

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular
Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética

TESE DE DOUTORADO

**EXPRESSÃO DE HLA-G E DE SEUS
RECEPTORES EM CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE EM
PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER
RENAL**

Aluna de doutorado: Giovana Cechim
Orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Porto Alegre
Outubro de 2018

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**EXPRESSÃO DE HLA-G E DE SEUS
RECEPTORES EM CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE EM
PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER
RENAL**

GIOVANA CECHIM

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Orientador

Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto

Co-orientador

Porto Alegre

Outubro de 2018

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho contou com o apoio das seguintes agências e instituições:

Agências Financiadoras

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)

Instituição de Origem

Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética - Departamento de Genética

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Instituição Colaboradora

Serviço de Urologia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

A minha família Ademar, Libana e Cláudia
pelo amor incondicional a mim dedicados.

“O mais bonito da ciência é que ela nunca tem fim”

Francisco M. Salzano

AGRADECIMENTOS

A Deus e a JC por tudo que sou e tenho.

Aos meus pais, Ademar e Libana, por todo amor e incentivo dedicados a mim de forma excepcional.

A minha irmã, Cláudia, por todo apoio e ajuda.

Aos meus avôs Aloísio e José pelo exemplo de vida e conselhos inesquecíveis.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Artur Bogo Chies, por toda ajuda e compreensão.

Ao Dr. Milton Berger pela colaboração que viabilizou a realização desse projeto.

Aos colegas e amigos do laboratório de Imunogenética Francis, Nadine, Jacqueline, Maria Cristina, Pri Vianna pelos momentos inesquecíveis dentro e fora do laboratório.

Ao colega Rafael Michita por toda ajuda nas coletas.

Aos mais que colegas de lab Joel e Valéria pela ajuda inestimável.

A Anne Martinelli pela amizade e por todo apoio técnico no laboratório.

Aos meus amados primos Clairton e Kiko pela grande ajuda na coleta e análise dos dados.

Aos meus queridos Vergínea e João Paulo por todo apoio emocional.

A Luiza pelos fantásticos conselhos.

Ao estimado Elmo pela ajuda nas questões burocráticas.

A CAPES e a FINEP pelo apoio financeiro.

Um MUITO OBRIGADO a todas as pessoas que literalmente doaram seu sangue para minha pesquisa. Sem a colaboração de vocês nada disso teria sido possível.

A todas as pessoas que ajudaram na realização deste trabalho de forma direta ou indireta.

MUITO OBRIGADO a todos!

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO.	20
2.0	JUSTIFICATIVA	42
3.0	OBJETIVOS.	45
3.1	Objetivo Geral.....	46
3.2	Objetivos Específicos.	46
4.0	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1	Casuística	48
4.2	Crterios de Seleção/Exclusão.....	48
4.3	Processamento das amostras de sangue e diferenciação dos monócitos em células dendríticas <i>in vitro</i>	49
4.4	Avaliação do Fenótipo de Membrana de células por Citometria de Fluxo....	50
4.5	Avaliação dos níveis de citocinas por Citometria de Fluxo	52
4.6	Análises Estatísticas.....	53
5.0	RESULTADOS	54
5.1	Avaliação fenotípica de células imunes de sangue periférico provenientes de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle.	55
5.1.1	Análise de monócitos de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle para a expressão dos receptores de HLA-G.....	58
5.1.2	Análise de linfócitos T de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle para a expressão dos receptores de HLA-G.....	61
5.1.3	Análise de células natural killer de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle para a expressão dos receptores de HLA-G.	64
5.1.4	Análise de linfócitos B de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle para a expressão do receptor de HLA-G.....	67
5.1.5	Análise de células dendríticas plasmocitóides de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle para a expressão dos receptores de HLA-G.	70

5.1.6	Análise do fenótipo de membrana de células dendríticas imaturas de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle.....	73
5.1.7	Análise do fenótipo de membrana de células dendríticas imaturas CD14 positivas de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle.....	74
5.1.8	Análise do fenótipo de membrana de células dendríticas imaturas CD14 negativas de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle.	77
5.1.9	Análise do fenótipo de membrana de células dendríticas maduras de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle.	82
5.2	Artigo Original “ <i>In vitro</i> generation of human monocyte-derived dendritic cells –methodological aspects in a comprehensive review”.....	89
5.3	Increased systemic IL-6 levels indicate inflammation as a determinant component in Renal Cell Carcinoma development.....	129
6.0	DISCUSSÃO	145
7.0	CONCLUSÃO	152
8.0	PERSPECTIVAS.	154
9.0	REFERÊNCIAS	156
10.0	ANEXOS.	171
10.1	Parecer Cosubstanciado do CEP.....	172
10.2	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Controle.....	176
10.3	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Paciente.	178

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCR	C-C receptor de quimiocinas
ccRCC	<i>clear cell Renal Cell Carcinoma</i> / Câncer renal de células claras
CD	<i>Cluster of differentiation</i> / Grupo de diferenciação
CR	Câncer Renal
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein / Antígeno 4 do linfócito T citotóxico
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> / Padrões Moleculares Associados a Danos
DCs	Células Dendríticas
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> / Fator de Crescimento de Colônia de Granulócito e Macrófago
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> / Antígeno Leucocitário Humano
iDC	Células Dendríticas imaturas
IFN	Interferon
IL	Interleucina
ILT / LIR	<i>Immunoglobulin-Like Transcript</i> / Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor
KIR	<i>Killer Immunoglobulin-like Receptors</i> / Receptor do tipo imunoglobulina da célula NK
LB	Linfócito B
LC	<i>Langerhans Cells</i> / Células de Langerhans
LT	Linfócito T
LPS	Lipopolissacarídeo
mDC	Células Dendríticas maduras

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> / Complexo Principal de histocompatibilidade
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i> / Metaloproteinase Matriz
NK	<i>Natural Killer</i> / Células Assassinas Naturais
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> / Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBMCs	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> / Células Mononucleares do Sangue Periférico
pDC	Células Dendriticas plasmocitóides
PD	<i>Programmed Death</i> / Morte Programada
PD-L	<i>Programmed Death-Ligand</i> / Ligante de Morte Programada
PGE	Prostaglandina E
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i> / Receptores de Reconhecimento de Padrões
SFB	Soro Fetal Bovino
SI	Sistema Imune
TLR	<i>Toll Like Receptor</i> / Receptor do Tipo Toll
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> / Fator de Necrose Tumoral
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> / Factor de Crescimento Endothelial Vascular
VHL	<i>Von Hippel-Lindau</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Ilustração das fases descritas pela teoria da imunoedição.	33
Figura 2-	Representação do gene HLA-G e das isoformas das proteínas codificadas por ele.....	38
Figura 3-	Representação esquemática da estrutura dos receptores de HLA-G, LILRB1, LILRB2 e KIR2DL4.....	40
Figura 4-	Gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise dos dados de citometria de fluxo.....	57
Figura 5-	Exemplos de gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise das diferentes populações de monócitos quanto a expressão de receptores de HLA-G.....	59
Figura 6-	Exemplos de gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise das diferentes populações de linfócitos T quanto a expressão do receptor de HLA-G.....	62
Figura 7-	Exemplos de gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise da população de células NK quanto a expressão dos receptores de HLA-G.....	65
Figura 8-	Exemplos de gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise dos linfócitos B quanto a expressão do receptor de HLA-G.	68
Figura 9-	Exemplos de gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise da população de células dendríticas plasmocitóides quanto a expressão dos receptores de HLA-G.	71
Figura 10-	Gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise de marcadores em células dendríticas imaturas.	73
Figura 11-	Exemplos de gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise do fenótipo de membrana das células dendríticas imaturas.....	75

Figura 12- Exemplos de gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise do fenótipo de membrana das células dendríticas imaturas.	78
Figura 13- Gráficos ilustrando os <i>gates</i> utilizados para a análise da expressão de marcadores em células dendríticas maduras.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Classificação conforme características do tumor primário.....	28
Tabela 2-	Classificação de acordo com as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza.....	28
Tabela 3-	Classificação segundo a presença ou ausência de metástases à distância.	29
Tabela 4-	Anticorpos utilizados para análise celular por citometria de fluxo.	51
Tabela 5-	Características clínicas dos indivíduos avaliados por citometria de fluxo.	56
Tabela 6-	Avaliação das diferentes populações de monócitos quanto a expressão de receptores de HLA-G.....	60
Tabela 7-	Avaliação das diferentes populações de linfócitos quanto a expressão do receptor de HLA-G.....	63
Tabela 8-	Avaliação das células NK quanto a expressão de receptores de HLA-G.....	66
Tabela 9-	Avaliação da população de linfócito B quanto a expressão do receptor de HLA-G.....	69
Tabela 10-	Avaliação da população de células dendríticas plasmocitóides quanto a expressão de receptores de HLA-G.....	72
Tabela 11-	Avaliação do fenótipo de membrana da população de células CD14 positivas provenientes de culturas de células dendríticas imaturas geradas <i>in vitro</i> a partir de monócitos.....	76
Tabela 12-	Avaliação do fenótipo de membrana da população de células CD14 negativas provenientes de culturas de células dendríticas imaturas geradas <i>in vitro</i> a partir de monócitos.....	79

Tabela 13-	Avaliação do fenótipo de membrana (marcadores CD80 e CD83), da população de células CD14 negativas provenientes de culturas de células dendríticas imaturas geradas <i>in vitro</i> a partir de monócitos.....	80
Tabela 14-	Avaliação do fenótipo de membrana (marcadores CD80, CD86, HLA-DR, HLA-G, ILT2 e ILT4), da população de células CD14 negativas provenientes de culturas de células dendríticas imaturas geradas <i>in vitro</i> a partir de monócitos.....	81
Tabela 15-	Avaliação do fenótipo de membrana (marcadores HLA-DQ, HLA- G, ILT2 e ILT4), da população de células CD14 positivas provenientes de culturas de células dendríticas maduras geradas <i>in vitro</i> a partir de monócitos.....	85
Tabela 16-	Avaliação do fenótipo de membrana (marcadores HLA-DQ, HLA- DR, HLA-G, ILT2 e ILT4), da população de células CD14 negativas provenientes de culturas de células dendríticas maduras geradas <i>in vitro</i> a partir de monócitos.....	86
Tabela 17-	Avaliação do fenótipo de membrana (marcadores CD80 e CD83), da população de células CD14 negativas provenientes de culturas de células dendríticas maduras geradas <i>in vitro</i> a partir de monócitos.....	87
Tabela 18-	Avaliação do fenótipo de membrana (marcadores CD80, CD86, HLA-DR, HLA-G, ILT2 e ILT4), da população de células CD14 negativas provenientes de culturas de células dendrítica maduras geradas <i>in vitro</i> a partirde monócitos.....	88

RESUMO

Os tumores renais correspondem a 3% das neoplasias que acometem os seres humanos e apesar de representarem uma parcela pequena dentro do universo do câncer, sua incidência vem aumentando a cada ano. A inter-relação entre câncer e sistema imune já vem sendo há muito descrita e diversos estudos vem demonstrando que o sistema imune, em muitas situações, pode atuar como um promotor da neoplasia ao sustentar processos inflamatórios crônicos e ao contribuir para a seleção de células tumorais com baixa imunogenicidade.

O processo de apresentação antigênica realizado pelas células dendríticas constitui o passo inicial da geração da resposta imune adaptativa anti-tumoral. Nesse contexto, as moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade, particularmente o HLA-G, vem ganhando a atenção dos cientistas, pois apesar das funções do HLA-G no ambiente tumoral ainda não estarem completamente compreendidas, essa molécula parece favorecer uma tolerização do tumor pelas células do sistema imunes. Considerando que diversos tumores induzem a expressão das moléculas de HLA-G e de seus receptores como uma estratégia de evasão do sistema imunológico, é possível considerar que esse estado de tolerância possa ser revertido por intervenções imunoterapêuticas. A identificação e o conhecimento dos mecanismos envolvidos nos processos de tolerização tumoral, poderão ser utilizados em abordagens corretivas não só para o tratamento de tumores renais, mas também para diversas outras neoplasias.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo contribuir para a compreensão dos processos de evasão tumoral da resposta imune através da investigação das funções da molécula de HLA-G e de seus receptores na patogênese do câncer renal, bem como avaliar a presença de fatores pró-inflamatórios que também podem contribuir para a promoção e o desenvolvimento de neoplasias renais.

Os resultados obtidos indicam níveis significativamente elevados da citocina pro-inflamatória IL-6 em pacientes portadores de câncer renal em comparação aos

indivíduos controle. Tal resultado, pode ser um indicativo do papel promotor dessa citocina na patologia do câncer renal.

Na avaliação das células imunes, foi possível observar, nos pacientes de câncer renal, um aumento significativo no número de linfócitos T, tanto CD4 quanto CD8 positivos, que expressavam o receptor de HLA-G, ILT2. Isso pode ser um indicativo de que tais células estão mais suscetíveis a regulação negativa via HLA-G, sendo essa molécula um mecanismo de evasão tumoral em câncer renal.

ABSTRACT

Renal tumors correspond to 3% of the neoplasms that affect the human beings and although they represent a small portion within the universe of the cancer, their incidence is increasing every year. The interrelationship between cancer and the immune system has long been described and several studies have demonstrated that the immune system, in many situations, can act as a promoter of the neoplasm by sustaining chronic inflammatory processes and contributing to the selection of tumor cells with low immunogenicity.

The antigen presentation process performed by dendritic cells is the initial step in the generation of the anti-tumor adaptive immune response. In this context, the molecules encoded by the major histocompatibility complex, particularly HLA-G, have been gaining the attention of scientists, because although the HLA-G functions in the tumor environment are still not fully understood, this molecule appears to favor tumor tolerance by the immune system. Considering that several tumors induce the expression of HLA-G molecules and their receptors as a strategy of immune system evasion, it is possible to consider that this state of tolerance can be reversed by immunotherapeutic interventions. The identification and knowledge of the mechanisms involved in tumor tolerance processes can be used in corrective approaches not only for the treatment of renal tumors but also for several other neoplasms.

The aim of the present work was to contribute to the understanding of the tumor evasion processes from the immune response by investigating the functions of the HLA-G molecule and its receptors in the pathogenesis of renal cancer, as well as to evaluate the presence of pro-inflammatory factors that may also contribute to the promotion and development of renal neoplasms.

The results obtained indicate significantly elevated levels of IL-6 pro-inflammatory cytokine in patients with renal cancer compared to control subjects. Such a result may be an indicative of the role of this cytokine in the pathology of renal cancer. In the evaluation of immune cells, it was possible to observe, in renal

cancer patients, a significant increase in the number of CD4 and CD8 positive T lymphocytes expressing the HLA-G receptor, ILT2. This may be an indication that such cells are more susceptible to HLA-G negative regulation, which is a mechanism of tumor evasion in renal cancer.

1- INTRODUÇÃO

1.1 – Sistema Imune

O sistema imune (SI) desempenha diversas funções no organismo humano, como o reconhecimento do próprio e do não próprio, a identificação e eliminação de patógenos e o monitoramento e a manutenção da homeostasia (Abbas et al., 2011). Para que tais funções sejam desempenhadas apropriadamente diferentes populações celulares interagem de maneira complexa dando origem a diversos padrões de resposta. De modo geral, pode-se dividi-las em respostas inatas e respostas adaptativas. Enquanto as primeiras são consideradas como inespecíficas, as adaptativas caracterizam-se por sua especificidade e memória. Entretanto, para que a homeostasia do organismo seja mantida, torna-se necessário que os dois tipos de resposta trabalhem conjuntamente, muitas vezes sendo difícil atribuir um determinado fenômeno exclusivamente a um ou outro tipo de resposta. Além do mais, determinados componentes do sistema imune apresentam funções que os colocam claramente na interface entre a resposta inata e a adaptativa. Dentre esses componentes, destacam-se as células dendríticas.

1.1.2- Células Dendríticas (DCs)

As células dendríticas foram identificadas por Steinman e Cohn em 1973, trabalho posteriormente reconhecido com um prêmio Nobel em 2011 devido a sua importância para a ciência (Steinman e Cohn, 1973; Steinman, 2012). As DCs originam-se de precursores hematopoiéticos tanto linfóides quanto mielóides que podem gerar tanto células circulantes como os monócitos, que vão para os tecidos onde podem se diferenciar em DCs imaturas (iDCs), quanto células dendríticas propriamente ditas como as células dendríticas plasmocitóides (Banchereau et al., 2000; Guemmonprez et al., 2002). As DCs se distribuem por todo o organismo, concentrando-se principalmente na interface entre o meio externo e interno, isto é, nas mucosas e na pele característica esta que lhes valeu a identificação como verdadeiras sentinelas do sistema imune (Stockwin et al., 2000; Steinman et al., 2003; Ueno et al., 2007; Randolph et al., 2008; Merad et al., 2013; Worbs et al., 2016).

Apesar de sua grande heterogeneidade fenotípica e funcional, este tipo celular pode ser classificado em dois subtipos principais no ser humano: as DCs mielóides ou convencionais e as DCs plasmocitóides (Naik et al., 2008; Matsui et al., 2009). Também é possível categorizar essas células de acordo com sua localização – pele, pulmões, cérebro, órgãos linfóides - uma vez que sua função está intimamente ligada ao local onde ela se encontra (Wu e Liu, 2007). A partir desta classificação anatômica é possível dividir as DCs em células migratórias que circulam continuamente dos tecidos periféricos para os linfonodos através dos vasos linfáticos aferentes e em DCs residentes que são encontradas nos tecidos e, quando ativadas, migram para os linfonodos drenantes daquele tecido (Randolph et al., 2008; Segura et al., 2012; Merad et al., 2013; Pulendran, 2015).

Nesse sentido, também é comum classificar as DCs em relação a sua habilidade em dirigir a resposta imune através da apresentação diferencial de antígenos ou modulando o sistema imunológico através da secreção de citocinas (Heath e Carbone, 2001; Pulendran, 2015). Nesse caso, dois tipos celulares podem ser identificados: as células dendríticas imaturas e as células dendríticas maduras (mDC). As iDCs se caracterizam por apresentar grande capacidade endocítica/fagocítica, altos níveis de expressão das moléculas de membrana CCR1, CCR5, CCR6 e CD68, altos níveis intracelulares das moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade, baixos níveis de expressão das moléculas de membrana CCR7, CD40, CD54, CD58, CD80, CD86 e CD83, assim como ausência de expressão detectável de DC-LAMP (CD203). Já as mDC, apresentam as características diametralmente opostas as iDCs. Essas características têm impacto direto na função celular e no tipo de interação que as DCs estabelecem com as outras células do sistema imune, interações estas que serão discutidas no decorrer deste trabalho.

Atualmente, vários grupos vêm estudando e classificando as DCs, seus precursores e seus estágios de maturação de acordo com o seu perfil transcricional (Miller et al., 2012; Collin e Bigley, 2018). Estes estudos visam entender como ocorre a regulação do desenvolvimento e da diferenciação dos diferentes subtipos de células dendríticas. Independente da classificação escolhida, a nomenclatura utilizada para descrever as características e os subtipos dessas células envolve os

marcadores de membrana que elas expressam. Embora não haja consenso sobre o perfil completo de marcadores que efetivamente caracterizem uma determinada subpopulação de DCs algumas dessas moléculas de membrana já se tornaram clássicas para categorizar determinados subtipos, como, por exemplo, CD123 para células dendríticas plasmocitóides (pDC) e CD207 para células de Langerhans (LC).

Uma das principais funções das DCs é a apresentação de antígenos para os linfócitos T, através das moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade, dando início a resposta adaptativa. Diversas hipóteses buscam explicar os mecanismos pelas quais a ativação da resposta imune ocorre, sendo que um dos modelos utilizados atualmente propõe que um dano tecidual ou um sinal de perigo, por exemplo, faz com que as iDCs capturem antígenos presentes em seu microambiente. Para que esse processo de reconhecimento de dano tecidual/sinal de perigo ocorra, as DCs apresentam em sua superfície um repertório de receptores de reconhecimento de padrões (PRR – *Pattern Recognition Receptors*) que podem ser associados à dano (DAMPs - *Damage-Associated Molecular Patterns*) ou associados à patógenos (PAMPs - *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Como exemplo, pode-se citar as lecitinas tipo C, os receptores do tipo NOD (NLRs - *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*) e os receptores do tipo toll (TLR). A ativação diferencial desses receptores, nas DCs, promove uma modulação da resposta imune, uma vez que, essa ativação pode atuar como um sinal de maturação para essas células (Geijtenbeek e Kooyk, 2003). Em resposta ao estímulo de maturação, as iDCs migrariam para os órgãos linfoides secundários onde podem apresentar os antígenos capturados aos linfócitos T, iniciando assim uma resposta imune específica (Worbs et al., 2016).

O processo de maturação das DCs caracteriza-se por uma série de modificações como: diminuição da expressão de receptores endocíticos/fagocitários, aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 e CD40, aumento da expressão do marcador de maturação CD83, das moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHCII), do receptor de quimiocina CCR7 bem como secreção

de citocinas pró-inflamatórias (Caux et al., 1994; Zhou e Tedder, 1995; Banchereau e Steinman, 1998; Yanagihara et al., 1998; Banchereau et al., 2000).

Entretanto, no modelo citado, o papel das iDCs na fisiologia do sistema imune ainda não está completamente elucidado. Sabe-se que, em um estado basal, a maioria das DCs presentes em compartimentos periféricos possui um fenótipo imaturo e captura continuamente os antígenos ali presentes (Steinman et al., 2003; Wilson et al., 2004). Porém, devido à baixa expressão de moléculas co-estimuladoras, têm-se proposto que a interação de células T virgens com as iDCs resultaria na indução de tolerância seja de um modo intrínseco à célula T (anergia ou deleção) ou extrínseco (via células T reguladoras ou citocinas), (Steinbrink et al., 1997; Lutz; Schuler, 2002; Steinman et al., 2003; Fehérvári e Sakaguchi, 2004; Sakaguchi, 2004; Probst et al., 2005). Por outro lado, alguns estudos propõem a hipótese de que as mDCs e não as iDCs, estariam envolvidas na indução da tolerância através da estimulação de linfócitos T reguladores (Tregs), (Huang et al., 2000; Akbari et al., 2001; Scheinecker et al., 2002; Verhasselt et al., 2004; Barnejee et al., 2006). Outros trabalhos ainda sugerem que diferenças no estímulo de maturação resultariam em diferentes estágios de maturação da DC, induzindo diferentes padrões de resposta de linfócitos T. De fato, moléculas derivadas de produtos bacterianos, como o LPS (lipopolissacarídeo), ou virais, bem como citocinas pró-inflamatórias [TNF- α (fator de necrose tumoral- α) ou mesmo IFN- γ (interferon- γ)] e sinais celulares, como CD40-ligante, promoveriam a produção de citocinas inflamatórias, como a IL-12p70 e IFN- α , pelas DCs, induzindo, preferencialmente, um padrão de resposta do tipo T *helper* 1 (Th1) (Schulz et al., 2000; Vieira et al., 2000). Em contraste, outras moléculas “anti-inflamatórias”, como a IL-10, a prostaglandina E2 (PGE2) e corticosteróides poderiam induzir um padrão de resposta do tipo T *helper* 2 (Th2) (Kalinski et al., 1997; Faries et al., 2001) ou de Tregs (Cools et al., 2007; Li et al., 2007).

Os diversos tipos de resposta resultantes da interação das DCs (seja no estado imaturo quanto no maduro) com os linfócitos T, as torna alvos importantes para a modulação da resposta imune. Em tecidos neoplásicos, é possível observar que as DCs presentes apresentam diversas alterações fenotípicas quando comparadas às DCs obtidas de tecidos não-neoplásicos (Gabrilovich et al., 1997;

Baleeiro et al., 2008). É relevante ainda notar que, de maneira condizente com a presença da neoplasia em um indivíduo imunocompetente, estas alterações não correspondem àquelas que se esperaria encontrar em tecidos onde a ativação funcional das DCs estivesse dando origem a uma resposta adaptativa específica contra antígenos daquele microambiente, mas sim a alterações associadas ao estabelecimento de estados de tolerância aos mesmos antígenos (Nagaraj et al., 2009). Ainda mais intrigante é a observação de que não só as DCs de pacientes com câncer apresentam alterações, mas também DCs geradas *in vitro* a partir de monócitos do sangue periférico dos mesmos pacientes apresentam fenótipo e função alterados (Della Bella et al., 2003; Hasebe et al., 2005; Neves et al., 2005). Desta forma, percebe-se no portador de câncer, uma adaptação recíproca do sistema imune e do tecido neoplásico, embora esse, muitas vezes, expresse antígenos identificados pelo sistema imune do paciente, que acabam sendo por ele tolerados.

1.2.1- Câncer

Atualmente o câncer é uma das principais causas de morte no mundo tendo ocasionado o óbito de 8,8 milhões de pessoas em 2015 (WHO, 2018, Ferlay et al., 2015). Apesar das inúmeras pesquisas voltadas para o tratamento e cura dessa enfermidade, ainda há diversas neoplasias para as quais a chance de recuperação do paciente é muito pequena (WHO, 2012; American Cancer Society, 2018; American Society of Clinical Oncology, 2018). Devido à multifatorialidade dessa doença é importante considerar tanto os fatores genéticos quanto ambientais no desenvolvimento do câncer (Da costa, 2001; Weinberg, 2008; Joosten et al., 2018). Se por um lado em algumas neoplasias os fatores genéticos parecem ser decisivos (como no caso do Retinoblastoma com deleções do gene *pRB* e no câncer renal com a mutação do gene supressor de tumor *VHL*) é também verdade que fatores ambientais vem contribuindo consideravelmente para aumentar a incidência de diversos tipos de câncer (Jones, 2002; Kaelin, 2004; GLOBOCAN, 2012; Jemal et al., 2011). Assim, as campanhas preventivas concentram seus esforços em informar a população sobre os fatores de risco e em como evitá-los.

Entretanto, embora os avanços tecnológicos tenham proporcionado diagnósticos cada vez mais precoces, algumas neoplasias, como o câncer renal, costumam apresentar sintomas apenas quando já se encontram em estado avançado. Como consequência, a realidade dos pacientes portadores de câncer renal é uma gama limitada de opções terapêuticas.

1.2.2 - Câncer Renal (CR)

Os tumores renais correspondem a mais de 3% das neoplasias que acometem os seres humanos e apesar de representarem uma parcela pequena dentro do universo dos diferentes tipos de câncer, sua incidência vem aumentando a uma taxa de 2 - 4% ao ano (Chow et al., 1999, Ferlay et al., 2015; Hsieh et al., 2017). Os principais fatores apontados como de risco para o seu desenvolvimento são: fumo (aumento de risco em 50% para homens e 20% para mulheres), obesidade (24 – 34% para cada 5 Kg/m² acima do índice de massa corporal normal) e hipertensão (Rini et al., 2009; Chow et al., 2010). O pico de incidência ocorre entre a 5^a - 7^a décadas de vida e atinge o sexo masculino em uma proporção 1,5– 2 vezes maior que o sexo feminino (European Association of Urology, 2012).

O CR pode apresentar sintomas como sangue na urina, dor costovertebral além da presença de massa palpável no flanco, sintomas estes conhecidos como tríade clássica (Devita et al., 2011). Além disso, 20 - 30% dos pacientes desenvolvem sintomas paraneoplásicos como hipertensão, perda de peso, febre e anormalidade da função hepática (Sacco et al., 2009). Visto que muitas vezes as neoplasias renais não manifestam sintomas, 20 – 30% dos pacientes já apresentam metástases quando do diagnóstico (Rini et al., 2009; Ricketts e Linehan, 2018; Turajlic et al., 2018). Nos casos de tumores metastáticos, a sobrevida em cinco anos é de 10 - 25%, ou seja, bastante inferior em comparação a pacientes com tumores malignos localizados, cuja sobrevida em cinco anos é de mais de 90% (Motzer et al., 1999).

Há diversos sistemas de classificação para o CR. Um dos mais completos é a classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (WHO) que utiliza critérios patológicos e genéticos (Fuhrman et al., 1982; Bruder et al., 2004). O

subtipo mais frequente é o chamado carcinoma renal de células claras (ccRCC) que corresponde a 70 – 90% dos casos. O segundo subtipo mais frequente (10 – 15%) é o carcinoma papilar e em seguida tem-se o carcinoma renal cromóforo (4 - 5%) e os subtipos mais raros como o carcinoma dos ductos coletores e tumores não classificáveis que correspondem a 1% dos casos (Oosterwijk et al., 2011; Moch, 2012). Outro sistema de classificação de suma importância é o sistema TNM para o estadiamento de tumores malignos que foi desenvolvido por Pierre Denoix e atualmente é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), (Denoix, 1946; <https://www.uicc.org/resources/tnm>; <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/tnm2.pdf>). Este sistema, ilustrado nas Tabelas 1, 2 e 3, baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tumor primário (T), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N), e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, de zero a quatro para as características do tumor primário, de zero a três para N e de zero ou um para M. Além das graduações numéricas, as categorias T e N podem ser sub classificadas em graduações alfabéticas (a, b, c). Tanto as graduações numéricas como as alfabéticas expressam o nível de evolução do tumor e dos linfonodos comprometidos. O símbolo "X" é utilizado quando uma categoria não pode ser devidamente avaliada. Quando as categorias T, N e M são agrupadas em combinações pré-estabelecidas ficam distribuídas em estágios que, geralmente, variam de I a IV. Estes estágios podem ser sub classificados em A e B, para expressar o nível de evolução da doença. A classificação clínica designada TNM (ou cTNM), tem por base as evidências obtidas antes do tratamento. A classificação patológica (classificação histopatológica pós-cirúrgica), designada pTNM, tem por base as evidências conseguidas antes do tratamento, complementadas ou modificadas pelas evidências adicionais obtidas através da cirurgia e do exame histopatológico. Os dados que serão apresentados em nosso trabalho experimental se referem à classificação pTNM.

Tabela 1 – Classificação conforme características do tumor primário.

T	Fator avaliado: Tumor Primário.
TX	Tumor primário não pode ser avaliado.
T0	Não há evidência de tumor primário.
T1	Tumor com 7 cm ou menos em sua maior dimensão, limitado ao rim.
T1a	Tumor com 4 cm ou menos.
T1b	Tumor com mais de 4 até 7 cm.
T2	Tumor com mais de 7 cm em sua maior dimensão, limitado ao rim.
T3	Tumor que se estende às grandes veias ou que invade diretamente a suprarenal ou os tecidos perirrenais, porém aquém da fáscia de Gerota.
T3a	Tumor que invade diretamente a suprarenal ou os tecidos perirrenais ¹ , porém aquém da fáscia de Gerota.
T3b	Extensão macroscópica do tumor à(s) veia(s) ² renal(is) ou à veia cava, ou à sua parede, abaixo do diafragma.
T3c	Extensão macroscópica do tumor à veia cava, ou à sua parede, acima do diafragma.
T4	Tumor que invade diretamente além da fáscia de Gerota (inclusive extensão contígua à suprarenal ipsilateral).

Notas: 1 - Inclui a gordura da cavidade renal (peripélvica). 2 - Inclui ramificação segmentar (músculo-contido).

Tabela 2 – Classificação de acordo com as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza.

N	Fator avaliado: Linfonodos Regionais.
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0	Ausência de metástase em linfonodo regional.
N1	Metástase em um único linfonodo regional.
N2	Metástase em mais de um linfonodo regional.

Tabela 3 – Classificação segundo a presença ou ausência de metástases à distância.

M	Fator avaliado: Metástase à distância.
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada.
M0	Ausência de metástase à distância.
M1	Metástase à distância.

Embora, a maioria dos casos de CR pareça ocorrer de maneira esporádica, observa-se que aproximadamente 3% dos casos são de origem hereditária (Morris e Latif, 2017; Carlo et al., 2018; Maher, 2018). Diversas síndromes genéticas estão associadas com um risco aumentado para o desenvolvimento de carcinoma renal (Linehan et al., 2010; Bausch et al., 2013). Os portadores de translocações no cromossomo 3 e da síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL), por exemplo, apresentam um aumento no risco estimado de desenvolver ccRCC de aproximadamente 70% (Maher, 2018). Estudos indicam que a perda do braço curto do cromossomo 3 é o primeiro evento no desenvolvimento do ccRCC. A alteração mais comum (em 43% dos casos) é uma translocação desequilibrada entre o cromossomo 3 e cromossomo 5 com cromotripsia (Zbar et al., 1987; Ricketts e Linehan, 2018). Já no caso da síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL) tem-se o envolvimento do gene *VHL*, que é um gene supressor tumoral, e o seu produto, a proteína Von Hippel-Lindau (pVHL), (Gossage et al., 2015). Um dos alvos da ação da pVHL são as subunidades α dos fatores de transcrição induzidos por hipóxia HIFs (HIF-1 α e HIF-2 α , também conhecidos como EPAS1) e embora a correlação entre a desregulação das HIFs e o CR ainda não esteja completamente estabelecida, estudos sugerem que a ativação das HIFs seja um passo necessário para a oncogênese do CR, o que sugere um papel crucial dos genes de resposta a hipóxia (Kondo et al., 2002; Gossage e Eisen, 2010; Schödel et al., 2016).

Com relação ao tratamento das neoplasias renais, usualmente, a primeira etapa é a remoção cirúrgica. Em tumores localizados, a cirurgia pode inclusive

promover a cura e preservar parcialmente o órgão (Rini et al., 2009). Entretanto, para tumores metastáticos, além da cirurgia são necessárias terapias adjuvantes (Carlo et al., 2016; Steeg, 2016; Atkins et al., 2017; Joosten et al., 2018). É importante salientar que o CR se caracteriza pela baixa resposta à quimioterapia após a cirurgia obrigando, assim, os pacientes a buscar novas formas de tratamento (Rini et al., 2009; Devita et al., 2011; European Association of Urology, 2012; Fukumura et al., 2018).

Na literatura é possível encontrar relatos de casos sobre regressão espontânea do tumor e também regressão de metástases após a remoção cirúrgica do tumor primário (Snow e Schellhammer, 1982; Lokich, 1997). Embora raros (menos de 1%), esses casos veem sendo relacionados à resposta imune anti-tumoral tanto pelo aumento do número de linfócitos T específicos contra antígenos tumorais, quanto pela atividade das células NK (*Natural Killer*), (Kawai, 2004; Ricci e Cerchiari, 2010). Tais ocorrências indicam uma importante participação do sistema imune no combate ao CR (Devita et al., 2011).

Devido às evidências da ativa participação do sistema imune no combate à neoplasia renal, desde 1984 a utilização de citocinas, como a interleucina-2 (IL-2), passou a constituir uma alternativa terapêutica para esses pacientes (Rosenberg et al., 1987; Devita et al., 2011; Rosenblatt e Mcdermott, 2011). Estudos demonstraram resposta clínica em 16% dos pacientes além do tempo livre da doença ter alcançado a marca de mais de dez anos para 7 – 9% desses pacientes. Entretanto, os altos índices de toxicidade da IL-2 ainda constituem um forte entrave para a utilização desse agente. Já o IFN- α também aparece como outra citocina terapêuticamente usada com ação anti-tumoral nos casos de câncer renal, embora, como agente único, resultados de grandes estudos tenham gerado dados controversos (Medical Research Council Renal Cancer Collaborators, 1999; Dunn et al., 2006; Stein, 2012).

Atualmente, o padrão ouro de tratamento para o CR é a combinação de drogas imunoterápicas (anticorpos monoclonais humanizados) como agentes anti-angiogênicos e inibidores de *checkpoint* das células imunes (Mahoney et al., 2015; Gharwan e Groninger, 2016; Smyth et al., 2016). Diversos agentes com ação anti-angiogênica são utilizados destacando-se o bevacizumabe (Avastin®) - anti-VEGF

(*Vascular Endothelial Growth Factor*) além do Sorafenibe (Nexavar[®]) e do sunitinibe (Sutent[®]) que atuam como inibidores de tirosinas quinases (Carmeliet e Jain, 2011; Khan e Kerbel, 2018). Já na classe dos agentes inibidores de *checkpoint* das células imunes tem-se os anticorpos contra PD-L1 (*Programmed Cell Death Protein Ligand 1*) que incluem avelumab – nome comercial BAVENCIO[®]- e o atezolizumab - TECENTRIQ[®]. Anticorpos contra a proteína PD-1 (*Programmed Cell Death Protein 1*) como o nivolumab – OPDIVO[®] - e o pembrolizumab –KEYTRUDA[®] como também anticorpos contra a proteína CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4), Ipilimumab – comercializado sob o nome de YERVOY[®] (Mellman et al., 2011). Por mais que a lista de agentes imunoterápicos disponíveis para o tratamento das mais diversas neoplasias venha crescendo rapidamente, muitos pacientes não podem se beneficiar clinicamente desses recursos terapêuticos seja devido aos efeitos colaterais seja em função da refratariedade a essas terapias (Fridman et al., 2017; Chowell et al., 2018). Embora o conhecimento sobre o nosso sistema imune tenha sido enormemente ampliando nos últimos anos, a compreensão sobre os mecanismos de ação dessas drogas, as interações com o microambiente tumoral e o impacto geral promovido pela imunomodulação que elas ocasionam no organismo ainda é pequena, constituindo um grande desafio aos cientistas (Routy et al., 2018).

