

KAREN STEPONAVICIUS PIEDADE CRUZ

**INTERAÇÕES CELULARES EM AMBIENTE TRIDIMENSIONAL ENTRE
CÉLULAS HÍBRIDAS DENDRÍTICAS-TUMORAIS E LINFÓCITOS HUMANOS:
EM BUSCA DE ESTRATÉGIAS DE APRIMORAMENTO DE VACINA
ANTITUMORAL**

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

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Marzagão
Barbuto

Co-Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Morais
Freitas

Versão original

São Paulo
2015

RESUMO

Cruz, K. S. P. **Interações celulares em ambiente tridimensional entre células híbridas dendríticas-tumorais e linfócitos humanos: em busca de estratégias de aprimoramento de vacina antitumoral.** 2015. 131 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Células híbridas dendríticas-tumorais vem sendo usadas em vacinas terapêuticas para portadores de neoplasias metastáticas e tem mostrado resultados promissores. Porém, o comportamento e as funções desempenhadas por essas células híbridas ainda são insuficientemente conhecidos. Neste contexto, o presente trabalho pretende estudar a interação dessas células híbridas com diferentes subpopulações de linfócitos T em um ambiente tridimensional (3D) com ou sem colágeno tipo III. Para isso, células mononucleares do sangue periférico foram diferenciadas em células dendríticas (DCs) e linfócitos T foram separados por colunas imunomagnéticas. Inicialmente, DCs em diferentes estágios de maturação e linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ foram cocultivados no ambiente 3D Biotek tratado com colágeno do tipo III ou não e analisados em diversos parâmetros. DCs só interagiram com linfócitos T CD4⁺ quando em presença de colágeno III. Com relação ao tempo e tipo de interação, o tempo de interação de DCs com linfócitos T CD4⁺ diminui conforme a maturação e DCs maduras apresentaram um tipo de interação onde elas preferencialmente interagem com um único linfócito. Já a interação com linfócitos T CD8⁺ não foram observadas diferenças quanto ao tempo de interação e DCs maduras foram capazes de interagir repetidas vezes com o mesmo linfócito. Os ensaios de migração mostraram que a presença colágeno tipo III ou mesmo a presença de DCs em diferentes estágios de maturação podem alterar a velocidade de migração dos linfócitos T CD8⁺. Além disso, a velocidade de migração dos linfócitos T CD8⁺ diminui após o contato e que há uma relação com o estágio de maturação das DCs. A maturação completa das DCs e a presença de colágeno III induziram a produção de IL-2 mas não foi observado uma aumento na proliferação de linfócitos T embora exista uma tendência a aumentar. Uma vez determinadas as condições, analisamos todos os parâmetros anteriores com DCs maduras fundidas com células tumorais de pacientes com câncer de mama ou com células da linhagem SKBR-3 cocultivadas com linfócitos T. Nossos resultados indicaram que células no grupo Fusão Tumoral interagiu tanto com linfócitos T CD4⁺ quanto com linfócitos T CD8⁺ mas o grupo Fusão Linhagem interagiram apenas com linfócitos T CD4⁺. Com relação ao tempo interação os linfócitos T CD4⁺ interagiram 2 vezes mais no grupo Fusão Linhagem do que nos grupos Sem Fusão e Fusão Tumoral e sua interação foi apenas com um único linfócito. Já com linfócitos T CD8⁺ o grupo Fusão Tumoral interagiu mais tempo quando comparado aos outros dois grupos. Células híbridas apresentaram a velocidade de migração reduzida quando comparadas as DCs. Não foi observada IL-2 na culturas onde as células híbridas estavam presentes e a proliferação de linfócitos no grupo Fusão Tumoral também não foi observada. Assim, a cocultura 3D foi capaz de demonstrar que células híbridas derivadas de câncer de mama não possuem comportamento similar ao de outras células, mostrando a importância de um protocolo personalizado para cada tipo de tumor, levando em consideração suas características única.

Palavras-chaves: Ambiente Tridimensional. Células Híbridas. Colágeno tipo III. Células Dendríticas. Linfócitos T.

ABSTRACT

Cruz K. S. P. **Cell interactions in three-dimensional environment between dendritic cell-tumor hybrid cells and human lymphocytes: looking for antitumor vaccine enhancement strategies.** 2015. 131 f. Ph. D. thesis (Immunology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Dendritic cell-tumor hybrid cells have been used in therapeutic vaccines for people with metastatic cancer and have shown promising results. However, the behavior and the functions performed by these hybrid cells are still insufficiently known. In this context, this study aims to analyze the interaction of these hybrid cells with different subpopulations of T lymphocytes in a three dimensional environment (3D) with or without collagen type III. Therefore, peripheral blood mononuclear cells were differentiated into dendritic cells (DCs) and the T lymphocytes were separated by immunomagnetic columns. Initially, DCs at different stages of maturation and CD4⁺ T lymphocytes and CD8⁺ T lymphocytes were co-cultured in the Biotek 3D environment and treated or not with collagen type III with further analyzes of several parameters. DCs only interacted with CD4⁺ T lymphocytes when in the presence of collagen type III. DCs interaction time with CD4⁺ T lymphocytes decreases with maturation and mature DCs showed a type of interaction where they preferentially interact with a single lymphocyte. Moreover, regarding the interaction with CD8⁺, no differences were observed concerning the interaction time and mature DCs were able to interact repeatedly with the same lymphocyte. Migration assays showed that the presence of collagen type III or even the presence of DCs in different stages of maturation could alter the migration speed of CD8⁺ T lymphocytes. Furthermore, the migratory speed of CD8⁺ T lymphocytes after interaction decreases, and there is a relation to DCs stage of maturation. Full maturation of DCs and the presence of collagen type III induced IL-2 production although T lymphocytes proliferation presented only a tendency to increase. Furthermore, we analyzed all the previous parameters with mature DCs fused with tumor cells from patients with breast cancer or the SKBR-3 cell line co-cultured with T lymphocytes. Our results indicated that cells in Tumor Fusion group interacted with both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, however the SKBR-3 Fusion group interacted only with CD4⁺ T lymphocytes. The CD4⁺ T lymphocytes interacted 2 times more in the SKBR-3 Fusion group than in Control and Tumor Fusion groups. Besides, their interaction was only with a single lymphocyte. CD8⁺ T lymphocytes interaction with the Tumor Fusion group resulted in longer interactions when in comparison with the other two groups and hybrid cells had a reduced migratory speed in comparison with DCs. No IL-2 was observed in cultures where the hybrid cells were present and the proliferation of lymphocytes in Tumor Fusion group was not observed. In conclusion, the 3D co-culture was able to demonstrate that hybrid cells derived from breast cancer had not a similar behavior to the other cells showing the importance of a custom protocol for each tumor type, taking into consideration the unique characteristics.

Keywords: Three-dimensional environment. Hybrid cells. Collagen type III. Dendritic cells. T lymphocytes.

1 INTRODUÇÃO e JUSTIFICATIVA

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O sistema imunológico é um sistema complexo de reconhecimento, composto por diversas células e moléculas que interagem entre si e com outros sistemas do organismo para a manutenção da homeostase. Entre todas as células existentes neste complexo sistema há um tipo celular que desempenha um papel fundamental na organização e modulação da resposta imunológica: as células dendríticas (DCs) (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; BANCHEREAU et al., 2000). Essas células foram identificadas em órgãos linfóides de camundongos e foram caracterizadas de acordo com sua morfologia específica, contendo um grande número de mitocôndrias, endossomos de várias densidades, núcleo irregular e a presença de extensões citoplasmáticas arranjadas na forma de dendritos (STEINMAN; COHN, 1973). Além disso, essas células estão amplamente distribuídas em todo o organismo no qual localizam-se principalmente na pele, nas mucosas e nos órgãos linfóides (BANCHEREAU et al., 2000; SATO; FUJITA, 2007; SERTL et al., 1986; STEINMAN; COHN, 1973; VAN VOORHIS et al., 1982).

Dados da literatura sobre as células dendríticas sugerem que essas células constituem uma heterogênea população que se divide em diferentes subpopulações (ARDAVIN et al., 2001; BANCHEREAU et al., 2000; COLLIN; MCGOVERN; HANIFFA, 2013; NAIK, 2008; TAN; O'NEILL, 2005). Embora a classificação dessas células em subpopulações 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 (BANCHEREAU et al., 2000; COLLIN; MCGOVERN; HANIFFA, 2013; ZIEGLER-HEITBROCK et al., 2010). As DCs plasmocitóides se caracterizam por possuírem uma capacidade de ativação de linfócitos T muito baixa (REIZIS et al., 2011), pela ausência de CD11c e presença de CD123 em sua superfície (COLONNA; TRINCHIERI; LIU, 2005; REIZIS et al., 2011) além de produzirem grandes quantidades de interferon (REIZIS et al., 2011). Já as DCs mielóides tem sido reconhecidas pela expressão de CD11c (O'DOHERTY et al., 1994) e por sua alta capacidade de apresentação de antígenos aos linfócitos T (BANCHEREAU et al., 2000; STEINMAN, 1991). Além disso, Schuler e Steinman (1985) foram os primeiros a descrever que as DCs mielóides apresentavam dois estágios de maturação, denominando-as de DCs imaturas e maduras.

