

ROBERTO PEREIRA GONZALEZ

**Efeito da melatonina sobre a diferenciação ativação e
função de células dendríticas**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Insitituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Imunologia).

São Paulo
2006

ROBERTO PEREIRA GONZALEZ

**Efeito da melatonina sobre a diferenciação ativação e
função de células dendríticas**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Insitituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração:
Imunologia

Orientador:
Prof. Dr. JOSÉ ALEXANDRE
MARZAGÃO BARBUTO

São Paulo
2006

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

© reprodução total

Gonzalez, Roberto Pereira.

Efeitos da melatonina sobre a diferenciação, ativação e função de células dendríticas / Roberto Pereira Gonzalez. -- São Paulo, 2006.

Orientador: José Alexandre Marzagão Barbuto.

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

Versão do título para o inglês: Melatonin effects on dendritic cell differentiation, activation and function.

Descritores: 1. Melatonina 2. Células que apresentam antígenos 3. Diferenciação 4. Ativação 5. Células dendríticas 6. Cultura de células I. Barbuto, José Alexandre Marzagão II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB026/2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Roberto Pereira Gonzalez.

Título da Dissertação: Efeito da melatonina sobre a diferenciação, ativação e função de células dendríticas.

Orientador(a): José Alexandre Marzagão Barbuto.

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

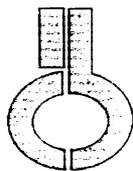
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a):
Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a):
Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a):
Assinatura:
Nome:
Instituição:



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 06608-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@ icb.usp.br

São Paulo, 07 de abril de 2004

PARECER 562/CEP

Prezado Senhor

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua quadragésima quarta reunião realizada em 06-abril-04, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "Efeito da melatonina sobre a diferenciação, ativação e função de células dendríticas".

Informo que, após análise do projeto, esta comissão resolveu **acatar o parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Beneficente de Senhoras Hospital Sírio Libanês**.

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

Cordialmente,

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

Ilmo. Sr.
ROBERTO PEREIRA GONZALES
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP



**SOCIEDADE BENEFICENTE DE SENHORAS
HOSPITAL SÍRIO LIBANÊS
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa**

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Data da Aprovação: São Paulo, 07 de março de 2001

Título do Protocolo: "Estudo clínico de fase II de Vacinação de pacientes com câncer de células renais e melanoma metastático com células dendríticas-tumorais" - Protocolo N.º: HSL2001/01

Nomes dos Investigadores: Dr. Ricardo José Marques

Aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Beneficente de Senhoras Hospital Siro Libanês avaliou o Protocolo de Estudo N.º: HSL2001/01, da data 05/02/01", e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido da versão português , estando de acordo com as Resoluções nº 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde, em 07/03/2001 e o aprovou.

Solicitamos informar-nos do andamento da pesquisa a cada 6 meses, após a data de aprovação pela CONEP.

Membros do Comitê de Ética em Pesquisa

	<i>Cargo</i>
Prof. Dr. Elias David Neto	Presidente
Gleida Andreia Kessanis	Secretária
Dr. Fábio Henrique Gregory	Membro Efetivo
Dr. Luiz Antonio M. César	Membro Efetivo
Dr. Ricardo José Marques	Membro Efetivo
Enf. Helen M. B. S. Petrolino	Membro Efetivo
Sr. Nelson Jafet	Membro Efetivo
Sr. Marcos Aidar	Membro Efetivo
Sra. Maria Cláudia Sebe	Membro Efetivo
Sra. Angela H. Chede	Membro Efetivo
Dr. Alfredo Rizkallah Filho	Membro Efetivo

Prof. Dr. Elias David Neto
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
S.B.S. Hospital Siro Libanês

À minha esposa, Roseli Kubo Gonzalez,
pelo carinho e infinito apoio e, por trazer
mais luz e amor ao meu caminho, sem
isto, tudo seria praticamente impossível.

Aos meus pais e aos meus irmãos pela educação, confiança, apoio, incentivo e por estarem sempre contribuindo para minha formação.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto, meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos e a amizade que cultivava entre nós alunos e pelo exemplo de cientista, autêntico, responsável, sempre disposto a enfrentar desafios e por guiar-me com sabedoria na viagem pelo fascinante mundo das ciências.

À Dra. Doris Ricci pelo apoio e incentivo que me dedicou durante os anos da graduação e até agora.

Ao amigo Dr. J. Geraldo Beggiano por me mostrar o valor das ciências e pelo incentivo.

Ao amigo João Carlos Violardi Lopes pela longa amizade, sincera e desinteressada e pelas longas conversas filosóficas.

À Patrícia Cruz Bergami-Santos (Patty) pela amizade, espírito de cooperação e pelos momentos de descontração e reflexão.

À Cris Jurado pela amizade, companheirismo e longas horas de conversa sobre nossa trajetória científica.

Às Profas. Dras. Regina P. Markus, Karina Bastos e Sueli O. Silva, pela participação e seriedade com que atuaram no meu Exame de Qualificação.

À Profa. Dra. Marília Seelaender pelos ensinamentos e por despertar o meu interesse pela melatonina.

À Célia pelo suporte técnico, amizade e, pelos momentos de boa prosa.

À Giovana pela amizade e pela disposição em ajudar quando comecei.

À Andréia por sua amizade, disposição em ajudar e pelos bate-papos.

À “menina” Clara pelo companheirismo na jornada através da iniciação científica, prova de ingresso e mestrado, valeu.

À Marisa pelo companheirismo e momentos agradáveis.

Ao Márcio, Renato e João Paulo por sua amizade, cooperação e momentos de descontração.

Aos novos membros do laboratório: Ana Paula, Simone, Vivian e Bruno, cujos questionamentos nos faz procurar saber mais.

Aos amigos que deixaram o nosso convívio diário e foram em busca do pote de ouro no fim do arco-íris: Luciene, Camila, Alexandra, Luiz Felipe, Ângela e Sandra.

À todos os professores que, com seus ensinamentos, participaram de minha formação.

Às secretárias Valéria, Jô e Eni por ajudar em tudo quanto possível.

Aos funcionários da portaria Milton, Otacílio, Nelson, Ailton, André, Moisés, Cristiano e Roberto pela competência com que executam suas funções.

Às bibliotecárias e bibliotecários do ICB pela presteza e dedicação.

À todos da Biocop que sempre se dispuseram a fazer um ótimo serviço com agilidade.

À todos os colegas da “Imuno” pela convivência e troca de conhecimento ao longo destes anos.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

À FAPESP pelo suporte ao laboratório e apoio financeiro ao projeto temático 04/09956-0.

*Os caminhos que conduzem o homem ao saber
são tão maravilhosos quanto o próprio saber.*

Kepler

RESUMO

GONZALEZ, R. P. Efeito da melatonina sobre a diferenciação, ativação e função de Células Dendríticas. 2006. 104 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Células dendríticas (DC) são as principais células apresentadoras de antígenos e, ultimamente, têm se tornado foco de vários estudos procurando usá-las na imunoterapia, principalmente do câncer. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da melatonina (MLT) sobre a diferenciação e ativação *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em DC. Estudou-se, por citometria de fluxo, o fenótipo de membrana (expressão de CD14, CD80, CD86, CD83, CD11c, CD1a, CD40, HLA-DR, HLA-I e CCR7) de células diferenciadas ou ativadas sob ação de uma dose fisiológica (1 nM) ou farmacológica (1 μ M) de MLT em comparação às citocinas IL-4 e GM-CSF e TNF- α . Nestas mesmas culturas avaliou-se a secreção de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL10, IL12p40, IL12p70 e IL2), por ELISA, e o potencial aloestimulador das células obtidas. Esta última por co-cultura com PBMC não-aderentes, coradas com CFSE. Os resultados indicam que a MLT induz tanto diferenciação de PBMC em DC, quanto ativação de DC, em níveis semelhantes aos obtidos com o uso das citocinas, IL-4, GM-CSF e TNF- α .

ABSTRACT

GONZALEZ, R. P. Melatonin effect on dendritic cell differentiation, activation and function. 2006. 104 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciência Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Dendritic cells (DC) are the major antigen presenting cells and lately have been the focus of many trials attempting their use for immunotherapy, mainly in cancer. The objective of this research was to evaluate melatonin (MLT) *in vitro* effects upon differentiation and activation of peripheral blood mononuclear cells-derived DC. The membrane phenotype (flow cytometry-determined expression of CD14, CD80, CD86, CD83, CD11c, CD1a, CD40, HLA-DR, HLA-I and CCR7) of differentiated or activated cells treated with physiological (1nM) or pharmacological (1µM) MLT concentrations, was compared to that of IL-4, GM-CSF and TNF-α-treated cells. In the same cultures cytokine secretion was evaluated by ELISA (for TNF-α, IFN-γ, IL10, IL12p40, IL12p70 and IL2) and the cells' allostimulatory potential, by co-culture with CFSE-labeled allogeneic lymphocytes. The results indicate that MLT is able to induce *in vitro* DC differentiation and activation, in a similar way as the cytokines, IL-4, GM-CSF and TNF-α.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Resultados obtidos através da análise de células selecionadas por “back gate” definido pela expressão de CD11c e HLA-DR. Os números no interior dos quadrantes representam as porcentagens de positivos para cada marcador. 45
- Figura 2.** Resultados obtidos através da análise por gate desenhado por tamanho e granulocidade. Os números no interior dos quadrantes representam as porcentagens de positivos para cada marcador. 46
- Figura 3.** Expressão do marcador CD86 em culturas tratadas com citocinas (GM-CSF e IL-4), com MLT 1 μ M, MLT 1 η M, citocinas combinadas com MLT 1 μ M e citocinas combinadas com MLT 1 η M. Os números no interior dos histogramas correspondem a porcentagem de células positivas para o marcador. Controle = histograma vazado; amostra=histograma cheio. Cito = citocinas (GM-CSF + IL4). 52
- Figura 4.** Porcentagem de expressão do marcador CD86 em células que foram tratadas com citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1 η M ou citocinas em combinação com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Anova p = 0,0531 para citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Anova p = 0,7833 para citocinas isoladamente ou combinada com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4). 53
- Figura 5.** Porcentagem de expressão do marcador CD14 por células que foram tratadas com citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1 η M ou citocinas em combinação com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Anova p = 0,0057 para citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1 η M; teste de Tukey p < 0,01 para citocinas vs MLT 1 μ M e p < 0,05 para citocinas vs MLT 1 η M. Anova p = 0,7291 para citocinas isoladamente ou combinadas com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4). 54
- Figura 6.** Porcentagem de expressão do marcador CD80 por células que foram tratadas com citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1 η M ou citocinas em combinação com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Anova p = 0,0288 para citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1 η M; teste de Tukey p < 0,05 para citocinas vs MLT 1 η M. Anova p = 0,1340 para citocinas isoladamente ou combinadas com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4). 55
- Figura 7.** Porcentagem de expressão do marcador CD83 por células que foram tratadas com citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1 η M ou citocinas em combinação com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Anova p = 0,1840 para citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Anova p = 0,4384 para citocinas isoladamente ou combinada com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4). 56
- Figura 8.** Porcentagem de expressão do marcador CD11c por células que foram tratadas com citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1 η M, ou citocinas em combinação com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Anova p = 0,001 para citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1 η M; teste de Tukey p < 0,01 para citocinas vs MLT 1 μ M e citocinas vs MLT 1 η M. Anova p = 0,6927 para citocinas isoladamente ou combinadas com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4). 57

- Figura 9.** Ensaio de proliferação pela “diluição” da marcação com CFSE de células respondedoras co-cultivadas com células diferenciadas sob diferentes tratamentos: citocinas, MLT 1 μ M, MLT 1 η M, citocinas com MLT 1 μ M e, citocinas com MLT 1 η M. Números no interior dos histogramas representam o índice de proliferação. Controle = Células respondedoras cultivadas sem estímulo. 58
- Figura 10.** Resposta proliferativa de PBMC não-aderentes quando em contato com células estimuladoras tratadas com citocinas, MLT 1 μ M, MLT 1 η M ou tratadas com citocinas combinadas com MLT 1 μ M ou citocinas combinadas com MLT 1 η M. Anova p = 0,2426. Cito = Citocinas (GM-CSF e IL-4). 59
- Figura 11.** Produção de TNF- α por células cultivadas sob diferentes tratamentos. As células foram tratadas com citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1 η M (n=5) ou citocinas combinadas com MLT 1 μ M ou citocinas combinadas com MLT 1 η M (n=4). Anova p = 0,0206 para células tratadas com citocinas ou MLT 1 μ M ou MLT 1 η M; teste de Tukey não apresentou diferenças. Anova p = 0,1904 para células tratadas com citocinas, citocinas com MLT 1 μ M e, citocinas com MLT 1 η M. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4). 60
- Figura 12.** Produção de IFN- γ por células cultivadas sob diferentes tratamentos. As células foram tratadas com citocinas, MLT 1 μ M, MLT 1 η M, citocinas combinadas com MLT 1 μ M ou citocinas combinadas com MLT 1 η M (n=6). Anova p = 0,0052; teste de Tukey p < 0,05 para citocinas vs MLT 1 μ M, MLT 1 μ M vs citocinas com MLT 1 μ M e MLT 1 μ M vs citocinas com MLT 1 η M. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4). 60
- Figura 13.** Produção de IL-10 por células cultivadas sob diferentes tratamentos. As células foram tratadas com citocinas, MLT 1 μ M, MLT 1 η M (n=7), ou citocinas combinadas com MLT 1 μ M ou citocinas combinadas com MLT 1 η M (n=6). Anova p = 0,1050 para citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Anova p = 0,7575 para citocinas, citocinas com MLT 1 μ M ou citocinas com MLT 1 η M. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4). 61
- Figura 14.** Produção de IL-12p40 por células cultivadas sob diferentes tratamentos. As células foram tratadas com citocinas, MLT 1 μ M, MLT 1 η M, citocinas combinadas com MLT 1 μ M ou citocinas combinadas com MLT 1 η M (n=6). Anova p = 0,797. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4). 61
- Figura 15.** Produção de IL-12p70 por células cultivadas sob diferentes tratamentos. As células foram tratadas com citocinas, MLT 1 μ M, MLT 1 η M (n=4), ou citocinas combinadas com MLT 1 μ M ou citocinas combinadas com MLT 1 η M (n=3). Anova p = 0,3837 para citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Anova p = 0,1201 para citocinas, citocinas com MLT 1 μ M ou citocinas com MLT 1 η M. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4). 62
- Figura 16.** Produção de IL-2 por células cultivadas sob diferentes tratamentos. As células foram tratadas com citocinas, MLT 1 μ M, MLT 1 η M, citocinas combinadas com MLT 1 μ M ou citocinas combinadas com MLT 1 η M (n=5). Anova p = 0,7848. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4). 62

- Figura 17.** Ensaio de proliferação pela “diluição” da marcação com CFSE de células respondedoras co-cultivadas com células diferenciadas por tratamento com citocinas e ativadas (nos dois últimos dias de cultura) com TNF- α , MLT 1 μ M, MLT 1 η M ou BCG. Números no interior dos histogramas representam o índice de proliferação. Controle = Células respondedoras cultivadas sem estímulo. 64
- Figura 18.** Resposta proliferativa dos linfócitos quando em contato com células estimuladoras diferenciadas com citocinas e ativadas com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M ou BCG, comparadas às diferenciadas com citocinas e ativadas com TNF- α . Anova p = 0,3560. 65
- Figura 19.** Produção de IFN- γ por células diferenciadas por citocinas (GM-CSF e IL-4) e ativadas com TNF- α ou MLT 1 μ M ou MLT 1 η M ou BCG (n=6). Anova p = 0,0548. 66
- Figura 20.** Produção de IL-10 por células diferenciadas por citocinas (GM-CSF e IL-4) e ativadas com TNF- α ou MLT 1 μ M ou MLT 1 η M ou BCG (n=9). Anova p = 0,4185. 66
- Figura 21.** Produção de IL-12p40 por células diferenciadas por citocinas (GM-CSF e IL-4) e ativadas com TNF- α ou MLT 1 μ M ou MLT 1 η M ou BCG (n=8). Anova p = 0,2473. 67
- Figura 22.** Produção de IL-2 por células diferenciadas por citocinas (GM-CSF e IL-4) e ativadas com TNF- α ou MLT 1 μ M ou MLT 1 η M ou BCG (n=4). Anova p = 0,7195. 67
- Figura 23.** Expressão dos marcadores CD83 e CCR7 em células diferenciadas por MLT 1 μ M e MLT 1 η M e ativadas por MLT 1 μ M e MLT 1 η M, comparadas ao modo usual de diferenciação (GM-CSF e IL-4) e de ativação (TNF- α). Números no interior dos histogramas representam a porcentagem de células positivas para o marcador. Histograma cheio = amostra; histograma vazado = controle isotípico. 68
- Figura 24.** Resposta proliferativa dos linfócitos quando em contato com células estimuladoras diferenciadas com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M e ativadas com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M, respectivamente, comparadas às diferenciadas com citocinas e ativadas com TNF- α . Anova p = 0,1133. Cito = Citocinas (GM-CSF e IL-4). 70
- Figura 25.** Produção de IFN- γ por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou diferenciadas por MLT 1 μ M e ativadas por MLT 1 μ M ou diferenciadas por MLT 1 η M e ativadas por MLT 1 η M (n=5). Anova p = 0,0123. Teste de Tukey P < 0,05 para citocinas vs MLT 1 μ M. Cito = Citocinas (GM-CSF e IL-4). 71
- Figura 26.** Produção de IL-10 por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou diferenciadas por MLT 1 μ M e ativadas por MLT 1 μ M ou diferenciadas por MLT 1 η M e ativadas por MLT 1 η M (n=5). Anova p = 0,0816. Cito = Citocinas (GM-CSF e IL-4). 71
- Figura 27.** Produção de IL-12p40 por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou diferenciadas por MLT 1 μ M e ativadas por MLT 1 μ M ou diferenciadas por MLT 1 η M e ativadas por MLT 1 η M (n=5). Anova p = 0,8020. Cito = Citocinas (GM-CSF e IL-4). 72