1.2.3- Câncer e Sistema Imune

A constatação da existência de uma inter-relação entre câncer e sistema imune é antiga e foi primeiramente considerada por Paul Ehrlich em 1909 ao publicar que o sistema imune seria capaz de impedir o crescimento de uma neoplasia (Ehrlich, 1909). Entretanto, somente após algumas descobertas como a da existência de antígenos tumorais específicos que a conceituação dessa relação começou a surgir (Klein, 1966). Burnet em 1957 formulou a hipótese chamada teoria da vigilância imunológica. Para Burnet (Burnet, 1957):

“It is by no means inconceivable that small accumulations of tumour cells may develop and because of their possession of new antigenic potentialities provoke an effective immunological reaction with regression of the tumour and no clinical hint of its existence.”

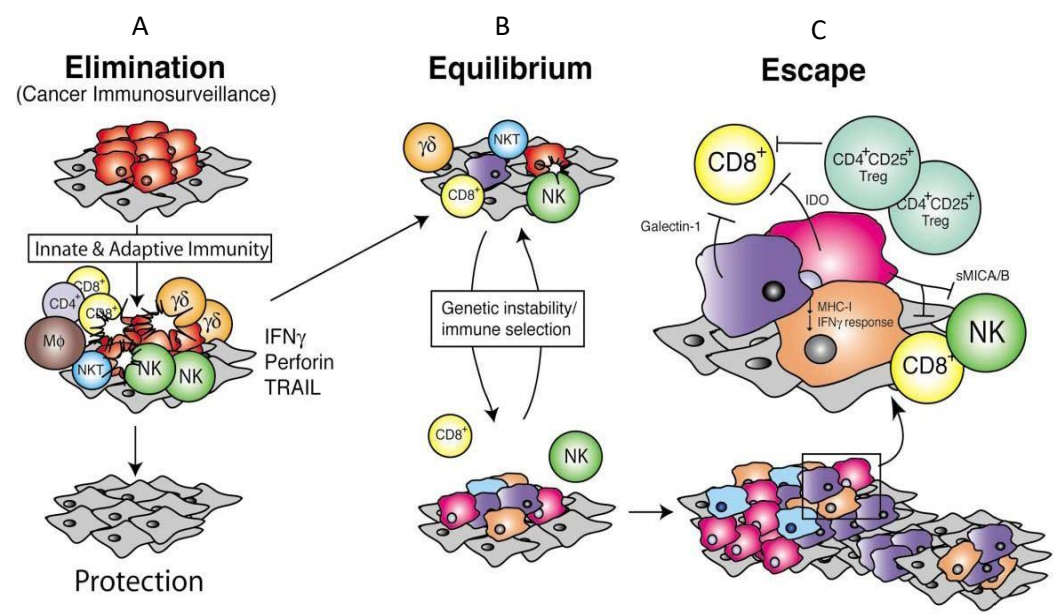
Devido a tais pensamentos, a hipótese foi definida como segue (Burnet, 1970):

“ [...] large, long-lived animals, like most of the warm-blooded vertebrates, inheritable genetic changes must be common in somatic cells and a proportion of these changes will represent a step toward malignancy. It is an evolutionary necessity that there should be some mechanism for elimination or inactivation such potentially dangerous mutant cells and it is postulated that this mechanism is of immunological character [...]”

Entretanto, paradoxalmente, com o avanço das pesquisas na área do câncer, cada vez mais trabalhos vem demonstrando que o sistema imune, em muitas situações, pode atuar como um promotor da neoplasia (Shankaran et al., 2001; Zou, 2006; Reiman et al., 2007; Facciabene et al., 2011) ao colaborar para a seleção de células tumorais de baixa imunogenicidade capazes de promover uma evasão a resposta imune. Devido a tais constatações, atualmente uma das teorias mais aceitas para explicar a inter-relação entre câncer e sistema imune é a teoria da imunoeedição (Schreiber et al., 2004 a,b). Conforme essa teoria, nosso sistema imune vigia constantemente (imunovigilância) o organismo em busca de células que apresentem características diferenciadas das demais e que as tornariam potencialmente perigosas como, por exemplo, a diminuição da expressão de moléculas de classe I codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade. A princípio todas essas células seriam eliminadas – fase de eliminação (figura 1, A), porém algumas dessas células transformadas justamente por possuírem características de baixa imunogenicidade ou de potencial tolerogênico escapariam da eliminação promovida pelo sistema imune e se estabeleceriam – fase de equilíbrio (figura 1, B), se desenvolvendo plenamente e originando tumores

malignos- fase de escape (figura 1, C), (Pardoll, 2003; Zitvogel et al., 2006; Lo Presti et al., 2018).

Figura 1 – Ilustração das fases descritas pela teoria da imunoeedição.



Células normais (representadas por quadrados cinza) ao receberem estímulos oncogênicos (radiação UV, infecção pelo papiloma vírus) podem sofrer transformações, tornando-se células tumorais (representadas em vermelho). Na fase de eliminação, o sistema imune pode erradicar as células transformadas em desenvolvimento e proteger o hospedeiro da formação de tumores) - figura 1,A.. Entretanto, se este processo não for bem sucedido, as células tumorais podem estabelecer um equilíbrio com o sistema imune, onde células variantes tumorais, por possuírem características como baixa expressão das moléculas de classe I codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade, sobrevivem aos mecanismos de eliminação utilizados pelo sistema imune figura 1,B. Essas células tumorais variantes podem multiplicar-se sem que o sistema imune consiga contê-las, tornando-se clinicamente detectável- fase de escape, figura 1,C (Adaptado de Dunn et al., 2002).

A comunicação entre o sistema imune e as células tumorais pode ocorrer basicamente de duas maneiras: a) através do contato célula – célula; b) pela liberação de citocinas, fatores solúveis e vesículas extracelulares (Riteau et al., 2003). É importante ressaltar que geralmente, no microambiente tumoral, a comunicação ocorre de diversas maneiras simultaneamente (De Palma et al.,

2017). A modulação do ambiente por citocinas pode favorecer tanto o crescimento quanto a morte tumoral (Dranoff, 2004; Dunn et al., 2006). Diversos estudos já demonstraram que a inflamação crônica promovida pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, pode atuar como um promotor de alguns tipos de neoplasia, como o câncer uterino e o de estômago (De Visser et al., 2006, Karin e Greten, 2005). Entretanto, para outros tipos de tumores como o melanoma, a resposta inflamatória é desejada, pois esta contribui para a eliminação das células cancerígenas (Grivennikov et al., 2010).

No contexto de contato célula tumoral – célula imune, assim como ocorre em relação às citocinas, também é possível observar efeitos paradoxais. Um exemplo disso é a expressão de MHC I não clássico como o HLA-G (Human leukocyte antigen) pelas células tumorais. Esse processo induz tolerância às células HLA-G positivas quando do reconhecimento dessas moléculas pelas células NK (Cabestré et al., 1999). Um mecanismo de extrema importância para a regulação negativa da resposta anti-tumoral ocorre sobre os linfócitos infiltrantes no tumor. Para a ativação efetiva dos linfócitos T (LT), acredita-se que seja necessária uma sinalização composta por basicamente três sinais. O primeiro sinal consiste no reconhecimento do complexo MHC-peptídeo nas células apresentadoras de antígenos (APC) pelos receptores dos linfócitos T (TCR) específicos para este antígeno (Redmond et al., 2005). O segundo sinal ocorre com a interação de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) expressas pelas APCs com seus respectivos ligantes expressos nos LT (CD28 e CTLA-4) (Young et al., 1992; Guermonprez et al., 2002) e o terceiro sinal envolveria um contato celular direto ou citocinas ativadoras. Na ausência do sinal mediado pelas moléculas co-estimuladoras, os linfócitos podem se tornar anérgicos aos antígenos que estão sendo apresentados, ou podem ser eliminados, ou ainda podem se diferenciar em linfócitos T reguladores – Tregs - (Harding et al., 1992; Redmond et al., 2005; Becker et al., 2006). A interação APC – LT sem a sinalização completa, invariavelmente vai ocasionar uma desarticulação da resposta imune contra o tumor.

1.2.4- Câncer e inflamação

Atualmente o processo inflamatório é considerado um dos principais marcadores da biologia do câncer (Hanahan e Weinberg, 2011). A inflamação, em diversos tipos de neoplasia, e inclusive no CR, está relacionada com a promoção da proliferação e da sobrevivência de células tumorais, da formação de metástases bem como subversão da resposta imune (Mantovani et al., 2008; Grivennikov et al., 2010; Trinchieri, 2012). Diversos tipos tumorais apresentam abundância de células infiltradas e citocinas pró-inflamatórias em seus microambientes que em muitas neoplasias, assim como no CR, representam um fator prognóstico ruim para o paciente (Lin e Karin, 2007; Mantovani et al., 2008 Yoshida et al., 2002; Cuadros et al., 2014). Além disso, diversos estudos vêm demonstrando um aumento da capacidade de invasão das células tumorais quando em presença de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6. Essas citocinas parecem estimular uma remodelação tecidual através da regulação de proteínas de membrana como a E-caderina (importante molécula de adesão celular) bem como um aumento na produção e atividade das enzimas metaloproteinases (MMP), proteínas essas que estão envolvidas com a formação de metástases (Xie et al., 2004; Sullivan et al., 2009; Elinav et al., 2013; Cathcart et al., 2016).

Apesar da ação das citocinas ser restrita ao microambiente aonde foram secretadas, altos níveis sistêmicos podem ser encontrados em pacientes com câncer e apresentam relação com a progressão tumoral (Mantovani et al., 2008). Diversos trabalhos demonstraram que pacientes com CR apresentam níveis sistêmicos aumentados da citocina IL-6, fato associado a um prognóstico ruim uma vez que essa citocina pode promover a ativação de fatores de transcrição como STAT3 e NF- κ B além de aumentar a transcrição de HIF1 α e *VEGF* que colaborariam diretamente para a progressão tumoral (Yu et al., 2009; Santoni et al., 2015; Taniguchi e Karin., 2018).

1.3.1- Complexo Principal de Histocompatibilidade

O complexo principal de histocompatibilidade - *Major Histocompatibility Complex* - MHC, foi descoberto nas décadas de 1930 - 50. Peter Gorer e George Snell observaram que, diferentemente da rejeição observada em experimentos de enxerto de pele entre animais geneticamente diferentes, enxertos entre animais geneticamente idênticos não levavam à rejeição (Abbas et al., 2011). A capacidade de reconhecimento do próprio e do não próprio é uma característica essencial para que o sistema imune execute adequadamente suas funções e, nesse contexto, as moléculas que compõem o MHC participam ativamente apresentando às células imunes moléculas que serão reconhecidas como próprias ou não.

Em seres humanos os genes que codificam o complexo principal de histocompatibilidade estão localizados no braço curto do cromossomo 6 ocupando um grande segmento de DNA. O *locus* do MHC se estende por aproximadamente 3500 quilobases, ou seja, ocupa cerca de 4 centimorgans e contém mais de 200 genes. Esse conjunto de genes é um dos mais polimórficos entre os mamíferos e pode ser dividido em três classes principais: classe I, classe II e classe III (Mackay e Rosen, 2000; Abbas et al., 2011). Em humanos existem sete genes do MHC da classe I denominados *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-E*, *HLA-F*, *HLA-G* (figura 2A) e *HLA-H* que codificam moléculas nominadas da mesma forma. Os genes *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C* e as moléculas codificadas por eles, são classificados de classe I clássicos, enquanto os genes *HLA-E*, *HLA-F*, *HLA-G* e *HLA-H* e as moléculas codificadas por eles são classificados de classe I não clássicos. As moléculas de classe I clássicas são expressas na maioria das células do corpo humano, enquanto que as não clássicas apresentam uma distribuição limitada a determinados tipos celulares.

Há cinco genes do MHC de classe II: *HLA-DP*, *HLA-DQ* e *HLA-DR* - clássicos - e *HLA-DM* e *HLA-DO* - não clássicos. As moléculas codificadas pelos genes clássicos são expressas na superfície da membrana celular das células apresentadoras de antígenos que compreendem as células dendríticas, os macrófagos e os linfócitos B e T ativados. Já as moléculas *HLA-DM* e *HLA-DO*, que

são codificadas pelos genes de mesmo nome, encontram-se em compartimentos internos das APCs atuando no processamento de antígenos.

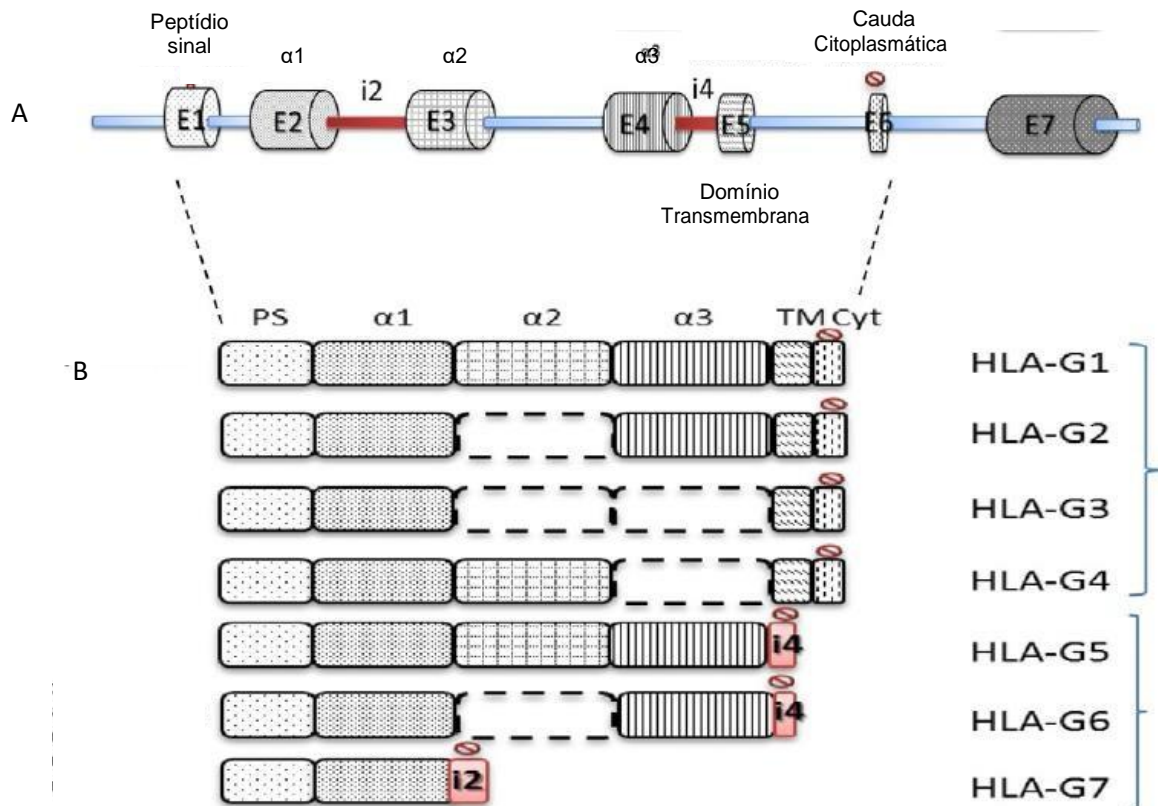
Diferentemente das moléculas de classe I e II codificadas pelo MHC, as moléculas de classe III não são proteínas de membrana e não estão relacionadas diretamente à apresentação antigênica embora participem do sistema imune. As moléculas codificadas pelos genes de classe III incluem diversas proteínas do sistema complemento como C2, C4a, C4b e fator H, além de citocinas inflamatórias, TNF- α e β e proteínas de choque térmico (Abbas et al., 2011).

1.3.2- Antígeno Leucocitário Humano - G (HLA-G)

A molécula de HLA-G apresenta uma expressão restrita à alguns tecidos. Em condições fisiológicas, a sua expressão ocorre em células do trofoblasto fetal, córneas, ilhotas pancreáticas, timo, precursores eritroides e endoteliais e em células-tronco mesenquimais (Carosella et al., 2015).

De acordo com *WHO Nomenclature Committee for factors of the HLA-system* existem 56 alelos *HLA-G* que codificam 18 diferentes proteínas (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>). O transcrito primário de HLA-G gera sete diferentes RNA mensageiros por *splicing* alternativo, sendo que quatro codificam moléculas ligadas à membrana (HLA-G1, -G2, -G3, -G4) e três codificam moléculas solúveis (HLA-G5, -G6, -G7) - figura 2B.

Figura 2 – Representação do gene *HLA-G* e das isoformas das proteínas codificadas por ele.



⊘ Códon de parada (stop codon)

Representação esquemática do gene *HLA-G* (figura 2A). Representação esquemática das isoformas das proteínas formadas por *splicing* alternativo do gene *HLA-G* (figura 2B). (Adaptado de Carosella et al., 2015).

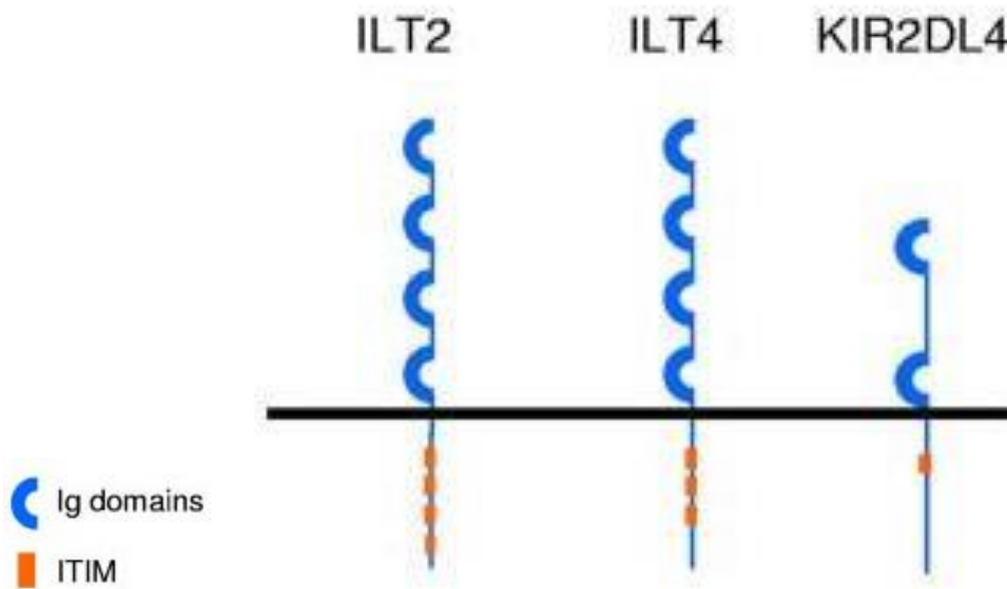
O HLA-G foi primeiramente descrito na interface materno-fetal onde, a sua forma solúvel (sHLA-G), desempenha um papel fundamental para a não rejeição do feto pela mãe (Ellis et al., 1987; Trowsdale e Betz, 2006). Além disso, o HLA-G parece exercer funções regulatórias do sistema imune, não estando envolvido com apresentação antigênica (Larsen, 2009). Diversos estudos sobre transplante de órgãos demonstram que uma expressão aumentada de HLA-G pelo enxerto está associada a uma maior aceitação do transplante e, conseqüentemente, ao aumento

da tolerância do receptor ao órgão transplantado (Poláková et al., 2015). Porém, também é possível observar a expressão dessa molécula em condições patológicas, como em doenças auto-imunes, doenças inflamatórias, infecções virais e, principalmente, em diversos tipos de neoplasias, como melanoma, câncer renal, câncer de pulmão e linfomas de células T (Lemaoult et al., 2005; Hu et al., 2010; Carosella et al., 2015). Há, inclusive, relatos de ascite (líquido na cavidade abdominal) ricos em HLA-G solúvel em neoplasias de ovário (Pistoia et al., 2007). As funções do HLA-G no ambiente tumoral ainda não estão completamente estabelecidas, mas alguns estudos apontam que sua expressão seja na superfície tumoral, seja na forma solúvel, no plasma dos pacientes, é um fator prognóstico ruim (Rouas-Freiss et al; 2014).

Um fenômeno importante para as funções do HLA-G é a trogocitose. Esse processo ocorre por contato direto entre células e promove troca de pedaços de membrana bem como de moléculas associadas entre as células que estão interagindo. Huang e colegas (Huang et al; 1999), descreveram primeiramente esse fenômeno em murinos onde células T adquiriram moléculas de MHC de APCs após a interação célula-célula. Entretanto, diversos trabalhos descreveram essa transferência de fragmentos de membrana contendo HLA-G de células tumorais para NKs, monócitos e células T (Caumartin et al., 2010; HoWangYin et al., 2010; Brown et al., 2012 a). É importante considerar, que as moléculas transferidas nesse processo permanecem funcionais, assim, a transferência de HLA-G para células do sistema imune, constitui um importante mecanismo de regulação (Brown et al., 2012 a,b).

Atualmente são conhecidos 5 receptores de HLA-G em humanos: LILRB1 (LIR1 ou ILT2 ou CD85J), LILRB2 (LIR2 ou ILT4 ou CD85D), KIR2DL4, CD8 e CD160. Entretanto, nesse estudo, somente os receptores LILRB1, LILRB2 e KIR2DL4 foram considerados.

Figura 3- Representação esquemática da estrutura dos receptores de HLA-G, LILRB1, LILRB2 e KIR2DL4.



(Adaptado de Carosella et al., 2011)

Os receptores ILT2 e ILT4 pertencem a família de receptores LILR (*Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptor*). Os receptores LILRB caracterizam-se por serem glicoproteínas transmembrana do tipo I com domínios extracelulares do tipo *Ig-like* que interagem com seus ligantes. Já na porção citoplasmática, possuem Immunoreceptor Tyrosine-based Inibitory Motif (ITIM) sendo 4 ITIMs em ILT2 e 3 em ILT4. Apesar de ILT2/4 interagirem com moléculas de classe I codificadas pelo complexo principal de histompatibilidade, esses receptores apresentam uma maior afinidade pela molécula de HLA-G, sendo que formas dimerizadas de HLA-G induzem uma sinalização mais eficiente do que moléculas monoméricas quando da interação com ILT2 (Shiroishi et al, 2006 a, b). Além disso, também é descrito que esses receptores competem com CD8 pela ligação do MCHI (Shiroishi et al, 2003). Apesar da expressão fisiológica de HLA-G ser restrita a poucos tipos celulares, seus receptores são expressos por diversas células sanguíneas humanas.

O receptor ILT2 é expresso em monócitos, macrófagos, eosinófilos,

basófilos, células dendríticas, em algumas populações de células T e em grande parte das células B, além das células NK. Já o receptor ILT4 também é expresso em monócitos, macrófagos, basófilos, mastócitos, células dendríticas, células endoteliais, células tronco hematopoiéticas, mas não nas células da linhagem linfóide (Samaridis e Colonna, 1997, Trowsdale et al., 2015, Kang et al., 2016).

As células NK apresentam, também, um receptor próprio de HLA-G: KIR2DL4 (Rajagopalan e Long, 1999). Esse receptor está associado tanto à inibição quanto à ativação das funções citotóxicas dessas células (Borges e Cosman, 2000; Shiroishi et al., 2006). Já os receptores ILT2/4 atuam de maneira inibitória nas células que os expressam.

1.4.1- Câncer e Imunoterapia

Diversos estudos vêm demonstrando que a recuperação do estado de homeostasia e o consequente combate à neoplasia pelo sistema imune é possível através de intervenções imunoterápicas (Fecci et al., 2003; Barbuto et al., 2004; Neves et al., 2005). Dentre as diversas modalidades terapêuticas utilizadas na oncologia, a manipulação do sistema imune configura atualmente uma das mais cobiçadas pelas indústrias farmacêuticas (Imai e Takaoka, 2006; Mellman et al., 2011; Pardoll, 2012; Smyth et al., 2016). O aumento do conhecimento sobre os processos do sistema imune tem chamado a atenção para as inúmeras relações que são estabelecidas entre os tumores e os diferentes componentes desse sistema (Fishelson et al., 2003; Gajewski, 2004; Flavell et al., 2010). Entretanto, para que a imunoterapia aumente seu escopo clínico, é de crucial importância um maior entendimento do funcionamento do sistema imune tanto no seu estado natural quanto em situações de doença, mas, principalmente, o conhecimento da biologia das células dendríticas, astro central na montagem da resposta imune anti-tumoral.

2 - JUSTIFICATIVA

Cada vez mais evidências científicas dão suporte a hipóteses de que tanto o processo inflamatório quanto a evasão do sistema imune são acontecimentos necessários para o estabelecimento e o desenvolvimento de tumores (Mantovani et al., 2008; Grivennikov et al., 2010; Hanahan e Weinberg, 2011; Trinchieri, 2012).

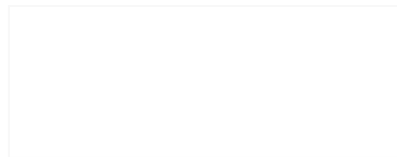
As células do sistema imune apresentam uma gama enorme de receptores que permitem a interação com as mais diversas moléculas e células. Assim, considerando que várias células desse sistema podem expressar tanto os receptores para a molécula HLA-G quanto a própria molécula de HLA-G em suas membranas plasmáticas, é possível hipotetizar que o câncer renal estaria promovendo a tolerização de seus antígenos pelo sistema imune, também, através da modulação da expressão das moléculas HLA-G e de seus receptores.

É válido considerar que o tumor, ao promover um microambiente pró-inflamatório (através da secreção de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo), vai atrair ainda mais células imunes para o seu microambiente. Uma vez que, essas células imunes poderiam ser reguladas de maneira negativa pelo tumor, via HLA-G, por exemplo, poderia se imaginar um microambiente rico em células imunes “desligadas” de suas funções anti-tumorais. Mais ainda, essas células imunes podem não só não combater as células tumorais, como, inclusive, induzir um fenótipo tolerogênico nas suas semelhantes. Assim, ao promover um microambiente inflamatório juntamente com a regulação negativa na função das células imunes, o tumor estaria promovendo sua tolerização perante o sistema que o permitiria crescer e se desenvolver plenamente.

Outro importante ponto a ser considerado é que o primeiro e mais essencial passo na montagem da resposta imune anti-tumoral é o processamento e a apresentação antigênica feita pelas DCs. Desta forma, é razoável considerar que o HLA-G poderia estar atuando sobre essas células, ou, ainda mais, sobre seus precursores sanguíneos, os monócitos, para corromper a resposta imune anti-tumoral e assim se desenvolver plenamente.

Considerando as evidências científicas sobre os fatos supracitados, o presente trabalho teve como objetivo investigar a molécula de HLA-G e de seus receptores na patogênese do câncer renal.

Para tanto, o trabalho apresenta diferentes abordagens: a primeira visa o estudo da expressão das moléculas de HLA-G e de seus receptores em células sanguíneas do sistema imune (monócitos, linfócitos B e T, células dendríticas plasmocitóides, células NK e células dendríticas diferenciadas *in vitro* a partir de monócitos). A segunda abordagem está relacionada a investigação da contribuição do processo inflamatório para o desenvolvimento e progressão do câncer renal, através da avaliação de diversas citocinas séricas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A).



3- OBJETIVOS

3.1- Geral

Avaliar uma possível correlação entre os níveis de expressão de membrana dos receptores de HLA-G - ILT2, ILT4 e KIR2DL4 - em células sanguíneas de pacientes portadores de câncer renal com o estadiamento da doença. Da mesma maneira, analisar se os níveis sistêmicos de citocinas em pacientes portadores de CR se correlacionam com o desfecho clínico de tais pacientes.

3.2- Específicos

3.2.1- Obter e diferenciar monócitos de portadores de CR e de indivíduos controle em células dendríticas imaturas e células dendríticas maduras.

3.2.2- Obter e caracterizar o fenótipo de membrana das células mononucleares de sangue periférico de pacientes portadores de CR bem como de indivíduos controle, para os receptores de HLA-G - ILT2, ILT4 e KIR2DL4.

3.2.3- Caracterizar o fenótipo de membrana das células dendríticas imaturas e maduras geradas *in vitro* a partir de monócitos de pacientes portadores de CR e de indivíduos controle, para os receptores de HLA-G, ILT2, ILT4 e KIR2DL4.

3.2.4- Avaliar os níveis sistêmicos de citocinas em pacientes portadores de CR bem como de indivíduos controle através da técnica de CBA (Cytometric Bead Array).

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuística

Este trabalho conta com a aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, (426.290) e da Universidade Federal do Rio grande do Sul (598.874-0). As amostras de sangue de pacientes portadores de câncer renal foram obtidas no setor de urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e as amostras de sangue de doadores saudáveis foram coletadas no departamento de genética da universidade e na Unidade Básica de Saúde-centro, localizada no município de Bom Princípio, após o consentimento expresso dos doadores através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2 Crítérios de Seleção/Exclusão

Para este estudo foram selecionados indivíduos com idade acima de 18 anos, não transplantados, sem histórico de doenças autoimunes nem neoplasias. Os indivíduos incluídos no grupo “Pacientes” foram atendidos no serviço de urologia do HCPA e tiveram diagnóstico de câncer renal confirmado por análise histopatológica da peça realizada pelo serviço de patologia do próprio hospital. A coleta de sangue dos participantes desse grupo foi realizada durante o procedimento cirúrgico para a retirada da lesão renal pelo médico anestesista responsável.

Os indivíduos incluídos no grupo “Controle” foram recrutados através de chamamento de voluntários por contato via redes sociais eletrônicas. A coleta de material dos participantes desse grupo foi realizada por profissional habilitado no Departamento de Genética da UFRGS e na Unidade Básica de Saúde-centro, localizada no município de Bom Princípio.

Impreterivelmente todos os participantes autorizaram a sua participação nesse estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.3 Processamento das amostras de sangue e diferenciação dos monócitos em células dendríticas *in vitro*

Uma fração do sangue coletado dos participantes foi primeiramente centrifugado a 2000 rpm durante 5 min para separação da porção líquida (plasma) que foi armazenada em freezer a -80° C ou em nitrogênio líquido para posterior análise. Para purificação das células mononucleares o sangue foi diluído em solução de Hank's (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) na proporção de 1:1. Assim, 20 mL de sangue diluído foram colocados em tubo plástico cônico de 50 mL sobre 25 mL de Ficoll-Paque Plus® (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). O material foi centrifugado a uma velocidade de 900 g à temperatura de 18 °C por 30 min. A camada de células mononucleares formada foi retirada e colocada em novo tubo cônico de 50 mL para que os procedimentos de lavagem fossem efetuados. Foram feitas 3 lavagens de 10 min cada a 2000 rpm em solução de Hank's. O sedimento resultante foi coletado, quantificado por contagem em câmara de Neubauer e ressuspendido em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (GIBCO). As células foram plaqueadas em placas de 6 poços (TPP, Suíça) em uma concentração final de 1×10^7 células/2mL/poço. As células foram mantidas em estufa com atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ e saturada com água à temperatura de 37°C para aderência das células por 2 h. Após esse período, as células não aderentes foram removidas e a fração aderente foi mantida em cultura por mais 7 dias em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (10 000 U/mL de penicilina, 10 000 µG/mL de estreptomicina) acrescido da citocina IL-4 (PEPROTEC, Rocky Hill, NJ, USA) na concentração final de 50 nG/mL e do fator de crescimento GM-CSF - (PEPROTEC, Rocky Hill, NJ, USA) na mesma concentração para a diferenciação dos monócitos em DCs. No quinto dia de cultura as células foram ativadas pela adição de 500 nG/mL de LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). No sétimo dia as células foram coletadas da placa de cultura e sua viabilidade avaliada após teste de exclusão realizado com azul de Trypan 0,4%

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). As células viáveis foram contadas e ressuspensas em volume de meio de cultura adequado para os ensaios subsequentes.

4.4 Avaliação do Fenótipo de Membrana de células por Citometria de Fluxo

Para avaliação do fenótipo de membrana dos monócitos submetidos ao processo de diferenciação, as células foram coletadas das placas de cultura, em três momentos distintos: duas horas após o plaqueamento (monócitos), no 5º dia da cultura (células dendríticas imaturas) e no 7º dia de cultura (células dendríticas maduras). Já para a análise do fenótipo de membrana das células mononucleares de sangue periférico, uma alíquota de células foi separada após o procedimento de purificação em gradiente de densidade.

As células coletadas foram contadas em câmara de Neubauer e alíquotas de $1 - 2 \times 10^5$ células foram separadas em tubos plásticos de 1,5mL. Cada alíquota, foi lavada por 3 vezes em 250 µL de tampão PBS-BSA (PBS 1X suplementado com 0,5% de soro albumina bovina). As células foram incubadas com soro humano AB durante 10 minutos para bloqueio de sítios inespecíficos. Após o período de incubação, as células foram novamente lavadas e ao sedimento obtido foram adicionados os anticorpos correspondentes aos marcadores de interesse. As células permaneceram incubadas com os anticorpos durante 60 min. ao abrigo da luz em geladeira. Em seguida, as células foram novamente lavadas em 250 µL de tampão PBS-BSA. Por fim, as células foram ressuspensas em 300 µL de PBS-BSA contendo 2% de formaldeído para a fixação das mesmas. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo (FACS ARIALL) com o auxílio do *software* DIVA e os dados obtidos foram analisados por meio do *software* Flowjo 7.2.5 (Tree Stars Inc.).

Tabela 4 – Anticorpos utilizados para análise celular por citometria de fluxo.

Molécula alvo	Clone	Isotipo	Fluorocromo	Empresa
CD11c	B-ly6	IgG1, κ	FITC	BD-Bioscience
CD14	M5E2	IgG2a, κ	PE-CY5	BD-Bioscience
CD14	M ϕ P-9	IgG2b, κ	PE	BD-Bioscience
CD14	MØP9	IgG2b, κ	PE-CSF	BD-Bioscience
CD16	3G8	IgG1, κ	PE	BD-Bioscience
CD16	3G8	IgG1, κ	PE-CSF	BD-Bioscience
CD19	HIB19	IgG1, κ	PE	BD-Bioscience
CD25	M-A251	IgG1, κ	APC-H7	BD-Bioscience
CD56	NCAM16.2	IgG2b, κ	PE-CY7	BD-Bioscience
CD80	L307.4	IgG1, κ	APC-H7	BD-Bioscience
CD80	L307.4	IgG1, κ	PE	BD-Bioscience
CD83	HB15e	IgG1, κ	APC	BD-Bioscience
CD85j (ILT2)	GHI/75	IgG2b, κ	FITC	Ex-Bio
CD85d (ILT4)	27D6	IgM	FITC	e-Bioscience
CD86	2331(FUN-1)	IgG1, κ	APC	BD-Bioscience
CD123	9F5	IgG1, κ	PE	BD-Bioscience
CD123	7G3	IgG2a, κ	PE-CY5	BD-Bioscience
CD127	HIL-7R-M21	IgG1, κ	PE	BD-Bioscience
CD158d (KIR2DL4)	181703	IgG2a	PE	RD
HLA-DR	G46-6	IgG2a, κ	PE-CY7	BD-Bioscience
HLA-DR	G46-6	IgG2a, κ	PE-CY5	BD-Bioscience
HLA-DQ	Tu169	IgG2a, κ	FITC	BD-Bioscience
HLA-G	87G	IgG2a	FITC	EXBIO

Tabela de anticorpos monoclonais, indicando a especificidade do anticorpo (molécula), o clone, o isotipo e o fluorocromo utilizados nos experimentos de citometria de fluxo.

4.5 Avaliação dos níveis de citocinas por Citometria de Fluxo

Os níveis de citocinas contidas no sangue periférico dos participantes da pesquisa foram medidos através do kit *Human Th1/Th2/Th17* (CBA - Cytometric Bead Array), (BD Biosciences, San Jose, CA, USA, Catálogo número: 560484). Através desse kit é possível detectar simultaneamente as citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-17A. Para a realização desse ensaio, foi utilizado o plasma dos participantes da pesquisa. As análises das amostras foram feitas conforme instruções do fornecedor do kit. O *software* FCAP Array (BD Biosciences) foi utilizado para avaliar os dados obtidos no citômetro de fluxo (FACS ARIAIII) com o auxílio do *software* DIVA (BD Biosciences).

4.6 Análises Estatísticas

Os dados de fenotipagem das células foram primeiramente, testados para normalidade (distribuição Gaussiana) através dos testes de D'Agostino e Pearson ou Shapiro-Wilk. Para as comparações entre os grupos "Pacientes" e "Controle", foram realizadas análises através do teste t (teste paramétrico para análise dados com distribuição normal) ou teste U de Mann-Whitney (teste não paramétrico para análise de dados sem distribuição normal). Já as comparações envolvendo proporções, foram feitas através do teste de qui-quadrado de Pearson com correção de Yates. Considerando as múltiplas comparações, os valores de p foram corrigidos através do método Benjamini-Hochberg FDR (*False discovery rate*). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

Os dados sobre os níveis de citocinas foram primeiramente analisados para o tipo de distribuição utilizando o teste t não pareado que demonstrou que esses dados apresentam uma distribuição não normal. Devido a isso, utilizaram-se testes

não paramétricos. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para comparações envolvendo três grupos e o teste de Mann-Whitney U para comparações entre dois grupos. Os dados de idade foram analisados com o teste t não pareado, demonstrando uma distribuição normal. Já a proporção de sexo entre os grupos, foi analisada através do teste de qui-quadrado de Pearson com correção de Yates. O valor de $p < 0,05$ foi definido como sendo estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram feitas empregando-se os *softwares* GraphPad Prisma 7.0 (GraphPad Software Inc, USA) e WINPEPI (Abramson, 2011).

