



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANA PAULA PEIXOTO

AVALIAÇÃO DE DOIS DIFERENTES PROTOCOLOS DE MATURAÇÃO DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS NO PERFIL DE ATIVAÇÃO E MIGRAÇÃO CELULAR

UBERABA-MG

2022

ANA PAULA PEIXOTO

AVALIAÇÃO DE DOIS DIFERENTES PROTOCOLOS DE MATURAÇÃO DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS NO PERFIL DE ATIVAÇÃO E MIGRAÇÃO CELULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Imunologia Básica e Aplicada, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde área de concentração Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Prof^a Dra. Márcia Antoniazi
Michelin

UBERABA-MG

2022

Catálogo na fonte:

Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

P43a	<p>Peixoto, Ana Paula Avaliação de dois diferentes protocolos de maturação de células dendríticas no perfil de ativação e migração celular / Ana Paula Peixoto. -- 2022. 101p. il.: fig., graf., tab.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2022 Orientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin</p> <p>1. Imunoterapia. 2. Células dendríticas. 3. Movimento celular. 4. Interleucina-12. 5. Quimiocina CCL5. I. Michelin, Márcia Antoniazi. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.</p> <p>CDU 612.017</p>
------	--

ANA PAULA PEIXOTO

AVALIAÇÃO DE DOIS DIFERENTES PROTOCOLOS DE MATURAÇÃO DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS NO PERFIL DE ATIVAÇÃO E MIGRAÇÃO CELULAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Imunologia Básica e Aplicada, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde área de concentração Imunologia Básica e Aplicada.

10 de Maio de 2022.

BANCA DE DEFESA

Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin – UFTM

Prof. Dr. Alexandre de Paula Rogério – UFTM

Profa. Dra. Rosy Iara Maciel de Azambuja Ribeiro – UFSJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo e primeiramente à Deus, por ter me concebido a dádiva da vida, força e sabedoria para vivenciar o mestrado na UFTM, pois é Dele proveniente todo o conhecimento.

Agradeço imensamente aos meus pais, José Odail e Zaida, pelo carinho e apoio desde o primeiro momento do meu respirar, pelo amor e educação a mim passados, incentivo mesmo em meio a dificuldades, por estarem presentes em todos os momentos, fossem eles de alegria ou angústia e por toda abdicção feita para que eu pudesse chegar até aqui. Aos meus avós João, Aracy, Antonio e em especial à avó Anna que nunca me deixou desistir e sempre celebrou todas as minhas vitórias, desde a minha primeira palavra pronunciada corretamente quando pequena e família que sempre foram base para força adquirida em minha caminhada.

Ao meu, hoje parceiro de vida, André, amigo, amor e confidente, sempre paciente e solícito para comigo, me incentivando, me apoiando e se fazendo presente em todas as horas.

Aos amigos queridos feitos na minha trajetória e no IPON (Instituto de Pesquisa em Oncologia), Saulo, Eduardo, Elias, Lucas e Cláudio, que se fizeram essenciais no dia a dia, por todo companheirismo e auxílio durante o decorrer desses dois anos. Em especial aos amigos Letícia, Lenilson, Eleni, Taíssa e Jéssica que foram meu apoio em todos os momentos, me incentivando a continuar e ser mais forte, mesmo nas adversidades.

À Professora Dra. Márcia Antoniazzi Michelin, pela orientação, oportunidade e paciência nos ensinamentos passados, por toda contribuição no meu crescimento profissional e pessoal, me fazendo enxergar capacidades que sempre achei inexistentes em mim. Assim como aos professores todos, do curso de pós-graduação em Ciências da Saúde por todo conhecimento passado com destreza a nós alunos.

Deixo meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Aos órgãos de fomento, FAPEMIG, FUNEPU, CAPES e FINEP pelo apoio financeiro na realização dos experimentos e incentivo pessoal.

Por fim, sou grata a todos, cada um em sua maneira especial, que direta ou indiretamente contribuíram com a minha formação nesses últimos dois anos.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”

Cora Coralina

RESUMO

INTRODUÇÃO: De papel indispensável, as células dendríticas, importantes apresentadoras de antígeno com heterogeneidade fenotípica e funcional, ligam as respostas imunes inatas e adaptativas. São responsáveis pela regulação e modulação de respostas efetoras contra microrganismos e células tumorais, também realizam a manutenção da tolerância imunológica em condições homeostáticas. Sua plasticidade funciona de acordo com estímulos e microambiente em que estão inseridas. A imunoterapia utilizando essas células, está em constante estudo para a obtenção de ativação suficiente de uma resposta imune celular. Vários protocolos e patentes foram e ainda são testados para diferenciação e maturação de um perfil apropriado de células dendríticas para uma imunoterapia eficaz. **OBJETIVO:** Testar o perfil de ativação e migração apresentado pela cultura de células dendríticas submetida a maturação por diferentes protocolos de estímulos (TNF- α e TNF- α , IL-12 e CCL5) em ensaio *in vitro*. **METODOLOGIA:** Sangue periférico de voluntários saudáveis (n=10) foi utilizado para o isolamento de monócitos e linfócitos. As células aderentes foram diferenciadas em células dendríticas que foram submetidas a maturação por 2 diferentes protocolos (protocolo 1 com estímulo de TNF- α ; protocolo 2 referente a estimulação com TNF- α , IL-12 e CCL5) e posteriormente co-cultura com células não aderentes. Para a caracterização do perfil fenotípico das células totais (aderentes e não aderentes), foi analisada a intensidade média de fluorescência de marcadores de superfície (CD209, CD11c, HLA-DR, CD123, CD209, CD80, CD86, CD83, CD3, CD8, CD4, CD25, FOX-P3, NKG2D e CD54) e citocinas (granzimas, perforinas, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-12, TGF- β , IL-4 e IL-17), por citometria de fluxo. A migração das células dendríticas maturadas foi vista sobre coloração e contagem de células em membrana de poliestireno submetidas a cultura com um gradiente quimiotático (MCP-1 e CCL5). **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Os resultados mostram aumentos significativos na expressão de moléculas de adesão/co-estimulatórias CD209, CD11c, HLA-DR, CD123, CD80, CD86, CD83 e citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-10 e TGF- β) das células dendríticas do protocolo 2 comparado com o protocolo 1. De tal forma, vemos a ativação de subtipos importantes de células T (Th1 e Th17, com redução de Treg) e Natural Killer (NK) produtoras de IFN- γ , com expressão diminuída de IL-10 no mesmo protocolo. **CONCLUSÃO:** Nossos estudos indicam que o protocolo de estimulação com TNF- α , IL-12 e CCL5 foi capaz de gerar um perfil de células dendríticas maduras

e eficazes para ativação de subtipos balanceados de linfócitos T e células NK, importantes na resposta imune antitumoral.

Palavras-chave: Imunoterapia. Células Dendríticas. Movimento celular. Interleucina-12. Quimiocina CCL5.

ABSTRACT

INTRODUCTION: With an indispensable role, dendritic cells, important antigen presenters with phenotypic and functional heterogeneity, link innate and adaptive immune responses. They are responsible for regulating and modulating effector responses against microorganisms and tumor cells, and also maintain immunological tolerance under homeostatic conditions. Their plasticity works according to stimuli and microenvironment in which they are inserted. Immunotherapy using these cells is under constant study to obtain sufficient activation of a cellular immune response. Several protocols and patents have been and are still being tested for differentiation and maturation of an appropriate profile of dendritic cells for effective immunotherapy.

OBJECTIVE: To test the activation and migration profile presented by the culture of dendritic cells submitted to maturation by different stimulus protocols (TNF- α and TNF- α IL-12 and CCL5) in an in vitro assay. **METHODOLOGY:** Peripheral blood from healthy volunteers (n=10) was used for the isolation of monocytes and lymphocytes. Adherent cells were differentiated into dendritic cells that were subjected to maturation by 2 different protocols (protocol 1 with TNF- α stimulation; protocol 2 regarding stimulation with TNF- α , IL-12 and CCL5) and then co-culture with cells non-adherent. To characterize the phenotypic profile of total cells (adherent and non-adherent), the mean fluorescence intensity of surface markers (CD209, CD11c, HLA-DR, CD123, CD209, CD80, CD86 CD83, CD3, CD8, CD4) was analyzed, CD25, FOXP3, NKG2D and CD54) and cytokines (granzymes, perforins, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-12, TGF- β , IL-4 and IL-17) by cytometry of flow. The migration of mature dendritic cells was seen on staining and counting of cells in polystyrene membrane cultured with a chemotactic gradient (MCP-1 and CCL5). **RESULTS AND DISCUSSION:** The results show significant increases in the expression of adhesion/co-stimulatory molecules CD209, CD11c, HLA-DR, CD123, CD80, CD86 and CD83 and cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-10 and TGF- β) of dendritic cells from protocol 2, compared to protocol 1. Thus, we see the activation of important subtypes of T cells (Th1 and Th17, with reduced Treg) and Natural Killer (NK) that produce IFN- γ , with decreased expression of IL-10 in the same protocol. **CONCLUSION:** Concluding our findings, we demonstrate that the stimulation protocol with TNF- α , IL-12 and CCL5 was able to generate a profile of mature dendritic cells and effective for activation of balanced subtypes of T lymphocytes and NK cells, important in the antitumor immune response.

Keywords: Immunotherapy. Dendritic Cells. Cell Movement. Interleukin-12.
Chemokine CCL5.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental do estudo.....	29
Figura 2 – Gráficos de comparação de expressão de marcadores de DCs submetidas a maturação por combinação de estímulos na concentração de 200U.....	31
Figura 3 – Gráficos de comparação de expressão de marcadores de DCs submetidas a maturação por combinação de estímulos (TNF- α) e (TNF- α , CCL5 e IL-12) na concentração de 200U.....	32
Figura 4 – Células dendríticas diferenciadas com GM-CFS e IL-4, no dia 5 (400x).....	34
Figura 5 – Células dendríticas maturadas com TNF- α , referente ao protocolo 1, no dia 7 (400x).....	34
Figura 6 – Células dendríticas maturadas com TNF- α , IL-12 e CCL5, referente ao protocolo 2, no dia 7 (400x).....	34
Figura 7 – Co-cultura de células não aderentes com as células dendríticas maturadas com TNF- α , referente ao protocolo 1, no dia 14 (200x).....	35
Figura 8 – Co-cultura de células não aderentes com as células dendríticas maturadas com TNF- α , IL-12 e CCL5, referente ao protocolo 2, no dia 14 (200x).....	35
Figura 9 – Representação esquemática da captura de imagens (10 campos) para a contagem de células dendríticas.....	37
Figura 10 – Captura com microscópio óptico de dois campos para a contagem de células dendríticas que migraram, pertencentes ao P1 e P2, respectivamente (200x).....	37
Figura 11 – Comparação da razão de concentração de IL-12 / IL-10 em moDCs maturadas com P1, P2 e co-cultura.....	43
Figura 12 – Comparação da razão de concentração de IL-12/IL-10 em TCD4 ⁺ dos voluntários saudáveis referentes a P2C.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Marcações extracelulares e intracelulares para citometria de fluxo.....39

LISTA DE SIGLAS

APCs – Células apresentadoras de antígenos
BCG – Bacilo de Calmette-Guérin
BD – Becton Dickinson
BMDC – Células dendríticas derivadas da medula óssea
CCL5 – ligante 5 da quimiocina CC
CCR7 – receptor de quimiocinas C-C tipo 7
CD – Cluster de diferenciação
CD141/BDCA-3 – Trombomodulina
CD1c/BDCA-1 – Antígeno 3 de células dendríticas do sangue
CD303/BDCA-2 – Antígeno 2 de células dendríticas do sangue
cDCs1 – Células dendríticas convencionais do tipo 1
cDCs2 – Células dendríticas convencionais do tipo 2
CTLs – Linfócitos T citotóxicos
CXCL4 – Quimiocina fator plaquetário 4
DAMP – padrões moleculares associados a danos
DCs – Células Dendríticas
Flt3L – ligante tirosina quinase 3
FOX-P3 – Ecurfina
GM-CSF – Fator estimulador de colônias de macrófagos de granulócitos
HLA-DR – Antígeno leucocitário humano de classe II
IFN- α – Interferon alfa
IFN- β – Interferon beta
IFN- γ – Interferon gama
IL-1 – Interleucina 1
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 – Interleucina 12
IL-15 – Interleucina 15
IL-2 – Interleucina 2
IL-4 – Interleucina 4
IL-6 – Interleucina 6
IMDM – Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IPON – Instituto de Pesquisa em Oncologia

LPS – Lipopolissacarideo
MCP-1/CCL2 – ligante 2 da quimiocina CC
MFI – Média de intensidade de Fluorescência
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
MIP-1 – Proteínas inflamatórias de macrófagos
MIP-1 α /CCL3 – ligante 3 da quimiocina CC
MIP-1 β /CCL4 – ligante 4 da quimiocina CC
moDCs – Células dendríticas derivadas de monócitos
NKG2D – Receptor de ativação da família dos receptores de lectina Tipo C
NK – Natural Killer
PAMP – padrões moleculares associados a patógenos
PBS – Tampão fosfato-salina
pDCs – Células dendríticas plasmocitóides
PGE2 – Prostaglandina E2
RPMI – Roswell Park Memorial Institute
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR – Receptores de células T
TGF- β – Fator de crescimento transformador beta
Th – T auxiliaries
Th1 – T auxiliaries do tipo 1
Th17 – T auxiliaries do tipo 17
Th2 – T auxiliaries do tipo 2
TLR7 – Receptores Semelhantes a Toll 7
TLR9 – Receptores Semelhantes a Toll 9
TLRs – Receptores Semelhantes a Toll
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa
Treg – Linfócito T regulatório
UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro
XCR1 – Receptor de quimiocinas

LISTA DE ABREVIATURAS

cels – Células

mL – mililitro

ng – Nanogramas

P1 – Protocolo 1

P1C – Protocolo 1 na presença de células não aderentes

P2 – Protocolo 2

P2C – Protocolo 2 na presença de células não aderentes

U – Unidades

µg – Microgramas

UI – Unidades Internacionais

µL – Microlitros

µm – Micrometros

xg – Força centrífuga relativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 CÉLULAS DENDRÍTICAS	17
1.2 PROTOCOLOS DE DIFERENCIAÇÃO E MATURAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS	20
1.3 CITOCINAS E QUIMIOCINAS IMPORTANTES NA MATURAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS	21
1.4 FUNÇÃO ANTITUMORAL DA IMUNOTERAPIA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS	23
2 JUSTIFICATIVA	26
3 HIPÓTESE	27
4 OBJETIVOS	28
4. 1 OBJETIVO GERAL	28
4.1.1 Objetivos específicos:	28
5 MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	29
5.2 PROCEDIMENTOS ÉTICOS PARA COLETA DE DADOS	29
5.3 PADRONIZAÇÃO	30
5.4 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES	32
5.5 CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO..	33
5.6 PREPARAÇÃO DA CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS	33
5.7 CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS COM CÉLULAS NÃO ADERENTES	35
5.8 MIGRAÇÃO DE DCs.....	36
5.9 CITOMETRIA DE FLUXO	38
5.10 ESTRATÉGIA E SELEÇÃO DE GATE E CONTROLES ISOTIPO	40
5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
6 RESULTADOS	43

6.1	ARTIGO	44
7	COMENTÁRIOS E CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
8	CONCLUSÃO.....	82
	REFERÊNCIAS.....	83
	ANEXO 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido	95
	ANEXO 2 - Questionário para tendência de voluntários saudáveis	98
	ANEXO 3 – Cópia do aceite do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM (683-2006/CEP).....	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÉLULAS DENDRÍTICAS

As células dendríticas (DCs do inglês “Dendritic Cells”) são células pertencentes ao sistema imunológico inato e consideradas as melhores células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês “Antigen-Presenting Cells”). Representam uma subpopulação de leucócitos derivada da medula óssea. De papel fundamental e indispensável, constituem o elo de comunicação entre respostas inatas e adaptativas, sendo responsáveis pela regulação e modulação de respostas imunes efetoras contra microrganismos e células tumorais e também realizam a manutenção da tolerância imunológica em condições homeostáticas (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; SCHLITZER; MCGOVERN; GINHOUX, 2015; STEINMAN; COHN, 1973).

Descritas pela primeira vez pelo patologista alemão Paul Langerhans, em 1868, apresentam processos citoplasmáticos do tipo dendritos são responsáveis por gerar eficiência na incorporação de material extracelular e apresentam expressão aumentada de moléculas apresentadoras de antígenos e moléculas coestimuladoras (BANCHEREAU; PALUCKA, 2005). Esta característica morfológica faz com que as DCs possuam alta capacidade fagocítica com processo migratório do sangue para os tecidos periféricos e internalização de antígenos em estado imaturo por métodos de fagocitose (DARZYNKIEWICZ; ROEDERER; TANKE, 2004).

O processamento de antígenos pelas DCs desencadeia a conversão de proteínas em peptídeos que são apresentados nas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC do inglês “Major Histocompatibility Complex”) reconhecidas pelas células T. O que aumenta a sua habilidade de processamento de antígenos, quando comparadas com outros tipos celulares, é a expressão de tipos diferentes de proteínas chamadas de receptores semelhantes a Toll (TLRs, do inglês “Toll-like Receptors”) e receptores de padrão de reconhecimento. Esse fato induz a expressão nas DCs de moléculas de superfície, coestimuladoras e citocinas necessárias para ativar linfócitos imaturos em tipos distintos de células efetoras (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

As DCs possuem uma heterogeneidade fenotípica e funcional, de maneira a apresentar plasticidade e capacidade de modulação de respostas efetoras de acordo com o microambiente em que estão inseridas. Embora todas as DCs sejam capazes de captação, processamento e apresentação de antígenos, a plasticidade existente faz com que os seus vários subtipos apresentem atividades imunológicas diferenciadas em razão de distintos marcadores celulares, localização, vias migratórias e dependência de estímulos inflamatórios para sua geração. Durante o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa, o fenótipo e a função das DCs desempenham um papel extremamente importante no início da tolerância, memória e ativação de perfis de células T auxiliares (Th do inglês T-helper), como T auxiliares do tipo 1 (do inglês “Th1”), T auxiliares do tipo 2 (do inglês “Th2”) e T auxiliares do tipo 17 (do inglês “Th17”) (PATENTE et al., 2018).

Essas importantes APCs surgem de células-tronco hematopoiéticas pluripotentes que se diferenciam em precursores de macrófagos, posteriormente dando origem a precursores comuns de monócitos e comuns de DCs que dão origem a duas linhagens, a linhagem mielóide (de onde se originam as subpopulações: DCs convencionais 1 e 2 (cDCs1 e cDCs2), DCs plasmocitóides (pDCs) e DCs derivadas de monócitos (moDCs) e a linhagem linfóide (que origina uma pequena parte também de pDCs) (CONTI; SANTIAGO; SFORCIN, 2014). Atualmente, vários subconjuntos de DCs são bem conhecidos e de desenvolvimento impulsionado por fatores transcricionais específicos (MURPHY et al., 2016).

A subpopulação de cDCs se tem dois fenótipos, a exemplo de cDC1 caracterizada pela expressão de clusters de diferenciação (CD do inglês “Cluster of Differentiation”) que precedem marcadores específicos como: CD141, receptor de quimiocinas (XCR1), C-lectina e molécula de adesão celular, sendo uma subpopulação homóloga a de rato que expressa CD8a⁺/CD103⁺. De grande importância na resposta antitumoral e antiviral (REYNOLDS; HANIFFA, 2015). Já a subpopulação cDC2 induz respostas de tipos Th1, Th2 e Th17, com padrões diferentes de secreção de citocinas e expressão de CD172a tanto em humanos, quanto em camundongos, juntamente com CD1c (humanos) e CD11b (camundongos) (GUILLIAMS et al., 2016). A presença de cDCs no microambiente tumoral pode influenciar substancialmente as funções das células

T antitumorais, impulsionando a expansão de linfócitos T citotóxicos (CTLs do inglês “cytotoxic T lymphocytes”) específicos. Agindo assim, na apresentação cruzada de antígeno e indução de resposta contra células tumorais (LIU; CAO, 2015).

A subpopulação de pDCs é caracterizada com morfologia de células plasmáticas em camundongos por CD11c⁺ e CD317⁺, já em humanos pela ausência de expressão de CD11c, expressão positiva de CD4, sistema de antígeno leucocitário humano de classe II (HLA-DR do inglês “Human leukocyte antigen”), BDCA-2, CD123 e CD304. Com presença de TLR7/9 estimulados que induzem secreção de altos níveis de interferon alfa/beta (IFN- α/β), IL-12, interleucina 6 (IL-6) e TNF- α , esses extremamente importantes em infecções virais e no câncer (REIZIS et al., 2011). Encontradas em tecidos linfoides, as pDCs podem atuar como APCs, mas são muito menos eficientes que as cDCs e a depender do contexto, a apresentação de antígenos pelas pDCs pode induzir respostas imunogênicas ou tolerância (SWIECKI; COLONNA, 2015).

Por fim, temos a subpopulação de moDCs em que monócitos na presença do fator de Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF do inglês “Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor”), interleucina 4 (IL-4) e condições inflamatórias *in vitro* dão origem a um grande número de células que se assemelham às DCs dos tecidos e são chamadas células dendríticas derivadas da medula óssea (BMDC do inglês “Bone marrow Dendritic cells”), importantes na indução de respostas antitumorais e na produção de TNF- α . Em humanos, expressam HLA-DR, CD11c, CD206, BDCA1, BDCA3, MHC II (INABA et al., 1992) e frequentemente são CD16⁺ e CD14⁺ (COLLIN; MCGOVERN; HANIFFA, 2013). Em camundongos, com a expressão de MHC II, CD11b, CD206, CD115/GM-CSFR, Mac-3/CD107b Fc ϵ RI e CD64 (VEGLIA; GABRILOVICH, 2017).

In vivo, a maturação das DCs é desencadeada por patógenos ou lesão tecidual, enquanto *in vitro*, isso pode ser imitado por estimulação com agonistas de TLRs ou por um coquetel de citocinas pró-inflamatórias (JONULEIT et al., 1997).

1.2 PROTOCOLOS DE DIFERENCIAÇÃO E MATURAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

A imunoterapia com DC está cada vez mais sendo estudada para se obter ativação suficiente de uma resposta imune antitumoral. Vários protocolos e patentes foram e ainda são testados para diferenciação e maturação de DCs em fenótipos e genótipos apropriados para uma imunoterapia eficaz. Os métodos mais recentes utilizados para gerar DCs, incluem expansão *in vivo* de DCs circulantes, diferenciação de precursores de monócitos ou precursores hematopoiéticos CD34⁺ (LUNDBERG., 2013). Desse modo em ensaios *in vitro*, as DCs podem ser propagadas a partir de células derivadas da medula óssea ou do sangue periférico, aonde se utiliza de várias combinações de fatores de crescimento, como GM-CSF e ligante tirosina quinase 3 (Flt3L) (KARSUNKY et al., 2003).

Entre 1995 e 2004, a primeira série de ensaios clínicos testando moDCs cultivadas em GM-CSF e IL-4 chegou à clínica. Elas sofreram carregamento de antígenos tumorais para promoção da imunidade, ativando células T. Na fase de diferenciação que geralmente tem duração de 2 a 5 dias, as citocinas IL-4 e GM-CSF são classicamente usadas na maioria dos protocolos (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994). Mas há outras maneiras de obtenção de DCs, essas podem ser diferenciadas, por exemplo, na presença de GM-CSF e IFN- α e secretam grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, de forma a induzir uma resposta efetora antitumoral de linfócitos T auxiliares e citolíticos (CD4⁺ e CD8⁺, respectivamente) (FARKAS; KEMÉNY, 2011).

Em protocolos utilizando o sangue periférico de pacientes, autores descreveram a geração de DCs imaturas diferenciadas em presença apenas de GM-CSF e da junção de GM-CSF e IL-4 (BARSOUM et al., 2013; TJOA; BOSCH, 2013; BOS et al., 2012). Essas citocinas também foram colocadas em associação ao IFN- β e IFN- α . Além disso, hormônios como a melatonina também foi utilizado na diferenciação de DCs (BARBUTO; GONZALEZ, 2007).

