduais

Para a análise imunohistoquímica, blocos de parafina contendo tecidos tumorais de 15 pacientes selecionados foram obtidos dos arquivos do laboratório de patologia do Hospital A.C Camargo. A partir de cada bloco, foram obtidos cortes de 5 μ m de espessura e postos em lâminas previamente preparadas com organossilano

(Star Frost®) para análise imunohistoquímica. Um dos cortes foi utilizado para a confecção de uma lâmina, corada por azul de toluidina, para quantificação de mastócitos.

Para a realização do estudo em tecidos frescos, foram utilizados fragmentos do tumor e de tecido pulmonar do mesmo paciente, porém sem acometimento por neoplasia (explantes), que foram obtidos durante cirurgia para remoção de tumores primários de pacientes do mesmo hospital e obedecendo aos mesmos critérios já descritos.

3.3 Análise imunohistoquímica e histoquímica

Secções representativas de tecido pulmonar ou neoplásico foram selecionadas por um patologista e a expressão das citocinas IL-4 e TNF- α , bem como dos marcadores CD68 (marcador de macrófagos), CD1a e proteína S-100 (marcadores de DCs imaturas) foi avaliada com o auxílio da técnica imunohistoquímica da streptoavidina-biotina-imunoperoxidase. A presença de mastócitos nos cortes foi avaliada por coloração com azul de toluidina. Os cortes de 5 μ m de espessura foram estendidos em lâminas preparadas com adesivo à base de 3-aminopropil-trietoxi-silano. Inicialmente, os cortes foram incubados por 24 horas em estufa a 55 °C e depois desparafinados em três banhos de xilol, a 60 °C, 55 °C e à temperatura ambiente, durante 60, 30 e 20 minutos, respectivamente. A seguir, os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol, seguidos por lavagens em água corrente. Uma lâmina de cada caso (Tecido pulmonar e neoplásico) foi corada com azul de toluidina para a detecção de mastócitos. As demais seções teciduais foram submetidas, a seguir, à recuperação antigênica utilizando-se panela de pressão (calor úmido) em solução de tampão citrato 10

mM/pH= 6,0 (NORTON *et al.*, 1994). Posteriormente, foi feito o bloqueio da peroxidase tecidual endógena por meio de três passagens de 15 minutos em solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes. Em seguida, os cortes foram submetidos à incubação com os anticorpos primários, anti-IL-4 (R & D Systems, policlonal), TNF- α (R & D Systems, policlonal), CD1a (Santa Cruz, monoclonal # CTB6) CD68 (Dako, monoclonal # PG-M1) e proteína S-100 (Dako, policlonal), por 24 horas. Os anticorpos foram diluídos em solução salina tamponada com fosfatos pH= 7,2 (PBS) com 1% de albumina sérica bovina, em câmara úmida a 4 °C. Depois de três lavagens em PBS, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário de cabra anti-espécie biotinilado, em solução pronta para uso (LSAB) (Dako; CA, USA). As seções teciduais foram lavadas novamente três vezes em tampão PBS pH= 7,2 por 5 minutos. Logo depois, foi aplicado o complexo streptoavidina-biotina-peroxidase em solução pronta para uso (Dako, CA, USA), durante 30 minutos em câmara úmida a 37 °C. Para a revelação da reação foi utilizada a solução de diaminobenzidina (Sigma) diluída em PBS (12,5 mg de diaminobenzidina para cada 12,5 mL de PBS). Após a revelação, as lâminas foram tratadas em água corrente e contra-coradas com hematoxilina.

3.4 Análise quantitativa dos marcadores

As células positivas para os marcadores CD1a, CD68 e S-100 foram contadas em cinco campos selecionados com aumento total de 100x (objetiva com aumento de 10x e ocular de 10x). Nos cortes corados com azul de toluidina para detecção de mastócitos, as células positivas foram contadas em cinco campos selecionados com aumento total de 200x (objetiva com aumento de 20x e ocular de 10x). A média do número de células obtida da contagem dos cinco campos foi utilizada para a análise

estatística. Para a avaliação da produção de IL-4 e TNF- α , foi utilizada a análise morfométrica: para tal análise foi utilizada, acoplada ao microscópio óptico, uma lente ocular especial com um retículo. Como ilustrado pela figura 1 esse retículo era composto por 100 pontos e 50 linhas. Foram contados os pontos que continham células positivas para o marcador em questão, em 10 campos com aumento total de 400x. O resultado foi expresso como porcentagem de pontos positivos, que corresponde ao número de pontos no retículo, com células positivas para o marcador analisado, dividido pelo número total de pontos que cobrem o tumor.

Dias após a contagem, algumas lâminas de cada marcador foram escolhidas aleatoriamente e recontadas para confirmação da contagem inicial.

O processamento das amostras teciduais por imunohistoquímica ou histoquímica, bem como a leitura das lâminas, foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo com o auxílio de patologistas e técnicos do mesmo. Já a análise morfométrica para IL-4 e TNF- α foi realizada no laboratório de Imunohistoquímica do departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) em colaboração com a Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi.

Figura 1 – Lente Reticular Contendo 100 pontos e 50 retas.

3.5 Obtenção das células tumorais

Fragmentos tumorais (explantes) foram obtidos durante cirurgia para remoção de tumores primários. Estes fragmentos foram colocados imediatamente em meio de cultura estéril (RPMI 1640), contendo antibióticos e antimicóticos e transportados para o laboratório. No laboratório, os espécimes tumorais foram recortados com uso de bisturi, em fragmentos de no máximo 1 mm³. Estes foram então, submetidos à digestão por collagenase (tipo VIII, 0,056 mg/mL) em 10 mL de meio RPMI 1640 por grama de tecido a 37 °C por 120 minutos. As suspensões celulares assim obtidas foram filtradas em gaze, para remoção dos restos de tecido e depois foram mantidas em cultura em meio R-10 (RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino) em estufa a 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂ e saturada de água.

3.6 Avaliação do fenótipo de membrana por citometria de fluxo

Para determinação de seu fenótipo de membrana, as células obtidas da preparação acima descrita 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), CD40 (molécula co-estimuladora), CD80 (molécula co-estimuladora), CD83 (marcador de DC ativada/madura), CD86 (molécula co-estimuladora), CD123 (marcador de DC plasmocitóide), CCR7 (receptor para quimiocinas expressas em órgãos linfóides secundários – presente em DCs ativadas) e HLA-DR (molécula codificada por genes do MHC de classe II). Após a contagem em câmara de Neubauer, as células (2×10^5) foram colocadas em tubos cônicos de 1,5 mL e centrifugadas por 30 segundos a 17946 G, a 4 °C. Foi então, adicionado o anticorpo específico em concentração apropriada para o marcador de interesse e os tubos incubados por 20 minutos no gelo e ao abrigo de luz. Após este período, os tubos foram novamente centrifugados e as células lavadas três vezes com 300 µL/tubo de tampão para citometria (solução salina tamponada com fosfatos (PBS) – pH= 7,2, contendo 0,5% de soroalbumina bovina e 0,02% de azida sódica). Após estas lavagens, as células foram ressuspensas em 200µL de tampão para citometria e analisadas no citômetro (FACScalibur), utilizando-se o “software” CellQuest (BD) ou WinMDi (Purdue University, EUA - www.purdue.edu). As células com morfologia linfocitária (linfócitos B, T e NK) foram excluídas da análise pelo “side scatter” (SSC), ou seja, pela granulosidade, tipo de estrutura e complexidade interna e pelo “forward scatter” (FSC), ou seja, pelo tamanho relativo, como se pode depreender dos gráficos abaixo (figura 2) mostrando as janelas de aquisição e análise.

Figura 2 – Dot Plots mostrando a população celular selecionada para análise dos marcadores fenotípicos de DCs e macrófagos.

3.7 Detecção de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

Após digestão enzimática dos tecidos pulmonares, acometidos ou não por neoplasia, as suspensões celulares resultantes do processamento foram mantidas em cultura (1×10^6 células/mL) durante 48 horas em estufa a 37 °C com atmosfera contendo 5% de CO₂ e saturada de água. As dosagens de IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF, M-CSF e TNF- α desses sobrenadantes foram realizadas por ELISA, utilizando os kits Opteia para citocinas (BD). Neste método, placas de 96 poços Maxisorp (Nalge Nunc international) foram sensibilizadas com 100 μ L/poço, de anticorpo de captura diluído em PBS, e incubadas por uma noite (“overnight”). Após 3 lavagens com 300 μ L/poço de tampão de lavagem para ELISA (Tween 20 diluído a 0,05% em PBS pH= 7,2), as placas foram bloqueadas com 300 μ L/poço de tampão de bloqueio (PBS pH= 7,2 acrescido de 10% de soro fetal bovino) por 2 horas à temperatura ambiente. Após 3 lavagens, as amostras foram incubadas por um período de 2

horas em temperatura ambiente. Para a curva-padrão das citocinas, foram incubadas duplicatas de 50 µL/poço das diluições seriadas (fator 2 de diluição) das citocinas recombinantes, conforme recomendações do fabricante. O período de incubação das amostras e da curva-padrão foi de 2 horas em temperatura ambiente. Após três lavagens foram adicionados 50 µL/poço do anticorpo de detecção, com incubação por 2 horas à temperatura ambiente. Novamente, a placa foi lavada três vezes, 50 µL/poço de estreptoavidina foram adicionados e houve nova incubação de 20 minutos, no escuro, em temperatura ambiente. Por fim, 50 µL/poço de H₂SO₄ (2N) foram adicionados para interromper a reação e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 450 nm.

3.8 Isolamento de células mononucleares

Para o isolamento de células mononucleares, 20 mL de produto de Câmaras de Leuco-Redução de indivíduos saudáveis doadores de plaquetas, foram diluídos em salina tamponada com fosfato (PBS) [NaCl 0,14 M; NaPO₄ 0,01%; pH= 7,2] na proporção de 1:1. As amostras foram colocadas em tubos plásticos cônicos de 50 mL sobre 12 mL de Ficoll-Paque e foram submetidas à centrifugação de 805 G por 30 minutos a 18 °C. A camada de células mononucleares formada foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur descartável, colocada em outro tubo juntamente com Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) e centrifugada a 290 G por 10 minutos. As células foram lavadas por mais 2 vezes a 200 e 160 G, nesta ordem, para eliminação das plaquetas. O “pellet” foi coletado, as células quantificadas e ressuspensas em meio R-10. A viabilidade celular foi avaliada por exclusão com Azul de Trypan (0,4% em PBS) 1:1.

3.9 Diferenciação de DCs e monócitos *in vitro* a partir de células mononucleares

As células mononucleares, obtidas com descrito anteriormente, foram enriquecidas para células aderentes por incubação em placas plásticas de 12 poços, na concentração de 5×10^6 células por poço, num volume final de 1 mL por poço. As células foram mantidas em estufa de CO₂ por 2h a 37 °C, para aderência. Após esse período, as células não-aderentes foram recolhidas e as aderentes cultivadas por 7 dias em estufa de CO₂ a 37 °C. Para diferenciação em DCs, as células foram cultivadas em meio R-10, acrescido de 50 ng/mL de IL-4 (Peprotech) e 50 ng/mL de GM-CSF (Peprotech). No quinto dia, as células foram estimuladas para maturação com 50 ng/mL de TNF- α (Peprotech), por mais dois dias.

Após sete dias, foram coletadas as células não-aderentes das culturas realizadas para diferenciação em DCs. As células foram, então, centrifugadas a 290 G, por 10 minutos e ressuspensas em meio R-10.

3.10 Separação de linfócitos T para ensaio proliferativo

3.10.1 Preparação das hemácias de carneiro

Para recuperar os linfócitos T dentre uma população celular, foram preparadas hemácias de carneiro para formação de rosetas com linfócitos T (SAXON *et al.*, 1976). Hemácias de carneiro foram colocadas em um tubo plástico estéril de 50 mL e centrifugadas a 900 G durante 10 minutos a 20 °C, e, 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-aminoethyl)-isothioronium bromide hydrobromide] (Sigma Chemical Co.) a fim de mudar a carga elétrica da superfície 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 μ m (Costar, Cambridge, MA), 8 mL de solução de 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 claro. As hemácias foram, então, ressuspensas em R-10 para se obter uma suspensão a 4 %.

3.10.2 Recuperação de linfócitos T

Uma suspensão de células mononucleares foi obtida como descrito no item 3.8, a partir de um volume de 20 mL de produto de Câmaras de Leuco-Redução de sangue periférico de doadores sadios. As células foram, então, incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C por 2 horas. Após esse período, as células não-aderentes foram retiradas e ajustadas para uma concentração máxima de 1×10^7 células/mL. Soro fetal bovino e hemácias de carneiro pré-tratadas com AET (preparação AET-SRBC), como descrito anteriormente, foram adicionados numa proporção de 2 : 1: 2. A solução foi submetida a centrifugação a 200 G 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 (900 G, 4 °C, 35 minutos).

Após a centrifugação, os linfócitos T 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 290 G, durante 10 minutos a 20 °C.

3.11 Tratamento de sobrenadante de células tumorais P9 com anticorpo anti-CD83

Células tumorais do paciente 9 (P9), descritas por expressar a molécula CD83 de membrana (BALEEIRO *et al.*, 2007), foram mantidas em cultura (1×10^6 /mL) por 72 horas. Após esse período, o sobrenadante dessa cultura foi coletado e posto em placas de 96 poços (Maxisorb; Nunc), previamente recobertas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD83 humano (clone HB15a – Santa Cruz) ou IgG de camundongo (controle) (Santa Cruz). O sobrenadante (100 µL/poço) foi incubado por 4 h a 37 °C. Em seguida, o sobrenadante foi coletado, filtrado em filtros com poros de 0,22 µm (Costar, Cambridge, MA) e mantido a –80 °C até sua utilização.

3.12 Avaliação da atividade aloestimuladora das DCs

Para avaliar o efeito do meio de cultura de células tumorais estabelecidas do paciente 9 (P9), tratados ou não com anticorpo anti-CD83, sobre a proliferação de linfócitos T induzida por DCs alogênêicas, 1×10^4 DCs irradiadas (12,5 Gy) (células estimuladoras) foram co-cultivadas com linfócitos T alogênêicos na concentração de 2×10^5 células/mL (células respondedoras) em um volume final de 200 µL/poço. Ao volume final de 200 µL/poço havia sido adicionado 10, 20 ou 30% de meio de cultura de células P9, previamente tratados com anti-CD83 ou IgG (controle).

Os linfócitos foram incubados previamente em tampão PBS-BSA 0,1%, contendo 5 μ M de CFSE (LYONS, 2000) à temperatura ambiente, no escuro, por 15 minutos. Após este período, as células foram lavadas 2 vezes em meio RPMI, suplementado com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas por 5 dias em estufa de CO₂, saturada de água, a 37 °C. Após esse período, as células foram marcadas com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8, incubadas por 20 minutos a 4 °C, lavadas 2 vezes em 300 μ L/tubo de tampão para citometria. Em seguida, o “pellet” foi ressuspenso em 200 μ L de tampão para citometria e as células analisadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur). Os dados obtidos foram analisados usando-se o “software” CellQuest (BD) ou WinMDi (Purdue University, EUA - www.purdue.edu).

3.13 *Análise estatística*

A análise estatística teve início com a determinação do padrão de distribuição dos dados nas amostras, pelo método de Kolmogorov-Smirnov. Quando a distribuição era normal (Gaussiana) foi utilizado um teste paramétrico, sendo o teste t pareado o escolhido para se verificar diferenças entre os tecidos neoplásico e não-neoplásico no mesmo indivíduo. Quando os dados não seguiam a distribuição normal, utilizamos um teste não paramétrico, sendo o teste Wilcoxon pareado o escolhido para comparar se havia diferenças entre os mesmos grupos. Em todas as análises, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$. Todos os testes foram realizados com o auxílio do programa Graphpad Software Prism 2.01.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo de amostras conservadas em blocos de parafina

4.1.1 Dados clínicos e demográficos dos pacientes selecionados para o estudo

Para a realização desta parte do presente projeto, foram obtidas, do arquivo de patologia do Hospital A.C. Camargo, amostras de tecido pulmonar ou neoplásico de 15 pacientes. Amostras de tecido pulmonar e neoplásico frescos de todos os pacientes incluídos neste estudo retrospectivo foram utilizadas no trabalho de doutorado de Luciene Barbosa Anselmo (*“Análise funcional de células dendríticas e seus precursores obtidos de pacientes portadores de neoplasias pulmonares”*). Parte dos resultados obtidos nesse estudo foi apresentada no *Keystone Symposia/Basic Aspects of Tumor Immunology* em 2005 (ANSELMO *et al.*, 2005). Dados clínicos e demográficos desses pacientes são apresentados na tabela 1. Foram 11 homens e 4 mulheres com idade variando entre 44 e 81 anos e com mediana de 69 anos. O exame histopatológico realizado no hospital de origem mostrou que seis pacientes portavam adenocarcinomas (ADE), outros seis, carcinomas epidermóides (CE) e três, carcinomas de grandes células (CGC). Destes pacientes, cinco eram fumantes, sete, ex-fumantes e três, não-fumantes. Os demais dados clínicos constam da tabela 1.

Tabela 1 – Dados clínicos e demográficos dos pacientes incluídos no estudo de amostras de arquivo.

Paciente	Idade	Sexo	Tabagismo	Diagnóstico	Estadio	Estadio Clínico
1	69	M	Ex-fumante	CGC	T2N2M0	3A
2	58	F	Não	CE	T2N0M0	1B
3	66	M	Não	CE	T1N2M0	3A
4	47	F	Não	ADE	T2N1M0	2B
5	81	M	Ex-fumante	CE	T4N1M0	3B
6	74	M	Ex-fumante	CE	T2N0M0	1B
7	73	M	Sim	CGC	T2N0M0	1B
8	75	M	Sim	CGC	T4N2M0	3B
9	45	F	Ex-fumante	ADE	T2N0M0	1B
10	70	M	Ex-fumante	ADE	T1N0M0	1A
11	74	M	Ex-fumante	ADE	T2N0M0	1B
12	44	M	Sim	CE	T3N0M0	2B
13	77	M	Sim	CE	T1N0M0	1A
14	65	F	Ex-fumante	ADE	T1N0M0	1A
15	64	M	Sim	ADE	T2N0M0	1B

M= masculino, F= feminino, ADE= adenocarcinoma, CE= carcinoma epidermóide, CGC= carcinoma de grandes células, classificação TNM onde T= tumor, N= comprometimento de linfonodos locais, M= metástases distantes.

4.1.2 Presença *in situ* de DCs imaturas (CD1a+ e S-100+), macrófagos (CD68+) e mastócitos (azul de toluidina+)

Para a identificação de DCs *in situ*, por análise imunohistoquímica, foram utilizados os marcadores CD1a e a proteína S-100. Assim, células que apresentavam coloração castanha quando marcadas com anti-CD1a ou anti-S-100, o suficiente para a distinção entre células positivas e negativas e morfologia compatível com a de DCs, ou seja, células alongadas e com dendritos, foram consideradas como tal. Em contrapartida, células positivas para CD68 e morfologia esférica, foram consideradas como sendo macrófagos. Para a contagem dos mastócitos, os cortes foram submetidos à coloração com azul de toluidina e foi considerada positiva a célula que apresentava coloração azul-arroxeadada intensa, com grânulos no citoplasma.