5 – RESULTADOS

5.1- Avaliação fenotípica de células imunes de sangue periférico provenientes de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle.

Para este estudo foram coletadas amostras de sangue periférico de 31 pacientes submetidos a cirurgia para retirada de lesão renal, sendo que a coleta de sangue foi realizada no momento da cirurgia. Visto que o diagnóstico de câncer renal só é confirmado após a análise histológica da peça, 5 pacientes foram diagnosticados com tumores benignos e, portanto, excluídos das análises. Um paciente que apresentava um possível câncer de próstata também foi excluído, somando um total de 26 amostras de pacientes com diagnóstico confirmado de câncer renal, porém sem tratamento prévio. A tabela 5 resume as características dos participantes do estudo, bem como a classificação dos tumores dos pacientes do estudo.

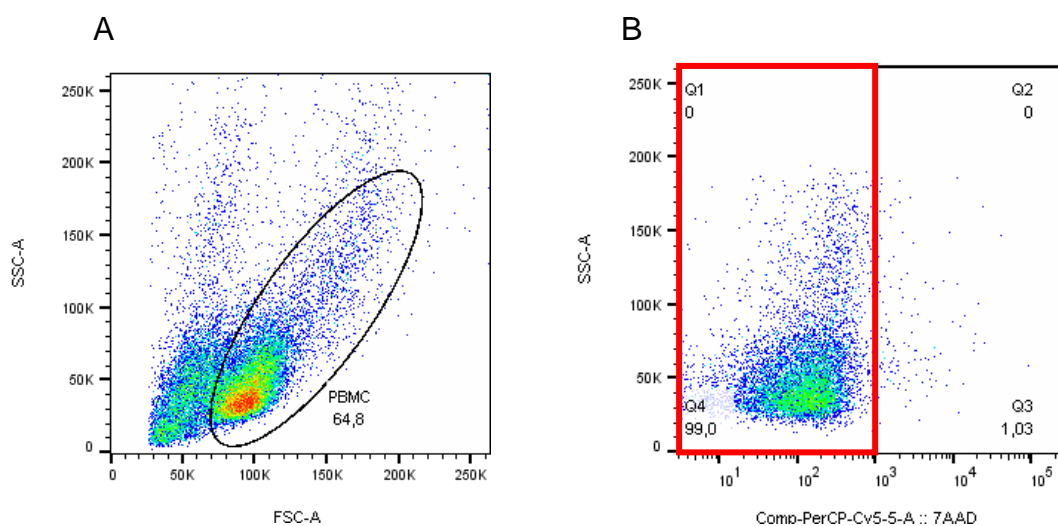
Tabela 5 - Características clínicas dos indivíduos avaliados por citometria de fluxo.

Características		Pacientes (n=26)	Controles (n=29)	Valor dep
Idade (anos); mediana (IQR)		58,50 (51,25-63,00) ^b	51,00 (45,50-57,50) ^b	0,0773 ^c
Sexo, n (%)	Masculino	14 (53,84) ^a	14 (48,28) ^a	0,499 ^d
	Feminino	12 (46,15) ^a	15 (51,72) ^a	
TNM, n (% ^e)	T1a	10 (41,70) ^a	-	
	T1b	5 (20,80) ^a	-	
	T3a	9 (37,50) ^a	-	
Furhman, n (% ^f)	1	1 (4,54) ^a	-	
	2	13 (59,10) ^a	-	
	3	6 (27,27) ^a	-	
	4	2 (9,09) ^a	-	

a, Desvio padrão; b, [primeiro quartil (Q1/4) - terceiro quartil (Q3/4)]; c, Teste t; d, Teste U de Mann-Whitney; e, baseado em n=24, f, baseado em n=22.

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) provenientes tanto de pacientes de câncer renal quanto de indivíduos controle, foram marcadas com anticorpos monoclonais contra as moléculas CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD56, CD123, CD85d (ILT4), CD85j (ILT2) e CD158d (KIR2DL4). Essas células também foram coradas com o corante para DNA, 7-AAD, para que as células não viáveis fossem excluídas das análises. Visto que o objetivo foi analisar diversas populações de células contidas na fração PBMC, foi feito um *gate* abrangente nos eventos totais coletados e excluiu-se as células que se apresentavam positivas para o corante 7-AAD. A partir das células viáveis (7-AAD negativas) os *gates* de análise subsequentes foram feitos (figura 1).

Figura 4 - Gráficos ilustrando os *gates* utilizados para a análise dos dados de citometria de fluxo.



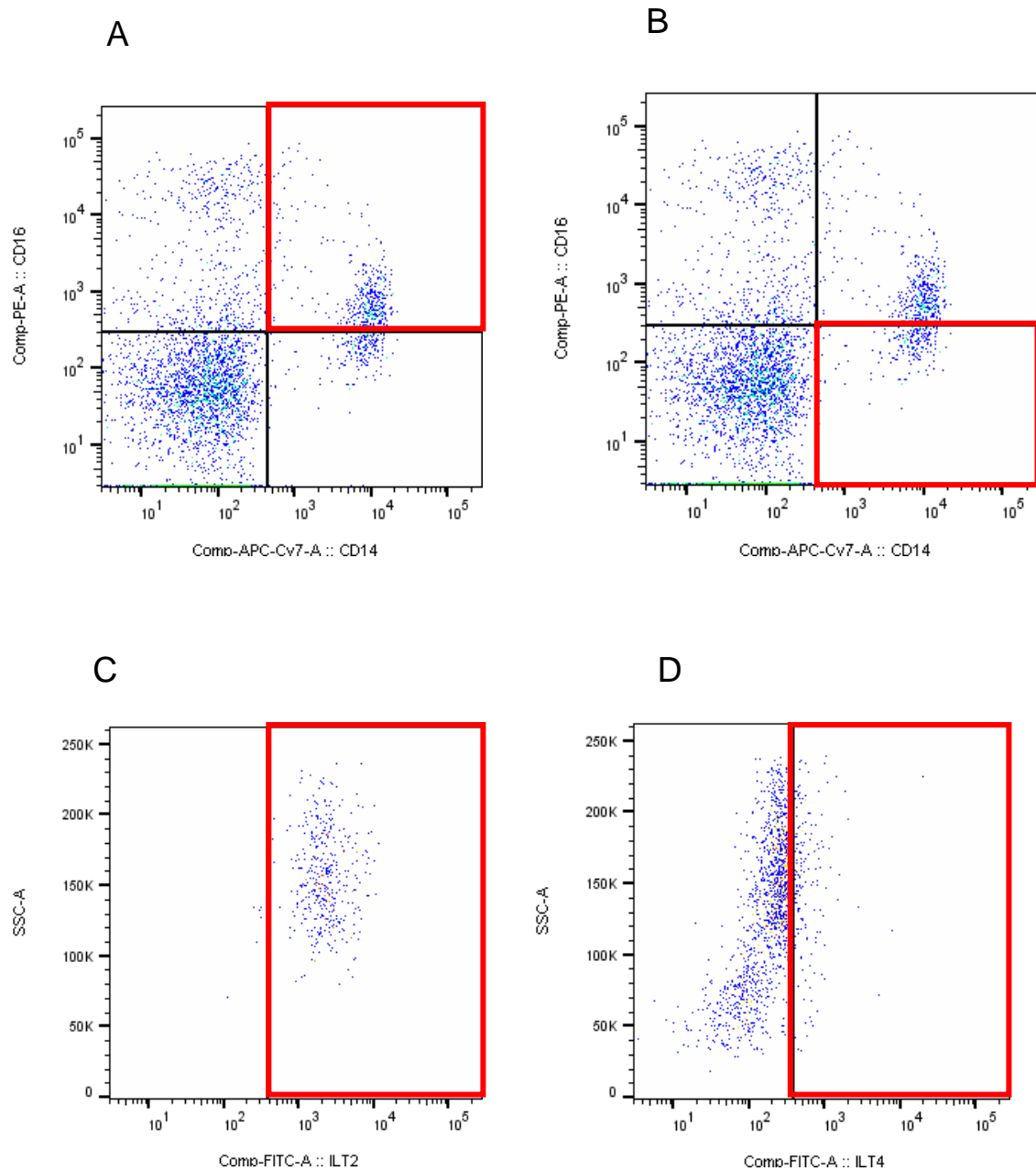
O gráfico A representa o *gate* correspondente as células com tamanho e granulosidade correspondentes PBMCs. O gráfico B mostra a seleção de células negativas para o corante 7-AAD dentro do *gate* de PBMCs.

5.1.1 Análise de monócitos de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle para a expressão dos receptores de HLA-G.

A fração monocítica contida nas PBMCs, foi classificada em duas subpopulações: monócitos clássicos (CD14⁺ CD16⁻) e monócitos não-clássicos ou monócitos CD16⁺ (CD14⁺ CD16⁺), (Randolph et al., 2002; Strauss-Ayali et al., 2007; Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Essa diferenciação das subpopulações foi feita devido as evidências demonstradas por estudos de que a subpopulação que expressa CD16 (receptor III de Fc) parece apresentar uma predisposição a se diferenciar em DCs migratórias (Randolph et al., 2002). Sendo assim, considerou-se importante realizar um estudo diferencial sobre essas subpopulações.

Conforme descrito na literatura, os monócitos podem expressar dois tipos de receptores de HLA-G: ILT2 e ILT4 (Samaridis e Colonna, 1997, Trowsdale et al., 2015; Kang et al., 2016). Assim, avaliou-se, as células monocíticas que expressavam esses receptores. Para esse fim, a estratégia de análise está ilustrada na figura 2. Após seleção da população de PBMCs e exclusão das células não viáveis (figura 1), foram selecionados os marcadores para CD14 e CD16. Nas populações CD14⁺ CD16⁺ (figura 2A) e CD14⁺ CD16⁻ (figura 2B) foram avaliadas as células que apresentavam expressão dos receptores ILT2 e ILT4 em suas membranas plasmáticas (figura 2). Os resultados obtidos estão descritos na tabela 6.

Figura 5 - Exemplos de gráficos ilustrando os *gates* utilizados para a análise das diferentes populações de monócitos quanto a expressão de receptores de HLA-G.



O gráfico A mostra a seleção de células positivas para os marcadores CD14 e CD16 (*gate* vermelho). O gráfico B mostra a seleção de células positivas para o marcador CD14 e negativas para o marcador CD16. O gráfico C mostra a população selecionada em B (*gate* vermelho) demonstrando a positividade dessas células para o marcador ILT2. O gráfico D mostra a população selecionada em A (*gate* vermelho) demonstrando a positividade dessas células para o marcador ILT4.

Tabela 6 – Avaliação das diferentes populações de monócitos quanto a expressão de receptores de HLA-

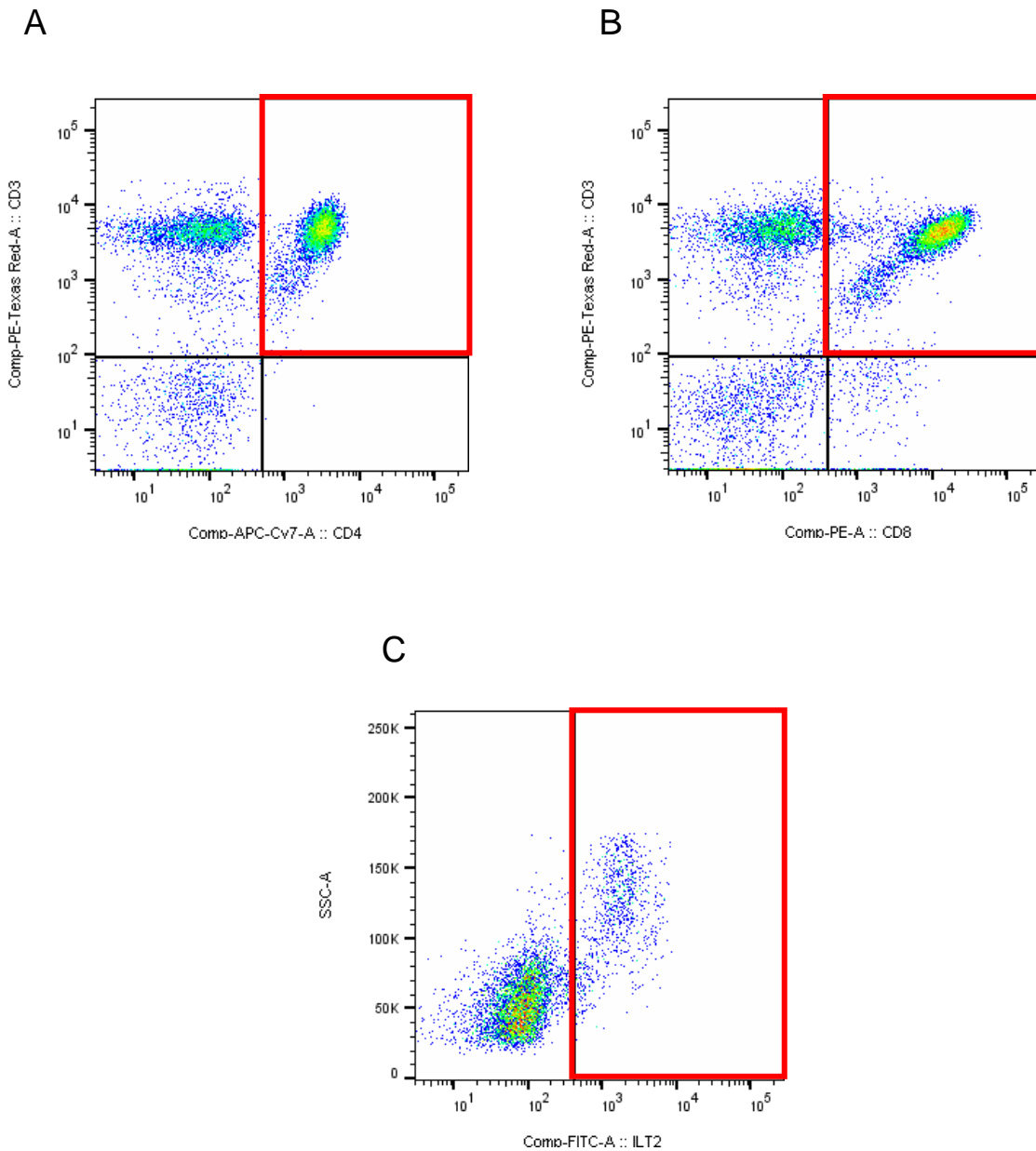
Marcadores de Membrana	Pacientes			Controles			Valor <i>p</i>	Valor <i>p</i> corrigido
	N	Média	Mediana	N	Média	Mediana		
CD14 ⁺ CD16 ⁻	14	--	5,07 (1,96-11,32) ^b	14	-	8,18 (4,58-13,55) ^b	0,3232 ^d	0,6170
CD14 ⁺ CD16 ⁻ ILT2 ⁺	14	-	11,08 (4,98-30,10) ^b	14	-	4,94 (0,09-48,10) ^b	0,5809 ^d	0,9384
CD14 ⁺ CD16 ⁻ ILT4 ⁺	11	-	0,41 (0,0-2,85) ^b	7	-	0,0 (0,0-0,18) ^b	0,1179 ^d	0,4700
CD14 ⁺ 16 ⁺	14	4,65 (4,45) ^a	-	14	4,55 (6,28) ^a	-	0,963 ^c	0,9630
CD14 ⁺ CD16 ⁺ ILT2 ⁺	12	-	11,42 (1,48-56,45) ^b	7	-	17,5 (0,41-34,10) ^b	0,8326 ^d	0,9630
CD14 ⁺ CD16 ⁺ ILT4 ⁺	10	-	1,42 (0,25-8,18) ^b	5	-	2,34 (0,1-3,27) ^b	0,8537 ^d	0,9630

a, Desvio padrão; b, [primeiro quartil (Q1/4) - terceiro quartil (Q3/4)]; c, Teste t; d, Teste U de Mann-Whitney.

5.1.2 Análise de linfócitos T de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle para a expressão dos receptores de HLA-G.

Conforme descrito na literatura, os linfócitos T podem expressar apenas um tipo de receptor de HLA-G: o ILT2 (Samaridis e Colonna, 1997; Trowsdale et al., 2015; Kang et al., 2016). Foram avaliadas as populações de linfócito T CD4 positivos ou CD8 positivos, para a expressão do receptor ILT2. A estratégia de análise utilizada está ilustrada na figura 3. Após a seleção da população de PBMCs e exclusão das células não viáveis (figura 1), foram selecionados os marcadores para CD3, CD4 e CD8. Nas populações CD3⁺ CD4⁺ (figura 3B) e CD3⁺ CD8⁺ (figura 3A) foram avaliadas as células que apresentavam expressão do receptor ILT2 em suas membranas plasmáticas. Os resultados obtidos estão resumidos na tabela 7.

Figura 6 - Exemplos de gráficos ilustrando os *gates* utilizados para a análise das diferentes populações de linfócitos T quanto a expressão do receptor de HLA-G.



O gráfico A mostra a seleção de células positivas para os marcadores CD3 e CD4 (*gate* vermelho) que representa a população de linfócitos T CD4. O gráfico B mostra a seleção de células positivas para os marcadores CD3 e CD8 (*gate* vermelho) representando a população de linfócitos T CD8. O gráfico C mostra a população selecionada em B (*gate* vermelho) demonstrando a positividade de linfócitos T CD4 para o marcador ILT2.

Tabela 7 – Avaliação das diferentes populações de linfócitos T quanto a expressão do receptor de HLA-G.

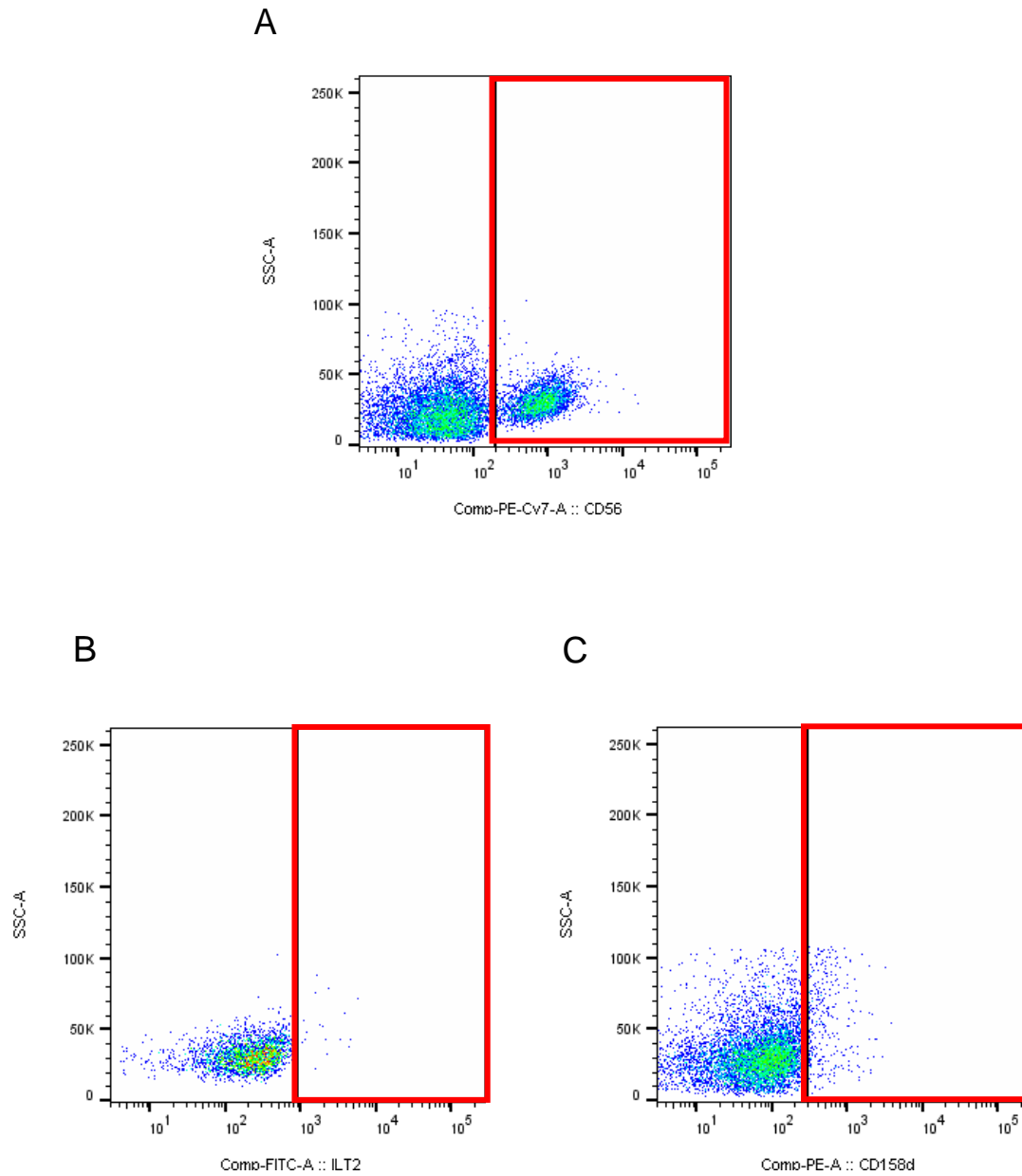
Marcadores de Membrana	Pacientes			Controles			Valor <i>p</i>	Valor <i>p</i> corrigido
	N	Média	Mediana	N	Média	Mediana		
CD3 ⁺ CD4 ⁺	13	24,16 (18,95) ^a	-	13	17,98 (10,82) ^a	-	0,3174 ^c	0,6170
CD3 ⁺ CD4 ⁺ ILT2 ⁺	13	-	2,20 (0,15-9,23) ^b	13	-	0,0 (0,0-0,33) ^b	0,0064 ^d	0,0882
CD3 ⁺ CD8 ⁺	13	17,60 (11,82) ^a	-	13	16,14 (9,77) ^a	-	0,7352 ^c	0,9630
CD3 ⁺ CD8 ⁺ ILT2 ⁺	13	-	0,15 (0,0-1,48) ^b	13	-	0,0 (0,0-0,0) ^b	0,0084 ^d	0,0882

a, Desvio padrão; b, [primeiro quartil (Q1/4) - terceiro quartil (Q3/4)]; c, Teste t; d, Teste U de Mann-Whitney.

5.1.3. Análise de células natural killer de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle para a expressão dos receptores de HLA-G.

As células NK expressam dois diferentes tipos de receptores de HLA-G: o ILT2 e o KIR2DL4 (Samaridis e Colonna, 1997; Trowsdale et al., 2015; Kang et al., 2016). Foram avaliadas as células NK que apresentavam expressão desses receptores em suas membranas plasmáticas utilizando a estratégia de análise ilustrada na figura 4. Após seleção da população de PBMCs e exclusão das células não viáveis (figura 1), foi selecionado o marcador CD56 (figura 4A). Na população positiva para CD56, foram avaliadas as células que apresentavam positividade para o anticorpo anti-ILT2 (figura 4B) e para o anticorpo anti-KIR2DL4 (figura 4C). Os resultados obtidos estão resumidos na tabela 8.

Figura 7 - Exemplos de gráficos ilustrando os *gates* utilizados para a análise da população de células NK quanto a expressão dos receptores de HLA-G.



O gráfico A mostra a seleção de células positivas para o marcador CD56 (*gate* vermelho) que foi utilizado para selecionar as células NK. O gráfico B mostra uma população de células NK positivas para o marcador ILT2 (*gate* vermelho). O gráfico C mostra a não ocorrência de células NK positivas para o marcador CD158d (KIR2DL4), (*gate* vermelho).

Tabela 8 – Avaliação das células NK quanto a expressão de receptores de HLA-G.

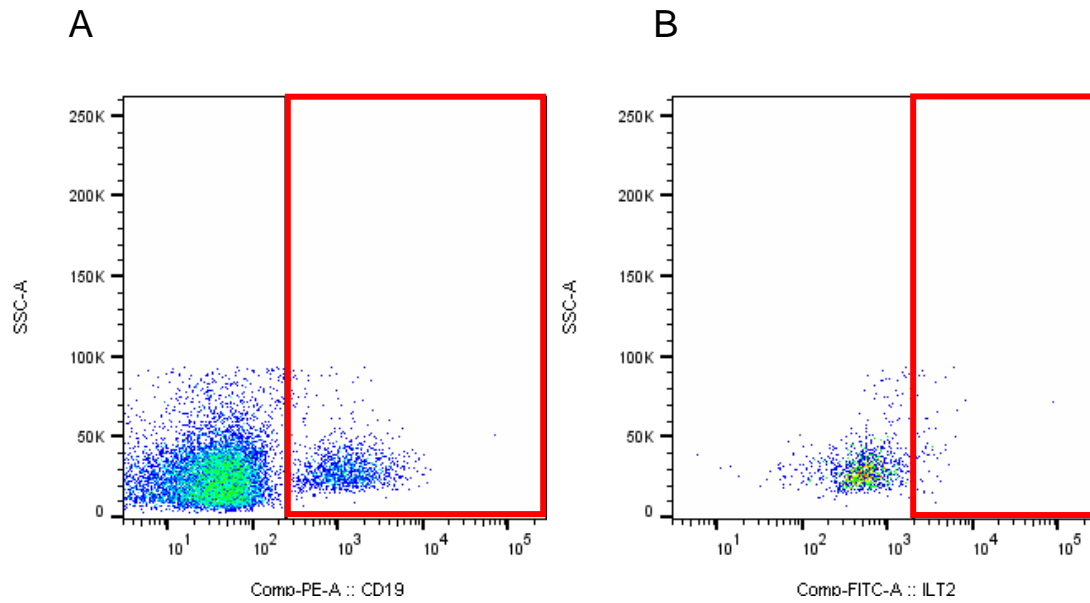
Marcadores de Membrana	Pacientes			Controles			Valor <i>p</i>	Valor <i>p</i> corrigido
	N	Média	Mediana	N	Média	Mediana		
CD56 ⁺	13	15,58 (7,33) ^a	-	14	11,33 (10,66) ^a	-	0,2420 ^c	0,6170
CD56 ⁺ CD158d ⁺	13	-	0,0 (0,0-0,0) ^b	12	-	0,0 (0,0-0,23) ^b	0,6972 ^d	0,9630
CD56 ⁺ ILT2 ⁺	13	-	0,33 (0,0-2,80) ^b	12	-	0,0 (0,0-0,17) ^b	0,0786 ^d	0,4126

a, Desvio padrão; b, [primeiro quartil (Q1/4) - terceiro quartil (Q3/4)]; c, Teste t; d, Teste U de Mann-Whitney.

5.1.4 Análise de linfócitos B de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle para a expressão do receptor de HLA-G.

De acordo com a literatura, os linfócitos B expressam somente um receptor de HLA-G, o ILT2 (Samaridis e Colonna, 1997; Trowsdale et al., 2015; Kang et al., 2016). Para a avaliação dos linfócitos B que apresentavam expressão do receptor ILT2 em suas membranas plasmáticas, foi utilizada a estratégia de análise que está ilustrada na figura 5. Após seleção da população de PBMCs e exclusão das células não viáveis (figura 1), foram selecionadas as células positivas para o marcador CD19 (figura 5A). Na população positiva para o marcador CD19, foram avaliadas as células que apresentavam positividade para o marcador ILT2 em suas membranas plasmáticas (figura 5B). Os resultados obtidos estão resumidos na tabela 9.

Figura 8 - Exemplos de gráficos ilustrando os *gates* utilizados para a análise dos linfócitos B quanto a expressão do receptor de HLA-G.



O gráfico A mostra a seleção de células positivas para o marcador CD19 (*gate* vermelho) que foi utilizado para selecionar os linfócitos B. O gráfico B mostra uma população de linfócito B positivas para o marcador ILT2 (*gate* vermelho).

Tabela 9 – Avaliação da população de linfócito B quanto a expressão do receptor de HLA-G.

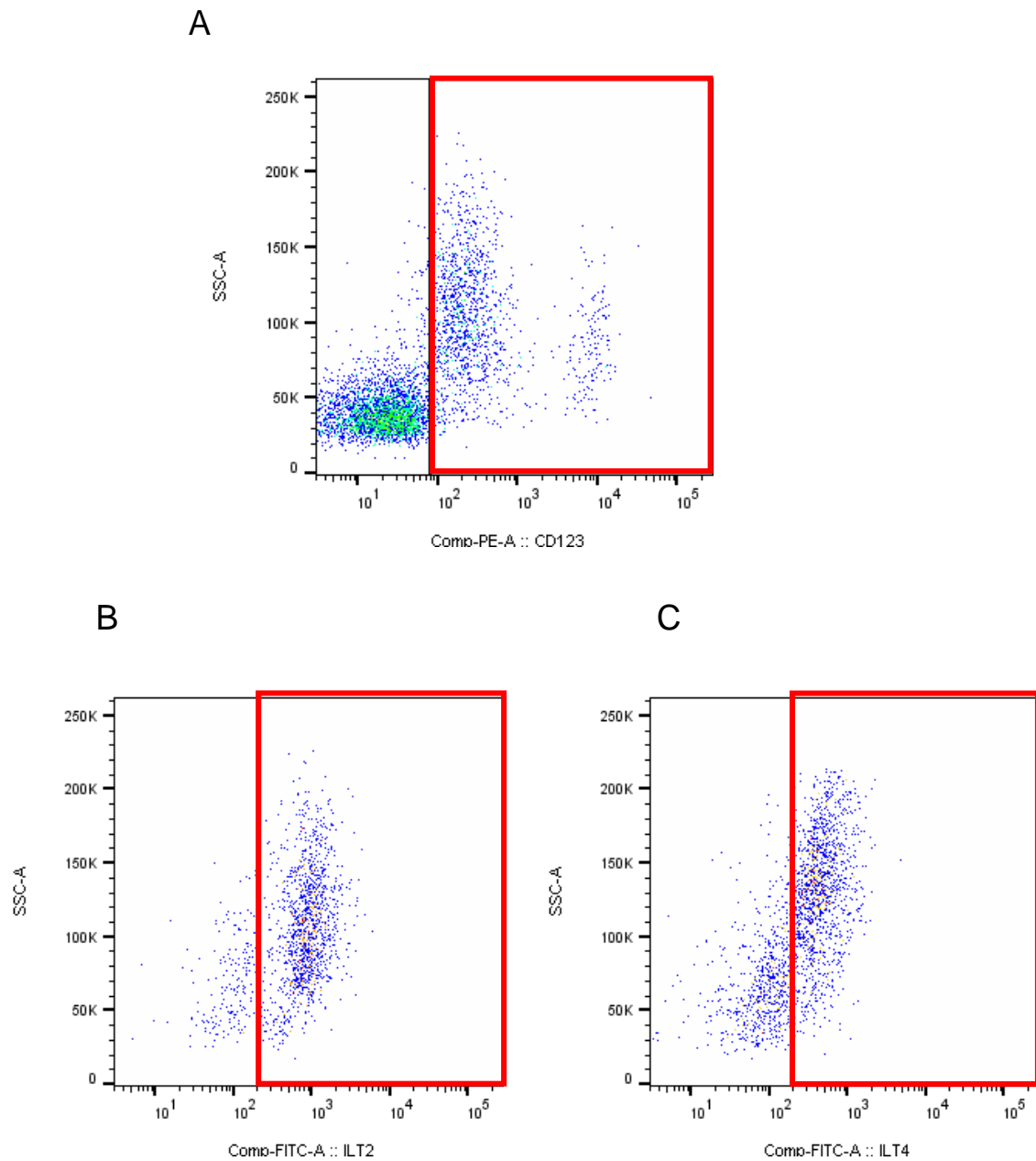
Marcadores de Membrana	Pacientes			Controles			Valor <i>p</i>	Valor <i>p</i> corrigido
	N	Média	Mediana	N	Média	Mediana		
CD19 ⁺	14	4,34 (4,25) ^a	-	14	2,67 (4,33) ^a	-	0,1343 ^c	0,4700
CD19 ⁺ ILT2 ⁺	11	1,31 (2,83) ^a	-	6	0,36 (0,43) ^a	-	0,8775 ^c	0,9630

a, Desvio padrão; b, [primeiro quartil (Q1/4) - terceiro quartil (Q3/4)]; c, Teste U de Mann-Whitney.

5.1.5 Análise de células dendríticas plasmocitóides de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle para a expressão dos receptores de HLA-G.

As células dendríticas plasmocitóides expressam dois receptores de HLA-G: ILT2 e ILT4 (Samaridis e Colonna, 1997; Trowsdale et al., 2015; Kang et al., 2016). Para avaliar as células dendríticas plasmocitóides que expressam os receptores de HLA-G, a estratégia de análise utilizada está ilustrada na figura 6. Após seleção da população de PBMCs e exclusão das células não viáveis (figura 1), foi selecionado o marcador para CD123 (figura 6A). A população positiva para o marcador CD123, considerada aqui como células dendríticas plasmocitóides, foram avaliadas as células que apresentavam positividade para o marcador ILT2 e ou ILT4 em suas membranas plasmáticas (figura 6B). Os resultados obtidos estão agrupados na tabela 10.

Figura 9 - Exemplos de gráficos ilustrando os *gates* utilizados para a análise da populações de células dendríticas plasmocitóides quanto a expressão dos receptores de HLA-G.



O gráfico A mostra a seleção de células positivas para o marcador CD123 que, nesse estudo, foi utilizado para selecionar as pDCs. O gráfico B mostra uma população de pDCs positiva para o marcador ILT2. O gráfico C mostra uma população de pDCs positivas para o marcador ILT4.

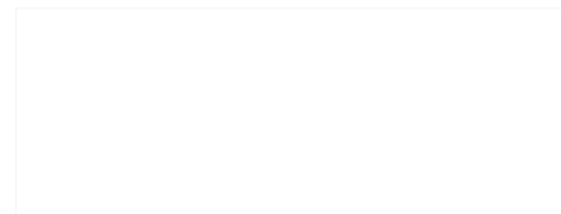


Tabela 10 – Avaliação da população de células dendríticas plasmocitóides quanto a expressão de receptores de HLA-G.

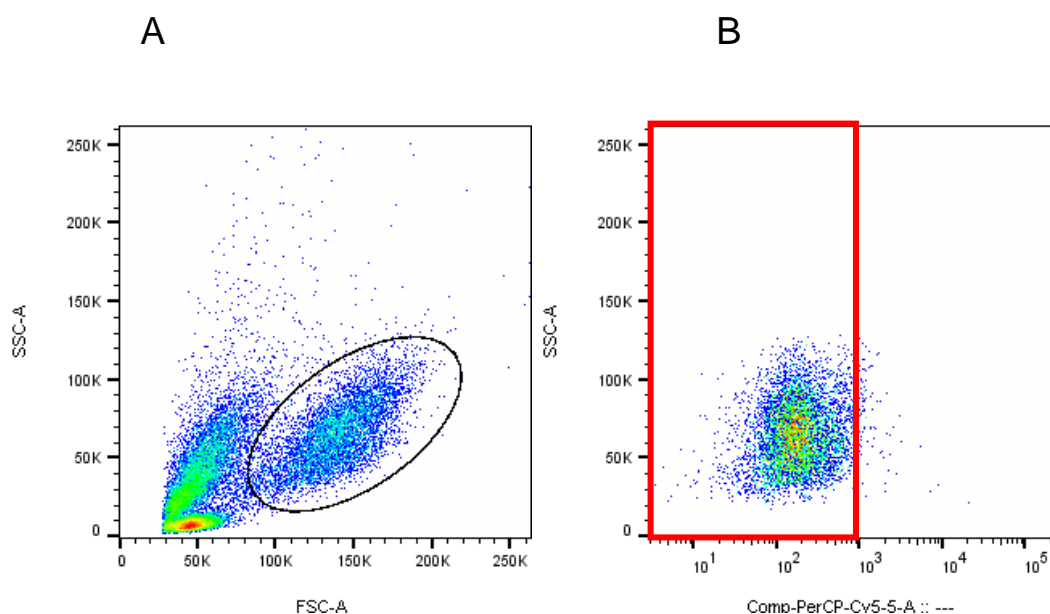
Marcadores de Membrana	Pacientes			Controles			Valor <i>p</i>	Valor <i>p</i> corrigido
	N	Média	Mediana	N	Média	Mediana		
CD123 ⁺	14	5,74 (3,95) ^a	-	14	5,58 (4,42) ^a	-	0,9268 ^c	0,9630
CD123 ⁺ ILT2 ⁺	14	8,96 (13,58) ^a	-	8	2,44 (5,85) ^a	-	0,3566 ^c	0,6240
CD123 ⁺ ILT4 ⁺	12	0,792 (1,44) ^a	-	7	0,04 (0,06) ^a	-	0,04063 ^c	0,3241

a, Desvio padrão; c, Teste t;

5.1.6 Análise do fenótipo de membrana de células dendríticas imaturas de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle.

Os monócitos de sangue periférico provenientes tanto de pacientes de câncer renal quanto de indivíduos controle foram diferenciados em células dendríticas *in vitro*. Após cinco dias em cultura, as células dendríticas estavam em um estado imaturo e foram marcadas com anticorpos monoclonais contra as moléculas CD14, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, HLA-DQ, HLA-G, ILT2 e ILT4 (figura 7). Para análise desses marcadores, primeiramente, as células que apresentavam tamanho e granulosidade correspondente a células dendríticas foram selecionadas através de um *gate* (figura 7A). Para a exclusão de células não viáveis, essas células também foram coradas com o corante para DNA 7-AAD, isso possibilitou que somente as células viáveis fossem selecionadas para as análises posteriores (figura 7B).