Células dendríticas imaturas residentes em tecidos não-linfóides e em um estado de homeostasia estão principalmente envolvidas na captura e no processamento dos antígenos (BANCHEREAU et al., 2000; GUERMONPREZ et al., 2002). Outra característica importante

deste tipo celular é a expressão de receptores de quimiocinas, como CCR1, CCR2 e CCR5 (SALLUSTO et al., 1998). Quando no tecido de origem ocorrem perturbações na homeostasia, as quais são detectadas por receptores para padrões moleculares amplamente expressos pelas DCs, se inicia o processo de maturação dessas células (BANCHEREAU et al., 2000; DZOPALIC et al., 2012; GUERMONPREZ et al., 2002). Neste processo, as células apresentam redução de sua capacidade endocítica, aumentam a produção de citocinas inflamatórias e passam a expressar, entre outras moléculas, o CCR7 (BANCHEREAU et al., 2000; GUERMONPREZ et al., 2002; SAEKI et al., 1999; SALLUSTO et al., 1998; YANAGIHARA et al., 1998). Do mesmo modo, as DCs maduras expressam outras características interessantes: a) aumentam a densidade de moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) na membrana citoplasmática; b) expressam altos níveis de moléculas coestimuladoras de linfócitos T (CD40, CD80 e CD86) e c) passam a expressar um indicador da maturação, o CD83 (BANCHEREAU et al., 2000; ZHOU; TEDDER, 1996). A mudança de expressão dos receptores de quimiocinas de CCR1, CCR2 e CCR5 para CCR7 favorece a migração das DCs ativadas (e dos linfócitos T “naïve”) para a região paracortical dos linfonodos (CYSTER, 2005; SALLUSTO et al., 1998). As DCs maduras também possuem a capacidade de realizar a apresentação cruzada de antígenos endocitados no contexto de moléculas de classe I do MHC (CARBONE et al., 1998). Devido a essas e outras características, após sua maturação fenotípica e funcional, as DCs tornam-se competentes na ativação de linfócitos T “naïve”, sendo consideradas as principais células apresentadoras de antígenos (APCs) (BANCHEREAU, STEINMAN, 1998; BANCHEREAU et al., 2000; GUERMONPREZ et al., 2002). Dessa forma, tanto linfócitos T auxiliares (CD4⁺) como citotóxicos (CD8⁺) podem ser ativados por esse tipo de DCs. Além disso, as DCs podem ser caracterizadas por outras moléculas, como a ausência de CD14, um conhecido marcador de monócitos (KIERTSCHER; ROTH, 1996; SALLUSTO, LANZAVECCHIA, 1994); a presença de CD1a, molécula apresentadora de lipídeos e glicolipídeos (AQUINO et al., 2011) e PD-L1, que está associada com um perfil tolerogênico (WÖLFLE et al., 2011). Outra molécula que está presente em DCs é o CD209, que se liga com alta afinidade às moléculas de adesão intercelular 3, presentes nos linfócitos, e internaliza antígenos que poderão ser apresentados aos linfócitos T (ENGERING et al., 2002).

Para que a apresentação de antígenos para os linfócitos ocorra, o comportamento e a localização desses dois tipos de células nos órgãos linfóides secundários é essencial. Dentre os vários órgãos linfóides, destacam-se os linfonodos, por se interporem à drenagem linfática de todo o organismo. Estes órgãos são tradicionalmente divididos em três regiões: cortical,

paracortical e medular. A região cortical está localizada periféricamente e apresenta folículos linfóides compostos por agregados de linfócitos B. Dentro de cada uma dessas estruturas é possível identificar um centro germinativo, que corresponde à área onde ocorre a multiplicação mais intensa e a ativação de linfócitos B (KALDJIAN et al., 2001; WILLARD-MACK, 2006). No folículo também encontramos um tipo celular especializado, a célula dendrítica folicular, que, embora tenha nome semelhante às DCs, tem origem e funções muito diversas (REZK et al., 2013). A região paracortical, situada na interface das regiões cortical e medular, apresenta predomínio de linfócitos T CD4⁺ além de linfócitos T CD8⁺, DCs, macrófagos e as células reticulares. As células reticulares são responsáveis pela síntese e secreção de moléculas de matriz extracelular, que se organizam em fibras reticulares. As fibras colágenas reticulares são muito delgadas e constituídas predominantemente pelo colágeno do tipo III, além de colágeno do tipo I, ambos associados a um elevado teor de proteoglicanos, glicoproteínas e componentes da lamina basal (CASTAÑOS-VELEZ; BIBERFELD; PATARROYO, 1995; KARTTUNEN et al., 1989; KRAMER; ROSEN; MECDONALD, 1988; SOBOCINSKI et al., 2010; WILLARD-MACK, 2006). É nesta região que ocorre a apresentação de antígenos pelas DCs para os linfócitos T (CYSTER, 2005; INGULLI et al., 1997; TAKAHASHI et al., 2001). Por último, a região medular é composta de cordões e seios medulares, sendo rica em macrófagos e plasmócitos (WILLARD-MACK, 2006).

Considerando o papel das DCs na ativação da resposta imune e que seu estágio de maturação funcional influencia significativamente o padrão de resposta imune (BANCHEREAU et al., 2000; PULENDRAN, 2004), essas células tem sido bastante exploradas como instrumentos de imunomodulação (BARBUTO, 2013; GANGULY et al., 2013; VASSALLI, 2013). Dentre estas abordagens, estratégias de vacinação terapêutica contra o câncer tem sido amplamente estudadas (BARBUTO et al., 2004; BARBUTO, 2013; VIK-MO et al., 2013; WANG et al., 2009). A maioria dos protocolos de imunização contra o câncer baseada em DCs não usa o isolamento direto destas células a partir dos tecidos, mas explora a possibilidade da diferenciação *in vitro* de precursores sanguíneos e da medula óssea em DCs funcionais (BARBUTO et al., 2004; CAUX et al., 1996; ORSINI et al., 2013; RAMOS et al., 2012; SALLUSTO, LANZAVECCHIA, 1994; VIK-MO et al., 2013). Neste contexto, existem diferentes estratégias de geração de vacinas antitumorais: as DCs podem ser incubadas com peptídeos sintéticos (MAYORDOMO et al., 1995; NIU et al., 2012; ROSALIA et al., 2013); com lisados tumorais (CHIANG et al., 2013; KIM et al., 2006; REYES et al., 2013); com proteínas de choque térmico (HSPs) isoladas de células tumorais

(CASEY et al., 2003; KUROTAKI et al., 2007; PRZEPIORKA; SRIVASTAVA, 1998); ou transfectadas/eletroporadas com RNA tumoral (VAN NUFFEL et al., 2010; VIK-MO et al., 2013; ZHANG et al., 2006). Outra abordagem que vem sendo estudada é o direcionamento de antígenos às DCs, por estratégias diferentes como, por exemplo, o acoplamento do antígeno a anticorpos direcionados contra moléculas características das DCs (BONIFAZ et al., 2004) ou o uso de peptídeos acoplados a receptores do tipo Toll (BALEEIRO et al., 2010).

Outras abordagens ainda procuram modificar as próprias DCs, seja pela transdução com genes para citocinas (KOYA et al., 2004; OJIMA et al., 2006) ou com genes que codificam moléculas co-estimuladoras (WIETHE et al., 2003). Ainda considerando a apresentação de antígenos, mas buscando outra estratégia, para o conseguir, há estudos procurando investigar se exossomos, nanovesículas originadas de compartimentos endossomais (JOHNSTONE et al., 1987), derivados das células tumorais (LI et al., 2013) ou de DCs (CHAPUT et al., 2004; ROMAGNOLI, 2012; VIAUD et al., 2009) podem ser usados como instrumentos para a imunoterapia.

Vale ressaltar que muitas das informações que temos sobre os tumores e a resposta anti-tumoral se deve, sem dúvida, a utilização de células tumorais primárias (BARBUTO et al., 2004; VIK-MO et al., 2013), mas também devido ao uso de linhagens tumorais (ROSENBLATT et al., 2013; ZHANG et al., 2014; ZHENG; SHU, 2011). O uso de linhagens tumorais possui diversas vantagens, como o seu crescimento rápido e contínuo, proliferação quase ilimitada, homogeneidade fenotípica e a possibilidade de realizar um elevado número de testes em um reduzido intervalo de tempo, permitindo assim maior reprodutividade dos resultados e uma redução dos ensaios com animais (COIMBRA, 2008). A partir de tais estudos, diversos grupos vem utilizando a imunização de portadores de neoplasias com células dendríticas fundidas com células tumorais para a indução da resposta imune contra o tumor (BARBUTO et al., 2004; ROSENBLATT et al., 2013; ZHANG et al., 2014; ZHENG, SHU, 2011). Na estratégia usada em nosso laboratório, as células híbridas dendríticas-tumorais são obtidas através da fusão de células tumorais do paciente com DCs alogênicas, obtidas de doadores saudáveis. Essa estratégia contorna um obstáculo potencial: o fato de que a diferenciação de DCs a partir de células precursoras de pacientes portadores de câncer não é tão eficiente quanto a diferenciação de células obtidas de doadores saudáveis (AZEVEDO; LAGINHA; BARBUTO, 2007; EISENDLE et al., 2005; NEVES et al., 2005; ORSINI et al., 2013, RAMOS et al., 2012). Com a fusão, espera-se que as células fundidas passem a apresentar antígenos tumorais no contexto de moléculas codificadas pelo MHC, tanto autólogas (do tumor), quanto alogênicas (das próprias DCs), acrescentando um efeito

alogenêico ao estímulo tumor-específico. Esta abordagem trouxe benefício clínico a pacientes com carcinoma renal ou melanoma metastáticos vacinados, com estabilização da doença por períodos superiores a seis meses (BARBUTO et al., 2004). Além do mais, estes pacientes apresentaram recuperação da função das DCs, avaliada pela expressão das moléculas CD80, CD83 e CD86, além da aquisição da capacidade de indução da secreção de interferon- γ em culturas mistas linfocitárias (NEVES et al., 2005). Com esses resultados promissores, nosso laboratório vem tentando estabelecer um novo protocolo para pacientes com câncer de mama. O câncer de mama é segundo tipo mais frequente no mundo, e é o mais comum entre as mulheres, respondendo por 22% dos casos novos a cada ano (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014).

Embora animadores, nossos resultados ainda estão longe de atingirem todo o potencial que se poderia se esperar da estratégia. Parte disto se deve, sem dúvida, à heterogeneidade dos tumores tratados e do estado imunológico dos pacientes. Todavia, também há muito que se estabelecer quanto à função imunoestimuladora das células híbridas usadas. Além dos métodos usuais pelos quais se podem estudar as diferentes funções destas células, uma abordagem relativamente recente pode acrescentar ainda mais à caracterização funcional das mesmas: o cultivo em ambiente tridimensional (3D).