Na análise dos cortes para os marcadores CD1a, S-100 e CD68 foram observadas diferenças entre tecido pulmonar e neoplásico, não só em um mesmo indivíduo, como no grupo como um todo. As diferenças observadas para os três marcadores atingiram significância estatística. Encontramos DCs, tanto CD1a+ quanto S-100+ em maior frequência em tecido pulmonar neoplásico, na comparação com o tecido pulmonar não acometido por neoplasia (Tabela 2). No tecido pulmonar sem neoplasia, tanto as DCs CD1a+ quanto as S-100+ se localizavam predominantemente nos epitélios bronquiolares (Figuras 3A, 3C e 4A) ou em regiões próximas a esses epitélios, sendo raras em outras áreas, como no estroma, por exemplo. Assim, o número de DCs imaturas CD1a+ por campo (com aumento total de 100x) em tecido neoplásico variou de 0 a 151,0 células, com uma média, para os 15 pacientes, de 39,3, enquanto que em tecido pulmonar, a frequência dessas células variou de 0 a 52,6 células com uma média de 6,2 ($p= 0,0371$). De modo similar, as DCs imaturas S-100+ presentes no tecido neoplásico variou de 5,6 a 152,0 células/campo com uma média de 59,3, ao passo que no tecido pulmonar a frequência dessas células variou de 0 a 144,8 com uma média de 27,4 ($p= 0,0177$). Não foi observada correlação entre a densidade de DCs (tanto CD1a+ quanto S-100+) e tipo histológico ou estadio dos tumores.

Tabela 2 – Contagem de células positivas para as moléculas CD1a, S-100 e CD68, por análise imunohistoquímica, e mastócitos por análise histoquímica de fragmento pulmonar não-acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente. p obtido no teste t pareado.

Paciente	CD1a		S-100		CD68		Mastócitos	
	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico
1	0,6	77,4	46,8	117,6	151,0	400,0	0,0	0,0
2	19,2	32,4	97,4	101,8	204,6	538,6	3,8	9,8
3	0,0	92,8	0,0	152,0	128,6	152,0	0,2	2,0
4	-*	9,6	-*	15,2	-*	460,4	-*	1,0
5	52,6	-*	144,8	-*	217,2	-*	0,6	-*
6	1,0	0,2	6,2	12,0	145,8	188,6	0,0	0,2
7	-*	24,6	-*	6,8	-*	124,2	-*	0,4
8	-*	0,0	-*	34,6	-*	145,4	-*	0,0
9	1,0	3,0	12,6	137,2	223,2	228,0	0,0	0,8
10	0,0	120,0	0,0	128,8	96,4	227,4	0,0	0,0
11	0,0	0,0	0,2	5,6	198,4	495,4	0,4	4,4
12	0,0	0,0	1,0	33,4	50,0	53,4	0,0	0,0
13	0,2	151,0	4,8	20,0	185,2	471,4	0,4	2,0
14	0,0	-*	15,6	-*	88,6	-*	0,4	-*
15	0,0	0,0	0,0	6,0	380,0	400,0	0,0	0,0
Média	6,217	39,31	27,45	59,31	172,4	298,8	0,4833	2,938
Valor de p	0,0371		0,0177		0,0108		0,0532	

*material não disponível

Figura 3 – Detecção de células CD1a+ (DCs imaturas) por imunohistoquímica em tecido pulmonar não comprometido por neoplasia (A e C), e em tecido pulmonar neoplásico (B e D). Aumento de 100x.

Figura 4 – Detecção de células S-100+ (DCs imaturas) por imunohistoquímica em tecido pulmonar não comprometido por neoplasia (A) e em tecido pulmonar neoplásico (B). Aumento de 100x.

Assim como as DCs (CD1a+ e S-100+), os macrófagos (CD68+) estavam presentes em maior frequência no tecido neoplásico (variando de 53,4 a 538,6 células, com uma média de 298,8 versus uma variação de 50,0 a 380,0 com uma média de 172,4 em tecido pulmonar; $p = 0,0108$). É interessante observar ainda que, a frequência de células CD68+ em adenocarcinomas foi mais alta que em carcinomas epidermóides ($p = 0,0048$). Além disso, quanto aos macrófagos presentes no segmento pulmonar sem neoplasia, pudemos observar que, ao contrário do que ocorre com as DCs, cuja distribuição se dá quase que exclusivamente nos epitélios bronquiolares, a distribuição dos macrófagos não se restringe a um único local, se estendendo desde os espaços alveolares até o estroma pulmonar, com padrões muito heterogêneos, por vezes na mesma lesão (Figura 5).

Figura 5 – Detecção de células CD68+ (macrófagos) por imunohistoquímica em tecido pulmonar não comprometido por neoplasia (A e C), e em tecido pulmonar neoplásico (B e D). Aumento de 100x.

A identificação de mastócitos nos cortes de tecido foi realizada pela coloração histoquímica com azul de toluidina, sendo considerada positiva a célula que apresentava coloração azul-arroxeadada intensa com grânulos no citoplasma (Figura 6).

Verificou-se pequeno número de mastócitos, tanto em cortes de tecido pulmonar como nas secções de tecido neoplásico (Tabela 2). Embora os segmentos neoplásicos tenham apresentado maior número de mastócitos, a diferença não atingiu significância estatística ($p= 0,0532$), o que poderia ser atribuído ao número limitado de casos.

Figura 6 – Detecção de mastócitos (setas) por coloração histoquímica com azul de toluidina em tecido pulmonar não comprometido por neoplasia (A), e em tecido pulmonar neoplásico (B). Aumento de 200x, mas (A) com aproximação eletrônica adicional, para melhor identificação da morfologia da célula.

4.1.3 Produção *in situ* de IL-4 e TNF- α

Para a detecção de imunopositividade para IL-4 e TNF- α , células (leucócitos) que apresentavam coloração alaranjada, semelhante ao controle positivo (Figura 7 para IL-4 e Figura 9 para TNF- α) foram consideradas positivas.

Para a IL-4, pudemos constatar uma grande variação no número de células positivas entre os indivíduos estudados, sobretudo para o tecido neoplásico. Enquanto a variação em tecido pulmonar foi de 2,8 a 12,6% de pontos positivos com média de 7,8%, a variação constatada no segmento neoplásico foi de 0 a 21% de pontos positivos com média de 6,1%. Essa diferença na frequência de células produtoras de IL-4 entre os dois tecidos, com o tecido pulmonar superando o neoplásico no número de células positivas, foi estatisticamente significativa ($p=0,0025$).

Figura 7 – Coloração por imunohistoquímica para a detecção de IL-4 em cortes de tecidos. Em (A) é mostrada uma secção de linfonodo, utilizado como controle negativo da reação, cujo processamento não foi adicionado o anticorpo anti-IL-4 e em (B e C) são mostrados cortes de linfonodo, conhecido por expressar essa citocina, sendo utilizados como controle positivo da reação, cujo processamento foi adicionado o anticorpo anti-IL-4. Aumento de 100x.

Tabela 3 – Análise morfométrica de células positivas para IL-4 e TNF- α ; Média de pontos positivos, em porcentagem, obtida de contagem em 10 campos com aumento de 400x. O resultado é expresso como porcentagem de pontos positivos, que corresponde ao número de pontos com células positivas para o marcador analisado, dividido pelo número total de pontos que cobrem o tumor.

Paciente	IL-4		TNF- α	
	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico
1	2,8	0	6,7	17,0
2	6,1	4,5	22,8	30,8
3	6,9	3,5	9,7	75,2
4	-*	5,3	-*	16,8
5	6,2	-*	15,9	-*
6	6,2	3,6	7,7	28,4
7	-*	21,0	-*	34,6
8	-*	0,1	-*	37,1
9	12,3	9,9	15,1	31,4
10	10,1	0,9	8,0	91,9
11	8,4	7,5	18,2	41,9
12	8,8	2,2	16,2	3,0
13	12,6	6,3	16,4	55,5
14	4,1	-*	6,8	-*
15	-*	14,1	-*	26,6
Média	7,8	6,1	12,8	37,7
Valor de p	0,0025		0,0228	

*material não disponível

Figura 8 – Carcinoma de células não-pequenas de pulmão. Visão panorâmica do denso infiltrado de mononucleares peri- e intra-tumoral (A). Detalhe da expressão imunohistoquímica da IL-4 (setas) pelos linfócitos (B e C). Parênquima pulmonar adjacente ao tumor – Note a expressão da IL-4 pelos macrófagos alveolares. Imunohistoquímica: A) Aumento de 40x; B e C) 100x; D) 400x.

Quanto a frequência de células positivas para o TNF- α , os valores variaram de 6,7 a 18,2% de pontos positivos com média de 12,8% para o tecido pulmonar e, de 3,0 a 91,9% de pontos positivos com média de 37,7% para o tecido neoplásico. Essa diferença na frequência de células produtoras de TNF- α entre os dois tecidos, com o tecido neoplásico superando o pulmonar, foi estatisticamente significativa ($p=0,0228$). Todos esses valores constam da tabela 3.

Figura 9 – Coloração por imunohistoquímica para a detecção de TNF- α em cortes de tecidos. Em (A) é mostrada uma secção de amígdala, utilizado como controle negativo da reação, cujo processamento não foi adicionado o anticorpo anti-TNF- α e em (B e C) são mostrados cortes de amígdala e carcinoma de mama, respectivamente, conhecidos por expressar essa citocina, sendo utilizados como controles positivos da reação, cujo processamento foi adicionado o anticorpo anti-TNF- α . Aumento de 100x.

Figura 10 – Carcinoma de células não-pequenas de pulmão. Expressão imunohistoquímica de TNF- α em macrófagos e linfócitos intra-tumorais (setas) (A e B) e presentes no parênquima pulmonar adjacente (setas) (C e D). Aumento de 400x.

4.2 Estudo de amostra frescas

4.2.1 Dados clínicos e demográficos dos pacientes incluídos no estudo

Para a realização desta parte do projeto, foram obtidas, durante cirurgia para remoção de tumores primários de pacientes do Hospital A.C. Camargo, amostras de tecido pulmonar ou neoplásico fresco de 17 pacientes. Dados clínicos e demográficos desses pacientes são apresentados na tabela 4. Foram estudados 7 homens e 9 mulheres com idade variando entre 43 e 83 anos e com mediana de 62 anos. O exame histopatológico realizado no hospital de origem mostrou que oito pacientes portavam adenocarcinoma (ADE), um, carcinoma adenóide cístico (CAC), outros três, carcinoma epidermóide (CE), um, carcinoma de grandes células (CGC), um, carcinoma neuroendócrino (CN), um com tumor carcinóide (TC) e um foi diagnosticado apenas como carcinoma pulmonar de células não-pequenas (NSCLC). Outro paciente, o paciente 2 não apresentou carcinoma pulmonar primário e sim, metástase para o pulmão e, portanto, seus dados não foram colocados na tabela. Ainda, dos pacientes incluídos nesse estudo, três são fumantes, seis ex-fumantes e sete não fumantes. Os demais dados clínicos constam da tabela 4.

Tabela 4 – Dados clínicos e demográficos dos pacientes incluídos no estudo de amostras frescas.

Paciente	Idade	Sexo	Tabagismo	Diagnóstico	Estadio	Estadio Clínico
1	81	M	Ex-fumante	CE	T1N0M0	1 A
2*	-	-	-	-	-	-
3	58	M	Ex-fumante	CN	T2N0M0	1 B
4	62	F	Ex-fumante	NSCLC	T2N0M0	1 B
5	58	M	Ex-fumante	CE	T4N2M1	4
6	70	M	Sim	ADE	T2N2M0	3 A
7	83	M	Ex-fumante	CGC	T2N0M0	1 B
8	68	M	Sim	ADE	T1N1M0	2 A
9	49	F	Não	ADE	T1N1M0	2 A
10	62	F	Não	ADE	T4N1M1	4
11	52	F	Não	ADE	T1N0M0	1 A
12	43	F	Ex-fumante	CAC	T2N0M0	1 B
13	62	F	Não	ADE	T2N2M0	3 A
14	78	F	Não	ADE	T1N0M0	1 A
15	63	F	Não	TC	T1N0M0	1 A
16	82	M	Sim	CE	T2N0M1	4
17	50	F	Não	ADE	T2N1M1	4

M= masculino, F= feminino, ADE= adenocarcinoma, CAC= carcinoma adenóide cístico, CE= carcinoma epidermóide, CGC= carcinoma de grandes células, CN= carcinoma neuroendócrino, NSCLC= carcinoma pulmonar de células não-pequenas, TC= Tumor Carcinóide, classificação TNM onde T= tumor, N= comprometimento de linfonodos, M= metástases distantes.

* = paciente com metástase pulmonar, sem diagnóstico de carcinoma primário de pulmão.

4.2.2 Peso e rendimento celular dos fragmentos teciduais

Após a coleta, os fragmentos teciduais foram transportados até o laboratório, pesados e submetidos à digestão enzimática. A figura 11 mostra o peso desses fragmentos e a figura 12, o rendimento celular obtido da digestão dos mesmos.

Figura 11 – Peso (g) dos fragmentos pulmonares não-acometidos por neoplasia ou acometidos, respectivamente. p obtido no teste t pareado. O traço indica a média.

Figura 12 – Rendimento celular, representado pelo número de células viáveis/grama obtidas a partir dos fragmentos pulmonares não-acometidos ou acometidos por neoplasia, respectivamente, após digestão enzimática dos mesmos. p obtido no teste t pareado. O traço indica a média.

O peso dos fragmentos teciduais variou de 0,22 g a 3,55 g para o segmento pulmonar e os fragmentos neoplásicos variaram de 0,21 g a 1,70 g, não tendo diferença estatisticamente significativa. O número de células viáveis dos espécimes cirúrgicos teve variação de $4,8 \times 10^6$ a 380×10^6 para os tecidos provenientes do

pulmão não-acometido por tumor contra uma variação de $1,8 \times 10^6$ a 270×10^6 para os tecidos tumorais, não atingindo, também, diferença estatisticamente significativa. De igual modo, o rendimento celular dado pela relação entre o número de células/peso do tecido não diferiu entre os dois tecidos, variando de $6,9 \times 10^6$ a $376,2 \times 10^6$ células/g para o tecido pulmonar contra uma variação de $17,6 \times 10^6$ a $262,1 \times 10^6$ células/g para o tecido neoplásico.

4.2.3 Fenótipo de membrana das células do tecido pulmonar ou neoplásico

Os pacientes foram analisados quanto a frequência de células positivas para as moléculas de superfície CD1a, CD11c, CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, CD123, CCR7 e HLA-DR por citometria de fluxo, em células provenientes de tecido pulmonar acometido e não-acometido por neoplasia pulmonar primária. Para a maioria dos pacientes estudados foram feitas triplas marcações, com as seguintes combinações de anticorpos: CD14 CD80 CD86, CD11c CD14 CD123, CCR7 CD40 CD86, CD1a CD83 CD86, HLA-DR CD83 CD123 e HLA-DR CD11c CD14. Após a aquisição do anticorpo anti-BDCA-2 (Miltenyi Biotec), específico para caracterização da subpopulação de DCs plasmocitóides (DEMEDTS *et al.*, 2005), acrescentamos ainda, as seguintes combinações: BDCA-2 HLA-DR CD11c e BDCA-2 CD11c CD123.

Como mencionado no item Material e Métodos, todas as amostras submetidas à citometria de fluxo foram analisadas dentro do “gate” R2, conforme ilustrado na figura 13 abaixo, pois dessa forma, excluímos os linfócitos da análise.

Figura 13 – Density Plots mostrando expressão de CD4 e CD8 em células do “gate” R1 (à esquerda) e R2 (à direita) em tecido neoplásico. Notar que os linfócitos T (tanto CD4 quanto CD8) estão localizados predominantemente na região de células pequenas e pouco granulosas (R1).

Na análise inicial foi feito um “gate” (dentro do “gate” R2 mostrado na figura 13), selecionando duas populações, CD14⁺ e CD14⁻ e, nessas duas populações foi analisada a expressão de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) e também, de moléculas indicativas de subpopulações de DCs (mielóides: CD11c⁺ CD123⁻; plasmocitóides: CD11c⁻ CD123⁺). A média da porcentagem de expressão de células CD14⁺ no pulmão sem tumor foi de 9,1% e no pulmão com tumor, de 11,4%, não atingindo diferença estatisticamente significativa ($p= 0,2763$). De igual modo, a frequência de células CD14⁻ não diferiu entre os tecidos analisados. Para essa

análise, o tecido sem tumor apresentou uma média de 90,9% de células CD14- contra 88,6% no tecido com tumor ($p= 0,2763$). Os resultados são mostrados nas tabelas 5-7 e nas figuras 14-28.

Quanto à porcentagem de células expressando os demais marcadores de superfície analisados, pudemos notar, em quase todos os pacientes estudados, diferenças no número de células positivas, quando comparamos, no mesmo indivíduo, tecido pulmonar e tecido neoplásico. De acordo com a porcentagem de células positivas para cada marcador, pudemos estratificar os pacientes em três grupos: 1- onde havia porcentagem equivalente de células positivas para o marcador em ambos os tecidos; 2- onde o tecido pulmonar apresentava maior número de células positivas; 3- onde o tecido neoplásico continha a maior porcentagem de células positivas para o marcador em questão. As tabelas 5-7 mostram os resultados obtidos.

Tabela 5 – Porcentagem de células positivas para as moléculas de membrana CD1a, CD11c, CD14 e CD40, por análise citofluorimétrica de produto de digestão enzimática do fragmento pulmonar não-acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente. p obtido no teste t pareado.

Paciente	CD1a+		CD11c+		CD14+		CD40+	
	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico
1	5,5	2,5	33,5	23,2	9,6	3,3	4,5	0,05
2*	-	-	-	-	-	-	-	-
3	5,1	5,6	49,0	43,4	18,0	55,0	2,4	0,9
4	-*	1,7	-*	36,9	-*	25,9	-*	1,7
5	2,9	50,3	35,5	81,7	24,8	25,1	1,3	14,6
6	0,7	12,0	5,4	6,4	7,5	1,3	0,4	0,9
7	3,4	19,8	28,9	10,3	24,2	24,5	3,0	8,3
8	0,9	0,5	16,0	10,3	3,9	11,8	0,2	0,3
9	27,0	2,9	23,0	14,0	5,1	5,5	2,0	2,0
10	37,0	84,0	31,0	19,0	11,0	19,7	3,0	5,9
11	60,5	38,5	7,0	11,0	3,0	4,0	1,0	2,0
12	3,4	19,5	1,4	1,6	1,2	2,2	0,5	1,1
13	25,5	18,9	25,7	23,2	13,4	16,3	7,7	3,1
14	13,2	24,2	3,8	20,1	1,2	11,0	1,6	2,6
15	39,8	6,0	1,9	-*	1,6	3,1	0,6	1,0
16	0	0	0	0	0	0	0	0
17	47,5	61,2	8,9	6,2	7,9	8,2	2,2	1,2
Média	16,5	21,1	18,1	20,5	9,1	11,4	1,9	2,9
Valor de p	0,3143		0,9786		0,2763		0,3402	

* não realizado

Tabela 6 – Porcentagem de células positivas para as moléculas de membrana CD80, CD83 e CD86, por análise citofluorimétrica de produto de digestão enzimática do fragmento pulmonar não-acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente. p obtido no teste t pareado.

Paciente	CD80+		CD83+		CD86+	
	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico
1	4,7	5,1	73,2	41,4	7,1	8,6
2*	-	-	-	-	-	-
3	19,7	33,7	61,0	79,9	9,6	10,7
4	-*	0,8	-*	84,6	-*	2,1
5	34,4	4,4	54,0	97,3	1,4	7,2
6	1,3	0,3	27,1	28,3	0,4	2,0
7	1,7	6,8	64,1	33,7	3,0	0,7
8	0,3	0,7	49,9	64,8	1,3	0,9
9	3,4	0,8	46,2	41,2	2,8	3,0
10	2,0	2,5	61,4	79,0	15,6	5,0
11	4,1	2,1	15,0	22,2	2,5	7,1
12	0,3	0,7	0	0	0,6	1,4
13	1,4	4,3	2,0	2,3	8,7	5,0
14	2,5	16,3	1,6	0,7	0,5	4,0
15	0,7	3,6	0,7	1,4	1,9	3,8
16	0,3	0	0	0	0,3	0
17	1,5	1,1	9,8	6,7	8,0	7,3
Média	5,2	5,2	29,6	36,3	4,2	4,3
Valor de p	0,9152		0,5517		0,8396	

* não realizado

Tabela 7 – Porcentagem de células positivas para as moléculas de membrana CD123, CCR7 e HLA-DR, por análise citofluorimétrica de produto de digestão enzimática do fragmento pulmonar não-acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente. p obtido no teste t pareado.