- Figura 28.** Produção de IL-12p70 por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou diferenciadas por MLT 1 μ M e ativadas por MLT 1 μ M ou diferenciadas por MLT 1 η M e ativadas por MLT 1 η M (n=5). Anova p = 0,1343. Cito = Citocinas (GM-CSF e IL-4). 72
- Figura 29.** Produção de IL-2 por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou diferenciadas por MLT 1 μ M e ativadas por MLT 1 μ M ou diferenciadas por MLT 1 η M e ativadas por MLT 1 η M (n=5). Anova p = 0,3952. Cito = Citocinas (GM-CSF e IL-4). 73
- Figura 30.** Resposta proliferativa dos linfócitos quando em contato com células estimuladoras diferenciadas com citocinas e ativadas com TNF- α ou MLT 1 μ M com TNF- α ou MLT 1 η M com TNF- α (n = 6). Anova p = 0,4911. 75
- Figura 31.** Produção de IFN- γ por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou por MLT 1 μ M combinada com TNF- α ou ativadas por MLT 1 η M combinada com TNF- α . Anova p = 0,8889. 76
- Figura 32.** Produção de IL-10 por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou por MLT 1 μ M combinada com TNF- α ou ativadas por MLT 1 η M combinada com TNF- α . Anova p = 0,3512. 76
- Figura 33.** Produção de IL-12p40 por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou por MLT 1 μ M combinada com TNF- α ou ativadas por MLT 1 η M combinada com TNF- α . Anova p = 0,0034. Teste de Tukey não apresentou diferenças. 77
- Figura 34.** Produção de IL-12p70 por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou por MLT 1 μ M combinada com TNF- α ou ativadas por MLT 1 η M combinada com TNF- α . Anova p = 0,4522. 77
- Figura 35.** Produção de IL-2 por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou por MLT 1 μ M combinada com TNF- α ou ativadas por MLT 1 η M combinada com TNF- α . Anova p = 0,7143. 78

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Porcentagem de células positivas para as moléculas de membrana de células diferenciadas por citocinas e ativadas por MLT. 63
- Tabela 2** - Porcentagem de células positivas para as moléculas de membrana, que foram diferenciadas e ativadas por MLT. 69
- Tabela 3** - Porcentagem dos marcadores de membrana de células ativadas com MLT combinada com TNF- α . 74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AET – [S(2-aminoethyl)-isothioronium bromide hydrobromide]
SRBC – Sheep red blood cells (hemácias de carneiro)
ANOVA – Análise da Variância
CCR7 – Chemokine receptor 7 (Receptor 7 para quimiocina)
CD – Cluster de diferenciação
APCs - Antigen presenting cells (Células apresentadoras de antígenos)
BCG – Bacilo Calmette-Guérin
CR3 – Receptor para a fração 3 do complemento
CEP – Comissão de Ética em Pesquisa
CFSE – éster de succinimidil-5-(e-6)-diacetato de carboxifluoresceína
DCs – Células dendríticas
DMSO – Dimetilsulfoxido
EAE – Encefalomielite Experimental Autoimune
ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fc – Fragmento cristalizável da Imunoglobulina
FcR – Receptor para porção Fc
G – aceleração da gravidade
GM-CSF – Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)
HIOMT – Hidroxindol-O-metiltransferase
HLA-DR – Human leukocyte antigen-DR (usado como indicador da expressão de moléculas de classe II, codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade humano)
HLA-I – “Human leukocyte antigen” (antígenos codificados pelo complexo principal de histocompatibilidade humano) de classe I
HPLC – High performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta performance)
HSL – Hospital Sírio Libanês
IFN – Interferon
IFN γ - Interferon do tipo gama
IL - Interleucina
IL3R-alfa - Receptor para interleucina 3 do tipo alfa
LC – Langerhans cells
LPS – Lipopolisacáride (endotoxina)
MCM – Monocyte conditioned medium (meio condicionado de monócitos)
M-CSF – Macrophage-colony stimulating factor (fator estimulador de colônias de macrófagos)
MHC – Major histocompatibility complex (complexo principal de histocompatibilidade)
MLR – Mixed Lymphocyte Reaction (reação mista de linfócitos)
MLT – Melatonina
MBP – Myelin basic protein (proteína básica de mielina)
MSH – Melanocyte stimulating hormone (hormônio estimulador de melanócitos)
NAT – N-acetil-transferase
NK – Células NK
OVA - ovalbumina
oxLDL – LDL oxidada
PACAP – Polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária
PBMCs – Peripheral Blood Mononuclear Cells – (células mononucleares do sangue periférico)

PBS – Phosphate buffered saline (solução salina tamponada com fosfato)
PBS-BSA – Solução salina tamponada com fosfato acrescida de Albumina bovina
PGE-2 – Prostaglandina-E2
PHA – Fitohemaglutinina A
R-10 – Meio de cultura RPMI contendo 10% de soro fetal bovino
RNA – ácido ribonucléico
ROI – Reativos intermediários do oxigênio
rpm – Rotações por minuto
RPMI 1640 – Meio de cultura
SCF – Stem cell factor (fator de células tronco)
TGF – Transforming growth factor (fator de transformação do crescimento)
TNF – Tumor necrosis factor (fator de necrose tumoral)
VEGF – vascular endothelial growth factor (fator de crescimento vascular-endotelial)
VIP – Vasoactive intestinal peptide (Peptídeo intestinal vasoativo)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	OBJETIVOS.....	40
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	41
	3.1 Casuística.....	41
	3.2 Isolamento de células mononucleares.....	41
	3.3 Cultura para diferenciação de células dendríticas.....	42
	3.4 Coleta e análise fenotípica das células.....	42
	3.5 Análises dos dados obtidos por citometria de fluxo.....	44
	3.6 Ensaio de proliferação.....	46
	3.7 Obtenção das células respondedoras.....	47
	3.7.1 Separação de células mononucleares não aderentes.....	47
	3.7.2 Separação de linfócitos T pelo método de rosetas.....	48
	3.8 ELISAs (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	49
	3.9 Análise estatística.....	50
4	RESULTADOS.....	51
	4.1 Efeito da Melatonina sobre a diferenciação das células.....	51
	4.1.1 Fenótipo de membrana.....	51
	4.1.1.1 Expressão de CD86.....	51
	4.1.1.2 Expressão de CD14.....	54
	4.1.1.3 Expressão de CD80.....	55
	4.1.1.4 Expressão de CD83.....	56
	4.1.1.5 Expressão de CD11c.....	57
	4.1.2 Aloestimulação pelas células diferenciadas.....	58
	4.1.3 Produção de citocinas nas culturas de diferenciação.....	59
	4.2 Efeito da melatonina sobre a ativação de células dendríticas diferenciadas sob ação de citocinas.....	63
	4.2.1 Fenótipo de membrana.....	63
	4.2.2 Aloestimulação pelas células ativadas.....	64
	4.2.3 Produção de citocinas.....	65
	4.3 Efeito da melatonina na ativação de células diferenciadas sob ação da melatonina.....	68
	4.3.1 Fenótipo de membrana.....	68
	4.3.2 Aloestimulação pelas células diferenciadas e ativadas por MLT.....	70
	4.3.3 Produção de citocinas nas culturas diferenciadas e ativadas por MLT.....	70
	4.4 Efeito da ativação por melatonina combinada com TNF- α em células diferenciadas por citocinas.....	73
	4.4.1 Fenótipo de membrana.....	73
	4.4.2 Aloestimulação pelas células ativadas por melatonina combinada com TNF- α em células diferenciadas por citocinas.....	74
	4.4.3 Produção de citocinas.....	75
5	DISCUSSÃO.....	79
6	CONCLUSÃO.....	86
	REFERÊNCIAS.....	88

1 INTRODUÇÃO

Frente à resistência do câncer avançado às formas usuais de tratamento, a busca por terapias alternativas tem conduzido as pesquisas por diversos caminhos, freqüentemente na área da imunoterapia. Pode-se citar como exemplo o uso do bacilo Calmette-Guérin em câncer superficial de bexiga (AKASA *et al*, 1995), o uso de citocinas, principalmente no carcinoma renal (BUZAID *et al*, 1987; BUZIO *et al*, 2001; ALATRASH *et al*, 2004) e no melanoma (LEGHA; BUZAID, 1993; BUZAID; LEGHA, 1994; RADNI *et al*, 2003; ALATRASH *et al*, 2004), a combinação de citocinas e drogas quimioterápicas (DUTCHER *et al*, 2000; WAGENER *et al*, 2002; PADRIK *et al*, 2004; SHINOJIMA *et al*, 2004) em carcinomas renais metastáticos (HOFMOCKEL *et al*, 1996) e melanoma (GOGAS *et al*, 2004), o uso de anticorpos monoclonais (LARA *et al*, 2004; LEONARD *et al*, 2004; HASSAN *et al*, 2004; COLEMAN *et al*, 2003) e o uso de vacinas (MORSE, 1997; MACKENSEN, 2000; NESTLE, 1998, BARBUTO *et al*, 2004).

Para a produção de vacinas terapêuticas contra o câncer, diversas estratégias têm sido utilizadas, tais como a “fabricação” de peptídeos imunogênicos (ROSENBERG *et al*, 1998), a combinação de extratos tumorais ou antígenos purificados e diferentes adjuvantes (OOSTERWIJK-WAKKA *et al*, 2002; PORTIELJE *et al*, 2003; DE VRIES *et al*, 2003; MCNEEL *et al*, 2003; SUZUKI *et al*, 2004) e as células dendríticas (DCs), potentes desencadeadoras da resposta imune (NESTLE *et al*, 1998; BARBUTO *et al*, 2004).

As células dendríticas são células apresentadoras de antígenos (APCs) e dentre as várias populações celulares capazes de atuar como tais, as mais eficientes (BOOG *et al*, 1985; BANCHEREAU *et al*, 2000; FONG & ENGLEMAN, 2000). Estas células são capazes de ativar, eficientemente, linfócitos T virgens, dando-lhes a capacidade de atuar como células efetoras do sistema imune (STEINMAN *et al*, 1973; INABA *et al*, 1983; INABA & STEINMAN, 1984; INABA & STEINMAN, 1985).

As DCs podem se diferenciar, *in vivo*, a partir de diferentes precursores, dentre os quais os monócitos, embora estes, ao deixar o sangue, possam se diferenciar tanto em macrófagos (BECKER *et al*, 1987) quanto em DCs (ZHOU & TEDDER, 1996). Esta diferenciação depende, provavelmente, dentre outros fatores, também de citocinas, como o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), a interleucina (IL)-4, IL-3, IL-1beta, fator de crescimento e transformação (TGF)-beta, interferon (IFN)-gama secretadas no tecido por diversas células como células de Langerhans, macrófagos, mastócitos, neutrófilos, monócitos e linfócitos (EGELER *et al*, 1999; CHU *et al*, 1999; LORENTZ *et al*, 2000; CORVOL *et al*, 2003; VILANI-MORENO *et al*, 2004; REDDY *et al*, 2004). Outro evento considerado importante para a promoção da transição de monócitos a DCs é a migração das células pela camada endotelial (RANDOLPH *et al*, 1998).

Uma vez diferenciadas em DCs, estas células assumem um estágio “imaturo”, quando têm alta taxa de fagocitose e relativamente baixa expressão de moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, bem como das moléculas co-estimulatórias CD80, CD86 e CD40 (PERRIN-COCON *et al*, 2004).

Sob determinadas condições, em geral associadas a situações onde a apresentação antigênica é necessária, como a presença de substâncias bacterianas reconhecidas como sinais de perigo (TERMEER *et al*, 2002; AL-BADER *et al*, 2003) ou de células tumorais necróticas (SAUTER *et al*, 2000), ocorre o “amadurecimento” das DCs. A maturação pode ser, ainda, resultado de efeito autócrino da secreção de citocinas como IFN-gama pelas DCs (PAN *et al*, 2004), substâncias como a endotelina-1 (GURULI *et al*, 2004), ou mesmo, de um efeito autócrino/parácrino da produção de IL-1 beta e fator de necrose tumoral (TNF)-alfa.(ROVERE *et al*, 1998).

A maturação das DCs é evidenciada por várias alterações fenotípicas, notadamente, diminuição na internalização e processamento dos antígenos, acompanhada de um

aparentemente paradoxal aumento de apresentação de antígenos (INABA *et al*, 1990; INGULLI *et al*, 1997), bem como aumento da expressão de diversas moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80, CD86 e outras como o receptor para quimiocinas CCR7 (CHEN *et al*, 2001)

Embora a população de monócitos sanguíneos pareça ser uma das principais precursoras das DCs, outros precursores podem ser identificados, como as células-tronco hematopoiéticas CD34+ presentes na circulação (STRUNK *et al*, 1996). De qualquer modo, DCs características podem ser encontradas em praticamente todos os órgãos, como DCs intersticiais (IDCs) (HART & FABRE, 1981; KLINKERT *et al*, 1982; PRICKETT *et al* 1988; ROCHESTER *et al*, 1988; NICOD *et al*, 1989; POLLARD & LIPSCOMB, 1990; PAVLI *et al*, 1990). Estas células, em geral, se localizam em áreas perivasculares com seus dendritos estendendo-se para o interstício, numa distribuição muito “apropriada” para a captura e processamento de antígenos. Não surpreendentemente, DCs estão caracteristicamente presentes nos órgãos linfóides (STEINMAN *et al*, 1974; HART & MACKENZIE, 1988; CROWLEY *et al*, 1990), onde foram inicialmente descritas por Steinman & Cohn em 1973, através de microscopia de contraste de fase e eletrônica, apesar da dificuldade em isolá-las.

Também na circulação linfática são encontradas células, descritas como “veiled cells” (SPRY *et al*, 1980; KNIGHT *et al*, 1982), que representam, provavelmente, DCs intersticiais em migração para os órgãos linfóides. Freudenthal & Steinman (1990) isolaram, também a partir de células mononucleares do sangue, células dendríticas correspondendo a menos de 0,1% das células brancas. Estes pesquisadores observaram, ainda, que estas células expressavam poucos receptores para a porção Fc das imunoglobulinas (FcR), poucos receptores para complemento (C3R), diminuída atividade fagocítica, mas altos níveis de MHC classe II na membrana, e alta capacidade estimulatória em reações mistas de linfócitos (MLR). No baço de camundongos, células com morfologia de células dendríticas são

encontradas em maior número e, quando cultivadas por um dia, assumem morfologia típica das células “veiled” (CROWLEY *et al*, 1990), reforçando a idéia de serem DCs em migração para órgãos linfóides. Coerentemente com esta hipótese, tais células estimulam ativamente culturas mistas de linfócitos e apresentam eficientemente antígenos protéicos aos linfócitos T (CROWLEY *et al*, 1990).

Nos órgãos linfóides, as DCs são mais caracteristicamente encontradas nas regiões T dependentes, onde foram descritas como células interdigitantes, com morfologia e fenótipo semelhante às anteriormente descritas (WITMER & STEINMAN, 1984) e onde estariam apresentando antígenos capturados na periferia, aos linfócitos T (KRIPKE *et al*, 1990).

Outro tecido onde se encontra uma população característica de DCs é a epiderme. Neste tecido, encontram-se as células de Langerhans (LCs) que, em humanos, são caracterizadas pela expressão do marcador de superfície CD1a (ATHANASAS-PLATSIS *et al*, 1995; PORCELLI, 1995; GATTI *et al*, 2000) e organelas conhecidas por grânulos de Birbeck (BIRBECK *et al*, 1961). Estas células quando cultivadas assemelham-se muito a DCs do sangue e linfóides (ROMANI *et al*, 1989) e, da mesma forma, são capazes de estimular a proliferação de linfócitos T (CAUX *et al*, 1996). As LCs podem, também, deixar a pele e deslocar-se, via linfáticos aferentes para órgãos linfóides de drenagem, fato evidenciado pela presença dos grânulos de Birbeck, característicos das LCs, na linfa (SILBERBERG-SINAKIN *et al*, 1976) e nos linfonodos (HOEFSMIT *et al*, 1982).

Embora todas estas subpopulações atuem *in vitro* como APCs, é muito provável que *in vivo* apresentem diferenças funcionais significativas, embora ainda não bem caracterizadas. Mesmo *in vitro* ainda é difícil caracterizar com precisão as diferentes funções de cada um destes subtipos celulares (FAUSCH *et al*, 2003; MÜNZ *et al*, 2005), o que, aliado à dificuldade técnica de seu isolamento, vem dando grande impulso às tentativas de diferenciação *in vitro* destas diversas subpopulações de DCs.

Entretanto, também aqui a heterogeneidade tem constituído empecilho à completa compreensão dos diversos papéis biológicos destas células. Esta heterogeneidade já se faz presente nos precursores utilizados para a obtenção das DCs *in vitro*. Tanto células-tronco hematopoiéticas CD34⁺, quanto monócitos sangüíneos podem, em condições adequadas, dar origem a DCs *in vitro* (revisto por BANCHEREAU, 1997).

Os precursores podem, também, ser encontrados numa forma mais madura em tecidos linfóides e não linfóides (revisto por WHITESIDE & ODOUX, 2004), e também na circulação (revisto por STEIMAN, 1991).

Caux *et al.* (1996), isolaram duas populações precursoras CD14⁺CD1a⁻ e CD14⁻CD1a⁺, a partir de culturas de 5 dias de células CD34⁺ de cordão umbilical em meio contendo GM-CSF e TNF-alfa.. Neste trabalho é mostrado que precursores CD14⁺CD1a⁻ mudam seu fenótipo, perdendo a expressão de CD14 e adquirindo expressão de moléculas CD1a, diferenciando-se em DCs intersticiais quando tratadas com GM-CSF e TNF-alfa, após 14 dias de cultura. Já os precursores CD14⁻CD1a⁺ diferenciam-se em LCs sob o mesmo tratamento. Esses dois subtipos de DCs mostraram-se capazes de estimular linfócitos T virgens com semelhante eficiência (CAUX *et al.*, 1996; CAUX *et al.*, 1997).