Figura 10 - Gráficos ilustrando os *gates* utilizados para a análise de marcadores em células dendríticas imaturas.

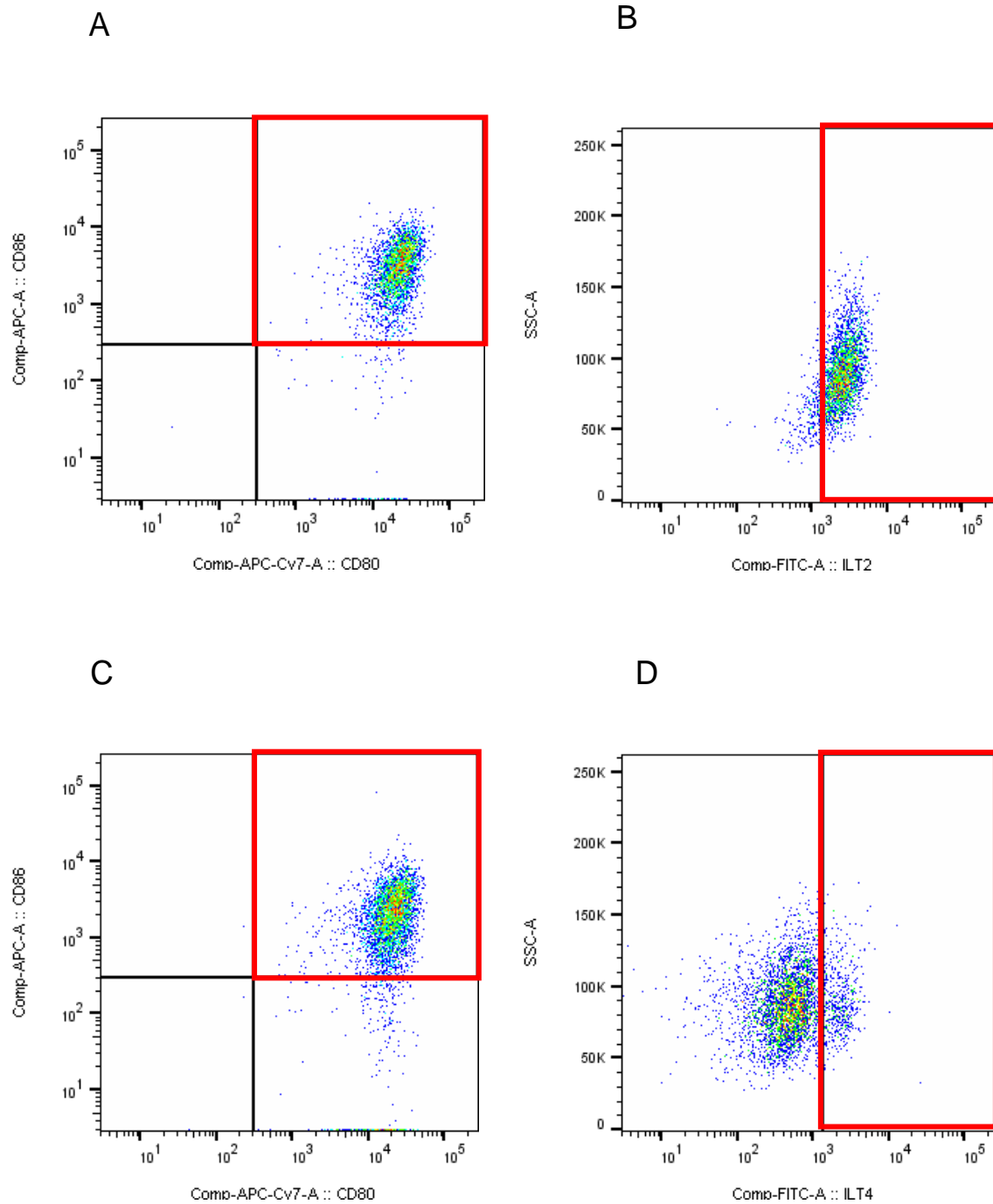


O gráfico A representa o *gate* correspondente as células com tamanho e granulosidade correspondentes as células dendríticas. O gráfico B mostra a seleção de células negativas para o corante 7-AAD (*gate* vermelho) a partir da população selecionada em A.

5.1.7 Análise do fenótipo de membrana de células dendríticas imaturas CD14 positivas de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle.

Para a análise do fenótipo de membrana das células dendríticas imaturas CD14 positivas, foi utilizada a seguinte estratégia: após a determinação do *gate* de tamanho e granulosidade correspondente as células dendríticas (figura 7A), fez-se a exclusão das células coradas para o corante de DNA, 7-AAD (células não viáveis), (figura 7B). Através de um *gate* foi selecionada a população positiva para o marcador CD14 (figura 8A *gate* vermelho). A partir da população selecionada, (figura 8A *gate* vermelho), foram realizadas as análises dos demais marcadores (figura 8B, 8C e 8D). Os resultados dessas análises podem ser visualizados na tabela 11.

Figura 11 - Exemplos de gráficos ilustrando os *gates* utilizados para a análise do fenótipo de membrana das células dendríticas imaturas.



Os gráficos mostram a seleção de populações feitas considerando as seleções prévias ilustradas na figura 7. O gráfico A mostra a seleção de células positivas para os marcadores CD80 e CD86 (*gate* vermelho). O gráfico B mostra a positividade da população selecionada em A para o marcador. O gráfico C mostra a seleção de células positivas para os marcadores CD80 e CD86 (*gate* vermelho). O gráfico D mostra a positividade da população selecionada em C para o marcador ILT4.

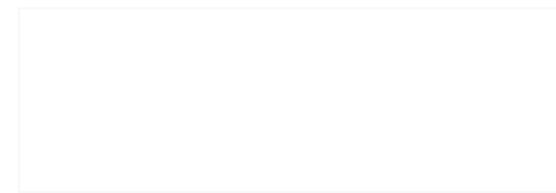


Tabela 11 – Avaliação do fenótipo de membrana da população de células CD14 positivas provenientes de culturas de células dendríticas imaturas geradas *in vitro* a partir de monócitos.

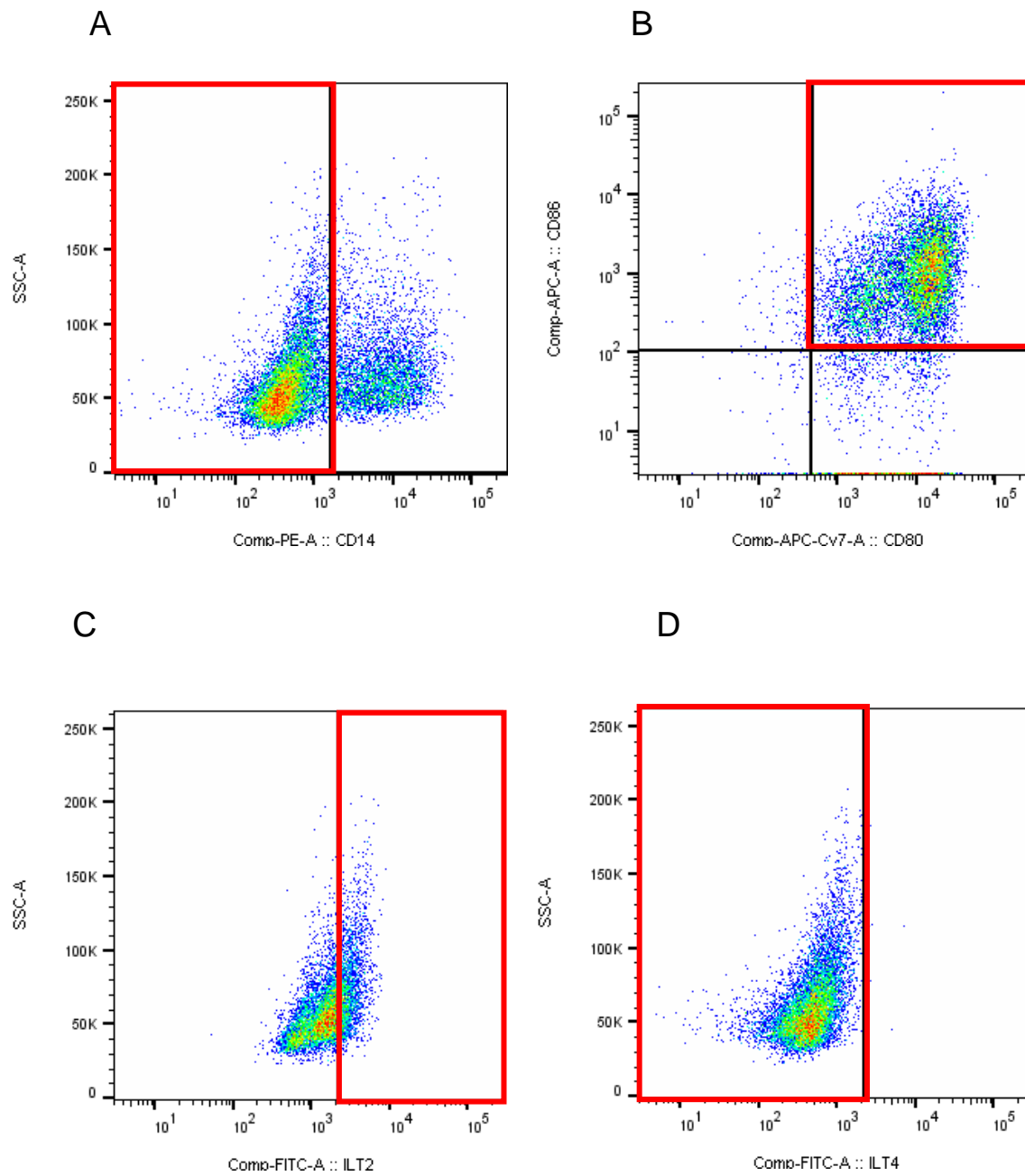
Marcadores de Membrana	Pacientes			Controles			Valor <i>p</i>	Valor <i>p</i> corrigido
	N	Média	Mediana	N	Média	Mediana		
CD14 ⁺	10	-	2,67 (0,39-45,73) ^b	17	-	10,80 (3,80-24,00) ^b	0,2658 ^d	0,7215
CD14 ⁺ HLA-DQ ⁺	2	-	0,92(0,20-2,54) ^b	7	-	32,80 (0,28-65,80) ^b	#	#
CD14 ⁺ HLA-G ⁺	4	-	0,48 (0,09-4,16) ^b	9	-	1,27(0,0-4,10) ^b	0,6953 ^d	0,9632
CD14 ⁺ ILT2 ⁺	7	-	0,78 (0,06-1,82) ^b	12	-	7,24 (0,0-52,25) ^b	0,4650 ^d	0,9475
CD14 ⁺ ILT4 ⁺	2	-	0,38(0,0-0,74) ^b	7	-	0,17 (0,0-10,46) ^b	0,9237 ^d	0,9632

b, [primeiro quartil (Q1/4) - terceiro quartil (Q3/4)]; d, Teste U de Mann-Whitney; #, Testes não realizados devido a N insuficiente em pelo menos um dos grupos.

5.1.8 Análise do fenótipo de membrana de células dendríticas imaturas CD14 negativas de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle.

Já para a análise do fenótipo de membrana das células dendríticas imaturas CD14 negativas, novamente, após a determinação do *gate* de tamanho e granulosidade correspondente as células dendríticas (figura 7A), fez-se a exclusão das células positivas para o corante de DNA, 7-AAD (células não viáveis), (figura 7B). Após, selecionou-se a população negativa para o marcador CD14 (figura 9A *gate* vermelho). A partir da população celular negativa para o marcador CD14, foram realizadas as análises dos demais marcadores (figura 9B, 9C e 9D). Os resultados dessas análises podem ser visualizados na tabela 12, 13 e 14.

Figura 12 - Exemplos de gráficos ilustrando os *gates* utilizados para a análise do fenótipo de membrana das células dendríticas imaturas.



O gráfico A mostra a seleção de células negativas para o marcador CD14 (*gate* vermelho). O gráfico B mostra a positividade da população selecionada em A para os marcadores CD80 e CD86 (*gate* vermelho). O gráfico C mostra a positividade da população selecionada para o marcador ILT2 (*gate* vermelho). O gráfico D mostra a negatividade da população selecionada em A para o marcador ILT4 (*gate* vermelho).

Tabela 12 – Avaliação do fenótipo de membrana da população de células CD14 negativas provenientes de culturas de células dendríticas imaturas geradas *in vitro* a partir de monócitos.

Marcadores de Membrana	Pacientes			Controles			Valor <i>p</i>	Valor <i>p</i> corrigido
	N	Média	Mediana	N	Média	Mediana		
CD14 ⁻	10	-	97,30 (54,28-99,65) ^b	17	-	89,20 (76,0-96,20) ^b	0,2657 ^d	0,7215
CD14 ⁺ HLA-DQ ⁺	4	29,61 (28,26) ^a	-	8	32,59 (34,01) ^a	-	0,8612 ^c	0,9632
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	10	62,69 (27,07) ^a	-	16	46,77 (28,11) ^a	-	0,1761 ^c	0,7215
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺ HLA-DQ ⁺	4	-	40,0(7,59-55,30) ^b	8	-	46,10 (4,89-77,95) ^b	0,7551 ^d	0,9632
CD14 ⁺ HLA-G ⁺	8	-	0,31 (0,08-0,51) ^b	15	-	0,0(0,0-0,16) ^b	0,0585 ^d	0,6675
CD14 ⁻ ILT2 ⁺	10	-	0,38 (0,06-2,56) ^b	17	-	0,0(0,0-7,40) ^b	0,2157 ^d	0,7215
CD14 ⁻ ILT4 ⁺	6	-	0,0(0,0-0,21) ^b	8	-	0,0(0,0-0,16) ^b	0,9408 ^d	0,9632

a, Desvio padrão; b, [primeiro quartil (Q1/4) - terceiro quartil (Q3/4)]; c, Teste t; d, Teste U de Mann-Whitney; #, Testes não realizados devido a N insuficiente em pelo menos um dos grupos.

Tabela 13 – Avaliação do fenótipo de membrana (marcadores CD80 e CD83), da população de células CD14 negativas provenientes de culturas de células dendríticas imaturas geradas *in vitro* a partir de monócitos.

Marcadores de Membrana	Pacientes			Controles			Valor <i>p</i>	Valor <i>p</i> corrigido
	N	Média	Mediana	N	Média	Mediana		
CD14 ⁻ CD80 ⁺	10	67,85 (29,61) ^a	-	15	63,12 (35,45) ^a	-	0,7071 ^c	0,9632
CD14 ⁻ CD83 ⁺	8	-	4,77 (1,49-27,25) ^b	8	-	6,33 (2,91-9,17) ^b	0,8968 ^d	0,9632
CD14 ⁻ CD80 ⁺ CD83 ⁺	8	20,52 (25,24) ^a	-	8	3,47 (3,12) ^a	-	0,0782 ^c	0,6675

a, Desvio padrão; b, [primeiro quartil (Q1/4) - terceiro quartil (Q3/4)]; c, Teste t; d, Teste U de Mann-Whitney; #, Testes não realizados devido a N insuficiente em pelo menos um dos grupos.

Tabela 14 – Avaliação do fenótipo de membrana (marcadores CD80, CD86, HLA-DR, HLA-G, ILT2 e ILT4), da população de células CD14 negativas provenientes de culturas de células dendríticas imaturas geradas *in vitro* a partir de monócitos.

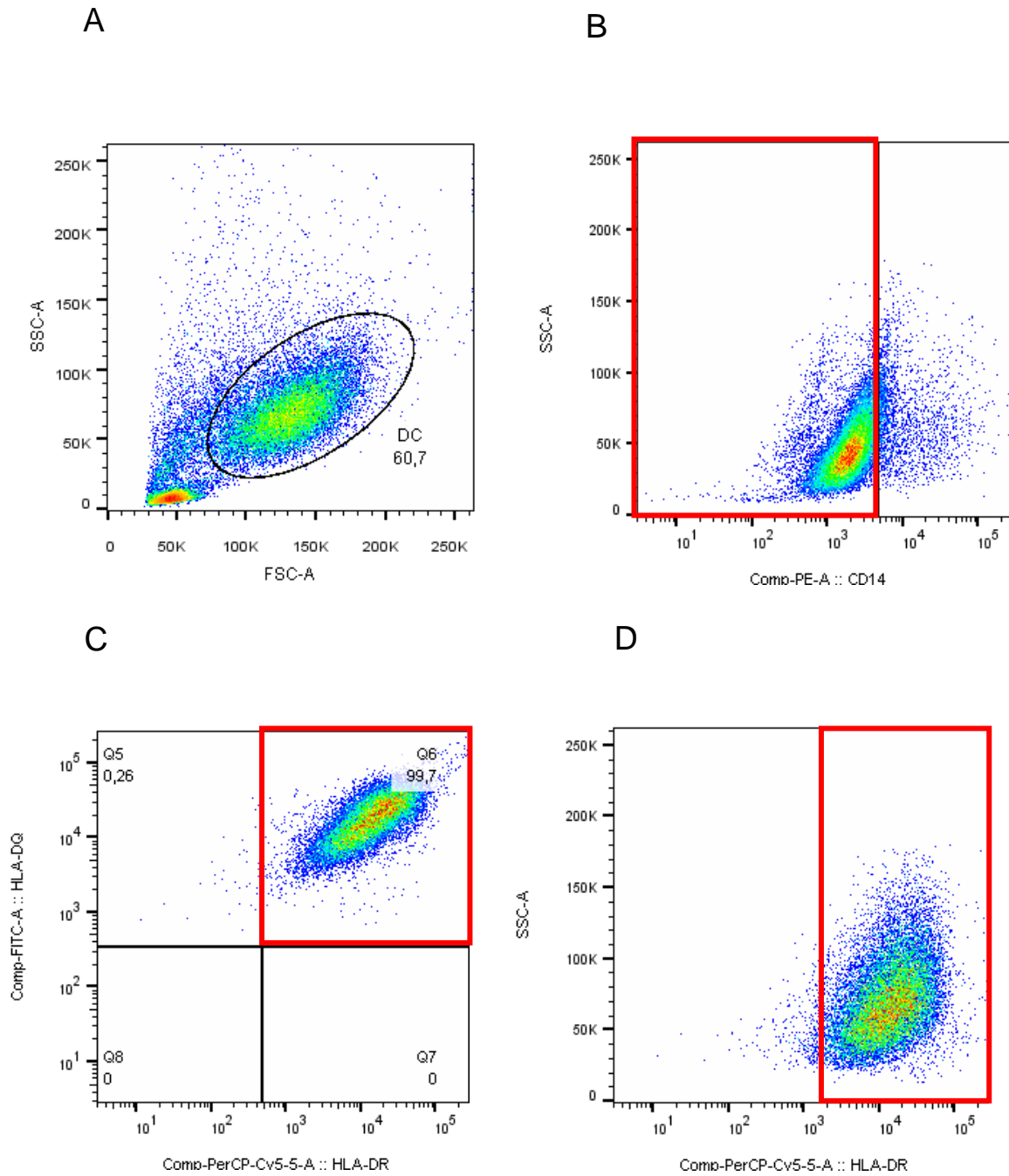
Marcadores de Membrana	Pacientes			Controles			Valor <i>p</i>	Valor <i>p</i> corrigido
	N	Média	Mediana	N	Média	Mediana		
CD14 ⁻ CD80 ⁺	10	67,85 (29,61) ^a	-	15	63,12 (35,45) ^a	-	0,7071 ^c	0,9632
CD14 ⁻ CD86 ⁺	10	40,84 (30,43) ^a	-	16	61,14 (34,48) ^a	-	0,1054 ^c	0,6675
CD14 ⁻ CD80 ⁺ CD86 ⁺	10	-	30,35(13,44-45,60) ^b	15	-	48,00(4,59-91,50) ^b	0,4987 ^d	0,9475
CD14 ⁻ CD80 ⁺ CD86 ⁺ HLA-G ⁺	4	-	0,76(0,11-1,41) ^b	14	-	0,13(0,0-2,67) ^b	#	#
CD14 ⁻ CD80 ⁺ CD86 ⁺ HLA-DR ⁺	10	72,29 (31,34) ^a	-	14	71,69 (23,76) ^a	-	0,9632 ^c	0,9632
CD14 ⁻ CD80 ⁺ CD86 ⁺ ILT2 ⁺	10	-	3,59 (0,46-21,41) ^b	13	-	0,78(0,0-18,40) ^b	0,6774 ^d	0,9632
CD14 ⁻ CD80 ⁺ CD86 ⁺ ILT4 ⁺	6	-	0,27 (0,0-1,07) ^b	8	-	0,73 (0,06-1,78) ^b	0,4580 ^d	0,9475

a, Desvio padrão; b, [primeiro quartil (Q1/4) - terceiro quartil (Q3/4)]; c, Teste t; d, Teste U de Mann-Whitney; #, Testes não realizados devido a N insuficiente em pelo menos um dos grupos.

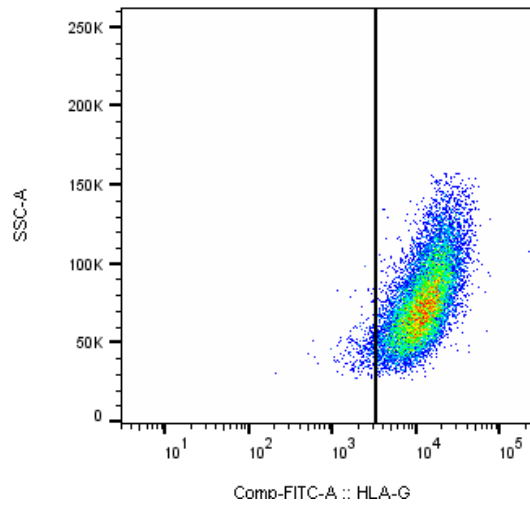
5.1.9 Análise do fenótipo de membrana de células dendríticas maduras de pacientes de câncer renal e de indivíduos controle.

Para a análise do fenótipo de membrana das células dendríticas maduras, seguiu-se o mesmo processo utilizado para avaliação das iDCs, ou seja, através de *gate* de tamanho e granulosidade correspondente, foram selecionadas as células dendríticas (figura 7A) e, em seguida, fez-se a exclusão das células positivas para o corante de DNA, 7-AAD (células não viáveis), (figura 7B). A positividade das células dendríticas maduras para os marcadores CD80, CD83, CD86, HLA-G, HLA-DQ, HLA-DR, ILT2 e ILT4, foi avaliada tanto na população positiva para o marcador CD14 (tabela 15), quanto na população CD14 negativa (tabelas 16, 17 e 18). Na figura 10 estão ilustrados alguns gráficos (*dot plots*) gerados durante as análises dos dados de citometria de fluxo.

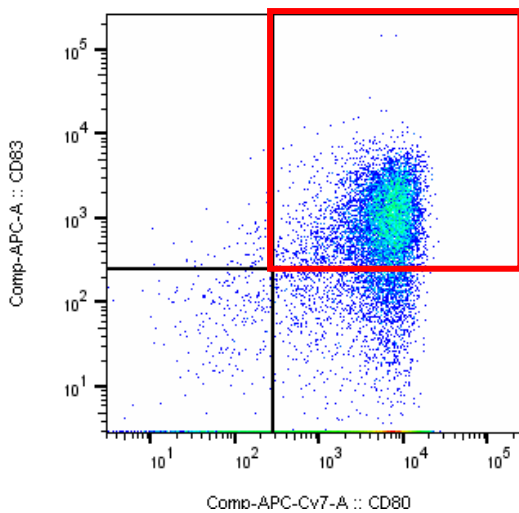
Figura 13 - Gráficos ilustrando os *gates* utilizados para a análise de marcadores em células dendríticas maduras.



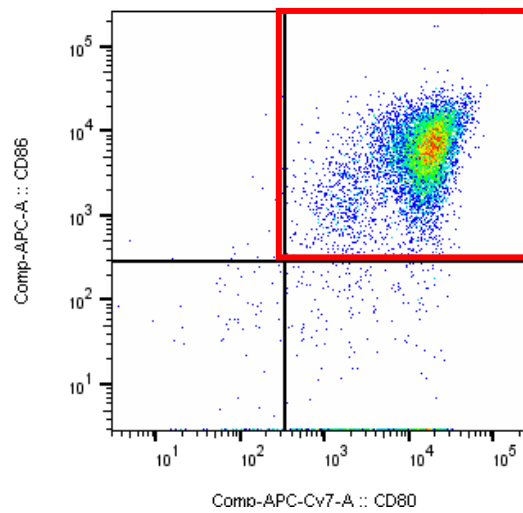
E



F



G



Os gráficos ilustram *gates* de análise em mDCs. O gráfico A representa o *gate* correspondente as células com tamanho e granulosidade correspondentes a células dendríticas. O gráfico B mostra a seleção de células negativas para o marcador CD14 (*gate* vermelho). O gráfico C mostra uma população de células positivas para os marcadores HLADQ e HLADR (*gate* vermelho). O gráfico D mostra uma população de células positivas para o marcador HLA-DR (*gate* vermelho). O gráfico E mostra uma de células positivas para os marcadores HLA-G (*gate* vermelho). O gráfico F mostra uma população de células positivas para os marcadores CD83 e CD80 (*gate* vermelho). O gráfico G mostra uma população de células positivas para os marcadores CD86 e CD80 (*gate* vermelho). Os gráficos representam populações celulares diferentes.

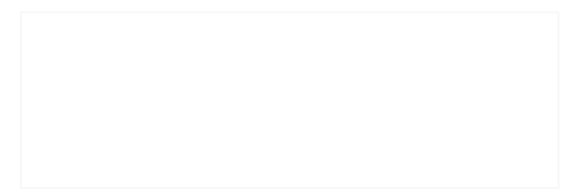


Tabela 15 – Avaliação do fenótipo de membrana (marcadores HLA-DQ, HLA-G, ILT2 e ILT4), da população de células CD14 positivas provenientes de culturas de células dendríticas maduras geradas *in vitro* a partir de monócitos.

Marcadores de Membrana	Pacientes			Controles			Valor <i>p</i>	Valor <i>p</i> corrigido
	N	Média	Mediana	N	Média	Mediana		
CD14 ⁺	14	-	37,30 (1,19-67,50) ^b	15	-	11,25(3,89-16,65) ^b	0,4140 ^d	0,6210
CD14 ⁺ HLA-DQ ⁺	3	-	39,95(14,30-65,60) ^b	6	-	3,57(0,19-12,50) ^b	#	#
CD14 ⁺ HLA-G ⁺	6	-	0,20 (0,03-0,70) ^b	8	-	0,66 (0,16-1,03) ^b	#	#
CD14 ⁺ ILT2 ⁺	9	-	0,90 (0,37-5,33) ^b	8	-	0,23 (0,0-1,82) ^b	0,2644 ^d	0,5666
CD14 ⁺ ILT4 ⁺	5	-	0,13 (0,0-0,27) ^b	6	-	0,0 (0,0-0,47) ^b	#	#

b, [primeiro quartil (Q1/4) - terceiro quartil (Q3/4)]; d, Teste U de Mann-Whitney; #, Testes não realizados devido a N insuficiente em pelo menos um dos grupos.

Tabela 16 – Avaliação do fenótipo de membrana (marcadores HLA-DQ, HLA-DR, HLA-G, ILT2 e ILT4), da população de células CD14 negativas provenientes de culturas de células dendríticas maduras geradas *in vitro* a partir de monócitos.

Marcadores de Membrana	Pacientes			Controles			Valor <i>p</i>	Valor <i>p</i> corrigido
	N	Média	Mediana	N	Média	Mediana		
CD14 ⁻	14	-	62,7(32,50-99,10) ^b	15	-	87,00(83,80-95,42) ^b	0,4073 ^d	0,6210
CD14 ⁻ HLA-DQ ⁺	7	15,12 (21,86) ^a	4,66 (3,54-37,15) ^b	7	14,79 (21,56) ^a	6,03 (0,13-28,73) ^b	#	#
CD14 ⁻ HLA-DR ⁺	14	45,58 (14,71) ^a	-	10	29,28 (20,51) ^a	-	0,0393 ^c	0,1474
CD14 ⁻ HLA-DQ ⁺ HLA-DR ⁺	7	-	4,49 (3,87-32,66) ^b	5	-	3,22 (0,18-15,88) ^b	#	#
CD14 ⁻ HLA-G ⁺	10	-	0,41 (0,17-0,82) ^b	15	-	0,22(0,0-0,40) ^b	0,4555 ^d	0,6211
CD14 ⁻ ILT2 ⁺	13	-	0,50 (0,11-15,65) ^b	15	-	0,46(0,0-17,50) ^b	0,6303 ^d	0,7273
CD14 ⁻ ILT4 ⁺	8	-	0	7	-	3,25(0,0-13,37) ^b	0,0291 ^d	0,1455

a, Desvio padrão; b, [primeiro quartil (Q1/4) - terceiro quartil (Q3/4)]; c, Teste t; d, Teste U de Mann-Whitney; #, Testes não realizados devido a N insuficiente em pelo menos um dos grupos.

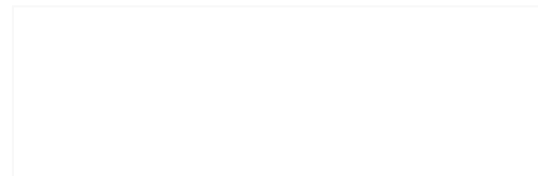


Tabela 17 – Avaliação do fenótipo de membrana (marcadores CD80 e CD83), da população de células CD14 negativas provenientes de culturas de células dendríticas maduras geradas *in vitro* a partir de monócitos.

Marcadores de Membrana	Pacientes			Controles			Valor <i>p</i>	Valor <i>p</i> corrigido
	N	Média	Mediana	N	Média	Mediana		
CD14 ⁻ CD80 ⁺	13	-	51,00(18,05-68,80) ^b	15	-	31,7(4,76-89,90) ^b	0,8029 ^d	0,8029
CD14 ⁻ CD83 ⁺	10	-	5,24 (2,72-12,05) ^b	8	-	0,82 (0,26-2,22) ^b	0,0011 ^d	0,0082
CD14 ⁻ CD80 ⁺ CD83 ⁺	9	-	8,23 (2,76-17,93) ^b	8	-	0,20 (0,12-0,71) ^b	0,0002 ^d	0,0030

b, [primeiro quartil (Q1/4) - terceiro quartil (Q3/4)]; d, Teste U de Mann-Whitney; #, Testes não realizados devido a N insuficiente em pelo menos um dos grupos.

Tabela 18 – Avaliação do fenótipo de membrana (marcadores CD80, CD86, HLA-DR, HLA-G, ILT2 e ILT4), da população de células CD14 negativas provenientes de culturas de células dendríticas maduras geradas *in vitro* a partir de monócitos.

Marcadores de Membrana	Pacientes			Controles			Valor <i>p</i>	Valor <i>p</i> corrigido
	N	Média	Mediana	N	Média	Mediana		
CD14 ⁻ CD80 ⁺	13	-	51,00(18,05-68,80) ^b	15	-	31,7(4,76-89,90) ^b	0,8029 ^d	0,8029
CD14 ⁻ CD86 ⁺	14	-	16,35 (7,84-32,35) ^b	15	-	15,90 (5,64-24,10) ^b	0,8029 ^d	0,8029
CD14 ⁻ CD80 ⁺ CD86 ⁺	14	-	10,55 (5,05-26,88) ^b	15	-	5,34 (2,93-8,03) ^b	0,1513 ^d	0,4539
CD14 ⁻ CD80 ⁺ CD86 ⁺ HLA-G ⁺	2	-	1,52 (1,15-26,65) ^b	14	-	0,60 (0,07-2,25) ^b	#	#
CD14 ⁻ CD80 ⁺ CD86 ⁺ HLA-DR ⁺	14	73,00 (20,50) ^a	-	8	62,35 (34,05) ^a	-	0,3889 ^c	0,6210
CD14 ⁻ CD80 ⁺ CD86 ⁺ ILT2 ⁺	14	-	0,90 (0,37-5,33) ^b	14	-	0,23 (0,0-1,82) ^b	0,2644 ^d	0,5666
CD14 ⁻ CD80 ⁺ CD86 ⁺ ILT4 ⁺	8	-	0,32(0,0-10,18) ^b	6	-	2,93 (0,04-10,90) ^b	0,6011 ^d	0,7273

a, Desvio padrão; b, [primeiro quartil (Q1/4) - terceiro quartil (Q3/4)]; c, Teste t; d, Teste U de Mann-Whitney; #, Testes não realizados devido a N insuficiente em pelo menos um dos grupos.

5.2 Artigo original “*In vitro* generation of human monocyte-derived dendritic cells –methodological aspects in a comprehensive review”

Artigo submetido ao periódico Journal of Immunological Methods.

In vitro generation of human monocyte-derived dendritic cells – methodological aspects in a comprehensive review

Giovana Cechim, José Artur Bogo Chies[#]

Immunogenetics Laboratory, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

[#]Corresponding author: Dr. José Artur Bogo Chies. Laboratório de Imunogenética (Prédio 43323, Laboratório 212), Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale, Porto Alegre - RS, Brazil, Phone: +5551 33086737. E-mail: jabchies@terra.com.br

Abstract

Dendritic cells (DCs) initiate and shape both innate and adaptive immune responses. They are specialized in antigen presentation to naïve T cells, thereby orchestrating the T cell immune responses. Human peripheral blood and tissues contain several subsets of phenotypically and functionally distinct DCs, which promote interactions between the external environment and lymphoid organs. Because of the difficulty in purifying these cells, *in vitro* studies only became more frequent when Frederica Sallusto and Antonio Lanzavecchia developed a method to generate DCs from blood monocytes *in vitro*. Nowadays a wide range of biotechnological innovations has allowed the study of DCs and their precursors in the most diverse situations faced by the immune system. As a result of such studies, monocyte-derived dendritic cells (MDDC) are presently used in clinical protocols for the treatment of a variety of diseases, including cancer and human immunodeficiency virus infection. Here, we summarize recent advances in the understanding of methodologies and inputs used in protocols to differentiate DCs from blood monocytes *in vitro*.

Keywords: Cytokines, Dendritic cell, differentiation, monocytes.

1. Introduction

In 1973, Ralph M. Steinman and Zanvil A. Cohn described a new cell type that had a cytoplasm with pseudopodia structures of various sizes and shapes, giving the cell a starry aspect, much like neuronal dendrites (Steinman and Cohn, 1973). This work described the cell currently known as a Dendritic cell (DC). In 2011, the importance of this discovery was recognized with the Nobel Prize in Physiology or Medicine (Steinman, 2012). However, the study of these cells only had significant advances in the 1990's, when Frederica Sallusto and Antonio Lanzavecchia first developed a method allowing the generation of DCs from blood monocytes. In this study, monocytes obtained from peripheral blood were differentiated into myeloid DCs in the presence of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and interleukin (IL)-4, (Sallusto and Lanzavecchia, 1994).

DCs are the major antigen presenting cells (APCs) due to their unique ability to activate naive T cells (Steinman and Witmer, 1978; Banchereau et al., 2000). DCs are bone marrow derived, originating from both myeloid and lymphoid precursors and can encompass a range of cell types with several phenotypes and functions (Ardavin et al., 1993; Banchereau et al., 2000; Ueno et al., 2007; Merad et al., 2013). They are distributed throughout the body but are especially present in regions such as the skin and mucous membranes, promoting interactions between the external environment and lymphoid organs (Steinman, 1991; Guermonprez et al., 2002; Granot et al., 2017; Worbs et al., 2017). Due to its migratory patterns, DCs are called "the Sentinels" of the immune system (Stockwin et al., 2000; Randolph et al., 2008; Merad et al., 2013; Worbs et al., 2017).

Generally, these cells are found inside tissues in a so-called "immature" state characterized by a high capacity to capture and process antigens and a limited capacity to stimulate T cells. In the immature state, DCs exhibit low expression of the co-stimulatory molecules CD80 and CD86, as well as a low expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. The presence of "danger signals" triggers morphological changes in DCs, inducing a process known as maturation, which is characterized by a reduction of the DC endocytic capacity and the increased expression of MHC class II and co-stimulatory molecules (Banchereau et al., 2000; Joffre et al., 2009; Dalod et al., 2014; Worbs et al., 2017).

Considering this cell type diversity, DCs may be classified according to several criteria, including their location, such as skin, lungs, and lymphoid organs, since their function is intimately linked to the compartment where they are located (Wu and Liu, 2007). Within this anatomical classification, it is also possible to separate DCs in two further categories: the migratory DCs, which migrate continuously from peripheral tissues to the draining lymph nodes via the afferent lymphatic vessels, and resident DCs, which are found in the tissues, and when activated, migrate to the draining lymph nodes (Randolph et al., 2008; Segura et al., 2012; Merad et al., 2013; Pulendran, 2015). In this regard, DCs are usually classified according to their different abilities to drive the immune response by differential antigen presentation or by modulating the immune system through cytokine secretion (Joffre et al., 2009; Kurts et al., 2010; Joffre et al., 2012; Pulendran, 2015). Nowadays DCs are evaluated according to their transcriptional profiles in order to understand the regulation of the development and differentiation of the distinct DC lineages (Belz and Nutt, 2012; Hammer and Ma, 2013; Merad et al., 2013; Collin and Bigley, 2018).