Paciente	CD123+		CCR7+		HLA-DR+	
	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico
1	34,5	11,4	24,2	9,5	61,7	45,4
2*	-	-	-	-	-	-
3	32,5	47,7	16,0	26,8	29,5	6,9
4	-*	37,3	-*	25,9	-*	8,2
5	7,3	38,1	22,1	17,2	32,2	93,5
6	12,8	1,9	27,9	0,5	28,0	4,6
7	42,9	47,2	47,1	19,7	17,2	50,4
8	10,4	2,3	6,5	7,8	14,5	9,3
9	10,9	1,7	27,2	32,0	60,0	76,2
10	3,0	6,7	2,4	1,0	37,7	49,0
11	4,5	2,7	10,0	8,5	10,2	17,1
12	2,1	16,6	0,8	1,1	11,2	28,1
13	7,8	6,2	9,8	4,8	38,5	19,9
14	0,6	3,8	1,1	5,6	4,4	15,1
15	32,6	-*	11,1	2,6	1,5	2,1
16	0	0	0	0	0	0
17	19,7	21,8	4,5	3,1	5,0	5,7
Média	14,6	15,6	14,0	10,4	23,5	27,1
Valor de p	0,8223		0,1181		0,4469	

* não realizado

De maneira semelhante ao que observamos na análise da porcentagem de células positivas para as moléculas de superfície em tecido pulmonar e neoplásico, na análise da intensidade de fluorescência das células positivas para os mesmos marcadores, foi possível observar a diferença entre os dois tecidos em um mesmo indivíduo. No entanto, mais uma vez essa diferença não foi estatisticamente significativa na análise conjunta dos dados. As tabelas 8-10 ilustram essa constatação.

Tabela 8 – Média de intensidade de fluorescência (MFI) das células positivas para as moléculas de membrana CD1a, CD11c, CD14 e CD40, por análise citofluorimétrica de produto de digestão enzimática do fragmento pulmonar não-acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente. p obtido no teste t pareado.

Paciente	CD1a+		CD11c+		CD14+		CD40+	
	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico
1	23,4	26,3	49,2	45,8	28,2	26,2	22,9	21,7
2*	-	-	-	-	-	-	-	-
3	25,0	22,2	60,1	50,8	25,5	24,5	28,2	21,3
4	-*	50,3	-*	97,6	-*	61,2	-*	55,0
5	34,1	19,3	126,1	43,4	39,5	11,0	42,7	13,0
6	2,9	4,0	6,3	11,9	3,1	3,7	2,9	3,8
7	8,3	4,3	8,6	6,4	9,4	4,0	6,6	3,9
8	24,3	22,2	45,6	45,9	15,9	28,3	16,0	24,3
9	19,5	12,9	16,8	47,0	9,8	11,9	10,1	9,8
10	33,4	121,7	61,2	171,9	17,1	25,1	15,3	17,4
11	68,2	58,0	37,9	62,2	18,6	23,3	15,5	21,6
12	36,3	28,5	47,4	38,9	41,1	42,2	37,7	38,1
13	40,4	48,1	60,4	69,1	20,3	29,3	19,8	23,4
14	319,6	88,4	111,0	146,9	75,1	52,1	88,2	55,6
15	232,0	27,6	69,5	-*	34,5	16,4	34,1	16,8
16	0	0	0	0	0	0	0	0
17	63,1	72,3	29,1	34,1	39,9	38,8	25,3	55,3
Média	62,1	37,9	48,6	58,1	25,2	24,9	24,4	23,8
Valor de p	0,2564		0,464		0,3762		0,5138	

* não realizado

Tabela 9 – Média de intensidade de fluorescência (MFI) das células positivas para as moléculas de membrana CD80, CD83 e CD86, por análise citofluorimétrica de produto de digestão enzimática do fragmento pulmonar não-acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente. p obtido no teste t pareado.

Paciente	CD80+		CD83+		CD86+	
	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico
1	27,4	34,4	84,2	46,2	24,7	26,2
2*	-	-	-	-	-	-
3	30,5	40,6	71,8	55,7	19,4	19,1
4	-*	53,0	-*	60,7	-*	73,4
5	87,2	10,5	38,8	58,2	61,8	13,8
6	3,3	4,2	8,9	29,6	4,7	12,7
7	9,8	8,6	18,2	12,1	5,8	6,6
8	33,3	28,8	49,2	59,3	27,4	24,9
9	12,4	12,3	16,1	28,5	9,7	24,3
10	19,3	20,8	23,1	31,5	38,5	35,6
11	22,7	20,5	25,9	40,3	26,0	35,6
12	32,2	27,1	0	0	68,9	52,1
13	19,9	25,4	29,7	25,1	36,7	30,8
14	85,8	55,8	75,4	54,6	65,6	97,7
15	53,9	23,3	31,2	16,5	31,6	18,8
16	18,0	0	0	0	21,0	0
17	30,4	38,9	38,6	41,3	54,5	51,1
Média	32,4	25,3	34,1	34,9	33,1	32,7
Valor de p	0,1451		0,8501		0,5083	

* não realizado

Tabela 10 – Média de intensidade de fluorescência (MFI) das células positivas para as moléculas de membrana CD123, CCR7 e HLA-DR, por análise citofluorimétrica de produto de digestão enzimática do fragmento pulmonar não-acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente. p obtido no teste t pareado.

Paciente	CD123+		CCR7+		HLA-DR+	
	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico	Tecido Pulmonar	Tecido Neoplásico
1	41,7	30,9	52,0	42,4	58,8	43,2
2*	-	-	-	-	-	-
3	40,9	51,7	145,1	77,2	31,5	25,1
4	-*	65,2	-*	79,7	-*	63,2
5	54,5	13,8	232,3	14,5	48,8	35,4
6	5,4	6,9	7,0	4,2	5,1	5,2
7	21,3	15,9	30,0	9,3	15,0	4,8
8	32,8	32,3	24,2	42,7	39,2	38,9
9	13,4	12,0	15,9	14,0	47,2	44,0
10	22,8	19,9	18,6	17,6	52,4	45,2
11	22,2	20,5	30,3	34,2	29,0	93,7
12	85,1	71,4	38,0	29,8	56,9	39,6
13	47,3	31,8	26,0	25,7	74,1	76,8
14	296,8	59,0	118,4	50,2	180,2	134,8
15	30,1	-*	110,6	23,8	36,8	17,0
16	0	0	0	0	0	0
17	35,4	41,4	28,9	35,9	59,5	82,0
Média	50,0	31,5	58,5	31,3	49,0	46,8
Valor de p	0,2100		0,0724		0,6032	

* não realizado

Figura 14 – Porcentagem de células CD80+ CD86+ dentro do “gate” CD14-, presentes no fragmento pulmonar não-acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente. p obtido no teste t pareado. O traço indica a média.

Figura 15 – Porcentagem de células CD80+ CD86- dentro do “gate” CD14-, presentes no fragmento pulmonar não-acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente. p obtido no teste t pareado. O traço indica a média.

Figura 16 – Porcentagem de células CD80- CD86+ dentro do “gate” CD14-, presentes no fragmento pulmonar não-acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente. p obtido no teste t pareado. O traço indica a média.

Figura 19 – Porcentagem de células CD80+ CD86+ dentro do “gate” CD14+, presentes no fragmento pulmonar não-acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente. p obtido no teste t pareado. O traço indica a média.

Figura 20 – Porcentagem de células CD80+ CD86- dentro do “gate” CD14+, presentes no fragmento pulmonar não-acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente. p obtido no teste t pareado. O traço indica a média.

Figura 23 – Porcentagem de células CD40+ CCR7+, presentes no fragmento pulmonar não-
acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente. p obtido no teste t
pareado. O traço indica a média.

Figura 24 – Porcentagem de células CD40+ CD86+, presentes no fragmento pulmonar não-
acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente. p obtido no teste t
pareado. O traço indica a média.

Figura 25 – Porcentagem de células CD40- CCR7+, presentes no fragmento pulmonar não-
acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente. p obtido no teste t
pareado. O traço indica a média.

Figura 28 – Porcentagem de células CD83+ CD123+, presentes no fragmento pulmonar não-acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente. p obtido no teste t pareado. O traço indica a média.

Conforme mencionado anteriormente, um de nossos objetivos era caracterizar fenotipicamente as células presentes no tecido pulmonar ou neoplásico e determinar a frequência de DCs e macrófagos. Desse modo, as células CD14- que apresentavam as moléculas HLA-DR e CD11c foram consideradas como DCs. Adicionalmente, as células negativas para CD14 e positivas para CD80 e/ou CD86 foram consideradas como DCs com capacidade co-estimuladora. Em contrapartida, as células CD14+ foram consideradas como sendo macrófagos/monócitos. Ainda, esses macrófagos (CD14+) foram agrupados em células com capacidade de co-estimulação, quando apresentavam uma ou as duas moléculas co-estimuladoras da família B7 (CD80/CD86) (Figura 19) e, em células sem capacidade de co-estimulação, quando não expressavam ambas as moléculas co-estimuladoras, com fenótipo CD14+CD80-CD86- (Figura 22).

As DCs (CD14-CD80+CD86+) estavam presentes em maior porcentagem no tecido pulmonar em relação ao neoplásico, com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0336$). Em contrapartida, as células CD14-CD80+CD86- e CD14-CD80-CD86+, embora estivessem em maior frequência em tecido pulmonar, essa

diferença não atingiu significância estatística ($p= 0,2015$ para CD14-CD80+ CD86-; $p= 0,4888$ para CD14-CD80-CD86+).

Assim, de maneira resumida, como podemos observar pelas figuras (15-28), quando comparamos apenas as médias de células expressando os marcadores, não notamos diferença estatisticamente significante entre pulmão não acometido por neoplasia e pulmão neoplásico. Por outro lado, diferenças são notadas ao se comparar, no mesmo indivíduo, não só a média de células expressando essas moléculas, mas também a intensidade de fluorescência das células positivas, no pulmão sem tumor e pulmão com tumor, como já foi mostrado nas tabelas 5-7 (porcentagem) e 8-10 (intensidade de fluorescência) para cada marcador. Os *dot plots* das figuras 29-33 também ilustram as diferenças entre os tecidos.

Figura 29 – Dot Plots mostrando expressão de HLA-DR CD11c em células CD14-, após digestão enzimática de tecido pulmonar não-acometido por neoplasia (A e C) ou neoplásico (B e D) do paciente 10 (A e B) e do paciente 11 (C e D).

Figura 30 – Dot Plots mostrando a expressão de CD80 CD86 em células CD14-, após digestão enzimática de tecido pulmonar não-acometido por neoplasia (A e C) ou neoplásico (B e D) do paciente 5 (A e B) e do paciente 10 (C e D).

Os *Dot Plots* exibidos acima mostram claramente, diferenças entre tecido não-acometido por neoplasia e neoplásico em um mesmo indivíduo. No pulmão sem tumor, há maior porcentagem de células com fenótipo de membrana compatível com o de DCs (CD14-CD11c+HLA-DR+), em relação ao pulmão acometido por neoplasia no paciente 10 (figura 29A e B), ao passo que no paciente 11 ocorre o oposto, ou seja, o tecido neoplásico com maior porcentagem de células CD14-CD11c+HLA-DR+ em relação ao tecido pulmonar (Figura 29C e D). Adicionalmente, há no pulmão

sem tumor, maior porcentagem de células portando moléculas co-estimuladoras (Figura 30A e B para CD80; Figura 30C e D para CD86). Em contrapartida, em outro paciente (Paciente 11) pudemos observar exatamente o oposto, ou seja, células que, fenotipicamente poderiam ser caracterizadas como DCs ativadas (HLA-DR+CD83+ ou CD1a+CD86+), presentes em maior quantidade no pulmão neoplásico na comparação com o segmento não-acometido por neoplasia (Figuras 31 e 32).

Figura 31 – Dot Plots mostrando a expressão de HLA-DR CD83 em células obtidas após digestão enzimática de tecido pulmonar não acometido por neoplasia (A) ou neoplásico (B) do mesmo paciente (Paciente 11).

Figura 32 – Dot Plots mostrando a expressão de CD1a CD86 em células obtidas após digestão enzimática de tecido pulmonar não acometido por neoplasia (A) ou neoplásico (B) do mesmo paciente (Paciente 11).

Ainda, neste mesmo paciente (Paciente 11) identificamos uma população celular ainda não descrita na literatura, células BDCA-2+HLA-DR+CD11c+ (Figura 33). Essa população está muito melhor representada no tecido pulmonar neoplásico que no pulmão sem tumor.

Figura 33 – Dot Plots mostrando a expressão de HLA-DR CD11c no “gate” BDCA-2+ em células obtidas após digestão enzimática de tecido pulmonar não-acometido por neoplasia (A) ou neoplásico (B) do mesmo paciente (Paciente 11).

4.2.4 Identificação de população celular CD83+

A presença, em elevada frequência, de células positivas para a molécula CD83 exigiu que se fizesse uma análise mais precisa dessa população em tecido pulmonar e neoplásico desses pacientes. Como pode ser observado nas figuras 34 e 35, é possível identificar uma população de células positivas para CD83 e

negativas para os outros marcadores de células mielóides e linfóides. Tal fenômeno pôde ser observado tanto em células de tecido pulmonar (Figura 34) quanto em células provenientes de tecido neoplásico (Figura 35).

Figura 34 – Expressão dos marcadores de células mielóides/linfóides CD1a, CD14, CD123, CCR7 e HLA-DR em células positivas para CD83, obtidas após digestão enzimática de tecido pulmonar não-acometido por neoplasia. Paciente 8.

Figura 35 – Expressão dos marcadores de células mielóides/linfóides CD1a, CD14, CD123, CCR7 e HLA-DR em células positivas para CD83, obtidas após digestão enzimática de tecido pulmonar neoplásico. Paciente 8.

Surpreendentemente, células tumorais do paciente 9, uma linhagem de adenocarcinoma pulmonar estabelecida em nosso laboratório, também expressaram a molécula CD83 (Figura 36).

Figura 36 – Expressão de CD83 em células tumorais do paciente 9 (P9). Essa linhagem tumoral de adenocarcinoma pulmonar foi estabelecida no laboratório por cultivo de células obtidas após digestão enzimática de tecido pulmonar neoplásico, em meio RPMI sem soro.

4.2.5 Efeito do sobrenadante de células tumorais P9 sobre a proliferação de linfócitos T induzida por DCs alogênêicas

Como pôde ser observado pela figura 36 células tumorais P9 expressam CD83 em sua membrana. Nossa hipótese era que essas células tumorais CD83+ pudessem secretar essa molécula no microambiente e prejudicar a resposta imune contra o tumor, tendo em vista que a molécula recombinante de CD83 é capaz de inibir a proliferação de linfócitos T induzida por DCs. Para testar esta hipótese, as células P9 foram cultivadas por 72 h, tendo tido após esse período seu sobrenadante coletado e submetido a incubação em placa recoberta com anticorpos anti-CD83, para remoção dessa molécula do meio, ou em placa recoberta com IgG de especificidade não-determinada. O sobrenadante foi então adicionado à co-

cultura de linfócitos T com DCs alógenêicas e após 5 dias, a proliferação dos linfócitos T foi avaliada (Figuras 37 e 38).

Figura 37 – Co-culturas de linfócitos (2×10^5) e DCs (1×10^4) em 10, 20 ou 30% de meio de cultura de células P9 após tratamento desse meio com anti-CD83 ou IgG (controle). Os linfócitos foram tratados com CFSE e sua proliferação avaliada pela diluição do marcador entre as células filhas. Primeiro, os linfócitos foram selecionados no “gate” R1 (A) e depois um segundo “gate” foi feito para análise da população de linfócitos T CD4+ em R2 (B no topo) e a diluição do corante nessa população é mostrada em C e D topo; a população de linfócitos T CD8+ foi selecionada em R3 (B inferior) e a diluição do CFSE nessa população é mostrada em C e D inferior. Em C e D são mostradas as porcentagens de linfócitos T que tiveram seu CFSE diluído após co-cultura com DCs em meio R-10 sem adição de meio de cultura de células tumorais P9 (controle). Co-culturas de linfócitos com DCs com 10% (E), 20% (F) ou 30% (G) de sobrenadante de células tumorais P9 tratados com anti-CD83 (E, F e G topo) ou IgG (E, F e G inferior) Histograma com preenchimento em vermelho = só linfócitos tratados com CFSE (controle); histograma vazio = linfócitos tratados com CFSE em co-cultura com DCs.

Figura 38 – Linfócitos foram tratados com CFSE e sua proliferação avaliada pela diluição do marcador entre as células filhas. p obtido no teste t. □= DCs + linfócitos T em meio R-10 (controle); Δ= DCs + linfócitos T em meio R-10 com 10, 20 ou 30% de sobrenadante de células tumorais P9; ○= DCs + linfócitos T em meio R-10 com 10%, 20% ou 30% de sobrenadante de células tumorais P9 tratado com anti-CD83. Barras= Erro Padrão da Média (S.E.M). n= 3.

Podemos notar que, de fato, houve um efeito inibidor na proliferação quando foi adicionado sobrenadante do tumor P9 tratado apenas com IgG (controle). Coerentemente, esse efeito inibidor diminuiu na presença de meio tratado com anti-CD83. Um efeito inibidor mais acentuado foi observado quando 20 ou 30% de meio de células tumorais eram adicionados às co-culturas.

4.2.6 Detecção, por ELISA, de citocinas em sobrenadante de cultura de células provenientes do tecido pulmonar ou neoplásico

Após digestão enzimática dos tecidos pulmonares, acometidos ou não por neoplasia, as suspensões celulares resultantes foram mantidas em cultura por 48 horas, nas condições descritas no “Material e Métodos”. Em seguida, o sobrenadante da cultura foi coletado e submetido a ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção das citocinas IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF, M-CSF e TNF- α . Os resultados são apresentados nas figuras 39-44.

IL-4

Figura 39 – Concentração de IL-4 no sobrenadante de células obtidas após digestão enzimática de fragmentos pulmonares não-acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente e mantidas em cultura por 48 horas. p obtido no teste t pareado. O traço indica a média. A linha tracejada corresponde ao limite de detecção da citocina no ensaio realizado.

IL-6

Figura 40 – Concentração de IL-6 no sobrenadante de células obtidas após digestão enzimática de fragmentos pulmonares não-acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente e mantidas em cultura por 48 horas. p obtido no teste t pareado. O traço indica a média. A linha tracejada corresponde ao limite de detecção da citocina no ensaio realizado.

Figura 42 – Concentração de GM-CSF no sobrenadante de células obtidas após digestão enzimática de fragmentos pulmonares não-acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente e mantidas em cultura por 48 horas. p obtido no teste t pareado. O traço indica a média. A linha tracejada corresponde ao limite de detecção da citocina no ensaio realizado.

Figura 43 – Concentração de M-CSF no sobrenadante de células obtidas após digestão enzimática de fragmentos pulmonares não-acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente e mantidas em cultura por 48 horas. p obtido no teste Wilcoxon pareado. A linha tracejada corresponde ao limite de detecção da citocina no ensaio realizado.