Nossa compreensão atual de muitos processos biológicos é amplamente baseada em estudos de populações de células cultivadas em ambientes bidimensionais (2D) e em modelos animais. Porém, essas culturas 2D acabam forçando as células a se ajustarem a uma superfície linear artificial, plana e rígida, assim interferindo diretamente sobre a morfologia celular, a polaridade, o metabolismo e a motilidade, não captando fielmente o comportamento fisiológico das células *in vivo* (BAKER; CHEN, 2012; LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008). Já os modelos animais são importante fonte de informações mas são limitados para estudos com seres humanos devido ao alto grau de diversidade de mecanismos funcionais e moleculares entre as espécies (RANGARAJAN et al., 2004; TEKLEMBURG; MACKLON, 2009). Portanto, modelos 3D *in vitro* proporcionam uma terceira abordagem que faz a ponte entre a cultura de células e modelos animais tradicionais (FEDER-MENGUS et al., 2008; GRIFFITH; SWARTZ, 2006; YAMADA; CUKIERMAN, 2007).

O primeiro estudo relatado de uma cultura 3D foi realizado por Carrel em 1912 em que cultivava cardiomiócitos e percebeu que a região mais central de suas colônias apresentava elevado índice de necrose. Como solução a este obstáculo, os cardiomiócitos passaram a ser cultivados sobre uma superfície constituída por fios de seda permitindo uma maior interação

das células com o ambiente. Desde então, o número de trabalhos utilizando essa nova metodologia cresce em grandes proporções.

As culturas 3D vem sendo utilizadas em diversos trabalhos, como em modelos para estudo de células tumorais (FREITAS; JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2008; LEE et al., 1985; SHAW; WROBEL; BRUGGE, 2004; XU et al., 2010), na análise de respostas terapêuticas a medicamentos (DORJ et al., 2013; YIP; CHO, 2013), em doenças autoimunes (SOLOMON et al., 2004), na diferenciação de células-tronco (HOLMES et al., 2013; NAITO et al., 2011), entre outros. Assim, existem diversos tipos de cultura 3D que representam a mais complexa estrutura tridimensional *in vivo* e restauram características histomorfológicas e funcionais do tecido original. Graças a essa nova abordagem *in vitro* muito se tem aprendido sobre o comportamento de células imunológicas e células tumorais (COUGOULE et al., 2012; DEBNATH; BRUGGE, 2005; FREITAS; JAEGER, 2002; FREITAS et al., 2008; LEE et al., 1985; REICHARDT; GUNZER; GUNZER, 2007; SHAW; WROBEL; BRUGGE, 2004; XU et al., 2010). Por exemplo, em estudo realizado por Lee et al. (1985) descreve que em culturas 3D de colágeno, as células mamárias passam a secretar beta-caseína, a proteína do leite.

Em estudo realizado por Gunzer et al. (2000a) usando um modelo 3D de matriz de colágeno do tipo I, DCs imaturas murinas foram caracterizadas pela baixa migração, enquanto DCs maduras murinas apresentaram uma alta atividade migratória. Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo e utilizando o mesmo modelo 3D, DCs interagiram com linfócitos T e mantiveram essa interação de forma contínua ao longo de sua superfície por curtos períodos. Esses encontros repetidos levaram a um influxo de cálcio nos linfócitos T e a ativação celular medida pelo aumento dos marcadores de ativação e pela proliferação (GUNZER et al., 2000b). Foi observado também que linfócitos T humanos são capazes de migrar em ambiente 3D revestido de colágeno do tipo I, mas não em Matrigel (COUGOULE et al., 2012). Entretanto, Hachehouche, Chetoui e Aoudjit (2010) mostraram que linfócitos T humanos possuem uma capacidade de migrar através de uma matriz 3D revestida de Matrigel e que, quando ativada por anti-CD3, sua capacidade migratória foi 3 vezes maior. Considerando a organização do sistema imunológico, é evidente que o movimento de suas células é um requisito indispensável para a sua função. As interações celulares, ocorrendo tanto no local de efetuação da resposta, quanto nos órgãos linfoides, permitem que informações capturadas num local do organismo influenciem a função de células em outro compartimento, direcionando a resposta para o restabelecimento da homeostasia e da capacidade das células de migrarem de maneira direcionada no organismo. Além disso, células do sistema imunológico que

interagem transientemente entre si para a troca de sinais específicos, podem apresentar alteração desses sinais se a polaridade celular e a tridimensionalidade forem diferentes *in vivo* (GUNZER et al., 2000b; PAGE; FLOOD; REYNAUD, 2013; REICHARDT; GUNZER; GUNZER, 2007; SCHMEICHEL; BISSELL, 2003).

Tasaki et al. (2004) utilizaram um sistema 3D que consistia na presença de DCs derivadas de monócitos humanos embebidas em um gel de colágeno do tipo I na camada inferior e, na camada superior, outro gel de colágeno do tipo I contendo células tumorais necróticas e/ou linfócitos T. Eles mostraram a migração de DCs em direção às células tumorais e linfócitos T e apresentação de antígenos tumorais para os linfócitos T pelas DCs. Além disso, exemplos do potencial desta estratégia também podem ser encontrados na análise das interações entre linfócitos T citotóxicos e células tumorais. Alguns estudos que abordaram este tópico encontraram um fenômeno intrigante: linfócitos T citotóxicos (CTLs) tumor-específicos, capazes de reconhecer células tumorais em culturas convencionais, falharam em culturas 3D (DANGLES-MARIE et al., 2003; FEDER-MENGUS et al., 2007; FISCHER et al., 2007; GHOSH et al., 2005; SANTINI et al., 2004). As explicações para esta observação ainda não são bem conhecidas, mas existem dados sugestivos de que em um ambiente 3D, existe uma menor possibilidade de interação das células tumorais com as CTLs, possivelmente por alterações conformacionais (FEDER-MENGUS et al., 2007). Essas mudanças conformacionais em células tumorais modulam também os perfis de expressão gênica, diminuindo a susceptibilidade ao ataque das CTLs (GHOSH et al., 2005). Outra possibilidade sugerida é a produção de ácido láctico, que, produzido em alta quantidade por células tumorais cultivadas em esferoides, tem capacidade de suprimir a proliferação e a produção de citocinas por CTLs humanas (FISCHER et al., 2007). Outros trabalhos encontrando resultados similares, argumentam que o fenômeno poderia ser decorrente de uma deficiência no reconhecimento das células tumorais pelas CTLs causada pela diminuição da expressão de HSPs (DANGLES-MARIE et al., 2003) ou da modificação do metabolismo lipídico (SANTINI et al., 2004) nas células tumorais cultivadas nestes ambientes.

Outrossim, a composição do arcabouço responsável pelo estabelecimento do ambiente 3D pode ser modificada e, assim, influenciar significativamente o estado funcional das diferentes células (COUGOULE et al., 2012; DHIMOLEA et al., 2010). Debnath e Brugge (2005) mostraram que quando as células epiteliais foram cultivadas em ambiente 3D, características do tecido de origem que de outra maneira não eram observadas, passavam a ser identificadas na cultura. Na verdade, não se pode ignorar a complexidade inerente à matriz extracelular (MEC), uma vez que a decisão final de uma célula para se diferenciar, proliferar,

migrar, entrar em apoptose ou executar outras funções específicas, é resultado de uma resposta bem coordenada de sua interação com os componentes da MEC e com as células vizinhas (SCHMIDT; FRIEDL, 2010; SCHUPPAN; RÜHL, 1994; STERN et al., 2009).

Frente a estas observações, percebe-se que o estudo em culturas 3D pode trazer informações novas e potencialmente relevantes para a compreensão das diversas interações celulares na resposta imunológica, inclusive daquela induzida pelas células híbridas dendríticas-tumorais usadas em vacinação terapêutica antitumoral por nosso grupo. Serão estas células capazes de interagir e/ou ativar, preferencialmente, uma ou outra subpopulação linfocitária? O padrão de interações é influenciado por modificações nas DCs ou nos diferentes componentes da matriz? Para responder a estas questões, culturas em ambientes 3D são essenciais e podem acrescentar novas variáveis ao estudo da imunoterapia do câncer.

De modo geral, as principais propriedades estruturais de biomateriais desejadas para a construção de um cultivo 3D são a permeabilidade (para permitir o crescimento e a organização celular), porosidade (para manter as células em sua conformação natural) e a conectividade (para permitir o fluxo livre de oxigênio e nutrientes em torno da massa de células em crescimento) (LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008). Outra propriedade importante para a criação de um ambiente 3D é a utilização de diferentes componentes da MEC que podem ou não ser utilizados em associação com os biomateriais com o objetivo criar uma maior semelhança com as condições de um organismo vivo (LEE; CUDDIHY; KOTOV, 2008; PAGE; FLOOD; REYNAUD, 2013). Entre os componentes utilizados comumente, podemos destacar os colágenos e o Matrigel. O Matrigel é composto por diversas proteínas estruturais, proteoglicanos e fatores de crescimento que se assemelham ao ambiente extracelular encontrado em muitos tecidos (KLEINMAN; MARTIN, 2005). Além dos componentes já presentes no Matrigel, outro integrante essencial da MEC são os colágenos. Apesar de diversos estudos demonstrarem que a estrutura de colágeno tipo I é capaz de dar suporte à organização celular (COUGOULE et al., 2012; GUNZER et al., 2000a,b; TASAKI et al., 2004), sabe-se que o colágeno do tipo III é capaz de promover a migração de células da hipófise (GONZÁLEZ et al., 2004) e é o principal componente da matriz do linfonodo, em especial das regiões cortical e paracortical (KRAMER; ROSEN; MECDONALD, 1988), podendo estar envolvido com a migração celular nestes compartimentos. Surpreendentemente, sabendo-se que as interações DC-linfócitos ocorrem nessas regiões, não existem trabalhos referentes às interações imunológicas em 3D utilizando o colágeno III ou ainda alguma mistura de outros componentes de matriz tipicamente presentes em órgãos reticulares.

Assim, no presente estudo, pretende-se acrescentar novos aspectos à análise funcional

das células híbridas dendríticas-tumorais utilizadas em vacinação antitumoral. Entre estes, a contribuição das variáveis dimensionais e de composição da matriz onde as interações ocorrem, podem, além de aprofundar a compreensão da fisiologia deste sistema terapêutico, oferecer novas estratégias de modulação e aperfeiçoamento da abordagem.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho apresentamos um novo modelo de cocultura 3D *in vitro* que permitiu determinar as consequências da interação de diferentes células apresentadoras de antígenos com linfócitos T, indicando haver grande influência dos componentes usados na construção do ambiente, das células e do estado de maturação das mesmas sobre o efeito que exercem sobre os linfócitos T, os quais apresentam modificações em sua atividade migratória, sua proliferação e produção de citocinas, todas mensuráveis no modelo.