Strobl *et al.* (1996) utilizando-se, também, de precursores hematopoiéticos CD34⁺ em meio de cultura livre de soro, suplementado com TGF-beta-1, obtiveram DCs com fenótipo CD1a⁺ e antígenos relacionados com grânulos de Birbeck. Em suas culturas, estes autores fizeram uso de uma combinação básica de citocinas recombinantes GM-CSF e TNF- α e fator de células tronco (SCF), utilizados sem mais suplementações, ou suplementado com TGF-beta-1, ou ainda com plasma de sangue de cordão umbilical. De acordo com esse trabalho, a suplementação com TGF-beta-1 aumenta o rendimento e melhora a função das células obtidas na estimulação de linfócitos T em culturas mistas.

Subpopulações derivadas de precursores mielóides CD34⁺, como as CD14⁺CD11c⁺CD1a⁻ encontradas no sangue podem se diferenciar em IDCs quando tratadas com GM-CSF e IL-4 e, maturar pelo uso de TNF- α ou LPS (ITO *et al*, 1999). Por outro lado células CD14⁻CD11c⁺CD1a⁺ diferenciam-se em LCs pelo uso de GM-CSF, IL-4 e TGF-beta (ITO *et al*, 1999), CD40L ou LPS (GATTI *et al*, 2000). Células plasmocitóides tonsilares CD4⁺CD11c⁻Lin⁻, quando isoladas e tratadas com IL-3 e CD40L apresentam fenótipo de célula dendrítica, com baixa capacidade de fagocitose ou endocitose e alta capacidade aloestimuladora (GROUARD *et al*, 1997). Estas células dendríticas plasmocitóides no homem são, possivelmente, equivalentes às DCs linfóides encontradas em camundongos (ZHOU & TEDDER, 1995).

Precursosores da linhagem mielóide são obtidos diretamente do sangue, e entre estes precursores, pode-se encontrar duas subpopulações principais: CD11c⁻; CD14^{lo}; CD33^{lo} que maturam *in vitro* com o uso de citocinas e CD11c⁺; CD 14^{lo}; CD33^{hi}, que podem maturar *in vitro* sem citocinas em DCs (O'DOHERTY *et al*, 1994).

Outros precursores obtidos do sangue periférico, são as células mononucleares CD14⁺, que também se diferenciam em DCs, após tratamento com GM-CSF e IL-4 por período de 5 dias, dando origem a células também eficientes na estimulação de linfócitos T (SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 1994).

Como se pode notar, a obtenção de DCs *in vitro* pode ser conseguida de diferentes modos. Tais variações incluem os precursores selecionados (O'DOHERTY *et al*, 1994; SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 1994; ZHOU & TEDDER, 1995; CAUX *et al*, 1996; STROBL *et al*, 1996; STRUNK *et al*, 1996; GROUARD *et al*, 1997; CAUX *et al*, 1997), as citocinas utilizadas (O'DOHERTY *et al*, 1993; CAUX *et al*, 1996; ROSENZWAJG *et al*, 1996; GROUARD *et al*, 1997; OLWEUS *et al*, 1997), sua concentração (STRUNK *et al*, 1996; CAUX *et al*, 1997; PALUCKA *et al*, 1998; BARBUTO *et al*, 2004), e o acréscimo de

diferentes agentes maturadores, desde citocinas como o TNF-alfa (SALLUSTO & LANZAVECCHIA, 1994) e IFN-gama (FEDELE *et al*, 2004), mediadores inflamatórios como a prostaglandina-E2 [PGE-2 (LUFT *et al*, 2002; SCANDELLA *et al*, 2002)], até mesmo bactérias como o BCG (KIM *et al*, 1999), ou seus produtos, como o LPS (ALBADER *et al*, 2003) ou outras toxinas (BAGLEY *et al*, 2002; BAGLEY *et al*, 2005). Além do mais, a maturação de DCs pode ser também obtida pela adição de lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL), uma fração do colesterol (PERRIN-COCON *et al*, 2001). Também a lisofosfatidilcolina, um dos componentes principais da oxLDL, implicado em diversos aspectos da resposta inflamatória e citada como um dos mediadores requeridos na resposta citotóxica de células NK contra células tumorais (WHALEN *et al*, 1999) é capaz de induzir esta maturação (COUTANT *et al*, 2002).

Acrescentando ainda mais heterogeneidade à biologia das DCs, observa-se um efeito modulador hormonal sobre a fisiologia destas células. Hormônios como estrógenos (KOMI & LASSILA, 2000), glicocorticóides (PIEMONTI *et al*, 1999a; MATYSZAK *et al*, 2000), neuropeptídeos como o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) (KODALI *et al*, 2004) e o polipeptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (PACAP) (DELGADO *et al*, 2004) afetam a função de DCs.

Assim, Piemonti *et al* (1999b), mostraram que os glicocorticóides aumentam a endocitose em DCs. Por outro lado, estes pesquisadores também observaram uma reduzida capacidade na apresentação de antígenos a células T autólogas e, descreveram uma baixa expressão das moléculas co-estimulatórias CD40 e CD86 em DCs tratadas com estes hormônios. Outros pesquisadores mostraram que os efeitos dos glicocorticóides sobre as DCs dependem do estágio de maturação das mesmas (MATYSZAK *et al*, 2000). DCs diferenciadas e tratadas com glicocorticóides antes da maturação, falham em expressar moléculas do MHC de classe II, CD86 e expressam baixos níveis de CD 40, enquanto células

tratadas com LPS e, somente após 4 horas, tratadas com glicocorticóides não mostraram alterações fenotípicas (MATYSZAK *et al*, 2000).

O neuropeptídeo VIP mostrou efeitos moduladores na produção de citocinas em LCs estimuladas com LPS (KODALI *et al*, 2004). Neste trabalho, LCs obtidas de camundongos tiveram seus níveis de secreção de citocinas IL-12 e IL-1-beta suprimidos, enquanto os níveis de IL-10 se elevaram. Outro estudo, também em modelo animal, mostrou que DCs imaturas tratadas com VIP ou PACAP exibiram aumentada expressão de CD86 e atividade estimuladora da proliferação de linfócitos T CD4+. Mas, contrastando, os mesmos neuropeptídeos, VIP e PACAP, agindo sobre DCs estimuladas com LPS, reduzem a expressão de CD80 e CD86, sem afetar a expressão de CD40 e MHC de classe II, ao mesmo tempo em que inibem a capacidade destas células estimularem a proliferação de linfócitos T *in vitro* e *in vivo* (DELGADO *et al*, 2004).

Estrógenos podem afetar a apresentação de antígenos, como visto *in vitro*, em modelo de encefalomielite experimental autoimune (EAE) (LIU *et al*, 2002). Neste trabalho, DCs de animais com EAE, tratadas com estrógeno, tiveram reduzida a capacidade de apresentação da proteína básica da mielina (MBP) aos linfócitos T, além de outras interferências, como redução na produção de TNF-alfa, IFN-gama e IL-12 (por DCs maduras). Também, células mononucleares do sangue periférico, tratadas *in vitro* com GM-CSF e IL-4, em presença de antiestrógenos como Tamoxifeno e Toremifeno, falham em diferenciar-se em DCs (KOMI & LASSILA, 2000).

Um hormônio, que tem se tornado alvo do interesse de pesquisadores nos últimos anos, é a melatonina (MLT) [(melatonina), *N*-acetil-5-metoxitriptamina]. Esta é produzida pela glândula pineal e tem efeitos pleiotrópicos. Relatos de que a injeção de extratos da glândula pineal em girinos, rãs, sapos e peixes produzia um clareamento da pigmentação da pele, que isso era causado pela agregação da melanina no interior dos melanócitos, por

inibição do hormônio estimulante dos melanócitos (MSH), levaram Lerner *et al* (1958) a isolar o “fator de clareamento”, dando a esse fator a denominação de MLT.

Este hormônio, produzido principalmente pela glândula pineal, é derivado da serotonina, e está relacionado com os ritmos biológicos, sendo determinante para o ritmo circadiano (BINKLEY, 1988a) e para a pigmentação da pele (PROTA, 1992) em alguns animais. Sabe-se atualmente que a síntese de MLT pode ocorrer difusamente em diversos tecidos como a retina, o trato gastrointestinal e em plaquetas (ARENDDT, 1997). Embora também encontrada na medula óssea de ratos, em níveis próximos aos níveis circulantes (TAN *et al*, 1999) e concentrada no citosol de células pequenas, a MLT não parece ser produzida localmente. Isto porque, embora as células que a contêm expressem a enzima N-acetil-transferase (NAT), requerida para a síntese de MLT, elas não expressam a enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), fundamental para esta síntese (TAN *et al*, 1999). Isso, é ainda reforçado pela observação de que animais pinealectomizados, recebendo MLT oral, têm os níveis circulantes desse hormônio próximos aos da medula.

Também em seres humanos, a MLT tem atuação direta na melanogênese, regulando a proliferação de melanócitos e sua atividade (IYENGAR, 2000). Além do mais, parece ter efeito regulatório sobre o sono, pois sua produção tem pico máximo durante o período noturno, diminuindo durante o dia (BINKLEY, 1988b; ARENDDT, 1997). Este ritmo levou a seu uso com sucesso para o tratamento de distúrbios do sono (ZHDANOVA, 2001) e alterações no ritmo circadiano provocadas por mudanças bruscas no fuso horário habitual, a síndrome do “*Jet Lag*” (TAKAHASHI *et al.*, 2002; HERXHEIMER & WATERHOUSE, 2003).

Todavia, os efeitos da MLT são muito mais amplos do que inicialmente se supunha, parecendo atuar, em diferentes situações como uma agente “protetor” da integridade tecidual. Em lesões mucosas produzidas por estresse em ratos, a MLT mostrou um efeito gastroprotetor

melhor que o da ranitidina, quando usada separadamente, e sinérgico a ranitidina e ao omeprazole, quando administrada simultaneamente (BANDYOPADHYAY *et al.* 2002). Em modelo de necrose tubular aguda em ratos induzida pelo quimioterápico cisplatina, a MLT também se mostrou protetora, diminuindo a lesão renal, provavelmente por sua ação antioxidante (PARLAKPINAR *et al.*, 2002). Da mesma forma, a alta atividade antioxidante apresentada pela MLT, removendo eficazmente radicais livres do oxigênio, principalmente o radical hidroxila (QI *et al.*, 2000; BANDYOPADHYAY *et al.*, 2002), também parece ser a responsável na diminuição da lesão hepática causada por isquemia-reperusão do fígado em indivíduos submetidos a hepatectomia (CHEN, 2003).

Ao mesmo tempo em que tem estes efeitos “protetores” em tecidos normais, contra o tecido neoplásico a MLT parece exercer efeito oposto. O tratamento de diversas células tumorais (carcinoma de mama, carcinoma cervical, carcinoma de ovário, melanoma, neuroblastoma) com MLT é capaz de bloquear sua divisão (HILL & BLASK, 1988; COS *et al.*, 1996a; RAM, 2000; SLOMINSKI & PRUSKI, 1993; YING *et al.*, 1993; PETRANKA *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 1995; COS *et al.*, 1996b). Esta ação parece depender da influência da MLT sobre a cinética do ciclo celular da célula tumoral (DELAUNOIT *et al.*, 1990; COS *et al.*, 1991; SHIU *et al.*, 1999), que ao contrário do da célula normal (NATARAJAN *et al.*, 2001), é afetado significativamente pelo hormônio.

Este efeito direto da MLT sobre as células tumorais foi sugerido como significativo e responsável pelo efeito clínico de seu uso em pacientes com câncer (CAPELLI *et al.* 2002), embora ele já tenha sido disputado (PAPAZISIS, 1998). Na verdade, em portadores de câncer a MLT não só apresenta apenas efeitos diretos contra a célula tumoral, mas também ação antiangiogênica, com diminuição dos níveis do fator de crescimento vascular-endotelial (VEGF), em pacientes com doença metastática (LISSONI, 2002) e capacidade de diminuir os níveis séricos de TNF-alfa, em pacientes acometidos por caquexia devido à doença neoplásica

avançada (LISSONI *et al.* 1996b). Com esta gama de efeitos, a MLT vem ganhando espaço crescente na clínica (LISSONI *et al.*, 1996a; LISSONI, 2002), embora sem consenso quanto a seu valor.

Especificamente no melanoma maligno, a MLT parece ter um papel mais específico, uma vez que foi descrita a ocorrência de um sistema melatoninérgico em células de melanoma humano (SLOMINSKI *et al.*, 2002). Nestas células, a síntese de MLT é acompanhada da diminuição na “dendricidade” e aumento de sua taxa de mitose (IYENGAR, 1998). Estas observações sugerem que as células de melanoma utilizam seu sistema melatoninérgico de maneira autócrina, facilitando sua proliferação.

Por outro lado, a secreção local de MLT, além de afetar diretamente as células tumorais, que expressam receptores para este hormônio, poderia afetar também outros componentes do microambiente neoplásico. Neste ponto é importante considerar que é neste ambiente que as interações iniciais entre o sistema imune e a neoplasia ocorrem (ROBERTS; WIECHMANN; HU, 2000; SOUZA; VISCONTI; CASTRUCCI, 2003), de modo que a produção local de MLT poderia também alterar a resposta do sistema imune à neoplasia.

Na verdade, em 1981 foi publicada a primeira evidência de um possível envolvimento da MLT endógena na resposta imune humoral em camundongos (MAESTRONI, 1981 apud BUBENIK *et al.*, 1998). Posteriormente confirmou-se, com ajuda de inibidores farmacológicos da síntese de MLT, a influência da MLT sobre a função também dos linfócitos T (revisado por MAESTRONI, 1999). Na verdade, hoje se reconhece que a MLT age sobre os mais variados aspectos da fisiologia do sistema imune, incluindo a circulação leucocitária, a cinética da resposta inflamatória, a produção de radicais livres por células efectoras, a produção de citocinas, a apresentação antigênica, a resposta humoral e a resposta celular.

Dentro de um modelo de inflamação em ratos, a MLT mostrou-se inibidora da circulação leucocitária, reduzindo o rolamento e a adesão dos leucócitos às células endoteliais, mediada pelos receptores para MLT, mostrando uma regulação endógena da inflamação (LOTUFO *et al*, 2001).

Em modelo experimental de inflamação crônica em camundongos, a MLT, tanto endógena quanto exógena, mostrou efeito na redução do inchaço e da permeabilidade vascular (LOPES *et al*, 1997). Com a finalidade de eliminar o surgimento noturno da MLT, foram utilizados procedimentos cirúrgicos como a pinealectomia e a gangliectomia cervical superior, interrompendo, assim, a comunicação entre a retina e a glândula pineal, o que resulta na inibição dos picos noturnos de MLT (LOPES *et al*, 1997). Neste trabalho, a administração de MLT restaurou a variação rítmica da inflamação. Posteriormente, os autores demonstraram que, animais adrenalectomizados, tinham a ritmicidade da inflamação rompida e, que a mesma, era restaurada com administração de MLT, sugerindo assim, uma interação da glândula adrenal com a pineal na regulação da ritmicidade na inflamação (LOPES; MARIANO; MARKUS, 2001).

Morrey *et al* (1994) observaram um estímulo na produção de reativos intermediários do oxigênio (ROI), em monócitos humanos através da incubação destes com MLT em doses que variavam de 10^{-7} a 10^{-12} M. Os autores verificaram um aumento da capacidade citotóxica dos monócitos frente a células de melanoma (A375) e fibroblastos murinos (L929), bem como a produção de IL-1 e, que isso ocorreu em concentrações a partir de 10^{-10} M, com produção de óxido nítrico, superóxido, peróxido de hidrogênio, bem como um aumento da sensibilidade de monócitos ao LPS.

A MLT induziu, ainda, em monócitos humanos, produção de tanto IL-1-alfa quanto IL-1-beta, com predomínio de IL-1-beta. Coerentemente, outro trabalho encontrou receptores para MLT presentes em monócitos humanos não ativados e, para confirmar se a MLT ativava

estes monócitos, mantiveram culturas por 1 dia com diferentes concentrações deste hormônio. A ativação foi confirmada pela habilidade dos monócitos ativados secretarem IL-1, IL-6 ou TNF-alfa (BARJAVEL *et al*, 1998). Os autores observaram, também, que a MLT não induziu secreção significativa destas citocinas quando cultivados por 3 dias, sugerindo que a MLT ativa os monócitos cultivados por 1 dia, mas não aqueles cultivados por 3 dias. Analisando-se a expressão dos receptores em monócitos frescos e cultivados, foi encontrada similaridade entre o número de receptores para os monócitos frescos ou cultivados por 1 dia, enquanto que monócitos cultivados por 2 dias apresentaram uma queda de 75% no número de receptores, podendo este quadro ser revertido por adição de LPS à cultura (BARJAVEL *et al* 1998). No entanto, essa reversão não acontece com monócitos cultivados por mais de dois dias.

A MLT mostrou-se, também, estimuladora sobre monócitos, obtidos de sangue periférico humano, na produção de IL-12. Monócitos humanos cultivados com LPS e IFN-gama, responderam com um aumento na produção de IL-12. A MLT aumentou a produção de IL-12, somente quando as concentrações de IFN-gama foram muito baixas (0,5 a 1 ng/mL). Esta ação foi dose-dependente e mais intensa quando a MLT foi acrescentada no período de aderência dos monócitos (GARCIA-MAURINO, *et al*, 1999).