TNF- α

Figura 44 – Concentração de TNF- α no sobrenadante de células obtidas após digestão enzimática de fragmentos pulmonares não-acometido por neoplasia ou neoplásico respectivamente e mantidas em cultura por 48 horas. p obtido no teste t pareado. O traço indica a média. A linha tracejada corresponde ao limite de detecção da citocina no ensaio realizado.

Embora na maioria dos casos analisados tenhamos constatado diferenças entre tecido pulmonar e neoplásico, em um mesmo indivíduo quanto à produção das citocinas, essa diferença não pôde ser confirmada pela análise estatística realizada. Uma possível explicação para que não se atingisse diferença estatística significativa é o pequeno número de casos analisados. É interessante notar também que, para todas as citocinas analisadas, houve vários casos de produção de citocina abaixo do limite de detecção para os kits de análise utilizados nesses ensaios. Nesse sentido, merece especial destaque o M-CSF, cuja produção ultrapassou o limite de detecção em apenas uma amostra, de tecido neoplásico.

Para a IL-4 apenas três amostras de tecido pulmonar e outras duas de tecido neoplásico produziram a citocina (Figura 39).

Em relação a IL-6, foi possível detectar sua produção em quinze de dezesseis amostras de tecido pulmonar contra apenas doze de quinze amostras do tecido neoplásico estudados. Neste estudo observamos que em dez pacientes houve maior produção dessa citocina em tecido neoplásico, enquanto em outros quatro pacientes

observou-se o oposto, ou seja, o tecido pulmonar produzindo IL-6 em quantidade superior ao tecido neoplásico. Embora houvesse um número maior de casos de produção dessa citocina por células de tecido neoplásico, a diferença não atingiu significância estatística ($p= 0,0592$).

Em células provenientes de tecido pulmonar, a presença de IL-10 só pôde ser detectada em seis dos dezesseis pacientes estudados, ao passo que no tecido neoplásico pudemos detectá-la em nove de quinze casos analisados. É interessante notar, ainda, que em sete casos houve maior produção dessa citocina por células provenientes de tecido neoplásico em comparação ao tecido livre de neoplasia, contra apenas três, nos quais o tecido pulmonar superava o neoplásico na produção de IL-10. Entretanto, na análise global da produção desta citocina, a diferença encontrada entre os dois tecidos não foi significativa ($p= 0,0922$).

Quanto ao GM-CSF, pudemos detectar sua presença em sobrenadante de células provenientes de tecido pulmonar em cinco dos dezesseis pacientes analisados. Já no segmento neoplásico, sua detecção foi possível em outros seis pacientes.

Em relação ao M-CSF, só pôde ser detectada sua produção, e em pequena quantidade, no sobrenadante de cultura de células provenientes do tecido tumoral de um único paciente.

No que se refere à produção de $\text{TNF-}\alpha$, pudemos detectar sua presença em sobrenadante de células de tecido pulmonar de apenas cinco pacientes, ainda assim, em quantidades muito baixas, comparáveis ao último ponto de nossa curva. De modo similar, pudemos detectar a presença de $\text{TNF-}\alpha$, em sobrenadante de cultura de células de tecido neoplásico, em apenas quatro casos.

5 DISCUSSÃO

Em nosso trabalho, estudamos o microambiente dos carcinomas pulmonares de células não-pequenas. Isto foi feito por duas abordagens distintas: a abordagem *in situ*, por meio de análise imunohistoquímica da presença de células e citocinas, em cortes de tecido pulmonar e neoplásico, e a análise de populações celulares dissociadas de amostras de tecido fresco, após cirurgia para remoção desses tumores. Nossos resultados mostram que, de fato, a neoplasia afeta a distribuição celular, os tipos celulares estudados e as citocinas presentes no microambiente no qual se desenvolve. Isto foi claro tanto na análise citofluorimétrica da frequência de células expressando os diferentes marcadores e nas citocinas produzidas por essas células em cultura, quanto na análise histológica dos tecidos, também quanto à presença dos diferentes tipos celulares e quanto à produção *in situ* de citocinas. Antes do mais, um ponto que merece ser mencionado foi a grande variação observada entre os indivíduos na expressão dos marcadores e na produção das citocinas, em todas as análises realizadas nesse estudo. Este fenômeno, embora esperado, dificultou a análise estatística dos dados e a determinação de padrões distintos para alguns dos parâmetros estudados.

O microambiente tumoral, objeto do presente estudo, é um importante fator na determinação do padrão de resposta imune aos tumores (ZOU, 2005). Entre os diversos parâmetros que influenciam este fenômeno, a natureza, frequência e estado de ativação das DCs presentes no local deveriam ter um papel crucial. Coerente com esta hipótese, neste trabalho pudemos mostrar que há uma considerável alteração na frequência e distribuição, não só de DCs, mas também de macrófagos, quando se compara o tecido neoplásico com o tecido pulmonar.

Nosso estudo teve início com a identificação *in situ* de DCs, macrófagos e mastócitos em cortes de tecido dos pacientes. A identificação *in situ* das DCs foi baseada na expressão dos marcadores CD1a e proteína S-100. A molécula CD1a caracteriza um subtipo de DCs, o das células de Langerhans, que embora inicialmente descritas como um tipo celular da pele (ROMANI *et al.*, 2003; SALLUSTO, 2001), também está presente no pulmão (DEMEDTS *et al.*, 2005; TAZI *et al.*, 1993). Já a proteína S-100, uma proteína citosólica ligante de cálcio (Mc NUTT, 1998; SCHAFER *et al.*, 1996), foi descrita na literatura como marcador de DCs imaturas (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998; STEINMAN *et al.*, 1997) e é comumente usada para a detecção deste tipo celular *in situ* por análise imunohistoquímica (HUANG *et al.*, 1990; INOUE *et al.*, 1993; ISHIGAMI *et al.*, 1998; LESPAGNARD *et al.*, 1999; MAEHARA *et al.*, 1999; NAKANO *et al.*, 1989; TAKAHASHI *et al.*, 1984; TSUJITANI *et al.*, 1992). Embora muitos autores descrevam as moléculas S-100 e CD1a como marcadores indistintos de DCs imaturas (BELL *et al.*, 1999; IWAMOTO *et al.*, 2003; JOHNSON *et al.*, 2000; KURABAYASHI *et al.*, 2004), outros autores afirmam que o CD1a não está presente em todas as DCs imaturas, mas que é restrito à sub-população de células de Langerhans (SIELING, 2000; SHORTMAN e LIU, 2002). No presente estudo, a distribuição das células CD1a+ e S-100+ é mais compatível com esta última hipótese, uma vez que, em vários pacientes, quando presentes na mesma amostra, o estavam em quantidades diferentes.

Ao contrário de nossas expectativas iniciais, encontramos DCs, tanto CD1a+ quanto S-100+ em maior frequência em tecido pulmonar neoplásico do que no tecido pulmonar não acometido por neoplasia. Por outro lado, a distribuição destas células mostrou uma clara desorganização no tecido neoplásico. No tecido pulmonar sem

neoplasia, tanto as DCs CD1a+ quanto as S-100+ se localizavam predominantemente nos epitélios bronquiolares ou em regiões próximas a esses epitélios, sendo raras em outras áreas, como o estroma, por exemplo. Esses achados estão em concordância com a literatura, que descrevem esse padrão de distribuição para as DCs pulmonares (DEMEDTS *et al.*, 2005; TAZI *et al.*, 1993). No tecido neoplásico, ao contrário, as DCs foram encontradas, freqüentemente na mesma lesão, em dois padrões distintos: dispersas por todo o tumor ou formando agregados de tamanhos variados.

Tais padrões de distribuição na neoplasia poderiam ser devidos à desorganização da arquitetura dos tecidos, causada pelo crescimento do tumor. Todavia, a hipótese de essas células seguirem uma distribuição “coordenada pelo tumor” não pode ser descartada. Nesse caso, essa distribuição poderia se dar pela modulação da expressão de E-caderina nessas DCs por células tumorais. Como já foi demonstrado *in vitro*, que DCs imaturas expressando altos níveis de E-caderina se agrupam em grandes “clusters”, e têm sua maturação impedida (RIEDL *et al.*, 2000), poderia ser especulado que o tumor esteja modulando a expressão de E-caderina nessas DCs, mantendo-as em seu estado imaturo, o que dificultaria a indução da resposta imune aos Ags tumorais.

Na verdade esses padrões de distribuição de DCs em neoplasias pulmonares são semelhantes ao descrito por Kurabayashi *et al.*, (2004). Nesse estudo os autores puderam observar, em áreas de DCs agregadas, células tumorais apoptóticas em quantidades significativamente mais altas em relação a áreas onde as DCs estavam dispersas. A interpretação destes pesquisadores para tal observação foi a de que as DCs estariam, de algum modo, induzindo apoptose nas células tumorais. Essa explicação encontra suporte em estudos *in vitro* onde foi

demonstrada a capacidade de DCs imaturas de induzir apoptose em células tumorais (LIU *et al.*, 2002; LU *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2001). Nesses mesmos estudos, foi constatado que a indução de apoptose das células tumorais foi mediada por TNF, Fas ligante (FasL) e “ligantes indutores de apoptose relacionados ao TNF” (TRAIL), expressos na membrana das DCs. Esses dados sugerem que, além de seu predominante papel como células reguladoras, as DCs poderiam atuar como células efetoras na imunidade (inata?) aos tumores. Desse modo, como identificamos os mesmos padrões de distribuição de DCs nos tecidos analisados, poderíamos especular que, em nossas amostras, onde foram encontrado agregados de DCs, essas células poderiam estar causando apoptose nas células tumorais subjacentes. Isto, porém, permanece uma especulação, pois não analisamos marcadores de apoptose nesses tecidos.

Uma vez que os dados de imunohistoquímica apontavam para a presença de elevada quantidade de DCs imaturas no tecido neoplásico, procuramos confirmar essa hipótese. Para tanto, avaliamos a expressão de moléculas comumente encontradas em DCs maduras, como as moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, em células provenientes desses tipos de tecidos, em outros pacientes, por citometria de fluxo de suspensões celulares obtidas da digestão dos tecidos. Esses dados mostraram que as DCs maduras (CD14-CD80+CD86+) estavam presentes em maior porcentagem no tecido pulmonar do que no neoplásico. Vale lembrar que esses dados corroboram resultados anteriores, obtidos em nosso laboratório, ou seja, maior frequência de células CD14-CD80+ em tecido pulmonar em relação ao tecido neoplásico (ANSELMO *et al.*, 2005).

Esta análise citofluorimétrica parece estar em contradição com os dados da análise imunohistoquímica, que mostrou maior frequência de DCs no tecido

neoplásico do que no tecido pulmonar livre de neoplasia. Essa aparente discordância nos resultados obtidos deve ser analisada com cautela, uma vez que foram utilizadas diferentes técnicas de análise, com a detecção de diferentes marcadores para caracterizar o mesmo tipo celular, a DC. Assim, na análise imunohistoquímica foram investigados os marcadores CD1a e S-100, comumente presentes em DCs imaturas (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998; BERGERON *et al.*, 2006; STEINMAN *et al.*, 1997), enquanto na citofluorimetria analisou-se a presença de células CD14-CD80+CD86+, fenótipo mais característico de DCs maduras (BANCHEREAU *et al.*, 2000). Análise semelhante foi realizada no trabalho de Anselmo *et al.*, (2005), para se chegar a conclusão de que poderia haver baixa frequência de DCs no tecido neoplásico, onde se estudaram as moléculas CD14 e CD80, sendo consideradas DCs, as células CD14-CD80+, que por expressarem o marcador CD80 poderiam ser classificadas, novamente, como células maduras (BANCHEREAU *et al.*, 2000). Dessa forma, aproveitando da diferença metodológica dos dois estudos, poderíamos inferir que o tecido pulmonar possui maior quantidade de DCs maduras, enquanto que o neoplásico, é predominantemente infiltrado por DCs imaturas. Tal afirmação nos levaria a pensar que o microambiente tumoral, ao menos nesses casos, não prejudica a diferenciação e recrutamento de DCs para o sítio tumoral, mas impede que essas DCs se tornem DCs ativadas e com capacidade de induzir uma resposta imune adaptativa contra os Ags tumorais. Essa hipótese pode ser reforçada por um estudo recente de Bergeron *et al.*, (2006), em que foi possível constatar em neoplasias pulmonares a presença de IL-10 e TGF- β em todos os casos analisados. Em contrapartida, os autores não puderam detectar produção de IL-12 no microambiente tumoral dos pacientes com essas neoplasias, o que seria compatível com a presença de DCs imaturas no local e conseqüente

deficiência na resposta imune desses pacientes aos Ags tumorais. Este fato, em tumores de pulmão seria equivalente ao observado por Bell *et al.*, (1999) em carcinomas de mama, onde os pesquisadores puderam verificar a presença de DCs imaturas infiltrando os tumores de todas as pacientes analisadas, ao passo que DCs maduras estavam ausentes em áreas tumorais, sendo encontradas somente na região peritumoral de 20 das 32 pacientes estudadas.

Assim, por si só, a maior frequência de DCs (imaturas?) encontrada no tecido neoplásico em relação ao tecido pulmonar nos pacientes, embora inesperada, não precisa ser encarada como surpreendente. Como possível explicação para tal, poderíamos propor que, à medida que o tumor cresce, ele causa dano tecidual provocando como resposta o recrutamento de células para o sítio tumoral. A partir daí, um microambiente favorável à diferenciação de precursores determinaria o surgimento de DCs. Esta hipótese é parcialmente apoiada pela detecção de células positivas para IL-4 em tecido neoplásico, uma citocina com um papel claro na diferenciação de monócitos em DCs. Embora isto possa ocorrer, vale notar que a frequência de células produtoras de IL-4 no tumor era inferior a do tecido pulmonar. De uma maneira simplista, se fossemos associar a presença de DCs nos tecidos somente com a presença de células produtoras de IL-4, nossa observação seria mais coerente com uma maior frequência de DCs no tecido pulmonar e não o inverso, como foi constatado.

De qualquer forma, o mesmo microambiente tumoral que “permitiu” a diferenciação de precursores em DCs, poderia impedir a maturação destas células, forçando assim, sua permanência no tecido neoplásico ou a apresentação de Ags tumorais por células “ineficientes”. Esta hipótese é suportada pela observação de que nessas neoplasias ocorreu uma aparente deficiência no processo de

amadurecimento das DCs, refletida pela ausência de moléculas co-estimuladoras nas mesmas.

Paradoxalmente, no entanto, pudemos observar elevada produção *in situ* de TNF- α , uma citocina que apesar de atuar como fator de crescimento para alguns tumores (GOILLOT *et al.*, 1992; MILES *et al.*, 1994; NAYLOR *et al.*, 1993), é também um potente fator pró-inflamatório e capaz de promover a maturação de DCs (SALLUSTO e LANZAVECCHIA, 1994; ZHOU e TEDDER, 1996). Ora, se o microambiente tumoral é rico em TNF- α , citocina importante para a maturação de DCs, porque razão as DCs ali presentes teriam sua maturação prejudicada?

Uma explicação possível no caso do TNF, é que a detecção da citocina, por si só, não indica, necessariamente, que ela está exercendo todas as suas funções. A presença de linfócitos B infiltrantes de tumores (TIL-B) produtores de anticorpos anti-TNF (BARBUTO *et al.*, 1995) ou a presença de receptores solúveis de TNF (GREGORC *et al.*, 2007; TESAROVÁ *et al.*, 2000) poderia bloquear as atividades biológicas dessa citocina no microambiente tumoral. É interessante notar que a presença de anticorpos e receptores solúveis para TNF poderia ainda justificar o baixo nível de detecção dessa citocina no sobrenadante de culturas celulares provenientes de tecido neoplásico nos pacientes.

Outro ponto que merece ser mencionado é que, apesar da alta imunopositividade para o TNF- α nos ensaios imunohistoquímicos realizados, é importante considerar que o anticorpo utilizado nesses testes foi policlonal, não sendo capaz de diferenciar o TNF- α solúvel daquele ligado a receptores presentes em macrófagos e células parenquimatosas (TRAN *et al.*, 1998). Desse modo, não podemos descartar a possibilidade de que o TNF- α detectado tenha sido produzido por alguns macrófagos e tenha se ligado a receptores presentes nos demais

macrófagos e também em células parenquimatosas. Tal fato é possível, uma vez que foi constatada, no microambiente tumoral de pacientes com tumor de pulmão, a presença de receptores para TNF (TNF-R) nas células presentes no tumor, em cerca de 70% dos casos analisados (TRAN *et al.*, 1998).

Uma outra explicação, também plausível para justificar a alta frequência de DCs imaturas no tumor apesar da elevada imunopositividade para TNF- α , seria o fato de que, em muitos casos, simultaneamente à produção de fatores “pró-maturação” no microambiente tumoral, poderia haver, também, a produção de citocinas imunossupressoras como a IL-10 e o TGF- β . Infelizmente não investigamos, em nosso estudo, a presença destas citocinas *in situ*. Por outro lado, foi possível testar o sobrenadante de células provenientes de tecido neoplásico quanto à presença de IL-10 (em outros indivíduos). Contudo, ela foi indetectável na maioria dos casos e, naqueles em que se detectaram quantidades elevadas dessa citocina, nem sempre se encontrou baixa expressão de moléculas co-estimuladoras nas DCs – isto é, não parece ter havido bloqueio de maturação das DCs.

Um outro fenômeno que pode ser considerado como importante na determinação da resposta imune contra tumores, é a frequência de macrófagos no microambiente tumoral. Nesse ponto, confirmando nossa hipótese inicial, pudemos observar no presente estudo maior frequência de macrófagos em tecido neoplásico, em relação ao pulmonar. Para a identificação *in situ* de macrófagos, foi utilizado o marcador CD68, uma proteína presente na membrana de lisossomos de macrófagos (KATAKI *et al.*, 2002). Apesar de DCs imaturas ocasionalmente também expressarem a molécula CD68, tal expressão não se compara aos níveis encontrados nos macrófagos. Além do que, na maioria dos casos, o macrófago é

facilmente identificado por sua morfologia mais esférica e citoplasma repleto de grânulos, distinta da morfologia das DCs.

O papel do macrófago na biologia das neoplasias é, no mínimo, conflitante. Eles são comumente descritos como uma “espada de dois gumes”, pois se por um lado eles têm sido implicados como importantes células efetoras na imunidade a tumores, por outro lado, são considerados, em algumas neoplasias, como facilitadores do crescimento neoplásico, devido ao seu potencial de contribuir para a formação do estroma tumoral e angiogênese, liberando fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (BINGLE *et al.*, 2002; VIGNAUD *et al.*, 1994) e o fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF) (INOSHIMA *et al.*, 2002). Em neoplasias pulmonares não é diferente, ou seja, o infiltrado de macrófagos associados ao tumor tem sido associado ora com regressão do tumor, ora com progressão do mesmo (KERR *et al.*, 1998; KOUKOURAKIS *et al.*, 1998). O balanço entre o efeito do macrófago promovendo regressão ou progressão do tumor parece depender do grau de ativação dessas células e da presença de sinais supressores produzidos pelo tumor. Nossos dados não parecem ainda contribuir para o esclarecimento do papel desta célula na biologia das neoplasias de pulmão, uma vez que não foi possível estabelecer correlação entre o número de macrófagos presentes no tumor dos pacientes incluídos em nosso estudo com os parâmetros clínicos dos mesmos.