Assim, pode-se concluir que esta forma de análise pode contribuir de maneira significativa para a compreensão da biologia da resposta imunológica de modo geral e, especificamente, para o aprimoramento de estratégias de imunização utilizando células apresentadoras de antígenos geradas *in vitro*, como é o caso da imunização com células híbridas dendríticas-tumorais para o tratamento do câncer.

Usando este método, foi possível concluir que:

- ✓ O ambiente 3D Biotek acrescido de colágeno III permite análise tridimensional das interações celulares de maneira reprodutiva;
- ✓ Embora outras interações entre DCs e linfócitos T prescindam do colágeno III, a presença deste é necessária para que se observem interações entre linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e DCs;
- ✓ Os parâmetros analisados (porcentagem, tipo e tempo) das interações celulares de DCs em diferentes estágios de maturação com diferentes subpopulações de linfócitos T permitiram a sugestão de um novo modelo de interação entre estas células: o modelo de encontro seriado longo;
- ✓ A presença de um substrato e a presença de DCs em diferentes estágios de maturação podem alterar a migração dos linfócitos T CD3⁺CD8⁺;
- ✓ A fase de maturação das DCs afeta suas interações com os linfócitos T e também o comportamento dos linfócitos T, tanto dos que interagem diretamente com elas quanto dos que não o fazem diretamente;
- ✓ A maturação completa das DCs e a presença de colágeno III induziram a produção de IL-2 nas co-culturas com linfócitos T, indicado que possa estar ocorrendo uma ativação fisiológica do sistema imunológico que, conseqüentemente, é acompanhada da expressão de moléculas reguladoras dessa mesma ativação.

- ✓ Os resultados dos grupos Fusão Linhagem e Fusão Tumoral indicam que o uso da linhagem SKBR-3 não é aconselhado para estes ensaios de interação celular e protocolo de vacinação, pois células híbridas que as contêm, possuem comportamento diverso daquelas produzidas a partir de células obtidas diretamente dos tumores das pacientes;
- ✓ Quando analisados porcentagem, tempo e tipo de interações, o grupo Fusão Tumoral mostrou interações com linfócitos T $CD3^+CD4^+$ e com linfócitos T $CD3^+CD8^+$ observando uma predisposição a interações de encontro serial longo, embora não estão sendo ativados após a interação;
- ✓ Células híbridas apresentaram a velocidade de migração reduzida quando comparadas as DCs.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

ADAMS, J. C.; WATT, F. M. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. **Development.**, v. 117, n. 4, p. 1183-1198, 1993

ALFERINK, J.; LIEBERAM, I.; REINDL, W.; BEHRENS, A.; WEISS, S.; HÜSER, N.; GERAUER, K.; ROSS, R.; RESKE-KUNZ, A. B.; AHMAD-NEJAD, P.; WAGNER, H. FÖRSTER, I. Compartmentalized production of CCL17 in vivo: strong inducibility in peripheral dendritic cells contrasts selective absence from the spleen. **J. Exp. Med.**, v. 197, n. 5, p. 585-599, 2003.

ALGARRA, I.; GARCÍA-LORA, A.; CABRERA, T.; RUIZ-CABELLO, F., GARRIDO, F. The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 53, n. 10, p. 904-910, 2004

AQUINO, A.; GRAZIANI, G.; FRANZESE, O.; PRETE, S. P.; BONMASSAR, E.; BONMASSAR, L.; D'ATRI, S. Exogenous control of the expression of Group I CD1 molecules competent for presentation of microbial nonpeptide antigens to human T lymphocytes. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 2011, p. 1-27, 2011.

ARDAVÍN, C.; MARTÍNEZ DEL HOYO, G.; MARTÍN, P.; ANJUÈRE, F.; ARIAS, C. F.; MARÍN, A. R.; RUIZ, S.; PARRILLAS, V.; HERNÁNDEZ, H. Origin and differentiation of dendritic cells. **Trends Immunol.**, v. 22, n. 12, p. 691-700, 2001.

AZEVEDO, A. P. S.; LAGINHA, F.; BARBUTO, J. A. M. Phenotypic and functional characterization of monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients. In: 13TH INTERNATIONAL CONGRESS OF IMMUNOLOGY, 2007. **Abstracts**. Rio de Janeiro, 2007, res. G07-099.

BAKER, B. M.; CHEN, C. S. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. **J. Cell. Sci.**, v. 1, n. 125, p. 3015-3024, 2012.

BALEEIRO, R.; DAHNE, L.; BAUDE, B.; LADEMANN, J.; WIESMULLER, K.; WALDEN, P. Induction of specific CD8+ T cell proliferation by human DC loaded with peptide coupled to TLR agonist. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DENDRITIC CELLS IN FUNDAMENTAL AND CLINICAL IMMUNOLOGY, 2010. **Abstracts**. Lugano, Suíça: Institute for Research in Biomedicine and Swiss Vaccine Research Institute, 2010. res. P03-081.

BALLESTEROS-TATO, A.; LEÓN, B.; GRAF, B. A.; MOQUIN, A.; ADAMS, P. S.; LUND, F. E.; RANDALL, T. D. Interleukin-2 inhibits germinal center formation by limiting T follicular helper cell differentiation. **Immunity.**, v. 36, n. 5. p. 586-847, 2012.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y. J. PULENDRAN B, PALUCKA K. Immunobiology of dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, n. 3, p. 767-811, 2000.

¹De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-52, 1998.

BARBUTO, J. A. Are dysfunctional monocyte-derived dendritic cells in cancer an explanation for cancer vaccine failures? **Immunotherapy**, v. 5, n. 2, p. 105-107, 2013.

BARBUTO, J. A.; ENSINA, L. F.; NEVES, A. R.; BERGAMI-SANTOS, P.; LEITE, K. R.; MARQUES, R.; COSTA, F.; MARTINS, S. C.; CAMARA-LOPES, L. H.; BUZAID, A. C. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 53, n. 12, p. 1111-1118, 2004.

BENVENUTI, F.; LAGAUDRIÈRE-GESBERT, C.; GRANDJEAN, I.; JANCIC, C.; HIVROZ, C.; TRAUTMANN, A.; LANTZ, O.; AMIGORENA, S. Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. **J. Immunol.**, v. 172, n. 1, p. 292-301, 2004.

BONIFAZ, L.C.; BONNYAY, D.P.; CHARALAMBOUS, A.; DARGUSTE, D. I.; FUJII, S.; SOARES, H.; BRIMNES, M. K.; MOLTEDO, B.; MORAN, T. M.; STEINMAN, R. M. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. **J. Exp. Med.**, v. 199, n. 6, p. 815-824, 2004.

BOUSSO, P.; ROBEY, E. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. **Nat. Immunol.**, v. 4, n. 6, p. 579-585, 2003.

BREART, B.; BOUSSO, P. Cellular orchestration of T cell priming in lymph nodes. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 18, n. 4, p. 483-490, 2006.

CAO, X.; SUGITA, M.; VAN DER WEL, N.; LAI, J.; ROGERS, R. A.; PETERS, P. J.; BRENNER, M. B. CD1 molecules efficiently present antigen in immature dendritic cells and traffic independently of MHC class II during dendritic cell maturation. **J. Immunol.**, v. 169, n. 9, p. 4770-4777, 2002.

CARBONE FR1, KURTS C, BENNETT SR, MILLER JF, HEATH WR. Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. **Immunol. Today**, v. 19, n. 8, p. 368-373, 1998.

CARREL, A. On the permanent life of tissues outside of the organism. **J. Exp. Med.**, v. 15, n. 5, p. 516-528, 1912.

CASEY, D. G.; LYSAGHT, J.; JAMES, T.; BATEMAN, A.; MELCHER, A. A.; TODRYK, S. M. Heat shock protein derived from a non-autologous tumour can be used as an anti-tumour vaccine. **Immunology**, v. 110, n. 1, p. 105-111, 2013.

CASTAÑOS-VELEZ, E.; BIBERFELD, P.; PATARROYO, M. Extracellular matrix proteins and integrin receptors in reactive and non-reactive lymph nodes. **Immunology**, v. 86, n. 2, p. 270-278, 1995.

CASTELLINO, F.; HUANG, A. Y.; ALTAN-BONNET, G.; STOLL, S.; SCHEINECKER, C.; GERMAIN, R. N. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. **Nature**, v. 440, n. 7086, p. 890-895, 2006.

CAUX, C.; MASSACRIER, C.; VANBERVLIET, B.; DUBOIS, B.; VAN KOOTEN, C.; DURAND, I.; BANCHEREAU, J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. **J. Exp. Med.**, v. 180, n. 4, p. 1263-1272, 1994.

Caux, C.; Vanbervliet, B.; Massacrier, C.; Dezutter-Dambuyant, C.; de Saint-Vis, B.; Jacquet, C.; Yoneda, K.; Imamura, S.; Schmitt, D.; Banchereau, J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. **J. Exp. Med.**, v. 184, n. 2, p. 695-706, 1996.

CHAPUT, N.; SCHARTZ, N. E.; ANDRÉ, F.; TAÏEB, J.; NOVAULT, S.; BONNAVENTURE, P.; AUBERT, N.; BERNARD, J.; LEMONNIER, F.; MERAD, M.; ADEMA, G.; ADAMS, M.; FERRANTINI, M.; CARPENTIER, A. F.; ESCUDIER, B.; TURSZ, T.; ANGEVIN, E.; ZITVOGEL, L. Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. II. Exosomes in CpG adjuvants efficiently prime naive Tc1 lymphocytes leading to tumor rejection. **J. Immunol.**, v. 172, n. 4, p. 2137-2146, 2004.