Já referente a fase de maturação de DCs, uma vez que a diferenciação gera células imaturas, é necessária a utilização de moléculas estimuladoras, como citocinas (TNF- α , interferon gama (IFN- γ), agonistas de TLR (lipopolissacarídeo), proteínas recombinantes (CD40L), antígenos tumorais ou coquetéis de maturação. Em estudos já feitos, pôde ser visto o amadurecimento

de DCs com coquetéis preparados nas várias combinações. As citocinas interleucina 1 (IL-1), IL-6, TNF- α , prostaglandina E2 (PGE2) e antígeno tumoral induziram uma resposta imune as células tumorais envolvendo linfócitos T (BARSOUIM et al., 2013). Outro coquetel eficaz na ativação de células T por apresentação cruzada teve como composição Bacilo de Calmette-Guérin (BCG), IFN- γ , lipopolissacarídeo (LPS) ou TNF- α e antígenos tumorais específicos (MURTA; MICHELIN, 2009).

Em um outro experimento ainda, DCs imaturas foram expostas a uma composição de proteínas de bactérias Gram-negativas *Klebsiella pneumonia* e IFN- γ em combinação com o CL075 (agonista de TLR8), esse coquetel levou a uma grande produção de IL-12 (BOS et al., 2012). Apenas TNF- α e PGE2 se mostraram efetivos na maturação de DCs (YUETSU, 2012). DCs pulsadas com peptídeos derivados de tumores demonstraram forte atividade antitumoral (PALUCKA; BANCHEREAU; UENO, 2013). Em publicação de Vopenkova et al., 2012, fez uma comparação *in vitro*, com diferentes estímulos de maturação para indução de células T específicas do tumor, mostrando que a combinação de IFN- γ e LPS obteve uma resposta mais efetiva.

Vemos também que o disparo simultâneo de diferentes TLRs nas DCs é responsável por efeitos sinérgicos, resultando na "superindução" de IL-12, inferindo que os agonistas de TLRs têm o potencial de induzir DCs ideais para estimular uma resposta imune eficaz (O'NEIL; BHARDWAJ, 2005).

1.3 CITOCINAS E QUIMIOCINAS IMPORTANTES NA MATURAÇÃO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

As DCs podem ser divididas em diferentes estados funcionais: DCs maduras e DCs imaturas (YU; CAO, 2002). Ambas possuem características específicas, as DCs imaturas (presentes nos tecidos não linfoides) possuem maior capacidade em captar antígenos por endocitose mediada por receptores como lectina, TLRs e receptores do complemento, mas com baixa eficiência de estimulação de células T *naive*, baixa expressão superficial de moléculas co-estimuladoras, de receptores de quimiocinas e baixa produção de citocinas imunoestimuladoras (TROMBETTA; MELLMAN, 2005).

Quando desenvolvidas em DCs maduras por estímulos pró-inflamatórios, diminuem a capacidade de fagocitose, mas aumentam a expressão do receptor de quimiocinas C-C tipo 7 (CCR7), assim como a expressão de MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86), resultando em desenvolvida função de apresentação de antígenos para estímulo da proliferação de linfócitos T primários e estimulação de células B (DE VLEESCHOUWER et al., 2005; RUSSO et al., 2000).

A maturação das DCs é desencadeada com o reconhecimento de mudanças da homeostase tecidual na forma de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) ou padrões moleculares associados a danos (DAMP). Diferentes estímulos associados a bactérias, vírus e tecidos danificados podem induzir a ativação e maturação das DCs (VEGLIA; GABRILOVICH, 2017). Esse reconhecimento ativa uma cascata de sinais responsáveis por mudanças metabólicas celulares e pela transcrição de genes, alterando o citoesqueleto e aumentando a motilidade para que seja possível a migração de DCs dos tecidos periféricos para os órgãos linfóides secundários, lugar em que pode ocorrer a apresentação de antígenos ativador dos linfócitos T (ALVAREZ; VOLLMANN; VON ANDRIAN, 2008).

Essa maturação de efeito ótimo já foi descrita em diversos estudos que citam várias citocinas e quimiocinas como importantes fatores de estimulação positiva para que as DCs possam exercer sua atividade com destreza. A quimiocina fator plaquetário 4 (CXCL4) é um poderoso quimioatraente para monócitos e um importante imunorregulador que demonstrou aumentar a expressão de moléculas MHC, CD86 e CD83 em moDCs de doadores saudáveis, desencadeando uma apresentação mais eficiente de antígenos, ativação de células T CD4 e T CD8 positivas, e produção de IFN- γ (SILVA-CARDOSO et al., 2017).

As quimiocinas inflamatórias são contribuintes críticos na atração de células imunes relevantes para o microambiente tumoral e na condução de interações celulares e cascatas de sinalização molecular que determinam o resultado final da resposta imune antitumoral do hospedeiro. Portanto, as proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP-1) e proteínas relacionadas, consistindo em ligante 3 da quimiocina CC (CCL3 ou MIP-1 α), ligante 4 da quimiona CC (CCL4 ou MIP-1 β) e CCL5, podem ser os principais

determinantes da infiltração celular imune em certos tumores, incluindo DCs no local do tumor (ALLEN et al., 2018).

A IL-12, conhecida como uma citocina que induz proliferação, tem função de aumentar a secreção e atividade do IFN- γ pelas células NK e pelos linfócitos Th1, aumentando respostas citotóxicas, passo crítico para defesa contra neoplasias. As citocinas inflamatórias ajudam na maturação de moDCs que aumentam sua produção de IL-12 e sua capacidade de iniciar células T específicas para antígenos *in vitro*. Agonistas de TLR podem ser mais eficazes para a maturação celular (OLESZYCKA; LAVELLE, 2014). Esses adjuvantes podem aumentar as respostas devido a efeitos físicos sobre antígenos e células, mas também aumentam a ativação de DCs. Antígenos específicos também se mostram um caminho em potencial para maturação.

1.4 FUNÇÃO ANTITUMORAL DA IMUNOTERAPIA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

Para o combate de alterações apresentadas em diversas neoplasias, a resposta imune antitumoral é executada em função da expressão de estruturas antigênicas existentes na superfície nas células tumorais, gancho essencial para ressaltar a importância das DCs que apresentam esses antígenos e fornecem sinais de proliferação e diferenciação para os linfócitos T, esses reconhecem uma célula tumoral pelos seus receptores de células T (TCR) resultando na ativação de células T CD8 e CD4 positivas (BANCHEREAU, STEINMAN, 1998, ARDAVÍN, 2003, BANCHEREAU; PALUCKA, 2005, PALUCKA; BANCHEREAU, 2012).

A imunoterapia contra o câncer baseada em DCs visa a ativação do sistema imunológico e em particular de CTLs específicos para tumores e células NK via IL-12, interleucina 15 (IL-15) e IFNs do tipo I para que se tornem capazes de eliminar as células malignas (ANGUILLE et al., 2014). Uma boa resposta antitumoral depende do papel crucial que as DCs desempenham na indução de respostas de células T. Ao interagir com as células T CD4⁺, as DCs podem induzir sua diferenciação em diferentes subconjuntos T auxiliares a partir de citocinas secretadas. A capacidade que as DCs possuem de realizar apresentações cruzadas permite o desencadeamento de respostas contra

antígenos intracelulares de outros tipos de células, aprontam linfócitos T CD8⁺ na ausência de células T CD4⁺ (MCCOY et al., 1999). DCs também podem ativar células B *naive* e de memória em razão da sua capacidade de estimular células T CD4⁺ (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015).

É importante também na presença de doenças que as DCs imaturas induzam resposta tolerogênica, para que os antígenos próprios apresentados às células T não possuam sinais coestimuladores ativadores que uma célula dendrítica madura forneceria, resultando em uma não responsividade das células T (KURTS et al., 1997).

Os efeitos antitumorais da imunoterapia de DCs podem ser reduzidos por vários fatores, seja pela presença de células imaturas (baixa eficiência na apresentação de antígenos) nos locais onde há desenvolvimento da massa tumoral, baixa contagem de DCs ou fraca capacidade de migração da mesma para o tumor. É visto pela plasticidade celular que o microambiente do tumor de mama é imunossupressor, DCs presentes induzem a um fenótipo de linfócito T regulatório (Treg) diminuindo sua funcionalidade. A maturação das DCs é crítica para permitir a identificação molecular específica de antígenos e induzir imunidade específica contra antígenos tumorais (DA CHUNHA; MICHELIN; MURTA, 2014).

Estudos anteriores desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa demonstram aumento da síntese de IL-12 e IFN- γ , aumento da expressão de interleucina 2 (IL-2) e TNF- α em linfócitos T CD4⁺, e de IL-2 em células T CD8⁺ com imunoterapia utilizando moDCs autólogas diferenciadas *in vitro* (MATIAS et al., 2013).

A eficácia da imunoterapia com DCs advindas de monócitos parece restrita a pacientes com diferentes tipos de neoplasias, sendo necessária a identificação do microambiente tumoral para ajuda na escolha do perfil de DC correto na adequada ativação de células T (KIRKWOOD et al., 2012; PALUCKA et al., 2010).

Sendo assim, o uso dessas células para a construção de vacinas que estimulam o sistema imune contra diversos tipos de neoplasias vem sendo cada vez mais edificado (MELIEF, 2008) e observado em experimentos *in vitro* e *in vivo* que se encontram em fases avançadas de pesquisa clínica, foi revelado também que camundongos C57BL/6 e BALB/C tratados com DCs tiveram uma

regressão de metástase pulmonar induzida, demonstrando assim a grande importância na resposta imune contra tumores (FIELDS; SHIMIZU; MULE, 1998). Estes protocolos quando utilizados em humanos também vêm sendo bastante eficazes, entretanto, mais estudos em diversos aspectos são necessários para uma aplicação bem-sucedida não só no câncer, mas para abranger diversas outras doenças. Desse modo, o presente estudo procura avaliar se o estímulo DCs diferenciadas *in vitro* com TNF- α , IL-12 e CCL5 propicia uma boa resposta ativando células imunes.

2 JUSTIFICATIVA

Em virtude de dados epidemiológicos que comprovam a gravidade da ocorrência de neoplasias e a escassez de tratamentos eficientes com menos efeitos adversos, é vista a necessidade de novas estratégias para complementar a terapêutica já existente.

Já é bem estabelecido que a imunoterapia usando vacinas baseadas em DCs é uma abordagem aprovada para aproveitar os requisitos do próprio sistema imunológico humano para eliminar células tumorais. Está em crescente avanço por possuir resultados comprovadamente imunogênicos testados na clínica e que elucidam sua modulação na resposta imunológica.

Todavia, ainda não existe um consenso otimizado sobre protocolos de estímulos efetivos na fabricação dessas potentes vacinas de modo a estimular corretamente a ótima ativação de fenótipos e subpopulações de DCs.

Como as DCs são sensores ambientais altamente sensíveis, os reagentes aos quais são expostas podem impactar fortemente sua função, portanto as condições da cultura são críticas para maturação de DCs que possam realizar boa função na apresentação de antígenos, capacidade de migração para linfonodos e ativação de outras células imunes. (SANTOS; BUTTERFIELD, 2018).

Assim sendo, é de extrema relevância o desenvolvimento de melhores protocolos de diferenciação e maturação de DCs. Justifica-se o presente trabalho que estabelece um novo protocolo experimental *in vitro* de maturação de DCs (TNF- α , CCL5 e IL-12) como um instrumento para entendimento da capacidade de modulação da resposta imune apresentada por essas potentes APCs e um posterior caminho para uma melhor resposta antitumoral.

3 HIPÓTESE

A hipótese desse estudo compara a ativação, migração e maturação adquirida por DCs no contexto de dois diferentes protocolos de maturação, com estímulo de apenas TNF- α (já testado segundo a literatura) e com a combinação de TNF- α , CCL5 e IL-12. Espera-se maior eficácia do protocolo que combina TNF- α , CCL5 e IL-12 na maturação de estado ótimo (aumento da migração, da expressão de receptores de quimiocinas, moléculas de adesão/co-estimulatórias e citocinas pró-inflamatórias) e por consequência, possível ativação de células não aderentes em co-cultura com DCs maturadas, em que linfócitos e células NK apresentem perfis e produção de citocinas importantes para a resposta contra neoplasias, assim como potencialização da maturação de DCs.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Testar o perfil de ativação e migração apresentado pela cultura de DCs submetida a maturação por dois diferentes protocolos de estímulos: TNF- α (P1) e combinação de TNF- α , CCL5 e IL-12 (P2) em ensaio *in vitro*.

4.1.1 Objetivos específicos:

- a) Comparar o perfil de ativação de DCs submetidas a dois diferentes protocolos de maturação (TNF- α ou TNF- α , CCL5 e IL-12), por citometria de fluxo da expressão de moléculas co-estimulatórias como CD11c, CHP II (HLA-DR), CD123, CD209, CD80, CD86 e CD83, além da produção de IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-12 e TGF- β . Para controle de exclusão será analisada a expressão do marcador *Lineage 1* (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56).
- b) Comparar a migração das DCs submetidas a dois diferentes protocolos de maturação (TNF- α ou TNF- α , CCL5 e IL-12), utilizando as quimiocinas MCP-1 e CCL5 como quimioatrativos.
- c) Avaliar por citometria de fluxo a influência da cultura de DCs submetidas à diferentes estímulos (TNF- α ou TNF- α , CCL5 e IL-12) na indução de ativação de linfócitos T citotóxicos (CD3, CD8, IFN- γ , granzima e perforina) obtidos de cultura de células.
- d) Avaliar por citometria de fluxo a influência da cultura de DCs submetidas à diferentes estímulos (TNF- α ou TNF- α , CCL5 e IL-12) na indução de ativação de linfócitos T auxiliares (CD3, CD4, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-17, TGF- β , IL-12, IL-10, Fox-p3 e CD25) obtidos de cultura de células.
- e) Avaliar por citometria de fluxo a influência da cultura de DCs submetidas à diferentes estímulos (TNF- α ou TNF- α , CCL5 e IL-12) na indução de ativação de células NK (NKG2D, CD54 e produção de IFN- γ e IL-10) obtidas de cultura de células.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Na descrição dos métodos são apresentados o modelo de estudo, a padronização, a realização de cultura de células, o procedimento de citometria de fluxo e a análise estatística.

5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo aplicado/experimental analítico quantitativo exploratório e *in vitro* no Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) pertencente à Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM). O projeto destinado à imunoterapia com células dendríticas teve como amostras biológicas para realização do estudo, sangue periférico coletado de dez doadores voluntários saudáveis para que fosse possível a preparação de culturas celulares para avaliação de migração e ativação de células.

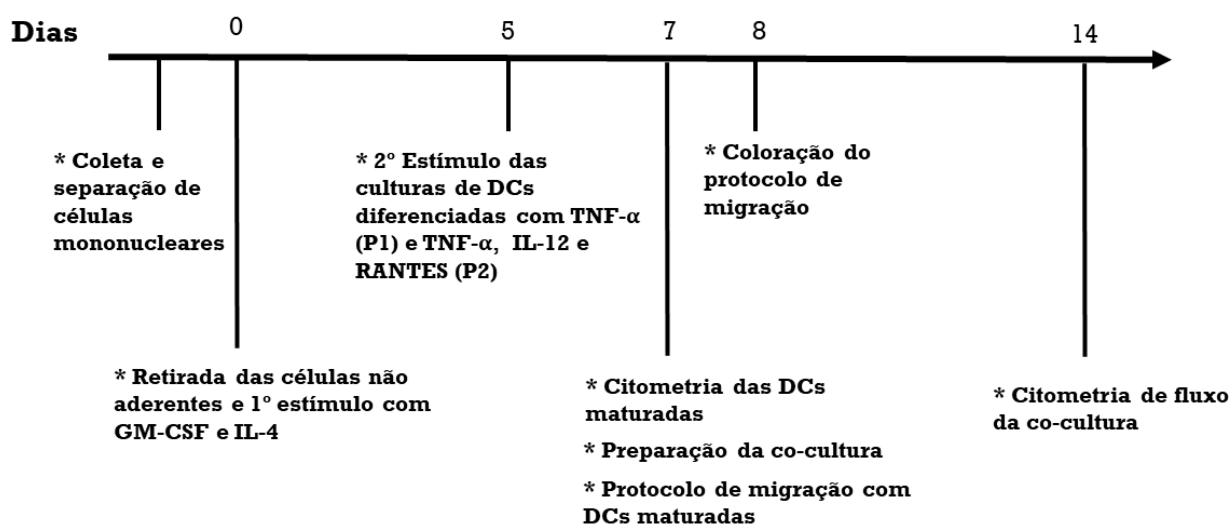


Figura 1. Delineamento experimental do estudo.

5.2 PROCEDIMENTOS ÉTICOS PARA COLETA DE DADOS

Esse estudo já tem o protocolo de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o número 683. Aos voluntários saudáveis que aceitaram participar, para esclarecimento, consentimento e ciência dos objetivos da pesquisa foi aplicado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

redigido sob modelo disponibilizado pela universidade e aplicação de ficha de anamnese adaptada de estudos já realizados para tendência de voluntários saudáveis com critérios de exclusão (idade inferior a 18 anos ou superior a 65; presença de antecedentes oncológicos; sintomas anteriores apresentados e histórico clínico com significância relevante). Além disso, a pesquisa seguiu os preceitos estabelecidos pela Resolução 466/12 do Ministério da Saúde.

5.3 PADRONIZAÇÃO

Foi feita uma padronização de todas as técnicas utilizadas e descritas posteriormente na maturação das DCs isoladas a partir de monócitos do sangue periférico de 3 doadores voluntários. Os valores encontrados das análises por citometria de fluxo foram representados em gráficos construídos no software GraphPad Prism 8.4, sem a realização de testes estatísticos, apenas para a definição de combinação de estímulos a serem utilizados.

E com a observação da média de intensidade de fluorescência (MFI) aumentada dos marcadores de adesão e co-estimulação de DCs submetidas aos estímulos IL-12 e CCL5 adicionados ao TNF- α comparada a estimulação com apenas TNF- α , posteriormente foi feita a utilização desses estímulos combinados para a construção do protocolo 2 (figuras 2 e 3).

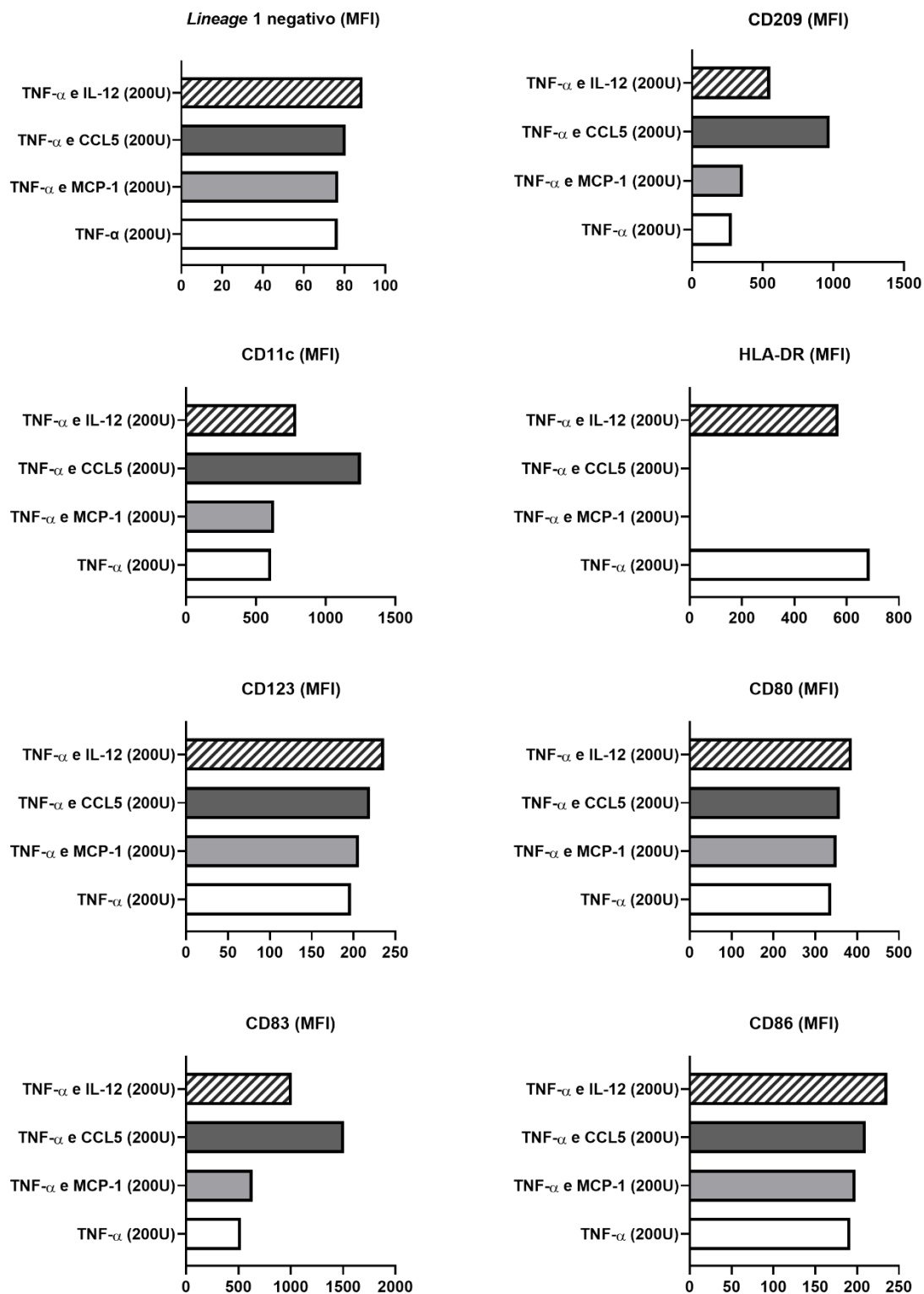


Figura 2. Gráficos de comparação de expressão de marcadores de DCs submetidas a maturação por combinação de estímulos na concentração de 200U.

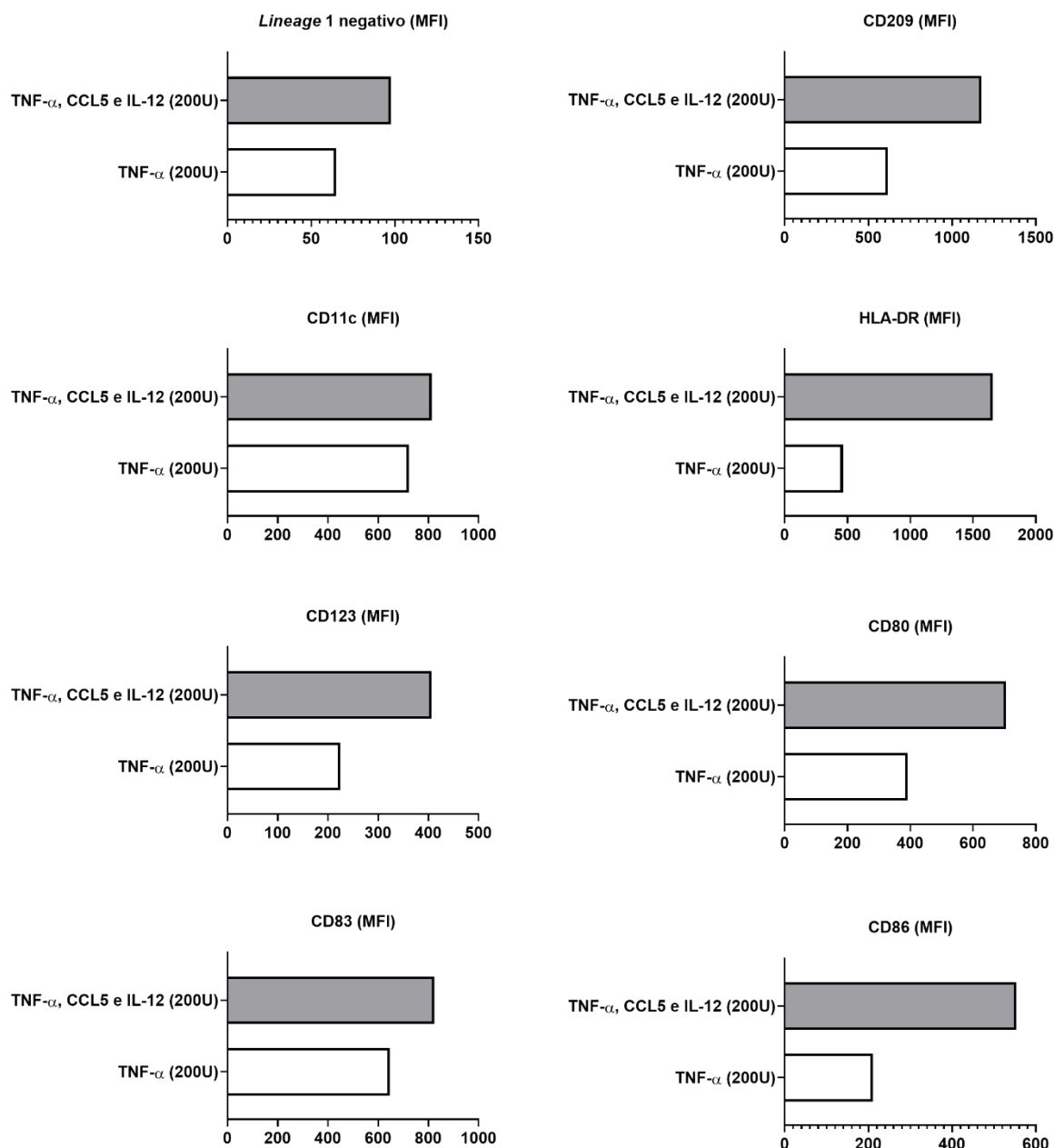


Figura 3. Gráficos de comparação de expressão de marcadores de DCs submetidas a maturação por combinação de estímulos (TNF-α) e (TNF-α, CCL5 e IL-12) na concentração de 200U.