Um outro tipo celular, o mastócito, presente também no pulmão, é uma célula que vem se destacando por sua importância não só na imunidade inata (MEKORI e METCALFE, 2000), como também na resposta imune adaptativa (GALLI *et al.*, 2005). Dentre as funções desempenhadas pelos mastócitos, merece destaque sua capacidade de produzir diversos mediadores, inclusive citocinas responsáveis pela diferenciação e ativação de DCs, como o GM-CSF, IL-4 e TNF- α (GALLI *et al.*,

2005). Devido à capacidade de produzir esses mediadores, acreditamos que a determinação de sua presença no tecido tumoral poderia ser correlacionada também com a presença de DCs no local. No presente estudo, porém, isto não aconteceu. Embora tenhamos achado esse tipo celular em maior frequência no tecido neoplásico, tanto neste, quanto no tecido sem neoplasia, a frequência de mastócitos foi baixíssima, o que impediu-nos de estabelecer uma correlação entre a frequência dessas células e DCs e/ou macrófagos nos tecidos. Vale ressaltar também, que, ao menos nas amostras analisadas, não foi possível identificar o mastócito como produtor das citocinas IL-4 e TNF- α , uma vez que as células que se apresentaram positivas para estes marcadores na análise imunohistoquímica foram preferencialmente os macrófagos.

É interessante considerar que o mastócito pode também ter um significado prognóstico em neoplasias, tendo sua presença associada ora a bom prognóstico, ora a mau prognóstico, por vezes no mesmo tipo de neoplasia. Já foi mostrado, em neoplasias humanas que os mastócitos se acumulam em locais de angiogênese com a produção de histamina, fator de crescimento de fibroblastos (bFGF), VEGF, heparina e triptase, substâncias conhecidas por sua capacidade de promover angiogênese (AZIZKHAN *et al.*, 1980; BLAIR *et al.*, 1997; QU *et al.*, 1995), o que sugere um papel do mastócito na angiogênese, tendo, portanto, nesses tumores, efeito negativo. Em outro estudo, com pacientes portadores de NSCLC, o elevado número de mastócitos encontrado no microambiente tumoral foi associado a mau prognóstico (TAKANAMI *et al.*, 1999). Em contrapartida, Tomita *et al.*, (1999) demonstraram haver uma correlação positiva entre o elevado número de mastócitos encontrados no tumor e bom prognóstico em seus pacientes, também com NSCLC. Já Tataroglu *et al.*, (2004), encontraram número mais elevado dessas células nos

pacientes que apresentavam neoplasias pulmonares em estágios iniciais, fato que os autores atribuíram a um possível papel do mastócito no combate à neoplasia desses pacientes (TATAROGLU *et al.*, 2004). Nesse ponto, poderíamos especular a respeito de um possível papel desses mastócitos, que por produzirem fatores pró-diferenciação de DCs, favoreceriam sua presença no tecido neoplásico, o que permitiria o estabelecimento de uma resposta imune adaptativa. Nesse caso então, o bom prognóstico associado a elevada frequência de mastócitos no tecido poderia de dar devido a influência deste tipo celular na diferenciação da DC. No presente estudo, porém, como vimos, não foi possível estabelecer qualquer associação entre a quantidade de mastócitos presentes no tumor com os parâmetros clínicos dos pacientes, o que novamente, poderia ser atribuído ao pequeno número de casos analisados.

As células investigadas no presente estudo são importantes não só por aumentar nossa compreensão acerca das relações entre o sistema imune e os tumores, como também em alguns casos, por sua frequência poder ter valor prognóstico. Não obstante, tal como essas células, as citocinas são fatores importantes para a compreensão dessas relações no microambiente tumoral, podendo fornecer indicações valiosas do que ocorre no local. No caso da imunidade aos tumores, o perfil de citocinas produzidas no local pode ser um forte indicador da ocorrência ou não de resposta imune contra o mesmo. Devido ao fato de as citocinas terem um papel fundamental na diferenciação de DCs e macrófagos, e, com isso, influenciar o curso da resposta imune adaptativa, sua detecção poderia contribuir para um melhor entendimento das interações no microambiente tumoral. No presente estudo, a detecção das citocinas foi feita por duas abordagens distintas; por imunohistoquímica, no caso da IL-4 e TNF- α e, por ELISA, em sobrenadante de

culturas celulares provenientes da digestão enzimática dos tecidos. Por essa última abordagem foram estudadas, além da IL-4 e TNF- α , as citocinas IL-6, IL-10, GM-CSF e M-CSF.

Apesar de termos detectado, por imunohistoquímica, IL-4 em tecido pulmonar de todos os pacientes analisados e, em tecido neoplásico, na maioria deles, a detecção dessa citocina, em sobrenadante de cultura de células estabelecidas a partir desses mesmos tipos de tecidos não mostrou o mesmo fenômeno. Na verdade, na maioria dos pacientes, não houve produção detectável da citocina em cultura. Observação semelhante ocorreu também na análise do TNF- α . Esses resultados estão em oposição também a dados da literatura (TRAN *et al.*, 1998), conforme discutido anteriormente.

Como possível explicação para tamanha discrepância nos resultados, poderíamos especular que as células de nossas culturas, como já foi demonstrado em diversas situações (BARBUTO *et al.*, 1995; TRAN *et al.*, 1998), estariam produzindo anticorpos e/ou receptores solúveis para TNF- α . Se isto de fato ocorresse, a ligação de anticorpos e/ou TNF-R ao TNF- α produzido pelas células em cultura poderia esconder a região no TNF- α onde ocorreria a ligação do anticorpo utilizado no ELISA, ocasionando a ocorrência de resultados falso-negativos. Outra explicação para a mesma discrepância de resultados seria a expressão pelas células em cultura, de receptores de membrana para o TNF- α . Uma outra possível explicação para tal constatação é o fato de a abordagem *in situ* (por imunohistoquímica) refletir o que as células estão fazendo em um dado momento, ou seja, é uma “fotografia” do tecido naquele momento, enquanto as metodologias *in vitro* refletem o potencial das células de produzir determinados fatores sob condições definidas e “artificiais”. Dentre estas condições alteradas pela cultura,

uma que chama a atenção é o fato de que nesta perde-se a organização do tecido do qual as células fazem parte, organização esta que poderia influenciar muito a produção de citocinas pelas células. Apesar disso, a análise da produção de mediadores no sobrenadante de culturas celulares representa mais uma informação, devendo, desse modo, ser também considerada. Na verdade, nossos dados concordam com os obtidos por Bergeron *et al.*, (2006) que, estudando RNA extraído de biópsias de tecido tumoral, detectaram mRNA para IL-4 em tecido neoplásico de apenas um de doze pacientes com NSCLC analisados. Outra possibilidade que não pode ser descartada é o fato de que a investigação das citocinas IL-4 e TNF- α , por imunohistoquímica, foi feita em um grupo de pacientes e a análise das mesmas citocinas e de outras como o GM-CSF, M-CSF, IL-6 e IL-10, no sobrenadante de cultura de células, foi feita em outros pacientes, embora com quadros clínicos equivalentes.

Devido à importância do GM-CSF para a diferenciação de DCs *in vitro* (SALLUSTO e LANZAVECCHIA, 1994) e sua produção estar associada à presença de DCs, tanto no tecido pulmonar sem neoplasia como no tecido pulmonar neoplásico (BERGERON *et al.*, 2006; TAZI *et al.*, 1993), o estudo da produção dessa citocina poderia contribuir para a compreensão do processo de diferenciação de DCs no microambiente tumoral. Contudo, a produção de GM-CSF não foi detectada na maioria de nossas amostras. Mais uma vez, isto discorda do descrito na literatura, uma vez que foi descrita sua produção em tecido pulmonar, inclusive por células tumorais em pacientes com NSCLC (BERGERON *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2003; TAZI *et al.*, 1993). Todavia, como discutimos anteriormente para a IL-4 e o TNF- α , a detecção da citocina feita *in situ* e/ou com detecção de mRNA extraídos a partir desses tecidos (que ocorreu nos trabalhos citados) não corresponde à nossa

análise, feita em cultura de células dissociadas dos tecidos. Assim, mais uma vez chama a atenção, a importância da “arquitetura” do tecido para a produção de citocinas. Talvez por isto, não tenhamos encontrado, em nosso trabalho qualquer associação entre a produção do GM-CSF e células expressando os marcadores de DCs nos tecidos.

Em relação ao M-CSF, citocina frequentemente associada a presença de macrófagos, só pôde ser detectada sua produção, e em pequena quantidade, no sobrenadante de cultura de células provenientes do tecido tumoral de um único paciente. Embora os monócitos/macrófagos sejam descritos como produtores de M-CSF (CHOMARAT *et al.*, 2000), e tenham estado presentes, em grande quantidade, na maioria dos tecidos analisados, nesses casos ao menos, eles não produziram a citocina *in vitro*. Além dos monócitos/macrófagos, células tumorais também poderiam produzir essa citocina, o que, mais uma vez, parece não ser verdadeiro para a maioria de nossas amostras. De certa forma confirmando nossa observação, apesar de ter sido mostrada produção *in vitro* de M-CSF por diversas linhagens tumorais, exatamente a linhagem de tumor de pulmão testada pelos pesquisadores que descreveram esta produção, não produziu a citocina (MENETRIER *et al.*, 1998).

Embora, em alguns estudos, tenha sido possível estabelecer correlação estatística entre a frequência de DCs ou macrófagos, e a presença de citocinas no microambiente (BERGERON *et al.*, 2006; TAZI *et al.*, 1993; ZOU, 2005), não encontramos no presente estudo, correlação entre a frequência dessas células e a presença das citocinas por nós analisadas. Tal observação aponta para a existência de outros fatores, além das citocinas que analisamos, responsáveis pelo recrutamento/diferenciação dessas células *in vivo* para os tecidos.

É importante considerar que o microambiente tumoral é composto não só por células do sistema imune, mas também, por células estromais e células do próprio tumor, além da matriz extracelular (ZOU, 2005). Todos esses elementos podem, potencialmente, influenciar no desenvolvimento de uma resposta imune contra os Ags tumorais. Assim, tão importante quanto estudar os outros elementos que compõem esse microambiente, é a investigação da própria célula neoplásica. Nesse sentido, uma observação intrigante pôde ser feita no presente estudo; a expressão em células tumorais, da molécula CD83. Esta molécula pertence a super-família das imunoglobulinas (Igs) e consiste de um domínio extracelular semelhante a Ig, um domínio transmembrânico altamente glicosilado e um domínio intracelular composto por 39 aminoácidos (ZHOU e TEDDER, 1996). Desde sua descoberta por Zhou em 1992, na superfície de DCs maduras (ZHOU *et al.*, 1992), a molécula CD83 tem sido amplamente usada como um marcador de maturação dessas células. A expressão de CD83 foi mostrada ocorrer também em linfócitos ativados (ZHOU *et al.*, 1992) e, mais tarde, em outros tipos celulares como macrófagos recém-ativados (CAO *et al.*, 2005) e neutrófilos (YAMASHIRO *et al.*, 2000). É interessante notar que, embora a expressão de CD83 tenha sido observada em células do tumor de Hodgkin (SORG *et al.*, 1997), nenhum estudo tinha mostrado sua expressão em outros tumores. Nesse ponto, é intrigante que, além das células tumorais dos pacientes com carcinoma pulmonar, tenhamos podido observar a expressão da molécula em diversas linhagens de tumores humanos, como adenocarcinomas de mama, carcinoma de cólon, adenocarcinomas de pulmão e melanomas (BALEEIRO *et al.*, 2007). Esta expressão de CD83 em tumores distintos sugeriu-nos a possibilidade desta molécula ter um papel relevante na biologia dessas neoplasias, o que foi, portanto, também objeto de investigação do presente trabalho.

Uma vez que já foi mostrado que CD83, em sua forma solúvel, tem atividade imunossupressora (LECHMANN *et al.*, 2001) e que pode ser liberado por células que o expressam (HOCK *et al.*, 2001; HOCK *et al.*, 2004), pensamos que essas células tumorais CD83+ pudessem secretá-lo e, por conseguinte, prejudicar a indução da resposta imune em seu microambiente. Do ponto de vista funcional, nossa hipótese pôde ser confirmada, uma vez que quando o meio de cultura de células tumorais P9 (que expressavam CD83) era adicionado a co-cultura de DCs com linfócitos T alogênêicos, a proliferação desses linfócitos era inibida. Essa inibição da proliferação de linfócitos T induzida por DCs não foi observada, no entanto, quando o sobrenadante da cultura de células tumorais foi previamente incubado em placa recoberta com anti-CD83, ou seja, onde deveria ocorrer a eliminação do CD83 solúvel. Este fenômeno não foi ainda descrito na literatura e parece constituir mais um mecanismo de evasão de tumores frente à resposta imune. Evidentemente ele precisa ser investigado com maior profundidade.

Em conclusão, os dados apresentados aqui são compatíveis com um microambiente tumoral que não favorece a indução de resposta imune efetiva contra os tumores de pulmão. A menor frequência de DCs maduras no tumor, associada à identificação de um marcador de DCs ativadas expresso por células tumorais, com um aparente efeito imunossupressor, não só são compatíveis com um microambiente que não favorece a indução de uma resposta imune efetiva contra os tumores de pulmão, mas também evidenciam a complexidade das relações entre sistema imune e tumor. Tais observações devem ser consideradas em estratégias para modificar o padrão dessas interações, como as abordagens imunoterapêuticas contra o câncer.

6 CONCLUSÕES

O microambiente tumoral de pacientes com câncer de pulmão parece alterar significativamente a distribuição de macrófagos e DCs, assim como o estado de maturação destas últimas. De modo similar, a produção de citocinas, sobretudo de IL-4 e TNF- α , também pareceu estar alterada. Especificamente pudemos verificar:

- Número significativamente mais elevado de células CD1a+, S-100+ e CD68+ *in situ* em tecido neoplásico do que em tecido pulmonar;
- Mastócitos presentes em maior número no tecido neoplásico, na comparação com o tecido pulmonar, sem, entretanto, atingir diferença estatisticamente significante;
- Células produtoras de IL-4 *in situ* em maior frequência no tecido pulmonar, na comparação com o tecido neoplásico;
- Maior número de células produtoras de TNF- α *in situ* em tecido neoplásico, na comparação com o tecido pulmonar;
- Maior frequência de DCs maduras (CD14-CD80+CD86+) em tecido pulmonar do que em neoplásico;
- Ausência de produção de M-CSF por células de tecido pulmonar de todos os pacientes analisados, e produção da mesma citocina por células de tecido neoplásico de apenas um paciente;

As diferenças encontradas, tanto na expressão dos marcadores analisados em células dissociadas dos tecidos, quanto na produção *ex vivo* das citocinas pelas mesmas células não obedecem a padrões evidentes e, portanto, não atingiram significância estatística na análise conjunta dos dados. Entretanto, considerando-se isoladamente cada paciente, sempre se obtiveram:

- Diferenças na frequência de células positivas para os marcadores CD1a, CD11c, CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, CD123, CCR7 e HLA-DR, entre o tecido pulmonar e o neoplásico num mesmo indivíduo;
- Diferenças na produção das citocinas IL-4, IL-6, IL-10, GM-CSF e TNF- α por células de tecido pulmonar e tecido neoplásico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSELMO, L. B.; GROSS, J. L.; HADDAD, F.; SILVA, R. A.; COUTO, W. J.; DEHEINZELIN, W. D.; YOUNES, R. N.; AB'SABER, A. M.; CANZIAN, M.; CAPELOZZI, V. L.; BARBUTO, J. A. M. Dendritic cell distribution in primary lung cancer patients. **Keystone Symposia/Basic Aspects of Tumor Immunology**, 2005.

ARDAVIN, C.; Del HOYO, G. M.; MARTIN, P.; ANJUÉRE, F.; ARIAS, C. F.; MARÍN, A. R. Origin and differentiation of dendritic cells. **Trends Immunol.**, v. 22, p. 691-700, 2001.

AUSTIN, J. M. The dendritic cell system and anti-tumor immunity. **In Vivo**, v. 7, p. 193-202, 1993.

ÁVILA-MORENO, F.; LÓPEZ-GONZALEZ, J. S.; GALINDO-RODRÍGUEZ, G.; PRADO-GARCÍA, H.; BAJAÑA, S.; SÁNCHEZ-TORRES, C. Lung squamous cell carcinoma and adenocarcinoma cell lines use different mediators to induce comparable phenotypic and functional changes in human monocyte-derived dendritic cells. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 55, p. 598-611, 2006.

AZIZKHAN, R. G.; AZIZKHAN, J. C.; ZETTER, B. R.; FOLKMAN, J. Mast cell heparin stimulates migration of endothelial cells in vitro. **J. Exp. Med.**, v. 152, p. 931-944, 1980.

BALEEIRO, R. B.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; TOMIYOSHI, M. Y.; GROSS, J. L.; HADDAD, F.; PINTO, C. A. L.; SOARES, F. A.; YOUNES, R. N.; BARBUTO, J. A. M. Expression of a dendritic cell maturation marker CD83 on tumor cells from lung cancer patients and several human tumor cell lines – is there a biological meaning behind it? **Cancer Immunol. Immunother.**, in press (on line Jul 13, 2007).

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y.; 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, p. 245-252, 1998.

BARBUTO, J. A. M.; GRIMES, W. J.; HERSH, E. M. Antibodies to tumor necrosis factor: a component of B cell immune responses with a role in tumor/host interaction. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 40, p. 31-36, 1995.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:**

Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BASU, S.; BINDER, R. J.; SUTO, R.; ANDERSON, K. M.; SRIVASTAVA, P. K. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. **Int. Immunol.**, v. 12, p. 1539-1546, 2000.

BECKER, Y. Anticancer role of dendritic cells (DC) in human and experimental cancers – a review. **Anticancer Res.**, v. 12, p. 511-520, 1992.

BELL, J. W. Possible immune factors in spontaneous regression of bronchogenic carcinoma: Ten year survival in a patient treated with minimal (1,200r) radiation alone. **Am. J. Surg.**, v.120, p. 804-806, 1970.

BELL, D.; CHOMARAT, P.; BROYLES, D.; NETTO, G.; HARB, G. M.; LEBECQUE, S.; VALLADEAU, J.; DAVOUST, J.; PALLUCKA, K. A.; BANCHEREAU, J. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. **J. Exp. Med.**, v. 190, p. 1417-1426, 1999.

BERGERON, A.; HAGE, F. E.; KAMBOUCHNER, M.; LECOSSIER, D.; TAZI, A. Characterisation of dendritic cell subsets in lung cancer micro-environments. **Eur. Respir. J.**, v. 28, p. 1170-1177, 2006.

BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. Th-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nat. Immunol.**, v. 8, p. 345-350, 2007.

BINGLE, L.; BROWN, N. J.; LEWIS, C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. **J. Pathol.**, v. 196, p. 254-265, 2002.

BIRBECK, M. S.; BREATHNACH, A. S.; EVERALL, J. D. An electron microscope study of basal melanocytes and high-level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. **J. Invest. Dermatol.**, v. 37, p. 51-63, 1961.

BLAIR, R. J.; MENG, H.; MARCHASE, M. J.; REN, S.; SCHAWARTZ, L. B.; TANNESSEN, M. G. Human mast cells stimulate vascular tube formation. Tryptase is a novel, potent angiogenic factor. **J. Clin. Invest.**, v. 99, p. 2691-2700, 1997.

BURNET, F. M. The concept of immunological surveillance. **Prog. Exp. Tumor Res.**, v. 13, p. 1-27, 1970.

CAO, W.; LEE, S. H.; LU, J. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. **Biochem. J.**, v. 385, p. 85-93, 2005.

CHAPUIS, F.; ROSENZWAJG, M.; YAGELLO, M.; EKMAN, M.; BIBERFELD, P.; GLUCKMAN, J. C. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. **Eur. J. Immunol.**, v. 27, p. 431-441, 1997.

CHOMARAT, P.; BANCHEREAU, J.; DAVOUST, J. ; PALUKA, A. K. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. **Nat. Immunol.**, v. 1, p. 510-514, 2000.

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

CORCORAN, L.; FERRERO, I.; VREMEC, D.; LUCAS, K.; WAITHMAN, J. The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells. **J. immunol.**, v. 170, p. 4926-4932, 2003.