CHIANG, C. L.; KANDALAFT, L. E.; TANYI, J.; HAGEMANN, A. R.; MOTZ, G. T.; SVORONOS, N.; MONTONE, K.; MANTIA-SMALDONE, G. M.; SMITH, L.; NISENBAUM, H. L.; LEVINE, B. L.; KALOS, M.; CZERNIECKI, B. J.; TORIGIAN, D. A.; POWELL, D. J. JR.; MICK, R.; COUKOS, G. A dendritic cell vaccine pulsed with autologous hypochlorous acid-oxidized ovarian cancer lysate primes effective broad antitumor immunity: from bench to bedside. **Clin. Cancer Res.**, v. 19, n. 17, p. 4801-4815, 2013.

COLLIN, M.; MCGOVERN, N.; HANIFFA, M. Human dendritic cell subsets. **Immunology.**, v. 140, n. 1, p. 22-30, 2013.

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

CÔTÉ, S. C.; PASVANIS, S.; BOUNOU, S.; DUMAIS, N. CCR7-specific migration to CCL19 and CCL21 is induced by PGE(2) stimulation in human monocytes: Involvement of EP(2)/EP(4) receptors activation. **Mol. Immunol.**, v. 46, n. 13, p. 2682-2693, 2009.

COUGOULE, C.; VAN GOETHEM, E.; LE CABEC, V.; LAFOURESSE, F.; DUPRÉ, L.; MEHRAJ, V.; MÈGE, J. L.; LASTRUCCI, C.; MARIDONNEAU-PARINI, I. Blood leukocytes and macrophages of various phenotypes have distinct abilities to form podosomes and to migrate in 3D environments. **Eur. J. Cell. Biol.**, v. 91, n. 12, p. 938-949, 2012.

CYSTER, J. G. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 127-159, 2005.

DANGLES-MARIE, V.; RICHON, S.; EL-BEHI, M.; ECHCHAKIR, H.; DOROTHÉE, G.; THIERY, J.; VALIDIRE, P.; VERGNON, I.; MENEZ, J.; LADJIMI, M.; CHOUAIB, S.; BELLET, D.; MAMI-CHOUAIB, F. A three-dimensional tumor cell defect in activating autologous CTLs is associated with inefficient antigen presentation correlated with heat shock protein-70 down-regulation. **Cancer Res.**, v. 63, n. 13, p. 3682-3687, 2003.

DAVIDSON, B.; ELSTRAND, M. B.; MCMMASTER, M. T.; BERNER, A.; KURMAN, R. J.; RISBERG, B.; TROPE, C. G.; SHIH, I. E. M. HLA-G expression in effusions is a possible

marker of tumor susceptibility to chemotherapy in ovarian carcinoma. **Gynecol. Oncol.**, v. 96, n. 1, p. 42-47, 2005.

DEBNATH, J.; BRUGGE, J. S.; Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 5, n. 9, p. 675-688, 2005.

DHIMOLEA, E.; MAFFINI, M. V.; SOTO, A. M.; SONNENSCHNEIN, C. The role of collagen reorganization on mammary epithelial morphogenesis in a 3D culture model. **Biomaterials.**, v. 2 n. 13, p. 3622– 3630, 2010.

DIEU, M. C.; VANBERVLIET, B.; VICARI, A.; BRIDON, J. M.; OLDHAM, E.; AÏT-YAHIA, S.; BRIÈRE, F.; ZLOTNIK, A.; LEBECQUE, S.; CAUX, C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. **J. Cell Sci.**, v. 15, n. 116, p. 2377-2388, 2003.

Dorj, B.; Won, J. E.; Purevdorj, O.; Patel, K. D.; Kim, J. H.; Lee, E. J.; Kim, H. W. A novel therapeutic design of microporous-structured biopolymer scaffolds for drug loading and delivery. **Acta. Biomater.**, v. 13, p. 1742-7061, 2013.

DORNER, B.; MÜLLER, S.; ENTSCHLADEN, F.; SCHRÖDER, J. M.; FRANKE, P.; KRAFT, R.; FRIEDL, P.; CLARK-LEWIS, I.; KROCZEK, R. A. Purification, structural analysis, and function of natural ATAC, a cytokine secreted by CD8(+) T cells. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 13, p. 8817-8823, 1997.

DUTTA, N.; MAJUMDER, D.; GUPTA, A.; MAZUMDER, D. N.; BANERJEE, S. Analysis of human lymphocyte antigen class I expression in gastric cancer by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Hum. Immunol.**, v. 66, n. 2, p. 164-169, 2005.

DUTTA, R. C.; DUTTA, A. K. Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications. **Biotechnol. Adv.**, v. 27, n. 4, p. 334-339, 2009.

DZOPALIC, T.; RAJKOVIC, I.; DRAGICEVIC, A.; COLIC, M. The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. **Immunol. Res.**, v. 52, n. 2, p. 20-33, 2012.

EISENDLE, K.; WOLF, D.; GASTL, G.; KIRCHER-EIBL, B. Dendritic cells from patients with chronic myeloid leukemia: functional and phenotypic features. **Leuk. Lymphoma.**, v. 46, n. 5, p. 663-670, 2005.

ENGERING, A.; GEIJTENBEEK, T. B.; VAN VLIET, S. J.; WIJERS, M.; VAN LIEMPT, E.; DEMAUREX, N.; LANZAVECCHIA, A.; FRANSEN, J.; FIGDOR, C. G.; PIGUET, V.; VAN KOOYK, Y. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. **J. Immunol.**, v. 168, n. 5, p. 2118-2126, 2002.

ENTSCHLADEN, F.; NIGGEMANN, B.; ZÄNKER, K. S.; FRIEDL, P. Differential requirement of protein tyrosine kinases and protein kinase C in the regulation of T cell locomotion in three-dimensional collagen matrices. **J. Immunol.**, v. 159, n. 7, p. 3203-3210, 1997.

FAVIER, B.; LEMAULT, J.; ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; MENIER, C.; CAROSELLA, E.

D. Research on HLA-G: an update. **Tissue Antigens.**, v. 69, n. 3, p. 207-211, 2007.

FEDER-MENGUS, C.; GHOSH, S.; RESCHNER, A.; MARTIN, I.; SPAGNOLI, G. C. New dimensions in tumor immunology: what does 3D culture reveal? **Trends Mol. Med.**, v. 14, n. 8, p. 333-340, 2008.

FEDER-MENGUS, C.; GHOSH, S.; WEBER, W. P.; WYLER, S.; ZAJAC, P.; TERRACCIANO, L.; OERTLI, D.; HEBERER, M.; MARTIN, I.; SPAGNOLI, G. C.; RESCHNER, A. Multiple mechanisms underlie defective recognition of melanoma cells cultured in three-dimensional architectures by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. **Br. J. Cancer.**, v. 96, n. 7, p. 1072-1082, 2007.

FENG, C. H.; CHENG, Y. C.; CHAO, P. H. The influence and interactions of substrate thickness, organization and dimensionality on cell morphology and migration. **Acta Biomater.**, v. 9, n. 3, p. 5502-5510, 2013.

FISCHER, K.; HOFFMANN, P.; VOELKL, S.; MEIDENBAUER, N.; AMMER, J.; EDINGER, M.; GOTTFRIED, E.; SCHWARZ, S.; ROTHE, G.; HOVES, S.; RENNER, K.; TIMISCHL, B.; MACKENSEN, A.; KUNZ-SCHUGHART, L.; ANDREESSEN, R.; KRAUSE, S. W.; KREUTZ, M. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. **Blood.**, v. 109, n. 9, p. 3812-3819, 2007.

FREITAS, V. M.; JAEGER, R. G. The effect of laminin and its peptide SIKVAV on a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line. **Virchows Arch.**, v. 441, n. 6, p. 569-576, 2002.

FREITAS, V. M.; RANGEL, M.; BISSON, L. F.; JAEGER, R. G.; MACHADO-SANTELLI, G. M. The geodiamolide H, derived from Brazilian sponge *Geodia corticostylifera*, regulates actin cytoskeleton, migration and invasion of breast cancer cells cultured in three-dimensional environment. **J. Cell Physiol.**, v. 216, n. 3, p. 583-594, 2008.

FRIEDL, P.; BRÖCKER, E. B. Reconstructing leukocyte migration in 3D extracellular matrix by time-lapse videomicroscopy and computer-assisted tracking. **Methods Mol. Biol.**, v. 239, n. 23, p. 77-90, 2004.

FRIEDL, P.; ENTSCHLADEN, F.; CONRAD, C.; NIGGEMANN, B.; ZÄNKER, K. S. CD4⁺ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 2331–2343, 1998.

FRIEDL, P.; GUNZER, M.; Interaction of T cells with APCs: the serial encounter model. **Trends Immunol.**, v. 22, n. 4, p. 187-191, 2001.

FRIEDL, P.; NOBLE, P. B.; SHIELDS, E. D.; ZÄNKER, K. S. Locomotor phenotypes of unstimulated CD45RA^{high} and CD45RO^{high} CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in three-dimensional collagen lattices. **Immunology.**, v. 82, n. 617–624, 1994.

FRIEDL, P.; NOBLE, P. B.; ZÄNKER, K. S. Lymphocyte migration in three-dimensional collagen gels. Comparison of three quantitative methods for analysing cell trajectories. **J. Immunol. Meth.**, v. 165, p. 157–165, 1993.

GANGULY, D.; HAAK, S.; SISIRAK, V.; REIZIS, B. The role of dendritic cells in autoimmunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 13, n. 8, p. 566-577, 2013.

GEIJTENBEEK, T. B.; TORENSMA, R.; VAN VLIET, S. J.; VAN DUIJNHOFEN, G. C.; ADEMA, G. J.; VAN KOOYK, Y.; FIGDOR, C. G. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. **Cell.**, v. 100, n. 5, p. 575-585, 2000.

GHOSH, S.; ROSENTHAL, R.; ZAJAC, P.; WEBER, W. P.; OERTLI, D.; HEBERER, M.; MARTIN, I.; SPAGNOLI, G.C.; RESCHNER, A. Culture of melanoma cells in 3-dimensional architectures results in impaired immunorecognition by cytotoxic T lymphocytes specific for Melan-A/MART-1 tumor-associated antigen. **Ann. Surg.**, v. 242, n. 6, p. 851-857, 2005.