5.4 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES

Para obtenção das DCs foi necessária a coleta de 20mL de sangue periférico dos doadores em tubos esterilizados e descartáveis contendo heparina (100UI/mL). O sangue coletado foi transferido para tubos plásticos cônicos contendo 15mL da solução de *Ficoll-Hypaque™ Plus* (GE Healthcare®). Os tubos foram submetidos a centrifugação a 600xg por 30 minutos à temperatura de 18°C

em centrífuga refrigerada para separação do anel de células mononucleares na interface entre a solução de Ficoll® e os outros tipos celulares depositados no fundo do tubo. O anel de células foi então cuidadosamente coletado com o auxílio de uma pipeta e transferido para outro tubo cônico de 50mL. Após uma nova centrifugação a 4°C e à velocidade de 805xg por 10 minutos, o excesso de Ficoll® foi removido por 3 lavagens (centrifugação) em 30mL de meio RPMI incompleto (Sigma-Aldrich®). Posteriormente as células foram contadas em câmara de Neubauer.

5.5 CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

Após contadas, as células foram adicionadas em frascos de cultura na quantidade de $32,5 \times 10^6$ células em um volume de 7,5mL por frasco em meio de cultura RPMI completo (Sigma-Aldrich®), incubadas a 37°C em estufa com ambiente de CO₂. Após 24 horas, as células não aderentes (sobrenadante) foram coletadas dos frascos e novamente plaqueadas.

O sobrenadante foi cultivado por mais 7 dias em meio RPMI completo a 5% de CO₂ e à 37°C, para utilização em cultura com parte das DCs obtidas dos dois diferentes protocolos (co-cultura).

5.6 PREPARAÇÃO DA CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS

As células mononucleares aderentes isoladas foram cultivadas durante 8 dias em estufa com 5% de CO₂, à 37°C e em garrafas de cultura com 7,5mL de meio IMDM completo (Sigma-Aldrich®). Um dia após o plaqueamento, as células foram estimuladas com 200U do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e 200U de IL-4 para obtenção de DCs imaturas, possível ver na fotografia demonstrando o aspecto morfológico dessas células (figura 4). As DCs obtidas foram então submetidas à 2 protocolos de maturação e no 5º dia de cultura, no protocolo 1 (P1), as DCs imaturas foram submetidas à maturação por meio do estímulo com 200U de TNF- α (figura 5). No protocolo 2 (P2), as DCs foram maturadas na presença de TNF- α , 10ng/mL de IL-12 e 10^{-6} µg/mL de CCL5, sendo possível visualizar a presença de um maior número de

prolongamentos citoplasmáticos (figura 6). As células foram conservadas por mais 48 horas em cultura para o processo de maturação.

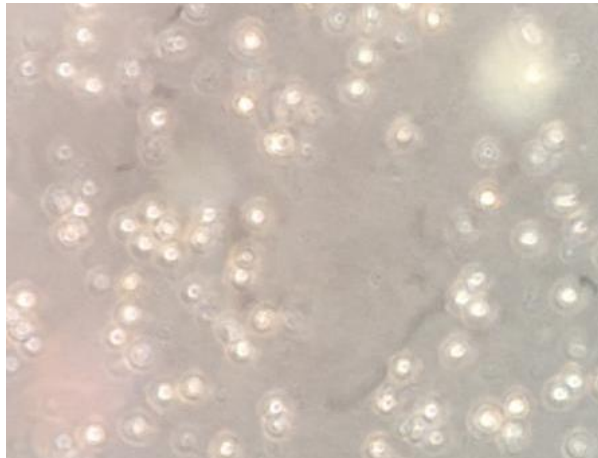


Figura 4. Células dendríticas diferenciadas com GM-CFS e IL-4, no dia 5 (400x).

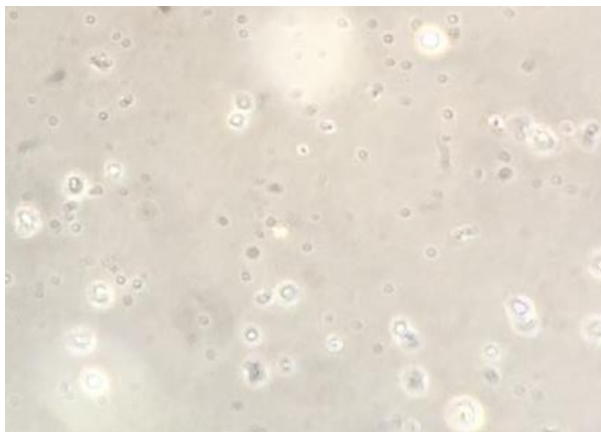


Figura 5. Células dendríticas maturadas com TNF- α , referente ao protocolo 1, no dia 7 (400x).

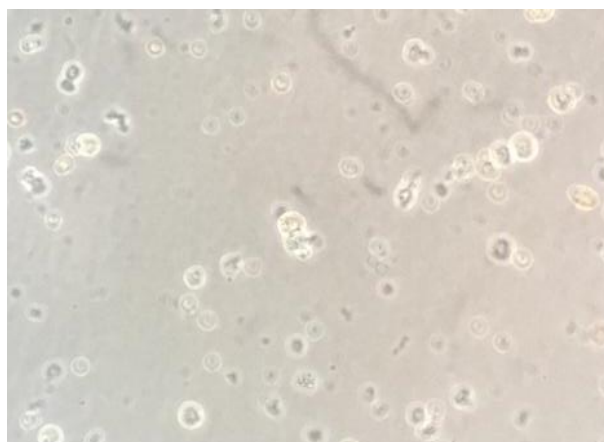


Figura 6. Células dendríticas maturadas com TNF- α , IL-12 e CCL5, referente ao protocolo 2, no dia 7 (400x).

5.7 CULTURA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS COM CÉLULAS NÃO ADERENTES

Foi realizada a co-cultura das células em frascos onde foram colocadas DCs maturadas provenientes do protocolo 1 (P1C) em conjunto com as células não aderentes (sobrenadante), no meio de cultura já descrito (figura 7). De mesma forma, foram acrescentadas células não aderentes às DCs do protocolo 2 (P2C) (figura 8). Posteriormente, os frascos foram preparados para avaliação após 7 dias de incubação em estufa a 5% de CO₂ e à 37°C.

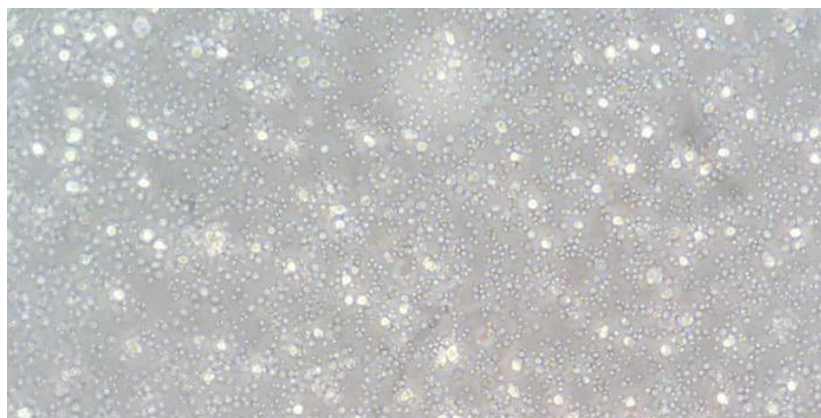


Figura 7. Co-cultura de células não aderentes com as células dendríticas maturadas com TNF- α , referente ao protocolo 1, no dia 14 (200x).

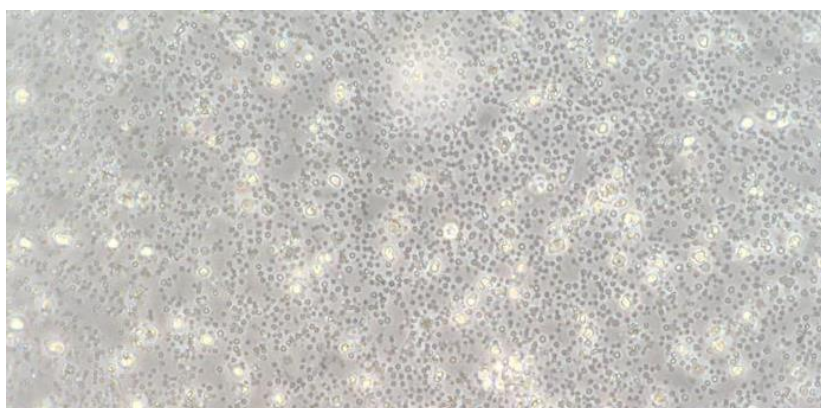


Figura 8. Co-cultura de células não aderentes com as células dendríticas maturadas com TNF- α , IL-12 e CCL5, referente ao protocolo 2, no dia 14 (200x).

5.8 MIGRAÇÃO DE DCs

O ensaio que mede a capacidade quimiotática das células em direção a um quimio-atraente, foi realizado em um ambiente estéril onde as DCs foram desconectadas das respectivas placas de cultura, com posterior centrifugação a 4°C e à velocidade de 805xg por 10 minutos. As células dos dois protocolos de maturação foram ressuspensas em 300µL de meio de cultura apropriado para plaqueamento em inserto (*BD Falcon™ Cell Culture Inserts*). O protocolo foi padronizado segundo o ensaio de migração de células *transwell* descrito por Pijuan e colaboradores (2019), com adaptação segundo padronização feita nos parâmetros do IPON.

Uma quantidade padronizada ($2,5 \times 10^5$) de solução de DCs foi mensurada e plaqueada na parte superior da membrana de policarbonato (8.0µm) do inserto, a incubação foi feita por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ para permitir que as células migrassem.

Com a utilização de pipeta, foi também adicionado no fundo da câmara inferior da placa de 24 poços (*BD Falcon™ Companion TC Plate*) a solução de quimio-atraente (10^{-6} µg/mL de MCP-1 e CCL5) em 700uL de meio IMDM completo), sem mover a membrana que deve ficar em contato com essa solução para formar um gradiente quimiotático. Após incubação o inserto foi removido da placa para análise e contagem de células.

O inserto foi retirado da placa contendo meio de cultura e colocado em solução de formaldeído a 3,7% em PBS 1X por 15 minutos para permitir a fixação das células. Posteriormente, para retirada da solução de formaldeído o inserto foi submetido a duas lavagens com PBS. Para a coloração e visualização no microscópio de luz, a membrana foi então mergulhada em solução de Hematoxilina de Harris por mais 15 minutos e lavada com mais duas lavagens em PBS 1X para retirar o excesso.

Um aplicador com ponta de algodão foi utilizado para remover cuidadosamente as células restantes que não migraram da parte superior da membrana, sem danificá-la. Após observação em microscópio invertido (Olympus), dois observadores contaram o número de células em 10 diferentes campos de visão de cada inserto para a obtenção de uma soma média de células

que migraram através da membrana em direção aos quimio-atraentes, para a parte inferior da membrana (realizado em triplicata para cada protocolo).

Os 10 campos fotografados para a contagem de células no programa ImageJ foram capturados (figura 9) com intuito de representar a quantia de células presentes na parte inferior da membrana, visto que segundo citado em diretrizes para uso (*BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber*): células que passam pelos poros da membrana, variam em uma distribuição uniforme até uma localização em áreas distintas, portanto ao contar células das membranas em triplicata, a escolha de campos no centro da membrana, bem como campos na periferia da membrana, sugerem uma “real” representação do número de células em toda a membrana.

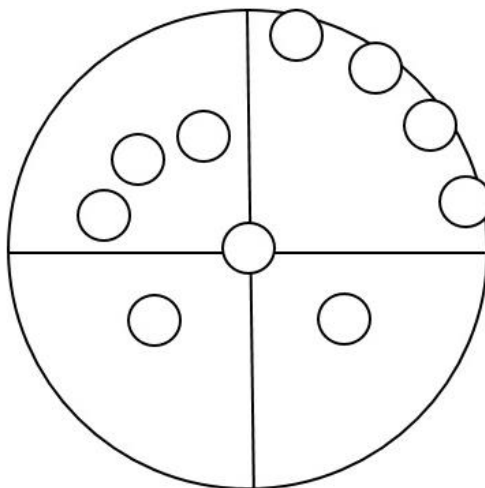


Figura 9. Representação esquemática da captura de imagens (10 campos) para a contagem de células dendríticas.

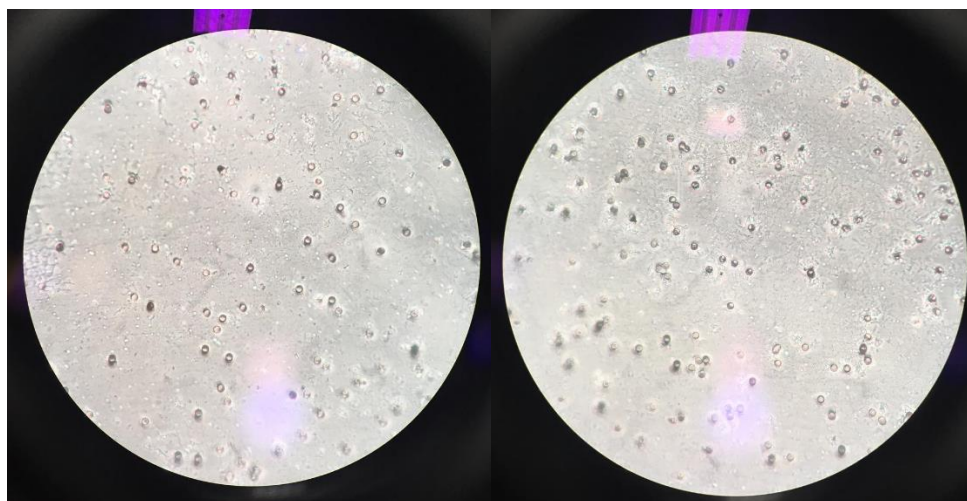


Figura 10. Captura com microscópio óptico de dois campos para a contagem de células dendríticas que migraram, pertencentes ao P1 e P2, respectivamente (200x).

5.9 CITOMETRIA DE FLUXO

As DCs maduras e as células em co-cultura dos dois protocolos foram submetidas à avaliação por citometria de fluxo. As amostras foram analisadas pelo citômetro *FACSCalibur™ BD* (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). A técnica de citometria de fluxo foi realizada de acordo com o protocolo de citometria sugerido no kit *Fixation/Permeabilization BD Cytotfix/Citoperm™*, com a utilização de anticorpos *BD Pharmigen™* e adaptada de acordo com parâmetros do laboratório IPON.

Brevemente, as células foram transferidas para tubos cônicos de 50mL. Essas células passaram por 3 lavagens com PBS (solução salina tamponada com fosfato) em cada lavagem e centrifugadas a 290xg por 10min e 4°C. O sobrenadante foi desprezado cuidadosamente, conservando o precipitado celular. Ao precipitado celular foi adicionado PBS acrescido da proteína transportadora inibitória *BD GolgiStop™*, durante 20 minutos a 4°C.

Posteriormente estas células foram lavadas por centrifugação com PBS a 290xg por 10min e 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em PBS para a divisão em tubos (10⁶cels por tubo). Inicialmente foi realizada a marcação extracelular. Após a marcação, as células foram incubadas a 4°C por 30 minutos na ausência de luz. Posteriormente estas foram lavadas duas vezes com PBS para remoção do excesso de anticorpos. Então foi colocado 100µL de *Citofix BD®*, o que permite que poros sejam feitos na membrana das células para ser realizada a marcação com 0,25µL de anticorpos intracelulares. A suspensão de células com os anticorpos foi deixada em repouso a 4°C por mais 20 minutos ao abrigo da luz.

No próximo passo, foram feitas mais duas lavagens com a solução de *Perm/wash BD®* para retirar o excesso de anticorpo intracelular. As DCs das culturas dos dois diferentes protocolos (TNF- α ou TNF- α , IL-12 e CCL5) foram marcadas para as moléculas coestimulatórias (CD80, CD83, CD86) e moléculas de adesão MHC II (HLA-DR), CD11c, CD123 e CD209, e analisada a produção de IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-12 e TGF- β .

As células do sobrenadante das culturas foram marcadas para linfócitos T citotóxicos (CD3, CD8, INF- γ , perforinas e granzimas) e T auxiliares totais

(CD3, CD4, TNF- α , INF- γ , IL-4, IL-17, TGF- β , IL-12, IL-10, Fox-p3 e CD25). Também foram marcadas células NK (NKG2D, CD54, IFN- γ , IL-10).

Após a realização da técnica de citometria de fluxo, foram avaliadas as marcações de interesse por Gate (indica a população de células que possui uma determinada molécula) na amostra que está sendo estudada. Nessa avaliação, também foi utilizada MFI que indica a média de expressão das moléculas de interesse e citocinas produzidas pelas células em que elas se mostrarem positivas.

Tabela 1 – Marcações extracelulares e intracelulares para citometria de fluxo.

Tubos	Descrição	Marcação extracelular	Marcação intracelular
1	Células dendríticas	Controle permeabilizado	Sem marcação
2	Células dendríticas	CD86 PE CD209 PerCP-Cy5.5 CD83 APC Lineage1 (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD50) FITC	Sem marcação
3	Células dendríticas	CD123 PE CD11c APC CD80 FITC Anti HLA-DR PerCP	Sem marcação
4	Células dendríticas	CD11c APC	IL-10-FITC TNF- α PE
5	Células dendríticas	CD11c PE	INF- γ FITC IL-12 APC TGF- β PerCP-Cy5.5
6	Linfócitos T Citotóxicos	CD3 PE CD8 Alexa Fluor 647	Granzima FITC
7	Linfócitos T Citotóxicos	CD8 PE	IFN- γ FITC Perforina Alexa Fluor 647

8	Linfócitos T Auxiliares	CD4 Alexa Fluor 647	IFN- γ FITC TNF- α PE
9	Linfócitos T Auxiliares	CD4 Alexa Fluor 647	IL-4 FITC IL-17 PE TGF- β PerCP-Cy5.5
10	Linfócitos T Auxiliares	CD4 Alexa Fluor 647	IL-12 PE IL-10 FITC
11	Linfócitos T Auxiliares	CD4 Alexa Fluor 647 CD25 FITC	FOX-P3 PE
12	Células NK	NKG2D APC CD54 PeCy5	IFN- γ FITC IL-10 PE
13	Isotipos 1	Mouse IgG1, κ PE Mouse IgG1, κ Alexa Fluor 647	Mouse IgG1, κ FITC Mouse IgG1, κ PerCP-Cy5.5
14	Isotipos 2	Mouse IgG2a, κ PeCy5 Mouse IgG1, κ FITC	Mouse IgG1, κ APC Rat IgG1, κ PE
15	Isotipos 3	Mouse IgG2b FITC Mouse IgG1, κ PE Mouse IgG2a APC	Sem marcação
16	Isotipos 4	IgG2a APC	Mouse IgG1, κ FITC Mouse IgG1, κ PE Mouse IgG1, κ APC Mouse IgG1, κ PerCP-Cy5.5

Fonte: Elaborado pela autora, 2021

5.10 ESTRATÉGIA E SELEÇÃO DE GATE E CONTROLES ISOTIPO

Foram delineadas as populações de estudo de acordo com os marcadores a serem analisados, “gate” de (Lineage 1⁻) para DCs.

“Gate” de (CD3⁺) para linfócitos totais; (CD3⁺CD8⁺) para linfócitos T citotóxicos; (CD3⁺CD4⁺) para linfócitos T auxiliares e (CD3⁻NKG2D⁺CD54⁺) para células NK.

As DCs foram selecionadas segundo o tamanho e granulosidade (FSC x SSC). Uma “gate” para *Lineage 1 negative* foi construída para exclusão de fenótipos que não representam DCs derivadas de monócitos. A partir dessa

“gate”, os marcadores foram traçados via histogramas para marcação de células positivas para moléculas de coestimulação (CD80⁺, CD83⁺ e CD86⁺), moléculas de adesão (HLA-DR⁺, CD11c⁺, CD123⁺ e CD209⁺) e produção presente de IL-10⁺, INF- γ ⁺, TNF- α ⁺, IL-12⁺ e TGF- β ⁺ por essas células.

As células não aderentes foram selecionadas com base no tamanho e granularidade (FSC x SSC). Nos linfócitos, foi construída uma “gate” CD3⁺ para marcação das células T. “Gate” de células positivas para CD8⁺ foi feita para caracterizar células T citotóxicas e dentro dessa “gate” foram puxados histogramas para a produção presente de IFN- γ , perforinas e granzimas. Para os linfócitos T auxiliares, uma “gate” de células positivas para CD4⁺ e dentro dessa população foram construídos dot plots para CD25⁺ e FOXP3⁺ de marcação referente aos linfócitos T reguladores, com histogramas para produção de IL-10⁺ e TGF- β ⁺. Seguindo, histogramas foram construídos para produção de INF- γ ⁺, TNF- α ⁺ e IL-12⁺ pelas células T auxiliares tipo 1; IL-4⁺ e IL-10⁺ em histogramas pelas células T auxiliares tipo 2 e histograma de IL-17⁺ pelas células T auxiliares tipo 17.

As células não aderentes foram selecionadas com base no tamanho e granularidade (FSC x SSC). Nas células NK uma “gate” de células positivas para os marcadores CD54⁺ e NKG2D⁺ foi construída e dentro dessa população, histogramas de produção de IFN- γ ⁺ e IL-10⁺ foram puxados.

Marcações de isotipos foram feitas para confirmação da especificidade de ligação do anticorpo de interesse, eliminando ligações inespecíficas.

5.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram testados para verificar a distribuição normal. Quando a distribuição se apresentou normal, foi utilizado o teste paramétrico “*t de Student*” para comparação entre 2 grupos pareados, com resultados expressos em média \pm desvio padrão. Quando a distribuição se apresentou não gaussiana, foi utilizado o teste não paramétrico (*Wilcoxon*) para comparação entre 2 grupos, sendo os resultados expressos em medianas com valores mínimo e máximo. As diferenças observadas foram consideradas significantes quando a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade foi menor que 0,05 (5%). Para análise dos dados foi utilizado o GraphPad Prism 8.4 (GraphPad

Software). E para realização do poder de teste foi utilizado o programa GPower 3.1.

6 RESULTADOS

Relação de IL-12/IL-10 por células dendríticas. O resultado demonstra que a relação IL-12/IL-10 foi maior em P1 comparada a P2, assim como em P1C comparada a P2C. Comparando as medianas dos mesmos protocolos antes e depois da co-cultura, vemos um aumento dessa relação em P1 para P1C, assim como em P2 para P2C. Resultados significativos ($p=0,0020$).

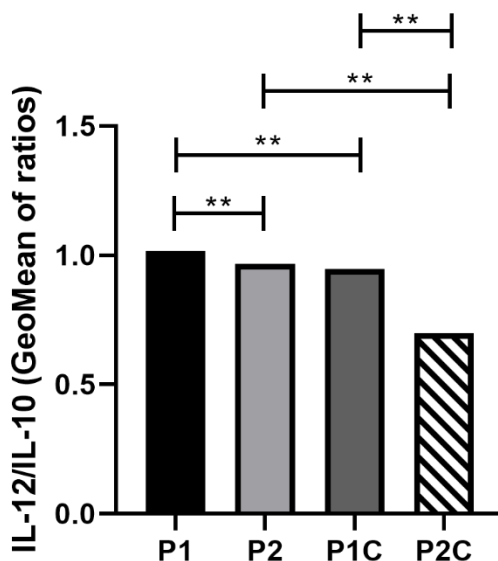


Figura 11. Comparação da razão de concentração de IL-12 / IL-10 em moDCs maturadas com P1, P2 e co-cultura. A relação está representada no gráfico em mediana. Para amostras não paramétricas foi realizado o teste de Wilcoxon (resultados expressos em mediana max. e min). $**p=0,00021$. P1: Protocolo 1, estímulo com TNF- α ; P2: Protocolo 2, estímulo com TNF- α , CCL5 e IL-12; P1C: Protocolo 1 e co-cultura; P2C: Protocolo 2 e co-cultura.