Pesquisadores descreveram, ainda, ação estimulatória da MLT sobre a produção das citocinas IL-2 e IFN-gama, possivelmente, por linfócitos T auxiliares humanos (GARCIA-MAURINO, *et al*, 1997). Neste trabalho, células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram ativadas em cultura com fito-hemaglutinina (PHA) e PHA e MLT, para se avaliar a produção de citocinas. A produção de IL-2 não foi afetada pela MLT quando combinada com concentrações de PHA entre 2 e 8 ug/mL. No entanto, em ausência de PHA ou com 0,5 ug/mL, a MLT aumentou significativamente a produção de IL-2. As citocinas IL-6 e IFN-gama mostraram-se aumentadas pela MLT, somente em culturas sem PHA. No mesmo trabalho, em culturas com PBMC totais, a MLT ativou a produção de IL-2 e IL-6, entretanto,

quando as PBMC foram depletadas de monócitos (CD14+) e, incubadas com MLT, somente a produção de IL-2 foi ativada pelo hormônio, sugerindo que os monócitos tenham participação ativa na produção de IL-6. Outro estudo apontou um efeito proliferativo, *in vitro*, sobre linfócitos, com diminuição da produção de IL-10, mas sem efeitos sobre a produção de IFN-gama (KÜHLWEIN; IRWIN, 2001). Estes autores sugeriram um possível efeito modulador da MLT sobre a proliferação de linfócitos e indução de ativação, através da supressão da expressão de IL-10. Mais recentemente, evidências da síntese da própria MLT por linfócitos humanos foram relatadas através de técnicas de RT-PCR que, detectaram RNA mensageiro para as enzimas NAT e HIOMT, enzimas chave para a síntese de MLT (CARRILLO-VICO *et al.*, 2004). Neste modelo a síntese de MLT foi confirmada através de dosagem por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e, foi proposta a hipótese de uma atuação intrácrina, autócrina e parácrina da MLT no estímulo à produção de IL-2. Desta forma, não é surpreendente que a MLT tenha sido descrita como sinérgica com a IL-2 no tratamento de portadores de câncer (CONTI; MAESTRONI, 1995; LISSONI *et al.*, 1995).

Além disso, IFN-gama e, também a IL-10, foram dosadas após cultura de sangue total com toxina tetânica ou lipopolisacarídeo bacteriano (LPS) de *E. coli* e mostraram correspondência com os níveis de MLT obtidos do sangue desses indivíduos, indicando a ocorrência de ritmicidade na produção dessas citocinas, porém, sem identificar o tipo celular envolvido (PETROVSKY; HARRISON, 1997).

Retornando a modelos animais, a expressão de genes para citocinas foi analisada por meio de células preparadas a partir de exsudato peritoneal e de esplenócitos extraídos de animais que receberam, por 10 dias consecutivos, injeções de MLT e, o grupo controle somente injeções de veículo salino alcoólico (LIU *et al.*, 2001). Após extração do ácido ribonucléico (RNA) foi feita a transcrição reversa pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), mostrando que células do exsudato peritoneal apresentaram aumentada expressão

gênica, do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), o fator de células tronco (SCF), o fator de transformação do crescimento (TGF)-beta e o IFN-gama, quando comparados ao controle, que no caso do M-CSF, não mostra qualquer expressão. Os esplenócitos apresentaram, também, aumentada expressão para os genes da IL-1-beta, M-CSF, SCF, TNF-alfa e IFN-gama (LIU *et al*, 2001), em relação ao grupo controle.

Além do mais, macrófagos esplênicos de camundongos tratados com MLT exógena apresentaram uma melhor estimulação de linfócitos T em ensaio de proliferação. Estas células apresentaram, quando incubadas em placas plásticas e tratadas com MLT e LPS, secreção de IL-1 cerca de 2,2 vezes maior que células tratadas unicamente com LPS (PIOLI *et al*, 1993). O sobrenadante examinado quanto à produção de IL-1, também revelou um aumento na produção de TNF-alfa e, resultados obtidos através de citometria de fluxo mostraram maior expressão de moléculas do MHC de classe II, quando comparados a macrófagos de camundongos tratados com solução salina (PIOLI *et al*. 1993). Contrariamente, há relato de que macrófagos obtidos de baço de camundongos, após aderência a placas plásticas, mostraram sob ação da MLT, uma diminuição na expressão de CD80 e de produção de TNF-alfa, quando estimulados por LPS e IFN-gama (RAGHAVENDRA *et al*, 2001). Uma possível explicação para estes resultados contraditórios poderia ser o uso de linhagens de camundongos diferentes, o sexo dos animais (machos em um experimento e fêmeas em outro), bem como a exposição a diferentes períodos de iluminação (13:11 h – claro:escuro no último) e, finalmente, a imunização dos animais no segundo experimento. Completando as contradições, Shafer; McNulty; Young (2001) não conseguiram detectar efeito da MLT sobre a produção de TNF-alfa por macrófagos de camundongos tratadados com LPS. Em estudo recente, a produção de IL-8 mostrou-se também afetada pela MLT (SILVA *et al*, 2004).

Camundongos suplementados com MLT em sua ração diária, durante 7 dias, sofreram alteração em suas populações celulares obtidas do baço e medula óssea (células NK e

monócitos/macrófagos). Em animais tratados por 14 dias, houve aumento no número absoluto apenas de células NK do baço e, células NK e monócitos/macrófagos da medula óssea (CURRIER; SUN; MILLES, 2000). Este trabalho mostrou também elevação no número total de células nucleadas, granulócitos maduros e células precursoras mielóides da medula óssea dos animais suplementados com MLT por 7 dias.

Embora vários relatos, como citados, sugiram um efeito estimulador da resposta imune causado pela MLT, há outros apontando para uma ação moduladora deste hormônio, indicando que diversas condições fisiopatológicas que envolvem o sistema imune são influenciadas pelos níveis séricos de MLT. Por exemplo, camundongos imunizados com ovalbumina (OVA) e tratados com MLT apresentaram proliferação das células T auxiliares antígeno-específicas, produção de IL-4 e imunoglobulina G1 (IgG1) aumentadas, mas diminuição na produção de IL-2 e IFN-gama (SHAJI; KULKARNI; AGREWALA, 1998). Em codornizes, mostrou-se um aumento da resposta imune celular e humoral (MOORE; SIOPE, 2003), dando consistência ao fato de animais pinealectomizados mostrarem uma depressão da resposta imune humoral (revisado por BUBENIK *et al.*, 1998).

Frente à resposta dos linfócitos com a MLT, levando à produção de citocinas como a IL-2, que aumentam a proliferação destas células, seria correto pressupor que houvesse a mediação de um receptor para MLT nessas células. Garcia-Pergañeda *et al.*, isolaram membranas de linfócitos e através da ligação de moléculas de MLT marcadas com iodo radioativo, verificaram a existência de ligações de alta afinidade da MLT com moléculas da membrana dos linfócitos. Estudos realizados com timo e baço de camundongos mostraram, igualmente, a existência de receptores para MLT em células obtidas destes órgãos (CARRILLO-VICO *et al.*, 2003a). Carrillo-Vico *et al.* (2003b), observaram em outro estudo que através do receptor de membrana conhecido como MT1, a MLT se contrapõe ao efeito inibidor da PGE-2 sobre os linfócitos, na produção de IL-2.

Frente a todos estes dados, mostrando efeitos imunomoduladores da MLT, é plausível supor que seus efeitos na diminuição do crescimento tumoral não dependam exclusivamente de sua ação direta anti-tumoral. Embora esta possibilidade, de ação direta via receptores encontre suporte experimental, também outra o encontra, ou seja, a de que a produção de MLT nas proximidades do tumor leve a modificação funcional de células do sistema imune no local, diferenciando-as e ativando-as contra o tumor.

É bastante conhecido o fato de que tumores exibem inúmeros mecanismos de evasão frente ao sistema imune, entretanto, a multiplicidade de ações da MLT poderia contribuir para a superação destes mecanismos de escape e o estabelecimento de uma resposta eficaz contra o tumor. Dentre os vários alvos possíveis, tanto para a evasão tumoral quanto para sua superação, estão as DCs. Sendo fundamentais para o início da resposta, a indução de sua deficiência funcional pelos tumores, representa uma forma eficaz e “econômica” de escape tumoral (GABRILOVICH, 2004; PINZON-CHARRY; MAXWELL; LOPEZ, 2005; VICARI; CAUX; TRINCHIERI, 2002). Da mesma forma, com a possibilidade, hoje, de geração *in vitro* deste tipo celular, o uso das DCs passou a representar uma perspectiva animadora para a imunoterapia dos tumores (BARBUTO, 2005). Assim, é possível propor que a modulação funcional das DCs contribua também para a ação anti-tumoral da MLT, de forma que o presente trabalho pretendeu investigar a ação da MLT sobre monócitos do sangue periférico humano, estudando sua diferenciação em DCs *in vitro*.

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da MLT, quer isoladamente, quer em conjunto com citocinas (GM-CSF e IL-4), sobre a diferenciação *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico em DCs. Também se pretendeu avaliar o efeito da MLT sobre a ativação de DCs diferenciadas *in vitro* sob ação de citocinas ou da própria MLT. Estes efeitos foram estudados através da verificação do fenótipo de membrana e da produção de citocinas por essas células, além da determinação de seu potencial aloestimulador para linfócitos T.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Amostras de sangue, de 18 indivíduos diferentes, foram usadas neste trabalho. Elas foram obtidas através de aférese de sangue periférico dos doadores, todos acima de 18 anos de idade e considerados saudáveis pelos testes de praxe, utilizados em bancos de sangue. Estes doaram células para a vacinação de pacientes com câncer, no Hospital Sírio Libanês, conforme protocolo HSL2001/01 de 05/02/2001, aprovado em 07/03/2001 pela comissão de ética do referido hospital.

O projeto, base para o trabalho aqui apresentado, foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo e, aprovado em 06-04-2004, conforme Parecer 562/CEP datado de 07-04-2004.

3.2 Isolamento de células mononucleares

Para purificação de PBMC, o produto da aférese dos doadores foi colocado em tubos plásticos cônicos de 50 mL, aos quais foram acrescentados, no fundo, 12 mL de Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Upsalla Sweden, densidade 1.077 +/- 0,001 g/mL). O material foi centrifugado a 600G, por 30 minutos, a 18°C e a camada de células mononucleares formada foi retirada com o auxílio de uma pipeta. O produto obtido foi lavado 3 vezes em meio RPMI 1640, pH 7,2 (Gibco Brl – Life Technologies, Grand Island, NY) com centrifugação a velocidades decrescentes (400G, 150G e 90G) por 10 minutos cada vez. O botão celular foi ressuspensionado em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 1% de L-glutamina (2mM) e 10% de soro fetal bovino (FCS; Gibco Brl – Life Technologies), pH 7,2 (meio R-10) e a viabilidade celular foi testada com Azul de Trypan (0,4%) 1:1.

3.3 Cultura para diferenciação de células dendríticas

As células mononucleares obtidas como anteriormente descrito foram enriquecidas por aderência a placas de Petri plásticas ou placas plásticas de 6 ou 12 poços, em meio R-10, por um período de 2 horas, em estufa a 37°C, com atmosfera contendo 5% de CO₂ e saturada de água. Após esse período, as células não aderentes foram desprezadas e as aderentes cultivadas por 5 ou 7 dias em meio de cultura contendo fatores capazes de induzir sua diferenciação em DCs.

Neste ponto, o protocolo usual requisita o acréscimo das citocinas IL-4 e GM-CSF (R&D Systems, Minneapolis, MN), para a diferenciação das células dendríticas e, no quinto dia, da citocina TNF-alfa (R&D Systems) para a maturação das células. Foram usadas as concentrações de 50 ng/mL para cada citocina. A MLT (Sigma) foi usada em concentrações de 1 nM e 1 µM, dose fisiológica e farmacológica, respectivamente (GARCIA-MAURIÑO *et al*, 1997). Em experimentos onde a MLT foi usada, ela foi colocada nos mesmos tempos que as citocinas utilizadas, ou seja, quando foi colocado GM-CSF e a IL4 em determinada cultura, também foi colocada a MLT (na mesma cultura ou em cultura paralela), nas concentrações acima especificadas. O mesmo acontecendo com a citocina TNF-alfa.

Os experimentos foram realizados em capela de fluxo laminar, em ausência de luz ambiente artificial, baixa luminosidade natural e, quando necessário, para melhor execução dos trabalhos em baixa luminosidade, foi utilizada uma lâmpada vermelha.

3.4 Coleta e análise fenotípica das células

Após os cinco ou sete dias, o meio de cultura sobrenadante foi retirado e acrescentou-se aos poços 1 ml de salina tamponada com fosfato (PBS) gelada para coleta das células. Após 10 minutos e pipetagem vigorosa, as células foram colhidas e colocadas em tubos, que foram centrifugados por 10 minutos a 153G, ressuspensas em 1 mL de R-10 e em seguida

contadas utilizando-se o método de exclusão pelo Azul de Trypan, conforme mencionado anteriormente.

Para a determinação do fenótipo de membrana, as células foram marcadas utilizando-se anticorpos monoclonais específicos, bem como os anticorpos controles. Analisou-se a expressão dos diferentes antígenos, com os anticorpos: anti-CD14 (Caltag Lab. Burlingame, CA ou R & D Systems), anti-CD80 (Caltag Lab. Burlingame, CA ou R & D Systems), anti-CD86 (Caltag Lab. Burlingame, CA ou R & D Systems) anti-CD83 (Caltag Lab. Burlingame, CA ou R & D Systems), anti-CD11c (Caltag Lab. Burlingame, CA ou R & D Systems), anti-HLA-I (Caltag Laboratories), anti-HLA-DR (R & D Systems), anti-CCR7 (R & D Systems), anti-CD40 (R & D Systems) e anti-CD1a (R & D Systems).

Cerca de 2×10^5 células de cada grupo foram colocadas em tubos de 1,5 mL; os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 153G, a 4°C e, em seguida, foi adicionado o anticorpo específico para o marcador de interesse, diluído em 25 µL de tampão para citometria (PBS, 0,5% de soroalbumina bovina (Life Technologies) e 0,02% de azida sódica – PBS-BSA 0,5%); as células foram incubadas por 20 min a 4°C, protegidas da luz. Com o término do período de incubação, as amostras foram lavadas duas vezes em um volume de 100 µL/tubo de tampão para citometria (PBS/BSA 0,5%), fixadas em tampão para citometria contendo 2% de paraformaldeído (200 µL/tubo) e armazenadas até a aquisição. As aquisições foram feitas em citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson, Palo Alto, CA). Para análise usou-se o “software” Cell Quest (Becton Dickinson) ou, o software WinMDI versão 2.8 (Windows Multiple Document Interface – Flow Cytometry Application - Joseph Trotter 2000), obtido gratuitamente da “FACS Core Facility – The Scripps Research Institute” (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

3.5 Análise dos dados obtidos por citometria de fluxo

A análise da expressão dos diferentes marcadores se fez em população selecionada, por tamanho e granulosidade, como compatível com as DCs, como encontrado em materiais e métodos de diversos autores (UPHAM *et al*, 2000; SMYTH *et al*, 2004; BERGES *et al*, 2005). Entretanto, para verificar a adequação desta seleção, dados mais recentes obtidos por citometria de fluxo foram analisados também, por uma estratégia de “back gate”, envolvendo os marcadores CD11c e HLA-DR. Estes marcadores poderiam ser considerados como característicos de DCs, o que, provavelmente, possibilitaria uma melhor análise das populações. Foram, então, comparados os resultados obtidos com o “back gate” e os resultados com os “gates” traçados com estimativa baseada no tamanho e granulosidade das amostras. Não encontramos diferenças significativas entre as duas abordagens. Abaixo encontram-se gráficos de um mesmo experimento, no qual a análise foi feita em “back gate” (figura 1) ou em “gate” desenhado por tamanho e granulosidade (figura 2).

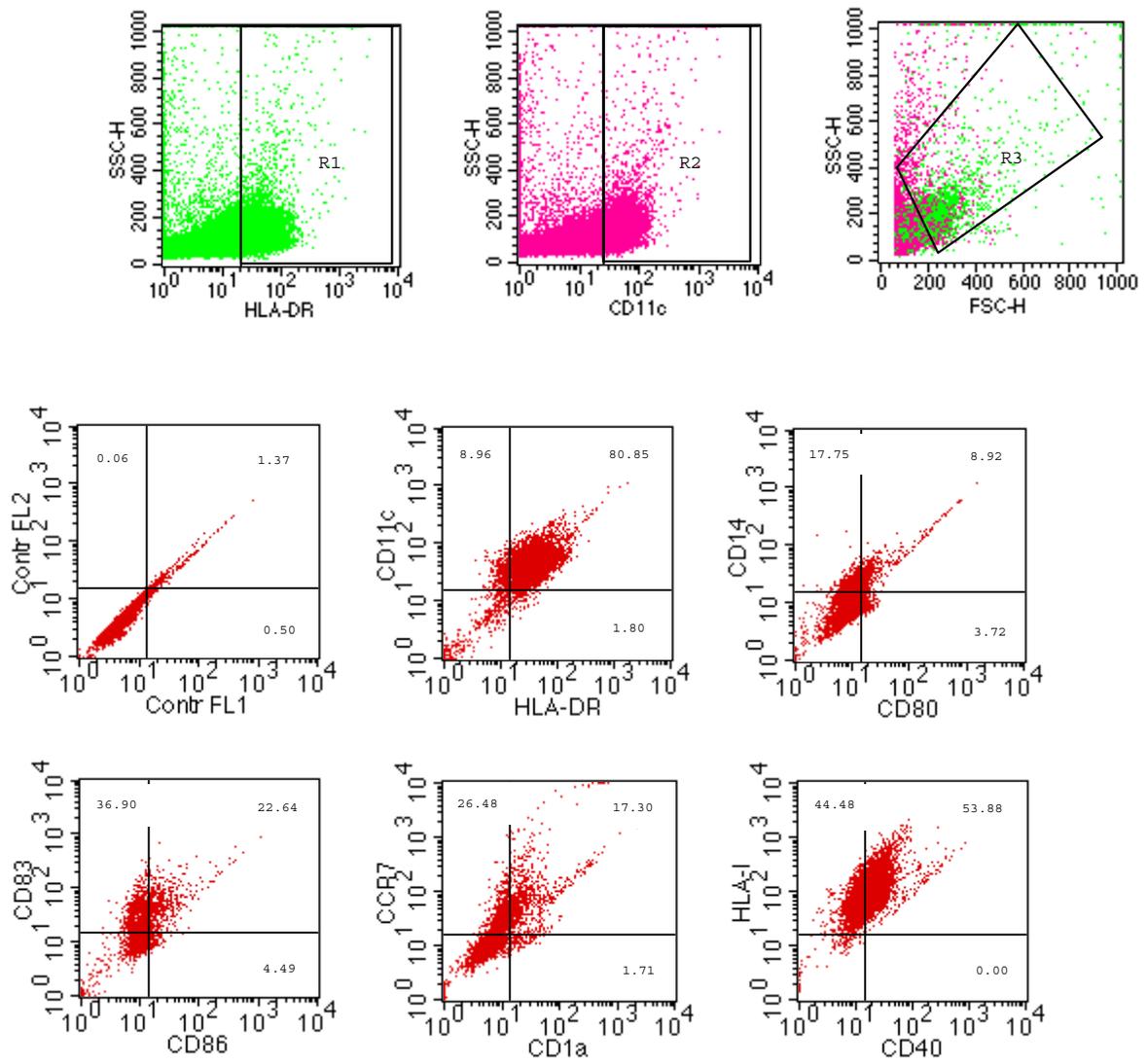


Figura 1. Resultados obtidos através da análise de células selecionadas por “back gate” definido pela expressão de CD11c e HLA-DR. Os números no interior dos quadrantes representam as porcentagens de positivos para cada marcador.