Due to its central role in immune responses, a better understanding of the physiology and function of the DCs will help us to improve the use in clinical protocols to treat several diseases such as cancer and human immunodeficiency virus (HIV) infection (Banchereau et al., 2001; Turville et al., 2002; Kavanagh and Bhardwaj, 2002; Gandhi et al., 2016; Garg et al., 2017).

This review presents key information about the generation of human DC from blood monocytes (MDDC). We will analyze alternatives for the purification of precursor cells (meaning the monocytes), the selection of suitable culture medium, appropriate culture medium supplements, growth factors, and cytokines. We will also review the most common molecular markers used to characterize DCs by flow cytometry. The figure 1 presents a schematic summary of the steps in a monocyte-derived dendritic cell culture.

Figure 1 - Scheme of the steps of a MDDC culture.

2. Sources of monocytes

The first step for monocyte-derived dendritic cell culture is to choose the monocyte source, since these cells are the preferred precursors for *in vitro* MDDC generation. One possibility is to directly collect blood by venipuncture. The advantage of whole blood as a monocyte source is the freshness of the material. However, the disadvantage of using whole blood is the low yield of monocytes, since they represent only 6% of all peripheral blood cells, so using whole blood requires the processing of a large blood volume (Meyer et al., 2005; WHO, 2010; Gillio-Meina et al., 2013).

The use of the cells, which are normally discarded after the processing of donated blood, is a way to skip such a problem. Commonly, after blood donation, the blood bag is centrifuged, which allows the separation of its components into erythrocytes, plasma, and a buffy coat, which are collected into separate bags. The buffy coat is a concentrate of platelets and leukocytes which can be further processed for platelet purification. The remaining material is rich in leukocytes and constitutes an excellent source of monocytes, but is commonly discarded. Processing a 450 mL blood bag usually generates 30–80 mL of buffy coat with approximately 1×10^9 cells (Ito and Shinomiya, 2001; Repnik et al., 2003; Meyer et al., 2005; Strasser and Eckstein, 2010).

When plasmapheresis is performed in order to obtain distinct blood products, leukocytes are often collected together with platelets as a byproduct and must be removed to avoid immune rejection in the recipient. Therefore, leukocytes are filtered out by leukoreduction and collected into leukoreduction system chambers (LRSC) or leukocyte removal filters also known as buffy cones (Ebner et al., 2001; Dietz et al., 2006; Strasser et al., 2007). The buffy cone usually contains 10 mL of a processed mixture with approximately 1×10^9 cells.

Another possible source for large quantities of leukocytes is a leukopak. This is an enriched leukapheresis product consisting of a variety of blood cells including monocytes, lymphocytes, and erythrocytes. There are two types of leukopaks: one is collected from peripheral blood without any stimulation on the blood donor and the other are obtained from donors who were stimulated with G-CSF (granulocyte

colony stimulating factor) to induce leukocyte production and trigger migration of stem cells from bone marrow into the bloodstream. Usually, leukopaks are collected from healthy donors, but for research purposes it is possible to obtain leukopaks from donors that present certain pathologies such as hematological malignancies and diabetes. Although the production of leukopaks from such specific donors is not usual, this kind of product can be commercially provided under request. Commercial leukopaks generally contain 80–200 mL of processed material with approximately 7×10^9 peripheral blood mononuclear cells (PBMC), (more information available on: www.allcells.com/products/whole-tissue/leuko-pak). The table 1 shows the percentage of cell types and the amount of cells found in different monocyte sources.

Table 1 - Percentage of cells in whole blood and blood products in health individuals.

3. Monocyte Purification

After choosing the source of cells, the next step in MDDC culture is to process the sample (Elkord et al., 2005). It is possible to use density gradient media to separate blood components. One of the most commonly used density gradient medium is Ficoll® Paque Plus (GE Healthcare Life Sciences – Catalog number: 17144003). Ficoll® Paque Plus is a synthetic sucrose polymer that ensures the separation of blood components as follows: erythrocytes and polymorphonuclear cells (eosinophils and neutrophils) are denser than Ficoll® Paque Plus and therefore are deposited on the bottom of the tube. Immediately above the erythrocytes a density gradient medium Ficoll® Paque Plus layer forms (density of 1.077 G/mL at 20°C). Above the Ficoll® Paque Plus layer, PBMCs form a layer of cells similar to a cloud, while the plasma is the uppermost layer in the tube (see figure 2). The PBMC layer includes B and T lymphocytes, monocytes, NK (Natural Killer) cells, and dendritic cells (Meyer et al., 2005). This methodology is highly efficient and recovers around 95% of the mononuclear cells present in the original blood sample (Ito and Shinomiya, 2001; Lehner and Holter, 2002).

Figure 2 - Schematic diagram of the separation of the components of a blood sample from Ficoll® Paque Plus density gradient medium.

Since monocytes are the only circulating blood cells to show high expression of CD14 on their membrane, this molecule is widely used as a biomarker for monocytes and as a target for their purification (Patel et al., 2017). Another distinct characteristic of monocytes is the ability to adhere to inert surfaces like plastic, different from other cells present in the PBMC fraction (Patarroyo et al., 1988). Protocols that take advantage of this characteristic usually seed PBMC cells in a plastic flask with the appropriate culture medium (presented in the “Culture Medium” topic) and allow adherence for 2 hours in a humidified incubator. All monocytes will adhere to the culture flask while B and T lymphocytes, NK cells, and DCs will remain non-adherent and can be eliminated as floating cells.

Another system to isolate monocytes is the use of magnetic beads coated with specific antibodies. Such magnetic bead-based cell isolation methodology can be performed using both a positive or a negative selection approach. In a negative selection approach using the Dynabeads™ Untouched™ Human Monocytes Kit, for example, (Invitrogen, Norway, Catalog number: 11350D), a mixture of biotinylated monoclonal antibodies, each one of them specific against a distinct surface cell marker [anti-CD3 (a typical T lymphocyte antigen), anti-CD7 (a typical T- and NK-lymphocyte antigen), anti-CD16a and anti-CD16b (typical antigens expressed in T lymphocytes, DCs, NK cells, macrophages and granulocytes), anti-CD19 (expressed in B lymphocytes), anti-CD56 (a NK cell surface molecule), anti-CDw123 (a typical plasmacytoid DCs antigen) and anti-CD235a (a typical antigen expressed in erythrocytes and stem cell precursors)] is added to the sample. After that, beads coupled with streptavidin are added. Of note, these beads act as superparamagnetic particles, meaning that they exhibit magnetic properties when placed in a magnetic field. After a short incubation period, the streptavidin-beads will bind to the biotinylated-antibody-labeled cells. A magnet is applied to the sample and the cells linked to the biotinylated-antibody-streptavidin-beads will be attracted and will be immobilized by the magnet whereas cells not linked to any of these antibodies will be free in the supernatant and can be washed out and collected. Since the mixture of antibodies encompasses specificities against all PBMCs, but not against monocytes, this system will capture all non-monocyte cells. Importantly, no binding will occur

between antibodies and monocytes, and therefore the isolated cells will be recovered after a relatively mild handling, without any activation mediated by antibodies.

Conversely, using a positive selection approach with anti-human CD14 MicroBeads from Miltenyi Biotec, Germany, (Catalog number: 130-050-201), for example, the cell sample is incubated with an anti-CD14 antibody bound to a magnetic bead. During this incubation period, the anti-CD14 antibody binds to the CD14-positive cells present in the sample and the cell suspension is loaded onto a column which contains a magnet that induces a high-gradient magnetic field. Thus, the magnetically labeled CD14-positive cells are retained within the column and the unlabeled cells run through. After removing the column from the magnetic field, the magnetically retained CD14-positive cells are eluted. It is worthy of note that the CD14 molecule belongs to the lipopolysaccharide (LPS) receptor complex. Recognition through this receptor is interpreted by the cell as a “danger signal” (Joffre et al., 2009) capable of inducing a maturation process on immature DCs (more details in “Activation of Immature Dendritic Cell”). However, according to the manufacturer, the binding of an antibody to CD14 does not trigger signal transduction since CD14 alone lacks a cytoplasmic domain. (Akira and Takeda, 2004; Liew et al., 2005; Napolitani et al., 2005). The advantages of using magnetic selection are high purity (>95%) and speed (Delirez et al., 2013).

Another technical alternative for cell separation involves flow cytometry. Fluorescent antibody-based cell sorting is a specialized type of flow cytometry used in the isolation of a specific cell type from a heterogeneous mixture of cells. The use of specific antibodies labeled with distinct fluorochromes allied to data about cell size and complexity allows the sorting of cells based on the presence or absence of specific molecules on its surface. Moreover, this technique is the only one capable of distinguishing and separating cells with different levels of expression of a given molecule within a population. Thus, through flow cytometry it is possible, for example, to isolate CD14^{high}CD16⁻ cells from a complex sample like total PBMCs, in a single procedure. As a consequence, cells will be subjected to less handling and, therefore, will be exposed to less stress. In this sense, when the objective is the isolation of a cell population defined by multiple simultaneous features (meaning the presence/absence of several surface markers in distinct expression intensities)

cell sorter flow cytometry is the technique of choice. However, drawbacks of this technique include the high cost of both the equipment and the accessories needed to ensure operator biosafety due to aerosols formed during sorting (Holmes et al., 2014).

4. Cytokines and DCs general features

Sallusto and Lanzavecchia (Sallusto and Lanzavecchia, 1994) first achieved *in vitro* MDDC generation through medium supplementation with distinct cytokines, in this case, through the combined use of IL-4 and GM-CSF. In the following years, several works characterized different protocols concerning the use of distinct cytokines in order to induce and support *in vitro* monocyte differentiation and maturation in MDDCs. It is of crucial importance to note that different combinations of cytokines will generate MDDCs with distinct characteristics and functions, so we should choose the cytokines that best match the purpose of the work. The cytokines most frequently used for *in vitro* MDDC differentiation and the main characteristics of the generated DCs will be briefly reviewed in the next paragraphs.

Sallusto and Lanzavecchia used the combination of IL-4 and GM-CSF to promote the differentiation of monocytes into DCs. GM-CSF growth factor seems to down-regulate the expression of the macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) receptor on monocytes, thereby inhibiting M-CSF-induced differentiation of monocytes into macrophages (Suzuki et al., 2004). Similarly, IL-4 exerts its actions in monocytes differentiation by inhibiting macrophage colony formation (Jansen et al., 1989; Relloso et al., 2002). Reports also suggest that IL-4 can activate some properties of monocytes and up-regulate MHC class-II molecules, Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN) and co-stimulatory molecules, and down-regulate CD14 (Ruppert et al., 1991; Ulanova et al., 2001; Relloso et al., 2002; Sander et al., 2017). The DC generated by this protocol, after seven days in culture, show a typical dendritic morphology. The phenotype of this DC is characterized by high membrane expression of MHC class I and class II molecules, CD1a, CD1b, CD1c, FcγRII, ICAM-1, CD11b, CD11c, CD40, B7, and CD33. In this work, DCs were also positive for Ii, LFA-1, LFA-3, and CD44. The expression of CD14 was either low or negative and these DCs were also negative for FcγRI and FcγRIII. They also presented a high capacity to stimulate allogeneic and

autologous T cells and a unique ability to stimulate naive T lymphocytes, being efficient at presenting soluble antigens (tetanus toxoid) to a specific T cell (Sallusto and Lanzavecchia, 1994).

Sanarico and colleagues (Sanarico et al., 2006), described another methodology for inducing differentiation of MDDCs *in vitro* using GM-CSF, IL-4, and IL-2. The DCs described by this group show the same morphology and phenotype of the DCs generated in the presence of GM-CSF and IL-4. After LPS stimulation, it was observed that there was an up-regulation of activation markers such as human leukocyte antigen (HLA)-ABC, HLA-DR, CD80, CD86, and CD83 but not CD25 (the IL-2 receptor subunit). However, some differences were observed regarding the DCs generated with GM-CSF and IL-4 only, such as a significantly higher secretion of IL-1 β , Tumor Necrosis Factor (TNF) - α , and IL-12p70 in response to LPS stimulation. They also demonstrated the capacity to induce high interferon (IFN) γ secretion by allogeneic naïve T cells (Sanarico et al., 2006).

Geissmann and coworkers developed a protocol for generating Langerhans cells (LC) *in vitro*, which are specific DCs found on the human skin (Perussia et al., 1985; Geissmann et al., 1998). They added GM-CSF, IL-4, and transforming growth factor (TGF) β to monocyte culture. The predominant TGF- β isoform expressed in the immune system, TGF- β 1, regulates cell differentiation and survival during Langerhans cell development (Bauer et al., 2012; Esebanmen and Langridge, 2017).

TGF- β also induces immature DCs to present an immunosuppressive phenotype thereby ensuring system homeostasis by downregulating the function of these cells (Li et al., 2006; Travis and Sheppard, 2014; Esebanmen and Langridge, 2017). The Langerhans cells generated by this protocol, in an immature state, exhibit Birbeck granules and express CD1a, E-cadherin, and CLA, but do not express CD83 and CD86.

However, the addition of TNF- α and IL-1 induces HLA class II, CD83, and CD86 expression and the loss of E-cadherin expression. These cells are also highly efficient in stimulating the proliferation of allogeneous lymphocytes (Geissmann et al., 1998).

A different combination of cytokines was used to produce MDDC by Takahashi et al. (Takahashi et al., 1997). A combination of GM-CSF and IL-7 gave rise to floating cells with typical DC morphology and some adherent cells developed the appearance of Langerhans cell-like dendrites. The typical DC presents a membrane phenotype with high expression of MHC class I and class II, CD1a, CD11c, CD23, CD40, CD54,

CD58, CD80, CD86, and CD95, and decreased CD14 expression (very low or absent). DCs induced by this protocol are also positive for CD21, weakly positive for CD32, and negative for CD16. Compared to PBMCs, the DCs generated by this protocol, also called G7 DC by the authors, are more effective in stimulating autologous and allogeneic T cell proliferation. G7 DCs are more effective in inducing peptide-specific CTL activity than the DCs generated with GM-CSF and IL-4 (Takahashi et al., 1997). The role of IL-7 in monocyte differentiation in DCs is not fully elucidated. Studies on IL-7R $\alpha^{-/-}$ and IL-7 $^{-/-}$ mice demonstrated that IL-7 may play an important role in the development of DCs and plasmacytoid dendritic cells (pDCs) but further investigations are required (Yang et al., 2005; Vogt et al., 2009).

Two different groups used the combination of GM-CSF and IFN- α to generate MDDC *in vitro* (Santini et al., 2000; Mohty et al., 2003). In both cases, the DCs generated with GM-CSF and IFN- α exhibited a typical DC morphology and show an immature phenotype which demonstrates, after exposure to maturation stimulus (CD40L or LPS), up-regulated expression of co-stimulatory molecules CD40, CD80, CD86, and high expression of CD83, HLA-DR, and MHC class I. The prominent ability of these DCs to secrete IFN- α suggests an ability to promote a Th1 response. Mohty and colleagues also measured the expression of CD1a, blood dendritic cell antigen (BDCA) -4, CD54, CD58, and DC lysosome-associated membrane protein (DC-LAMP) on MDDC, which showed an increase in expression after the maturation stimulus with CD40L for 2 days. The DCs generated by Mohty and colleagues (called as IFN-DCs by the authors) differentially secreted, depending on their maturation stage, large amounts of inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , and especially IL-18 (which could be detected at both maturational stages). However, these cells did not secrete IL-12p70. In the immature state, IFN-DCs induced a potent autologous antigen-specific immune response. Like the natural type I IFN-producing plasmacytoid DCs, the IFN-DCs expressed a several Toll-like receptors (TLR) including TLR7 and could secrete IFN- α following viral stimulation or TLR7-specific stimulation (Ito et al., 2002; Mohty et al., 2003; Liu, 2005).

Santini and coworkers observed that, in response to type I IFN (IFN- α , IFN- α 2b and IFN- β) and GM-CSF treatment, adherent monocytes became nonadherent cells within three days of culture. The loss of adherence was associated with cellular aggregation in large cell clusters. However, a considerable percentage of the cells

underwent apoptosis after five days in culture, and it is important to note that TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors (R1 and R2) were upregulated in response to LPS stimulus (Wang and El-Deiry, 2003). The DCs obtained by Santini and coworkers showed a stronger capability to stimulate the proliferation of allogeneic lymphocytes than DCs generated with GM-CSF and IL-4. In particular, DCs generated in the presence of type I IFN and GM-CSF showed a potent ability to take up, process, and present inactivated HIV-1 to autologous T lymphocytes *in vitro* when compared to DCs generated with GM-CSF and IL-4 (Santini et al., 2000; Biron, 2001; Ito et al., 2001).

IL-3 cytokines are also used in association with IFN- β or IL-4 in protocols to produce MDDC. (Buelens et al., 2002; Ebner et al., 2002). DCs generated by these protocols acquire a dendritic morphology and show similarities in phenotype. The expression of CD14 molecules is low or absent, but high levels of BDCA-4, and CD11c are found when compared to DCs generated with GM-CSF and IL-4. Only CD1a was differentially expressed, either at low levels or not at all. After a maturation stimulus, DCs upregulated the costimulatory molecules CD40, CD80, CD86, CD83, DC-LAMP, HLA-DR, and MHC class I (Biron, 2001; Buelens et al., 2002; Ebner et al., 2002).

The IL-15 cytokine is used in two different protocols to generate MDDC *in vitro* (Mohamadzadeh et al., 2001; Saikh et al., 2001). Saikh and colleagues use only IL-15 to promote monocyte differentiation into DC. The DCs generated by Saikh and colleagues show surface levels of the costimulatory molecules CD86, CD80, CD40, and CD83 that were equivalent to DC obtained from cultures of monocytes treated with GM-CSF plus IL-4 and stimulated with TNF- α . However, the DCs generated with IL-15 did not express CD1a. Another important feature of Saikh's DCs is the ability to stimulate strong allo-responses and produce significant amounts of IFN- γ and IL-12 when compared to DCs generated with GM-CSF plus IL-4 and stimulated with TNF- α (Saikh et al., 2001; Dubois et al., 2002; Dubois et al., 2005).

Mohamadzadeh's group differentiated monocytes in the presence of IL-15 plus GM-CSF (Mohamadzadeh et al., 2001). The resulting cells, after six days in culture, had a phenotype positive for CD1a molecule, negative for CD14, and an increased in surface expression of HLA-DR, CD40, CD80, CD86, and CD83. The intracellular expression of DC-LAMP was observed upon LPS activation. The interesting features about this DC are the expression of Langerhans cell markers such as E-Cadherin,

Langerin, and chemokine receptor (CCR) 6. Nevertheless, they do not express Birbeck granules like a “genuine” Langerhans cell (Mohamadzadeh et al., 2001; Dubois et al., 2002; Dubois et al., 2005).

TNF- α is used together with GM-CSF by Iwamoto and coworkers to induce the differentiation of monocytes into DCs (called TNF-DC by the authors), (Iwamoto et al., 2007). The culture of CD14⁺ monocytes was incubated for seven days in the presence of GM-CSF and TNF- α , inducing a spindle-shaped and adherent morphology. Two days after LPS stimulation, they began to convert to DC-like floating cells with extended dendrites. The TNF-DC expressed low levels of CD14 and substantial levels of HLA-DR, CD40, CD70, CD80, CD86, and CD83, and produced extremely large amounts of TNF (>150 ng/ml at peak). They also produce IL-12/IL-23p40 and IL-23p19/p40, but very little IL-12p70 compared to DC generated with IL-4 and GM-CSF. The TNF-DC had the capacity to induce naïve CD4 T cells to produce IFN- γ and TNF- α and stimulated resting CD4 T cells to secrete IL-17 when compared to DC generated with IL-4 and GM-CSF (Chomarat et al., 2003; Wajant et al., 2003; Iwamoto et al., 2007; Brenner et al., 2015). The table 2 presents a summary of the cytokines, growth factors and maturation inducing substances used by the different groups described above.

Table 2- Combination of cytokines, growth factors and maturation stimulus for MDDC culture *in vitro*.

5. Culture Medium

The importance of the culture medium in the *in vitro* induction of DCs is undeniable since it should provide a suitable environment (an appropriate pH and all the necessary nutrients and factors) for cell maintenance, growth, and differentiation. There are many different culture media described and used in the extensive literature on MDDC. To make the best choice, it is necessary to consider the general and specific objectives of the experiments, as well to take into consideration the cost of the different supplements to be used (Duperrier et al., 2000; Peng et al., 2005; Janetzki et al., 2010).

If the main objective encompasses the clinical (therapeutic grade) use of the MDDCs generated *in vitro*, such as vaccines, the only Food and Drug Administration (FDA) approved culture medium is the AIM-V (GIBCO, Catalog number: 087-0112DK). The complete AIM-V composition is not informed by the manufacturer (GIBCO), although the manufacturer provides some important information (in this sense, it is reported that this medium does not contain serum but contains L-glutamine and antibiotics - 50 µg/mL streptomycin sulfate and 10 µg/mL gentamicin sulfate).

For research purposes, PromoCell, for example, offers three different medium types: DC Generation Medium (Catalog number: C-28050), DC Generation Medium DXF (Catalog number: C-28052), and Monocyte Attachment Medium (Catalog number: C-28051). As in the previous example, the complete composition is not disclosed. The only information available states that the DC Generation Medium DXF is free from animal-derived components, although it contains human serum albumin. An important point, according to the manufacturer, is that the Monocyte Attachment Medium allows an efficient selection of monocytes from freshly isolated mononuclear cells through differential adherence and immunomagnetic purification steps. For all media, supplementation with growth factors and cytokines is needed (Challagundla et al., 2015).

Another culture medium used to generate MDDC for research purposes is X-VIVO 15. The complete composition is not reported by the manufacturer (LONZA), so the only information available is that it is chemically defined and serum-free. There are versions with or without L-glutamine, gentamicin, recombinant transferrin and phenol red. As previously stated, all media requires cytokine and growth factor supplementation, depending on the specific goal of the experiment and the initial cell source.

A commonly used medium in cell culture experiments is RPMI-1640. It was developed by Moore and colleagues at the Roswell Park Memorial Institute, hence the acronym RPMI (Moore et al., 1967). The exact RPMI-1640 composition is available and well established, which allows the production of quite similar media by several manufacturers. There are several modified versions of RPMI, some of them lacking specific components, others already supplemented with certain

growth factors or other molecules. Nevertheless, as a general rule, supplementation with serum, cytokines, and/or growth factors is required.

6. Supplements for the Culture Medium

The widely used culture medium RPMI-1640 is also the only commercial medium for which the complete formula is available. This enables each researcher to direct the supplementation specifically according to the particularities of each experiment. The most commonly used culture medium supplements (biological or chemical factors) for *in vitro* production of MDDCs will be briefly presented below.

An essential function of culture medium consists in providing cells an environment with a physiological pH, and thus, buffering agents are essential. Sodium bicarbonate (NaHCO_3) is a commonly used pH regulating agent, since it can be used in cell culture without increased toxicity to the cells. Sodium bicarbonate chemically reacts either as acid or as a base due to its amphoteric characteristic. In solution, sodium bicarbonate produces bicarbonate ions, while the metabolism of cells in culture produces carbon dioxide (CO_2), decreasing the culture medium pH (if the culture medium contains phenol red, the color of the medium will become yellowish). In addition, the incubator also injects carbon dioxide into its atmosphere, thereby increasing the carbon dioxide concentration in the microenvironment and lowering the culture medium pH. Thus, within the incubator microenvironment, a sodium bicarbonate-carbon dioxide buffer balance is established. The carbon dioxide dissolved in the culture medium, either from the incubator or from the cell metabolism, equilibrates with the bicarbonate ions, buffering the medium. The sodium bicarbonate concentration in the medium should be in equilibrium with the carbon dioxide level in the incubator atmosphere. Thus, for media containing 1.5–2.2 G/L of sodium bicarbonate, the incubator must inject 5% of carbon dioxide into its microenvironment. For media containing 3.7 G/L of sodium bicarbonate, the incubator should inject 10% of carbon dioxide. If the sodium bicarbonate concentration is too high in relation to the carbon dioxide level injected by the incubator, the culture medium will alkalize, and its color will turn pink (Barker, 1998).

HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) is a buffer agent which is membrane impermeable, chemically and enzymatically stable, demonstrates a limited effect on biochemical reactions, and has very low visible and UV light absorbance. HEPES provides extra buffering capacity when cell cultures require extended periods of manipulation outside of a CO₂ incubator. The HEPES concentration in cell culture media may vary from 10 mM to 25 mM. Although HEPES-buffered medium exposed to fluorescent light was shown to be cytotoxic, due to the formation of free radicals, this effect is preventable by manipulating the cells under light-shielded conditions.

Serum is a quite ubiquitous supplement in cell cultures. This component will supply mainly growth factors and cytokines to the cells, although generally it is not possible to define the exact types and concentrations of these components in the serum. Many studies use human serum from an AB serum pool to supplement cell cultures. The final concentrations of serum used vary from 1 - 10%. It is also possible to use plasma or even umbilical cord blood serum. Nevertheless, if the cells will not be used in clinical applications, fetal bovine serum is the least expensive choice, and is also easier to obtain. However, it is crucial to observe if the serum was inactivated. This inactivation is necessary due to the presence of proteins from the complement system which could cause cell death (Anton et al., 1998).

Although cell culture procedures are conducted in aseptic environments, any biological contaminant can devastate the cell culture, and therefore the use of antibiotics and antimycotics is sometimes required. The most common antibiotics used in cell cultures are penicillin-streptomycin and gentamicin. Penicillin-streptomycin acts on Gram-positive and Gram-negative bacteria whereas gentamicin is also active against mycoplasma. The recommended concentration for use in cell culture for Penicillin-streptomycin are 50 to 100 I.U./mL penicillin and 50 to 100 µg/mL streptomycin (Catalog number :ATCC® 30-2300), and 5 to 50 µg/mL gentamicin (Barker, 1998). In culturing cells that are intended for clinical use, the FDA does not recommend the use of penicillin or β-lactams due to the possibility of severe hypersensitivity reactions (Vatsan et al., 2013).

A widely used antifungal agent is amphotericin B. It acts against both fungi and yeasts. The recommended concentration for use in cell culture is 0.25-2.5 µg/mL (GIBCO, Catalog number: 15290026).

A component often added to culture medium is the amino acid glutamine. This amino acid can lead to citrate production, which is exported to the DC's cytoplasm and acts as a substrate for fatty acids synthesis, an essential process for the induction of DC activation by TLR ligands. Due to its rapid degradation and instability in solution, glutamine supplementation must be performed after careful consideration. The recommended concentration for use in cell culture generally falls in the range of 2-6 mM (GIBCO, Catalog number: 21051024).

Free radicals are a natural side product of the increased metabolism in monocytes and in immature DCs during differentiation and maturation. To avoid the toxic effects of the accumulation of these reactive oxygen species in the culture medium, 2-mercaptoethanol (2-ME) is used as a reducing agent. Due to its instability in solution, 2-mercaptoethanol should be added daily. It is recommended to dilute 2-ME to 50 mM in phosphate-buffered saline (PBS), and add this solution to the cell medium at a final concentration of 50 μ M. (GIBCO, Catalog Number: 21985023), (Click, 2014).

7. Culture Time

The time needed to establish a cell line or to induce cell differentiation *in vitro* is quite variable, and several aspects should be taken into consideration. The majority of studies consider that the differentiation process from monocyte to immature DC is completed in five days with an additional period of 48 hours for maturation. However, several works have been demonstrated that *in vitro* development of mature DCs from monocyte precursors does not require more than 2 days of culture, defined by some as fast DCs (fDC), (Dauer et al., 2003; Obermaier et al., 2003; Ramadan et al., 2004; Massa and Seliger, 2013). The data about phenotypic characteristics, immune properties, and the pattern of responses induced for the fDC are still poorly understood (Tanaka et al., 2006; Rojas-Canales et al., 2012; Pavlović et al., 2015).

8. *In vitro* maturation of Immature Dendritic Cell

In the majority of MDDCs generation protocols, the resulting DCs are in an immature state. An immature dendritic cell (iDC) shows a high capacity to capture and process antigens but has limited capacity to stimulate T cells due to the low expression of the co-stimulatory molecules CD40, CD80, CD86, and HLA-class II. The *in vitro* maturation process is characterized by several events and although different groups may define distinct features, the main events include the downregulation of endocytic/phagocytic receptors, the upregulation of costimulatory molecules CD40, CD80 and CD86, the upregulation of CD58 and CD83, the shift in lysosomal compartments with downregulation of CD68, the upregulation of DC-LAMP, and the changes in HLA-class II molecules (Banchereau et al., 2000; Lutz and Schuler, 2002; Iwasaki and Medzhitov, 2004).

Some important morphological changes also occur during the DC *in vitro* maturation process, including the loss of adhesive structures, cytoskeleton reorganization, and the acquisition of high cellular motility (see table 3). These changes allow the DCs a better capacity for lymphocyte stimulation (Banchereau et al., 2000; Dalod et al., 2014).

Table 3-Characteristics of DCs according to different maturation stages.

To induce the DC maturation process *in vitro* it is necessary to give a stimulus that mimics a danger signal (Matzinger., 1994; Gallucci et al., 1999; Joffre et al., 2009; Castiello et al., 2011). It is important to note that in a seven day protocol for MDDC generation, the stimulus is usually given on day 5 and is maintained for 48 hours. In the case of fDCs, the differentiation cocktail already contains substances that will induce cell maturation. The main substances used to promote DC maturation in MDDC cultures are described below (Haenssle et al., 2008; Castiello et al., 2011; Li et al., 2012).

A common substance used to mimic DC activation when provoked by bacteria is LPS, a characteristic component of the wall of Gram-negative bacteria (Raetz and Whitfield, 2002). The LPS molecule is bound by the CD14 molecule present on the cell surface and activates the TLR4/MD-2 complex pathway, promoting the

secretion of pro-inflammatory cytokines by DCs (Iwasaki and Medzhitov, 2004; Park and Lee, 2013). Nevertheless, due to its potential toxicity, LPS is only used in research protocols. The majority of protocols aiming for DC maturation use LPS in a concentration range of 10 nG/mL to 10 µG/mL (InvivoGen, Catalog code: tlrl-eklps).

Flagellin is another substance that mimics the danger signal triggered by the presence of Gram-negative and/or Gram-positive bacteria. Flagellin is generally detected by TLR5 whereas intracellular flagellin is detected by NOD-like receptors (NLRs) NLRC4 and NAIP5. The process of DC maturation induced by flagellin results in the activation of the NF-κB signaling pathway and cytokine production (Akira et al., 2001; Vicente-Suarez et al., 2009; Miao and Warren, 2010). It was already been suggested that flagellin could be used as a vaccine adjuvant (Coffman et al., 2010). As in the previous case of LPS use, the flagellin concentrations used in DC maturation protocols widely vary, ranging from 10 nG/mL to 10 µG/mL (Vicente-Suarez et al., 2009), (InvivoGen, Catalog code:tlrl-stfla).

To mimic virus-mediated activation during DC maturation it is possible to use commercially available synthetic polynucleotide sequences such as the double stranded RNA analog polyinosinic-polycytidylic acid [poly(I:C)], the single-stranded RNA analog poly-uridine (polyU), or the single-stranded RNA analog guanosine- and uridine-rich (GU-rich). Whereas poly(I:C) binds to TLR3, the remaining two types of sequences bind to TLR7/TLR8 (Heil et al., 2004; Schlee and Hartmann, 2016). Alternatively, the use of compounds derived from imidazoquinoline such as the analog imiquimod can be used to activate immature DCs. Imiquimod is a commercially available compound which selectively binds to TLR7 (Xiao et al., 2016). Poly(I:C) and imiquimod are also used as adjuvants in protocols to develop cancer vaccines (Coffman et al., 2010), (InvivoGen, Catalog code: vac-pic).

Short synthetic single-stranded DNA molecules that contain unmethylated CpG dinucleotides (CpG) are also used as TLR9 agonists to activate iDCs (Jakob et al., 1998; Hemmi et al., 2000; Akira et al., 2001; Iwasaki and Medzhitov, 2004). A modified version of CpGs called CpG-ODN has been developed for clinical use as an adjuvant (Cella et al., 1999; Bauer et al., 2001; Coffman et al., 2010).

The CD40 is a costimulatory molecule expressed on DCs and the interaction with its ligand CD40L (CD154) leads to an activation of the NF-κB signaling pathway, a key transducer of inflammatory signals in DCs (Schulz et al., 2000; Aggarwal, 2003;

O'Sullivan and Thomas, 2003; Ma and Clark, 2009). Transfected cells expressing the CD40L protein can be used in co-culture assays to induce the maturation of iDCs (Buelens, C., et al., 2002; Mohty, M., et al., 2003), whereas, to promote DC activation via CD40 receptor, some commercial alternatives are available. For example, CD40L recombinant protein, which should be used in conjunction with an enhancer for better performance, is already available ([Enzo Life Sciences](#), Catalog number: ALX-850-064).

Interleukins and several other molecules can concomitantly be used to induce DC maturation. A “maturation cocktail” can, for example, contain IL-6, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , and Prostaglandin E2 (PGE2), (Jonuleit et al., 1997). In the cited case, this cocktail enhances the pro-inflammatory effects of TNF- α by creating an inflammatory environment that induces DC maturation. This cocktail generates mature DCs that strongly stimulate the proliferation of allogeneic lymphocytes (Castiello et al., 2011).

9. Typical MDDC Immunophenotype Markers

The phenotype characterization of the obtained DCs is crucial to demonstrate the success of the MDDC differentiation. However, due to the absence of a consensus concerning which molecules characterize a DC and which markers are expressed in different DC subsets, it is quite common to find a wide variety of markers used in distinct studies. Nevertheless, the expression of certain molecules is consistently used to indicate successful MDDC differentiation and/or maturation. For example, since a peripheral blood monocyte, the main source for *in vitro* DC generation, expresses high levels of CD14 on its membrane, and MDDC lacks the expression of this same molecule, CD14 is a marker for DC differentiation. Additionally, to determine the success of the iDC maturation process, it is essential to monitor the increased expression of co-stimulatory molecules such as CD40, CD80, and CD86. These molecules are constitutively expressed at low levels in DCs, however, their expression can be considerably increased after induction of maturation by LPS (Banchereau et al., 2000; Ueno et al., 2007).

The HLA-II molecule is also constitutively expressed at low levels both in monocytes and DCs. After a maturation stimulus, its expression on DCs is increased.

Thus, like co-stimulatory molecules, HLA-II can be used as an indicator of the success of the iDC maturation process (Al-daccak et al., 2004; Neeffjes et al., 2011).

CD1 represents a group of antigen-presenting molecules which are responsible for the presentation of lipid antigens and their derivatives. There are five isoforms of CD1 proteins [CD1a, CD1b, CD1c, CD1e (group 1) and CD1d (group 2)]. Myeloid DCs express all five proteins whereas Langerhans cells express only CD1a and CD1e (Mori et al., 2016). In blood monocytes, CD1a, CD1b, and CD1c (BDCA-1) can be upregulated on the cell surface by cytokine cocktails designed to drive DC differentiation *in vitro* (Moody., 2006).

A strategy for characterizing a pDC, for example, would encompass the measurement of the CD123 (IL-3R α), CD303 (BDCA-2), and CD304 (BDCA-4) expression levels. This strategy depends on the fact that pDCs present high expression of such molecules in the membrane (Dzionek et al., 2000; Colonna et al., 2004; Swiecki and Colonna, 2015).

Other potential markers are CD207 (Langerin), which is used to characterize Langerhans cells (Merad et al., 2008; Nestle et al., 2009), and CD209 (DC-SIGN), which is expressed on pDCs and MDDCs and is highly expressed on DCs in mucosal tissues. The expression of this last marker is increased after LPS-mediated DC maturation induction (Belz and Nutt, 2012).

Finally, in the analyses performed by flow cytometry it is of great importance to evaluate the cellular viability. Substances used to determine cell viability can be divided into two broad groups: substances used in live cells or fixed cells. Calcein AM (BD Biosciences, Catalog Number 564061) is a dye used for staining live cells. The hydrophobicity of the acetomethoxy (AM) derivative of Calcein allows this dye to enter on viable cells. Once inside, intracellular esterases cleave the AM groups off allowing Calcein to fluoresce within the cell. Only viable cells are stained, since dead cells lack esterase activity. Calcein AM is optimally excited at the 495 nm wavelength of light and emits maximally at 515 nm (Chung et al., 2017).

7-Amino-actinomycin D, or 7-AAD, is a nucleic acid dye used to indicate cell viability in flow cytometric assays. The fluorescence is detected in the far red range of the spectrum with a 650 nm long-pass filter (Schmid et al., 1992).

For fixed cells, an alternative may be the reagents BD Horizon FVS from BD Biosciences (Catalog Number 564406). BD Horizon FVS are amine-reactive dyes

used to discriminate viable from non-viable cells based on fluorescence intensity. These dyes react by covalently binding the cell surface and intracellular amines, resulting in live cells poorly stained and cells with permeable membranes exhibiting highly fluorescent. Typically, dead cells exhibit a fluorescence intensity 10 to 20-fold greater than live cells stained with the same amount of dye. The advantage of these dyes is that they can be used in cells fixed with formaldehyde, and can be used in protocols where cell permeabilization occurs (Mahalingaiah et al., 2018).