Relação de IL-12/IL-10 por linfócitos Th1 e Th2. O resultado demonstra que a relação entre MFI de IL-12/IL-10 em células do P2 foi significativa ($p<0.0001$) e $\Psi>80\%$, mostrando a prevalência de um perfil Th1.

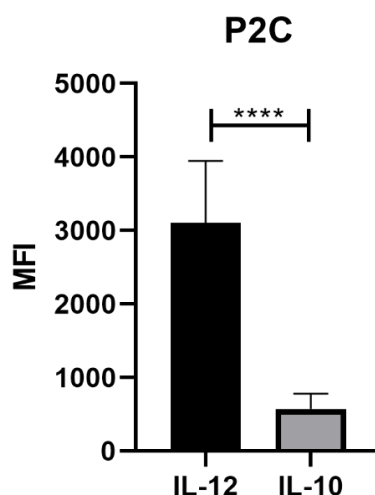


Figura 12. Comparação da razão de concentração de IL-12/IL-10 em TCD4⁺ dos voluntários saudáveis referentes a P2C. A relação está respresentada no gráfico em MFI de IL-12 e IL-10. Para amostras paramétricas foi realizado o teste de relação t (resultados expressos em média ± desvio padrão). **** $p < 0,0001$. P2C: Protocolo 2 e co-cultura.

6.1 ARTIGO

Article title: TNF- α , CCL5 e IL-12: New stimulus protocol for activation and maturation of dendritic cells and in vitro non-adherent cells with antitumor profile obtained from healthy volunteers

Ana Paula Peixoto¹, Eddie Fernando Cândido Murta² e Márcia Antoniazi Michelin^{1,3}

- 1- Oncology Research Institute (Instituto de Pesquisa em Oncologia, IPON), Federal University of the Triângulo Mineiro (Universidade Federal do Triângulo Mineiro, UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brazil
- 2- Discipline of Gynecology and Obstetrics, UFTM, Uberaba, Minas Gerais, Brazil
- 3- Discipline of Immunology, UFTM, Uberaba, Minas Gerais, Brazil

Abstract

Introduction: Dendritic cells (DCs) present great phenotypic and functional heterogeneity and are responsible for regulating and modulating responses against microorganisms and tumor cells. They are key to linking innate and adaptive responses. When matured by different stimuli, they express co-stimulatory molecules and have increased lymphocyte migration and activation. Immunotherapy with DCs is constantly under study to obtain sufficient activation of an anti-tumor immune response. Therefore, the study aims to test the activation profile, maturation (increase in chemokine receptors, adhesion/co-

stimulatory molecules and pro-inflammatory cytokines) and modulation of DCs and non-adherent cells, in the context of 2 different maturation protocols, protocol 1 with TNF- α and combination of TNF- α , CCL5 and IL-12 (protocol 2) in an in vitro assay. **Methods:** Isolation of monocytes and lymphocytes from the peripheral blood of healthy volunteers (n=10). Monocytes were differentiated into DCs submitted to maturation by the 2 protocols already mentioned and later to co-culture with non-adherent cells. To characterize the phenotypic profile of total cells, the mean fluorescence intensity of surface markers and cytokines was analyzed by flow cytometry. The migration of matured DCs was seen by staining and counting cells on a polystyrene membrane subjected to a chemotactic gradient (MCP-1 and CCL5). Parametric "Student's t" and non-parametric (Wilcoxon) tests were used. **Results:** Significant increases in P2 expression of molecules (CD209, CD11c, HLA-DR, CD123, CD209, CD80, CD86 and CD83), as well as increased production of cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-10 and TGF- β) by DCs, with potentiation of this response after co-culture. There is a significant increase in the production of granzymes by CD8⁺ T, a significant increase in IL-12 and IL-17 by CD4⁺ T cells and a decrease in the expression of CD25 and FOXP3 markers. In addition to Natural Killer cells with increased expression of IFN- γ production and decreased expression of IL-10. **Conclusions:** The stimulation protocol with TNF- α , CCL5 and IL-12 was able to generate a profile of mature and efficient DCs for activation of balanced subtypes of T lymphocytes and Natural Killer cells important in the antitumor immune response.

Keywords: Dendritic Cells. Immunotherapy. Cell Migration. T Cells. TNF- α . Interleukin-12. Chemokine CCL5.

Background

DCs are considered the best professional antigen presenters (APCs). They link innate and adaptive responses, responsible for regulating and modulating effector immune responses against microorganisms and tumor cells and also maintain immune tolerance under homeostatic conditions [1].

They have a morphology specialized in the incorporation of extracellular material [2], having high phagocytic capacity, with a migratory process from blood to peripheral tissues and internalization of immature antigens [3]. When matured by pro-inflammatory stimuli, they decrease the ability to phagocytosis, but

increase the expression of the type 7 chemokine receptor, as well as the expression of class II major histocompatibility complex molecules (MHC-II) and co-stimulatory molecules (CD80 and CD86) [4, 5].

This recognition of stimuli activates a cascade of signals responsible for phenotypic changes and increased production of cytokines so that the migration of DCs from peripheral tissues to secondary lymphoid organs can occur, where the presentation of T cell activating antigens can occur. [6, 61].

During the development of an adaptive immune response, the phenotype and function of DCs play an extremely important role in the initiation of tolerance, memory and activation of T helper cell profiles (Th1, Th2 and Th17) differentiated in immunological activities due to different markers cells, location, migratory pathways and dependence on inflammatory stimuli for their generation [7]. Environment factors and the sign of maturation given to DCs define whether a Th1 or Th2 profile response will develop [8].

Immunotherapy with DCs is constantly being studied to obtain these activated cells with appropriate phenotypes and genotypes for effective immunotherapy. Several protocols and patents have been and are still being tested for differentiation and maturation of these cells. In vitro, DCs can be propagated from bone marrow or peripheral blood-derived cells [9].

IL-4 and granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) are classically used in most protocols for differentiation [10]. Regarding the maturation phase, since differentiation generates immature cells, it is necessary to use stimuli such as inflammatory cytokines (TNF- α , IFN- γ), Toll-like receptor agonists and cocktails with immunogenic antigens [11]. These help in the maturation of monocyte-derived DCs (moDCs), increase their IL-12 production and ability to prime specific T cells in vitro [12].

This optimal effect maturation has already been described in several studies in which several cytokines and chemokines are important factors in stimulating DC activation. Inflammatory chemokines are critical contributors in attracting relevant immune cells to the tumor microenvironment and in driving molecular signaling cascades. Therefore, related proteins, consisting of CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), and CCL5, may be the main determinants of immune cell infiltration in certain tumors, including tumor-site DCs [13].

Immunotherapy based on DCs in the antitumor response aims at activating the immune system and, in particular, tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and Natural Killer (NK) cells so that they become capable of killing malignant cells [14]. A good antitumor response depends on the crucial role that DCs play in inducing CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses [15].

Thus, in this study, we compared two protocols (TNF- α , already existing in the literature for use by study groups [16] and the combination of TNF- α , CCL5 and IL-12) in the stimulation of maturation of moDCs isolated from the peripheral blood of healthy volunteers, evaluating surface markers and cytokines, in order to elucidate whether the co-culture and the stimuli used were able to develop a balanced profile of DCs regarding the antitumor response. We still seek to elucidate how the matured DCs activated different profiles of T cells and NK cells, consequently providing a response that meets antitumor characteristics. Contributing to the generation of a new maturation protocol.

Methods

Voluntary donors and isolation of monocytes and lymphocytes.

Peripheral blood samples (20mL) from ten healthy volunteer donors were used in the preparation of cell cultures to assess maturation and activation of DCs, lymphocytes and NK cells. The study already has a research protocol approved (683) by the Research Ethics Committee of the UFTM. Healthy volunteers who agreed to participate, for clarification, consent and awareness of the research objectives were given the Informed Consent Form (FICF) written in the model of the university. In addition, the research followed the precepts established by Resolution 466/12 of the Ministry of Health.

Blood collected in tubes with heparin (100UI/mL) was transferred to conical plastic tubes containing 15mL of Ficoll-Hypaque™Plus solution (GE Healthcare®). The tubes were centrifuged at 600xg for 30 minutes at a temperature of 18°C in a refrigerated centrifuge to separate the ring of mononuclear cells (collected with the aid of a pipette and transferred to another tube). After a new centrifugation at 4°C and at a speed of 805xg for 10 minutes, the excess of Ficoll® was removed by washing 3 times in 30mL of incomplete RPMI medium (Sigma-Aldrich®). Afterwards, cells were counted in a Neubauer chamber.

Peripheral blood mononuclear cell culture

Cells were added to culture flasks in the amount of $32,5 \times 10^6$ cells in a volume of 7,5mL per flask in complete RPMI culture medium (Sigma-Aldrich®) and incubated at 37°C in a CO₂ oven. After 24 hours, non-adherent cells (supernatant with lymphocytes and NK cells) were collected and plated again.

The supernatant was cultivated for 7 more days in complete RPMI medium at 5% CO₂ and at 37°C for use in culture with part of the DCs obtained from the two different protocols (co-culture).

Dendritic cell culture

The isolated adherent mononuclear cells were cultured for 8 days in culture bottles with 7,5mL of complete IMDM medium (Sigma-Aldrich®) at 37°C and 5% CO₂. One day after plating, cells were stimulated with 200U of GM-CSF and IL-4 to obtain immature DCs. These were then submitted to two maturation protocols and on the 5th day of culture the immature DCs were submitted to maturation through stimulation with 200U of TNF- α in protocol 1 (P1). In protocol 2 (P2) DCs were matured in the presence of TNF- α , 10^{-6} μ g/mL of CCL5 and 10 ng/mL of IL-12. Afterwards, the cells were preserved for another 48 hours in culture for the maturation process.

Co-culture

The cells were co-cultured in flasks where matured DCs from P1 were placed together with non-adherent cells (P1C) and the culture medium described above. In another flask, non-adherent cells to P2 DCs (P2C) were added. Flasks were prepared for evaluation after 7 days of incubation in the greenhouse.

Dendritic Cell Migration

The assay that measures the chemotactic capacity of the cells towards a chemoattractant was carried out in a sterile environment, the DCs were disconnected from the respective culture plates with subsequent centrifugation at 4°C and at a speed of 805xg for 10 minutes. Cells from the 2 maturation protocols were resuspended in 300 μ L of appropriate culture medium for insert plating (BD Falcon™ Cell Culture Inserts). The protocol was standardized according to the

transwell cell migration assay described by Pijuan et al. (2019) [17], with adaptation according to standardization carried out in the parameters of the Institute for Research in Oncology.

A standardized amount ($2,5 \times 10^5$) of DCs solution was measured and plated on top of the polycarbonate membrane ($8.0 \mu\text{m}$) of the insert, the incubation was done for 24 hours at 37°C and 5% CO_2 to allow migration of the cells.

Using a pipette, 700 μL of the chemoattractant solution (10^{-6} $\mu\text{g}/\text{mL}$ of MCP-1 and CCL5) in complete IMDM medium) was added to the bottom chamber of the 24-well plate (BD Falcon™ Companion TC Plate), without moving the membrane which must contact this solution to form a chemotactic gradient. After incubation the insert was removed from the plate for analysis and cell counting.

The insert was placed in a 3,7% formaldehyde solution in 1X phosphate-buffered saline (PBS) for 15 minutes to allow the cells to be fixed. Afterwards, in order to remove the formaldehyde solution, the insert was subjected to two washings with PBS. For staining and visualization under a light microscope, the membrane was then immersed in Harris Hematoxylin solution for an additional 15 minutes and washed with two more washes in 1X PBS to remove excess.

A cotton-tipped applicator was used to gently remove the remaining cells that had not migrated from the top of the membrane without damaging it. After observation under an inverted microscope (Olympus), two observers counted the number of cells in 10 different fields of view of each insert to obtain an average sum of cells that migrated across the membrane towards the chemoattractants to the lower part of the membrane (performed in triplicate for each protocol).

The fields photographed for cell counting in the ImageJ program were captured in order to represent the amount of cells present in the lower part of the membrane, as mentioned in guidelines for use (Corning® BioCoat™ Matrigel® Invasion Chamber) [18]: cells passing through the membrane pores vary in a uniform distribution to a location in distinct areas, so when counting membrane cells in triplicate, the choice of fields in the center of the membrane, as well as fields in the periphery of the membrane, suggests a “real” representation of the number of cells across the membrane.

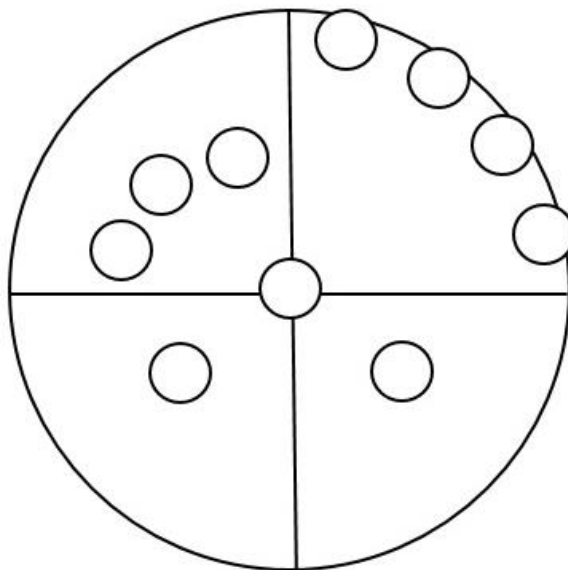


Figure 1. Schematic representation of the image capture of 10 fields for dendritic cell count.

Surface markers and cytokines of dendritic cells and non-adherent cells

Mature DCs and co-cultured cells from the 2 protocols were submitted to evaluation by flow cytometry. Samples were analyzed on a FACSCalibur™ BD cytometer (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). The flow cytometry technique was performed according to the cytometry protocol suggested in the BD Cytotfix/Citoperm™ Fixation/Permeabilization kit, using BD Pharmingen™ antibodies and adapted according to IPON laboratory parameters.

Briefly, the cells underwent 3 washes with PBS, in each wash centrifuged at 290 xg for 10 min and 4°C. Discard the supernatant carefully preserving the cell precipitate. The cell pellet was added with PBS plus BD GolgiStop™ inhibitory transporter protein for 20 minutes at 4°C. After centrifugation cells were resuspended in PBS for division into tubes (10^6 cells per tube). Initially, extracellular labeling was performed (incubated at 4°C for 30 minutes in the absence of light). Subsequently, washed twice with PBS to remove excess antibodies. Then, 100 uL of Citofix BD® was placed, which allows pores to be made in the cell membrane to be labeled with 0,25µL of intracellular antibodies. The cell suspension with the antibodies were left to stand at 4°C for a further 20 minutes in the dark.

In the next step, two more washes were performed with the Perm/wash BD® solution to remove excess intracellular antibody. DCs obtained from the two

different protocols (TNF- α or TNF- α , IL-12 and CCL5) were labeled for total DCs (CD11c), for co-stimulatory molecules (CD80, CD83, CD86), MHCII (HLA-DR), CD123, CD209 and analyzed the production of cytokines IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-12 and TGF- β .

Non-adherent cells from the two different protocols were labeled for total T lymphocytes (CD3), for cytotoxic T lymphocytes and cytokines (CD8, IFN- γ , perforins and granzymes), for helper T lymphocytes and analyzed for cytokine production (CD4, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-17, TGF- β , IL-12, IL-10, Fox-p3 and CD25). They were also labeled for NK cells (NKG2D, CD54, IFN- γ and IL-10).

After performing the flow cytometry technique, the study populations were delineated according to the markers to be analyzed, "gate" from (Lineage 1⁻) to DCs. For non-adherent cells, a gate was made (CD3⁺) for total lymphocytes; (CD3⁺CD8⁺) for cytotoxic T lymphocytes; (CD3⁺CD4⁺) for helper T lymphocytes and (CD3⁻NKG2D⁺CD54⁺) for NK cells. Isotype labels were used to confirm the binding specificity of the antibody of interest, eliminating nonspecific binding.

Statistical analysis

The results obtained were tested to verify the normal distribution. When the distribution was normal, the "Student's t" parametric test was used to compare 2 paired groups, with results expressed as mean \pm standard deviation. When the distribution was non-Gaussian, the non-parametric test (Wilcoxon) was used to compare 2 groups, with the results expressed as medians with minimum and maximum values. The differences observed were considered significant when $p < 0.05$ (5%). For data analysis we used GraphPad Prism 8.4 (GraphPad Software). And to perform the test power, the GPower 3.1 program was used.

Results

Dendritic cell surface markers. For the characterization of the phenotypic profile, the mean fluorescence intensity (MFI) of surface markers of DCs from healthy donors submitted to two different maturation protocols (P1 and P2) was analyzed by flow cytometry in order to better understand their maturation and activation.

The Lineage 1 marker (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 and CD56) marks cells with a phenotype that do not represent DCs, therefore, it serves as an exclusion marker considering its negative expression, this can be seen increased

before and after co-culture in P2 95.42 (144.9 – 57.95) (max. – min.) compared to P1 74.94 (99.60 – 15.72) and test power (Ψ) >80%, as well as for P2C 200.1 (409.9 – 88.20) compared to the P1C 149.2 (219.5 – 29.81) ($p=0,0098$). When comparing the medians of the same protocols before and after co-culture, P1C compared to P1; P2C compared to P2, the differences were also statistically significant at $p<0.05$ and $\Psi>80\%$ (figure 2A).

In the expression seen in the markers CD209, CD11c and HLA-DR present in differentiated DCs, an increase in MFI before and after co-culture can be seen, in P2 compared to P1 $\Psi>80$, as well as in P2C compared to P1C ($p<0.05$). When comparing the medians of the same protocols before and after co-culture, P1C and P1; P2C and P2, there is a slight increase in expression, but without significance (figure 2B, C and D).

The CD123 marker marks plasmacytoid DCs (pDCs) and its expression is increased before and after co-culture at P2 318.5 (688.3 - 280.8) compared to P1 293.2 (415.5 - 137.8) ($p=0.0195$), as well as in P2C 602.0 (918.7 - 357.0) compared to P1C 494.7 (762.9 - 341.0), but not statistically significant. Comparing the medians of the same protocols before and after co-culture, an increase in P1C when compared to P1 is observed, as well as in P2C compared to P2, with $p<0.05$ and $\Psi>80\%$ (figure 2E).

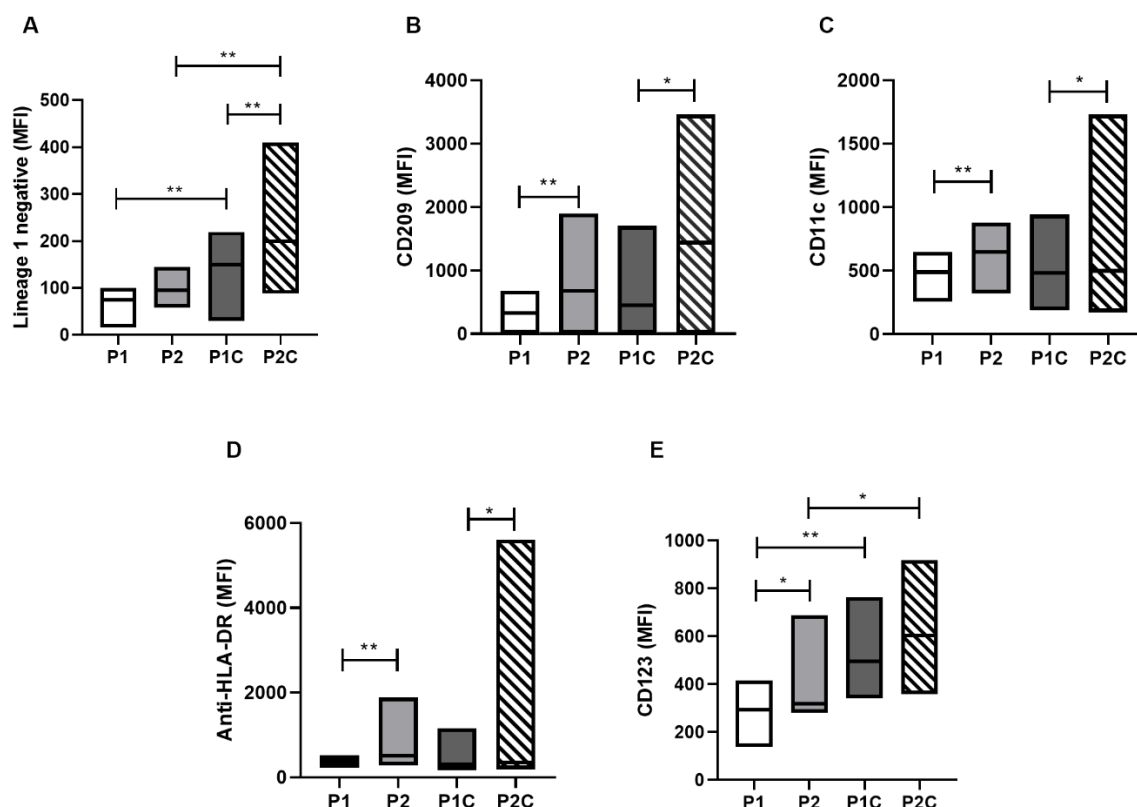


Figure 2. Cell surface marker expression of moDCs matured with P1, P2 and co-culture. Graphs represent MFI of Lineage 1- (A), CD209⁺ (B), CD11c⁺ (C), Anti-HLA-DR⁺ (D) and CD123⁺ (E). For non-parametric samples, the Wilcoxon test was used (results expressed as median max. and min.). *p=0,00332; **p=0,00021. P1: Protocol 1 stimulated with TNF- α ; P2: Protocol 2 stimulated with TNF- α , CCL5 and IL-12; P1C: Protocol 1 and co-culture; P2C: Protocol 2 and co-culture.

Costimulation markers analyzed in mature DCs (CD80, CD83 and CD86) are found with increased expression in the P2 maturation protocol compared to P1 stimulation before and after co-culture with non-adherent cells.

The CD80 marker has a significant increase in MFI in P2 551.3 (1116 – 457.7) when compared to P1 479.3 (698.4 – 249.7) ($p=0.0137$), as well as in P2C 924, 4 (1298 – 604.1) compared to P1C 811.8 (1087 – 570.7) ($p=0.0059$). Comparing the medians of the same protocols before and after co-culture, an increase in P1C compared to P1 ($p=0.0020$) and $\Psi>80\%$ is noted, as well as in P2C compared to P2, which was not significant (figure 3A).

The MFI of the CD83 marker is significantly increased in P2 505.1 (1833 – 304.0) compared to P1 381.3 (646.8 – 243.4) ($p=0.0039$). Likewise, the MFI of P2C 337.9 (1785 – 142.3) remains slightly increased compared to P1C 314.2 (1070 – 131.9), however without statistical significance (figure 3B).

The CD86 marker also shows a significant increase in P2 320.8 (698.1 – 280.9) compared to P1 299.1 (421.1 – 149.0) ($p=0.0195$). Comparing the medians of the same protocols before and after co-culture, an increase in expression in P1C 495.1 (900.9 – 352.7) to P1 ($p=0.0020$) and $\Psi>80$ is noted, thus as in P2C 601.3 (930.0 – 365.0) for P2 ($p=0.0371$) and $\Psi>80\%$ (figure 3C).

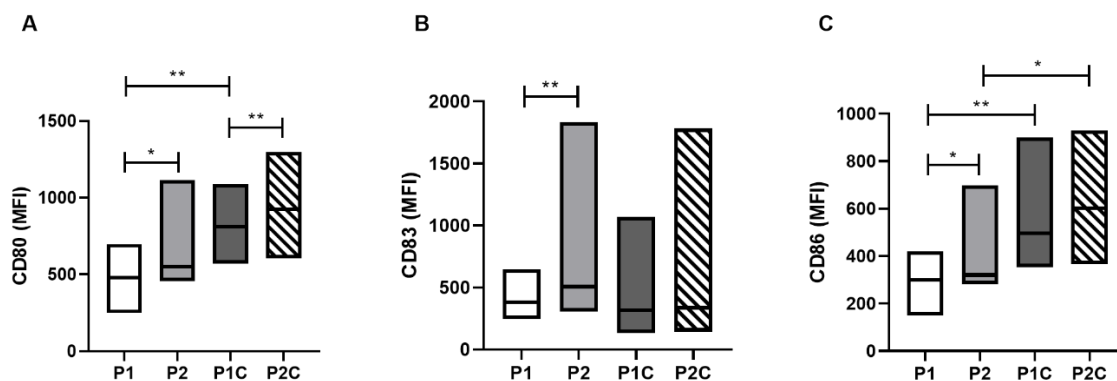


Figure 3. Expression of costimulatory molecules present in moDCs matured with P1, P2 and co-culture. Graphs represent MFI of CD80⁺ (A), CD83⁺ (B) and CD86⁺ (C). For non-parametric samples, the Wilcoxon test was used (results expressed as median max. and min.).