GONZÁLEZ, B.; SOLANO-AGAMA MDEL, C.; GONZÁLEZ DEL PLIEGO, M.; MENDOZA-GARRIDO, M. E. Differences in cell migration of cultured pituitary cells from infantile and adult rats: participation of the extracellular matrix and epidermal growth factor. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 22, n. 4, p. 231-239, 2004.

GRETZ, J. E.; ANDERSON, A. O.; SHAW, S. Cords, channels, corridors and conduits: critical architectural elements facilitating cell interactions in the lymph node cortex. **Immunol. Rev.**, v. 156, p. 11-24, 1997.

GRIFFITH, L. G.; SWARTZ, M. A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.7, n. 3, p. 211-224, 2006.

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

GUNZER, M.; FRIEDL, P.; NIGGEMANN, B.; BRÖCKER, E. B.; KÄMPGEN, E.; ZÄNKER, K. S. Migration of dendritic cells within 3-D collagen lattices is dependent on tissue origin, state of maturation, and matrix structure and is maintained by proinflammatory cytokines. **J. Leukoc. Biol.**, v. 67, n. 5, p. 622-629, 2000a.

GUNZER, M.; SCHÄFER, A.; BORGMANN, S.; GRABBE, S.; ZÄNKER, K. S.; BRÖCKER, E. B.; KÄMPGEN, E.; FRIEDL, P. Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. **Immunity.**, v. 13, n. 3, p. 323-332, 2000b.

HACHEHOUCHE, L. N.; CHETOUI, N.; AOUDJIT, F.; Implication of discoidin domain receptor 1 in T cell migration in three-dimensional collagen. **Mol. Immunol.**, v. 47, n. 9, p. 866-869, 2010.

HARKIN, D. G.; HAY, E. D. Effects of electroporation on the tubulin cytoskeleton and directed migration of corneal fibroblasts cultured within collagen matrices. **Cell Motil. Cytoskeleton.**, v. 35, n. 4, p. 345-357, 1996.

HERRMANN, F.; LEHR, H. A.; DREXLER, I.; SUTTER, G.; HENGSTLER, J.; WOLLSCHIED, U.; SELIGER, B. HER-2/neu-mediated regulation of components of the MHC class I antigen-processing pathway. **Cancer Res.**, v. 64, n. 1, p. 215-220, 2004.

HIRANO, N.; BUTLER, M. O.; XIA, Z.; ANSEN, S.; VON BERGWELT-BAILDON, M. S.; NEUBERG, D.; FREEMAN, G. J.; NADLER, L. M. Engagement of CD83 ligand induces prolonged expansion of CD8⁺ T cells and preferential enrichment for antigen specificity. **Blood.**, v. 107, p. 1528–1536, 2006.

HOLMES, B.; CASTRO, N. J.; LI, J.; KEIDAR, M.; ZHANG, L. G. Enhanced human bone marrow mesenchymal stem cell functions in novel 3D cartilage scaffolds with hydrogen treated multi-walled carbon nanotubes. **Nanotechnology.**, v. 24, n. 36, p. 365-400, 2013.

HUGHES, G.C.; CLARK, E. A. Regulation of dendritic cells by female sex steroids: relevance to immunity and autoimmunity. **Autoimmunity.**, v. 40, n. 6, p. 470-481, 2007.

IBRAHIM, E. C.; ARACTINGI, S.; ALLORY, Y.; BORRINI, F.; DUPUY, A.; DUVILLARD, P.; CAROSELLA, E. D.; AVRIL, M. F.; PAUL, P. Analysis of HLA antigen expression in benign and malignant melanocytic lesions reveals that upregulation of HLA-G expression correlates with malignant transformation, high inflammatory infiltration and HLA-A1 genotype. **Int. J. Cancer.**, v. 108, n. 2, p. 243-250, 2004.

IBRAHIM, E. C.; GUERRA, N.; LACOMBE, M. J.; ANGEVIN, E.; CHOUAIB, S.; CAROSELLA, E. D.; CAIGNARD, A.; PAUL, P. Tumor-specific up-regulation of the nonclassical class I HLA-G antigen expression in renal carcinoma. **Cancer Res.**, v. 61, n. 18, p. 6838-6845, 2001.

IEZZI, G.; KARJALAINEN, K.; LANZAVECCHIA, A. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. **Immunity.**, v. 8, n. 1, p. 89-95, 1998.

ILINA, O.; BAKKER, G. J.; VASATURO, A.; HOFMANN, R. M.; FRIEDL, P. Two-photon laser-generated microtracks in 3D collagen lattices: principles of MMP-dependent and -independent collective cancer cell invasion. **Phys. Biol.**, v. 8, n. 1, p. 15-19, 2011.

INGBER, D. E.; DIKE, L.; HANSEN, L.; KARP, S.; LILEY, H.; MANIOTIS, A.; MCNAMEE, H.; MOONEY, D.; PLOPPER, G.; SIMS, J. Cellular tensegrity: exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration, and tissue pattern during morphogenesis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 150, n. 77, p. 173-224, 1994.

INGULLI, E.; MONDINO, A.; KHORUTS, A.; JENKINS, M. K. In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. **J. Exp. Med.**, v. 185, n. 12, p. 2133-41, 1997.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em:

<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em: 9 Março 2013.

JEONG, S.; PARK, S.; PARK, B. W.; PARK, Y.; KWON, O. J.; KIM, H. S. Human leukocyte antigen-G (HLA-G) polymorphism and expression in breast cancer patients. **PLoS**

One, v. 9, n. 5, p. 982-989, 2014.

JOHNSTONE, R. M.; ADAM, M.; HAMMOND, J. R.; ORR, L.; TURBIDE, C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 19, p. 9412-9420, 1987.

KALDJIAN, E. P.; GRETZ, J. E.; ANDERSON, A. O.; SHI, Y.; SHAW, S. Spatial and molecular organization of lymph node T cell cortex: a labyrinthine cavity bounded by an epithelium-like monolayer of fibroblastic reticular cells anchored to basement membrane-like extracellular matrix. **Int. Immunol.**, v. 13, n. 10, p. 1243-1253, 2001.

KANEKO, K.; ISHIGAMI, S.; KIJIMA, Y.; FUNASAKO, Y.; HIRATA, M.; OKUMURA, H.; SHINCHI, H.; KORIYAMA, C.; UENO, S.; YOSHINAKA, H.; NATSUGOE, S. Clinical implication of HLA class I expression in breast cancer. **BMC Cancer**, v. 11, n. 6, p. 454-450, 2011.

KANTHOU, C.; KRANJC, S.; SERSA, G.; TOZER, G.; ZUPANIC, A.; CEMAZAR, M. The endothelial cytoskeleton as a target of electroporation-based therapies. **Mol. Cancer Ther.**, v. 5, n. 12, p. 3145-3152, 2006.

Karttunen, T.; Sormunen, R.; Risteli, L.; Risteli, J.; Autio-Harmanen, H. Immunoelectron microscopic localization of laminin, type IV collagen, and type III pN-collagen in reticular fibers of human lymph nodes. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 37, n. 3, p. 279-286, 1989.

KIERTSCHER, S. M.; ROTH, M. D. Human CD14⁺ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. **J. Leukoc. Biol.**, v. 59, n. 2, p. 208-218, 1996.

KIM, C. H.; HONG, M. J.; PARK, S. D.; KIM, C. K.; PARK, M. Y.; SOHN, H. J.; CHO, H. I.; KIM, T. G.; HONG, Y. K. Enhancement of anti-tumor immunity specific to murine glioma by vaccination with tumor cell lysate-pulsed dendritic cells engineered to produce interleukin-12. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 55, n. 11, p. 1309-1319, 2006.

KLEINMAN, H. K.; MARTIN, G. R. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. **Semin. Cancer Biol.**, v. 15, n. 5, p. 378-386, 2005.

KOYA, R. C.; WEBER, J. S.; KASAHARA, N.; LAU, R.; VILLACRES, M. C.; LEVINE, A. M.; STRIPECKE, R. Making dendritic cells from the inside out: lentiviral vector-mediated gene delivery of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4 into CD14⁺ monocytes generates dendritic cells in vitro. **Hum. Gene Ther.**, v. 15, n. 8, p. 733-748, 2004.

KRAMER, R. H.; ROSEN, S. D.; MCDONALD, K. A. Basement-membrane components associated with the extracellular matrix of the lymph node. **Cell Tissue Res.**, v. 252, n. 2, p. 367-375, 1988.

KUROTAKI, T.; TAMURA, Y.; UEDA, G.; OURA, J.; KUTOMI, G.; HIROHASHI, Y.; SAHARA, H.; TORIGOE, T.; HIRATSUKA, H.; SUNAKAWA, H.; HIRATA, K.; SATO, N. Efficient cross-presentation by heat shock protein 90-peptide complex-loaded dendritic cells via an endosomal pathway. **J. Immunol.**, v. 179, n. 3, p. 1803-1813, 2007.