10. Conclusion

Despite several technical challenges, significant progress has been made in recent years concerning the generation of human DCs *in vitro*. Much of the recently acquired knowledge was due to studies using blood monocytes as *in vitro* precursors of DCs. The incorporation of knowledge concerning cellular biology, cytokines, growth factors, transcription profiles of these cells in different stages of maturation with the characterization of the patterns of expression of surface markers has allowed a more comprehensive and accurate description of the DCs present in distinct tissues both in pathological as well as in healthy situations.

The appropriate combination of cytokines and growth factors that will generate MDDCs with the most suitable characteristics for a given study is already possible. The development of protocols that allow us to differentiate MDDCs into a particular DC subtype as well as to simulate pathological microenvironments is a reality that has not only broadened our knowledge but also allows us to manipulate these cells for use in clinical protocols. The increasing amounts of reagents available to induce maturation of iDCs via a specific receptor also contributes to the production of DCs with specific characteristics, membrane markers, specific profile of cytokine secretion, or a given lymphocyte polarization state.

Another important advance in the study of MDDCs was the use of multiparametric flow cytometry (Hasan et al., 2015). The careful selection of antibodies and the optimal combination of the fluorochromes used to label such specific reagents are key steps in the establishment of a robust panel to analyze MDDCs (Maecker et al., 2004; Byrd et al, 2015). To succeed in this step, several companies provide specific programs to help set up the analysis panels and

protocols to identify the different DC subtypes. International consortia have also been working for the increased standardization of flow cytometry protocols including the EuroFlowConsortium, the Human Immunology Project Consortium (HIPC), the European Network for Translational Immunology Research and Education (ENTIRE) and the Association for Cancer Immunotherapy (CIMT).

Great progress has been made in the understanding of the development, differentiation, and function of DCs. However, the major challenge will be to transpose the acquired knowledge into *in vivo* situations to elucidate the DCs physiological behavior. This knowledge will be useful in the design of novel vaccines and DC-based immunotherapies for the prevention and treatment of several human diseases.

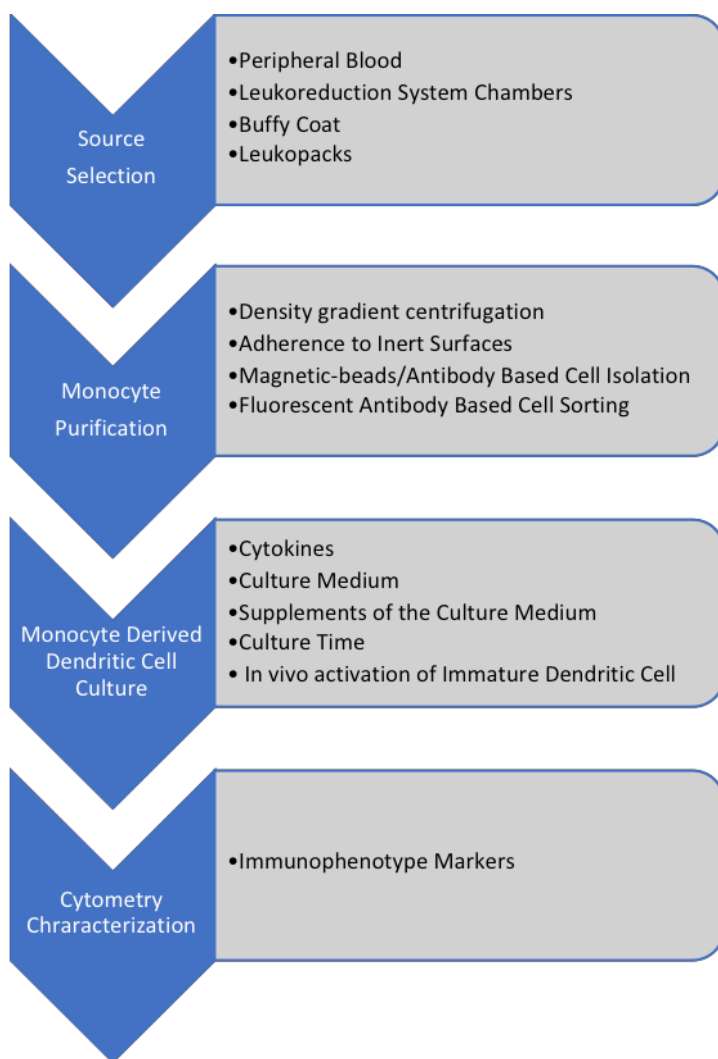


Figure 1 - Scheme of the steps of MDDC culture.

Table 1- Percentage of cells in whole blood and blood products in health individuals.

	Whole blood (%)	Buffy coat (%)	LRSC (%)	Leukopak (%)
CD4 ⁺ T cells	22.5	24.4	32.39	31,92
CD8 ⁺ T cells	6.8	10.8	15.04	17.13
B cells	5.2	7.2	11.33	12.52
Monocytes	8.4	10.7	20.28	19.08
NK cells	4.4	4.1	10.21	7.65
Eosinophils	3.2	1.3	1.88	1.07
Neutrophils	53.8	34.4	2.89	3.91
PBMC	2x10 ⁶ cells/mL	1x10 ⁹ cells	1x10 ⁹ cells	7x10 ⁹ cells/half

LRSC: Leukoreduction System Chamber. NK: Natural Killer. PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells. Modified from: <https://www.miltenyibiotec.com/US-en/resources/mac-handbook/human-cells-and-organs/human-cell-sources/blood-human.html>

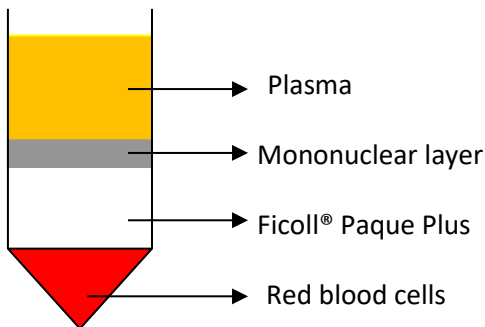


Figure 2 - Schematic diagram of the separation of the components of a blood sample from Ficoll® Paque Plus density gradient medium.

Table 2- Combination of cytokines, grown factors and maturation stimulus for MDDC culture *in vitro*.

Cytokines	Concentration	Time to add cytokines	Stimulus for maturation	Maturation stimulus added at	Stimulation period	Total culture time	Referencies
GM-CSF + IL-4	50 ng/mL ¹⁺ 1000 U/mL ¹	1 ^o day	TNF- α (10 ng/mL) ² CD40L ³	Not mentioned	24 hours 24 hours	Seven days	Sallusto and Lanzavecchia, 1994
GM-CSF + IL-7	600 U/mL ⁴⁺ 6 U/mL ⁵	1 ^o day	Not mentioned	Not mentioned	Not mentioned	Seven days	Takahashi et al., 1997
GM-CSF + IL-4 + TGF- β 1	250 nG/mL ⁶⁺ 100 nG/mL ⁷⁺ 10 nG/mL ⁸	1 ^o day ⁹	TNF- α ¹⁰ + IL-1 ¹⁰	Not mentioned	Not mentioned	Seven days	Geissmann et al., 1998
GM-CSF + IFN- α	500 U/mL ¹¹⁺ 1000 U/mL ¹²	1 ^o day	LPS (1 μ G/mL) ¹³	3 ^o day	48 hours	Five days	Santini et al., 2000
GM-CSF + IFN- α	100 nG/mL ¹⁴⁺ 500 IU/mL ¹⁵	1 ^o day ¹⁶	LPS (10 μ G/mL) ¹⁷ or Poly(I:C)(15 μ G/mL) ¹⁸ or CD40L ¹⁹	5 ^o day	48 hours	Seven days	Mohty et al., 2003
GM-CSF + IL-15	100 nG/mL ²⁰ 200 nG/mL ²¹	1 ^o day	LPS (100 nG/mL) ²²	Not mentioned	Not mentioned	Six days	Mohamadzadeh et al., 2001.
IL-15	100 nG/mL ²³	1 ^o day	Not mentioned	Not mentioned	Not mentioned	Seven days	Saikh et al., 2001
IL-3 + IL-4	100 U/mL ²⁴ 1000 U/mL ²⁵	1 ^o day	TNF- α (10 nG/mL) ²⁶⁺ IL-1 β (10 nG/mL) ²⁷⁺ IL-6 (1000U/mL) ²⁸⁺ PGE2 (1 μ G/mL) ²⁹	7 ^o day	48 hours	Nine days	Ebner et al., 2002.
IL-3 + IFN- β	50 U/ml ³⁰ 1000 U/ml ³¹	1 ^o day	LPS (1 μ G/mL) ³² or Influenza virus ³² or Poly[I:C](20 μ G/mL) ³³ CD40L ³⁴	Not mentioned	24 hours 24 hours 48 hours 3 days	Six days	Buelens et al., 2002

GM-CSF +	50 nG/mL ³⁵	1 ^o day	LPS (200 nG/mL) ³⁷	5 ^o day	48 hours	Seven days	Sanarico et al., 2006
IL-4 +	10 nG/mL ³⁵	1 ^o day					
IL-2	100 U/mL ³⁶	1 ^o and 5 ^o days					
GM-CSF +	10 nG/mL ³⁸	1 ^o day	LPS (10 µG/mL) ³⁹	Not mentioned	Several time intervals	Seven days	Iwamoto et al., 2007
TNF-α	10 nG/mL ³⁸						

¹ Own lab production. ² Reagent supplied by Dr. Manfred Brockhaus (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland). ³ A soluble chimeric fusion protein between the mouse CD8 α-chain and the human CD40 ligand (CD40L) was a generous gift of Dr. Peter Lane (Basel Institute for Immunology). ⁴ Pepro Tech Inc. (Rocky Hill, NJ) or provided by Prof. Nicos Nicola (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Victoria, Australia). ⁵ Pepro Tech Inc. ⁶ Sandoz AG (Bale, Switzerland). ⁷ Genzyme Corp. (Cambridge, MA). ⁸ R&D Systems, (Minneapolis, MN). ⁹ At days 2 and 4, half of the medium was removed and an equivalent volume of fresh medium, supplemented with GM-CSF, IL-4 and TGF-β1 was added. ¹⁰ Concentrations not mentioned. ¹¹ R&D Systems. ¹² CIFN is a synthetic type I IFN produced from recombinant DNA, whose sequence is based on a consensus derived from the amino acid sequences of the most common types of human IFN- α. (CIFN, specific activity of 10⁹ U/mG protein), Amgen. ¹³ Sigma-Aldrich. ¹⁴ Leucomax, Novartis (Rueil-Malmaison, France). ¹⁵ Introna, Schering-Plough (Levallois-Perret, France). ¹⁶ The medium was replenished with cytokines every 3 days. ¹⁷ LPS from Escherichia coli, serotype O26: B6, Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). ¹⁸ Polyribonucleosinic polyribocytidylic acid- poly(I:C), (Sigma-Aldrich). ¹⁹ Murine L cells transfected with human CD40L were kindly provided by Schering-Plough (Laboratory for Immunological Research, Dardilly, France), used after 75 Gy irradiation (ratio, 1:10). ²⁰ Leukine, Immunex. ²¹ (R&D Systems or Schering-Plough). ²² Sigma-Aldrich. ²³ PeproTech Inc (Rocky Hill, NJ). ²⁴ PeproTech (London, U.K.; sp. act., 10⁷ U/mG). ²⁵ Genzyme (Cambridge, MA; sp. act., 5.10⁷ U/mG). ²⁶ TNF-α (sp. act., 6X10⁷ U/mG) was provided by Dr. G. R. Adolf (Bender, Vienna, Austria). ²⁷ IL-1β (sp. act., 5X10⁸ U/mG), Genzyme. ²⁸ IL-6 (sp. act., 1X10⁷ U/mG), Genzyme. ²⁹ PGE2 (prostine E), Pharmacia & Upjohn (Buurs, Belgium). ³⁰ R&D Systems Europe (Oxon, United Kingdom). ³¹ Ares Serono Europe (London, United Kingdom). ³² Provided by N. Kuehm, Aventis, Pasteur Me´rieux (Val de Reuil, France). ³³ Sigma. ³⁴ DCs were activated by coculture with irradiated 3T6 fibroblasts transfected with the human CD40L gene (CD40L transfectants) (5x10⁴/mL). ³⁵ EuroClone. ³⁶ R&D Systems (Minneapolis, MN). ³⁷ Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). ³⁸ Diaclone Research. ³⁹ LPS from Escherichia coli (L4516), Sigma-Aldrich.



Table 3 – Characteristics of DCs according to different maturation stages. The characteristics described refers to the expression in the plasma membrane.

Immature DC	Mature DC
High intracellular expression of HLA-II	High membrane expression of HLA-II
High endocytic/phagocytic capacity	Low endocytic/phagocytic capacity
High membrane expression of CCR1, CCR5 and CCR6	Low membrane expression of CCR1, CCR5, and CCR6
Low membrane expression of CCR7	High membrane expression of CCR7
Low membrane expression of CD40, CD54 and CD58	High membrane expression of CD40, CD54, and CD58
Absent/low membrane expression of DC-LAMP	High membrane expression of DC-LAMP
Low membrane expression of CD80, CD86 and CD83	High membrane expression of CD80, CD86, and CD83
High membrane expression of CD68	Low membrane expression of CD68
Induce T cell anergy/tolerance	Great capacity to lymphocyte stimulation

References

Aggarwal, B. B., 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 745-756.

Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T., 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 2, 675-680.

Akira, S., Takeda, K., 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499-511.

Al-Daccak, R., Mooney, N., Charron, D., 2004. MHC class II signaling in antigen-presenting cells. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 108-113.

Anton, D., Dabadghao, S., Palucka, K., Holm, G., Yi, Q., 1998. Generation of dendritic cells from peripheral blood adherent cells in medium with human serum. *Scand. J. Immunol.* 47, 116-121.

Ardavin, C., Wu, L., Li, C. L., Shortman, K., 1993. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature.* 362, 761-763.

Association for Cancer Immunotherapy (CIMT). <http://www.cimt.eu/workgroups/cip/proficiency> (Accessed 12 June 2018).

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

Banchereau, J., Palucka, A. K., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Taquet, N., Rolland, A., Taquet, S., Coquery, S., Wittkowski, K. M., Bhardwaj, N., Pineiro, L., Steinman, R., Fay, J., 2001. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 61, 6451-6458.

Barker, K. 1998. *At the Bench: A Laboratory Navigator*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bauer, M., Redecke, V., Ellwart, J. W., Scherer, B., Kremer, J. P., Wagner, H., Lipford, G. B., 2001. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c⁺, CD123⁺ dendritic cells. *J. Immunol.* 166, 5000-5007.

Bauer, T., Zagórska, A., Jurkin, J., Yasmin, N., Köffel, R., Richter, S., Gesslbauer, B., Lemke, G., Strobl, H., 2012. Identification of Axl as a downstream effector of TGF- β 1 during Langerhans cell differentiation and epidermal homeostasis. *J. Exp. Med.* 209, 2033-2047.

Belz, G. T., Nutt, S. L., 2012. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 101-113.

Biron, C. A., 2001. Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity.* 14, 661-664.

Brenner, D., Blaser, H., Mak, T. W., 2015. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 362-374.

Buelens, C., Bartholomé, E. J., Amraoui, Z., Boutriaux, M., Salmon, I., Thielemans, K., Willems, F., Goldman, M., 2002. Interleukin-3 and interferon beta cooperate to induce differentiation of monocytes into dendritic cells with potent helper T-cell stimulatory properties. *Blood.* 99, 993-998.

Byrd, T., Carr, K. D., Norman, J. C., Huye, L., Hegde, M., 2015. Polystyrene microspheres enable 10-color compensation for immunophenotyping of primary human leukocytes. *Cytometry A.* 87, 1038-1046.

Castiello, L., Sabatino, M., Jin, P., Clayberger, C., Marincola, F. M., Krensky, A. M., Stroncek, D. F., 2011. Monocyte-derived DC maturation strategies and related pathways: a transcriptional view. *Cancer. Immunol. Immunother.* 60, 457-466.

Cella, M., Salio, M., Sakakibara, Y., Langen, H., Julkunen, I., Lanzavecchia, A., 2000. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J. Exp. Med.* 189, 821-829.

Challagundla, K. B., Wise, P. M., Neviani, P., Chava, H., Murtadha, M., Xu, T., Kennedy, R., Ivan, C., Zhang, X., Vannini, I., Fanini, F., Amadori, D., Calin, G. A., Hadjidaniel, M., Shimada, H., Jong, A., Seeger, R. C., Asgharzadeh, S., Goldkorn, A., Fabbri, M., 2015. Exosome-mediated transfer of microRNAs within the tumor microenvironment and neuroblastoma resistance to chemotherapy. *J. Natl. Cancer. Inst.* 107.

Chomarat, P., Dantin, C., Bennett, L., Banchereau, J., Palucka, A. K., 2003. TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *J. Immunol.* 171, 2262-2269.

Chung, S., Nguyen, V., Lin, Y.L., Kamen, L., Song, A., 2017. Thaw-and-use target cells pre-labeled with calcein AM for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 447, 37-46.

Click, R. E., 2014. Review: 2-mercaptoethanol alteration of in vitro immune functions of species other than murine. *J. Immunol. Methods.* 402, 1-8.

Coffman, R. L., Sher, A., Seder, R. A., 2010. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity.* 33, 492-503.

Collin, M., Bigley, V., 2018. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*. 154, 3-20.

Colonna, M., Trinchieri, G., Liu, Y. J., 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* 5, 1219-1226.

Dalod, M., Chelbi, R., Malissen, B., Lawrence, T., 2014. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J.* 33, 1104-1116.

Dauer, M., Obermaier, B., Hertel, J., Haerle, C., Pohl, K., Rothenfusser, S., Schnurr, M., Endres, S., Eigler, A., 2003. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol.* 170, 4069-4076.

Delirez, N., Shojaeefar, E., Parvin, P., Asadi, B., 2013. Comparison the effects of two monocyte isolation methods, plastic adherence and magnetic activated cell sorting methods, on phagocytic activity of generated dendritic cells. *Cell J.* 15, 218-223.

Dietz, A. B., Bulur, P. A., Emery, R. L., Winters, J. L., Epps, D. E., Zubair, A. C., Vuk-Pavlović, S., 2006. A novel source of viable peripheral blood mononuclear cells from leukoreduction system chambers. *Transfusion.* 46, 2083-2089.

Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T. A., Tagaya, Y., 2002. IL-15R α recycles and presents IL-15 *In trans* to neighboring cells. *Immunity.* 17, 537-547.

Dubois, S. P., Waldmann, T. A., Müller, J. R., 2005. Survival adjustment of mature dendritic cells by IL-15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8662-8667.

Duperrier, K., Eljaafari, A., Dezutter-Dambuyant, C., Bardin, C., Jacquet, C., Yoneda, K., Schmitt, D., Gebuhrer, L., Rigal, D., 2000. Distinct subsets of dendritic cells resembling dermal DCs can be generated *in vitro* from monocytes, in the presence of different serum supplements. *J Immunol. Methods.* 238, 119-131.

Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D. W., Schmitz, J., 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 165, 6037-6046.

Ebner, S., Neyer, S., Hofer, S., Nussbaumer, W., Romani, N., Heufler, C., 2001. Generation of large numbers of human dendritic cells from whole blood passaged through leukocyte removal filters: an alternative to standard buffy coats. *J. Immunol. Methods.* 252, 93-104.

Ebner, S., Hofer, S., Nguyen, V. A., Fürhapter, C., Herold, M., Fritsch, P., Heufler, C., Romani, N., 2002. A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern. *J. Immunol.* 168, 6199-6207.

Elkord, E., Williams, P. E., Kynaston, H., Rowbottom, A. W., 2005. Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. *Immunology*. 114, 204-212.

European Network for Translational Immunology Research and Education - ENTIRE. http://www.cost.eu/COST_Actions/bmbs/BM0907?parties (accessed 03 May 2018).

Esebanmen, G. E., Langridge, W. H. R., 2017. The role of TGF-beta signaling in dendritic cell tolerance. *Immunol. Res.* 65, 987-994.

EuroFlow. <https://euroflow.org/usr/pub/prlogin.php>. (accessed 03 May 2018).

Gallucci, S., Lolkema, M., Matzinger, P., 1999. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.* 5, 1249-1255.

Gandhi, R. T., Kwon, D. S., Macklin, E. A., Shopis, J. R., McLean, A. P., McBrine, N., Flynn, T., Peter, L., Sbrolla, A., Kaufmann, D. E., Porichis, F., Walker, B. D., Bhardwaj, N., Barouch, D. H., Kavanagh, D. G., 2016. Immunization of HIV-1-Infected Persons With Autologous Dendritic Cells Transfected With mRNA Encoding HIV-1 Gag and Nef: Results of a Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 71, 246-253.

Garg, A. D., Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., Agostinis, P., 2017. Integrating Next-Generation Dendritic Cell Vaccines into the Current Cancer Immunotherapy Landscape. *Trends Immunol.* 38, 577-593.

Geissmann, F., Prost, C., Monnet, J. P., Dy, M., Brousse, N., Hermine, O., 1998. Transforming growth factor beta 1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 187, 961-966.

Gillio-meina, C., Cepinskas, G., Cecchini, E. L., Fraser, D. D., 2013. Translational research in pediatrics II: blood collection, processing, shipping, and storage. *Pediatrics*. 131, 754-766.

Granot, T., Senda, T., Carpenter, D. J., Matsuoka, N., Weiner, J., Gordon, C. L., Miron, M., Kumar, B. V., Griesemer, A., Ho, S. H., Lerner, H., Thome, J. J. C., Connors, T., Reizis, B., Farber, D. L., 2017. Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *Immunity*. 46, 504-515.

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

Haenssle H., Buhl, T., Knudsen, S., Krueger, U., Rosenberger, A., Reich, K., Neumann, C., 2008. CD40 ligation during dendritic cell maturation reduces cell death and prevents interleukin-10-induced regression to macrophage-like monocytes. *Exp. Dermatol.* 17, 177-187.

Hammer, G. E., Ma, A., 2013. Molecular control of steady-state dendritic cell maturation and immune homeostasis. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 743-791.

Hasan, M., Beitz, B., Rouilly, V., Libri, V., Urrutia, A., Duffy, D., Cassard, L., Di Santo, J. P., Mottez, E., Quintana-Murci, L., Albert, M. L., Rogge, L., Milieu Intérieur Consortium., 2015. Semi-automated and standardized cytometric procedures for multi-panel and multi-parametric whole blood immunophenotyping. *Clin. Immunol.* 157, 261-276.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S., 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 303, 1526-1529.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S., 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 408, 740-745.

Holmes, K. L., Fontes. B., Hogarth, P., Konz, R., Monard, S., Pletcher, C. H. Jr., Wadley, R. B., Schmid, I., Perfetto, S. P., 2014. International Society for the Advancement of Cytometry cell sorter biosafety standards. *Cytometry A.* 85, 434-453.

Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Ikehara, S., Inaba, K., Fukuhara, S., 2001. Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. *J. Immunol.* 166, 2961-2969.

Ito, Y., Shinomiya, K., 2001. A new continuous-flow cell separation method based on cell density: principle, apparatus, and preliminary application to separation of human buffy coat. *J. Clin. Apher.* 16, 186-191.

Ito, T., Amakawa, R., Kaisho, T., Hemmi, H., Tajima, K., Uehira, K., Ozaki, Y., Tomizawa, H., Akira, S., Fukuhara, S., 2002. Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J. Exp. Med.* 195, 1507-1512.

Iwamoto, S., Iwai, S., Tsujiyama, K., Kurahashi, C., Takeshita, K., Naoe, M., Masunaga, A., Ogawa, Y., Oguchi, K., Miyazaki, A., 2007. TNF-alpha drives human CD14+ monocytes to differentiate into CD70+ dendritic cells evoking Th1 and Th17 responses. *J. Immunol.* 179, 1449-1457.

Iwasaki, A., Medzhitov, R., 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5, 987-995.

Jakob, T., Walker, P. S., Krieg, A. M., Udey, M. C., Vogel, J. C., 1998. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J. Immunol.* 161, 3042-3049.

Janetzki, S., Price, L., Britten, C. M., Van der Burg, S. H., Caterini, J., Currier, J. R., Ferrari, G., Gouttefangeas, C., Hayes, P., Kaempgen, E., Lennerz, V., Nihlmark, K., Souza, V., Hoos, A., 2010. Performance of serum-supplemented and serum-free media in IFN gamma Elispot Assays for human T cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 59, 609-618.

Jansen, J. H., Wientjens, G. J., Fibbe, W. E., Willemze, R., Kluin-Nelemans, H. C., 1989. Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4. *J. Exp Med.* 170, 577-582.

Joffre, O., Nolte, M. A., Spörri, R., Reis e Sousa, C., 2009. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 227, 234-247.

Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., Amigorena, S., 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 557-569.

Jonuleit, H., Kühn, U., Müller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., Enk, A. H., 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.* 27, 3135-3142.

Kavanagh, D. G., Bhardwaj, N., 2002. A division of labor: DC subsets and HIV receptor diversity. *Nat. Immunol.* 3, 891-893.

Kurts, C., Robinson, B. W., Knolle, P. A., 2010. Cross-priming in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 403-414.

Lehner, M., Holter, W., 2002. Endotoxin-free purification of monocytes for dendritic cell generation via discontinuous density gradient centrifugation based on diluted ficoll-paque plus. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 128, 73-76.

Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K., O'Neill, L. A., 2005. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 446-458.

Li, D. Y., Gu, C., Min, J., Chu, Z. H., Ou, Q. J., 2012. Maturation induction of human peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells. *Exp. Ther. Med.* 4, 131-134.

Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K., Flavell, R. A. I., 2006. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 99-146.

- Liu, Y. J., 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 275-306.
- Lutz, M. B., Schuler, G., 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 23, 445-449.
- Ma, D. Y., Clark, E. A., 2009. The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin. Immunol.* 21, 265-272.
- Maecker H. T., Frey, T., Nomura, L. E., Trotter, J., 2004. Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. *Cytometry A.* 62, 169-173.
- Mahalingaiah, P.K., Palenski, T., Van Vleet, T.R., 2018. An In Vitro Model of Hematotoxicity: Differentiation of Bone Marrow-Derived Stem/Progenitor Cells into Hematopoietic Lineages and Evaluation of Lineage-Specific Hematotoxicity. *Curr. Protoc. Toxicol.* 1: e45.
- Massa, C., Seliger, B., 2013. Fast dendritic cells stimulated with alternative maturation mixtures induce polyfunctional and long-lasting activation of innate and adaptive effector cells with tumor-killing capabilities. *J. Immunol.* 190, 3328-3337.
- Matzinger, P., 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 991-1045.
- Merad, M., Ginhoux, F., Collin, M., 2008. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 935-947.
- Meyer, T. P., Zehnter, I., Hofmann, B., Zaisserer, J., Burkhart, J., Rapp, S., Weinauer, F., Schmitz, J., Illert, W. E., 2005. Buffy Coats (FBC): a source of peripheral blood leukocytes recovered from leukocytedepletion filters. *J. Immunol. Methods.* 20, 150-166.
- Miao, E. A., Warren, S. E., 2010. Innate immune detection of bacterial virulence factors via the NLRC4 inflammasome. *J. Clin. Immunol.* 30, 502-506.
- Mohamadzadeh, M., , Berard, F., Essert, G., Chalouni, C., Pulendran, B., Davoust, J., Bridges, G., Palucka, A. K., Banchereau, J., 2001. Interleukin 15 skews monocyte differentiation into dendritic cells with features of Langerhans cells. *J. Exp. Med.* 194, 1013-1020.
- Moody, D. B., 2006. TLR gateways to CD1 function. *Nat. Immunol.* 7, 811-817.
- Moore, G. E., Gerner, R. E., Franklin, H. A., 1967. Culture of normal human leukocytes. *JAMA.* 199, 519-524.

- Mohty, M., Vialle-Castellano, A., Nunes, J. A., Isnardon, D., Olive, D., Gaugler, B., 2003. IFN-alpha skews monocyte differentiation into Toll-like receptor 7-expressing dendritic cells with potent functional activities. *J. Immunol.* 171, 3385-3393.
- Mori, L., Lepore, M., De Libero, G., 2016. The Immunology of CD1- and MR1-Restricted T Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 34, 479-510.
- Napolitani G., Lepore, M., De Libero, G., 2005. The Immunology of CD1- and MR1-Restricted T Cells.. *Nat. Immunol.* 6, 769-776.
- Neefjes, J., Jongstra, M. L., Paul, P., Bakke, O., 2011. Towards a system understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 823-836.
- Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J. Z., Nickoloff, B. J., 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 679-691.
- Obermaier, B., Dauer, M., Hertel, J., Schad, K., Endres, S., Eigler, A., 2003. Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biol. Proced. Online.* 5, 197-203.
- O'Sullivan, B., Thomas, R., 2003. CD40 and dendritic cell function. *Crit. Rev. Immunol.* 23, 83-107.
- Park, B. S., Lee, J. O., 2013. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp. Mol. Med.* 6, 45-66.
- Pavlović, B., Tomić, S., Đokić, J., Vasilijić, S., Vučević, D., Lukić, J., Gruden-Movsesijan, A., Ilić, N., Marković, M., Čolić, M., 2015. Fast dendritic cells matured with Poly (I:C) may acquire tolerogenic properties. *Cytotherapy.* 17, 1763-1776.
- Patel, A. A., Zhang, Y., Fullerton, J. N., Boelen, L., Rongvaux, A., Maini, A. A., Bigley, V., Flavell, R. A., Gilroy, D. W., Asquith, B., Macallan, D., Yona, S., 2017. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med.* 214, 1913-1923.
- Patarroyo, M., Prieto, J., Beatty, P. G., Clark, E. A., Gahmberg, C. G., 1988. Adhesion-mediated molecules of human monocytes. *Cell Immunol.* 113, 278-289.
- Peng, J. C., Thomas, R., Nielsen, L. K., 2005. Generation and maturation of dendritic cells for clinical application under serum-free conditions. *J. Immunother.* 28, 599-609.
- Perussia, B., Fanning, V., Trinchieri, G., 1985. A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.* 4, 120-137.

Pulendran, B., 2015. The Varieties of Immunological Experience: Of Pathogens, Stress, and Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 563–606.

Raetz, C. R, Whitfield, C., 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635-700.

Ramadan, G., Konings, S., Kurup, V. P., Keever-Taylor, C. A., 2004. Generation of Aspergillus- and CMV- specific T-cell responses using autologous fast DC. *Cytotherapy.* 6, 223-234.

Randolph, G. J., Ochando, J., Partida-Sánchez, S., 2008. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 293-316.

Relloso, M., Puig-Kröger, A., Pello, O. M., Rodríguez-Fernández, J. L., De la Rosa, G., Longo, N., Navarro, J., Muñoz-Fernández, M. A., Sánchez-Mateos, P., Corbí, A. L., 2002. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. *J. Immunol.* 168, 2634-2643.

Repnik, U., Knezevic, M., Jeras, M., 2003. Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. *J. Immunol. Methods.* 278, 283-292.

Rojas-Canales, D., Krishnan, R., Jessup, C. F., Coates, P. T., 2012. Early exposure of interferon- γ inhibits signal transducer and activator of transcription-6 signalling and nuclear factor κ B activation in a short-term monocyte-derived dendritic cell culture promoting 'FAST' regulatory dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 167, 447-458.

Ruppert, J., Friedrichs, D., Xu, H. , Peters, J. H., 1991. IL-4 decreases the expression of the monocyte differentiation marker CD14, paralleled by an increasing accessory potency. *Immunobiology.* 182, 449-464.

Sanarico, N., Ciaramella, A., Sacchi, A., Bernasconi, D., Bossù, P., Mariani, F., Colizzi, V., Vendetti, S., 2006. Human monocyte-derived dendritic cells differentiated in the presence of IL-2 produce proinflammatory cytokines and prime Th1 immune response. *J. Leukoc. Biol.* 80, 555-562.

Sander J., Schmidt, S. V., Cirovic, B., McGovern, N., Papantonopoulou, O., Hardt, A. L., Aschenbrenner, A. C., Kreer, C., Quast, T., Xu, A. M., Schmidleithner, L. M., Theis, H., Thi Huong, L. D., Sumatoh, H. R. B., Lauterbach, M. A. R., Schulte-Schrepping, J., Günther, P., Xue, J., Baßler, K., Ulas, T., Klee, K., Katzmarski, N., Herresthal, S., Krebs, W., Martin, B., Latz, E., Händler, K., Kraut, M., Kolanus, W., Beyer, M., Falk, C. S., Wiegmann, B., Burgdorf, S., Melosh, N. A., Newell, E. W., Ginhoux, F., Schlitzer, A., Schultze, J. L., 2017. Cellular Differentiation of Human Monocytes Is Regulated by Time-Dependent Interleukin-4 Signaling and the Transcriptional Regulator NCOR2. *Immunity.* 47, 1051-1066.

Santini, S. M., Lapenta, C., Logozzi, M., Parlato, S., Spada, M., Di Pucchio, T., Belardelli, F., 2000. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J. Exp. Med.* 191, 1777-1788.

Strasser, E. F., Weidinger, T., Zimmermann, R., Ringwald, J., Eckstein, R., 2007. Recovery of white blood cells and platelets from leukoreduction system chambers of Trima Accel and COBE Spectra plateletpheresis devices. *Transfusion.* 47, 1943-1944

Strasser, E. F., Eckstein, R., 2010. Optimization of leukocyte collection and monocyte isolation for dendritic cell culture. *Transfus. Med. Rev.* 24, 130-139.

Stockwin, L. H., McGonagle, D., Martin, I. G., Blair, G. E., 2000. Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunol. Cell Biol.* 78, 91-102.

Saikh, K. U., Khan, A. S., Kissner, T., Ulrich, R. G., 2001. IL-15-induced conversion of monocytes to mature dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 126, 447-455.

Sallusto, F., Lanzavecchia, A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179, 1109-1118.

Segura, E., Valladeau-Guilemond, J., Donnadieu, M. H., Sastre-Garau, X., Soumelis, V., Amigorena, S., 2012. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J. Exp. Med.* 209, 653-660.

Schlee, M., Hartmann, G. 2016. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 566-580.

Schmid, I., Krall, W. J., Uittenbogaart, C. H., Braun, J., Giorgi, J. V., 1992. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry.* 13, 204-208.

Schulz, O., Edwards, A. D., Schito, M., Aliberti, J., Manickasingham, S., Sher, A., Reis e Sousa, C., 2000. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity.* 13, 453-462.

Steinman, R. M., Cohn, Z. A. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137, 1142-1462.

Steinman, R. M., Witmer, M. D. 1978. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 5132-5136.

Steinman, R. M., 2012. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 1-22.

Swiecki, M., Colonna, M., 2015. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 471-485.

Suzuki, H., Katayama, N., Ikuta, Y., Mukai, K., Fujieda, A., Mitani, H., Araki, H., Miyashita, H., Hoshino, N., Nishikawa, H., Nishii, K., Minami, N., Shiku, H., 2004. Activities of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on monocytes. *Am. J. Hematol.* 75, 179-189.

Takahashi, K., Honeyman, M. C., Harrison, L. C., 1997. Dendritic cells generated from human blood in granulocyte macrophage-colony stimulating factor and interleukin-7. *Hum. Immunol.* 55, 103-116.

Tanaka, F., Yamaguchi, H., Haraguchi, N., Mashino, K., Ohta, M., Inoue, H., Mori, M., 2006. Efficient induction of specific cytotoxic T lymphocytes to tumor rejection peptide using functional matured 2 day-cultured dendritic cells derived from human monocytes. *Int. J. Oncol.* 29, 1263-1268.

Travis, M. A., Sheppard, D., 2014. TGF- β activation and function in immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 32, 51-82.

Turville, S. G., Cameron, P. U., Handley, A., Lin, G., Pöhlmann, S., Doms, R. W., Cunningham, A. L., 2002. Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat. Immunol.* 3, 975-983.

Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspord, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J. W., Pascual, V., Palucka, A. K., Banchereau, J., 2007. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Rev.* 219, 118-142.

Ulanova, M., Tarkowski, A., Hahn-Zoric, M., Hanson, L. A., 2001. The Common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism. *Infect. Immun.* 69, 1151-1159.

Vatsan, R. S., Bross, P. F., Liu, K., Theoret, M., De Claro, A. R., Lu, J., Helms, W., Niland, B., Husain, S. R., Puri, R. K., 2013. Regulation of immunotherapeutic products for cancer and FDA's role in product development and clinical evaluation. *J. Immunother. Cancer.* 29, 1-5.

Vicente-suarez, I., Brayer, J., Villagra, A., Cheng, F., Sotomayor, E. M., 2009. TLR5 ligation by flagellin converts tolerogenic dendritic cells into activating antigen-presenting cells that preferentially induce T-helper 1 responses. *Immunol. Lett.* 125, 114-118.

Vogt, T. K., Link, A., Perrin, J., Finke, D., Luther, S. A., 2009. Novel function for interleukin-7 in dendritic cell development. *Blood*. 113, 3961-3968.

Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P., 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 10, 45-65.

Wang, S., El-Deiry, W. S. 2003. TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. *Oncogene*. 22, 8628-8633.