*p=0.00332; **p=0.00021. P1: Protocol 1, TNF- α stimulation; P2: Protocol 2, stimulation with TNF- α , CCL5 and IL-12; P1C: Protocol 1 and co-culture; P2C: Protocol 2 and co-culture.

Cytokine profile produced by dendritic cells. MFI analyzed from the expression of cytokines produced by matured DCs obtained from P1 and P2 with co-culture. The pattern seen in the anti-inflammatory cytokine IL-10 (human cytokine synthesis inhibitory factor) and pro-inflammatory cytokine IFN- γ (macrophage activating factor) is the same. There is a significant increase in the MFI at P2 compared to P1. Comparing the medians of the same protocols before and after the co-culture, we saw an increase in expression in P1C for P1 $\Psi > 80\%$, as well as in P2C for P2 with $p < 0.05$ and $\Psi > 80\%$ (figure 4A and B).

We can see an increase in the production of the pro-inflammatory cytokine TNF- α , when we analyze the significantly increased MFI before and after co-culture, at P2 320.8 (494.4 – 286.4) compared to P1 313.7 (414.6 – 212.2) ($p = 0.0273$) $\Psi > 80\%$, as well as in P2C 562.4 (768.6 – 476.8) compared to P1C 489.5 (702.2 – 425.9) ($p = 0.0371$). Comparing the medians of the same protocols before and after co-culture, we see an increase in expression in P1C to P1 ($p = 0.0020$) and $\Psi > 80\%$, as well as in P2C to P2 ($p = 0.0020$) and $\Psi > 80\%$ (figure 4C).

IL-12 cytokine production by activated DCs also has increased MFI in P2C 1577 (9910 – 285.5) compared to P1C 866.9 (2717 – 217.4) ($p = 0.0488$) (figure 4D).

The production of the anti-inflammatory cytokine TGF- β by DCs was also analyzed. Comparing the medians of the same protocols before and after co-culture, a significant increase in the MFI of P1C 390.4 (695.9 – 278.5) compared to P1 284.5 (449.1 – 215.3) is noted.) ($p = 0.0137$) (figure 4E).

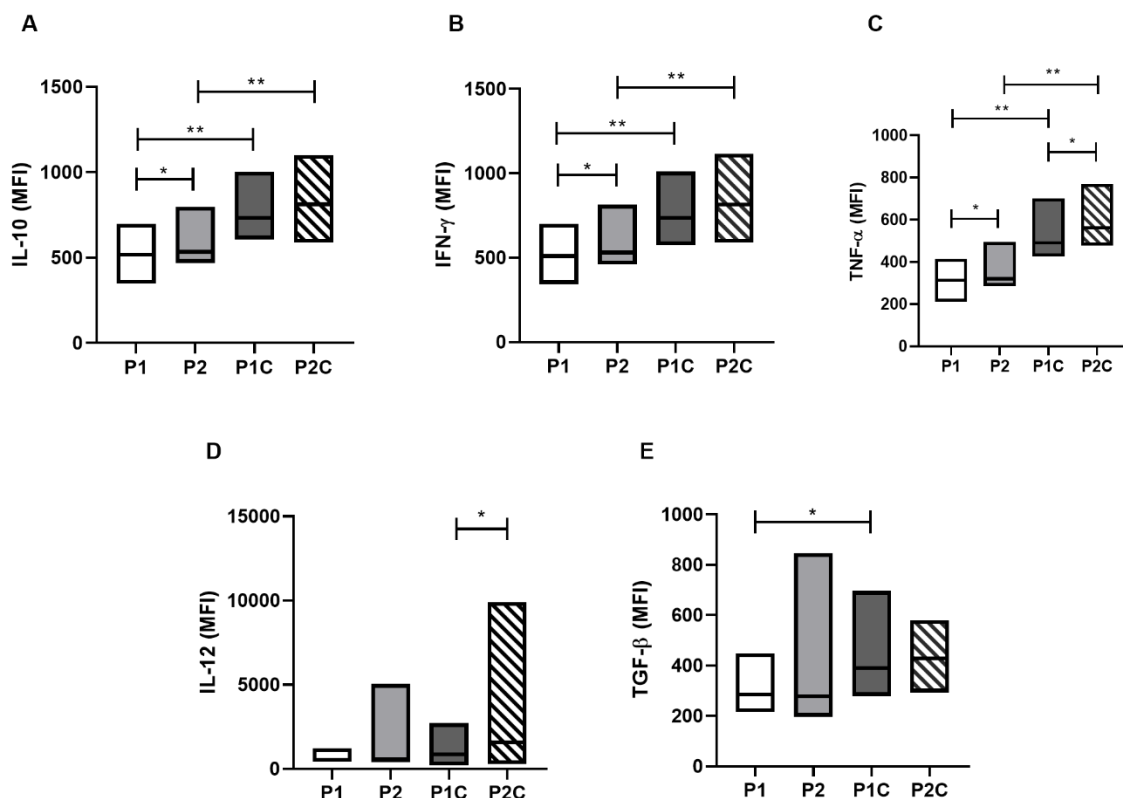


Figure 4. Cytokine expression (IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-12 and TGF- β) in moDCs matured with P1, P2 and co-culture. Graphs represent the MFI of IL-10 (A), IFN- γ (B), TNF- α (C), IL-12 (D) and TGF- β (E). For non-parametric samples, the Wilcoxon test was used (results expressed as median max. and min.). * $p=0.00332$; ** $p=0.00021$. P1: Protocol 1, TNF- α stimulation; P2: Protocol 2, stimulation with TNF- α , CCL5 and IL-12; P1C: Protocol 1 and co-culture; P2C: Protocol 2 and co-culture.

Quantification of dendritic cell migration. Regarding the count of DCs photographed under a light microscope that migrated through the upper part of the insert membrane towards the chemoattractants, to the lower part of the membrane, we can see in the graph an increase in migration referring to the significantly higher number of cells in P2 (3181 ± 496.3) compared to P1 (2649 ± 453.1) ($p < 0.0001$) and $\Psi > 80\%$ (figure 5).

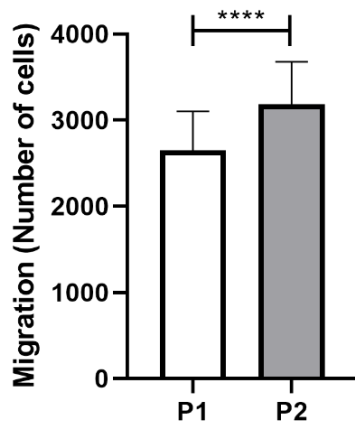


Figure 5. Quantification of migration of moDCs from healthy donors submitted to two different maturation protocols. The graph represents the number of cells counted in 10 fields per insert (triplicate). For parametric data, Student's t-test was performed (result expressed as mean and standard deviation ****p <0.0001. P1: Protocol 1, stimulus with TNF- α ; P2: Protocol 2, stimulus with TNF- α , CCL5 and IL-12.

Cell surface markers of non-adherent cells. In order to identify a profile of activated T cells, the MFI of surface markers and the production of cytokines from non-adherent cells from healthy volunteers were analyzed, placed in co-culture with DCs matured by P1 and P2.

The presence of CD3 was higher in P2C 841.5 (1068 – 590.0) when compared to P1C 838.0 (1097 – 500.0), but not significant (figure 6). The CD3 molecule is a total lymphocyte marker that is present on both CD4⁺T lymphocytes and CD8⁺ T lymphocytes.

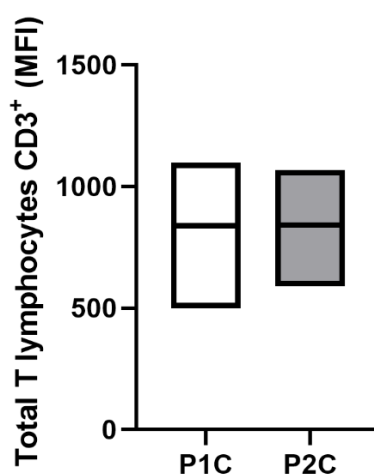


Figure 6. Expression of total T lymphocytes (CD3⁺) of healthy volunteers regarding P1C and P2C. The graph represents the MFI of CD3⁺ cells. For non-parametric samples, the Wilcoxon

test was performed (results expressed as median max. and min.). P1C: Protocol 1 and co-culture; P2C: Protocol 2 and co-culture.

Expression of cytotoxic T lymphocytes and cytokine production. Cytotoxic T lymphocyte cytokine production was seen. CD8 MFI, a characteristic marker of cytotoxic T lymphocytes, is slightly decreased in P2C 499.3 (912.6 – 303.9) compared to P1C 489.1 (943.9 – 316.3), but it is not significant statistics (figure 7A).

Granzyme is a protein produced by activated cytotoxic T lymphocytes. There is a significant increase in its MFI at P2C 4446 (8896 – 2017) compared to P1C 3359 (5498 – 0.000) ($p=0.0195$) (figure 7B).

However, the cytokines IFN- γ and perforin produced by activated cytotoxic T lymphocytes show a very slightly increased MFI in P2C cells compared to P1C, but with non-statistically significant differences (figure 7C and D).

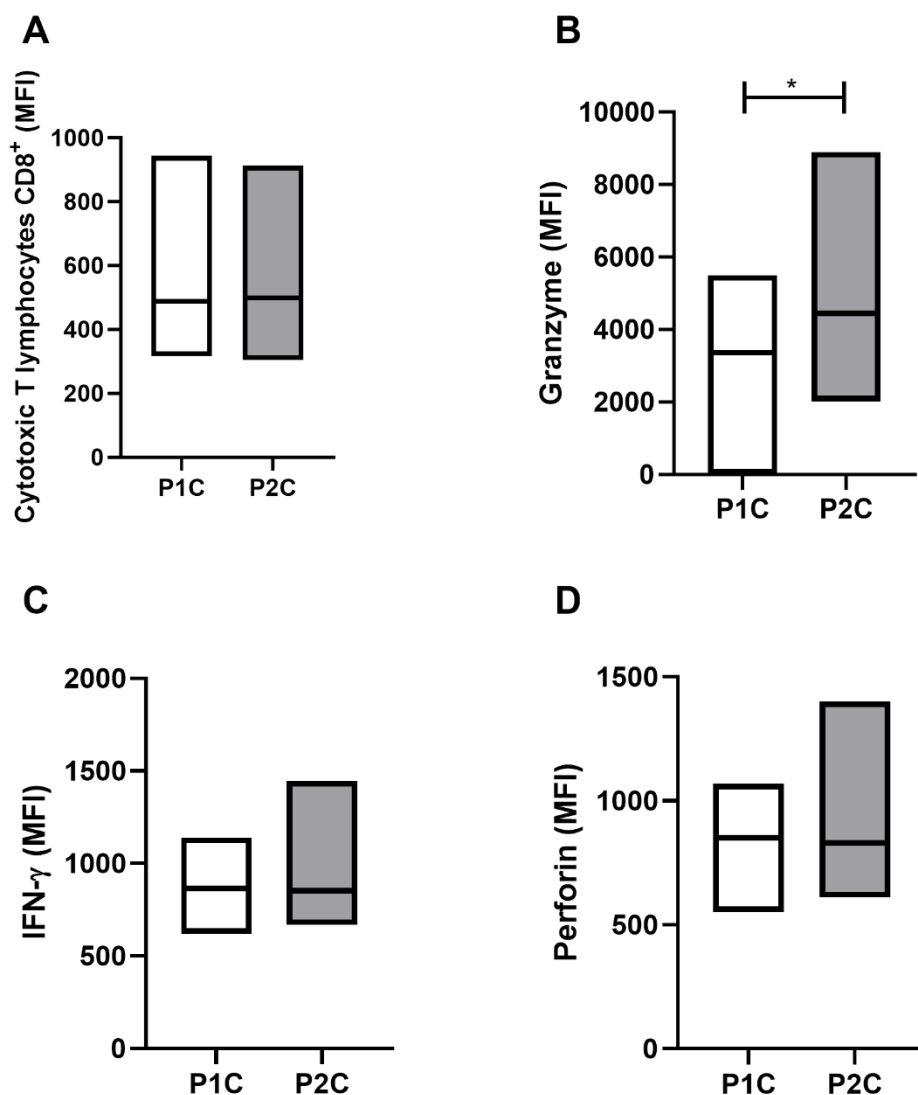


Figure 7. Expression of CTLs (CD8⁺) and cytokines from healthy volunteers related to P1C and P2C. Graphs represent MFI of CD8⁺ cells (A) and production of Granzyme (B), IFN- γ (C), and Perforin (D). For non-parametric samples, the Wilcoxon test was performed (results expressed as median max. and min.). *p=0.00332. P1C: Protocol 1 and co-culture; P2C: Protocol 2 and co-culture.

Helper T lymphocyte cell surface markers. The MFI of surface markers and the cytokine production of CD4⁺ T lymphocytes were analyzed.

CD4 is typical of these cells. There are some populations of helper T lymphocytes, among which we can mention: Th1, Th2, Treg, Th17 among others. Regarding the presence of CD4, it is also noted a slight increase in MFI at P2C 451.0 (1010 – 256.7) compared to P1C 437.9 (880.1 – 309.0), however without statistical significance (figure 8).

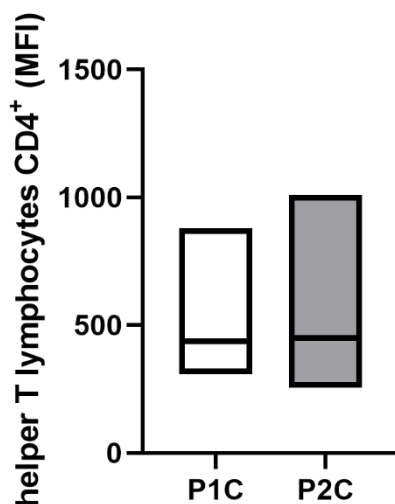


Figure 8. Helper T lymphocyte (CD4⁺) expression of healthy volunteers referring to P1C and P2C. The graph represents the CD4⁺ cell MFI. For non-parametric samples, the Wilcoxon test was performed (results expressed as median max. and min.). P1C: Protocol 1 and co-culture; P2C: Protocol 2 and co-culture.

Cell surface markers and cytokines of Treg lymphocyte profile. MFI of surface markers and the production of cytokines such as CD25, FOXP3, IL-10 and TGF- β were analyzed.

Knowing that the immunosuppressive profile known as Treg has on its surface the CD25 marker, which is the receptor for IL-2, cytometric analysis for this marker was also performed. There is a significant decrease in its MFI in helper T lymphocytes of P2C 2608 (5307 - 0.000) compared to P1C 4122 (8429

- 2500) ($p=0.0195$) and $\Psi>80\%$, as well as in FOX-P3 in Helper T lymphocytes of P2C 2247 (4247 ± 0.000) compared to P1C 3955 (9910 ± 2054) ($p=0.0020$) and $\Psi>80\%$ (Figure 9A and B).

There is a slight decrease in the MFI of IL-10 produced by the anti-inflammatory lymphocytes of P2C 2613 ($9910 - 0.000$) compared to that of P1C 5734 ($9010 - 2000$), however without significant difference (figure 9C).

A slight increase in TGF- β MFI can be seen in helper T lymphocytes of P2C 3242 ($6612 - 0.000$) compared to that of P1C 1690 ($4059 - 0.000$), however without significance (figure 9D).

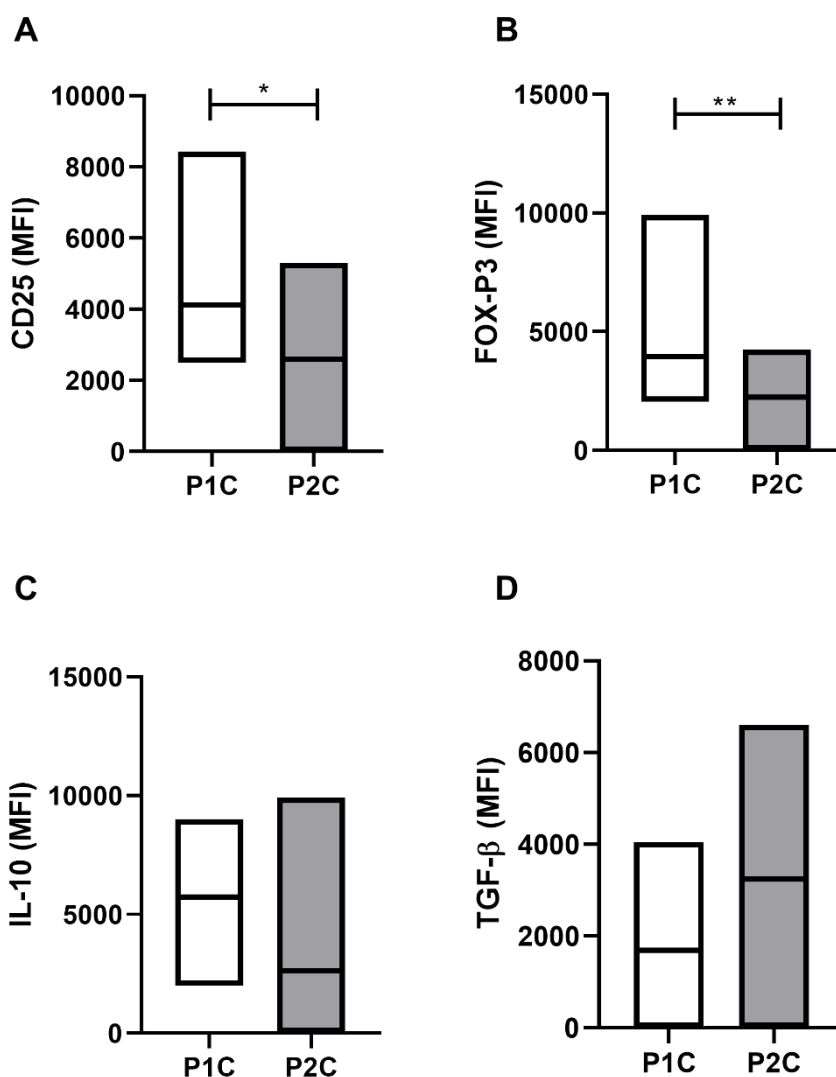


Figure 9. Expression of TCD4⁺ markers and cytokines from healthy donors related to P1C and P2C. Graphs represent MFI of CD25⁺ (A) and FOX-P3⁺ (B) cells, and IL-10 (C) and TGF- β (D) production. For non-parametric samples, the Wilcoxon test was performed (results expressed as median max. and min.). * $p=0.00332$; ** $p=0.00021$. P1C: Protocol 1 and co-culture; P2C: Protocol 2 and co-culture.

Cytokine production by Th1 helper T lymphocytes. For profile characterization of other populations of helper T lymphocytes, it was also evaluated using the MFI of the main cytokines produced, such as IFN- γ , TNF- α and IL-12. Cytokine IFN- γ produced by activated helper T lymphocytes shows an MFI with no statistical difference between lymphocytes, however it presents a slight decrease in P2C 507.7 (1390 – 276.7) compared to P1C 561.7 (1075 – 337, 1) (figure 10A).

There is a slight increase in the MFI of TNF- α produced by lymphocytes of P2C 3315 (7635 – 1570) compared to that of P1C 2684 (5573 – 0.000), however it does not present statistical significance between the medians (figure 10B).

There is a significant increase in the MFI of IL-12 produced by the pro-inflammatory lymphocytes of P2C 2882 (4332 – 1560) compared to that of P1C 2155 (3995 \pm 0.000) ($p=0.0020$) and $\Psi>80\%$ (figure 10C).

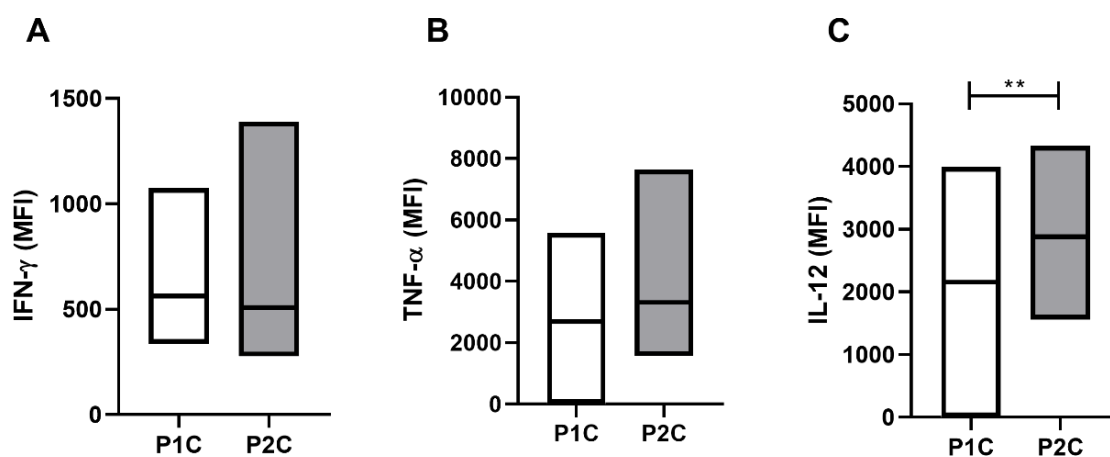


Figure 10. Expression of cytokine production by TCD4⁺ in healthy volunteers referring to P1C and P2C. The graphs represent the MFI of IFN- γ (A), TNF- α (B) and IL-12 (C) production. For non-parametric samples, the Wilcoxon test was performed (results expressed as median max. and min.). ** $p=0.00021$. P1C: Protocol 1 and co-culture; P2C: Protocol 2 and co-culture.

Cytokines of Th2 lymphocyte profile. We analyzed the MFI of the presence of helper T lymphocyte cytokines of the Th2 profile, such as IL-4 and IL-10. There is a slight decrease in the MFI of these cytokines produced by the pro-inflammatory lymphocytes of P2C compared to those of P1C, but these differences between the protocols were not statistically significant (figure 11A and B).

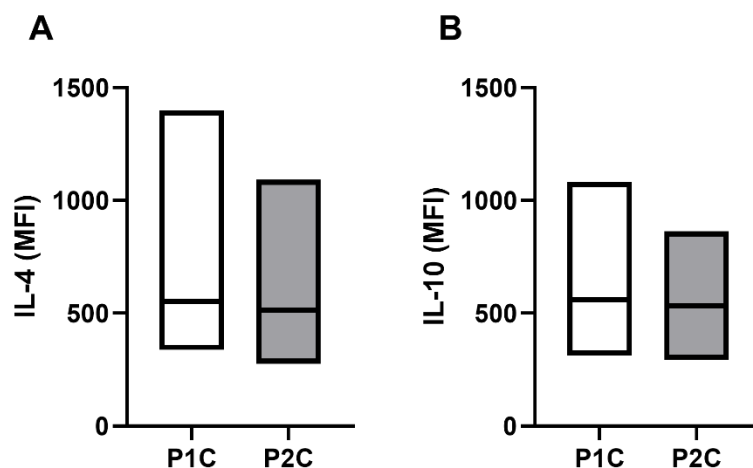


Figure 11. Expression of TCD4⁺ surface markers from healthy volunteers referring to P1C and P2C. The graphs represent the MFI of IL-4 (A) and IL-10 (B) production. For non-parametric samples, the Wilcoxon test was performed (results expressed as median max. and min.). P1C: Protocol 1 and co-culture; P2C: Protocol 2 and co-culture.

Th17 lymphocyte profile cytokines. IL-17 cytokine production was analyzed, considering that MFI was significantly increased in P2C 3916 (8058 – 2110) compared to P1C 2503 (7234 – 0.000), $p=0.0098$ (figure 12).