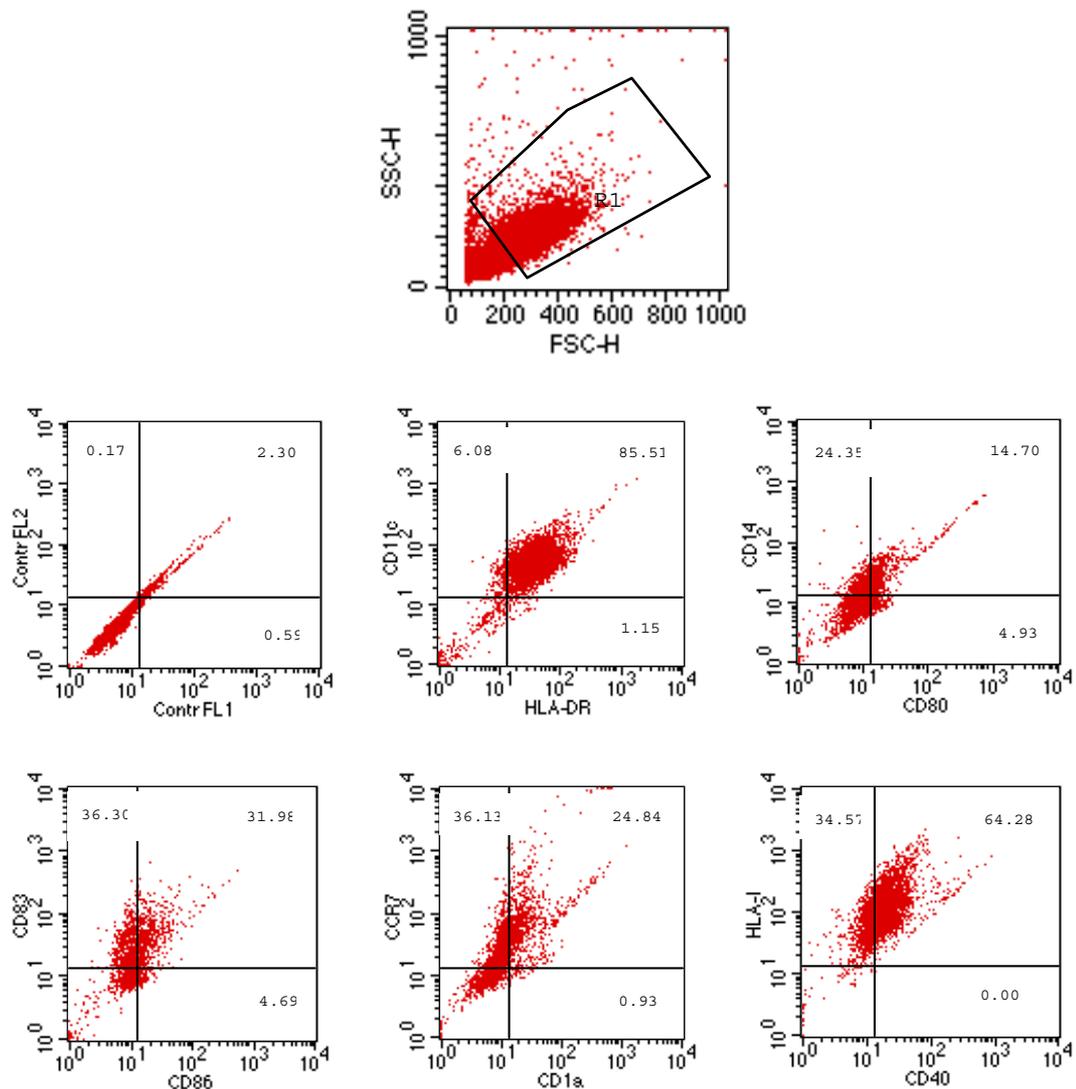


Figura 2. Resultados obtidos através da análise por gate desenhado por tamanho e granulosidade. Os números no interior dos quadrantes representam as porcentagens de positivos para cada marcador.

3.6 Ensaio de proliferação

Como células estimuladoras nestes ensaios, usaram-se células dendríticas (estimuladoras) geradas ou ativadas na presença de citocinas ou MLT e, coletadas seguindo-se o método descrito acima. Estas células, após irradiação com 1250 rads (radiação gama proveniente de fonte de Césio), foram colocadas na concentração de 1×10^4 ou $3,33 \times 10^3$ células/poço, em placas de 96 poços. Como células respondedoras foram usadas células

mononucleares não-aderentes alogênicas ou, linfócitos T (purificados dentre as células não-aderentes por formação de rosetas com hemácias de carneiro – vide a seguir). As células respondedoras foram colocadas na proporção de 1:10 ou 1:30 (1×10^5 células/poço) e previamente coradas com éster de succinimidil-5-(e-6)-diacetato de carboxifluoresceína (CFSE). Para esta marcação, cerca de 1×10^7 células foram incubadas, por 20 minutos, em CFSE (5 μ M) diluído em PBS/BSA 0,1% (LYONS, 1994; LYONS, 2000). Após a incubação, as células foram lavadas e usadas nas co-culturas. As co-culturas foram mantidas por 5 dias em estufa saturada de água, a 37°C e contendo 5% de CO₂.

Ao final da cultura, o sobrenadante das culturas foi retirado e às células acrescentou-se 200 mL de tampão para aquisição de amostras em citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson, Palo Alto, CA) e, a análise, foi realizada usando-se o “software” Cell Quest (Becton Dickinson, Palo Alto, CA) ou, o software WinMDI versão 2.8. O resultado da proliferação foi determinado através do cálculo de um índice de proliferação, obtido pela divisão da média geométrica do controle (células sem estímulo) pela média geométrica das amostras (células estimuladas).

3.7 Obtenção das células respondedoras

As células respondedoras utilizadas para realização de experimentos de proliferação (aloestimulação), foram obtidas por 2 métodos diferentes descritos a seguir.

3.7.1 Separação de células mononucleares não aderentes

As células mononucleares não-aderentes alogênicas, utilizadas em alguns experimentos como células respondedoras, foram obtidas na etapa de enriquecimento das células mononucleares, em que as aderentes foram utilizadas para cultura de diferenciação e

ativação de células dendríticas. Células não aderentes obtidas nesta etapa foram congeladas em meio contendo 60% de RPMI, 30% de SFB e 10% de Dimetilsulfoxido (DMSO), em frascos de congelamento de 1,5 mL, onde foram colocados 1 mL de suspensão de células. Quando necessárias aos experimentos, foram descongeladas, colocadas em tubos cônicos de 15 mL, aos quais acrescentou-se R-10 até o volume de 10 mL e centrifugadas a 1200 rpm, por 10 minutos a 4°C.

3.7.2 Separação de linfócitos T pelo método de rosetas

Para recuperar os linfócitos T dentre uma população celular, foram preparadas hemácias de carneiro para formação de rosetas com linfócitos T (SAXON; FELDHAUS; ROBINS, 1976). Hemácias de carneiro foram colocadas em um tubo plástico estéril de 50 mL e centrifugadas a 900 G durante 10 minutos a 20 °C, e, a seguir, lavadas 2 vezes, com mesma centrifugação, em meio RPMI-1640 e em tampão PBS a temperatura ambiente. Estas hemácias foram tratadas com AET [S(2-aminoethyl)-isothioronium bromide hydrobromide] (Sigma Chemical Co.) a fim de mudar a carga elétrica da superfície das hemácias, possibilitando uma maior interação eletrostática com linfócitos T e a formação de rosetas estáveis. Para tanto, foram diluídos 0,5 g de AET em 12,5 mL de água bidestilada e deionizada, com ajuste final do pH para 9,0 utilizando-se NaOH 1,0 M (Reagen, RJ). Após passagem em filtro de 0,22 µm (Costar, Cambridge, MA), 8 mL de solução de AET foram acrescentados a cada 2 mL de papa de hemácias de carneiro e mantidos durante 40 minutos a 37 °C. A seguir, foram efetuadas lavagens (centrifugações de 650 G durante 10 minutos) das hemácias, com tampão PBS pH 7,2 gelado até obtenção de sobrenadante claro. As hemácias foram, então, ressuspensas até se obter uma suspensão a 4 % em R-10.

Uma suspensão de células mononucleares foi obtida como descrito no item 3.2, a partir de um volume de 30 mL de sangue periférico de doadores saudáveis. As células foram, então, incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 2 horas. Após esse período, as células não-aderentes foram retiradas e ajustadas para uma concentração máxima de 1×10^7 células/mL. Soro fetal bovino e hemácias de carneiro pré-tratadas com AET foram adicionados numa proporção de 2 : 1 : 2. A solução foi submetida a centrifugação a 200 G por 5 minutos a 4 °C e, em seguida, incubada em gelo por 1 hora. Após esse período, o número de rosetas foi contado e a suspensão foi submetida à centrifugação sobre Ficoll-Paque (900 G, 4°C, 35 minutos).

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

3.8 ELISAs (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Para análise da produção de citocinas pelas células cultivadas com citocinas ou MLT, utilizou-se o método ELISA através do kit BD OptEIA™ (BD Biosciences Pharmingen – San Diego, CA). Para este ensaio, o kit dispunha de anticorpos de captura, que foram plaqueados “overnight”, a 4°C, em placas para ELISA, de 96 wells, fundo chato e lavados no dia seguinte em lavadora para placas (Opsys MW – Dynex Technologies Inc. Chantilly, VA) por 3 vezes, a fim de retirar-se o excesso de anticorpos. A seguir as placas foram bloqueadas com solução de PBS com 10% de soro fetal bovino, 200 µL/poço, por 1 hora. Decorrido esse período, as placas foram novamente lavadas por 3 vezes e nos poços correspondentes colocados 100 µL de cada padrão e das amostras dos sobrenadantes das culturas (retirados no momento da coleta das células, e mantidos congelados até este momento). Após a colocação das amostras as placas foram seladas com filme plástico e incubadas por período de 2 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas por 5 vezes e a elas adicionados

100 μL de solução de reagente de detecção (anticorpos de detecção acrescido de peroxidase com estreptoavidina). As placas foram mais uma vez seladas e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. A seguir, as placas foram lavadas por 7 vezes e a cada poço adicionado 100 μL de solução substrato, e as placas incubadas por meia hora em temperatura ambiente e no escuro. Por fim, adicionou-se a cada poço 50 μL de solução de parada de reação (ácido sulfúrico 2 N) e as placas foram lidas dentro do período de 30 minutos de parada da reação, a 450 ηM , em leitor de ELISA (Versamax – Microplate Reader – Molecular Devices – Sunnyvale, CA), equipado com o “software” SOFTmax^R PRO (versão 3.1.2, Molecular Devices Corp.).

3.9 Análise estatística

O método estatístico utilizado para comparação dos vários tratamentos, foi o da Análise da Variância (ANOVA) Pareada, seguido pelo teste de Tukey, comparando todos os pares de colunas. A análise foi feita utilizando-se o “software” GraphPad Prism (versão 2.01, GraphPad Software Inc.).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da MLT sobre a diferenciação das células

Após adesão, PBMC aderentes foram cultivadas por um período de 5 dias, na presença de citocinas (GM-CSF e IL-4), MLT na concentração de 1 μ M ou MLT na concentração de 1 η M. Também foram feitos tratamentos combinados nos quais as células receberam citocinas e MLT 1 μ M ou citocinas e MLT 1 η M.

4.1.1 Fenótipo de membrana

Ao final do quinto dia, as células foram coletadas e avaliadas quanto à expressão dos marcadores CD14, CD80, CD86, CD83 e CD11c, por meio de citometria de fluxo, conforme relatado em material e métodos.

4.1.1.1 Expressão de CD86

A figura 3 mostra os resultados obtidos de um experimento típico, analisado por meio de citometria de fluxo, das culturas tratadas com citocinas (GM-CSF e IL-4), MLT 1 μ M ou MLT 1 η M e MLT 1 μ M ou MLT 1 η M combinada com citocinas.

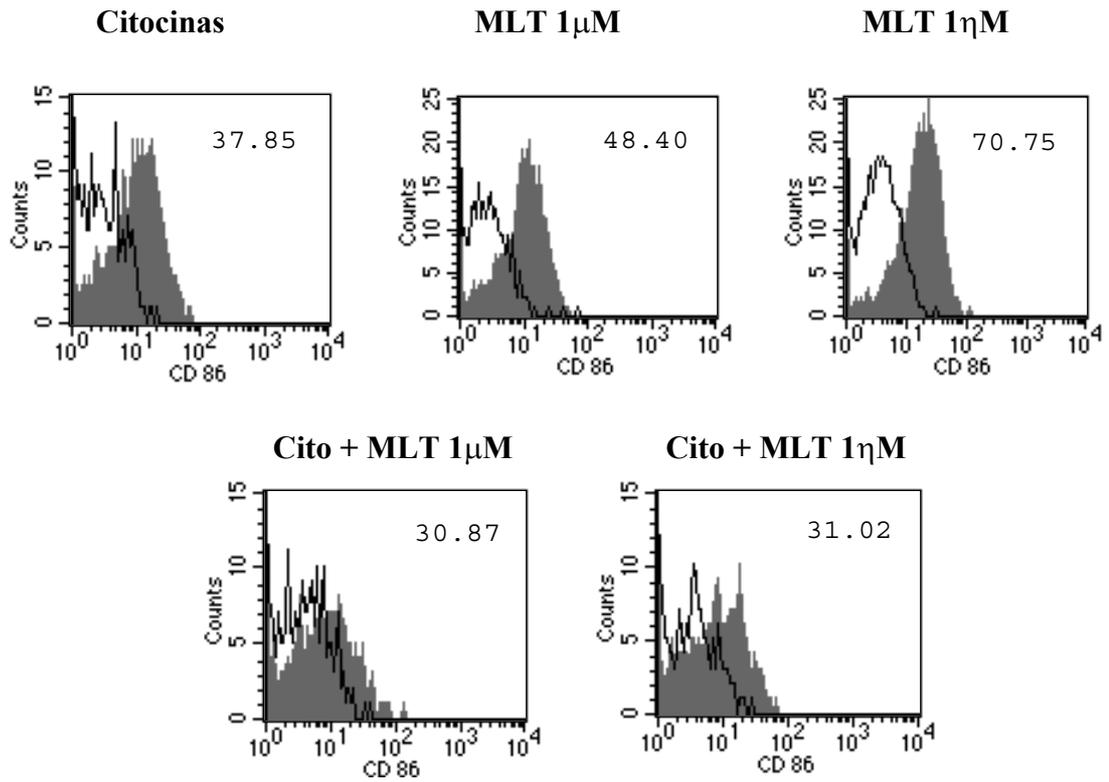


Figura 3. Expressão do marcador CD86 em culturas tratadas com citocinas (GM-CSF e IL-4), com MLT $1\mu\text{M}$, MLT $1\eta\text{M}$, citocinas combinadas com MLT $1\mu\text{M}$ e citocinas combinadas com MLT $1\eta\text{M}$. Os números no interior dos histogramas correspondem a porcentagem de células positivas para o marcador. Controle = histograma vazado; amostra=histograma cheio. Cito = citocinas (GM-CSF + IL4).

A figura 4 mostra o resultado de 11 repetições destes experimentos em que as culturas receberam MLT 1 μ M ou MLT 1 η M e também de 9 experimentos em que as culturas receberam MLT 1 μ M ou MLT 1 η M juntamente com citocinas. A análise estatística dos 11 experimentos foi feita em separado dos outros 9 resultados, comparando se apenas os experimentos correspondentes, gerando dessa forma resultados de ANOVA diferentes.

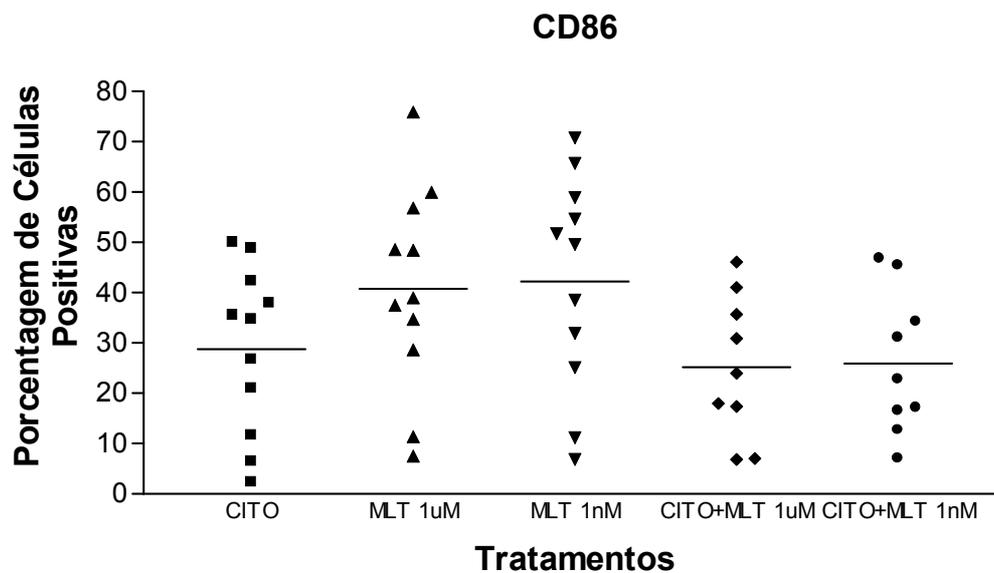


Figura 4. Porcentagem de expressão do marcador CD86 em células que foram tratadas com citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1 η M ou citocinas em combinação com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Anova p = 0,0531 para citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Anova p = 0,7833 para citocinas isoladamente ou combinada com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4).