DEMEDTS, I. K.; BRUSSELLE, G. G.; VERMAELEN, K. Y. ; PAUWELS, R. A. Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 32, p. 177-184, 2005.

DEMEDTS, I. K.; BRACKE, K. R.; MAES, T.; JOOS, G. F.; BRUSSELLE, G. G. Different roles for human lung dendritic cell subsets in pulmonary immune defense mechanisms. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 35, p. 387-393, 2006.

DZIOONEK, A.; FUCHS, A.; SCHIMIDT, P.; CREMER, S.; ZYSK, M.; MILTENYI, S.; BUCK, D. W.; SCHIMITZ, J. BDCA-2, BDCA-3 and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. **J. Immunol.**, v. 165, p. 6037-6046, 2000.

DZIOONEK, A. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell specific type-II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon α/β induction. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 1823-1834, 2001.

EGNER, W.; HART, D. N. The phenotype of freshly isolated and cultured human bone marrow allostimulatory cells: possible heterogeneity in bone marrow dendritic cell populations. **Immunology**, v. 85, p. 611-620, 1995.

EGNER, W.; MCKENZIE, J. L.; SMITH, S. M.; BEARD, M. E.; HART, D. N.; Identification of potent mixed leukocyte reaction-stimulatory cells in human bone marrow: putative differentiation stage of human blood dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 150, p. 3043-3053, 1993.

FADOK, V. A.; SAVILL, J. S.; HASLETT, C.; BRATTON, D. L.; DOHERTY, D. E.; CAMPBELL, P. A. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. **J. Immunol.**, v. 149, p. 4029-4035, 1992.

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, p. 330-336, 2003.

GABRILOVICH, D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic cell defects. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 941-952, 2004.

GABRILOVICH, D. I.; CHEN, H. L.; GIRGIS, K. R.; CUNINGHAM, H. T.; MENY, G. M.; NADAF, S.; KAVANAUGH, D.; CARBONE, D. P. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. **Nat. Med.**, v. 2, p. 1096-, 1996.

GALLI, S. J.; NAKAE, S.; TSAI, M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. **Nat. Immunol. Rev.**, v. 6, p. 135-142, 2005.

GANS, T. Macrophage function. **New Horiz.**, v. 1, p. 2327, 1993.

GEISSMANN, F.; PROST, C.; MONNET, J. P.; DY, M.; BROUSSE, N.; HERMINE, O. Transforming growth factor beta 1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. **J. Exp. Med.**, v. 187, p. 961-966, 1998.

GILL, P. S.; BRYNES, R. Recent advances in AIDS-related Kaposi's sarcoma. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 1, p. 57-61, 1989.

GOILLOT, E.; COMBARET, V.; LANDENSTEIN, R.; BAUBET, D.; BLAY, J.Y.; PHILIP, T.; FAVROT, M. C. Tumor necrosis factor as an autocrine growth factor for neuroblastoma. **Cancer Res.**, v. 52, p. 3194-3200, 1992.

GREGORC, V.; SPREAFICO, A.; FLORIANI, I.; COLOMBO, B.; LUDOVINI, V.; PISLOLA, L. Prognostic value of circulating chromogranin A and soluble tumor necrosis factor receptors in advanced nonsmall cell lung cancer. **Cancer**, v. 110, p. 845-853, 2007.

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

HART, D. N.; FABRE, J. W. Major histocompatibility complex antigens in rat kidney, ureter, and bladder: localization with monoclonal antibodies and demonstration of I-a positive dendritic cells. **Transplantation**, v. 31, p. 318-325, 1981.

HART, D. N.; FABRE, J. W. Demonstration and characterization of I-a positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. **J. Exp. Med.**, v. 154, p. 347-361, 1981.

HART, D.N.; FUGGLE, S. V.; WILLIAMS, K. A.; FABRE, J. W.; TING, A.; MORRIS, P. J. Localization of HLA-ABC and DR antigens in human kidney. **Transplantation**, v. 31, p. 428-433, 1981.

HARTMANN, E. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. **Cancer Res.**, v. 63, p. 6478-6487, 2003.

HERTZ, C.; KIERTSCHER, S.; GODOWSKI, P.; BOUIS, D.; NORDARD, M.; ROTH, M. et al. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. **J. Immunol.**, v. 166, p. 2444-2450, 2001.

HOCK, B. D.; KATO, M.; MCKENZIE, J. L.; HART, D. N. A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes, and is detectable in normal human sera. **Int. Immunol.**, v. 13, p. 959, 2001.

HOCK, B. D.; HARING, L. F.; STEINKASSERER, A.; TAYLOR, K. G.; WILLIAM, N.; PATTON, W. N.; MCKENZIE J. L. The soluble form of CD83 is present at elevated levels in a number of hematological malignancies. **Leuk. Res.**, v. 28, p. 237, 2004.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, p. 1057-1061, 2003.

HUANG, J. Á.; HUANG, H. D.; PENG, Q. B.; ZHU, Z. J.; YU, X. R. S100 protein positive dendritic cells and the significance of their density in gastric precancerous lesions. **Proc. Chin. Acad. Med. Sci. Peking. Union. Med. Coll.**, v. 5, p. 93-96, 1990.

INOSHIMA, N.; NAKANISHI, Y.; MINAMI, T.; IZUMI, M.; TAKAYAMA, K.; YOSHINO, I.; HARA, N. The influence of dendritic cell infiltration and vascular endothelial growth factor expression on the prognosis of non-small cell lung cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 8, p. 3480-3486, 2002.

INOUE, K.; FURIHATA, M.; OHTSUKI, Y.; FUJITA, Y. Distribution of S-100 protein-positive dendritic cells and the expression of HLA-DR antigen in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in relation to tumour progression and prognosis. **Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.**, v. 422, p. 351-355, 1993.

ISHIGAMI, S.; AIKOU, T.; NATSUGOE, S.; HOKITA, S.; IWASHIGE, H.; TOKUSHIGE, M.; SONODA, S. Prognostic value of HLA-DR expression and dendritic cell infiltration in gastric cancer. **Oncology**, v. 55, p. 65-69, 1998.

IWAMOTO, M.; SHINOHARA, H.; MIYAMOTO, A.; OKUSAWA, M.; MABUCHI, H.; NOHARA, T, GON G, TOYODA M, TANIGAWA N. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. **Int. J. Cancer**, v. 104, p. 92-97, 2003.

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, p. 2307-2315, 2004.

JOHNSON, S. K.; KERR, K. M.; CHAPMAN, A. D.; KENNEDY, M. M.; KING, G.; COCKBURN, J. S.; JEFFREY, R. R. Immune cell infiltrates and prognosis in primary carcinoma of the lung. **Lung Cancer**, v. 27, p. 27-35, 2000.

KASHIHARA, M.; UEDA, M.; HORIGUCHI, M.; FURUKAWA, F.; HANAOKA, M.; IMAMURA, S. A monoclonal antibody specifically reactive to human Langerhans cells. **J. Invest. Dermatol.**, v. 87, p. 602-607, 1986.

KATAKI, A.; SCHEID, P.; PIET, M.; MARIE, B.; MARTINET, M.; MARTINET, Y.; VIGNAUD, J. M. Tumor infiltrating lymphocytes and macrophages have a potential dual role in lung cancer by supporting both host-defense and tumor progression. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 140, p. 320-327, 2002.

KERR, K. M.; JOHNSON, S. K.; KING, G.; KENNEDY, M. M.; WEIR, J.; JEFFREY, R. Partial regression in primary carcinoma of the lung: does it occur? **Histopathology**, v. 33, p. 55-63, 1998.

KORN, T.; BETTELLI, E.; GAO, W.; AWASTHI, A.; JÄGER, A.; STROM, T. B., OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. **Nature**, v. 26, p. 484-7, 2007.

KOUKOURAKIS, M. I.; GIATROMANOLAKI, A.; KAKOLYRIS, S.; O'BYRNE, K. J.; APOSTOLIKAS, N.; SKARLATOS, J.; GATTER, K. C.; HARRIS, A. L. Different patterns of stromal and cancer cell thymidine phosphorylase reactivity in non-small-cell lung cancer. Impact on tumour neoangiogenesis and survival. **Br. J. Cancer**, v. 77, p. 1696-1703, 1998.

KURABAYASHI, A.; FURIHATA, M.; MATSUMOTO, M.; HAYASHI, H.; OHTSUKI, Y. Distribution of tumor-infiltrating dendritic cells in human non-small cell lung carcinoma in relation to apoptosis. **Pathol. Int.**, v. 54, p. 302-310, 2004.

LECHMANN, M.; KROOSHOOP, D. J.; DUDZIAK, D.; KREMMER, E.; KUHN, C.; FIGDOR, C. G. The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 1813, 2001.

LESPAGNARD, L.; GANCBERG, D.; ROUAS, G.; LECLERECQ, G.; de SAINT-AUBAIN, N.; SOMERHAUSEN, N.; DI LEO, A.; PICCART, M.; VERHEST, A.; LARSIMONT, D. Tumor-infiltrating dendritic cells in adenocarcinomas of the breast: a study of 143 neoplasms with a correlation to usual prognostic factors and to clinical outcome. **Int. J. Cancer**, v. 84, p. 309-314, 1999.

LI, R.; RÜTTINGER, D.; LI, R.; WANG, Y. L. Analysis of the immunological microenvironment at the tumor site in patients with non-small cell lung cancer. **Langenbeck Arch. Surg.**, v. 388, p. 406-412, 2003.

LIU, Y. J. Professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 275-306, 2005.

LIU, S.; ZHANG, M.; WANG, W.; CAO, X. The involvement of TNF- α -related apoptosis inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN- β -stimulated human dendritic cells to tumor cells. **J. Immunol.**, v. 168, p. 1823-1830, 2002.

LU, G.; JANJIC, M. B.; JANJIC, J.; WHITESIDE, T. L.; STKUS, W.; VUJANOVIC, N. L. Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF. Lymphotoxin- α 1 β 2, Fas ligand and TNF-related apoptosis-inducing ligand. **J. Immunol.**, v. 168, p. 1831-1839, 2002.

LYONS, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometry measurement of CFSE dye dilution. **J. Immunol. Methods**, v. 243, p. 147-154, 2000.

MAEHARA, Y.; KABASHIMA, A.; TOKUNAGA, E.; HASUDA, S.; OKI, E.; KAKEJI, Y.; BABA, H.; SUGIMACHI, K. Recurrences and relation to tumor growth potential and local immune response in node-negative advanced gastric cancer. **Oncology**, v. 56, p. 322-327, 1999.

MAKARENKOVA, V.; SHURIN, G. V.; TOURKOVA, I. L.; BALKIR, L.; PIRTSKHALAISHVILLI, G.; PEREZ, L.; GEREIN, V.; SIEGFRIED, J. M.; SHURIN, M. R. Lung cancer-derived bombesin-like peptides down-regulate the generation and function of human dendritic cells. **J. Neuroimmunol.**, v. 145, p. 55-67, 2003.

MATTHAY, R. A.; MAHLER, D. A.; BECK, G. J.; LOKE, J.; BAUE, A. E.; CARTER, D. C.; MITCHELL, M. S. Intratumoral Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy prior to surgery for carcinoma of the lung: results of a prospective randomized trial. **Cancer Res.**, v. 46, p. 5963-5968, 1986.

Mc NUTT, N. S. The S100 family of multipurpose calcium-binding proteins. **J. Cutan. Pathol.**, v. 25, p. 521-529, 1998.

MEKORI, Y. A.; METCALFE, D. D. Mast cells in innate immunity. **Immunol. Rev.**, v. 173, p. 131-140, 2000.

MENETRIER-CAUX, C.; MONTMAIN, G. ; DIEU, M. C. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34+ progenitors by tumors cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. **Blood**, v. 92, p. 4778-4791, 1998.

MERAD, M.; ANGEVIN, E.; WOLFERS, J.; FLAMENT, C.; LORENZI, I.; TRIEBEL, F.; ESCUDIER, B.; ZITVOGEL, L. Generation of monocytes-derived dendritic cells from patients with renal cell cancer: modulation of their functional properties after therapy with biological response modifiers (IFN-alpha plus IL-2 and IL-12). **J. Immunother.**, v. 23, p. 369-378, 1997.

MILES, D. W.; HAPPERFIELD, L. C.; NAYLOR, M. S.; BOBROW, L. G.; RUBENS, R. D.; BALKWILL, F. R. Expression of tumour necrosis factor (TNF alpha) and its receptors in benign and malignant breast tissue. **Int. J. Cancer**, v. 56, p. 777-786, 1994.

MOHAMADZADEH, M.; BERARD, F.; ESSERT, G. Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. **J. Exp. Med.**, v. 194, p. 1013-1020, 2001.

MUZIO, M.; BOSISIO, D.; POLENTARUTTI, N.; D'AMICO, G.; STOPPACCIARO, A.; MANCINELLI, R. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 164, p. 5998-6004, 2000.

NAKANO, T.; OKA, K.; ARAI, T.; MORITA, S.; TSUNEMOTO, H. Prognostic significance of Langerhans` cell infiltration in radiation therapy for squamous cell carcinoma of the uterine cervix. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 113, p. 507-511, 1989.

NAYLOR, M. S.; STAMP, G. W.; FOULKES, W. D.; ECCLES, D.; BALKWILL, F. R. Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 2194-2206, 1993.

NENINGER, E.; CROMBET, T.; OSORIO, M.; CATALA, M.; TORRE, A.; LEONARD, I.; GARCIA, B.; MARINILLO, P.; GONZÁLEZ, G.; LAGE, A. Vaccination with EGF active immunotherapy improves survival in advanced non small cell lung cancer (NSCLC) patients: interim analysis of a randomized phase II trial. **Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.**, v. 23, p. 7210, 2005.

NETTEN, J. P.; ASHMEAD, B. J.; PARKER, R. L.; THORNTON, I. G.; FLETCHER, C.; CAVERS, D.; COY, P.; BRIGDEN, M. L. Macrophage-tumor cell associations: a factor in metastasis of breast cancer? **J. Leuk. Biol.**, v. 54, p. 360-362, 1993.

NEVES, A. R.; ENSINA, L. F.; ANSELMO, L. B.; LEITE, K. R.; BUZAID, A. C.; CAMARA-LOPES, L. H.; BARBUTO, J. A. Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 54, p. 61-66, 2005.

NORTON, A. J.; JORDAN, S.; YEOMANS, P. Brief, high temperature heat denaturation (pressure-cooking) : a simple and effective method of antigen retrieval of routinely processed tissues. **J. Pathol.**, v. 173, p. 371-379, 1994.

PAVLI, P.; MAXWELL, L.; Van de POL, E.; DOE, F. Distribution of human colonic dendritic cells and macrophages. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 104, p. 124-132, 1996.

PENN, I. Principles of tumor immunity: immunocompetence and cancer. In: **Biologic therapy of cancer**. Ed De Vita VT Jr, Hellman S & Rosenberg ST. Philadelphia. p. 53-66, 1991.

PRICKETT, T. C.; McKENZIE, J. L.; HART, D. N. characterization of interstitial dendritic cells in human liver. **Transplantation**, v. 46, p. 754-761, 1988.

QU, Z.; LIEBLER, J. M.; POWERS, M. R. ; GALEY, T. ; AHMADI, P.; HUANG, X. N. Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma. **Am. J. Pathol.**, v. 147, p. 564-573, 1995.

RAEZ, L. E.; FEIN, F.; PODACK, E. R. Lung cancer immunotherapy. **Clin. Med. Res.**, v. 3, p. 221-228, 2005.

RIEDL, E.; STOCKL, J.; MAJDIC, O.; SCHEINECKER, C.; KNAPP, W.; STROBL, H. Ligation of E-cadherin on in vitro-generated immature Langerhans-type dendritic cells inhibits their maturation. **Blood**, v. 96, p. 4276-4284, 2000.

RISSEOAN, M. C.; DUHEN, T.; BRIDON, J. M.; BENDRISS-VERMARE, N.; PERONNE, C. Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. **Blood**, v. 100, p. 3295-3303, 2002.

ROMANI, N.; HOLZMANN, S.; TRIPP, C. H.; KOCH, F.; STOITZNER, P. Langerhans cells—dendritic cells of the epidermis. **APMIS**, v. 111, p. 725-40, 2003.

RUBARTELLI, A.; POGGI, A.; ZOCCHI, M. R. The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the $\alpha(v)\beta3$ integrin and requires intracellular and extracellular calcium. **Eur. J. Immunol.**, v. 27, p. 1893-900, 1997.

RUCKDESCHEL, J. C.; CODISH, S. D.; STRANAHAN, A. Postoperative empyema improves survival in lung cancer: documentation and analysis of a natural experiment. **N. Engl. J. Med.**, v. 287, p. 1013-1017, 1972.

SALLUSTO, F. Origin and migratory properties of dendritic cells in the skin. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.**, v. 1, p. 441-8, 2001.

SALLUSTO, F.; PALERMO, B.; LENIG, D.; MIETTINEN, M.; MATIKAINEN, S.; JULKUNEN, I. et al. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, p. 1617-1625, 1999.

SALLUSTO, P.; 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 α . **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 1109-1118, 1994.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. **Immunol. Rev.**, v. 177, p. 134-140, 2000.

SATO, K.; YAMASHITA, N.; BABA, M.; MATSUYAMA, T. Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. **Blood**, v. 101, p. 3581-, 2003.

SAXON, A.; FELDHAUS, J.; ROBINS, R. A. Single step separation of human T and B cells using AET treated red cells. **J. Immunol. Methods**, v. 90, p. 285-289, 1976.

SCHAFER, B. W.; HEIZMANN, C. W. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: Functions and pathology. **Trends Biochem. Sci.**, v. 21, p. 134-140, 1996.

SCHILLER, J. H.; BITTNER, G. Anti-proliferative effects of tumor necrosis factor, gamma interferon, and 5-fluorouracil on human colorectal carcinoma cell lines. **Int. J. Cancer**, v. 46, p. 61-66, 1990.

SCHILLER, J. H.; MORGAN-IHRIG, C.; LEVITT, M. L. Concomitant administration of interleukin-2 plus tumor necrosis factor in advanced non-small cell lung cancer. **Am. J. Clin. Oncol.**, v. 18, p. 47-51, 1995.

SERTL, K.; TAKEMURA, T.; TSCHACHLER, E.; FERRANS, V. J.; KALINER, M. A.; SHEVACH, E. M. Dendritic cells with antigen-presenting capability reside in airway epithelium, lung parenchyma, and visceral pleura. **J. Exp. Med.**, v. 163, p. 436-451, 1986.

SHANKARAM, V.; IKEDA, H.; BRUCE, A. T. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. **Nature**, v. 410, p. 1107-1111, 2001.

SHEN, 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, p. 1546-1553, 2004.

SHIELD, B. Angiogenic effects of macrophages isolated from ascitic fluid aspirated from woman with advanced ovarian cancer. **Cancer Lett.**, v. 62, p. 159-165, 1992.

SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nat. Rev.**, v. 2, p. 151-161, 2002.

SIELING, P. A. CD1-restricted T cells: T cells with a unique immunological niche. **Clin. Immunol.**, v. 96, p. 3-10, 2000.

SORG, U. R.; MORSE, T. M.; PATTON, W. N.; HOCK, B. D.; ANGUS, H. B.; ROBINSON, B.A. Hodgkin's cells express CD83, a dendritic cell lineage associated antigen. **Pathology**, v. 29, p. 294, 1997.

SPITS, H.; COUWENBERG, F.; BAKKER, A. Q.; WEIJER, K.; UITTENBOGAART, C. H. Id2 and Id3 inhibit development of CD34⁺ stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. **J. Exp. Med.**, v. 192, p. 1775-1784, 2000.

STEINMAN, L. A brief history of Th17, the first major revision in the Th1/Th2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nat. Med.**, v. 13, p. 139-145, 2007.