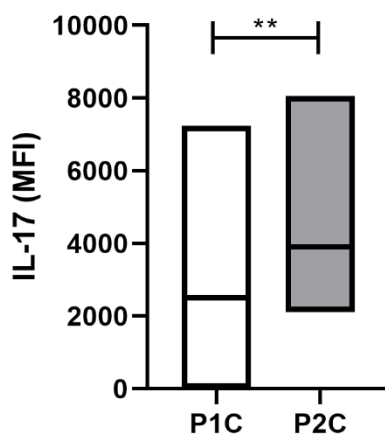


Figure 12. IL-17 expression by helper T lymphocytes from healthy volunteers referring to P1C and P2C. The graph represents the MFI of IL-17 production. For non-parametric samples, the Wilcoxon test was performed (results expressed as median max. and min.). $**p=0.00021$. P1C: Protocol 1 and co-culture; P2C: Protocol 2 and co-culture.

Natural Killer Cell Surface Markers and Cytokines. The MFI analysis was performed by flow cytometry of surface markers and cytokine production of NK cells obtained from healthy donors subjected to culture with DCs matured by P1C

and P2C, to better understand the activation of these cells through immunomodulatory DCs via cell-cell contact and cytokine production.

We can see a slight increase in the MFI of the markers present in activated NK cells (NKG2D and CD54) in P2C 654.2 (1511 – 306.9) compared to P1C 605.4 (1829 – 251.2), however without statistical significance (figure 13A).

The level of IFN- γ and IL-10 production by activated NK cells is opposite, IL-10 MFI is decreased in P2C 2422 (2900 \pm 1728) compared to P1C 2904 production (6494 \pm 1800) ($p=0.0098$); IFN- γ production is seen to be significantly increased in P2C 5355 (7635 – 3298) compared to P1C 4094 (5962 – 0.000) ($p=0.0059$) and $\Psi>80$ (figure 13B and C).

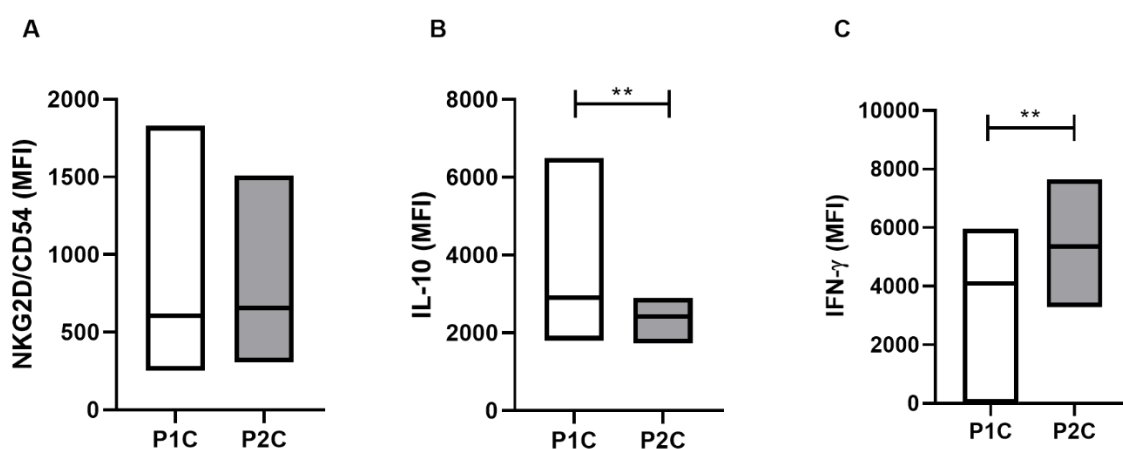


Figure 13. NK cell cytokine expression from healthy volunteers added to P1C and P2C. Graphs depict MFI of NKG2D⁺/CD54⁺ cells (A), IL-10 production (B) and IFN- γ (C). For non-parametric samples, the Wilcoxon test was performed (results expressed as median max. and min.). ** $p=0.00021$. P1C: Protocol 1 and co-culture; P2C: Protocol 2 and co-culture.

Discussion

In this study, DCs differentiated and matured by both stimulus protocols (P1 and P2) were evaluated. Cell surface markers and cytokines analyzed before and after co-culture with non-adherent cells made possible the characterization of a possible immunological and anti-tumor profile for future efficacy.

DCs prepared for maturation and activation derived from the separation of PBMCs (human peripheral blood mononuclear cells) were defined by flow cytometry as HLA-DR⁺ and lineage negative (Lin⁻) cells for surface markers associated with the T cell lineage, cells B, monocytes, granulocytes and NK cells [19, 20]. Suggesting greater differentiation of DCs referring to this phenotypic classification in P2.

According to Nelson et al. (1999) DCs consist of a heterogeneous population of hematopoietic cells characterized by their morphology and efficient antigen-presenting capacity to activate naive T lymphocytes but lacking specific lineage markers that dictate their functional properties [21]. Therefore, without a surface marker common to all DCs, its identification becomes a challenge. When analyzing the profile of DCs found in the two protocols used, it was possible to observe greater expression of the molecules CD11c, CD123, CD209 and HLA-DR in P2.

In vitro cultured DC acquire different phenotypic and functional properties depending on the medium and stimulus cocktail provided [22], [23], [24].

Corroborating our results, in a comparison study of differentiation carried out by Dilioglou, Cruse and Lewis (2003) between CD14 monocytes from human umbilical cord blood and CD34 stem cells in the generation of DCs with stimulation of GM-CSF, IL-4 and TNF- α , the profile of these differentiated cells had the characteristic expression of CD80, CD86, CD83, CD11c and HLA-DR. It was also later seen that there was a significant decrease in the activation of T cells stimulated by CD80 and CD86 when these molecules were blocked by monoclonal antibodies in moDCs [25].

A greater increase in expression of CD80, CD86 and CD83 (the main glycoproteins known as markers of maturation for human DCs) [26] was observed in P2 and a greater expression when the same protocols were compared before and after the addition of non-adherent cells. These data suggest an effective stimulation of the combination of stimuli acting together.

These molecules play important roles in inducing immune responses, as during maturation of dendritic cells CD83 is up-regulated along with CD80 and CD86. The CD83 molecule is a member of the Ig superfamily [27], with important regulation in vitro and in vivo and linked to lymphocyte stimulation via calcium-dependent signaling [28].

Its stimulatory and regulatory role in DCs was possibly elucidated in a study by Lechmann et al. (2002) where it was observed that soluble molecules of the extracellular CD83 domain can completely inhibit mediated T cell proliferation. Furthermore, CD83 knockout mice revealed a block in the generation of CD4⁺ T lymphocytes. Communication of this marker is also present

between key cells in the system, such as activated B cells and activated CD8⁺ T cells [29].

On the other hand, CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) are responsible for the second signal to T lymphocytes, interacting with their ligands expressed by T cells [30]. Thus suggesting an excellent function in the presentation of antigens related to the DC vaccine obtained when they are in a "mature" state [31].

Several stimuli are effective in inducing DC maturation, shown by Csomor et al. (2007) that maturation of immature human moDCs in the presence of C1q was followed by positive expression of CD80, CD83, CD86, MHCII and CCR7. The functional activity of cells was evaluated by measuring cytokine secretion and their ability to activate allogeneic T lymphocytes [32].

In a study by DE LA ROSA et al. (2003) in which adhesion molecules and chemokines involved in migration through endothelium of distinct subsets (myeloid and plasmacytoid DCs) present in peripheral blood were analyzed, these cells responded with migratory potency to CXCL12, CCL5 and CCL2 (protein-1) stimuli monocyte chemoattractant) [33].

In the study by ZHU et al. (2000) a positive migration response of human moDCs to MCP-1 and CCL5 was also seen, as these chemokines and their corresponding receptors were consistently expressed in these cells, suggesting an important role in the interaction between DCs and T cells for the induction of immune responses [34].

Therefore, elucidating the migration and activation via CCR5 required. In one study, wild-type mice compared to CCR5^{-/-} mice experienced poor migration of DCs and NK cells to the site of infection. DCs in an in vitro culture of CCR5^{-/-} mice could not be activated after parasite infection [35].

The importance of these stimuli was seen in a study conducted in 2011 by Immecke et al. where an immunosuppressant inhibited IL-12 production, antigen uptake and CCL5 expression by DCs and these consequently had less interaction with CD4⁺ T lymphocytes and decreased migration [36].

Activated lymphocytes can induce a better maturation of moDCs and the presence of mononuclear cells seems to contribute to the DC differentiation process. Whereas, in the study by Lopes; Michelin; Myrtle (2017), who also compared different differentiation protocols, found a significantly lower mature profile of DCs differentiated with GM-CSF, IL-4, TNF- α and activated

lymphocytes in the absence of non-adherent cells, compared to an increased expression of CD11c, CD86 and HLA-DR on cells similarly differentiated in the presence of non-adherent cells capable of producing IL-12 significantly increased and with a significant decrease in IL-4 production [17]. Also in DCs analyzed in this study, both from control and from patients with cervical cancer, the production of TGF- β was significantly increased in the presence of non-adherent cells.

Previous studies have shown that lymphocytes of the innate immune response, including NK cells, NKT and $\gamma\delta$ T cells were able to induce DC maturation, which could be evidenced by increased expression of CD86 and production of IL-12 [37].

Human moDCs (CD11c⁺) predominantly induced the differentiation of naive T lymphocytes into Th1 cells by producing IL-12, whereas CD11c⁻ cells predominantly induced Th2 responses. Furthermore, IL-12 produced by DCs was able to stimulate cytotoxicity and IFN- γ production by CD8⁺ T lymphocytes and NK cells [38].

According to several authors, the characterization of human DC subsets is still under study, but with their pre-definition they can point to conventional markers, which were found present in this study, CD123 characteristic of pDCs and pre-DCs; CD11c characteristic of cDCs2 and moDCs and HLA-DR present in moDCs [39].

In line with our results, Kim et al., 2019; Findlay et al., 2019; Tomita et al., 2019 and Sallusto; Lanzavecchia, 1994 characterized peripheral blood moDCs differentiated with GM-CSF and IL-4 that share characteristics with blood cDCs1 such as the presence of CD11c, CD209, and HLA-DR, which play a role in the activation and functional polarization of CD4⁺ T cells and CTLs and in the production of IL-12p70 and IL-10 [10, 40, 41, 42].

Thus, differentiation and effective maturation of DCs is suggested in a possible heterogeneous profile with greater expression of adhesion molecules in cells derived from the protocol stimulated with TNF- α , IL-12 and CCL5. Together with a balance in the production of cytokines by DCs, which demonstrates an increase in the expression of IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-10 and TGF- β .

Maldonado-López et al. (1999) cites the production of IL-12 by subsets of DCs (cDCs and moDCs) which are as such, cDC1, commonly associated with Th1 responses and are often portrayed as the main subset of cDC inducing this

response [43]. However, there is a remarkable body of literature that implicates the profile of moDCs in driving Th1 responses during Salmonella infection [44].

It is unclear whether moDCs can serve as APCs, given their low expression of MHC-II and co-stimulatory molecules. However, it does produce high levels of IL-12p40 in vitro [45] and a cooperation between moDCs and cDCs has been suggested by several studies that designated moDCs as regulators of Th1 differentiation.

Finally, IFN- γ produced from T or NK cells acted as a feedback role in DC to further promote IL-12 production [46, 47].

IL-12 is a heterodimeric, proinflammatory cytokine. Produced by APCs and crucial for the recruitment and effector functions of CD8⁺ and NK T cells [48, 49]. Furthermore, it facilitates antigen presentation by up-regulating MHC-I in tumor cells, favoring polarization to M1 macrophages and attracting effector immune cells by increasing chemokine production [50, 51].

In confirmation with the results found in the expression of IL-12 by P2 DCs, the activity of this interleukin in promoting dendritic cell subtypes (cDCs1, cDCs2 and moDCs) [52] with a high intrinsic capacity to present antigens via cross-presentation to activate CD8⁺ T cells and promote Th1 responses [53, 54]. Still other subtypes, such as human cDCs2 have been seen capable of synthesizing large amounts of IL-12, TNF- α , IL-8 and IL-10 in vitro [52] which are potent in activating Th1, Th2, Th17 and T cells. T CD8⁺ [55].

The production of IL-12p40 by DCs in a study by Everts et al. (2016) down-regulates Th2 responses [56]. The TGF- β cytokine when produced by DCs reflects a critical signal for the differentiation of Th17 in vitro [57].

MCP-1 receptor-dependent MoDCs have also been associated with promoting Th17 responses in a model of oropharyngeal candidiasis. As in studies with Th1 differentiation, we can again see cooperation between moDCs and cDCs to facilitate optimal differentiation of the Th17 subtype [58] which has positive activity in ex vivo inflammation studies, with production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-12) and stimulation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells [59].

Immature DCs express less co-stimulatory molecules and pro-inflammatory cytokines, but positively regulate the expression of inhibitory molecules with production of IL-10 and are essential to prevent responses against

healthy tissues, but with a non-beneficial role in other contexts [60]. The secretion of IL-10 blocks the production of IL-12, thus inhibiting the development of a Th1 response [31].

T cell responses are initiated by DCs by the presentation of costimulatory molecules and expression of naive T cell receptor ligands. Important interaction in the differentiation of CD4⁺ T cells into effector T cell subtypes [61].

The subpopulation of cDCs expressing MHC class I and II, therefore they are the main ones considered in the initiation of T cell activation [62]. In addition, control by DCs of the effector T helper cell type response is induced through the production of cytokines such as IL-12 p70 for Th1, IL-4 for Th2 or IL-17 for a Th17 response [63].

With the achievement of a more favorable heterogeneous profile for the activation of mature DCs in P2, the increased activation of T cell profiles that are conducive to fighting neoplasms can be explained. This could be seen in our results, which showed lower expression of CD8 in non-adherent cells from protocol 2, however with significantly increased expression in granzyme production by these T cells.

DCs, NK cells and CD4⁺ T cells work together so that CD8⁺ T lymphocytes are activated and if activated in CTLs their response is essential for the elimination of cancer cells, through the release of granules (granzymes and perforins) or induction of apoptosis mediated by FasL [64].

CD8⁺ lymphocytes become effectors through the presentation of MHC I by DCs [65] and through co-stimulatory ligands for receptors present on CD8⁺ T cells. With activation, the induction of cytotoxicity occurs through the production of IFN- γ and TNF- α [66]. The increase in this response is caused by CD4⁺ T cells that induce DCs to secrete IL-12 and cytokines that help in CTL proliferation [67].

The classification of human CD4⁺ effector cells consider their immune functions, transcription factors and their main cytokines [68]. The Treg subtype has the markers CD4⁺, CD25⁺ and Foxp3 transcription factor present [69] of regulatory activity for helper and cytotoxic T cells [70, 71] through the release of cytokines such as IL-10 and TGF- β 1 restricting antitumor immunity [72, 73]. According to FU et al. (2018) an increase in the number of Tregs is common in cancer patients [74].

Treg cell development is also induced by immature DCs [75, 76]. The result found suggests the presence of more immature DCs in P1, as the presence of the Treg profile is more expressed in non-adherent cells that came into contact with DCs stimulated with this protocol.

Thus, it is important to note the reduced expression of Treg profile markers in P2 non-adherent cells, as well as the production of IL-10, however with a positive balance of TGF- β that suggests a positive feedback for the other analyzed cytokines. Continuing with the balanced profiles found, P2 becomes more effective when compared to P1 because of its increased differentiation of CD4⁺ T cells in the Th1 profile.

In the presence of IL-12, naive helper T cells differentiate into Th1 cells [77] with increased production of pro-inflammatory cytokines, IFN- γ , TNF- α and IL-12. In one study, activation of anti-PD1 anti-tumor immunity requires IL-12-mediated crosstalk between T cells and dendritic cells that allows CD8⁺ T cell-mediated tumor cell killing [78]. Our results corroborate the positivity of the results found in this profile of higher expression of TNF- α and IL-12 in P2.

In the Th2 profile, on the other hand, no significance was found in the expression of cytokines produced between the protocols, although IL-4 and IL-10 are found to be less expressive in P2.

Study by Nurieva et al. (2007) demonstrated the production of IL-17 signature cytokine from Th17 cells that also produce IL-22 and TNF- α [79]. An intriguing subpopulation acts between pathogenic and suppressor in the antitumor response [80].

Th17 cells play vital roles in inflammation, in addition to their defined pro-tumor roles (causes the dissipation of immunity and contributes to the survival of tumor cells), this subtype of helper T lymphocytes also drives anti-tumor immunity (through the recruitment of DCs, T cells and plasticity towards the Th1 phenotype, related to IFN- γ and TNF- α production [81]. The cytokine IL-17 had significantly higher expression in P2 non-adherent cells.

Activated NK cells produce IFN- γ and TNF- α , which help to differentiate helper T cells in a Th1 profile [82]. In the tumor, Th1 cells promote the effector functions of specific cytotoxic T cells, these secrete IFN- γ , granzyme and perforin along with NK cells and can induce cancer cell apoptosis and control tumor

growth [83]. This effective immune response built by NK cells depends on cytokine production, cell-cell interactions and the balance of their receptors [84].

We can find a profile of pro-inflammatory NK cells present in protocol 2, as the cytokine IFN- γ is significantly more expressed compared to P1, which has a profile of NK cells with significantly increased production of IL-10.

Additional research is needed to elucidate in vivo whether the combination of these P2 stimuli is able to project the same effect of increasing surface markers and the production of important cytokines in an antitumor response by DCs and non-adherent cells, in order to represent the interaction between these cells with greater detail.

Conclusions

The stimulation protocol with TNF- α , CCL5 and IL-12 (P2) was able to generate a profile of mature and effective dendritic cells for activation of balanced subtypes of T lymphocytes and NK cells important in the antitumor immune response. In addition, co-culture with non-adherent cells significantly leveraged the profile of DCs (increase of differentiated cells and heterogeneous profile, with greater migration and increased expression of surface molecules CD209, CD11c, HLA-DR and CD123) and co-stimulatory (CD80, CD86 and CD83) that characterize cytokine and interleukin producing subtypes also with increased expression important in activating responses against neoplasias (IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-10 and TGF- β).

Therefore, the development of better DC maturation protocols is extremely relevant. We then provide a new potential justification for the establishment of a new in vitro experimental protocol for DC maturation (TNF- α , CCL5 and IL-12), as an instrument to understand the modulation capacity of the immune response presented by these potent APCs and a subsequent path to a better antitumor response.

List of abbreviations

DCs: Dendritic cells

APCs: Antigen-Presenting Cells

MHC: Major histocompatibility complex

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

moDCs: Dendritic cells derived from monocytes

CTL: Cytotoxic T lymphocyte

NK: Natural Killer

PBS: Phosphate buffered saline

pDCs: Plasmacytoid dendritic cells

MFI: Mean fluorescence intensity

References

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

[2] Banchereau J, Palucka K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(4):296-306.

[3] Darzynkiewicz Z, Roederer M, Tanke HJ. *Cytometry: new developments*. Academic Press. 2004;75.

[4] de Vleeschouwer S, Arredouani M, Adé M, Cadot P, Vermassen E, Ceuppens JL, et al. Uptake and presentation of malignant glioma tumor cell lysates by monocyte-derived dendritic cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2005;54(4):372-382.

[5] Russo V, Tanzarella S, Dalerba P, Rigatti D, Rovere P, Villa A, et al. Dendritic cells acquire the MAGE-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I-restricted T cell response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(5):2185-2190.

[6] Alvarez D, Vollmann EH, Von Andrian UH. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity*. 2008;29(3):325-342.

[7] Patente TA, Pinho MP, Oliveira AA, Evangelista GC, Bergami-Santos PC, Barbuto JA. Human dendritic cells: Their heterogeneity and clinical application potential in cancer immunotherapy. *Frontiers in immunology*. 2019;9:3176.

- [8] Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2(3):151-161.
- [9] Karsunky H, Merad M, Cozzio A, Weissman IL, Manz MG. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. 2003;198(2):305-313.
- [10] 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. *The Journal of experimental medicine*. 1994;179(4):1109-1118.
- [11] Murta EFC, Michelin MA. Method for Growing Autologous Dendritic Cells, cells obtained by this Method, pharmaceutical Compositions and use thereof. WO2011072355, 2009.
- [12] Oleszycka E, Lavelle EC. Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum. *Current opinion in immunology*. 2014;28:1-5.
- [13] Allen F, Bobanga ID, Rauhe P, Barkauskas D, Teich N, Tong C, et al. CCL3 augments tumor rejection and enhances CD8+ T cell infiltration through NK and CD103+ dendritic cell recruitment via IFN γ . *Oncoimmunology*. 2018;7(3):e1393598.
- [14] Anguille S, Smits EL, Lion E, van Tendeloo VF, Berneman ZN. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *The lancet oncology*. 2014;15(7):e257-e267.
- [15] McCoy KD, Hermans IF, Fraser JH, le Gros G, Ronchese F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) can regulate dendritic cell-induced

activation and cytotoxicity of CD8⁺ T cells independently of CD4⁺ T cell help. *Journal of Experimental Medicine*. 1999;189(7):1157-1162.

[16] Lopes AMM, Michelin MA, Murta EFC. Monocyte-derived dendritic cells from patients with cervical intraepithelial lesions. *Oncology letters*. 2017;13(3):1456-1462.

[17] Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, Maiques O, Sisó P, Marti RM, et al. In vitro cell migration, invasion, and adhesion assays: from cell imaging to data analysis. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2019;7:107.

[18] Corning® BioCoat™ Matrigel® Invasion Chamber Catalog No. 354480, 354481 Guidelines for Use. https://www.corning.com/media/jp/cls/documents/jp-literature/applicationnotej/Matrigel_Invasion_Chamber_6-Experimental_Procedure-2_6-Other-5_Protocol_6-Reference_EN.pdf. Accessed 15 June 2020.

[19] Savary CA, Graziutti ML, Melichar B, Przepiorka D, Freedman RS, Cowart RE, et al. Multidimensional flow-cytometric analysis of dendritic cells in peripheral blood of normal donors and cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 1997;45(5):234-240.

[20] Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of immunology*. 2013;31:563-604.

[21] Nelson EL, Strobl S, Subleski J, Prieto D, Kopp WC, Nelson PJ. Cycling of human dendritic cell effector phenotypes in response to TNF- α : modification of the current 'maturation' paradigm and implications for in vivo immunoregulation. *The FASEB journal*. 1999;13,(14):2021-2030.

[22] Duperrier K, Eljaafari A, Dezutter-Dambuyant C, Bardin C, Jacquet C, Yoneda K, et al. Distinct subsets of dendritic cells resembling dermal DCs can

be generated in vitro from monocytes, in the presence of different serum supplements. *Journal of immunological methods*. 2000;238(1-2):119-131.

[23] Li LQ, Masucci MG, Levitsky V. Effect of interleukin-7 on the in vitro development and maturation of monocyte derived human dendritic cells. *Scandinavian journal of immunology*. 2000;51(4):361-371.

[24] Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *The Journal of Immunology*. 1998;160(9):4587-4595.

[25] Dilioglou S, Cruse JM, Lewis RE. Function of CD80 and CD86 on monocyte-and stem cell-derived dendritic cells. *Experimental and molecular pathology*. 2003;75(3):217-227.

[26] Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(6):2588-2592.

[27] Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, Tedder TF. A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *The Journal of Immunology*. 1992;149(2):735-742.

[28] Pinho MP, Migliori IK, Flatow EA, Barbuto JAM. Dendritic cell membrane CD83 enhances immune responses by boosting intracellular calcium release in T lymphocytes. *Journal of leukocyte biology*. 2014;95(5):755-762.

[29] Lechmann M, Zinser E, Golka A, Steinkasserer A. Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *International archives of allergy and immunology*. 2002;129(2):113-118.

[30] Domingues R. Análise fenotípica de células dendríticas e de linfócitos T efetores, polifuncionais e reguladores no líquen plano. Programa de

Dermatologia da Universidade de São Paulo. 2016.

<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5133/tde-06062016-115609/publico/RosanaDomingues.pdf>. Accessed 28 July 2020.

[31] Pizzurro GA, Barrio MM. Dendritic cell-based vaccine efficacy: aiming for hot spots. *Front Immunol*. 2015; 6:91.

[32] Csomor E, Bajtay Z, Sándor N, Kristóf K, Arlaud GJ, Thiel S, et al. Complement protein C1q induces maturation of human dendritic cells. *Molecular immunology*. 2007;44(13):3389-3397.

[33] de La Rosa G, Longo N, Rodríguez-Fernández JL, Puig-Kroger A, Pineda A, Corbí AL, et al. Migration of human blood dendritic cells across endothelial cell monolayers: adhesion molecules and chemokines involved in subset-specific transmigration. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003;73(5):639-649.