Worbs, T., 2017. Dendritic cell migration in health and disease. *Nat. Rev. Immunol*. 17, 30-48.

Wu, L., Liu, Y. J., 2007. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity*. 26, 741-750.

Xiao, Q., Li, X., Sun, D., Yi, H., Lu, X., Nian, H., 2016. TLR7 Engagement on Dendritic Cells Enhances Autoreactive Th17 Responses via Activation of ERK. *J. Immunol*. 197, 3820-3830.

Yang, G. X., Lian, Z. X., Kikuchi, K., Moritoki, Y., Ansari, A. A., Liu, Y. J., Ikehara, S., Gershwin, M. E., 2005. Plasmacytoid dendritic cells of different origins have distinct characteristics and function: studies of lymphoid progenitors versus myeloid progenitors. *J. Immunol*. 175, 7281-7287.

WHO- World Health Organization. Guidelines on Drawing Blood: Best Practices in Phlebotomy.

http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0005/268790/WHO-guidelines-on-drawing-blood-best-practices-in-phlebotomy-Eng.pdf?ua-1 (accessed 12 april 2018).

5.3 Artigo original “Increased systemic IL-6 levels indicate inflammation as a determinant component in Renal Cell Carcinoma development”

Artigo submetido ao periódico Experimental and Molecular Pathology

Increased systemic IL-6 levels indicate inflammation as a determinant component in Renal Cell Carcinoma development

Giovana Cechim¹, Joel Henrique Ellwanger¹, Valéria de Lima Kaminski¹, Milton Berger², José Artur Bogo Chies¹

1. Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética, Departamento de Genética, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

2. Departamento de Urologia, Hospital de Clínicas do Porto Alegre (HCPA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author: Dr. José Artur Bogo Chies. Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética (Prédio 43323, Laboratório 212), Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale, Porto Alegre - RS, Brazil, Phone: +5551 33086737. E-mail: jabchies@terra.com.br

Abstract

Renal Cell Carcinoma (RCC) is one of the most prevalent kidney tumors. It is believed that inflammation is a key factor for cancer progression and spread since inflammatory markers are generally associated to poor prognosis of RCC patients. Cytokines are cell communication molecules that act in both health and pathological situations. Of note, tumor growth and progression are processes mediated by cytokines. Recent findings suggest that cytokine level measurements could be used for cancer monitoring and prognosis. Considering this scenario, this study aimed to characterize and compare the systemic profile of distinct cytokines associated to the classical Th1, Th2 and Th17 immune responses in plasma samples from RCC patients ($n=25$) and healthy controls ($n=29$). No statistical difference in systemic IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A, TNF, and INF- γ between RCC patients and controls ($p>0.05$). On the other hand, higher systemic IL-6 levels were observed in RCC patients in comparison to controls ($p=0.0034$). In conclusion, this study highlights the importance of assessing the impact of IL-6 on RCC pathogenesis and its potential role as a biomarker of disease progression.

Keywords: RC, IL-6, CBA, cytokines, inflammation.

Introduction

Inflammation is one of the hallmarks of cancer biology (Hanahan and Weinberg, 2011). It allows proliferation and survival of malignant cells, disruptiveness of host immune responses, angiogenesis, and metastasis. In addition, tumors usually settle and develop in sites of chronic inflammation, with pro-inflammatory cells being found in abundance in tumor biopsies (Mantovani et al., 2008). Moreover, a series of mechanisms revealed a cytokine-mediated link between inflammation and cancer (Lin and Karin, 2007). In the context of renal cell carcinoma (RCC) the presence of inflammation represents poor prognosis for patients (Yoshida et al., 2002; Cuadros et al., 2014). Besides, resistance to chemotherapy and radiation, absence of early warning symptoms and different clinical manifestations are common features of RCC (Kamińska et al., 2015).

T-helper (Th) lymphocytes are CD4⁺ cells with a heterogeneous population that play essential roles in adaptive immunity. These cells are responsible for cell-mediated immunity by their ability to induce pro- or anti-inflammatory reactions mainly through the secretion of different sets of cytokines that dictate the direction of an immune response (Annunziato and Romagnani, 2009). Interleukins (ILs) are a subset of cytokines which allow both cell signaling in the immune system as well as the generation of a tightly controlled and specific response. Distinct immune cell repertoires, such as Th1, Th2, and Th17 cells, produce and secrete ILs that will locate and attach to a specific target via specific receptors on a cell surface. The interaction between ILs and their receptors ends by triggering a cascade of events within the target cell ultimately altering the targeted behavior. In this context, ILs own a variety of immunomodulatory roles capable of driving maturation, differentiation, migration, and adhesion of immune cells (Anestakis et al., 2015).

Pro-inflammatory mediators play an important role for establishment of renal cancer. An adequate microenvironment for tumor growth and development encompasses inflammation-mediated recruitment of leukocytes, expression of tumor-promoting chemokines and cytokines, and induction of an angiogenic switch for tumor blood supply (Grivennikov et al., 2010; Mantovani et al., 2008). In the context of cancer development, inflammatory molecules can mediate cell communication favoring the tumor, thus compounding the hallmarks of cancer-related inflammation. Commonly, growing solid malignant masses become deprived of blood supply, which results in the lack of adequate oxygen and nutrient levels leading to necrotic cell death and the release of pro-inflammatory mediators. This resulting inflammatory response

prompts neo-angiogenesis thus providing additional growth factors for the remaining cancer cells, produced by this additional recruitment of inflammatory immune cells (Grivennikov et al., 2010).

Interestingly, tumor progression are based on strategies to avert immune system recognition through the establishment of an adequate tumor microenvironment (Bhatia and Kumar, 2014). Tumors can secrete factors that suppress T cell responsiveness, including immune suppressive or anti-inflammatory cytokines, as well as enzymes that disrupt T cell effector functions (Mao et al., 2014). Another escape mechanism found in tumors involves the adaptive immune response, which is the recruited and/or induced to conversion towards inflammatory cells that suppress T cell responses (Anestakis et al., 2015). Interleukin family members present in the tumor microenvironment interact with various biomolecules and cell subpopulations, such as cancer stem cells, microRNAs, epithelial-mesenchymal transition markers and transcription factors (Setrerrahmane and Xu, 2017). These interactions have been translated into a number of cytokine-based approaches for cancer monitoring and therapy.

Despite the local action of cytokines, systemic inflammation levels can provide important signals related to tumor and cancer progression (Mantovani et al., 2008). Some data about systemic inflammatory cytokine measurements in the plasma of RCC patients is available at the literature, suggesting an association with poor prognosis (Setrerrahmane and Xu, 2017; Fitzgerald, 2012; Mantovani et al., 2008; Negrier et al., 2004; Dosquet et al., 1994). The comprehension of the biological impact of individual cytokines in tumor progression is essential for the development of new biomarkers and possibly new therapeutic targets. Thus, considering the role of cytokines in cancer and the recent advances in RCC progression monitoring, the aim of this study was to evaluate the profile of Th1/Th2 and Th17 systemic cytokines in plasma samples of RCC pre-treatment patients and healthy controls.

Material and Methods

Patients and ethical aspects

We recruited for this study pre-treatment patients diagnosed with renal cell carcinoma (RCC group, $n=25$) at the Urology Service of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre*, located in the metropolitan region of Rio Grande do Sul State (southern Brazil). The diagnosis of renal cancer was confirmed through imaging exams and histopathological analysis. We also included in this study healthy individuals with no cancer history (Control group, $n=29$), also from southern Brazil and showing similar age to the individuals included in the RCC group. This study was approved by the ethics committees of the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* and *Universidade Federal do Rio Grande do Sul* (#CAAE: 11858512.3.0000.5327). All participants signed a consent form in accordance with the Declaration of Helsinki.

Tumor classification and plasma samples

Tumors were classified by histopathological analysis, according to two systems: I. Fuhrman System (Fuhrman et al., 1982); in brief, lesions are classified into four grades (G1, G2, G3, and G4) according to nuclear size and presence of nucleoli (Ficarra et al., 2005). II. TNM Classification of Malignant Tumours/TNM staging; originally proposed by Denoix (1946), this system is adopted by the Union for International Cancer Control (UICC, 2018). "T" refers to a primary tumor site, "N" refers to regional lymph node involvement, and "M" refers to the presence or otherwise of distant metastatic spread (UICC, 2018). This system classifies the primary tumors (T) into four stages according to tumor extent. In addition, these stages can receive sub-classifications (a, b, c). For this study, we consider only "primary tumor site (T)" classification, since in most cases the other classifications (N and M) did not apply to the tumors or were not available for consultation,

Plasma samples were obtained from peripheral blood collection followed by centrifugation. Afterward, the samples were kept under refrigeration (-80°C) until the cytokine analyzes. Of note, samples of individuals from "RCC group" were collected at the hospital on the day of surgery for tumor excision, prior to any other treatment.

CBA analysis

Cytokine levels were evaluated by flow cytometry using BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine kit (Catalog No. 560484, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). This kit allows the simultaneous detection of the following cytokines: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , and IL-17A. CBA analysis was performed using plasma samples, according to the manufacturer's instructions. FCAP Array software (BD Biosciences) was used to evaluate raw data obtained through FACSDiva software (BD Biosciences). Cytokine levels were expressed in pg/mL.

Statistical analysis

The unpaired t-test was applied to compare age between groups, once these data showed normal distribution. Sex ratio between groups was compared using Pearson's chi-square with Yates's correction. Cytokine levels did not show normal distribution and therefore were compared through non-parametric tests: Kruskal-Wallis test was used for comparisons involving three groups and Mann-Whitney U test was used for comparisons between two groups. p -value ≤ 0.05 was defined as statistically significant. The analyzes were performed using WINPEPI (Abramson,

2011) and GraphPad Prism 5.01 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). The graphs were plotted using the GraphPad Prism.

Results

Table 1 shows age data and sex distribution of both groups evaluated in this study. Individuals from the Cancer group did not show statistically significant differences regarding age and sex in comparison to the Control group ($p>0.05$). Table 1 also shows the distribution of tumors according to the TNM staging. Regarding the first classification, data from three patients were not available.

Table 2 shows the levels of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , and IL-17A in both groups. IL-6 levels were significantly higher in the Cancer group compared to the Control group ($p=0.0034$), (Brietzke et al., 2009). No statistically significant differences were observed between the groups in relation to the other cytokines evaluated ($p>0.05$).

Considering that only IL-6 and IL-10 showed median values > 0 pg/mL, these two cytokines were chosen for subsequent analyzes performed from the stratification of Cancer group individuals according to the TNM staging. Regarding Fuhrman System analyzes, patients with G1 and G2 were included in the same group and patients with G3 and G4 were included in a second group. This procedure was adopted due to the small number of individuals showing tumors classified as G1 ($n=1$) and G4 ($n=2$). However, we did not find statistically significant differences ($p>0.05$) regarding IL-6 and IL-10 levels in patients with different tumor grades (Figure 1).

Taking together, our results indicate that IL-6 plasma levels were increased in RCC patients in the pre-treatment stage. However, these levels did not differ between sub-groups of patients with tumors of different histopathological characteristics.

Discussion

In this study we measured the plasma levels of the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF and IFN- α in patients with renal cancer. It is well established that inflammation plays an important role in the initiation of malignant transformation and cancer progression (Mantovani et al., 2008; Grivennikov et al., 2010; Trinchieri, 2012). Furthermore, the invasive capacity of malignant cells can increase in the presence of inflammatory cytokines such as TNF- α , and IL-6 by downregulating E-cadherin expression and upregulating the production and activity of matrix metalloproteinases (MMP), (Xie et al., 2004; Sullivan et al., 2009; Elinav et al., 2013; Cathcart et al., 2016).

Of the cytokines studied, only IL-6 presented a significantly higher level in renal cancer patients compared to the controls. This result draws our attention to the accumulating evidence of

the IL-6 function in the development and progression of renal cancer (Kamińska et al., 2015). The IL-6 cytokine promotes cell proliferation, migration and invasion mainly by the activation of transcription factors STAT3 and NF- κ B (Lee et al., 2009; Yu et al., 2009; Johnson et al., 2018; Taniguchi and Karin., 2018). It is also described that IL-6 modulates angiogenesis in renal cell carcinoma by increasing the expression of HIF1 α and VEGF (Santoni et al., 2015).

IL-6 is a pro-inflammatory cytokine with multiple functions in immunity regulation. It is produced by a variety of cells including macrophages, T and B cells, fibroblasts, endothelial cells, and epithelial cells, particularly renal mesangial and tubular cells (Setrerrahmane and Xu, 2017; Kishimoto, 1997). Such multiple IL-6 functions are mediated by two membrane proteins: an 80 kDa binding receptor (IL-6R) and the transducer signaling gp130 protein. Besides, a soluble IL-6 receptor, gp80 (sIL-6R), binds to circulating IL-6 molecules which results in the IL-6/sIL-6R complex formation. This complex thus binds and activates the gp130 transducer chain in any cell expressing the receptor subunit glycoprotein gp130 (Nguyen et al., 2014).

In the context of inflammation and cancer, RCC cells exposed to hypoxia can secrete IL-6. For example, elevated IL-6 mRNA expression levels and IL-6 secretion was detected in primary renal cell carcinoma tissues (Kamińska, 2015). In this same direction, not only primary RCC cell cultures but also established RCC cell lines express IL-6 mRNA and IL-6 protein receptor (Takenawa, 1991; Kamińska, 2015). This hypoxia-induced secretion enhances local IL-6 levels, thus resulting in increased RCC cells invasion (Fitzgerald, 2012). Sakai et al. (1991) found high IL-6 serum levels in a study on patients with RCC both before and after nephrectomy. Abnormally high IL-6 serum levels were detected in a study with metastatic RCC patients, and it was indicated as a potential and independent prognostic factor for these patients (Negrier et al., 2004). Blay et al. (1997) investigated the potential role of circulating IL-6 in the paraneoplastic inflammatory and cholestatic syndrome associated with metastatic RCC. In that study, it was indicated a correlation between serum IL-6 presence and systemic symptoms, as well as increased serum C-reactive protein and haptoglobin levels (Blay et al., 1997). Costes et al. (1997) showed a correlation between the size and stage of RCC with serum IL-6 concentration. In addition, other study demonstrated a heterogeneous mean concentration of IL-6 in renal cancer patients, but either higher in comparison to controls (Adler, 1998). Also, abnormal IL-6 concentrations were previously correlated to the worse prognosis of patients with metastatic RCC (Stadler, 1992).

Of note, the patient which presented the highest IL-6 levels was also the only one in our sample presenting metastasis, specifically in lymph nodes. This corroborates the association of a higher invasive capacity of malignant cells and IL-6, previously discussed. Thus, we can suggest that the measurement of plasma levels of IL-6 in patients with metastatic renal cancer can be used as a complementary approach in order to evaluate or predict the response to immunotherapy. Importantly, the most commonly drugs used in the treatment of metastatic renal cancer are

inhibitors of tyrosine kinases (Sunitinib, Bevacizumab, Pazopanib and Sorafenib) that also promote an inhibition of STAT3 signaling pathway – which both signaling transducers can be directly activated by IL-6 (Hodge et al., 2005; Ranieri et al., 2017).

Interestingly, the IL-6/sIL-6R complex has already been implicated in various deleterious effects of IL-6 in chronic inflammatory diseases and cancer (Nguyen, 2014), and it could reflect the elevated systemic levels of this interleukin in RCC found by our group and others in different cancer types, with and without metastatic processes. Regarding the tumor microenvironment, tumor endothelial cells up-regulate the expression of gp130, down-regulate the expression of the membrane-bound IL-6R, and are targeted by the IL-6/IL-6sR complex, which leads to proliferation, inhibition of apoptosis, and enhanced carcinogenesis (Matsumoto, 2010). Besides, as gp130 is expressed on almost every human cell, the IL-6/sIL-6R complex is able to affect many circulating cells, which can further explain the high detected systemic levels of this interleukin in RCC, other types of cancer, and in chronic inflammatory diseases (Kamińska, 2015).

Conclusion

Considering the important role of the IL-6 cytokine for the establishment and maintenance of renal cancer, the use of immunotherapeutic drugs which directly interferes with IL-6 signaling pathway appear as a new alternative for patients with metastatic renal cancer. Some of those drugs [Tocilizumab (anti-human IL-6R) and Siltuximab (murine-human monoclonal antibody against IL-6)] are already used to treat other pathologies and tests for their use for the treatment of renal cancer seems to be the next step (Oguro et al., 2013; Kamińska et al., 2015; Ishibashi et al., 2017; Garbers et al., 2018; Johnson et al., 2018). In summary, the higher systemic IL-6 levels observed in RCC patients rekindles the importance of future studies regarding this interleukin, focusing on potential therapeutic strategies as well as in cancer establishment, development, and progression.

Conflicts of Interest Statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

GC, JHE, and VLK received a doctoral fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil). JABC receives a research

fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil).

Funding

This study received financial support from *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (HCPA, Porto Alegre, Brazil).

References

Adler, G., Eichman, W., Szczepanski, M., Targonska, I., Jasinska, A. (1998) Postoperative plasma interleukin-6 in patients with renal cancer correlates with C-reactive protein but not with total fibrinogen or with high molecular weight fibrinogen fraction. *Thromb Res.* 89(5):243-8.

Anestakis, D., Petanidis, S., Kalyvas, S., Nday, C.M., Tsave, O., Kioseoglou, E., Salifoglou, A. (2015) Mechanisms and applications of interleukins in cancer immunotherapy. *Int J Mol Sci.* 16(1):1691-710. doi: 10.3390/ijms16011691.

Annunziato, F., Romagnani, S. (2009) Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res Ther.* 11(6):257. doi: 10.1186/ar2843.

Bhatia, A., Kumar, Y. (2014) Cellular and molecular mechanisms in cancer immune escape: a comprehensive review. *Expert Rev Clin Immunol.* 10(1):41-62. doi: 10.1586/1744666X.2014.865519.

Blay, J.Y., Rossi, J.F, Wijdenes, J., Menetrier-Caux, C., Schemann, S., Négrier, S., Philip, T., Favrot, M. (1997). Role of interleukin-6 in the paraneoplastic inflammatory syndrome associated with renal-cell carcinoma. *Int J Cancer.* 72(3):424-30.

Brietzke, E., Stertz, L., Fernandes, B.S., Kauer-Sant'anna, M., Mascarenhas, M., Escosteguy, V.A., Chies, J.A., Kapczinski, F. (2009). Comparison of cytokine levels in depressed, manic and euthymic patients with bipolar disorder. *J Affect Disord.* 116(3):214-7. doi: 10.1016/j.jad.2008.12.001.

Cathcart, J.M., Banach, A., Liu, A., Chen, J., Goligorsky, M., Cao, J. (2016). Interleukin-6 increases matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) levels via down-regulation of p53 to drive cancer progression. *Oncotarget.* 7:61107-61120. doi: 10.18632/oncotarget.11243.

Costes, V., Liautard, J., Picot, M.C., Robert, M., Lequeux, N., Brochier, J., Baldet, P., Ros (1997) Expression of the interleukin 6 receptor in primary renal cell carcinoma. *J Clin I* 50(10):835-40.

Cuadros, T., Trilla, E., Sarró, E., Vilà, M.R., Vilardell, J., de Torres, I., Salcedo, M., López-Hellin, J, Sánchez. A., Ramón y Cajal, S., Itarte, E., Morote, J., Meseguer, A. (2014) HAVCR/KIM-1 activates the IL-6/STAT-3 pathway in clear cell renal cell carcinoma and determines tumor progression and patient outcome. *Cancer Res.* 74(5):1416-28. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1671.

Denoix, P.F. Enquete permanente dans les centres anticancereaux. *Bull Inst Nat Hyg* 1946; 1: 70-75.

Dosquet, C., Schaetz, A., Faucher, C., Lepage, E., Jean-Luc Wautier, J.L., Francois Richard, Cabane, J. (1994) Tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and interleukin-6 in patients with renal cell carcinoma. *Eur J of Cancer.* 30A(2) 162-167. doi: 10.1016/0959-8049(94)90079-5.

Elinav, E., Nowarski, R., Thaïss, C.A., Hu, B., Jin, C., Flavell, R.A. (2013). Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat. Rev. Cancer.* 13:759-71. doi: 10.1038/nrc3611.

Ficarra, V., Martignoni, G., Maffei, N., Brunelli, M., Novara, G., Zanolla, L., Pea, M., Artibani, W. (2005). Original and reviewed nuclear grading according to the Fuhrman system: a multivariate analysis of 388 patients with conventional renal cell carcinoma. *Cancer.* 103(1): 68-75. doi: 10.1002/cncr.20749.

Fitzgerald, J.P., Nayak, B., Shanmugasundaram, K., Friedrichs, W., Sudarshan, S., Eid, A.A., DeNapoli, T., Parekh, D.J., Gorin, Y., Block, K. (2012). Nox4 mediates renal cell carcinoma cell invasion through hypoxia-induced interleukin 6- and 8- production. *PLoS One.* 7(1):e30712. doi: 10.1371/journal.pone.0030712.

Fuhrman, S., Lasky, L.C., Limas, L. (1982). Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 6: 655-663.

Garbers, C., Heink, S., Korn, T., Rose-John, S. (2018). Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17:395-412. doi: 10.1038/nrd.2018

Grivennikov, S.I., Greten F.R., Karin, M. (2010) Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell.* 140(6): 883–899. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025.

- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hodge, D.R., Hurt, E.M., Farrar, W.L. (2005) The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer*. 41(16):2502-12. doi: 10.1016/j.ejca.2005.08.016.
- Ishibashi, K., Haber, T., Breuksch, I., Gebhard, S., Sugino, T., Kubo, H., Hata, J., Koguchi, T., Yabe, M., Kataoka, M., Ogawa, S., Hiraki, H., Yanagida, T., Haga, N., Thüroff, J.W., Prawitt, D., Brenner, W., Kojima, Y. (2017). Overriding TKI resistance of renal cell carcinoma by combination therapy with IL-6 receptor blockade. *Oncotarget*. 8:55230-55245. doi: 10.18632/oncotarget.19420.
- Johnson, D.E., O'Keefe, R.A., Grandis, J.R. (2018). Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 15:234-248. doi: 10.1038/nrclinonc.2018.8.
- Kamińska, K., Czarnecka, A.M., Escudier, B., Lian, F., Szczylik, C. (2015) Interleukin-6 as an emerging regulator of renal cell cancer. *Urol Oncol*. 33(11):476-85. doi: 10.1016/j.urolonc.2015.07.010.
- Kishimoto, T. (1989). The biology of interleukin-6. *Blood*.74(1):1-10.
- Lee, H., Herrmann, A., Deng, J.H., Kujawski, M., Niu, G., Li, Z., Forman, S., Jove, R., Pardoll, D.M., Yu, H. (2009). Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell*. 15: 283-229. doi: 10.1016/j.ccr.2009.02.015.
- Lin, W.W., Karin, M. (2007) A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 117(5):1175-83. doi: 10.1172/JCI31537.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 454(7203):436-44. doi: 10.1038/nature07205.
- Mao, Y., Poschke, I., Kiessling, R. (2014) Tumour-induced immune suppression: Role of inflammatory mediators released by myelomonocytic cells. *J. Intern. Med*. 276, 154–170. doi: 10.1111/joim.12229.
- Matsumoto, S., Hara, T., Mitsuyama, K., Yamamoto, M., Tsuruta, O., Sata, M., Scheller, J., Rose-John, S., Kado, S., Takada, T. (2010). Essential roles of IL-6 trans-signaling in colonic epithelial cells, induced by the IL-6/soluble-IL-6 receptor derived from lamina propria macrophages, on the development of colitis-associated premalignant cancer in a murine model. *J Immunol*. 1;184(3):1543-51. doi: 10.4049/jimmunol.0801217.

Negrier, S., Perol, D., Menetrier-Caux, C., Escudier, B., Pallardy, M., Ravaud, A., Douillard, J.Y., Chevreau, C., Lasset, C., Blay, J.Y., Groupe Francais d'Immunotherapie. (2004).

Interleukin-6, interleukin-10, and vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: prognostic value of interleukin-6--from the Groupe Francais d'Immunotherapie. *J Clin Oncol.* 15;22(12):2371-8. doi: 10.1200/JCO.2004.06.121.

Nguyen, D.P., Li, J., Tewari, A.K. (2014) Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (IL-6). *BJU Int.* 113(6):986-92. doi: 10.1111/bju.12452.

Oguro, T., Ishibashi, K., Sugino, T., Hashimoto, K., Tomita, S., Takahashi, N., Yanagida, T., Haga, N., Aikawa, K., Suzutani, T., Yamaguchi, O., Kojima, Y. (2013). Humanised antihuman IL-6R antibody with interferon inhibits renal cell carcinoma cell growth in vitro and in vivo through suppressed SOCS3 expression. *Eur. J. Cancer.* 49:1715-24. doi: 10.1016/j.ejca.2012.11.038

Ranieri, G., Marech, I., Niccoli Asabella, A., Di Palo, A., Porcelli, M., Lavelli, V., Rubini, G., Ferrari, C., Gadaleta, C.D. (2017) Tyrosine-Kinase Inhibitors Therapies with Mainly Anti-Angiogenic Activity in Advanced Renal Cell Carcinoma: Value of PET/CT in Response Evaluation. *Int J Mol Sci.* 18(9). doi: 10.3390/ijms18091937.

Sakai, A., Kawano, M., Kuramoto, A. (1991). Interleukin-6 produced by renal-cell carcinoma cells and progression of multiple myeloma. *N Engl J Med.* 27;324(26):1893-4. doi: 10.1056/NEJM199106273242613.

Santoni, M., Conti, A., Piva, F., Massari, F., Ciccamese, C., Burattini, L., Cheng, L., Lopez-Beltran, A., Scarpelli, M., Santini, D., Tortora, G., Cascinu, S., Montironi, R. (2015). Role of STAT3 pathway in genitourinary tumors. *Future Sci. OA.* 1;1(3):FSO15. doi: 10.4155/fso.15.13.

Setrerrahmane, S., Xu, H. (2017) Tumor-related interleukins: old validated targets for new anti-cancer drug development. *Mol Cancer.* 16(1):153. doi: 10.1186/s12943-017-0721-9.

Stadler, W.M., Richards, J.M., Vogelzang, N.J. (1992). Serum interleukin-6 levels in metastatic renal cell cancer: correlation with survival but not an independent prognostic indicator. *J Natl Cancer Inst.* 2;84(23):1835-6.

Sullivan, N.J., Sasser, A.K., Axel, A.E., Vesuna, F., Raman, V., Ramirez, N., Oberyshyn, T.M., Hall, B.M. (2009). Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene.*28:2940-2947. doi: 10.1038/onc.2009.180.

Taniguchi, K., Karin, M. (2018). NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat. Rev. Immunol.* 18:309-324. doi: 10.1038/nri.2017.142

Trinchieri, G. (2012). Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. *Annu. Rev. Immunol.* 30:677-706. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075008.

Takenawa, J., Kaneko, Y., Fukumoto, M., Fukatsu, A., Hirano, T., Fukuyama, H., Nakayama, H., Fujita, J., Yoshida, O. (1991). Enhanced expression of interleukin-6 in primary human renal cell carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 83(22):1668-72.

UICC - Union for International Cancer Control. TNM. Available at: <https://www.uicc.org/resources/tnm>. Accessed on 05 September 2018.

Xie, T.X., Wei, D., Liu, M., Gao, A.C., Ali-Osman, F., Sawaya, R., Huang, S. (2004). Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene.* 23:3550-3560. doi: 10.1038/sj.onc.1207383.

Yoshida, N., Ikemoto, S., Narita, K., Sugimura, K., Wada, S., Yasumoto, R., Kishimoto, T., Nakatani, T. (2002). Interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and interleukin-1beta in patients with renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 86(9):1396-400. doi: 10.1038/sj.bjc.6600257.

Yu, H., Pardoll, D., Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer.* 9:798-809. doi: 10.1038/nrc2734.

Table 1. Characteristics of the individuals included in the study.

Characteristic		Cancer group (n=25)	Control group (n=29)	p-value
Age, years; median (IQR)		58.00 (50.00-62.50)	51.00 (45.50-57.50)	0.1246 ^b
Sex, n (%)	Male	14 (56.00)	14 (48.28)	0.769 ^c
	Female	11 (44.00)	15 (51.72)	
TNM staging, n (%)	T1a	11 (44.00)	-	
	T1b	5 (20.00)	-	
	T3a	9 (36.00)	-	
Fuhrman System, n (% ^a)	G1	1 (4.55)	-	
	G2	13 (59.09)	-	
	G3	6 (27.27)	-	
	G4	2 (9.09)	-	

IQR, interquartile range. n, sample size. a, based on n=22. b, Unpaired t test. c, Pearson's chi-square with Yates's correction.

Table 2. Cytokine levels in Control group and Cancer group.

Cytokine	Cancer group pg/mL, median (IQR) (n=25)	Control group pg/mL, median (IQR) (n=29)	p-value (Mann-Whitney U test)
IL-2	0.0 (0.0-0.14)	0.0 (0.0-0.0)	0.7300
IL-4	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.075)	0.2389
IL-6	2.30 (1.06-4.47)	0.85 (0.65-1.72)	0.0034
IL-10	0.78 (0.17-1.60)	0.58 (0.305-0.765)	0.2414
IL-17A	0.0 (0.0-0.0)	0.0 (0.0-0.0)	0.4543
TNF	0.0 (0.0-0.83)	0.0 (0.0-0.68)	0.6286
IFN- γ	0.0 (0.0-0.135)	0.0 (0.0-0.02)	0.2868

IQR, interquartile range. Significant p-value is show in bold.

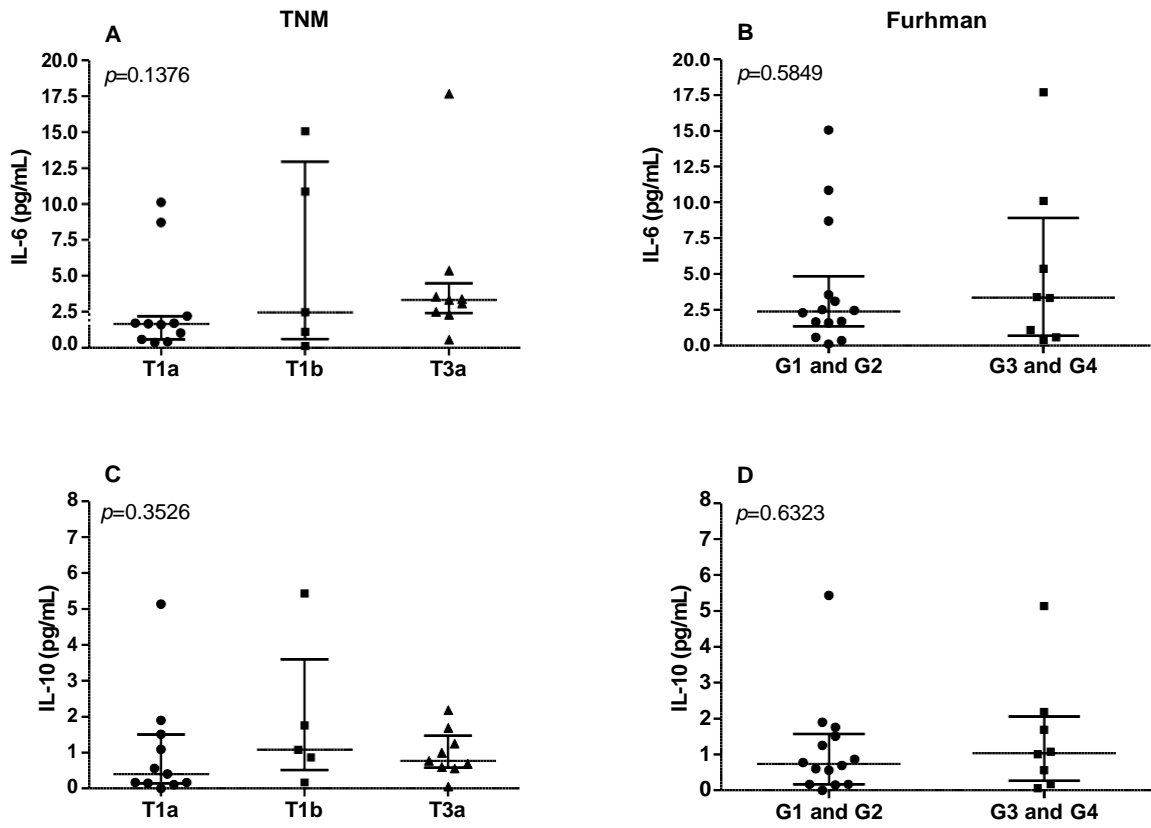


Figure 1. Comparison of IL-6 and IL-10 levels in cancer patients according to TNM and Furhman scale. Kruskal-Wallis test was used for comparisons regarding TNM staging. Mann-Whitney U test was used for comparisons regarding Furhman System.

6 – DISCUSSÃO

Neste trabalho avaliou-se a influência da molécula de HLA-G e de seus receptores em células do sistema imune de pacientes portadores de câncer renal. Para tanto, foram utilizadas as técnicas de cultura celular e de citometria de fluxo. O sangue dos participantes do estudo foi processado e o plasma foi utilizado em estudos de citocinas enquanto que as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram avaliadas em ensaios de imunofenotipagem.

As PBMCs obtidas foram divididas para a realização de dois estudos distintos. Uma fração foi utilizada para obtenção de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos *in vitro*. A segunda fração das PBMCs, foi utilizada para fenotipagem das células sanguíneas imunes (células dendríticas plasmocitóides, células NK, linfócitos B e T e monócitos). As células sanguíneas imunes foram analisados quanto a expressão dos receptores de HLA-G - ILT2, ILT4 e KIR2DL4 - bem como da expressão da própria molécula de HLA-G. As células dendríticas diferenciadas a partir dos monócitos *in vitro* foram avaliadas para a expressão dos receptores ILT2 e ILT4, além de serem analisadas quanto a marcadores associados à diferenciação, como CD14, bem como marcadores relacionados ao estado de maturação/ativação de células dendríticas como CD80, CD83, CD86 e HLA-DR.

Desde a primeira descrição de diferenciação de monócitos de sangue periférico em células dendríticas *in vitro* feita por Sallusto and Lanzavecchia, em 1994 (Sallusto e Lanzavecchia, 1994), a quantidade de recursos tecnológicos que podem ser empregados na técnica de diferenciação aumentou consideravelmente. Com o crescente conhecimento sobre a biologia dessa célula, também aumentou a utilização dessas células, as quais passaram a ser utilizadas em protocolos clínicos. Entretanto, toda essa diversidade de recursos gera dificuldades para comparar os estudos, pois as células apresentam características diferentes. Assim, considerando a importância da geração *in vitro* de células dendríticas a partir de monócitos sanguíneos para o estudo da biologia das DCs, acrescentou-se ao estudo uma revisão bibliográfica intitulada “ *In vitro* generation of human monocyte-derived dendritic cells – a review of

methodological aspects” que aborda os diferentes aspectos metodológicos utilizados nas técnicas de obtenção de DCs *in vitro*.

As células dendríticas apresentam uma morfologia típica (semelhante a uma estrela) bem como expressam marcadores específicos que remetem a sua função de célula apresentadora de antígenos, como níveis elevados de moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC), baixos níveis de CD14 e interação com os linfócitos graças à expressão de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 e CD83 (Banchereau et al., 2000; Théry e Amigorena, 2001).

Como as DCs são diferenciadas a partir de monócitos e visto que os monócitos são as únicas células circulantes do sangue que expressam altos níveis do marcador CD14 em sua membrana (Auffray et al., 2009), é possível utilizar como um indicador de diferenciação dos mesmos a diminuição tanto da expressão quanto do número de células que expressam a molécula CD14. Visto que o processo de diferenciação dos monócitos em DCs *in vitro* ocorre durante os primeiros cinco dias da cultura, a quantidade de células positivas para esse marcador deveria ser baixa, indicando que monócitos foram diferenciados com sucesso. Entretanto, se observa, nos pacientes, nos dados das culturas de mDCs, um número considerável de células positivas para CD14, enquanto que, nas culturas de iDCs essa população é pouco numerosa. É necessário considerar dois aspectos ao analisar esses dados. Primeiramente é crucial ressaltar que as células avaliadas no quinto dia de cultura (iDCs) e as células avaliadas no sétimo dia de cultura (mDCs) são provenientes de poços diferentes da placa de cultura e por isso estão suscetíveis a variações nas condições experimentais o que pode ter provocado as diferenças encontradas. Entretanto, também é preciso ressaltar que dentro dos grupos, tanto controles quanto pacientes, é possível identificar indivíduos que apresentavam altas níveis de diferenciação (ou seja, um número muito baixo de células expressando CD14) bem como indivíduos que não diferenciaram suas células, demonstrando uma variação natural dentro da população já esperada. Na tentativa de minimizar o impacto de tais variações nos resultados, propõe-se uma subdivisão dos indivíduos dentro de seus grupos, classificando-os de acordo com a quantidade de células CD14 positivas.

Ainda sobre monócitos submetidos ao processo de diferenciação *in vitro*, que permaneceram positivos para a molécula CD14, chama a atenção, a expressão do receptor ILT2. Enquanto nas iDCs observa-se uma expressão elevada nos controles, nas mDCs ocorre uma reversão, que apesar de pequena e não significativa estatisticamente, remete a estudos que demonstram a regulação negativa promovida por HLA-G sobre o processo de diferenciação dos monócitos em DCs, que ocorre em portadores de diversos tipos de neoplasias.