STEINMAN, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 271-296, 1991.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J. Exp. Med.**, v. 137, p. 1142-1162, 1973.

STEINMAN, R. M.; PACK, M.; INABA, K. Dendritic cells in the T cell areas of lymphoid organs. **Immunol. Rev.**, v. 156, p. 25-37, 1997.

STEINMAN, R. M.; WITMER, M. D. Lymphoid Dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 75, p. 5132-6, 1978.

SUZUKI, Y.; YANAGAWA, H.; NISHIOKA, Y.; NISHIMURA, N.; TAKEUCHI, E.; SONE, S. Efficient generation of dendritic cells from alveolar and pleural

macrophages as well as blood monocytes in patients with lung cancer. **Lung Cancer**, v. 34, p. 195-205, 2001.

TAKAHASHI, K.; ISOBE, T.; OHTSUKI, Y.; AKAGI, T.; SONOBE, H.; OKUYAMA, T. Immunohistochemical study on the distribution of alpha and beta subunits of S-100 protein in human neoplasm and normal tissues. **Virchows Arch. B. Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.**, v. 45, p. 385-396, 1984.

TAKANAMI, I.; TAKEUCHI, K.; KODAIRA, S. Tumor-associated macrophage infiltration in pulmonary adenocarcinomas: association with angiogenesis and poor prognosis. **Oncology**, v. 57, p. 138-142, 1999.

TATAROGLU, C.; KARGI, A.; ÖZKAL, S.; ESREFOGLU, N.; AKKOÇLU, A. Association of macrophages, mast cells and eosinophil leukocytes with angiogenesis and tumor stage in non-small cell lung carcinomas (NSCLC). **Lung Cancer**, v. 43, p. 47-54, 2004.

TAZI, A.; BOUCHONNET, F.; GRANDSAIGNE, M.; BOUMSELL, L.; HANCE, A. J.; SOLER, P. Evidence that granulocyte macrophage-colony-stimulating factor regulates the distribution and differentiated state of dendritic cells/Langerhans cells in human lung and lung cancers. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 566-576, 1993.

TESAROVÁ, P.; KUASNICKA, J.; UMLAUFOVÁ, A.; HOMOLKOVÁ, H.; JIRSA, M.; TESAR, V. Soluble TNF and IL-2 receptors in patients with breast cancer. **Med. Sci. Monit.**, v. 6, p. 661-667, 2000.

TOMITA, M.; MATSUZAKI, Y.; ONITSUKA, T. Correlation between mast cells and survival rates in patients with pulmonary adenocarcinoma. **Lung Cancer**, v. 26, p. 103-108, 1999.

TRAN, T. A.; KALLAKURY, B. V. S.; AMBROS, R. A.; ROSS, J. Prognostic significance of tumor necrosis factors and their receptors in nonsmall cell lung carcinoma. **Cancer**, v. 83, p. 276-282, 1998.

TSUJITANI, S.; KAKEJI, Y.; WATANABE, A.; KOHNOE, S.; MAEHARA, Y.; SUGIMAGHI, K. Infiltration of S-100 protein positive dendritic cells and peritoneal recurrence in advanced gastric cancer. **Int. Surg.**, v. 77, p. 238-241, 1992.

Van VOORHIS, W. C.; HAIR, L. S.; STEINMAN, R. M.; KAPLAN, G. Human dendritic cells: enrichment and characterization from peripheral blood. **J. Exp. Med.**, v. 155, p. 1172-1187, 1982.

VERMAELEN, K.; PAUWELS, R. Pulmonary dendritic cells. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 172, p. 530-551, 2005.

VIGNAUD, J. M.; MARIE, B.; KLEIN, N. The role of platelet-derived growth factor production by tumor-associated macrophages in tumor stroma formation in lung cancer. **Cancer Res.**, v. 54, p. 5455-5463, 1994.

VISINTIN, A.; MAZZONI, A.; SPITZER, J. H.; WYLLIE, D. H.; DOWER, S. K.; SEGALL, D. M. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 166, p. 249-255, 2001.

VOLBERDING, P. A. Kaposi's sarcoma in AIDS. **Immunol. Ser.**, p. 44345- 44358, 1989.

WEI, Y. Q.; HANG, Z. B. In situ observation of lymphocyte-tumor cell interaction in human lung carcinoma. **Immunol. Invest.**, v. 18, p. 1095-1105, 1989.

WEIDNER, N.; SEMPLE, J. P.; WELCH, W. R.; FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, v. 324, p. 1-8, 1991.

WITTE, M. H.; WITTE, C. L. AIDS Kaposi's sarcoma complex: Evolution of a full-blown lymphologic syndrome. **Lymphology**, v. 21, p. 4-10, 1988.

YAMAJI, H.; IIZASA, T.; KOH, E.; SUZUKI, M.; OTSUJI, M.; CHANG, H.; MOTOHASHI, S.; YOKOI, S.; HIROSHIMA, K.; TAGAWA, M.; NAKAYAMA, T.; FUJISAWA, T. Correlation between interleukin 6 production and tumor proliferation in non-small cell lung cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 53, p. 786-792, 2004.

YAMASHIRO, S.; WANG, J. M.; YANG, D.; GONG, W. T.; KAMOHARA, H.; YOSHIMURA, T. Expression of CCR6 and CD83 by cytokine-activated human neutrophils. **Blood**, v. 96, p. 3958, 2000.

YANG, R.; XU, D.; ZHANG, A.; GRUBER, A. Immature dendritic cells kill ovarian carcinoma cells by a Fas/FasL pathway, enabling them to sensitize tumor-specific CTLs. **Int. J. Cancer**, v. 94, p. 407-413, 2001.

ZHOU, L. J.; SCHWARTING, R.; SMITH, H. M.; TEDDER, T. F. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. **J. Immunol.**, v. 149, p. 735-742, 1992.

ZHOU, L. J.; TEDDER, T. F. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 93, p. 2588-2592, 1996.

ZOU, W. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. **Nat. Med.**, v. 7, p. 1339-1346, 2001.

ZOU, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, p. 263-273, 2005.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Consentimento pós-informado do paciente

ESTUDO: Estudo da expressão de citocinas no micro-ambiente tumoral em pacientes com neoplasias pulmonares e sua correlação com a presença de macrófagos e células dendríticas

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, _____, portador da Cédula de identidade, RG _____, e inscrito no CPF/MF _____ nascido(a) em ____ / ____ / _____, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo *“Estudo da expressão de citocinas no micro-ambiente tumoral em pacientes com neoplasias pulmonares e sua correlação com a presença de macrófagos e células dendríticas”*. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- O presente estudo busca um melhor entendimento das relações entre os tumores de pulmão e o sistema imunológico humano. Para isso, tem como objetivos: detectar a produção, nesses tumores, de determinadas substâncias capazes de interferir na resposta imune contra o câncer, bem como a presença de células dendríticas, que são as células responsáveis pelo início da resposta imune contra diversos

microorganismos e também contra tumores. Para tanto, será retirado um fragmento do tumor após a ressecção cirúrgica, ou seja, após o tumor ser retirado do meu corpo, será retirado um fragmento para ser encaminhado para a pesquisa;

- Após a realização da cirurgia para ressecção do tumor do pulmão, será retirado um pequeno fragmento de 1 cm³ do tumor e outro fragmento de 1 cm³ do pulmão próximo ao tumor. Este material será retirado da peça cirúrgica que já foi removida através da cirurgia, o que não implica em nenhum risco cirúrgico adicional, nem causará qualquer interação nos exames que são rotineiramente realizados no material retirado na cirurgia;

- Essa coleta será feita apenas para este estudo ou outros projetos relacionados, realizados em nosso laboratório;

- O(s) procedimento(s) não vai (vão) me causar nenhum problema;

- A participação neste projeto não tem o objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer custo ou prejuízo com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados com o estudo;

- Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

- A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;

- Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados.

Responsável pelo Estudo: Renato Brito Baleeiro, Departamento de Imunologia, ICB-USP

Telefone para contato: 3091-7375

Responsável pelo Estudo na Instituição: Dr. Jefferson Luiz Gross, Departamento de Cirurgia Torácica, Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A.C. Camargo

Telefone para contato: 3272-5120 ou 3272-5121

Obs. Se o pesquisador principal não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor entre em contato com o Coordenador do Comitê de Ética do Hospital do Câncer – SP, pelo Telefone 3272-5000, ramais 1113 ou 1117

Declaro que após ter sido adequadamente esclarecido sobre esta pesquisa clínica, consinto em participar da mesma na qualidade de paciente.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

() **Paciente** / () **Responsável**

Testemunha

Nome / RG / Telefone

ANEXO 3 – Manuscrito Submetido a Publicação

High frequency of immature dendritic cells and altered *in situ* production of interleukin-4 and tumor necrosis factor- α in lung cancer

Baleeiro RB^a, Anselmo LB^a, Soares FA^c, Pinto CAL^c, Ramos O^c, Gross JL^b, Haddad F^b, Younes RN^b, Tomiyoshi MY^a, Bergami-Santos PC^a, Barbutto JAM^{a,1}

^a Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo – Av. Prof. Lineu Prestes 1730 – CEP 05508-000. Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil.

^b Department of Thoracic Surgery, Hospital A.C. Camargo - R Prof. Antonio Prudente 211 - CEP 01509-900 – Liberdade – São Paulo – SP – Brazil

^c Department of Pathological Anatomy, Hospital A.C. Camargo - R Prof. Antonio Prudente 211 - CEP 01509-900 – Liberdade – São Paulo – SP – Brazil

¹ Corresponding author e-mail: jbarbutto@icb.usp.br

Abstract

Antigen-presenting cells, like dendritic cells (DCs) and macrophages, play a significant role in the induction of an immune response and an imbalance in the proportion of macrophages, immature and mature DCs within the tumor could affect significantly the immune response to cancer. DCs and macrophages can differentiate from monocytes, depending on the milieu, where cytokines, like interleukin (IL)-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) induce DC differentiation and tumor necrosis factor (TNF)- α induce DC maturation. Thus, the aim of this work was to analyze by immunohistochemistry the presence of DCs (S100+ or CD1a+), macrophages (CD68+), IL-4 and TNF- α within the microenvironment of primary lung carcinomas. To analyze the presence of DCs (S100+ or CD1a+), macrophages (CD68+), IL-4 and TNF- α , we used immunohistochemistry. Higher frequencies of both immature DCs and macrophages were detected in the tumor-affected lung, when compared to the non-affected lung. Also, TNF- α -positive cells were more frequent, while IL-4-positive cells were less frequent in neoplastic tissues. These data are discussed and interpreted as the result of an environment that does not oppose monocyte differentiation into DCs, but that could impair DC maturation, thus affecting the induction of effective immune responses against the tumor.

Keywords: lung cancer, dendritic cells, macrophages, IL-4, TNF, immunohistochemistry.

Introduction

Lung cancer is the leading cause of cancer mortality in the United States, and globally there are more than 1 million new cases diagnosed each year [1]. In spite of aggressive treatment with surgery, radiation, and chemotherapy, the long-term survival for lung cancer patients still remains low. Even patients with “early stage” disease frequently succumb to lung cancer due to development of metastases, pointing to the need of effective approaches for systemic therapy of this condition. In this context, immunotherapeutic strategies, which would be advantageous due to the specificity of the immune response, are continuously considered as an option to the management of lung cancer patients [2]. However, the frequent failure of these approaches indicates that our understanding of the immune system-lung cancer interactions needs to be deepened in order to achieve the full potential of immune intervention for lung cancer treatment. In this setting, the evaluation of the distribution, frequency and function of monocytes, macrophages and dendritic cells (DCs) on blood and lung of patients bearing lung carcinomas has a definite role, and has been one of our group’s interests [3,4], since these cells are involved in innate immunity and play a central role in the adaptive immune response.

Dendritic cells are antigen-presenting cells (APC) that play a crucial role in the initiation and modulation of an appropriate response of the immune system to danger signals (bacteria, viruses, for instance) by linking innate to adaptive immune responses [5]. These cells have unique functional and morphologic properties and compared to other APC such as monocytes/macrophages and B cells, are much stronger T cell stimulators [5,6]. Immature DCs, thought to differentiate from blood monocytes upon their exposure to an appropriate tissue environment [5], are present in peripheral organs, where they continuously sample the environment, taking up and processing antigens [7]. Exposure of DCs to microbial agents or inflammatory mediators induce their maturation, characterized by an increased expression of class I and II molecules of the major histocompatibility complex (MHC-I and II), of costimulatory molecules, such as CD80 and CD86, and by the expression of maturation markers, such as CD83 [8,9]. Such maturation process enables DCs for optimal T cell activation [7], which is supposed to occur in the T cell zone of secondary lymphoid organs, to where mature DCs migrate due the maturation-induced expression of specific chemokine receptors (CCR7) and adhesion molecules [10].

Not surprisingly, DC dysfunction is frequently observed in malignancy [11-15, 16], but the underlying mechanisms of these functional alterations are poorly defined and probably heterogeneous [17]. Not only tissue DCs have been reported as affected by the tumor microenvironment, but also the differentiation of blood monocytes seems to be affected in cancer patients [18]. Considering the role of interleukin-4 (IL-4) in the differentiation of recently egressed blood monocytes into dendritic cells within tissues [19], and of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in the induction of DC maturation [20], in the present study we describe the immunohistochemical detection of these two cytokines within lung tissues. This was performed both in tumor and non-tumor areas from the same patients, where the presence of macrophages (CD68+ cells) and immature DCs (S-100+ or CD1a+ cells) was also evaluated. The results show a higher frequency of DCs and macrophages in lung cancer, when compared to non-affected lung in the same patient, as well as an altered expression of both IL-4 and TNF- α in the same tissues.

Material and methods

Patients and tissue specimens

Biopsies of non-small cell lung cancers (NSCLC) and of non-affected lung tissue were obtained during surgery for primary tumor resection from 15 patients, whose demographic characteristics are summarized in table 1 in the results section. No patient had received chemotherapy or radiotherapy at the time of surgery. Written informed consent was obtained from all subjects, and the protocol was approved by the Ethical Committee of the Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A C Camargo (HCACC) (protocol nº742/05) and of the Institute of Biomedical Sciences (protocol nº676/CEP).

Immunohistochemical staining

One paraffin block per tumor/non-affected tissue was used. Five serial sections were cut from formalin fixed and paraffin embedded tissues representing each tissue for subsequent analysis of immature DCs (CD1a+ and S-100+), macrophages (CD68+), IL-4- and TNF- α -secreting cells. Expression of the markers was evaluated using a streptavidin-biotinylated horseradish peroxidase detection system (LSAB+kit/HRP; DAKO, Kyoto, Japan). After retrieval of the antigen by heating in a microwave oven for 15 minutes, sections were incubated overnight at 4°C with a primary antibody for

each marker (CD1a clone CTB6 – Santa Cruz, CD68 clone PG-M1 – Dako, and polyclonal antibodies against S-100 protein – Dako, and IL-4 and TNF- α polyclonal from R&D Systems). For the negative control, the primary antibodies were omitted. As chromogen, a solution of diaminobenzidine-tetrahydrochloride (0.03%) containing 0.1% hydrogen peroxide was used. Sections were counterstained with hematoxylin. The number of immature DCs and macrophages was counted in five fields, at a magnification of 100x, under light microscopy. The average count was used as the final score. The level of IL-4 and TNF- α expression was scored according to Tazi *et al.* (1993) [21] and Ogawa *et al.* (2004) [22], based on the staining intensity of the cells: score 0, if no staining was detected; score 1, if the staining intensity was weak; score 2, if the intensity was moderate; score 3 if the intensity was high.

Preparation of Single-Cell Suspension from Lung Tissues and Labeling for Flow Cytometry

Lung tissues (tumor affected and non-affected) were obtained from patients who underwent surgical resection for primary tumor removal. Written informed consent was obtained from all subjects, and the protocol was approved by the Ethical Committee of the Hospital A.C. Camargo (HACC) (nº742/05) and the Institute of Biomedical Sciences (nº676/CEP). Tissue samples, aseptically obtained from surgical resection, were minced and single-cell suspensions were generated by digestion with collagenase type VIII (0.56 mg/ml; Sigma, St Louis, MO, USA) during 120 min incubation at 37°C.

After enzymatic digestion, the cell suspension derived from tumor affected lung or non-affected lung were stained with fluorescent monoclonal antibodies against CD14 and CD80 and their expression was analyzed by flow cytometry.

Statistical analysis

The number of DCs (CD1a+ or S-100+) and macrophages (CD68+) infiltrating tumor-affected and non-affected lung in the patients was compared by paired Student's t-test. The expression of IL-4 and TNF- α in the tissues was assessed through χ^2 test for trends. Differences were considered significant when *p* was less than 0.05. All statistical analyses were performed using the Graphpad Software Prism 2.01 for Windows.

Results

Patients' characteristics

The patients' age, gender, smoking status, diagnosis, pathological tumor-node metastasis classification (pTNM) and clinical stage (CS) are listed in table 1.

Table 1 – Demographic and clinical characteristics of the patients.

Patient	Age	Sex	Smoker	Diagnosis	pTNM ¹ - CS ²
1	69	M	Ex	LCC	T2N2M0 - 3A
2	58	F	N	SCC	T2N0M0 - 1B
3	66	M	N	SCC	T1N2M0 - 3A
4	47	F	N	ADC	T2N1M0 - 2B
5	81	M	Ex	SCC	T4N1M0 - 3B
6	74	M	Ex	SCC	T2N0M0 - 1B
7	73	M	S	LCC	T2N0M0 - 1B
8	75	M	S	LCC	T4N2M0 - 3B
9	45	F	Ex	ADC	T2N0M0 - 1B
10	70	M	Ex	ADC	T1N0M0 - 1A
11	74	M	Ex	ADC	T2N0M0 - 1B
12	44	M	S	SCC	T3N0M0 - 2B
13	77	M	S	SCC	T1N0M0 - 1A
14	65	F	Ex	ADC	T1N0M0 - 1A
15	64	M	S	ADC	T2N0M0 - 1B

F= Female; M= Male; Ex= Ex-Smoker; N= Non-Smoker; S= Smoker; ADC= Adenocarcinoma; LCC= Large Cell Carcinoma; SCC= Squamous Cell Carcinoma; 1= Pathological Tumor-Node Metastasis Classification; 2= Clinical Stage.

Distribution in situ of CD1a+ and S-100+ immature DCs and CD68+ macrophages

Patients' samples were analyzed as to the frequency of immature DCs (CD1a+ and S-100+) and macrophages (CD68+) in the primary tumor and in non-affected lung tissue by immunohistochemistry (Figures 1 and 2). Consistent and statistically significant differences were observed between these tissues, both in individual patients and as a group. The number of immature CD1a+ DCs per field (100x) within tumor ranged from 0 to 151.0 cells, with a mean, for the 15 patients, of 39.3, whereas in non-affected lung, the frequency of these cells ranged from 0 to 52.6 cells with a mean of 6.2 ($p= 0.0371$). Likewise, immature S-100+ DCs in the tumor environment ranged from 5.6 to 152.0 cells/field with a mean of 59.3, whereas in non-affected lung their frequency ranged from 0 to 144.8 with a mean of 27.4 ($p= 0.0177$). No statistically significant correlation was found between the density of immature DCs

(both CD1a+ and S-100+) and the histological type of tumor, nor with the tumor stage. Also macrophages were present with a higher frequency within the tumor (ranging from 53.4 to 538.6 cells, with a mean of 298.8 versus a range of 50.0 to 380.0 with a mean of 172.4 in non-affected tissues, $p = 0.0108$). Interestingly, the frequency of CD68+ cells in adenocarcinomas was higher than their number in squamous-cell carcinomas ($p = 0.0048$) (Table 2).