[34] Zhu K, Shen Q, Ulrich M, Zheng M. Human monocyte-derived dendritic cells expressing both chemotactic cytokines IL-8, MCP-1, CCL5 and their receptors, and their selective migration to these chemokines. *Chinese medical journal*. 2000;113(12):1124-1128.

[35] Abe C, Tanaka S, Nishimura M, Ihara F, Xuan X, Nishikawa Y. Role of the chemokine receptor CCR5-dependent host defense system in *Neospora caninum* infections. *Parasites & vectors*. 2015;8(1):1-12.

[36] Immecke SN, Baal N, Wilhelm J, Bechtel J, Knoche A, Bein G, et al. The cyclophilin-binding agent Sanglifehrin A is a dendritic cell chemokine and migration inhibitor. *PLoS One*. 2011;6(3):e18406.

[37] Mocikat R, Braumüller H, Gumy A, Egeter O, Ziegler H, Reusch U, et al. Natural killer cells activated by MHC class II targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity*. 2003;19(4):561-569.

- [38] Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ. et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*. 2000;18(1):767-811.
- [39] Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*. 2018;154(1):3-20.
- [40] Kim SJ, Kim G, Kim N, Chu H, Park BC, Yang JS, et al. Human CD141+ dendritic cells generated from adult peripheral blood monocytes. *Cytotherapy*. 2019;21(10):1049-1063.
- [41] Findlay EG, Currie AJ, Zhang A, Ovciarikova J, Young L, Stevens H, et al. Exposure to the antimicrobial peptide LL-37 produces dendritic cells optimized for immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2019;8(8):1608106.
- [42] Tomita Y, Watanabe E, Shimizu M, Negishi Y, Kondo Y, Takahashi H. Induction of tumor-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes from naïve human T cells by using Mycobacterium-derived mycolic acid and lipoarabinomannan-stimulated dendritic cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2019;68(10):1605-1619.
- [43] Maldonado-lópez R, de Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, et al. CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 1999;189(3):587-592.
- [44] Flores-langarica A, Marshall JL, Bobat S, Mohr E, Hitchcock J, Ross EA, et al. T-zone localized monocyte-derived dendritic cells promote Th1 priming to Salmonella. *European journal of immunology*. 2011;41(9):2654-2665.
- [45] Nakano H, Lin KL, Yanagita M, Charbonneau C, Cook DN, Kakiuchi T, et al. Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nature immunology*. 2009;10(4):394-402.

- [46] Ma X, Chow JM, Gri G, Carra G, Gerosa F, Wolf SF, et al. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(1):147-157.
- [47] Sarhan D, Palma M, Mao Y, Adamson L, Kiessling R, Mellstedt H, et al. Dendritic cell regulation of NK-cell responses involves lymphotoxin- α , IL-12, and TGF- β . *European journal of immunology*. 2015;45(6):1783-1793.
- [48] Zundler S, Neurath MF. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine & growth factor reviews*. 2015;26(5):559-568.
- [49] Tugues S, Burkhard SH, Ohs I, Vrohling M, Nussbaum K, vom Berg J, et al. New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death & Differentiation*. 2015;22(2):237-246.
- [50] Yu X, Wu B, Ma T, Lin Y, Cheng F, Xiong H, et al. Overexpression of IL-12 reverses the phenotype and function of M2 macrophages to M1 macrophages. *Int J Clin Exp Pathol*. 2016;9(9):8963-8972.
- [51] Suzuki S, Umezu Y, Saijo Y, Satoh G, Abe Y, Satoh K, et al. Exogenous recombinant human IL-12 augments MHC class I antigen expression on human cancer cells in vitro. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 1998;185(3):223-226.
- [52] Haniffa M, Shin A, Bigley V, MCGovern N, Teo P, See P, et al. Human tissues contain CD141^{hi} cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103⁺ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity*. 2012;37(1):60-73.
- [53] Bachem A, Güttler S, Hartung E, Ebstein F, Schaefer M, Tannert A, et al. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺ CD141⁺ cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2010;207(6):1273-1281.

[54] Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, Clark GJ, Ju X, Angel CE, et al. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *Journal of Experimental Medicine*. 2010;207(6):1247-1260.

[55] Nizzoli G, Larghi P, Paroni M, Crosti MC, Moro M, Neddermann P, et al. IL-10 promotes homeostatic proliferation of human CD8+ memory T cells and, when produced by CD1c+ DCs, shapes naive CD8+ T-cell priming. *European journal of immunology*. 2016;46(7):1622-1632.

[56] Everts B, Tussiwand R, Dreesen L, Fairfax KC, Huang SCC, Smith AM, et al. Migratory CD103+ dendritic cells suppress helminth-driven type 2 immunity through constitutive expression of IL-12. *Journal of Experimental Medicine*. 2016;213(1):35-51.

[57] Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology*. 2009;27:485-517.

[58] Trautwein-Weidner K, Gladiator A, Kirchner FR, Becattini S, Rüllicke T, Sallusto F, et al. Antigen-specific Th17 cells are primed by distinct and complementary dendritic cell subsets in oropharyngeal candidiasis. *PLoS pathogens*. 2015;11(10):e1005164.

[59] Zaba LC, Fuentes-Duculan J, Eungdamrong NJ, Abello MV, Novitskaya I, Pierson KC, et al. Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *Journal of Investigative Dermatology*. 2009;129(1):79-88.

[60] Hilligan KL, Ronchese F. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses. *Cellular & Molecular Immunology*. 2020;17(6):587-599.

[61] Gardner A, Ruffell B. Dendritic cells and cancer immunity. *Trends in immunology*. 2016;37(12):855-865.

- [62] Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity*. 2014;40(5):642-656.
- [63] Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E, et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(3):1036-1041.
- [64] Farhood B, Najafi M, Mortezaee K. CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(6):8509-8521.
- [65] Spranger S, Gajewski TF. Impact of oncogenic pathways on evasion of antitumour immune responses. *Nature Reviews Cancer*. 2018;18(3):139-147.
- [66] Thomas DA, Massagué J. TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer cell*. 2005;8(5):369-380.
- [67] Borst J, Ahrends T, Bąbała N, Melief CJ, Kastenmüller W. CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2018;18(10):635-647.
- [68] Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry Part A*. 2014;85(1):36-42.
- [69] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-1061.
- [70] Colombo MP, Piconese S. Regulatory T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(11):880-887.

- [71] Josefowicz SZ, Lu L, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annual review of immunology*. 2012;30:531-564.
- [72] Huber S, Gagliani N, Esplugues E, O'connor Jr W, Huber FJ, Chaudhry A, et al. Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ regulatory CD4⁺ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity*. 2011;34(4):554-565.
- [73] Maj T, Wang W, Crespo J, Zhang H, Wang W, Wei S, et al. Oxidative stress controls regulatory T cell apoptosis and suppressor activity and PD-L1-blockade resistance in tumor. *Nature immunology*. 2017;18(12):1332-1341.
- [74] Fu R, Zhang YW, Li HM, Lv WC, Zhao L, Guo QL, et al. LW106, a novel indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 inhibitor, suppresses tumour progression by limiting stroma-immune crosstalk and cancer stem cell enrichment in tumour micro-environment. *British journal of pharmacology*. 2018;175(14):3034-3049.
- [75] Liu J, Cao X. Regulatory dendritic cells in autoimmunity: a comprehensive review. *Journal of autoimmunity*. 2015;63:1-12.
- [76] Shiokawa A, Kotaki R, Takano T, Nakajima-Adachi H, Hachimura S. Mesenteric lymph node CD11b⁻ CD103⁺ PD-L1^{High} dendritic cells highly induce regulatory T cells. *Immunology*. 2017;152(1):52-64.
- [77] Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'garra A, Murphy KM. Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*. 1993;260(5107):547-549.
- [78] Garris CS, Arlauckas SP, Kohler RH, Trefny MP, Garren S, Piot C, et al. Successful anti-PD-1 cancer immunotherapy requires T cell-dendritic cell crosstalk involving the cytokines IFN- γ and IL-12. *Immunity*. 2018;49(6):1148-1161.

[79] Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*. 2007;448(7152):480-483.

[80] Gagliani N, Huber S. Basic aspects of T helper cell differentiation. *T-Cell Differentiation*. 2017:19-30.

[81] Najafi S, Mirshafiey A. The role of T helper 17 and regulatory T cells in tumor microenvironment. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 2019;41(1):16-24.

[82] Chester C, Fritsch K, Kohrt HE. Natural killer cell immunomodulation: targeting activating, inhibitory, and co-stimulatory receptor signaling for cancer immunotherapy. *Frontiers in immunology*. 2015;6:601.

[83] Zwirner NW, Ziblat A. Regulation of NK cell activation and effector functions by the IL-12 family of cytokines: the case of IL-27. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:25.

[84] Paul S, Lal G. The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1124.

7 COMENTÁRIOS E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em busca de atingir o padrão ideal de ativação e maturação de células imunes para aproveitar os requisitos do próprio sistema imunológico humano na eliminação de células tumorais. É necessário um conhecimento mais profundo e específico quanto aos mecanismos utilizados no estímulo dessas células e vias de sinalização envolvidas.

Na imunoterapia utilizando DCs as condições da cultura são críticas para sua maturação e posterior apresentação de antígenos como APCs potencializadoras em consenso com as outras células imunes de perfil antitumoral.

De tal modo, a hipótese deixada aqui traz uma junção de estímulos para um novo protocolo de maturação de DCs a partir de monócitos, desencadeando um possível entendimento de modulação dessa imunoterapia testada *in vitro*. Chamando a atenção para CCL5, IL-12 e TNF- α em combinação eficaz.

8 CONCLUSÃO

O protocolo estimulado com TNF- α , CCL5 e IL-12 (P2) foi mais favorável na maturação efetiva das DCs *in vitro*, proporcionando mais células diferenciadas e de perfil heterogêneo e com maior migração e expressão aumentada de moléculas de superfície (CD209, CD11c, HLA-DR e CD123) e co-estimulatórias (CD80, CD86 e CD83) que caracterizam subtipos produtores de citocinas e interleucinas também com expressão aumentada importantes na ativação de respostas contra neoplasias (IFN- γ , TNF- α , IL-12, IL-10 e TGF- β).

Além disso o presente estudo elucidou que a presença de células não aderentes (co-cultura) alavancou esse perfil de maneira significativa. Com a expressão aumentada de células T CD8⁺ ativadas produtoras de granzimas, presença de subtipos de células T helper, onde Th1 e Th7 predominam com redução de Treg e perfil de NK pró-inflamatórias no protocolo 2.

Assim sendo, é de extrema relevância o desenvolvimento de melhores protocolos de maturação de DCs. Fornecemos então uma nova justificativa potencial para o estabelecimento de um novo protocolo experimental *in vitro* de maturação de DCs (TNF- α , CCL5 e IL-12), como instrumento para entendimento da capacidade de modulação da resposta imune apresentada por essas potentes APCs e um posterior caminho para uma melhor resposta antitumoral.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. **Imunologia Celular e Molecular**/ ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S; [tradução de Claudia Reali e outros]. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2008 Tradução de: Cellular and Molecular Immunology, 6th ed.

ABE, C.; TANAKA, S.; NISHIMURA, M.; IHARA, F.; XUAN, X.; NISHIKAWA, Y. Role of the chemokine receptor CCR5-dependent host defense system in *Neospora caninum* infections. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2015.

ALLEN, F.; BOBANGA, I. D.; RAUHE, P.; BARKAUSKAS, D.; TEICH, N.; TONG, C. *et al.* CCL3 augments tumor rejection and enhances CD8+ T cell infiltration through NK and CD103+ dendritic cell recruitment via IFN γ . **Oncoimmunology**, v. 7, n. 3, 2018.

ALVAREZ, D.; VOLLMANN, E. H.; VON ANDRIAN, U. H. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. **Immunity**, v. 29, n. 3, p. 325-342, 2008.

ANGUILLE, S.; SMITS, E. L.; LION, E.; VAN TENDELOO, V. F.; BERNEMAN, Z. N. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. **The lancet oncology**, v. 15, n. 7, p. e257-e267, 2014.

ARDAVÍN, C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, n. 7, p. 582, 2003.

BACHEM, A.; GÜTTLER, S.; HARTUNG, E.; EBSTEIN, F.; SCHAEFER, M.; TANNERT, A. *et al.* Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+ CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 6, p. 1273-1281, 2010.

BANCHEREAU J; PALUCKA K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 4, p. 296, 2005.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y. J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. **Annual review of immunology**, v. 18, n. 1, p. 767-811, 2000.

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

BARBUTO, J.A.M.; GONZALEZ, R.P. Process for obtaining dendritic cell vaccine and immunomodulator or product employing these dendritic cells. PI0504559-2A, 2007.

BARSOUM, A.L.; ROHRER, S.; SEGERS, C.C.; COGGIN, J.R. JOSEPH, H. Vaccines with oncofetal antigen/iLRP-loaded autologous dendritic cells and uses thereof. U.S. Patent Application No 13/383,103, 2013.

BORST, J.; AHRENDTS, T.; BAŁAŁA, N.; MELIEF, C. J.; KASTENMÜLLER, W. CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 10, p. 635-647, 2018.

BOS, G. M. J.; GERMERAAD, W. T. V.; OTH, T.; GIJSBERS, B. S.; VANDERLOCHT, J. Method for the in vitro maturation of dendritic cells. **European Patent Application number EP13720885**, v. 6, 2012.

CHEN, L. Co-inhibitory molecules of the B7–CD28 family in the control of T-cell immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 5, p. 336-347, 2004.

CHESTER, C.; FRITSCH, K.; KOHRT, H. E. Natural killer cell immunomodulation: targeting activating, inhibitory, and co-stimulatory receptor signaling for cancer immunotherapy. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 601, 2015.

COLLIN, M.; BIGLEY, V. Human dendritic cell subsets: an update. **Immunology**, v. 154, n. 1, p. 3-20, 2018.

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

COLOMBO, M. P.; PICONESE, S. Regulatory T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 11, p. 880-887, 2007.

CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. B.; SFORCIN, J. M. Células dendríticas: mini-revisão. **Biosaúde**, v. 16, n. 1, p. 28-33, 2014.

COSMI, L.; MAGGI, L.; SANTARLASCI, V.; LIOTTA, F.; ANNUNZIATO, F. T helper cells plasticity in inflammation. **Cytometry Part A**, v. 85, n. 1, p. 36-42, 2014.

CSOMOR, E.; BAJTAY, Z.; SÁNDOR, N.; KRISTÓF, K.; ARLAUD, G. J.; THIEL, S. *et al.* Complement protein C1q induces maturation of human dendritic cells. **Molecular immunology**, v. 44, n. 13, p. 3389-3397, 2007.

DA CUNHA, A; MICHELIN, M. A.; MURTA, E. F. C. Pattern response of dendritic cells in the tumor microenvironment and breast cancer. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 3, p. 495, 2014.

DARZYNKIEWICZ, Z.; ROEDERER, M.; TANKE, H. J. Cytometry: new developments. **Academic Press**, 2004.

DE LA ROSA, G.; LONGO, N.; RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, J. L.; PUIG-KROGER, A.; PINEDA, A.; CORBÍ, Á. L. *et al.* Migration of human blood dendritic cells across endothelial cell monolayers: adhesion molecules and chemokines involved in subset-specific transmigration. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 5, p. 639-649, 2003.

DE VLEESCHOUWER, S.; ARREDOUANI, M.; ADÉ, M.; CADOT, P.; VERMASSEN, E.; CEUPPENS, J. L. *et al.* Uptake and presentation of malignant glioma tumor cell lysates by monocyte-derived dendritic cells. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 54, n. 4, p. 372-382, 2005.

DILIOGLOU, S.; CRUSE, J. M.; LEWIS, R. E. Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells. **Experimental and molecular pathology**, v. 75, n. 3, p. 217-227, 2003.

DOMINGUES, R. Análise fenotípica de células dendríticas e de linfócitos T efetores, polifuncionais e reguladores no líquen plano. 2016. 118 f. (Tese Doutorado em Dermatologia) - Programa de Dermatologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5133/tde-06062016-115609/publico/RosanaDomingues.pdf>

DUPERRIER, K.; ELJAAFARI, A.; DEZUTTER-DAMBUYANT, C.; BARDIN, C.; JACQUET, C.; YONEDA, K. *et al.* Distinct subsets of dendritic cells resembling dermal DCs can be generated in vitro from monocytes, in the presence of different serum supplements. **Journal of immunological methods**, v. 238, n. 1-2, p. 119-131, 2000.

EVERTS, B.; TUSSIWAND, R.; DREESEN, L.; FAIRFAX, K. C.; HUANG, S. C. C.; SMITH, A. M. *et al.* Migratory CD103+ dendritic cells suppress helminth-driven type 2 immunity through constitutive expression of IL-12. **Journal of Experimental Medicine**, v. 213, n. 1, p. 35-51, 2016.

FARHOOD, B.; NAJAFI, M.; MORTEZAEI, K. CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 6, p. 8509-8521, 2019.

FARKAS, Á.; KEMÉNY, L. Interferon- α in the generation of monocyte-derived dendritic cells: recent advances and implications for dermatology. **British Journal of Dermatology**, v. 165, n. 2, p. 247-254, 2011.

FIELDS, R. C.; SHIMIZU, K.; MULE, J. J. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 16, p. 9482-9487, 1998.

FINDLAY, E. G.; CURRIE, A. J.; ZHANG, A.; OVCIARIKOVA, J.; YOUNG, L.; STEVENS, H. *et al.* Exposure to the antimicrobial peptide LL-37 produces dendritic cells optimized for immunotherapy. **Oncoimmunology**, v. 8, n. 8, p. 1608106, 2019.

FLORES-LANGARICA, A.; MARSHALL, J. L.; BOBAT, S.; MOHR, E.; HITCHCOCK, J.; ROSS, E. A. *et al.* T-zone localized monocyte-derived dendritic cells promote Th1 priming to Salmonella. **European journal of immunology**, v. 41, n. 9, p. 2654-2665, 2011.

FU, R.; ZHANG, Y. W.; LI, H. M.; LV, W. C.; ZHAO, L.; GUO, Q. L. *et al.* LW106, a novel indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 inhibitor, suppresses tumour progression by limiting stroma-immune crosstalk and cancer stem cell enrichment in tumour micro-environment. **British journal of pharmacology**, v. 175, n. 14, p. 3034-3049, 2018.

GAGLIANI, N.; HUBER, S. Basic aspects of T helper cell differentiation. **T-Cell Differentiation**, p. 19-30, 2017.

GARDNER, A.; RUFFELL, B. Dendritic cells and cancer immunity. **Trends in immunology**, v. 37, n. 12, p. 855-865, 2016.

GARRIS, C. S.; ARLAUCKAS, S. P.; KOHLER, R. H.; TREFNY, M. P.; GARREN, S.; PIOT, C. *et al.* Successful anti-PD-1 cancer immunotherapy requires T cell-dendritic cell crosstalk involving the cytokines IFN- γ and IL-12. **Immunity**, v. 49, n. 6, p. 1148-1161. e7, 2018.

GUILLIAMS, M.; DUTERTRE, C. A.; SCOTT, C. L.; MCGOVERN, N.; SICHIEEN, D.; CHAKAROV, S. *et al.* Unsupervised high-dimensional analysis aligns dendritic cells across tissues and species. **Immunity**, v. 45, n. 3, p. 669-684, 2016.

HANIFFA, M.; SHIN, A.; BIGLEY, V.; MCGOVERN, N.; TEO, P.; SEE, P. *et al.* Human tissues contain CD141^{hi} cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103⁺ nonlymphoid dendritic cells. **Immunity**, v. 37, n. 1, p. 60-73, 2012.

HILLIGAN, K. L.; RONCHESE, F. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4⁺ T helper cell responses. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 17, n. 6, p. 587-599, 2020.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1057-1061, 2003.

HSIEH, C. S.; MACATONIA, S. E.; TRIPP, C. S.; WOLF, S. F.; O'GARRA, A.; MURPHY, K. M. Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. **Science**, v. 260, n. 5107, p. 547-549, 1993.

HUBER, S.; GAGLIANI, N.; ESPLUGUES, E.; O'CONNOR JR, W.; HUBER, F. J.; CHAUDHRY, A. *et al.* Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ regulatory CD4⁺ T cells in an interleukin-10-dependent manner. **Immunity**, v. 34, n. 4, p. 554-565, 2011.

IMMECKE, S. N.; BAAL, N.; WILHELM, J.; BECHTEL, J.; KNOCH, A.; BEIN, G. *et al.* The cyclophilin-binding agent Sanglifehrin A is a dendritic cell chemokine and migration inhibitor. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e18406, 2011.

INABA, K.; INABA, M.; ROMANI, N.; AVA, H.; DEGUCHI, M.; IKEHARA, S. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow

- cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 6, p. 1693-1702, 1992.
- ITANO, A.; JENKINS, M. K. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. **Nature immunology**, v. 4, n. 8, p. 733-739, 2003.
- IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature immunology**, v. 16, n. 4, p. 343, 2015.
- JONGBLOED, S. L.; KASSIANOS, A. J.; MCDONALD, K. J.; CLARK, G. J.; JU, X.; ANGEL, C. E. *et al.* Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. **Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 6, p. 1247-1260, 2010.
- JONULEIT, H.; KUHN, U.; MULLER, G.; STEINBRINK, K.; PARAGNIK, L.; SCHMITT. *et al.* Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. **European journal of immunology**, v. 27, n. 12, p. 3135-3142, 1997.
- JOSEFOWICZ, S. Z.; LU, L.; RUDENSKY, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. **Annual review of immunology**, v. 30, p. 531-564, 2012.
- JUSTUS, C. R.; LEFFLER, N.; RUIZ-ECHEVERRIA, M.; YANG, L. V. In vitro cell migration and invasion assays. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 88, p. e51046, 2014.
- KARSUNKY, H.; MERAD, M.; COZZIO, A.; WEISSMAN, I. L.; MANZ, M. G. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 2, p. 305-313, 2003.
- KIM, B. S.; KIM, I. K.; PARK, Y. J.; KIM, Y. S.; KIM, Y. J.; CHANG, W. S. *et al.* Conversion of Th2 memory cells into Foxp3+ regulatory T cells suppressing Th2-mediated allergic asthma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 19, p. 8742-8747, 2010.
- KIM, S. J.; KIM, G.; KIM, N.; CHU, H.; PARK, B. C.; YANG, J. S. *et al.* Human CD141+ dendritic cells generated from adult peripheral blood monocytes. **Cytotherapy**, v. 21, n. 10, p. 1049-1063, 2019.
- KIRKWOOD, J. M.; BUTTERFIELD, L. H.; TARHINI, A. A.; ZAROOUR, H.; KALINSKI, P.; FERRONE, S. Immunotherapy of cancer in 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 62, n. 5, p. 309-335, 2012.
- KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 Cells. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 485-517, 2009.

- KURTS, C.; KOSAKA, H.; CARBONE, F. R.; MILLER, J. F.; HEALTH, W. R. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8+ T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 2, p. 239-245, 1997.
- LECHMANN, M.; ZINSER, E.; GOLKA, A.; STEINKASSERER, A. Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. **International archives of allergy and immunology**, v. 129, n. 2, p. 113-118, 2002.
- LI, L. Q.; MASUCCI, M. G.; LEVITSKY, V. Effect of interleukin-7 on the in vitro development and maturation of monocyte derived human dendritic cells. **Scandinavian journal of immunology**, v. 51, n. 4, p. 361-371, 2000.
- LIU, J.; CAO, X. Regulatory dendritic cells in autoimmunity: a comprehensive review. **Journal of autoimmunity**, v. 63, p. 1-12, 2015.
- LIU, Y.; CAO, X. Intratumoral dendritic cells in the anti-tumor immune response. **Cellular & molecular immunology**, v. 12, n. 4, p. 387, 2015.
- LOPES, A. M. M.; MICHELIN, M. A.; MURTA, E. F. C. Monocyte-derived dendritic cells from patients with cervical intraepithelial lesions. **Oncology letters**, v. 13, n. 3, p. 1456-1462, 2017.
- LUNDBERG, K.; ALBREKT, A. S.; NELISSEN, I.; SANTEGOETS, S.; DE GRUIJL, T. D.; GIBBS, S. *et al.* Transcriptional profiling of human dendritic cell populations and models-unique profiles of in vitro dendritic cells and implications on functionality and applicability. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e52875, 2013.
- MA, X.; CHOW, J. M.; GRI, G.; CARRA, G.; GEROSA, F.; WOLF, S. F. *et al.* The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 1, p. 147-157, 1996.
- MAJ, T.; WANG, W.; CRESPO, J.; ZHANG, H.; WANG, W.; WEI, S. *et al.* Oxidative stress controls regulatory T cell apoptosis and suppressor activity and PD-L1-blockade resistance in tumor. **Nature immunology**, v. 18, n. 12, p. 1332-1341, 2017.
- MALDONADO-LÓPEZ R.; DE SMEDT T.; MICHEL P.; GODFROID J.; PAJAK B.; HEIRMAN C. *et al.* CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. **J Exp Med**. 1999 Feb 1;189(3):587-92. doi: 10.1084/jem.189.3.587. PMID: 9927520; PMCID: PMC2192907.
- MATIAS, B. F.; DE OLIVEIRA, T. M.; RODRIGUES, C. M.; ABDALLA, D. R.; MONTES, L.; MURTA, E. F. *et al.* Influence of immunotherapy with autologous dendritic cells on innate and adaptive immune response in cancer. **Clinical Medicine Insights: Oncology**, 7, CMO-S12268, 2013.