Na análise dos dados das culturas de iDCs e mDC, nas células que expressavam os receptores de HLA-G, ILT2 e ILT4, considerando tanto as células CD14⁻ quanto a população CD14⁻ CD80⁺ CD86⁺, é possível notar um maior número (estatisticamente não significativa) de células positivas para ILT4 nos controles. Isso pode estar refletindo um mecanismo fisiológico de indução de tolerância. Para um maior esclarecimento da questão, serão realizadas análises considerando apenas o grupo controle. Na população celular CD14⁻, o trabalho investigou, de maneira exploratória, a ocorrência do isotipo HLA-DQ, que segundo a literatura é o segundo isotipo mais frequente das moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade após o isotipo HLA-DR. As moléculas testadas nos ensaios estão diretamente relacionadas a apresentação antigênica visto que é através delas que os antígenos, inclusive os tumorais, são apresentados para a molécula de TCR dos linfócitos T. Embora a função dos diferentes isotipos ainda não esteja completamente esclarecida, alguns trabalhos tem associado a apresentação antigênica feita via diferentes isotipos a diferentes polarizações da resposta dos LT. Além disso, vale lembrar que o receptor ILT2 parece interagir diretamente com as de MHC durante a sinapse imunológica. Assim, nas condições experimentais utilizadas, não foi possível constatar diferença significativa no número de células que expressavam a molécula HLA-DQ ou a duplo positividade HLA-DQ/HLA-DR. Vale ressaltar que o N amostral pequeno, não permitiu maiores análises.

Considerando ainda os resultados de fenotipagem nas populações de iDCs e das mDCs, foram analisadas a positividade das células para as moléculas co-estimuladoras na população CD14⁻ de maneira separada (CD14⁻CD80⁺, CD14⁻CD83⁺ e CD14⁻CD86⁺) e também conjunta (CD14⁻CD80⁺CD83⁺ e CD14⁻CD80⁺CD86⁺). Nas populações duplo positivas, foram avaliados HLA-G, HLA-

DR, ILT2 e ILT4. Nas culturas de iDCs, a positividade das células para as moléculas CD80 e CD86 mostraram uma distribuição normal e a avaliação dos valores de média, mostram uma elevação (não significativa) no número de células CD86 positivas nos indivíduos controles. Já nas culturas de mDCs, a positividade das células para os marcadores CD80 e CD86 também apresentaram uma distribuição normal sendo que a positividade das células para o marcador CD80 mostrou uma elevação (não significativa) no grupo dos pacientes.

É possível observar que as moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (marcadas nos experimentos com o anticorpo contra HLA-DR) apresentaram uma distribuição normal e, embora seja esperado um aumento na expressão após o processo de maturação, os valores nos pacientes permaneceram quase sem alteração. Já no grupo controle ocorreu uma diminuição do número de células. Aqui novamente, é necessário ressaltar que essa diferença pode ser devido ao desenho experimental, como mencionado anteriormente. A expressão da molécula de HLA-G nessa população não foi avaliada devido ao baixo N amostral.

Os resultados que chamaram a atenção foram vistos nas análises de células que expressam os receptores de HLA-G na população de células CD14⁻CD80⁺CD86⁺. Embora as diferenças não sejam significativas, o número de células que expressam ILT2 foram regulados negativamente pelo processo de maturação em ambos os grupos, porém nas iDCs, chamam a atenção, visto que, as iDCs não são consideradas boas células estimuladoras de linfócitos e a baixa quantidade de células expressando moléculas co-estimuladoras resultaria na indução de anergia do linfócito. Já com relação ao o número de células que expressam o receptor ILT4, nota-se uma diferença no grupo controle, onde é possível observar uma modulação positiva desse pelo processo de maturação o que acentuou ainda mais as diferenças de expressão entre os grupos.

Ainda sobre as culturas de mDCs, observa-se um aumento no número de células que expressam a molécula CD83, bem como da duplo positividade CD80⁺CD83⁺. Essa diferença também ocorre nas iDCs, porém só há significância estatística nas populações de mDC. Tal resultado, remeteu a uma busca na literatura para um maior entendimento da função dessa molécula no processo de apresentação antigênica. Diversos estudos atribuem a essa

molécula um papel desinibição do estado de maturação das DCs e, embora sua função exata não seja conhecida, ela parece ser necessária para a interação DC-LT (Lechmann et al, 2011). Entretanto, ela também parece estar relacionada com a indução de tolerância pelo linfócito T ao antígeno apresentado quando no seu estado solúvel (Boussiotis et al, 1994). Há uma literatura farta de estudos que demonstram a secreção de CD83 solúvel (sCD83) por tumores como uma estratégia de evasão do sistema imune. Entretanto, a secreção de sCD83, por DCs ativadas e linfócitos B, parece ser um mecanismo fisiológico de controle da resposta imune, visto que em indivíduos saudáveis baixos níveis dessa molécula são encontrados no soro (Hock et al, 2001.). Entretanto, em diferentes patologias, esse mecanismo parece estar desequilibrado, visto que, há relatos da ocorrência de uma maior liberação dessa molécula, pelas DC, inibindo a proliferação linfocitária e conseqüentemente induzindo tolerância ao antígeno apresentado. Há evidências de que a atividade da própria DC estaria sendo regulada por esse mecanismo, visto que, a molécula de sCD83 parece bloquear o processo de maturação da DC (Lechmann et al, 2001). Assim, considerando as evidências demonstradas na literatura, sugere-se que o aumento significativo da expressão de CD83 nas MDDC de pacientes de CR, esteja correlacionado com a secreção dessa molécula, uma vez que, a forma solúvel de CD83 é proveniente da clivagem da proteína de membrana CD83 (Lechmann et al, 2011).

Outro resultado que chamou atenção foi a maior expressão do receptor ILT2 nas duas subpopulações de linfócitos T (CD4 e CD8) dos pacientes. Na literatura há diversos relatos sobre tumores (de diversos tipos) que expressam HLA-G em suas membranas e também liberam HLA-G solúvel em seu microambiente (Rouas-Freiss et al., 2005; Carosella et al., 2015). A molécula de ILT2 em LT parece atuar de duas maneiras diferentes colaborando para a indução de um estado de tolerância nessas células. Através da simples interação de HLA-G - ILT2, sendo o HLA-G na forma solúvel ou de membrana, e através de um outro mecanismo descrito por Shiroishi e colegas (Shiroishi et al., 2003). No estudo conduzido por Shiroishi foi demonstrado que em uma situação de apresentação de superantígeno, a molécula de ILT2 pode se co-localizar com o TCR no local de formação da sinapse imunológica e poderia estar funcionando como um co-receptor inibitório ora bloqueando a ligação de CD8 com o MHC I

ora interagindo diretamente com o complexo MHC-peptídeo promovendo a geração de linfócitos T regulatórios (Colonna et al., 1997; Shiroishi et al., 2003; Gregori et al., 2010; Banchereau et al., 2012). Apesar dos antígenos tumorais não se caracterizarem como superantígenos, é razoável supor que no contexto dos pacientes avaliados nessa tese, a maior expressão do receptor ILT2 nos de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ pode estar tornando essas células mais vulneráveis a mecanismos regulatórios via HLA-G.

As análises dos níveis sistêmicos de citocinas no plasma dos participantes do estudo revelaram um aumento significativo nos níveis de IL-6 nos pacientes em comparação com o grupo controle. Esse resultado corrobora a hipótese de que a inflamação pode estar contribuindo de maneira importante para o desenvolvimento e progressão do CR. Na literatura, há evidências de que essa citocina pró- inflamatória, poderia estaria promovendo a proliferação celular, bem como o processo de migração e invasão das células tumorais ao colaborar para a ativação de fatores de transcrição como o STAT3 e o NF-κB (Yu et al., 2009; Taniguchi and Karin., 2018). Além disso, há descrições sobre a possível modulação do processo de angiogênese, no CR, através do aumento da expressão de HIF1α e VEGF (Santoni et al., 2015). É digno de nota que o paciente que apresentou os maiores níveis de IL-6 também foi é único em nossa amostra que apresentava metástase linfonodais. Isso corrobora a associação de uma maior capacidade invasiva de células tumorais e a citocina pró- inflamatória IL-6. Assim, torna-se possível sugerir que a medida dos níveis plasmáticos de IL-6 em pacientes com câncer renal metastático pode ser considerada como uma abordagem complementar para avaliar e/ou prever a progressão do CR.

7 – CONCLUSÃO

Nas investigações conduzidas durante a realização desse trabalho, a hipótese de que o processo inflamatório estaria contribuindo para o desenvolvimento do câncer renal parece ser verdadeira. A ocorrência de metástases linfonodais no paciente que apresentou o maior índice de IL-6, juntamente com diversas descrições na literatura médica, parece ser um indicativo de que há uma correlação dos níveis sistêmicos dessa citocina com o desfecho clínico de tais pacientes.

Entretanto, para um maior entendimento sobre o papel da inflamação no CR, mais estudos são necessários.

Com relação a hipótese de correlação entre os níveis de expressão de membrana dos receptores de HLA-G, ILT2, ILT4 e KIR2DL4 em células sanguíneas de pacientes portadores de câncer renal com o estadiamento da doença, esse estudo não confirmou a hipótese.

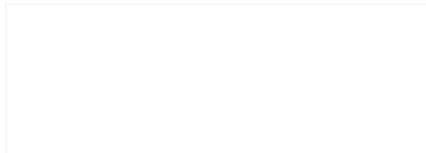
8 – PERSPECTIVAS

Após a análise dos resultados obtidos nesse trabalho, considera-se importante para a conclusão do tema a realização de estudos adicionais como:

- Medição de HLA-G solúvel e de CD83 no plasma dos participantes do estudo.

- Imunohistoquímica para o receptor de IL-6 e para a molécula de HLA-G nas peças de tumor dos pacientes avaliados nesse estudo.

- Aprofundar as análises nos dados de citometria de fluxo, utilizando, inclusive, ferramentas de bioinformática.



9 – REFERÊNCIAS

Abbas, A.K ; Lichmann, A.H ; Pillai, S. *Imunologia celular e molecular*. 2011. 7ª ed, Rio de Janeiro. Elsevier. 592 p.

Akbari, O., et al., 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* 2, p: 725-731.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Disponível em: < <http://www.cancer.org> >. Acesso em: 01 set. 2017.

AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY. Disponível em: < <http://www.asco.org>>. Acesso em: 01 set. 2017.

Atkins, M. B., et al., 2017. Immune checkpoint inhibitors in advanced renal cell carcinoma: experience to date and future directions. *Ann. Oncol.* 28, p:1484-1494.

Baleeiro, R. B; Barbuto, J. A., 2008. Local secretion/shedding of tumor-derived CD83 molecules as a novel tumor escape mechanism. *Mol. Immunol.* 45, p: 3502-3504.

Banchereau, J; Steinman, R. M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392, p:245-252.

Banchereau, J., et al., 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767-811.

Banchereau, J., et al 2012. Immunoglobulin-like transcript receptors on human dermal CD14+ dendritic cells act as a CD8-antagonist to control cytotoxic T cell priming. *Proc. Nat.l Acad. Sci. U. S. A.* 109, p:18885-90.

Banerjee, D.K., et al., 2006. Expansion of FOXP3 high regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood.* 108, p:2655-2661.

Barbuto, J.A., et al., 2004. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer. Immunol Immunother.* 53, p:1111-1118.

Bausch B, et al., 2013. Renal cancer in von Hippel-Lindau disease and related syndromes. *Nat. Rev. Nephrol.* 9, p:529-538.

Becker C, et al, 2006. Regulatory T cells: present facts and future hopes. *Med. Microbiol. Immunol.* 195, p:113-124.

Borges L, Cosman D, 2000. LIRs/ILTs/MIRs, inhibitory and stimulatory Ig-superfamily receptors expressed in myeloid and lymphoid cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, p.209-17.

Boussiotis VA, et al, 1994. Blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: a means to induce tolerance. *Curr. Opin. Immunol.* 6, p:797–807.

Brown R et al, 2012. Trogocytosis generates acquired regulatory T cells adding further complexity to the dysfunctional immune response in multiple myeloma. *Oncoimmunology.* 9, p:1658-1660. a

Brown R et al, 2012. CD86+ or HLA-G+ can be transferred via trogocytosis from myeloma cells to T cells and are associated with poor prognosis. *Blood.* 10, p:2055-63. b

Bruder E., et al., 2004. Morphologic and molecular characterization of renal cell carcinoma in children and young adults. *Am. J. Surg. Pathol.* 28, p:1117-1132.

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

Burnet F. M., 1957. Cancer - a biological approach. *British Medical Journal.* p.841-847,

Cabestré, F. A., et al 1999. HLA-G expression in human melanoma cells: protection from NK cytotoxicity. *J. Reprod. Immunol.* 43, p: 183-193.

Caux C, et al., 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* 180, p:1263-1272.

Carlo M. I, et al., 2016. Checkpoint inhibitors and other novel immunotherapies for advanced renal cell carcinoma. *Nat. Rev. Urol.* 13, p:420-431.

Carlo M.I, et al., 2018. Prevalence of Germline Mutations in Cancer Susceptibility Genes in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. *JAMA Oncol.* 5.

Carmeliet P, Jain R.K, 2011. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 10, p:417-427.

Carosella E.D, et al., 2011. The tolerogenic interplay(s) among HLA-G, myeloid APCs, and regulatory cells. *Blood.* 25, p: 6499-6505.

Carosella E.D, et al., 2015. HLA-G: An Immune Checkpoint. *Molecule. Adv. Immunol.* 127, p:33-144.

Cathcart J.M, et al., 2016. Interleukin-6 increases matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) levels via down-regulation of p53 to drive cancer progression. *Oncotarget.* 7, p:61107-61120.

Caumartin J et al., 2010. Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. *EMBO J.* 5, p:1423-33.

Chow W. H, et al., 1999. Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA.* 5, p: 1628-1631.

Chow W, 2010. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat. Rev. Urol.* 7, p. 245-257.

Colonna M, et al. 1997. A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J. Exp. Med.* 186, p:1809–1818.

Cools N, et al. 2007. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J. Leukoc. Biol.* 82, p:1365-1374.

Cuadros T, et al. 2014. HAVCR/KIM-1 activates the IL-6/STAT-3 pathway in clear cell renal cell carcinoma and determines tumor progression and patient outcome. *Cancer Res.* 74, p:1416-1428.

Chowell D, et al, 2018. Patient HLA class I genotype influences cancer response to checkpoint blockade immunotherapy. *Science.* 359, p:582-587.

Collin M, Bigley V, 2018. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* 154, p: 3-20.

Da Costa LT, et al, 2001. Return of de-differentiation: why cancer is a developmental disease. *Curr. Opinion. Oncol.* 13, p.58–62.

Della Bella S, Gennaro M, Vaccari M, Ferraris C, Nicola S, Riva A, Clerici M, Greco M, Villa ML. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer.* 2003 Oct 20;89(8):1463-72.

Denoix PF, 1946. Enquete permanent dans les centres anticancereaux. *Bull Inst. Nat. Hyg.* 1, p: 70-75.

De Palma M, et al, 2017. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 17, p:457-474.

Devita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer Principles and practice of Oncology*, 2011. 9aed. Filadélfia, Lippincott Williams & Wilkins. 3235 p.

De Visser KE, et al, 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer.* 6, p.24-37.

Dranoff, G. 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 4, p.11- 22.

Dunn G, 2006. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immunol.* 6, p.836-48.

Ehrlich P, 1909. Über den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 5, p. 273–290.

Elinav E, et al, 2013. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat. Rev. Cancer.* 13, p:759-771.

Ellis SA, et al, 1987. Evidence for a novel HLA antigen found on human extravillous trophoblast and a choriocarcinoma cell line. *Immunology.* 4, p: 595-601.

European Association of Urology. Disponível em: < [http: / www.uroweb.org](http://www.uroweb.org)>. Acesso em: 02 jun. 2018.

Facciabene A, et al, 2011. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature.* 13, p. 226-230.

Faries MB, et al, 2001. Calcium signaling inhibits interleukin-12 production and activates CD83(+) dendritic cells that induce Th2 cell development. *Blood.* 98, p:2489-2497.

Fecci PE, et al, 2003. The history, evolution, and clinical use of dendritic cell-based immunization strategies in the therapy of brain tumors. *J. Neurooncol.* 64, p:161-176.

Fehérvári Z, Sakaguchi S, 2004. Control of Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int. Immunol.* 16, p:1769-1780.

Ferlay J, et al, 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer.* 136, p:359-386.

Fishelson Z, et al, 2003. Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol. Immunol.* 40, p:109-123.

Flavell RA, et al, 2010. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat. Rev. Immunol.* 10, p:554-567.

Fridman WH, et al, 2017. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 14, p:717-734.

Fuhrman S, et al 1982. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 6, p: 655-663.

Fukumura D, et al, 2018. Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: opportunities and challenges. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, p:325-340.

Gabrilovich DI, et al, 1997. Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 3, p:483-490.

Gabrilovich DI, 2004. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat. Rev. Immunol.* 4, p:941-952.

Geijtenbeek TB, Van Kooyk Y, 2003. Pathogens target DC-SIGN to influence their fate DC-SIGN functions as a pathogen receptor with broad specificity. *APMIS.* 111, p:698-714.

Gharwan H, Groninger H, 2016. Kinase inhibitors and monoclonal antibodies in oncology: clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 13, p:209-227.

GLOBOCAN. Disponível em: < <http://www.globocan.iarc.fr> >. Acesso em: 01 jun. 2018.

Gossage L, Eisen T, 2010. Alterations in VHL as potential biomarkers in renal-cell carcinoma. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 7, p: 277-288.

Gossage L, et al, 2015. VHL, the story of a tumour suppressor gene. *Nat. Rev. Cancer.* 15, p:55-64.

Gregori S, et al, 2010. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood.*

116, p935–944.

Grivennikov, S.I, et al, 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 19, p:883-99.

Guermonprez P, et al, 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20, p:621-667.

Hanahan D, Weinberg RA, 2001. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144, p:646-674.

Harding FA, et al, 1992. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature*. 356, p:607-609.

Hasebe H, et al, 2000. Dysfunctional regulation of the development of monocyte-derived dendritic cells in cancer patients. *Biomed. Pharmacother.* 54, p:291-298.

Heath WR, Carbone FR, 2001. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 1, p:126-134.

Hock BD, et al, 2001. A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes, and is detectable in normal human sera. *Int. Immunol.* 13, p: 959–967.

HoWangYin KY et al, 2010. Different functional outcomes of intercellular membrane transfers to monocytes and T cells. *Cell Mol Life Sci.* 7, p:1133-45.

Hsieh JJ, et al, 2018. Genomic classifications of renal cell carcinoma: a critical step towards the future application of personalized kidney cancer care with panomics precision. *J. Pathol.* 244, p:525-537.

Hu B, et al, 2010. Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 14, p.21635-40.

Huang JF, et al, 1999. TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells. *Science*. 5441, p:952-954.

Huang FP, et al, 2000. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.* 191, p:435-444.

Imai K, Takaoka A, 2006. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Rev. Cancer.* 6, p:714-727.

- Jemal A, et al, 2011. Global cancer statistics. *Cancer J. Clin.* 61, p.69-90.
- Joosten SC, et al, 2018. Epigenetics in renal cell cancer: mechanisms and clinical applications. *Nat. Rev. Urol.* 15, p:430-451.
- Jones PA, Baylin SB, 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 3, p.415-28.
- Kaelin WG, et al, 2004. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and kidney cancer. *Clin. Cancer Res.* 15, p 6290S-5S.
- Kaliński P, et al, 1997. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J. Immunol.* 159, p:28-35.
- Kang X, et al, 2016. Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: Immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors. *Cell Cycle.* 15, p.25-40.
- Karin M, Greten FR, 2005. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat. Rev. Immunol.* 5, p:749-759.
- Kawai K, et al, 2004. Enhancement of T cell proliferative response against autologous cancer cells of a metastatic renal cell carcinoma patient after unexplained regression. *J. Urol.* 11, p.1130-1132.
- Khan KA, Kerbel RS, 2018. Improving immunotherapy outcomes with anti-angiogenic treatments and vice versa. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, p:310-324.
- Klein G, 1966. Tumor antigens. *Annu. Rev. Microbiol.* 20, p.223-252.
- Kondo K, et al, 2002. Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell.* 1, p:237-246.
- Kurts C, et al, 2010. Cross-priming in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 10, p: 403-414.
- Larsen MH, Hviid TV, 2009. Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease. *Hum. Immunol.* 70, p.1026-34.
- Lechmann M, et al 2001. The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J. Exp. Med.* 194, p:1813–1821.
- Lechmann M, et al, 2002. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for

maturation. *Trends Immunol.* 23, p:273-275.

Lemaoult J, et al, 2005. Immuno-tolerogenic functions of HLA-G: relevance in transplantation and oncology. *Autoimmun. Rev.* 4, p.503-509.

Lutz MB, Schuler G, 2002.. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 23, p:445-449.

Li L, et al, 2007. Hepatoma cells inhibit the differentiation and maturation of dendritic cells and increase the production of regulatory T cells. *Immunol. Lett.* 3114, p:38-45.

Lin WW, Karin M, 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J. Clin. Invest.* 117, p:1175-1183.

Linehan WM, et al, 2010. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nat. Rev. Urol.* 7, p:277-285.

Lokich J, 1997. Spontaneous regression of metastatic renal cancer. Case report and literature review. *Am. J. Clin. Oncol.* 20, p.416-418.

Lo Presti E et al, 2018. $\gamma\delta$ T Cells and Tumor Microenvironment: From Immunosurveillance to Tumor Evasion. *Front. Immunol.* 9, p:1395.

Mackay I, Rosen FS, 2000. The HLA system- First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 7, p. 702-709.

Maher ER, 2019. Hereditary renal cell carcinoma syndromes: diagnosis, surveillance and management. *World J. Urol.* 21.

Mahoney KM, et al, 2015. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, p:561-584.

Mantovani A, et al, 2008. Cancer-related inflammation. *Nature.* 454, p:436-444.

Matsui T, et al, 2009. CD2 distinguishes two subsets of human plasmacytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J. Immunol.* 182, p:6815-6823.

Medical Research Council Renal Cancer Collaborators, 1999. Interferon- α and survival in metastatic renal carcinoma: early results of a randomised controlled trial. *Lancet.* 2, p.14-17.

Mellman I, et al, 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 480, p:480-489.

Merad M, et al, 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31, p:563-604.

Miller JC, et al, 2012. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* 13, p:888-899.

Moch H, 2012. An overview of renal cell cancer: Pathology and genetics. *Semin. Cancer Biol.* 23, p.3-9.

Morris MR, Latif F, 2017. The epigenetic landscape of renal cancer. *Nat. Rev. Nephrol.* 13, p:47-60.

Motzer RJ, et al, 1999. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 17, p.2530-2540.

Nagaraj S, et al, 2009. Regulatory myeloid suppressor cells in health and disease. *Cancer Res.* 69, p:7503-7506.

Naik SH, 2008. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol Cell Biol.* 86, p:439-452.

Neves AR, et al, 2005. Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. *Cancer Immunol. Immunother.* 54, p:61-66.

Oosterwijk E, et al, 2011. Basic research in kidney cancer. *Eur. Urol.* 60, p.622-633.

Pardoll D, 2003. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu. Rev. Immunol.* 21, p :807-839.

Pardoll D, 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer.* 12, p:252-264.

Pistoia AV, et al, 2007. Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? *Seminars in Cancer Biology.* 17, p. 469–479.

Poláková K, et al, 2015. Analysis of HLA-G expression in serum and biopsy samples of kidney transplant recipients. *Immunobiology*. 220, p.533-537.

Probst HC, et al, 2005. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat. Immunol.* 6, p: 280-286.

Pulendran B, 2015. The Varieties of Immunological Experience: Of Pathogens, Stress, and Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 33, p: 563–606.

Rajagopalan S, Long EO, 1999. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J. Exp. Med.* 7, p: 1093-1100.

Randolph GJ, et al, 2002. The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J. Exp. Med.* 4, p: 517-27.

Randolph GJ, et al, 2008. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 26, p:293-316.

Redmond WL, et al, 2005. Distinct requirements for deletion versus anergy during CD8 T cell peripheral tolerance in vivo. *J. Immunol.* 174, p:2046-2053.

Reiman JM, et al, 2007. Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin. Cancer Biol.* 17, p.275-287.

Ricci SB, Cerchiari U, 2010. Spontaneous regression of malignant tumors: Importance of the immune system and other factors. *Oncol. Lett.* 1, p.941-945.

Ricketts CJ, Linehan WM, 2016. The origin, evolution and route to metastasis of clear cell RCC. *Nat. Rev. Nephrol.* 6.

Rini BI, et al, 2009. Renal cell carcinoma. *Lancet.* 28, p.1119-1132.

Riteau B, et al., 2003. Exosomes bearing HLA-G are released by melanoma cells. *Hum. Immunol.* 11, p:1064-1072.

Rosenberg SA, et al, 1987. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med.* 9, p.889-897.

Rosenblatt J, Mcdermott DF, 2001. Immunotherapy for renal cell carcinoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 25, p.793-812.

Rouas-Freiss N, et al, 2005. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res.* 65, p:10139-10144.

Rouas-Freiss N, et al, 2014. The dual role of HLA-G in cancer. *J. Immunol. Res.* 2014, p.1-10.

Routy B, et al, 2018. The gut microbiota influences anticancer immunosurveillance and general health. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15, p:382-396.

Sacco E, et al, 2009. Paraneoplastic syndromes in patients with urological malignancies. *Urol. Int.* 83, p.1-11.

Samaridis J, Colonna M, 1997. Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. *Eur. J. Immunol.* 27, p.660-665.

Santoni M, et al, 2015. Role of STAT3 pathway in genitourinary tumors. *Future Sci. OA.* 1, p:FSO15.

Schreiber DR, et al, 2004a. The Three ES of Cancer Immunoediting. *Annu. Rev. Immunol.* 22, p:329–360.

Schreiber DR, et al, 2004b. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity*, 21, p.137–148.

Sakaguchi S, 2004. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 22, p :531-562.

Scheinecker C, et al, 2002. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J. Exp. Med.* 196, p :1079-1090.

Schödel J, et al, 2016. Hypoxia, Hypoxia-inducible Transcription Factors, and Renal Cancer. *Eur. Urol.* 69, p:646-657.

Shankaran V, et al, 2001. IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 410, p.1107-1111.

Shiroishi M, et al, 2003. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, p:8856-8861.

Shiroishi M, et al, 2006a. Structural basis for recognition of the nonclassical MHC

molecule HLA-G by the leukocyte Ig-like receptor B2 (LILRB2/LIR2/ILT4/CD85d). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 31, p.16412-16417.

Shiroishi M, et al, 2006b. Efficient leukocyte Ig-like receptor signaling and crystal structure of disulfide-linked HLA-G dimer. J. Biol. Chem. 15, p: 10439-10447.

Steege PS, 2016. Targeting metastasis. Nat. Rev. Cancer. 16, p:201-218.

Steinbrink K, et al, 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. J. Immunol. 159, p:4772-4780.

Stein WD, et al, 2012. Analyzing the pivotal trial that compared sunitinib and IFN- α in renal cell carcinoma, using a method that assesses tumor regression and growth. Clin. Cancer Res. 15, p.2374-2381.

Smyth MJ, et al, 2016. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. Nat. Rev. Clin. Oncol. 13, p.143-158.

Schulz O, et al, 2000. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. Immunity. 13, p:453-462.

Segura E, et al, 2012. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. J. Exp. Med. 209, p:653-660.

Steinman RM, Cohn ZA, 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J. Exp. Med. 137, p:1142-1462.

Steinman, R. M; Hawiger, D; Nussenzweig, M. C., 2003. Tolerogenic dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. 21, 685- 711.

Steinman RM, 2012. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. Annu. Rev. Immunol. 30, p: 1-22.

Stockwin LH, et al, 2000. Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. Immunol. Cell Biol. 78, p:91-102.

Schulz O, et al, 2000. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. Immunity. 13, p:453-462.

Snow RM, Schellhammer PF, 1982. Spontaneous regression of metastatic renal cell carcinoma. Urology. 20, p.177-181.

Sullivan NJ, et al, 2009. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene*. 28, p:2940-2947.

Taniguchi K, Karin M, 2018. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat. Rev. Immunol.* 18, p:309-324.

Trinchieri G, 2012. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. *Annu. Rev. Immunol.* 30, p:677-706.

Trowsdale J, Betz AG, 2006. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nat. Immunol.* 3, p: 241-246.

Trowsdale J, et al, 2015. Surveillance of cell and tissue perturbation by receptors in the LRC. *Immunol. Rev.* 267, p.117-136.

Turajlic S, et al, 2018. Kidney cancer: The next decade. *J. Exp. Med.* 14.

Ueno H, et al, 2007. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Rev.* 219, p:118-142.

Verhasselt V, et al, 2004. Induction of FOXP3-expressing regulatory CD4pos T cells by human mature autologous dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 34, p:762-772.

Vieira PL, et al, 2000. Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *J. Immunol.* 164, p:4507-4512.

Weinberg, RA. *A biologia do câncer*. 2008. Porto Alegre: Artmed. 864p

Wilson NS, Villadangos JA, 2004. Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. *Immunol. Cell Biol.* 82, p:91-98.

World Health Organization. Disponível em: <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> >. Acesso em 01 set. 2017.

Worbs T, 2016. Dendritic cell migration in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 17, p:30-48.

Wu L, Liu YJ, 2007. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity*. 26, p:741-750.

Xie TX, et al, 2004. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene*. 23, p:3550-3560.

Yanagihara S, et al, 1998. EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J. Immunol*. 161, p:3096-3102.

Yoshida N, et al, 2002. Interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and interleukin-1beta in patients with renal cell carcinoma. *Br. J. Cancer*. 86, p:1396-1400.

Young JW, et al, 1992. The B7/BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4+ T lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro. *J. Clin. Invest*. 90, p:229-237.

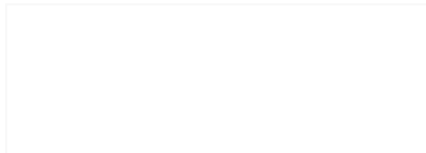
Yu H, et al, 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer*. 9, p:798-809.

Zbar B, et al, 1987. Loss of alleles of loci on the short arm of chromosome 3 in renal cell carcinoma. *Nature*. 327, p:721-724.

Zhou LJ, Tedder TF, 1995. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J. Immunol*. 154, p:3821-3835.

Zitvogel L, et al, 2006. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat. Rev. Immunol*. 6, p.715-727.

Zou W, 2006. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol*. 6, p. 295-307.



10 – ANEXOS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Correlação entre a expressão de moléculas de classe II codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade em células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes portadores de câncer renal e sua resposta linfocitária

Pesquisador: MILTON BERGER

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 11858512.3.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA / UFRGS

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO
Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA / UFRGS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 480.137

Data da Relatoria: 31/10/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa foi aprovado no CEP do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Número do Parecer: 426.290). Foi enviado para análise no CEP da UFRGS pelo motivo de inclusão do nome do co-participante JOSÉ ARTUR BOGO CHIES.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto de pesquisa propõe avaliar uma possível correlação entre os isotipos de HLA (HLA-DR, HLA-DP e HLA-DQ) expressos em monócitos de pacientes portadores de câncer renal com o tipo de resposta linfocitária desenvolvida por tais pacientes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Foram apresentados os riscos e os benefícios da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo CEP do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farroupilha

CEP: 90.040-060

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4085

E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

Continuação do Parecer: 480.137

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram anexados. Porém, como um servidor da UFRGS foi incluído como co-participante, recomenda-se a inclusão de folha de rosto devidamente assinada pelo representante legal da UFRGS.

Recomendações:

Recomenda-se aprovação do projeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Como o projeto de pesquisa tem aprovação do CEP do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS, o CEP da UFRGS reitera a aprovação. Para a completa documentação do projeto de pesquisa, recomenda-se aos pesquisadores a inclusão nos termos de apresentação obrigatória de folha de rosto devidamente assinada pelo representante legal da UFRGS.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 05 de Dezembro de 2013

Assinador por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro

Bairro: Farroupilha

CEP: 90.040-060

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3308-3738

Fax: (51)3308-4085

E-mail: etica@propesq.ufrgs.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – CONTROLE -

ESTUDO: Correlação entre a expressão de moléculas de classe II codificadas pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade em células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes portadores de câncer renal e sua resposta linfocitária

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você. Este estudo visa um melhor entendimento sobre a função das diferentes moléculas que participam dos processos de defesa do organismo contra o câncer renal. Caso você aceite participar desse estudo, os procedimentos envolvidos serão os seguintes:

- I) Será feita 1 (uma) coleta de 30 mL de sangue periférico (± 2 colheres de sopa).
- II) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o tratamento podendo apenas causar um pequeno incômodo, dor, no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue).
- III) A participação neste projeto não tem objetivo de tratamento, bem como não acarretará qualquer despesa para você.
- IV) Você terá a liberdade de desistir ou de interromper a participação neste estudo no momento em que desejar sem necessidade de qualquer explicação; a desistência não causará nenhum prejuízo à sua saúde ou ao bem estar físico e não interferirá no atendimento ou tratamento médico que está sendo realizado na instituição.
- V) Nessa pesquisa serão estudadas as chamadas células dendríticas (DC) e as células T (linfócitos) que são células que fazem parte do sistema de proteção do organismo. As características dessas células como, por exemplo, moléculas de membrana, bem como as suas interações são o objeto desse estudo.
- VI) Os resultados obtidos durante este estudo serão divulgados em publicações científicas sem que seus dados pessoais sejam mencionados, ou seja, seu nome não aparecerá nas publicações decorrentes do estudo.
- VII) Solicitamos a sua autorização para acessar os dados do seu prontuário, pois estes são necessários para a avaliação do seu sistema de defesa.
- VIII) Caso você desejar, poderá pessoalmente tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa:
() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- IX) Você não terá benefícios diretos pela participação neste estudo, mas poderá contribuir para o avanço do conhecimento sobre o assunto.

X) Se você tiver alguma dúvida poderá contatar o pesquisador responsável, Dr. Milton Berger, através do telefone 3359 8286 ou Farm. Giovana Cechim através do telefone 33086737.

XI) O comitê de ética em pesquisa do HCPA poderá ser contatado através do telefone 33597640.

XII) Você assinará este termo em duas vias e receberá uma delas.

Eu,.....(nome)
abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo “Correlação entre a expressão de moléculas de classe II codificadas pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade em células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes portadores de câncer renal e sua resposta linfocitária”. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Porto Alegre, de de 20

Assinatura do(a) paciente

Nome e assinatura do responsável pela aplicação do TCL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PACIENTE -

ESTUDO: Correlação entre a expressão de moléculas de classe II codificadas pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade em células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes portadores de câncer renal e sua resposta linfocitária.

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você. Este estudo visa um melhor entendimento sobre a função das diferentes moléculas que participam dos processos de defesa do organismo contra o câncer renal. Caso você aceite participar desse estudo, os procedimentos envolvidos serão os seguintes:

- I) Será feita 1 (uma) coleta de 30 mL de sangue periférico (± 2 colheres de sopa).
- II) Essa coleta será feita apenas para este estudo e em nada influenciará o tratamento podendo apenas causar um pequeno incômodo, dor, no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue).
- III) Durante a cirurgia, será feita a coleta de uma pequena parte do tumor retirado.
- IV) A participação neste projeto não tem objetivo de tratamento, bem como não acarretará qualquer despesa para você.
- V) Você terá a liberdade de desistir ou de interromper a participação neste estudo no momento em que desejar sem necessidade de qualquer explicação; a desistência não causará nenhum prejuízo à sua saúde ou ao bem estar físico e não interferirá no atendimento ou tratamento médico que está sendo realizado na instituição.
- VI) Nessa pesquisa serão estudadas as chamadas células dendríticas (DC) e as células T (linfócitos) que são células que fazem parte do sistema de proteção do organismo. As características dessas células como, por exemplo, moléculas de membrana, bem como as suas interações são o objeto desse estudo.
- VII) Os resultados obtidos durante este estudo serão divulgados em publicações científicas sem que seus dados pessoais sejam mencionados, ou seja, seu nome não aparecerá nas publicações decorrentes do estudo.
- VIII) Solicitamos a sua autorização para acessar os dados do seu prontuário, pois estes são necessários para a avaliação do seu sistema de defesa.
- IX) Caso você desejar, poderá pessoalmente tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa:
 - () Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
 - () Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

X) Você não terá benefícios diretos pela participação neste estudo, mas poderá contribuir para o avanço do conhecimento sobre o assunto.

XI) Se você tiver alguma dúvida poderá contatar o pesquisador responsável, Dr. Milton Berger, através do telefone 3359 8286 ou Farm. Giovana Cechim através do telefone 33086737.

XII) O comitê de ética em pesquisa do HCPA poderá ser contatado através do telefone 33597640.

XIII) Você assinará este termo em duas vias e receberá uma delas.

Eu,.....(nome)
abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo “Correlação entre a expressão de moléculas de classe II codificadas pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade em células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes portadores de câncer renal e sua resposta linfocitária”. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Porto Alegre, de de 20

Assinatura do(a) paciente

Nome e assinatura do responsável pela aplicação do TCL