4.1.1.2 Expressão de CD14

A figura 5 mostra a expressão de CD14 em 10 repetições do experimento em que as culturas receberam MLT 1 μ M ou MLT 1 η M e também de 8 experimentos em que as culturas receberam MLT 1 μ M ou MLT 1 η M juntamente com citocinas, sempre em comparação às células que receberam apenas as citocinas. A análise estatística dos 10 experimentos foi feita em separado dos outros 8 resultados, comparando se apenas os experimentos correspondentes, gerando dessa forma resultados de ANOVA diferentes, embora os resultados tenham sido plotados no mesmo gráfico.

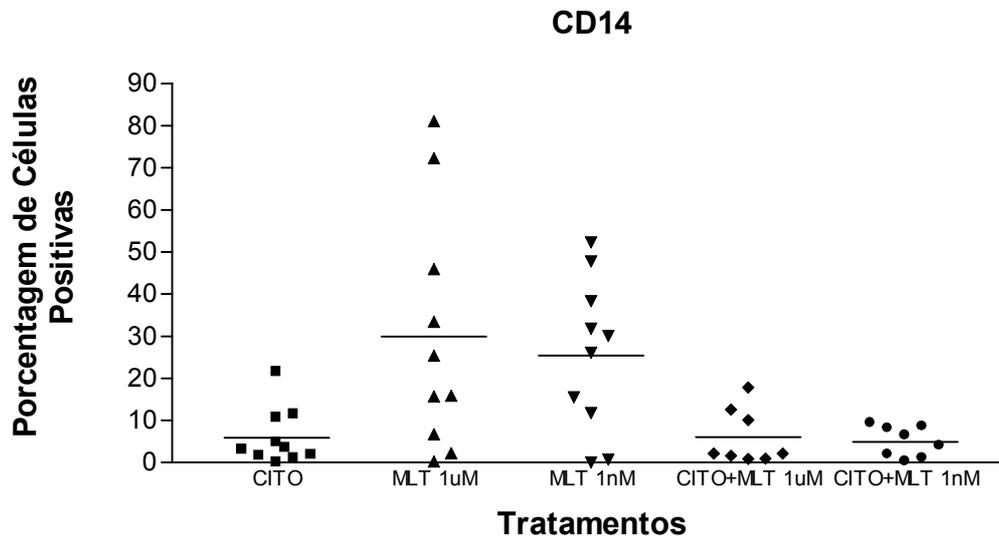


Figura 5. Porcentagem de expressão do marcador CD14 por células que foram tratadas com citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1 η M ou citocinas em combinação com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Anova p = 0,0057 para citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1 η M; teste de Tukey p < 0,01 para citocinas vs MLT 1 μ M e p < 0,05 para citocinas vs MLT 1 η M. Anova p = 0,7291 para citocinas isoladamente ou combinadas com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4).

4.1.1.3 – Expressão de CD80

A figura 6 mostra o resultado dos mesmos experimentos, mas quanto à expressão do CD80. Da mesma forma, a análise estatística dos 10 experimentos foi feita em separado dos outros 8 resultados, comparando se apenas os experimentos correspondentes, gerando dessa forma resultados de ANOVA diferentes, embora os resultados tenham sido plotados no mesmo gráfico.

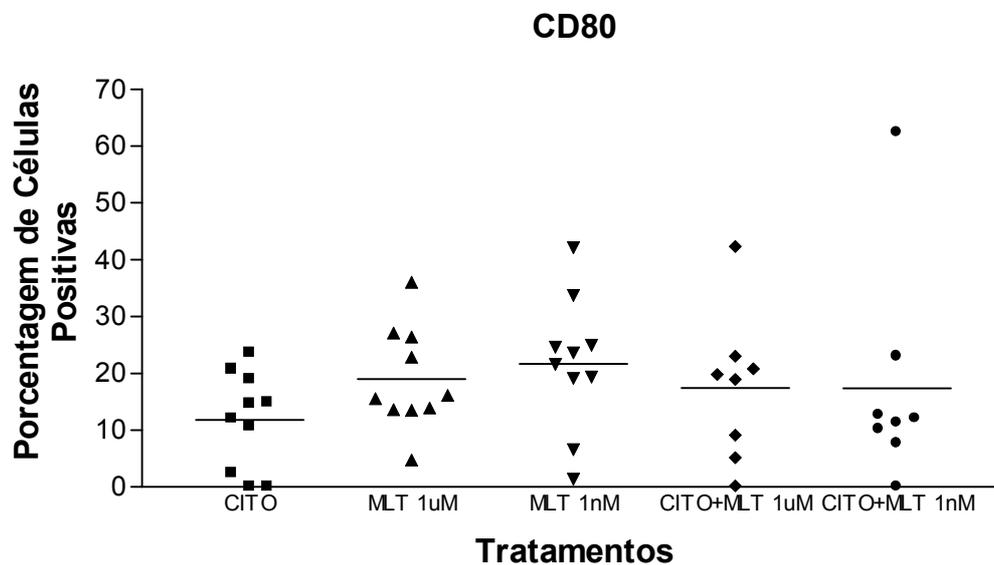


Figura 6. Porcentagem de expressão do marcador CD80 por células que foram tratadas com citocinas, MLT 1 µM ou MLT 1nM ou citocinas em combinação com MLT 1µM ou MLT 1nM. Anova $p = 0,0288$ para citocinas, MLT 1 µM ou MLT 1nM; teste de Tukey $p < 0,05$ para citocinas vs MLT 1nM. Anova $p = 0,1340$ para citocinas isoladamente ou combinadas com MLT 1 µM ou MLT 1nM. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4).

4.1.1.4 – Expressão de CD83

A figura 7 mostra o resultado de 9 repetições do experimento, quanto à expressão do marcador de ativação CD83 em culturas receberam MLT ou citocinas isoladamente e de 7 repetições para culturas com combinação de MLT e citocinas. Também aqui a análise estatística foi feita em separado para estes dois tipos de experimento.

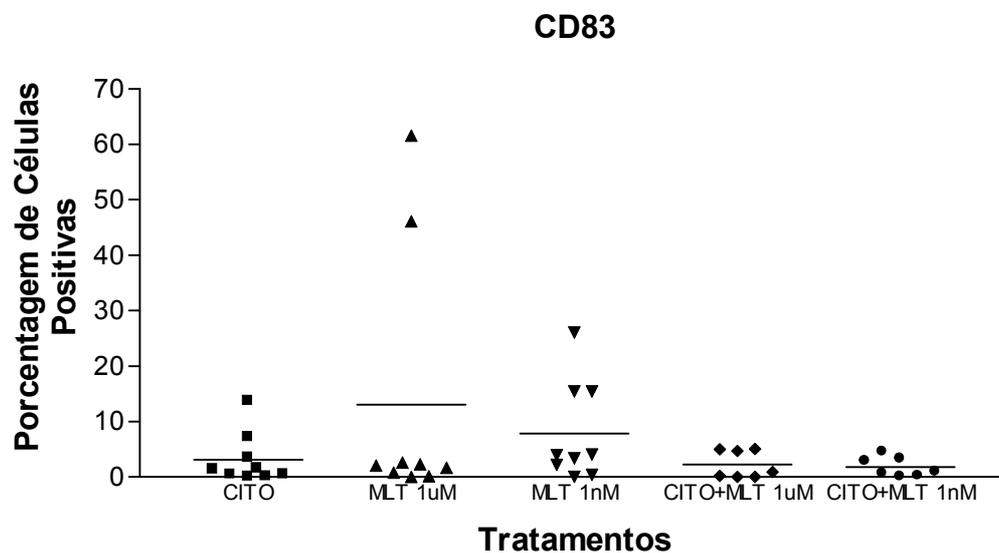


Figura 7. Porcentagem de expressão do marcador CD83 por células que foram tratadas com citocinas, MLT 1 µM ou MLT 1nM ou citocinas em combinação com MLT 1µM ou MLT 1nM. Anova $p = 0,1840$ para citocinas, MLT 1 µM ou MLT 1nM. Anova $p = 0,4384$ para citocinas isoladamente ou combinada com MLT 1 µM ou MLT 1nM. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4).

4.1.1.5 Expressão de CD11c

O marcador CD11c foi analisado em 5 repetições dos experimentos com tratamentos isolados e em três com o tratamento combinado. Os resultados encontrados estão resumidos na figura 8.

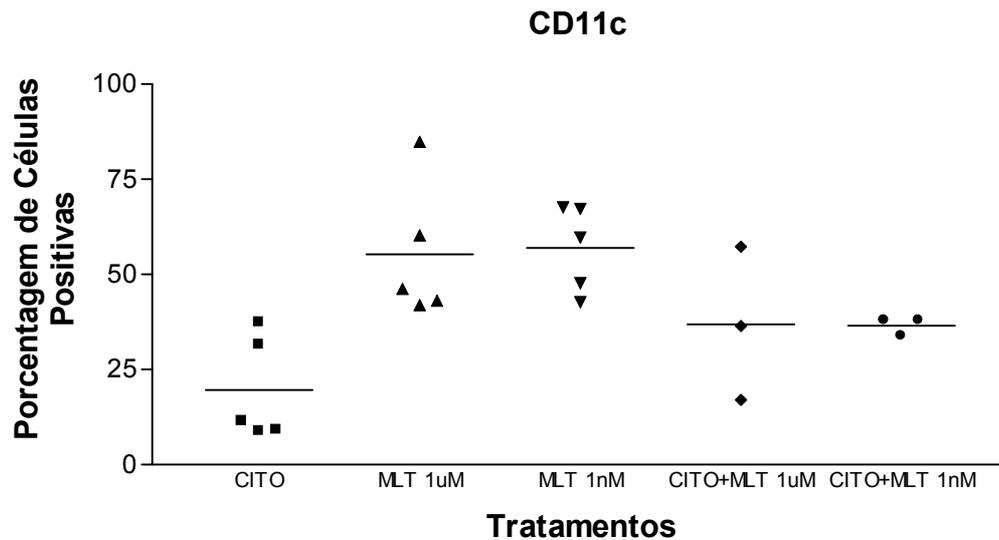


Figura 8. Porcentagem de expressão do marcador CD11c por células que foram tratadas com citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1nM, ou citocinas em combinação com MLT 1 μ M ou MLT 1nM. Anova $p = 0,001$ para citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1nM; teste de Tukey $p < 0,01$ para citocinas vs MLT 1 μ M e citocinas vs MLT 1nM. Anova $p = 0,6927$ para citocinas isoladamente ou combinadas com MLT 1 μ M ou MLT 1nM. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4).

4.1.2 Aloestimulação pelas células diferenciadas

Células que foram avaliadas quanto ao fenótipo, também foram avaliadas quanto à sua capacidade de aloestimulação em reação mista de linfócitos. As células respondedoras usadas foram PBMC não-aderentes. A figura 9 mostra os resultados de um experimento típico de aloestimulação.

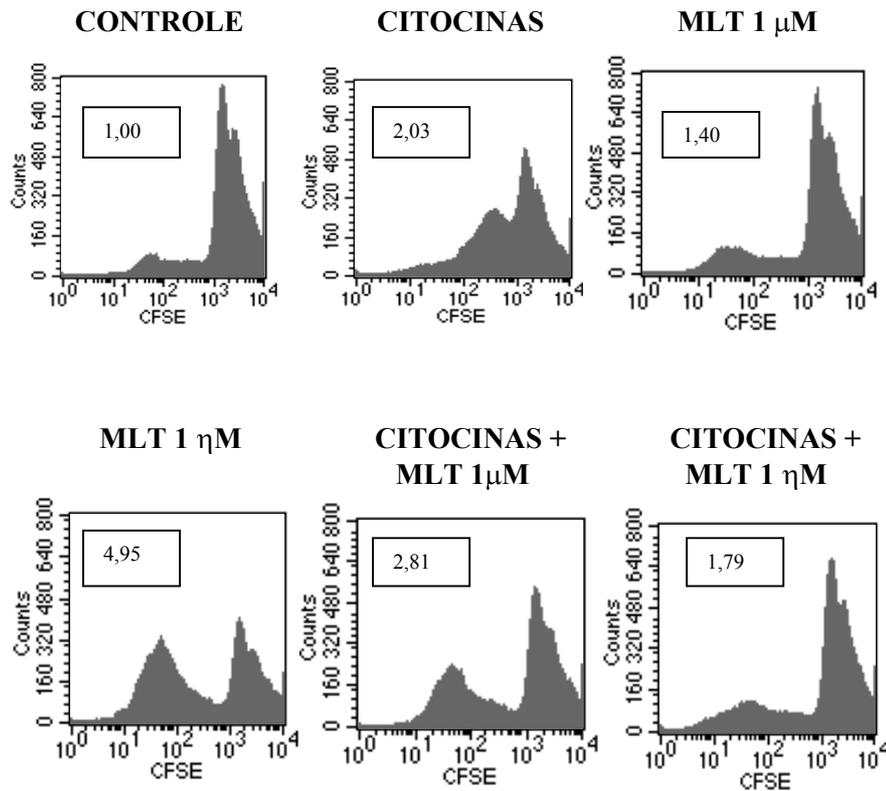


Figura 9. Ensaio de proliferação pela “diluição” da marcação com CFSE de células respondedoras co-cultivadas com células diferenciadas sob diferentes tratamentos: citocinas, MLT 1 μ M, MLT 1 η M, citocinas com MLT 1 μ M e, citocinas com MLT 1 η M. Números no interior dos histogramas representam o índice de proliferação. Controle = Células respondedoras cultivadas sem estímulo.

O resultado de 6 repetições destes experimentos de aloestimulação são apresentados na figura 10.

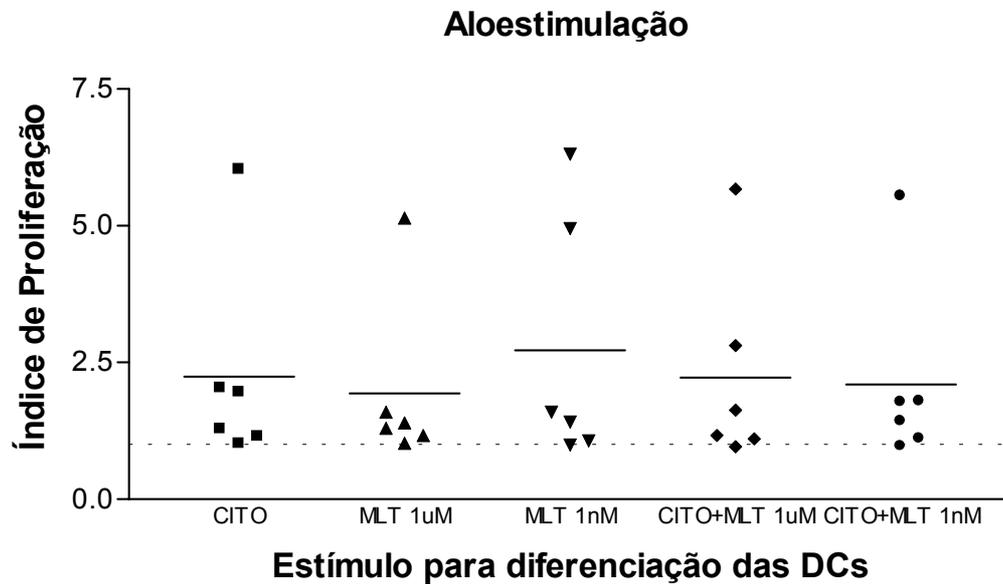


Figura 10. Resposta proliferativa de PBMC não-aderentes quando em contato com células estimuladoras tratadas com citocinas, MLT 1 μ M, MLT 1 η M ou tratadas com citocinas combinadas com MLT 1 μ M ou citocinas combinadas com MLT 1 η M. Anova p = 0,2426. Cito = Citocinas (GM-CSF e IL-4).

4.1.3 Produção de citocinas nas culturas de diferenciação

Os sobrenadantes das culturas de PBMC na presença dos diferentes estímulos (citocinas e MLT em diferentes concentrações/combinações) foi coletado e seu conteúdo analisado quanto à presença de diferentes citocinas: TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-12 p40, IL-12 p70 e IL-2. O número de repetições de cada ensaio e os resultados da análise estatística constam das legendas das figuras. Os resultados são apresentados nos gráficos a seguir.

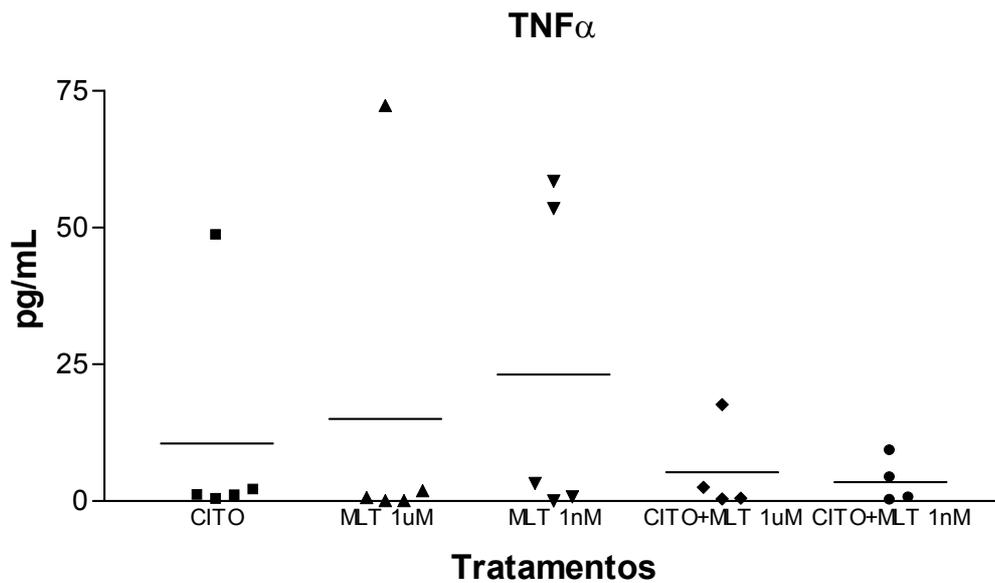


Figura 11. Produção de TNF- α por células cultivadas sob diferentes tratamentos. As células foram tratadas com citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1nM (n=5) ou citocinas combinadas com MLT 1 μ M ou citocinas combinadas com MLT 1nM (n=4). Anova p = 0,0206 para células tratadas com citocinas ou MLT 1 μ M ou MLT 1nM; teste de Tukey não apresentou diferenças. Anova p = 0,1904 para células tratadas com citocinas, citocinas com MLT 1 μ M e, citocinas com MLT 1nM. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4).