MCCOY, K. D.; HERMANS, I. F.; FRASER, J. H.; LE GROS, G.; RONCHESE, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) can regulate dendritic cell-induced activation and cytotoxicity of CD8+ T cells independently of CD4+ T cell help. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 7, p. 1157-1162, 1999.

MELIEF, C. J. Cancer immunotherapy by dendritic cells. **Immunity**, v.29, n. 3, p. 372-383, 2008.

MERAD, M.; SATHE, P.; HELFT, J.; MILLER, J.; MORTHA, A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. **Annual review of immunology**, v. 31, p. 563-604, 2013

MILDNER, A.; JUNG, S. Development and function of dendritic cell subsets. **Immunity**, v. 40, n. 5, p. 642-656, 2014.

MOCIKAT, R.; BRAUMÜLLER, H.; GUMY, A.; EGETER, O.; ZIEGLER, H.; REUSCH, U. *et al.* Natural killer cells activated by MHC class II low targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. **Immunity**, v. 19, n. 4, p. 561-569, 2003.

MURPHY, T. L.; GRAJALES-REYES, G. E.; WU, X.; TUSSIWAND, R.; BRISENO, C. G.; IWATA, A. *et al.* Transcriptional control of dendritic cell development. **Annual review of immunology**, v. 34, p. 93-119, 2016.

MURTA, E.F.C.; MICHELIN, M.A. Method for Growing Autologous Dendritic Cells, cells obtained by this Method, pharmaceutical Compositions and use thereof. WO2011072355, 2009.

NAJAFI, S.; MIRSHAFIEY, A. The role of T helper 17 and regulatory T cells in tumor microenvironment. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 41, n. 1, p. 16-24, 2019.

NAKANO, H.; LIN, K. L.; YANAGITA, M.; CHARBONNEAU, C.; COOK, D. N.; KAKIUCHI, T. *et al.* Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. **Nature immunology**, v. 10, n. 4, p. 394-402, 2009.

NELSON, E. L.; STROBL, S.; SUBLESKI, J.; PRIETO, D.; KOPP, W. C.; NELSON, P. J. Cycling of human dendritic cell effector phenotypes in response to TNF- α : modification of the current 'maturation' paradigm and implications for in vivo immunoregulation. **The FASEB journal**, v. 13, n. 14, p. 2021-2030, 1999

NIZZOLI, G.; LARGHI, P.; PARONI, M.; CROSTI, M. C.; MORO, M.; NEDDERMANN, P. *et al.* IL-10 promotes homeostatic proliferation of human CD8+ memory T cells and, when produced by CD1c+ DCs, shapes naive CD8+ T-cell priming. **European journal of immunology**, v. 46, n. 7, p. 1622-1632, 2016.

NURIEVA, R.; YANG, X. O.; MARTINEZ, G.; ZHANG, Y.; PANOPOULOS, A. D.; MA, L. *et al.* Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 480-483, 2007.

O'NEIL, D.; BHARDWAJ, N. Generation of autologous peptide-and protein-pulsed dendritic cells for patient-specific immunotherapy. ***In Adoptive Immunotherapy: Methods and Protocols***, p. 97-112, 2005.

OLESZYCKA, E.; LAVELLE, E. C. Immunomodulatory properties of the vaccine adjuvant alum. **Current opinion in immunology**, v. 28, p. 1-5, 2014..

PALUCKA, A.C.; BANCHEREAU, J.F.; UENO, H. Dendritic cell (DC)- vaccine therapy for pancreatic cancer. WO2013016675, 2013.

PALUCKA, K. A.; TAQUET, N.; SANCHEZ-CHAPUIS, F.; GLUCKMAN, J. C. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 9, p. 4587-4595, 1998.

PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.265-277, 22 mar. 2012.

PALUCKA, K.; UENO, H.; ROBERTS, L.; FAY, J.; BANCHEREAU, J. Dendritic cells: are they clinically relevant?. **Cancer journal (Sudbury, Mass.)**, v. 16, n. 4, p. 318, 2010.

PATENTE, T. A.; PINHO, M. P.; OLIVEIRA, A. A.; EVANGELISTA, G.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; BARBUTO, J. A. Human dendritic cells: their heterogeneity and clinical application potential in cancer immunotherapy. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 3176, 2019.

PATENTE, T. A.; PINHO, M. P., OLIVEIRA, A. A.; EVANGELISTA, G. C.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; BARBUTO, J. A. Human dendritic cells: Their heterogeneity and clinical application potential in cancer immunotherapy. **Frontiers in immunology**, v. 9, 2018.

PAUL, S.; LAL, G. The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1124, 2017.

PIJUAN, J.; BARCELÓ, C.; MORENO, D. F.; MAIQUES, O.; SISÓ, P.; MARTI, R. M. *et al.* In vitro cell migration, invasion, and adhesion assays: from cell imaging to data analysis. **Frontiers in cell and developmental biology**, 7, 107. 2019.

PINHO, M. P.; MIGLIORI, I. K.; FLATOW, E. A.; BARBUTO, J. A. M. Dendritic cell membrane CD83 enhances immune responses by boosting intracellular calcium release in T lymphocytes. **Journal of leukocyte biology**, v. 95, n. 5, p. 755-762, 2014.

PIZZURRO, G. A.; BARRIO, M. M. Dendritic cell-based vaccine efficacy: aiming for hot spots. **Front Immunol.** 2015; 6: 91. 2015.

PULENDRAN, B.; SMITH, J. L.; CASPARY, G.; BRASEL, K.; PETTIT, D.; MARASKOVSKY, E. *et al.* Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 3, p. 1036-1041, 1999.

REIZIS, B.; BUNIN, A.; GHOSH, H. S.; LEWIS, K. L.; SISIRAK, V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. **Annual review of immunology**, v. 29, p. 163-183, 2011.

REYNOLDS, G.; HANIFFA, M. Human and mouse mononuclear phagocyte networks: a tale of two species?. **Frontiers in immunology**, v. 6, n. 330, 2015,

RUSSO, V.; TANZARELLA, S.; DALERBA, P.; RIGATTI, D.; ROVERE, P.; VILLA, A. *et al.* Dendritic cells acquire the MAGE-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I-restricted T cell response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 5, p. 2185-2190, 2000.

SAITO, M.; NAGASAWA, M.; TAKADA, H.; HARA, T.; TSUCHIYA, S.; AGEMATSU, K. *et al.* Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 2, p. 235-249, 2011.

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. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 4, p. 1109-1118, 1994.

SANTOS, P. M.; BUTTERFIELD, L. H. Dendritic cell-based cancer vaccines. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 2, p. 443-449, 2018.

SARHAN, D.; PALMA, M.; MAO, Y.; ADAMSON, L.; KIESSLING, R.; MELLSTEDT, H. *et al.* Dendritic cell regulation of NK-cell responses involves lymphotoxin- α , IL-12, and TGF- β . **European journal of immunology**, v. 45, n. 6, p. 1783-1793, 2015.

SAVARY, C. A.; GRAZZIUTTI, M. L.; MELICHAR, B.; PRZEPIORKA, D.; FREEDMAN, R. S.; COWART, R. E. *et al.* Multidimensional flow-cytometric analysis of dendritic cells in peripheral blood of normal donors and cancer patients. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 45, n. 5, p. 234-240, 1997.

SCHLITZER, A.; MCGOVERN, N.; GINHOUX, F. Dendritic cells and monocyte-derived cells: Two complementary and integrated functional systems. **Seminars in cell & developmental biology**. v. 41, pp. 9-22, 2015.

SHIOKAWA, A.; KOTAKI, R.; TAKANO, T.; NAKAJIMA-ADACHI, H.; HACHIMURA, S. Mesenteric lymph node CD11b⁻ CD103⁺ PD-L1^{High} dendritic cells highly induce regulatory T cells. **Immunology**, v. 152, n. 1, p. 52-64, 2017.

SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 3, p. 151-161, 2002.

SILVA-CARDOSO, S. C.; AFFANDI, A. J.; SPEL, L.; COSSU, M.; VAN ROON, J. A., BOES, M. *et al.* CXCL4 exposure potentiates TLR-driven polarization of human monocyte-derived dendritic cells and increases stimulation of T cells. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 1, p. 253-262, 2017.

SPRANGER, S.; GAJEWSKI, T. F. Impact of oncogenic pathways on evasion of antitumour immune responses. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 3, p. 139-147, 2018.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **Journal of Experimental Medicine**, 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 75, n. 10, p. 5132-5136, 1978.

SUZUKI, S.; UMEZU, Y.; SAIJO, Y.; SATOH, G.; ABE, Y.; SATOH, K. *et al.* Exogenous recombinant human IL-12 augments MHC class I antigen expression on human cancer cells in vitro. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 185, n. 3, p. 223-226, 1998.

SWIECKI, M.; COLONNA, M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 8, p. 471-485, 2015.

THOMAS, D. A.; MASSAGUÉ, J. TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. **Cancer cell**, v. 8, n. 5, p. 369-380, 2005.

TJOA, B.; BOSCH, M. L. Generation of dendritic cells from monocytic dendritic precursor cells with GM-CSF in the absence of additional cytokines. U.S. Patent No 8,389,278, 2013.

TOMITA, Y.; WATANABE, E.; SHIMIZU, M.; NEGISHI, Y.; KONDO, Y.; TAKAHASHI, H. Induction of tumor-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes from naïve human T cells by using Mycobacterium-derived mycolic acid and lipoarabinomannan-stimulated dendritic cells. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 68, n. 10, p. 1605-1619, 2019.

TRAUTWEIN-WEIDNER, K.; GLADIATOR, A.; KIRCHNER, F. R.; BECATTINI, S.; RÜLICHE, T.; SALLUSTO, F. *et al.* Antigen-specific Th17 cells are primed by distinct and complementary dendritic cell subsets in oropharyngeal candidiasis. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 10, p. e1005164, 2015.

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

TUGUES, S.; BURKHARD, S. H.; OHS, I.; VROHLINGS, M.; NUSSBAUM, K.; VOM BERG, J. *et al.* New insights into IL-12-mediated tumor suppression. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, n. 2, p. 237-246, 2015.

VEGLIA, F.; GABRILOVICH, D. I. Dendritic cells in cancer: the role revisited. **Current opinion in immunology**, v. 45, p. 43-51, 2017.

VOPENKOVA, K.; MOLLOVA, K.; BURESOVA, I.; MICHALEK, J. Complex evaluation of human monocyte-derived dendritic cells for cancer immunotherapy. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 16, n. 11, p. 2827-2837, 2012.

YU, X.; WU, B.; MA, T.; LIN, Y.; CHENG, F.; XIONG, H. *et al.* Overexpression of IL-12 reverses the phenotype and function of M2 macrophages to M1 macrophages. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 9, n. 9, p. 8963-8972, 2016.

YU, Y. Z.; CAO, X. T. Dendritic cells and immune activation and immune tolerance. **Second Milit Med Univer**, v. 23, n. 10, p. 2050-2053, 2002.

YUETSU, T. Differentiation/cultivation method for dendritic cells. WO2012160702, 2012.

ZABA, L. C.; FUENTES-DUCULAN, J.; EUNG DAMRONG, N. J.; ABELLO, M. V.; NOVITSKAYA, I.; PIERSON, K. C. *et al.* Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 1, p. 79-88, 2009.

ZHOU, L. J.; TEDDER, T. F. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 6, p. 2588-2592, 1996.

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. **The Journal of Immunology**, v. 149, n. 2, p. 735-742, 1992.

ZHU, K.; SHEN, Q.; ULRICH, M.; ZHENG, M. Human monocyte-derived dendritic cells expressing both chemotactic cytokines IL-8, MCP-1, CCL5 and their receptors, and their selective migration to these chemokines. **Chinese medical journal**, v. 113, n. 12, p. 1124-1128, 2000.

ZUNDLER, S.; NEURATH, M. F. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 26, n. 5, p. 559-568, 2015.

ZWIRNER, N. W.; ZIBLAT, A. Regulation of NK cell activation and effector functions by the IL-12 family of cytokines: the case of IL-27. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 25, 2017.

ANEXO 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Para voluntários saudáveis da pesquisa de avaliação e ativação de células dendríticas)

Convidamos você a participar da pesquisa: **AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO E MIGRAÇÃO APRESENTADA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS SUBMETIDAS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE MATURAÇÃO**. O objetivo desta pesquisa é testar o perfil de ativação e migração apresentado pela cultura de células dendríticas (DCs) submetidas a maturação por diferente protocolo de estímulos (TNF- α , IL-12 e CCL5) em ensaio *in vitro*. Sua participação é importante, pois amostras saudáveis podem auxiliar na realização do desenvolvimento não específico, na diferenciação e maturação de células dendríticas que podem ter um importante impacto para melhorar os tratamentos contra muitas doenças.

Desse modo torna-se necessária a descoberta e utilização de novas formas de estimulação do sistema imunológico para efetividade em imunoterapias, assim como tratamentos que sejam economicamente viáveis para o sistema único de saúde brasileiro.

A imunoterapia com células dendríticas surge como peça-chave bastante eficaz, sendo uma abordagem aprovada para aproveitar os requisitos do próprio sistema imunológico humano contra células tumorais e outras patologias. As DCs como terapia já foram testadas na clínica e estão em crescente avanço, por possuírem resultados comprovadamente imunogênicos e que elucidam sua modulação na resposta imunológica. Todavia, ainda não existe um consenso sobre como fabricar essas potentes vacinas, de modo a estimular corretamente a ótima ativação/fenótipo de DCs.

Assim sendo, é de extrema relevância o desenvolvimento de melhores protocolos de diferenciação e maturação de células dendríticas, que são dependentes da alta expressão de moléculas de superfície para o desempenho de um ótimo papel na migração e na ativação de linfócitos.

Justifica-se o presente trabalho que estabelece um novo protocolo experimental *in vitro* de maturação de DCs não específicas como instrumento

para entendimento da capacidade de modulação da resposta imune apresentada por essas potentes células apresentadoras de antígenos.

Caso você aceite participar desta pesquisa será necessário o participante voluntário saudável doar amostra biológica (20ml de sangue periférico) para realização do estudo, no instituto de pesquisa em Oncologia (IPON), com tempo estimado de 20 minutos na data que o doador puder se dirigir ao Instituto. Espera-se que de sua participação na pesquisa seja possível adquirir amostras saudáveis para a realização do protocolo experimental proposto, tendo como benefício um posterior perfil de ativação que pode ser utilizado na preparação de imunoterapia eficaz, assim indiretamente podendo ter a aplicação dessa imunoterapia como adjuvante.

Critério de inclusão: idade entre 18 e 65 anos. Critérios de exclusão: análise de questionário relacionado à saúde para tendência de voluntários saudáveis.

Você poderá obter quaisquer informações relacionadas a sua participação nesta pesquisa, a qualquer momento que desejar, por meio dos pesquisadores do estudo. Sua participação é voluntária, e em decorrência dela você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você não terá nenhum gasto por participar nesse estudo, pois qualquer gasto que você tenha por causa dessa pesquisa lhe será ressarcido. Você poderá não participar do estudo, ou se retirar a qualquer momento, sem que haja qualquer constrangimento junto aos pesquisadores, ou prejuízo, bastando você dizer ao pesquisador que lhe entregou este documento. Você não será identificado neste estudo, pois a sua identidade será de conhecimento apenas dos pesquisadores da pesquisa, sendo garantido o seu sigilo e privacidade. Você tem direito a requerer indenização diante de eventuais danos que você sofra em decorrência dessa pesquisa.

Contato dos pesquisadores:

Pesquisador(es): Ana Paula Peixoto; Prof^a. Dr^a Márcia Antoniazi Michelin

Nome: Ana Paula Peixoto

E-mail: anappeixoto25@gmail.com

Telefone: (19)91801230

Endereço: Av. Guilherme Ferreira, 1940 - IPON

Em caso de dúvida em relação a esse documento, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelo telefone (34) 3700-6803, ou no endereço Av. Getúlio Guaritá, 159, Casa das Comissões, Bairro Abadia – CEP: 38025-440 – Uberaba-MG – de segunda a sexta-feira, das 08:00 às 12:00 e das 13:00 às 17:00. Os Comitês de Ética em Pesquisa são colegiados criados para defender os interesses dos participantes de pesquisas, quanto a sua integridade e dignidade, e contribuir no desenvolvimento das pesquisas dentro dos padrões éticos.

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e a quais procedimentos serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará o atendimento que estou recebendo. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro para participar do estudo. Concordo em participar do estudo, **AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO E MIGRAÇÃO APRESENTADA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS SUBMETIDAS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE MATURAÇÃO** e receberei uma via assinada deste documento.

Uberaba,.....//.....

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador responsável
assistente

Assinatura do pesquisador

Telefone de contato dos pesquisadores:
Ana Paula Peixoto – (19)91801230

ANEXO 2 - Questionário para tendência de voluntários saudáveis

FICHA DE ANAMNESE			
QUESTIONARIO SOBRE ESTADO DE SAÚDE			
1. IDENTIFICAÇÃO DO DOADOR			
NOME COMPLETO:			Nº
E-MAIL:		CELULAR:()	
SEXO:	DATA DE NASCIMENTO:	IDADE:	
2.HÁBITOS DIÁRIOS/COMPORTAMENTO RELACIONADO A SAÚDE			
TABAGISMO: []SIM []NÃO – FREQUÊNCIA:			
INGESTÃO DE BEBIDA ALCOOLICA: []MUITO []MODERADO[] NÃO CONSUMO			
INGESTÃO DE ÁGUA: []BOA []REGULAR []PÉSSIMA			
APETITE: []MUITO []MODERADO []POUCO			
EXPOSIÇÃO AO SOL: []ÁS VEZES []POUCO []DIARIAMENTE			
QUALIDADE DO SONO: []NORMAL []MODERADO []POUCO			
PRATICA ATIVIDADE FÍSICA: []SIM []NÃO – FREQUÊNCIA:			
3. HISTÓRICO CLÍNICO			
MÊS DO ÚLTIMO EXAME FÍSICO OU MÉDICO:			
FEZ ALGUM TRATAMENTO MÉDICO: []SIM [] NÃO – QUAL?			
ANTECEDENTES ONCOLÓGICOS: []SIM [] NÃO – QUAL?			
TOMA ALGUM MEDICAMENTO: []SIM [] NÃO – QUAIS?			
ANTECEDENTES ALÉRGICOS: []SIM [] NÃO – QUAIS?			
RESTRIÇÃO A PRÁTICA DE ATIVIDADE FÍSICA: []SIM [] NÃO – QUAIS?			
ALTERAÇÕES CARDÍACAS: []SIM [] NÃO – QUAIS?			
HIPO/HIPERTENSÃO ARTERIAL: []SIM [] NÃO			

DISTÚRBO CIRCULATÓRIO:	<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO – QUAL?
DISTURBIO HORMONAL:	<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO – QUAL?
DIABETES:	<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO – TIPO:
POSSUI PROBLEMA ORTOPÉDICO:	<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO – QUAL?
TEM AGUL PROBLEMA ENDOCRINOLÓGICO:	<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO – QUAL?
ÚLCERA/GASTRITE:	<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO – OBS:
PROBLEMAS DE FÍGADO:	<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO – OBS:
PROBLEMAS DE CORAÇÃO:	<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO – OBS:
HEPATITE:	<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO – OBS:
HIV:	<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO – OBS:
FEZ ALGUMA CIRURGIA:	<input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO – QUAL?
4. MARQUE OS PROBLEMAS ABAIXO QUE TENHAM SIDO DIAGNOSTICADO (A) OU TRATADO (A) POR UM MÉDICO:	
<input type="checkbox"/> PROBLEMA RENAL <input type="checkbox"/> ENFISEMA <input type="checkbox"/> ANEMIA <input type="checkbox"/> ARTRITE <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> PROBLEMAS OCULARES <input type="checkbox"/> ASMA <input type="checkbox"/> AVC <input type="checkbox"/> OBESIDADE <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> PROBLEMAS MUSCULARES <input type="checkbox"/> OUTROS:	
5. INDIQUE SINTOMAS SENTIDOS ANTERIORMENTE:	
TOSSE:	<input type="checkbox"/> SEMPRE <input type="checkbox"/> ALGUMAS VEZES <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> NUNCA
DOR ABDOMINAL:	<input type="checkbox"/> SEMPRE <input type="checkbox"/> ALGUMAS VEZES <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> NUNCA
DOR NAS PERNAS:	<input type="checkbox"/> SEMPRE <input type="checkbox"/> ALGUMAS VEZES <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> NUNCA
DOR NOS BRAÇOS:	<input type="checkbox"/> SEMPRE <input type="checkbox"/> ALGUMAS VEZES <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> NUNCA
DOR NAS COSTAS OU PESCOÇO:	<input type="checkbox"/> SEMPRE <input type="checkbox"/> ALGUMAS VEZES <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> NUNCA
DOR NO PEITO:	<input type="checkbox"/> SEMPRE <input type="checkbox"/> ALGUMAS VEZES <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> NUNCA
DORES ARTICULARES:	<input type="checkbox"/> SEMPRE <input type="checkbox"/> ALGUMAS VEZES <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> NUNCA

FALTA DE AR COM ESFORÇO LEVE: []SEMPRE []ALGUMAS VEZES []NUNCA	
SENTIR-SE FRACO: []SEMPRE []ALGUMAS VEZES []NUNCA	
TONTURA: []SEMPRE []ALGUMAS VEZES []NUNCA	
BATIMENTO CARDÍACO ACELERADO: []SEMPRE []ALGUMAS VEZES []NUNCA	
6. EXCLUSIVO PARA PACIENTE DO SEXO FEMININO	
USO DE ANTICONCEPCIONAL: []SIM []NÃO QUAL?	
ESTÁ GRAVIDA OU PRETENDE ENGRAVIDAR []SIM []NÃO	
7. COMENTÁRIOS GERAIS	
Caso você tenha alguma informação para acrescentar, que não tenha sido pergunta nesse questionário de saúde, favor registrar nesse espaço.	
TERMO DE RESPONSABILIDADE	
Eu _____ , declaro ter sido informado(a) claramente e ciente sobre todos os benefícios, riscos e advertências gerais sobre minha participação na pesquisa <u>AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO E MIGRAÇÃO APRESENTADA POR CÉLULAS DENDRÍTICAS SUBMETIDAS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE MATURAÇÃO</u> ,. As declarações acima são verdadeiras, não cabendo ao pesquisador responsável à responsabilidade por informações omitidas.	
DATA DO PREENCHIMENTO	ASSINATURA DO DOADOR VOLUNTARIO

/ _____ /	
DATA DO PREENCHIMENTO	ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL
_____ / /	

ANEXO 3 – Cópia do aceite do Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM (683-2006/CEP)




Mem 09/08/IPON/UFTM
Uberaba, 10 de Junho de 2008

Ao Sr. João Batista Ribeiro
Coordenador do CEP-UFTM

Prezado Coordenador,

Venho por meio deste solicitar que no Parecer Consubstanciado (Parecer 683 de 10/03/2006), que trata de Imunoterapia com Células Dendríticas, sejam incluídos grupos de pacientes com neoplasias em outros órgãos, além do colo uterino. A presente solicitação justifica-se pelo fato de que a terapia citada pode ser aplicada no tratamento de neoplasia em outros órgãos por se tratar da mesma metodologia e dos mesmos reagentes descritos anteriormente, constituindo-se em um avanço para pacientes cujas terapias convencionais não são possíveis de serem realizadas, ou que não apresentaram resultados clínicos.

Atenciosamente,


 Prof. Dr. Eddie Fernando Cândido Murta
 Prof. Titular – Disciplina de Ginecologia e Obstetrícia
 Instituto de Pesquisa em Oncologia – IPON
 Coordenador do Projeto


 João Batista Ribeiro
 Coordenador do CEP em Ética em Pesquisa da UFTM