- LAURENCE, A.; TATO, C. M.; DAVIDSON, T. S.; KANNO, Y.; CHEN, Z.; YAO, Z.; BLANK, R. B.; MEYLAN, F.; SIEGEL, R.; HENNIGHAUSEN, L.; SHEVACH, E. M.; O'SHEA, J. J. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. **Immunity.**, v. 26, n. 3, p. 371-381, 2007.
- LE BOUTEILLER, P.; SOLIER, C.; PRÖLL, J.; AGUERRE-GIRR, M.; FOURNEL, S.; LENFANT, F. Placental HLA-G protein expression in vivo: where and what for? **Hum. Reprod. Update.**, v. 5, n. 3, p. 223-233, 1999.
- LECHMANN, M.; KROOSHOOP, D. J.; DUDZIAK, D.; KREMMER, E.; KUHN, C.; FIGDOR, C. G.; SCHULER, G.; STEINKASSERER, A. 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. 1813-1821, 2001.
- LEE, E. Y.; LEE, W. H.; KAETZEL, C. S.; PARRY, G.; BISSELL, M. J. Interaction of mouse mammary epithelial cells with collagen substrata: regulation of casein gene expression and secretion. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A.**, v. 82, n. 5, p. 1419-1423, 1985.
- LEE, J.; CUDDIHY, M. J.; KOTOV, N. A. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. **Tissue Eng. Part. B Rev.**, v. 14, n. 1, p. 61-86, 2008.
- LEE, K. H.; HOLDORF, A. D.; DUSTIN, M. L.; CHAN, A. C.; ALLEN, P. M.; SHAW, A. S. T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. **Science.**, v. 295, n. 5559, p. 1539-1542, 2002.
- LENARDO, M.; CHAN, K. M.; HORNUNG, F.; MCFARLAND, H.; SIEGEL, R.; WANG, J.; ZHENG, L. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. **Annu. Rev. Immunol.**, n. 17, p. 221-253, 1999.
- LI, W.; MU, D.; TIAN, F.; HU, Y.; JIANG, T.; HAN, Y.; CHEN, J.; HAN, G.; LI, X. Exosomes derived from Rab27a-overexpressing tumor cells elicit efficient induction of antitumor immunity. **Mol. Med. Rep.**, v. 8, n. 6, p. 1876-1882, 2013.
- LIAO, W.; SCHONES, D. E.; OH, J.; CUI, Y.; CUI, K.; ROH, T. Y.; ZHAO, K.; LEONARD W. J. Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression. **Nat. Immunol.**, v. 9, n. 11, p. 1288-1296, 2008.
- LIAO, W.; LIN, J. X.; LEONARD, W. J. IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 23, n. 5, p. 598-604, 2011.
- LIU, Y. J. Professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, n. 78, p. 275-306, 2005.
- LOUMAGNE L¹, BAUDHUIN J, FAVIER B, MONTESPAN F, CAROSELLA ED, ROUAS-FREISS N. In vivo evidence that secretion of HLA-G by immunogenic tumor cells allows their evasion from immunosurveillance. **Int. J. Cancer.**, v. 135, n. 9, p. 2107-2117, 2014.

- MAYORDOMO, J. I.; ZORINA, T.; STORKUS, W. J.; ZITVOGEL, L.; CELLUZZI, C.; FALO, L. D.; MELIEF, C. J.; ILDSTAD, S. T.; KAST, W. M.; DELEO, A. B. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. **Nat. Med.**, v. 1, n. 12, p. 1297-1302, 1995.
- MEMPEL, T. R.; HENRICKSON, S. E.; VON ANDRIAN, U. H. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. **Nature.**, v. 427, n. 76, p. 154-159, 2004.
- MILLER, M. J.; WEI, S. H.; PARKER, I.; CAHALAN, M. D. Two-photon imaging of lymphocyte motility and antigen response in intact lymph node. **Science.**, v. 296, n. 5574, p. 1869-1873, 2002.
- MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 86, n. 3, p. 1-11, 1991.
- NAIK, S. H. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. **Immunol. Cell. Biol.**, v. 86, n. 5, p. 439-452, 2008.
- NAITO, H.; TOJO, T.; KIMURA, M.; DOHI, Y.; ZIMMERMANN, W. H.; ESCHENHAGEN, T.; TANIGUCHI, S. Engineering bioartificial tracheal tissue using hybrid fibroblast-mesenchymal stem cell cultures in collagen hydrogels. **Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.**, v. 12, n. 2, p. 156-161, 2011.
- NEVES, A.R.; ENSINA, L. F.; ANSELMO, L. B.; LEITE, K. R.; BUZAID, A. C.; CÂMARA-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, n. 1, p. 61-66, 2005.
- NIU, B. L.; DU, H. M.; SHEN, H. P.; LIAN, Z. R.; LI, J. Z.; LAI, X.; WEI, S. D.; ZOU, L. Q.; GONG, J. P. Myeloid dendritic cells loaded with dendritic tandem multiple antigenic telomerase reverse transcriptase (hTERT) epitope peptides: a potentially promising tumor vaccine. **Vaccine.**, v. 30, n. 23, p. 3395-3404, 2012.
- NUSSENZWEIG, M. C.; STEINMAN, R. M. Contribution of dendritic cells to stimulation of the murine syngeneic mixed leukocyte reaction. **J. Exp. Med.**, v. 151, n. 5, p. 1196-1212, 1980.
- O'DOHERTY, U.; PENG, M.; GEZELTER, S.; SWIGGARD, W. J.; BETJES, M.; BHARDWAJ, N.; STEINMAN, R. M. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. **Immunology.**, v. 82, n. 3, p. 487-493, 1994.
- OJIMA, T.; IWAHASHI, M.; NAKAMURA, M.; MATSUDA, K.; NAKA, T.; NAKAMORI, M.; UEDA, K.; ISHIDA, K.; YAMAUE, H. The boosting effect of co-transduction with cytokine genes on cancer vaccine therapy using genetically modified dendritic cells expressing tumor-associated antigen. **Int. J. Oncol.**, v. 28, n. 4, p. 947-953, 2006.
- ORSINI, G.; LEGITIMO, A.; FAILLI, A.; FERRARI, P.; NICOLINI, A.; SPISNI, R.; MICCOLI, P.; CONSOLINI, R. Defective Generation and Maturation of Dendritic Cells from

- Monocytes in Colorectal Cancer Patients during the Course of Disease. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 14, n. 11, p. 22022-22041, 2013.
- PAGE, H.; FLOOD, P.; REYNAUD, E. G. Three-dimensional tissue cultures: current trends and beyond. **Cell Tissue Res.**, v. 352, n. 1, p. 123-131, 2013.
- PINHO, M. P.; MIGLIORI, I. K.; FLATOW, E. A.; BARBUTO, J. A. Dendritic cell membrane CD83 enhances immune responses by boosting intracellular calcium release in T lymphocytes. **J. Leukoc. Biol.**, v. 56, n. 8, p. 1237-1255, 2014.
- PRZEPIORKA, D.; SRIVASTAVA, P. K. Heat shock protein--peptide complexes as immunotherapy for human cancer. **Mol. Med. Today.**, v. 4, n. 11, p. 478-484, 1998.
- PULENDRAN, B. Modulating TH1/TH2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors. **Immunol. Res.**, v. 29, n. 3, p. 187-196, 2004.
- RAMOS, C. S.; GONÇALVES, A. S.; MARINHO, L. C.; GOMES AVELINO, M. A.; SADDI, V. A.; LOPES, A. C.; SIMÕES, R. T.; WASTOWSKI, I. J. Analysis of HLA-G gene polymorphism and protein expression in invasive breast ductal carcinoma. **Hum. Immunol.**, v. 75, n. 7, p. 667-672, 2014.
- RAMOS, R. N.; CHIN, L. S.; DOS SANTOS, A. P.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; LAGINHA, F.; BARBUTO, J. A. Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 92, n. 3, p. 673-682, 2012.
- RANGARAJAN, A.; HONG, S. J.; GIFFORD, A.; WEINBERG, R. A. Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. **Cancer Cell.**, v. 6, n. 2, p. 171-183, 2004.
- RAO, W. H.; HALES, J. M.; CAMP, R. D.; Potent costimulation of effector T lymphocytes by human collagen type I. **J. Immunol.**, v. 165, n. 9, p. 4935-4940, 2000.
- REICHARDT, P.; GUNZER, F.; GUNZER, M. Analyzing the physiodynamics of immune cells in a three-dimensional collagen matrix. **Methods Mol Biol.**, v. 380, n. 90, p. 253-269, 2007.
- REIZIS, B.; COLONNA, M.; TRINCHIERI, G.; BARRAT, F.; GILLIET, M. Plasmacytoid dendritic cells: one-trick ponies or workhorses of the immune system? **Nat. Rev. Immunol.**, v. 11, n. 8, p. 558-565, 2011.
- REYES, D.; SALAZAR, L.; ESPINOZA, E.; PEREDA, C.; CASTELLÓN, E.; VALDEVENITO, R.; HUIDOBRO, C.; INÉS BECKER, M.; LLADSER, A.; LÓPEZ, M. N.; SALAZAR-ONFRAY, F. Tumour cell lysate-loaded dendritic cell vaccine induces biochemical and memory immune response in castration-resistant prostate cancer patients. **Br. J. Cancer.**, v. 109, n. 6, p. 1488-1497, 2013.
- REZK, S. A.; NATHWANI, B. N.; ZHAO, X.; WEISS, L. M. Follicular dendritic cells: origin, function, and different disease-associated patterns. **Hum. Pathol.**, v. 44, n. 6, p. 937-950, 2013.

ROMAGNOLI, G. G. **Exossomos derivados de células dendríticas como adjuvantes naturais na resposta antitumoral**. 2012. 142 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ROSALIA, R. A.; QUAKKELAAR, E. D.; REDEKER, A.; KHAN, S.; CAMPS, M.; DRIJFHOUT, J. W.; SILVA, A. L.; JISKOOT W. Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation. **Eur. J. Immunol.**, v. 43, n. 10, p. 2554-2565, 2013.

ROSENBLATT, J.; AVIVI, I.; VASIR, B.; UHL, L.; MUNSHI, N. C.; KATZ, T.; DEY, B. R.; SOMAIYA, P.; MILLS, H. Vaccination with dendritic cell/tumor fusions following autologous stem cell transplant induces immunologic and clinical responses in multiple myeloma patients. **Clin Cancer Res.**, v. 19, n. 13, p. 3640-3648, 2013.

ROSKELLEY, C. D.; DESPREZ, P.Y.; BISSELL, M. J. Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A.**, v. 91, n. 26, p. 12378-12382, 1994.

SAEKI, H.; MOORE, A. M.; BROWN, M. J.; HWANG, S. T. Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. **J. Immunol.**, n. 1,62 v. 5, p. 2472-2475, 1999.

SALLUSTO, F.; SCHAERLI, P.; LOETSCHER, P.; SCHANIEL, C.; LENIG, D.; MACKAY, C. R.; QIN, S.; LANZAVECCHIA, A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, n. 9, p. 2760-2769, 1998.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **J. Exp. Med.**, v. 79, n. 4, p. 1109-1118, 1994.

SANTINI, M. T.; RAINALDI, G.; ROMANO, R.; FERRANTE, A.; CLEMENTE, S.; MOTTA, A.; INDOVINA, P. L. MG- 63 human osteosarcoma cells grown in monolayer and as three-dimensional tumor spheroids present a different metabolic profile: a (1)H NMR study. **FEBS. Lett.**, v. 557, n. 3, p. 148-154, 2004, 2004.