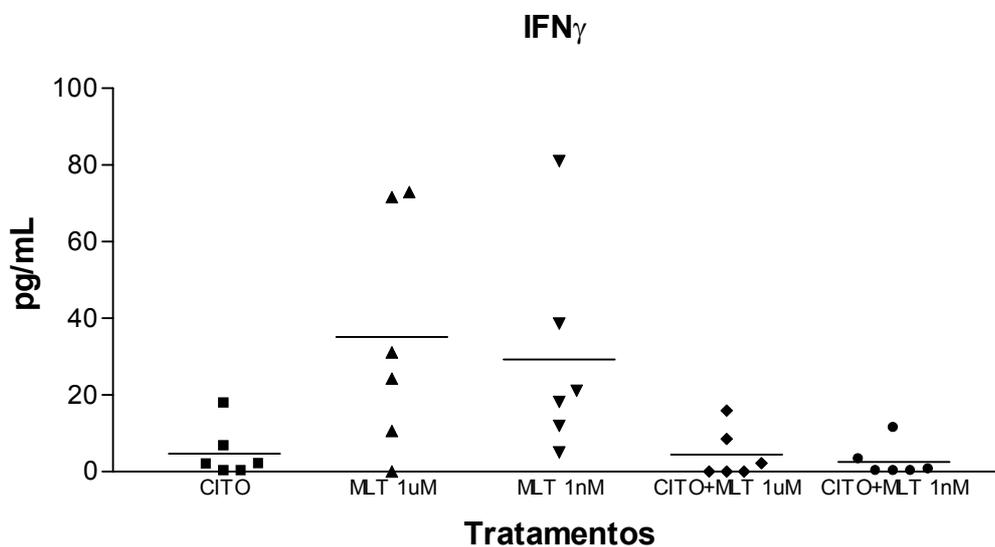


Figura 12. Produção de IFN- γ por células cultivadas sob diferentes tratamentos. As células foram tratadas com citocinas, MLT 1 μ M, MLT 1nM, citocinas combinadas com MLT 1 μ M ou citocinas combinadas com MLT 1nM (n=6). Anova p = 0,0052; teste de Tukey p < 0,05 para citocinas vs MLT 1 μ M, MLT 1 μ M vs citocinas com MLT 1 μ M e MLT 1 μ M vs citocinas com MLT 1nM. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4).

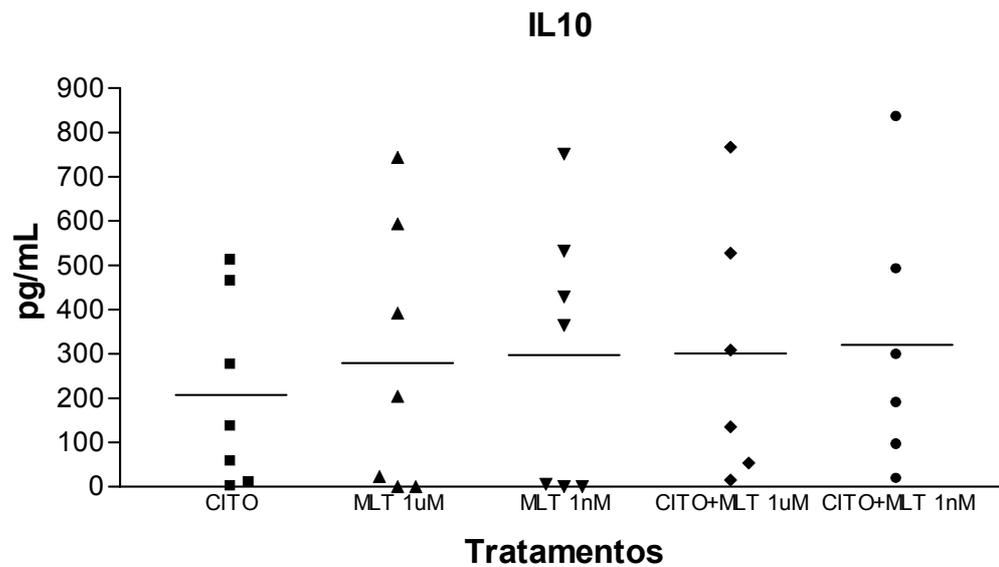


Figura 13. Produção de IL-10 por células cultivadas sob diferentes tratamentos. As células foram tratadas com citocinas, MLT 1 μ M, MLT 1 n M (n=7), ou citocinas combinadas com MLT 1 μ M ou citocinas combinadas com MLT 1 n M (n=6). Anova p = 0,1050 para citocinas, MLT 1 μ M ou MLT 1 n M. Anova p = 0,7575 para citocinas, citocinas com MLT 1 μ M ou citocinas com MLT 1 n M. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4).

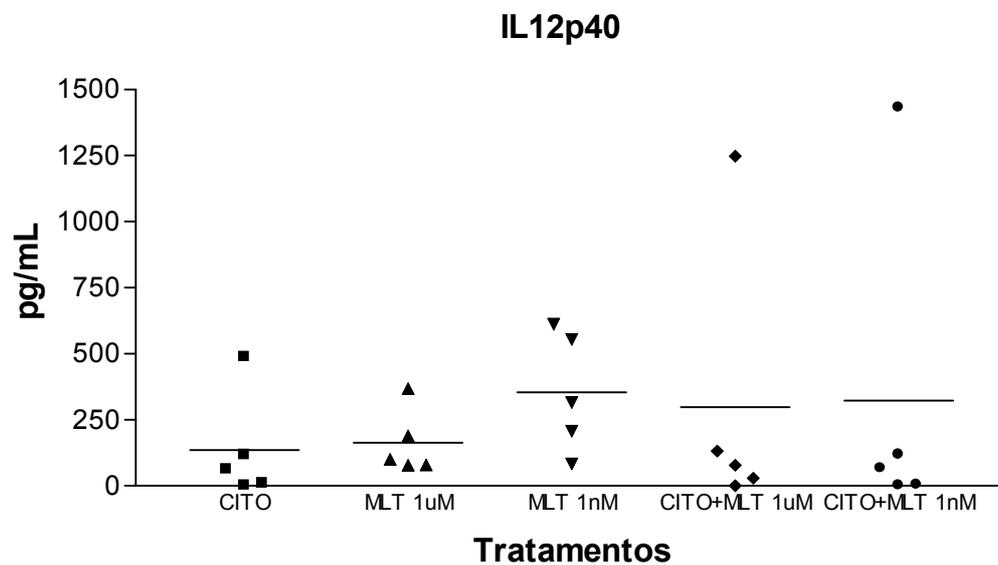


Figura 14. Produção de IL-12p40 por células cultivadas sob diferentes tratamentos. As células foram tratadas com citocinas, MLT 1 μ M, MLT 1 n M, citocinas combinadas com MLT 1 μ M ou citocinas combinadas com MLT 1 n M (n=6). Anova p = 0,797. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4).

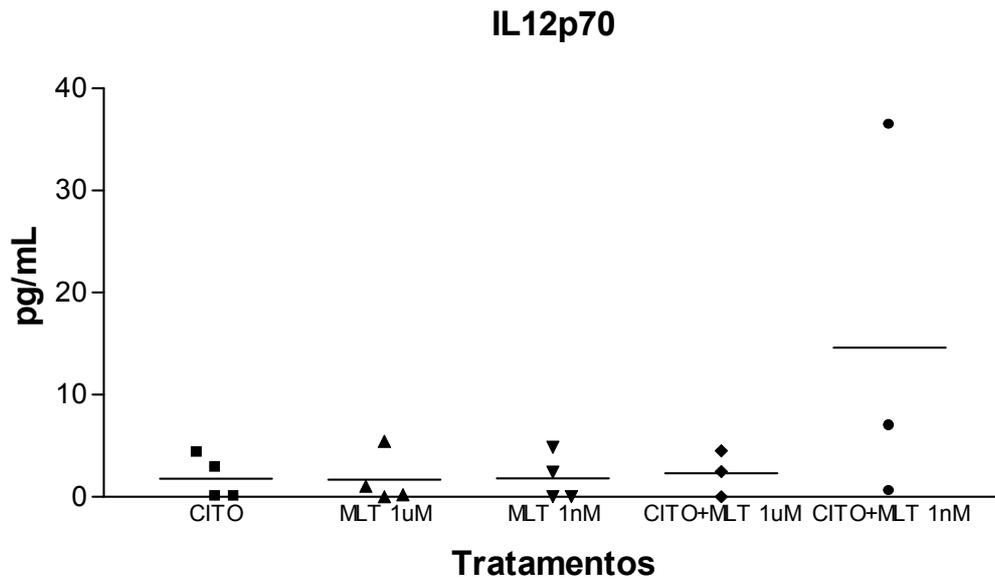


Figura 15. Produção de IL-12p70 por células cultivadas sob diferentes tratamentos. As células foram tratadas com citocinas, MLT 1µM, MLT 1nM (n=4), ou citocinas combinadas com MLT 1µM ou citocinas combinadas com MLT 1nM (n=3). Anova p = 0,3837 para citocinas, MLT 1µM ou MLT 1nM. Anova p = 0,1201 para citocinas, citocinas com MLT 1µM ou citocinas com MLT 1nM. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4).

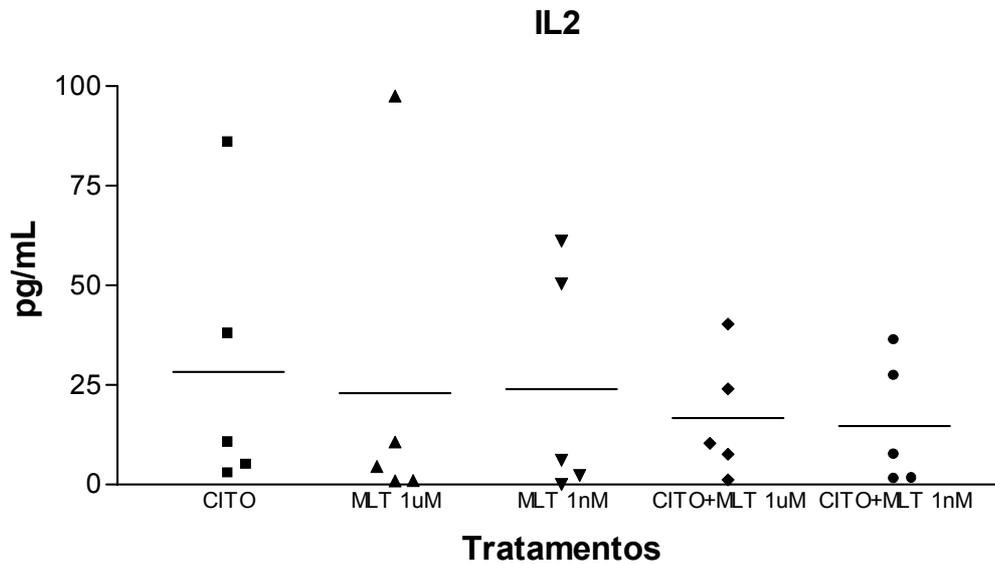


Figura 16. Produção de IL-2 por células cultivadas sob diferentes tratamentos. As células foram tratadas com citocinas, MLT 1µM, MLT 1nM, citocinas combinadas com MLT 1µM ou citocinas combinadas com MLT 1nM (n=5). Anova p = 0,7848. Cito = citocinas (GM-CSF e IL-4).

4.2 Efeito da MLT sobre a ativação de células dendríticas diferenciadas sob ação de citocinas

Células mononucleares do sangue periférico foram tratadas com citocinas (GM-CSF e IL-4) do primeiro ao quinto dia de cultura, para diferenciação. No quinto dia, a fim de ativá-las, essas culturas foram suplementadas com TNF- α , MLT 1 μ M, MLT 1 η M ou ainda BCG e mantidas em cultura até o sétimo dia, quando foram colhidas.

4.2.1 Fenótipo de membrana

Na tabela 1 encontram-se as análises do fenótipo das células cultivadas nas condições acima descritas, onde se vêem as médias e desvios-padrão das porcentagens de células positivas para os marcadores CD11c, CD14, CD80, CD83 e CD86.

Tabela 1 – Porcentagem de células positivas para as moléculas de membrana de células diferenciadas por citocinas e ativadas por MLT.

Marcador	n	ANOVA (p)	Estímulo			
			TNF- α	MLT 1 μ M	MLT 1 η M	BCG
CD11c	6	0,1973	20,09 \pm 22,30	20,45 \pm 13,00	11,50 \pm 10,40	11,75 \pm 7,94
CD14	10	0,2036	1,30 \pm 1,71	3,10 \pm 4,05	5,69 \pm 11,52	1,39 \pm 1,98
CD83	10	0,4800	1,54 \pm 2,01	2,97 \pm 1,91	9,60 \pm 26,80	1,17 \pm 1,13
CD80	10	0,3718	15,65 \pm 15,10	13,77 \pm 12,60	20,62 \pm 19,97	14,00 \pm 5,89
CD86	11	0,0655	24,19 \pm 15,60	27,37 \pm 21,20	36,05 \pm 15,27	30,79 \pm 18,13

4.2.2 Aloestimulação pelas células ativadas

As células diferenciadas com citocinas (GM-CSF e IL-4) e ativadas por TNF- α ou MLT 1 μ M ou MLT 1 η M ou ainda BCG foram submetidas à avaliação de sua capacidade de aloestimulação de linfócitos (MLR). Essa estimulação fez uso de células respondedoras obtidas pelo método de separação por não-aderência das células mononucleares. Os resultados obtidos de um experimento representativo podem ser vistos na figura 17.

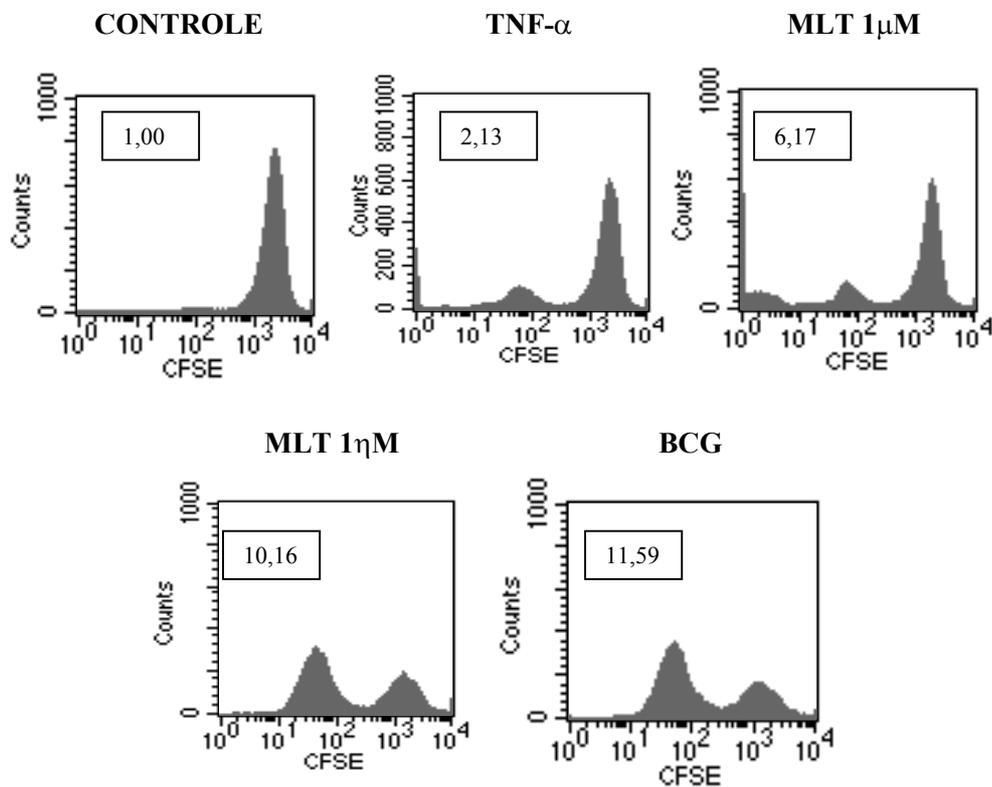


Figura 17. Ensaio de proliferação pela “diluição” da marcação com CFSE de células respondedoras co-cultivadas com células diferenciadas por tratamento com citocinas e ativadas (nos dois últimos dias de cultura) com TNF- α , MLT 1 μ M, MLT 1 η M ou BCG. Números no interior dos histogramas representam o índice de proliferação. Controle = Células respondedoras cultivadas sem estímulo.

Os resultados de 9 repetições deste experimento são mostrados na figura 18.

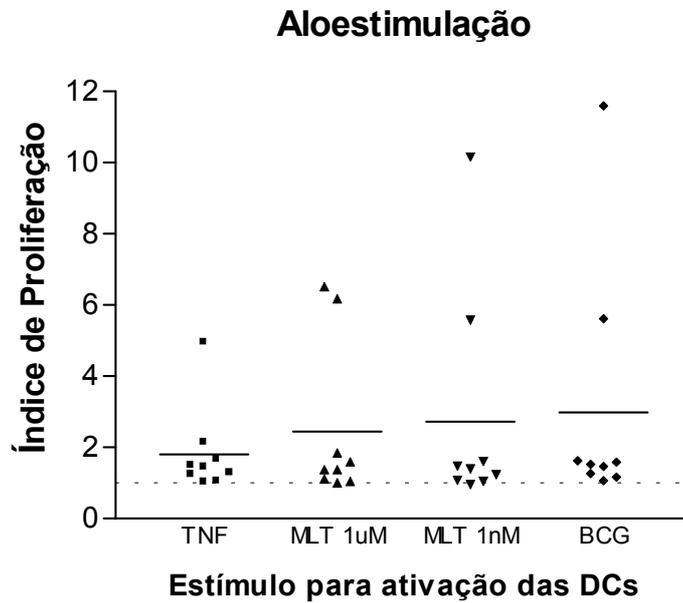


Figura 18. Resposta proliferativa dos linfócitos quando em contato com células estimuladoras diferenciadas com citocinas e ativadas com MLT 1µM ou MLT 1nM ou BCG, comparadas às diferenciadas com citocinas e ativadas com TNF-α. Anova p = 0,3560.