Figure 1 – Distribution and location of immature dendritic cells CD1a+ (A and B) and S-100+ (C and D) within lung tissue (A and C) and lung cancer (B and D). Scale bar= 100μm. The distribution pattern of CD1a+ and S-100+ DCs in lung tissues was restricted to epithelia whereas within lung cancer, these cells were either scattered (White arrowheads shown in B) and aggregated (White arrows shown in C) around the neoplasia.

Figure 2 – Distribution and location of macrophages CD68+ within lung tissue (A) and lung cancer (B). Scale bar= 100µm.

Table 2 – Average number of positive cells for CD1a, S-100 and CD68 in lung tissues by immunohistochemistry (p in paired Student's t test).

Patient	CD1a		S-100		CD68	
	Non-Affected Lung	Tumor-Affected Lung	Non-Affected Lung	Tumor-Affected Lung	Non-Affected Lung	Tumor-Affected Lung
1	0.6	77.4	46.8	117.6	151.0	400.0
2	19.2	32.4	97.4	101.8	204.6	538.6
3	0.0	92.8	0.0	152.0	128.6	152.0
4	-*	9.6	-*	15.2	-*	460.4
5	52.6	-*	144.8	-*	217.2	-*
6	1.0	0.2	6.2	12.0	145.8	188.6
7	-*	24.6	-*	6.8	-*	124.2
8	-*	0.0	-*	34.6	-*	145.4
9	1.0	3.0	12.6	137.2	223.2	228.0
10	0.0	120.0	0.0	128.8	96.4	227.4
11	0.0	0.0	0.2	5.6	198.4	495.4
12	0.0	0.0	1.0	33.4	50.0	53.4
13	0.2	151.0	4.8	20.0	185.2	471.4
14	0.0	-*	15.6	-*	88.6	-*
15	0.0	0.0	0.0	6.0	380.0	400.0
Mean	6.2	39.3	27.4	59.3	172.4	298.8
P value	0.0371		0.0177		0.0108	

-* Not done

Detection of IL-4 and TNF- α in situ

Cells of lung and tumor parenchyma were labeled similarly with the anti-IL-4 antibody, without any significant difference between these two tissues (p= 0.5527) (Figure 3a-b). Also macrophages in both tissues were stained with the anti-IL-4 antibody (Figure 3c), but, for

these cells, the level of expression was significantly higher among non-affected lung samples ($p= 0.0097$). In non-affected lung, the expression of IL-4 could be detected in macrophages of all patients, one with low (1), three with moderate (2), and eight with high intensity (3) (Table 3). In contrast, in tumor-affected lung the expression of IL-4 could not be observed in two patients, in three patients its expression was low (1), in six, moderate (2) and in two, high (3) (Table 3).

Figure 3 – Detection of IL-4 by immunohistochemistry in lung tissues. IL-4 production was observed in bronchiolar epithelium of lung tissues (A), tumor cells (B) and macrophages (C). Scale bar= 100µm.

Also TNF- α was detected in parenchymal cells from both tissues (Figure 4a-b), but contrasting with the IL-4 expression, labeling intensity for TNF- α was higher in tumor parenchymal cells than in non-affected lung parenchyma ($p= 0.0415$) (Table 3). While in non-affected lung, the expression of TNF- α could be detected in parenchymal cells in nine of twelve patients analyzed (three with low (1); two with moderate (2); and four with high intensity (3)), in tumor-affected lung the expression of TNF- α could be observed in all patients (in two patients it was low (1), in three, moderate (2) and in eight, high (3)). TNF- α was also detected inside macrophages, but for these cells, the high staining intensity was equal in both tissues (Figure 4c and Table 3).

Figure 4 – Detection of TNF- α by immunohistochemistry in lung tissues. TNF- α production was observed in bronchiolar epithelium of lung tissues (A), tumor cells (B) and macrophages (C). Scale bar= 100 μ m.

Table 3 – Staining intensity of sections subjected to immunohistochemistry for detection of IL-4 and TNF- α positive cells in lung tissues. According to staining intensity, immunopositivity was scored from 0 to 3.

Patient	IL-4				TNF- α			
	Non-Affected Lung		Tumor-Affected Lung		Non-Affected Lung		Tumor-Affected Lung	
	Parenchyma	Macrophages	Parenchyma	Macrophages	Parenchyma	Macrophages	Parenchyma	Macrophages
1	0	2	0	1	3	3	2	3
2	1	1	0	0	3	3	3	3
3	3	3	1	1	3	3	3	3
4	-*	-*	3	2	-*	-*	3	3
5	1	3	-*	-*	2	3	-*	-*
6	3	2	0	0	1	3	3	3
7	-*	-*	3	3	-*	-*	3	3
8	-*	-*	1	1	-*	-*	2	3
9	0	3	2	2	0	3	2	3
10	0	3	1	3	3	3	3	3
11	0	2	2	2	0	3	3	3
12	0	3	0	2	2	3	1	3
13	0	3	0	2	0	3	1	3
14	0	3	-*	-*	1	3	-*	-*
15	0	3	0	2	1	3	3	3
Mean	0.7	2.6 [#]	1.0	1.5 [#]	1.7 [★]	3.0	2.5 [★]	3.0

[#] p= 0.0097 in χ^2 test for trends, when non-affected versus tumor-affected lung macrophages were compared.

[★] p= 0.0415 in χ^2 test for trends, when non-affected versus tumor-affected lung macrophages were compared.

-* Not done

Immunophenotype of cells from pulmonary and neoplastic tissue

Patients were analyzed for the frequency of CD14⁻ CD80⁺ positive cells in the primary tumor and in non-affected lung tissue by flow cytometry. Lung DCs were defined using the following criterion: at first, based on their side scatter and forward scatter, lymphoid cells such as B and T were excluded from our analysis (Fig. 5). In this population, the cells that were CD14⁻ and expressed the co-stimulatory molecule, CD80 were considered as mature DCs. Lower frequency of phenotypically mature dendritic cells (CD14⁻CD80⁺) was found in tumor-affected lung when

compared with non-affected lung ($p = 0.0235$) (Fig. 5).

Figure 5 – Top= Histograms showing expression of CD3 (T cells) and CD19 (B cells) on cells gated in R1 and R2, in neoplastic tissue. Note that the B (CD19⁺) and T (CD3⁺) lymphocytes are located in a region of cells that have a lower side scatter (reflecting lower granularity and complexity) as well as a lower forward scatter (reflecting cell size). Therefore, cells gated in R2 excluded both B and T lymphocytes from our analysis. In the bottom are shown cells CD14⁻CD80⁺ gated in R2.

Discussion

The local microenvironment is probably a significant factor in the determination of the immune response pattern to tumors [17]. Among the various parameters that influence this phenomenon, the nature, frequency and activation state of antigen presenting cells should play a relevant role. In the present paper we show that, indeed, there is a considerable alteration in the frequency and distribution of macrophages and dendritic cells within the tumor, when compared to the non-affected lung.

Dendritic cells were identified by the expression of either S-100 or CD1a. The first marker, S-100, is a cytosolic calcium-binding protein [23,24] that is expressed in immature DCs [5,25] and it is often used for detection of this type of cell *in situ* by immunohistochemistry [26-30]. On the other hand, the CD1a molecule is the hallmark of a subset of DC, the Langerhans cells (LCs), that though initially described as a skin cell type [31,32] is, today, also known to be present in the lung [21,33]. It is noteworthy that the frequency of S-100+ cells was higher, in almost all samples analyzed, than that of CD1a+ cells, an observation that is compatible with the expression of this marker only by a subset of lung dendritic cells. Even higher was the frequency of macrophages in the tissues, again an expected observation [34]. Intriguing, however, was the observation that DCs, both CD1a+ and S-100+, were present with higher frequency within tumors. Furthermore, CD1a+ cells were those with the more pronounced increase in frequency. Considering that LCs are a subpopulation of DCs with specific functional characteristics [31], this preferential increase might affect the pattern of antigen presentation within the lungs.

Not only was the frequency of DCs affected in tumors, but also their distribution. While, DCs (both CD1a+ and S-100+) were predominantly placed in the bronchiolar epithelium in non-affected lung, what is in agreement with the literature [21,33], in tumors, two distinct distribution patterns were observed: cells scattered throughout the tissue or cells aggregated in some areas. Such patterns of DCs distribution were present, frequently within the same patient and are similar to those described by Kurabayashi *et al.* (2004) [35]. Such patterns could be due to the architectural disorganization of tissues, caused simply by the tumor growth, but a “tumor-coordinated” distribution cannot be ruled out.

To explain the increased frequency of DCs within tumors, one could also argue that the local tumor growth, causing tissue damage, could lead to an enhanced

recruitment of inflammatory cells to the tumor site. There, a microenvironment favorable to differentiation of precursors toward DCs would lead to the observed high frequency of these cells. This hypothesis is partially supported by the frequent detection of IL-4 within tumor samples, a cytokine with a clear role in the promotion of DC differentiation from monocytes [17,19]. However, the intensity of IL-4 detection within tumors was not increased but decreased (mainly in the macrophage population), an observation that would not indicate such a preferential environment for DC differentiation in lung tumors.

Another possible explanation for this phenomenon would be the existence of a maturation deficit of tumor-infiltrating DCs, a phenomenon that is frequently observed [36]. This maturation deficit could lead to an accumulation of immature cells within tissues, thus explaining our observations. Actually, in a flow cytometry study of cell suspensions obtained from tumor and from non-affected lung tissue samples, we noticed the presence of a higher frequency of mature DCs in non-affected lungs [4], an observation in agreement with this maturation deficit hypothesis. Furthermore, a possible enhanced maturation dependence of LCs, in order to leave peripheral tissues, could also explain their preferential increase within the tumor.

Paradoxically however, we detected high levels of TNF- α within tumors, mainly on parenchymal cells. Since this cytokine, in spite of being a growth factor for some tumors [37-39], is also a strong pro-inflammatory factor and important for DC maturation [19,20], its increased levels in tumors would be contradictory with this hypothetical DC maturation deficit. Nevertheless, it is necessary to consider that, in the tumor microenvironment, there might be the simultaneous production of cytokines such as IL-10 and TGF- β that could block the maturation of local, immature DCs, as it has been shown in other tumors [40]. Furthermore, the detection of the cytokine does not indicate, necessarily, that it is exerting all its roles. The presence of tumor-infiltrating B lymphocytes (TIL-B), producing neutralizing antibodies to TNF [41], or the presence of soluble TNF receptors [42], could block some of this cytokine's biological activities in the tumor environment. Moreover, in spite of high immunopositivity for TNF in our samples, it is important to take into account that the antibody used in such analyzes was polyclonal, not being able to distinguish between free TNF and receptor-bound TNF [43]. Thus, we cannot exclude the possibility that the TNF detected in lung epithelial and tumor cells had been produced by tumor-infiltrating inflammatory cells in the tumor stroma [44,45] and was bound to receptors

present on the parenchymal cells. This would be in agreement with the high expression of receptors for TNF (TNF-R) in lung cancer cells [43], which could, actually, act as a “sink” for the cytokine, avoiding its action on immature DCs.

Altogether, the data presented here, showing an increase in immature dendritic cells and macrophage frequency within tumors, a decreased staining for IL-4 in tumor macrophages and an increase staining for TNF- α in tumor parenchymal cells, are compatible with a local microenvironment that does not favor the induction of effective immune responses against lung cancer. This adds to the complexity of tumor-immune system interactions and should be considered in attempts to modify the pattern of these interactions in immunotherapeutic approaches to lung cancer.

Acknowledgements

This study was supported by grants (#05/50422-2; #04/09956-0) from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

- 1- Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Global cancer statistics (2005). *CA Cancer J Clin* 55: 74-108.
- 2- O' Mahony D, Kummar S, Gutierrez ME (2005). Non-small-cell lung cancer vaccine therapy: A concise review. *J Clin Oncol* 23: 1-7.
- 3- Anselmo LB, Gross JL, Haddad F, Deheinzelin D, Younes R, Barbuto JAM (2005). Functional analysis of cells obtained from bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of lung cancer patients. *Life Sciences* 76: 2945-2951.
- 4- Anselmo LB, Gross JL, Haddad F, Silva RA, Couto WJ, Deheinzelin WD, Younes RN, AB'Saber AM, Canzian M, Capelozzi VL, Barbuto JAM. Dendritic cell distribution in primary lung cancer patients. *Keystone Symposia/Basic Aspects of Tumor Immunology*, 2005.
- 5- Banchereau J & Steinman RM (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245–252.
- 6- Steinman RM & Cohn Z.A (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137: 1142-1162.

- 7- Vermaelen KY, Carro-Muino I, Lambrecht BN, Pauwels RA (2001). Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J Exp Med* 193:51–60.
- 8- Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM and Tedder TF (1992). A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol* 149: 735-742.
- 9- Egner W & Hart DN (1995). The phenotype of freshly isolated and cultured human bone marrow allostimulatory cells: possible heterogeneity in bone marrow dendritic cell populations. *Immunology* 85: 611-620.
- 10- Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, Forster R, Burgstahler R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999). Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur. J. Immunol.* 29: 1617–1625.
- 11- Zinkernagel RM & Doherty PC (1979). MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol* 27:51-177.
- 12- Doyle A, Martin WJ, Funa K, Gazdar A, Camey D, Martin SE, Linnoila I, Cuttitta F, Mulshine J, Bunn P, Minna J. Markedly (1985). Decreased expression of class I histocompatibility antigens, protein, and mRNA in human small cell lung cancer. *J Exp Med* 161: 1135-1154.
- 13- Leung KH (1989). Inhibition of human NK cell and LAK cell cytotoxicity and differentiation by prostaglandin E₂. *Cell Immunol* 123: 384-390
- 14- Smith DR, Kunkel SL, Burdick MD, Wilke CA, Orringer MB, Whyte RI, Strieter RM (1994). Production of IL-10 by human bronchogenic carcinoma. *Am J Pathol* 145: 18-25.
- 15- Chaux P, Moutet M, Faivre J, Martin F, Martin M (1996). Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of T-cell activation. *Lab Invest* 74: 975-983.
- 16- Beck C, Schreiber H, Rowley DA (2001). Role of TGF-beta in immune-evasion of cancer. *Microsc Res Tech* 52: 387-395.
- 17- Zou W (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature Rev Cancer* 5: 263-273.

- 18- Neves AR, Ensina LF, Anselmo LB, Leite KR, Buzaid AC, Camara-Lopes LH, Barbuto, JAM (2005). Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. *Cancer Immunol Immunother* 54: 61-66.
- 19- Sallusto P & Lanzavecchia A (1994). 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 α . *J Exp Med* 179: 1109-1118.
- 20- Zhou LJ & Tedder TF (1996). CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 2588-2592.
- 21- Tazi A, Bouchonnet F, Grandsaigne M, Bounsell L, Hance AJ, Soler P (1993). Evidence that granulocyte macrophage-colony-stimulating factor regulates the distribution and differentiated state of dendritic cells/Langerhans cells in human lung and lung cancers. *J Clin Invest* 91: 566-576.
- 22- Ogawa E, Takenaka K, Yanagihara K, Kurozumi M, Manabe T, Wada H, Tanaka F (2004). Clinical significance of VEGF-C status in tumour cells and stromal macrophages in non-small cell lung cancer patients. *Br J Cancer* 91: 498-503.
- 23- Schafer BW & Heizmann CW (1996). The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: Functions and pathology. *Trends Biochem Sci* 21: 134-140.
- 24- McNutt NS (1998). The S100 family of multipurpose calcium-binding proteins. *J Cutan Pathol* 25: 521-529.
- 25- Steinman RM, Pack M, Inaba K (1997). Dendritic cells in the T cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev* 156: 25-37.
- 26- Takahashi K, Isobe T, Ohtsuki Y, Akagi T, Sonobe H, Okuyama T (1984). Immunohistochemical study on the distribution of alpha and beta subunits of S-100 protein in human neoplasm and normal tissues. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 45: 385-396.
- 27- Nakano T, Oka K, Arai T, Morita S, Tsunemoto H (1989). Prognostic significance of Langerhans' cells infiltration in radiation therapy for squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Arch Pathol Lab Med* 113: 507-511.

- 28- Huang JA, Huang HD, Peng QB, Zhu ZJ, Yu XR (1990). S100 protein positive dendritic cells and the significance of their density in gastric precancerous lesions. *Proc Chin Acad Med Sci Peking Union Med Coll* 5: 93-96.
- 29- Tsujitani S, Kakeji Y, Watanabe A, Kohnoe S, Maehara Y, Sugimachi K (1992). Infiltration of S-100 protein positive dendritic cells and peritoneal recurrence in advanced gastric cancer. *Int Surg* 77: 238-241.
- 30- Inoue K, Furihata M, Ohtsuki Y, Fujita Y (1993). Distribution of S-100 protein-positive dendritic cells and the expression of HLA-DR antigen in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in relation to tumour progression and prognosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 422: 351-355.
- 31- Sallusto F (2001). Origin and migratory properties of dendritic cells in the skin. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 1: 441-8.
- 32- Romani N, Holzmann S, Tripp CH, Koch F, Stoitzner P (2003). Langerhans cells —dendritic cells of the epidermis. *APMIS* 111: 725-40.
- 33- Demedts IK, Brusselle GG, Vermaelen KY, Pauwels RA (2005). Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32: 177-184.
- 34- Tataroglu C, Kargi A, Özkal S, Esrefoglu N, Akkoçlu A (2004). Association of macrophages, mast cells and eosinophil leukocytes with angiogenesis and tumor stage in non-small cell lung carcinomas (NSCLC). *Lung Cancer* 43: 47-54.
- 35- Kurabayashi A, Furihata M, Matsumoto M, Hayashi H, Ohtsuki Y (2004). Distribution of tumor-infiltrating dendritic cells in human non-small cell lung carcinoma in relation to apoptosis. *Pathol Int* 54: 302-310.
- 36- Bell D, Chomarat P, Broyles D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, Valladeau, Davoust J, Pallucka KA, Banchereau J (1999). In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* 190: 1417-1426.
- 37- Goillot E, Combaret V, Landenstein R, Baubet D, Blay JY, Philip T, Favrot MC (1992). Tumor necrosis factor as an autocrine growth factor for neuroblastoma. *Cancer Res* 52: 3194-3200.
- 38- Naylor MS, Stamp GW, Foulkes WD, Eccles D, Balkwill FR (1993). Tumor necrosis factor and its receptors in human ovarian cancer. Potential role in disease progression. *J Clin Invest* 91: 2194-2206.

- 39- Miles DW, Happerfield LC, Naylor MS, Bobrow LG, Rubens RD, Balkwill FR (1994). Expression of tumour necrosis factor (TNF alpha) and its receptors in benign and malignant breast tissue. *Int J Cancer* 56: 777-786.
- 40- Iwamoto M, Shinohara H, Miyamoto A, Okusawa M, Mabuchi H, Nohara T, Gon G, Toyoda M, Tanigawa N (2003). Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 104: 92-97.
- 41- Barbuto JAM, Grimes WJ, Hersh EM (1995). Antibodies to tumor necrosis factor: a component of B cell immune responses with a role in tumor/host interaction. *Cancer Immunol Immunother* 40: 31-36.
- 42- Staal-Van Den Brekel AJ, Dentener MA, Drent M, Ten Velde GPM, Buurman WA, Wouters EFM (1998). The enhanced inflammatory response in non-small cell lung carcinoma is not reflected in the alveolar compartment. *Respir Med* 92: 76-83.
- 43- Tran TA, Kallakury BVS, Ambros RA, Ross J (1998). Prognostic significance of tumor necrosis factors and their receptors in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 83: 276-282.
- 44- Naylor MS, Stamp GW, Balkwill FR (1990). Investigation of cytokine gene expression in human colorectal cancer. *Cancer Res* 50: 4436-4440.
- 45- Ito A, Sato T, Iga T, Mori Y (1990). Tumor necrosis factor bifunctionally regulates matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) production by human fibroblasts. *FEBS Lett* 269: 93-95.