SATO, K.; FUJITA, S. Dendritic cells: nature and classification. **Allergol. Int.**, v. 56, n. 3, p. 183-191, 2007.

SCHMEICHEL, K. L.; BISSELL, M. J. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. **J. Cell Sci.**, v. 116, n. 12, p. 2377-2388, 2003.

SCHMIDT, S.; FRIEDL, P. Interstitial cell migration: integrin-dependent and alternative adhesion mechanisms. **Cell Tissue Res.**, v. 339, n. 1, p. 83-92, 2010.

SCHULER, G.; STEINMAN, R. M. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. **J. Exp. Med.**, v. 161, n. 3, p. 526-546, 1995.

SCHUPPAN, D.; RÜHL, M. Matrix in signal transduction and growth factor modulation. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, n. 9, p. 2125-2141, 1994.

SCOTT-TAYLOR, T.; PETTENGELL, R.; CLARKE, I.; STUHLER, G.; LA BARTHE, M.; WALDEN, P.; DALGLEISH, A. Human tumour and dendritic cell hybrids generated by electrofusion: potential for cancer vaccines. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1500, n. 3, p. 265-279, 2000.

SELIGER, B. Molecular mechanisms of MHC class I abnormalities and APM components in human tumors. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 57, n. 11, p. 1719-1726, 2008.

SERHAL, K.; BAILLOU, C.; GHINEA, N.; FONTANGES, P.; DUPUY, F. P.; LEMOINE, F. M.; LACAVE, R. Characteristics of hybrid cells obtained by dendritic cell/tumour cell fusion in a T-47D breast cancer cell line model indicate their potential as anti-tumour vaccines. **Int. J. Oncol.**, v. 31, n. 6, p. 1357-1365, 2007.

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, n. 2, p. 436-451, 1986.

SHAW, K. R.; WROBEL, C. N.; BRUGGE, J. S. Use of three-dimensional basement membrane cultures to model oncogene-induced changes in mammary epithelial morphogenesis. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.**, v. 9, n. 4, p. 297-310, 2004.

SHEVACH, E. M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. **Immunity.**, v. 30, n. 5, p. 636-645, 2009.

SHIROISHI, M.; TSUMOTO, K.; AMANO, K.; SHIRAKIHARA, Y.; COLONNA, M.; BRAUD, V. M.; ALLAN, D. S.; MAKADZANGE, A. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A.**, v. 100, n. 15, p. 8856-8861, 2003.

SIXT, M.; LÄMMERMANN, T. In vitro analysis of chemotactic leukocyte migration in 3D environments. **Methods Mol. Biol.**, v. 769, n. 77, p. 149-146, 2011.

SOBOCINSKI, G. P.; TOY, K.; BOBROWSKI, W. F.; SHAW, S.; ANDERSON, A. O.; KALDJIAN, E. P. Ultrastructural localization of extracellular matrix proteins of the lymph node cortex: evidence supporting the reticular network as a pathway for lymphocyte migration. **BMC. Immunol.**, v. 17, n. 12, p. 11-42, 2010.

SOLOMON, S.; MASILAMANI, M.; MOHANTY, S.; SCHWAB, J. E.; BONEBERG, E. M.; ILLGES, H. Generation of three-dimensional pannus-like tissues in vitro from single cell suspensions of synovial fluid cells from arthritis patients. **Rheumatol. Int.**, v. 24, n. 2, p. 71-76, 2004.

SOMASUNDARAM, R.; RUEHL, M.; TILING, N.; ACKERMANN, R.; SCHMID, M.; RIECKEN, E. O.; SCHUPPAN, D. Collagens serve as an extracellular store of bioactive interleukin 2. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 49, p. 38170-38175, 2000.

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, n. 5, p. 1142-1162, 1973.

STEINMAN, R. M.; WITMER, M. D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A**, v. 75, n. 10, p. 5132-5136, 1978.

STEPONAVICIUS-CRUZ, K.; FREITAS, V. M.; BARBUTO, J. A. Dendritic cells and T lymphocytes interactions in a novel 3D system. **Procedia Engineering.**, v. 59, p. 166-173, 2013.

STERN, M. M.; MYERS, R. L.; HAMMAM, N.; STERN, K. A.; EBERLI, D.; KRITCHEVSKY, S. B.; SOKER, S.; VAN DYKE, M. The influence of extracellular matrix derived from skeletal muscle tissue on the proliferation and differentiation of myogenic progenitor cells ex vivo. **Biomaterials.**, v. 30, n. 12, p. 2393-2399, 2009.

TAKAHASHI, K.; KENJI, A.; NORIHIRO, T.; EISAKU, K.; TAKASHI, O.; KAZUHIKO, H.; TADASHI, Y.; TADAATSU, A. Morphological interactions of interdigitating dendritic cells with B and T cells in human mesenteric lymph nodes. **Am. J. Pathol.**, v. 159, n. 1, p. 131-138, 2001.

TAN, J. K.; O'NEILL, H. C. Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity. **J. Leukoc. Biol.**, v. 78, n. 2, p. 319-324, 2005.

TASAKI, A.; YAMANAKA, N.; KUBO, M.; MATSUMOTO, K.; KUROKI, H.; NAKAMURA, K.; NAKAHARA, C.; ONISHI, H.; KUGA, H.; BABA, E.; TANAKA, M.; MORISAKI, T.; KATANO, M. Three-dimensional two-layer collagen matrix gel culture model for evaluating complex biological functions of monocyte-derived dendritic cells. **J. Immunol. Methods.**, v. 287, n. 2, p. 79-90, 2004.

TEKLENBURG, G.; MACKLON, N. S. Review: in vitro models for the study of early human embryo-endometrium interactions. **Reprod. Sci.**, v. 16, n. 9, p. 811-818, 2009.

TSCOETSCHEL, U.; SCHWING, J.; FROSCH, S.; SCHMITT, E.; SCHUPPAN, D.; RESKE-KUNZ, A. B. Modulation of proliferation and lymphokine secretion of murine CD4⁺ T cells and cloned Th1 cells by proteins of the extracellular matrix. **Int. Immunol.**, v. 9, n. 1, p. 147-159, 1997.

USHIKI, T.; OHTANI, O.; ABE, K. Scanning electron microscopic studies of reticular framework in the rat mesenteric lymph node. **Anat. Rec.**, v. 241, n. 1, p. 113-122, 1995.

VAN NUFFEL, A. M.; CORTHALS, J.; NEYNS, B.; HEIRMAN, C.; THIELEMANS, K.; BONEHILL, A. Immunotherapy of cancer with dendritic cells loaded with tumor antigens and activated through mRNA electroporation. **Methods Mol. Biol.**, v. 629, n. 12, p. 405-452, 2010.

- VAN PARIJS, L.; REFAELI, Y.; LORD, J. D.; NELSON, B. H.; ABBAS, A. K.; BALTIMORE, D. Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. **Immunity.**, v. 11, n. 7, p. 281–288, 1999.
- 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, n. 4, p. 1172-1187, 1982.
- VASSALLI, G. Dendritic cell-based approaches for therapeutic immune regulation in solid-organ transplantation. **J. Transplant.**, v. 3, n. 15 p. 376-429, 2013.
- VIAUD, S.; TERME, M.; FLAMENT, C.; TAIEB, J.; ANDRÉ, F.; NOVAULT, S.; ESCUDIER, B.; ROBERT, C.; CAILLAT-ZUCMAN, S.; TURSZ, T.; ZITVOGEL, L.; CHAPUT, N. Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: a role for NKG2D ligands and IL-15 α . **PLoS One.**, v. 4, n. 3, p. 494-500, 2009.
- VIK-MO, E. O.; NYAKAS, M.; MIKKELSEN, B. V.; MOE, M. C.; DUE-TØNNESEN, P.; SUSO, E. M.; SÆBØE-LARSSSEN, S.; SANDBERG, C.; BRINCHMANN, J. E.; HELSETH, E.; RASMUSSEN, A. M.; LOTE, K.; AAMDAL, S.; GAUDERNACK, G.; KVALHEIM, G.; LANGMOEN, I. A. Therapeutic vaccination against autologous cancer stem cells with mRNA-transfected dendritic cells in patients with glioblastoma. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 62, n. 9, p. 1499-1509, 2015.
- VULCANO, M.; ALBANESI, C.; STOPPACCIARO, A.; BAGNATI, R.; D'AMICO, G.; STRUYF, S.; TRANSIDICO, P.; BONECCHI, R.; DEL PRETE, A.; ALLAVENA, P.; RUCO, L. P.; CHIABRANDO, C.; GIROLOMONI, G.; MANTOVANI, A.; SOZZANI, S. Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, n. 3, p. 812-822, 2001.
- WANG, K. ZHOU, Q.; GUO, A. L.; XU, C. R.; AN, S. J.; WU, Y. L. An autologous therapeutic dendritic cell vaccine transfected with total lung carcinoma RNA stimulates cytotoxic T lymphocyte responses against non-small cell lung cancer. **Immunol Invest.**, v. 38, n. 7, p. 665-680, 2009.
- WIETHE, C.; DITTMAR, K.; DOAN, T.; LINDENMAIER, W.; TINDLE, R. Enhanced effector and memory CTL responses generated by incorporation of receptor activator of NF- κ B (RANK)/RANK ligand costimulatory molecules into dendritic cell immunogens expressing a human tumor-specific antigen. **J Immunol.**, v. 171, n. 8, p. 4121-30, 2003.
- WILLARD-MACK, C. L. Normal structure, function, and histology of lymph nodes. **Toxicol Pathol.**, v. 34, n. 5, p. 409-424, 2006.
- WÖLFLE, S. J.; STREBOVSKY, J.; BARTZ, H.; SÄHR, A.; ARNOLD, C.; KAISER, C.; DALPKE, A. H.; HEEG, K. PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. **Eur. J. Immunol.**, v. 41, n. 2, p. 413-424, 2011.
- XU, R.; SPENCER, V. A.; GROESSER, D. L.; BISSELL, M. J. Laminin regulates PI3K basal localization and activation to sustain STAT5 activation. **Cell Cycle.**, v. 9, n. 21, p. 4315-4322, 2010.