4.2.3 Produção de citocinas

Células submetidas à diferenciação com GM-CSF e IL-4 e ativação com TNF-α, MLT 1µM ou MLT 1nM ou BCG, foram avaliadas quanto ao padrão de citocinas produzido durante sua diferenciação/ativação. Os resultados obtidos para as citocinas IFN-γ, IL-10, IL-12p40, IL-12p70 e IL-2 são mostrados abaixo.

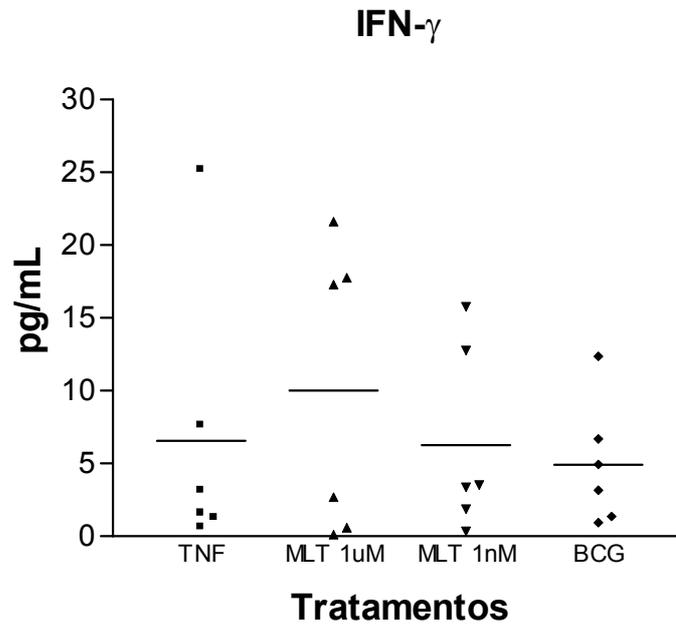


Figura 19. Produção de IFN- γ por células diferenciadas por citocinas (GM-CSF e IL-4) e ativadas com TNF- α ou MLT 1 μ M ou MLT 1nM ou BCG (n=6). Anova p = 0,0548.

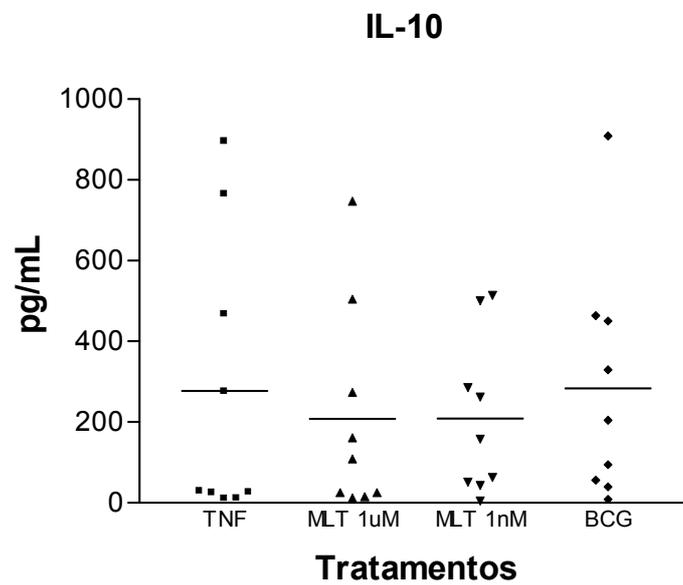


Figura 20. Produção de IL-10 por células diferenciadas por citocinas (GM-CSF e IL-4) e ativadas com TNF- α ou MLT 1 μ M ou MLT 1nM ou BCG (n=9). Anova p = 0,4185.

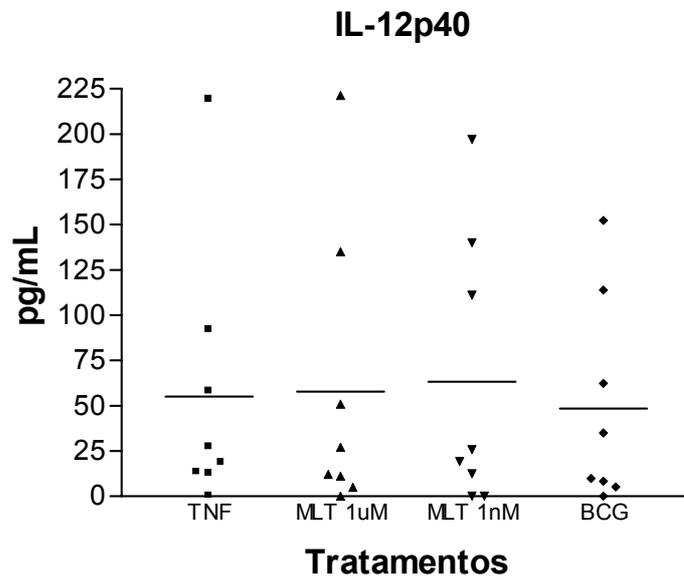


Figura 21. Produção de IL-12p40 por células diferenciadas por citocinas (GM-CSF e IL-4) e ativadas com TNF- α ou MLT 1 μ M ou MLT 1nM ou BCG (n=8). Anova p = 0,2473.

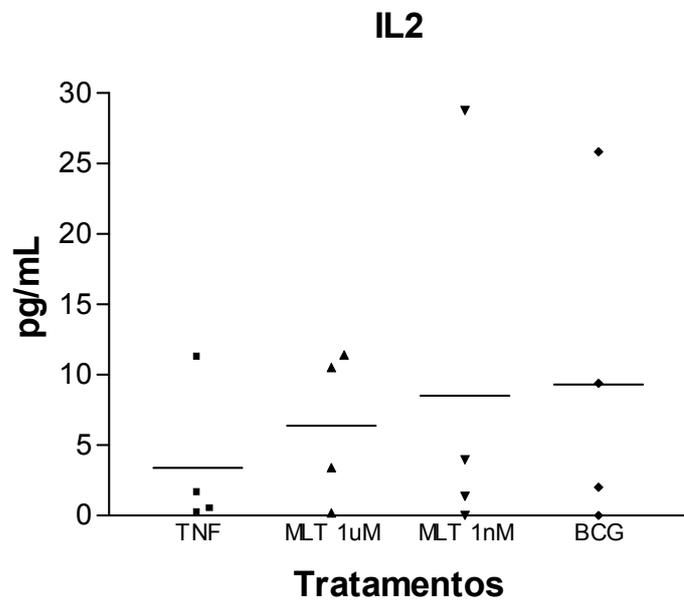


Figura 22. Produção de IL-2 por células diferenciadas por citocinas (GM-CSF e IL-4) e ativadas com TNF- α ou MLT 1 μ M ou MLT 1nM ou BCG (n=4). Anova p = 0,7195.

4.3 Efeito da MLT na ativação de células diferenciadas sob ação da MLT

A fim de avaliar a capacidade de a MLT ativar células diferenciadas com MLT, do quinto ao sétimo dia de cultura foi adicionada a cultura, MLT 1 μ M ou MLT 1 η M., em concentração igual à usada nos primeiros 5 dias da cultura. Como controle foram feitas DCs da maneira usual (citocinas + TNF- α).

4.3.1 Fenótipo de membrana

Para ilustrar os efeitos da MLT sobre a ativação de células dendríticas são mostrados, na figura 23, os histogramas de um mesmo experimento onde se vêem os marcadores CD83 e CCR7, obtidos de um experimento típico.

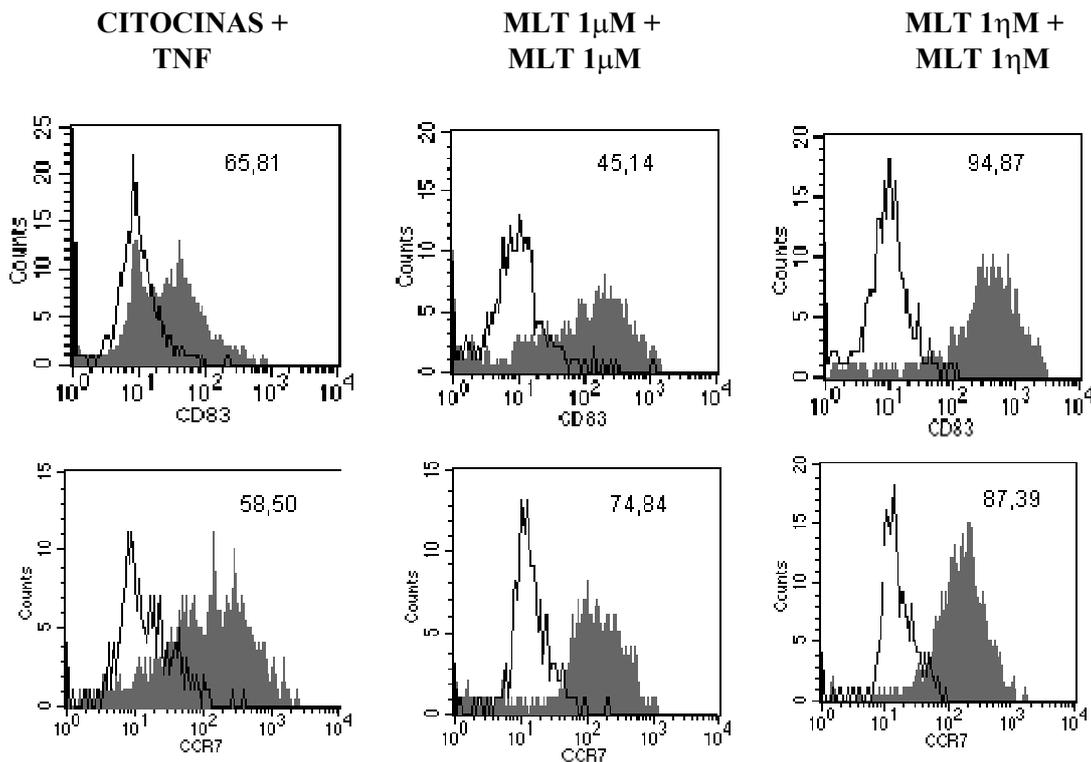


Figura 23. Expressão dos marcadores CD83 e CCR7 em células diferenciadas por MLT 1 μ M e MLT 1 η M e ativadas por MLT 1 μ M e MLT 1 η M, comparadas ao modo usual de diferenciação (GM-CSF e IL-4) e de ativação (TNF- α). Números no interior dos histogramas representam a porcentagem de células positivas para o marcador. Histograma cheio = amostra; histograma vazado = controle isotópico.

Na tabela 2 encontram-se as análises do fenótipo das células cultivadas nas condições acima descritas, onde se vêem as médias e desvios padrão das porcentagens de células positivas para os marcadores CD11c, HLA-DR, HLA-I, CD 14, CD80, CD83, CD86, CD1a, e CD40. O teste de Tukey apresentou diferenças para as moléculas de HLA-DR ($p < 0,01$ para citocinas + TNF- α vs MLT 1 η M), CD14 ($p < 0,05$ para citocinas + TNF- α vs MLT 1 μ M e $p < 0,01$ para citocinas + TNF- α vs MLT 1 η M) e CCR7 ($p < 0,01$ para citocinas + TNF- α vs MLT 1 μ M e $p < 0,001$ para citocinas + TNF- α vs MLT 1 η M).

Tabela 2 - Porcentagem de células positivas para as moléculas de membrana, que foram diferenciadas e ativadas por MLT.

Marcador	n	ANOVA (p)	Estímulos		
			Cito+TNF- α	MLT 1 μ M+ MLT 1 μ M	MLT 1 η M+ MLT 1 η M
CD11c	6	0,2287	50,92 \pm 30,53	43,44 \pm 36,51	41,06 \pm 35,83
HLA-DR	6	0,0103	37,72 \pm 25,24	54,43 \pm 25,48	61,65 \pm 22,43
HLA-I	6	0,3410	71,21 \pm 33,10	83,75 \pm 12,97	76,08 \pm 15,17
CD14	6	0,0096	15,06 \pm 23,17	28,25 \pm 22,43	32,87 \pm 21,05
CD80	6	0,5765	11,88 \pm 17,54	13,92 \pm 18,12	18,83 \pm 27,52
CD83	6	0,2263	22,12 \pm 30,78	30,54 \pm 26,48	37,15 \pm 35,12
CD86	6	0,4682	15,20 \pm 13,73	19,75 \pm 18,52	25,16 \pm 17,38
CCR7	6	0,0001	29,74 \pm 30,91	46,54 \pm 29,17	55,35 \pm 28,92
CD1a	6	0,6821	16,62 \pm 14,42	14,74 \pm 13,93	23,86 \pm 25,97
CD40	3	0,1268	31,11 \pm 26,53	19,23 \pm 21,23	20,69 \pm 26,67

4.3.2 Aloestimulação pelas células diferenciadas e ativadas por MLT

As células diferenciadas por MLT e ativadas por MLT 1 μ M ou MLT 1 η M e as diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α foram submetidas à avaliação de sua capacidade de aloestimulação de linfócitos (MLR). Essa estimulação fez uso de linfócitos T, obtidos pelo método de separação por rosetas formadas por eritrócitos de carneiro, cocultivados com as células ativadas. Os resultados obtidos para 6 repetições do experimento podem ser vistos na figura 24.

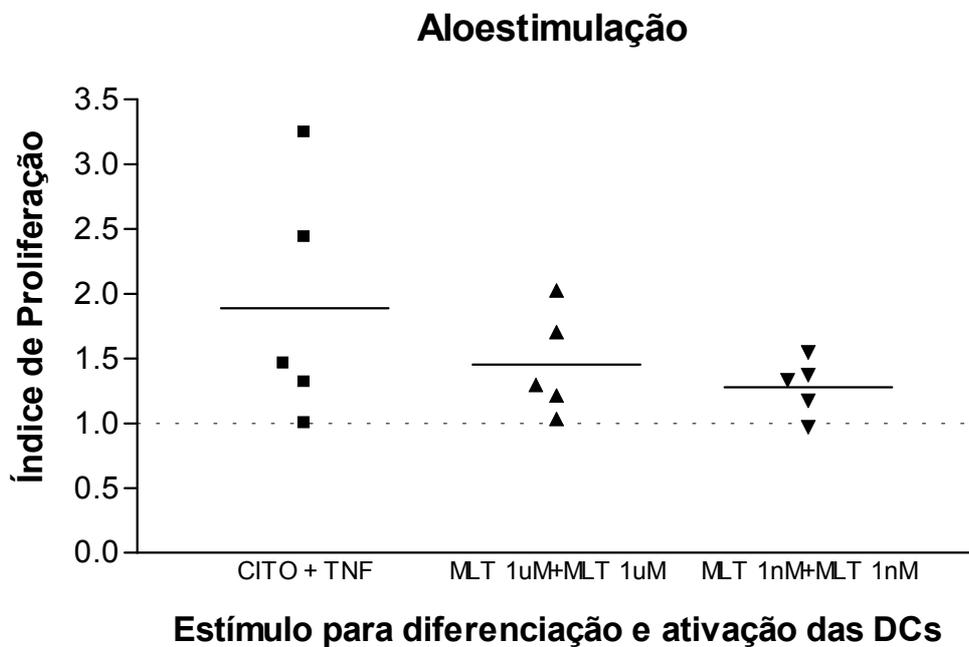


Figura 24. Resposta proliferativa dos linfócitos quando em contato com células estimuladoras diferenciadas com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M e ativadas com MLT 1 μ M ou MLT 1 η M, respectivamente, comparadas às diferenciadas com citocinas e ativadas com TNF- α . Anova $p = 0,1133$. Cito = Citocinas (GM-CSF e IL-4).

4.3.3 Produção de citocinas nas culturas diferenciadas e ativadas por MLT

A presença das citocinas IFN- γ , IL-10, IL-12 p40, IL-12 p70 e IL-2 foi avaliada nos sobrenadantes das culturas de DCs, e os resultados de experimentos independentes são apresentados a seguir.

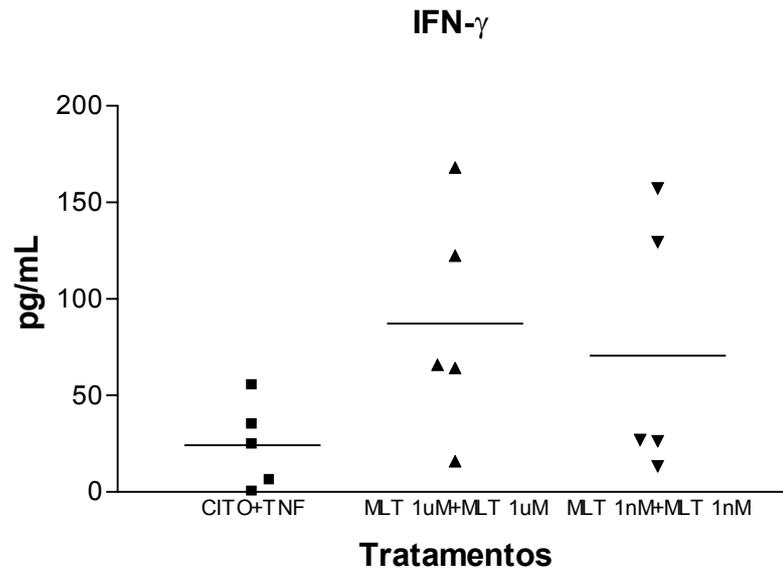


Figura 25. Produção de IFN- γ por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou diferenciadas por MLT 1 μ M e ativadas por MLT 1 μ M ou diferenciadas por MLT 1nM e ativadas por MLT 1nM (n=5). Anova p = 0,0123. Teste de Tukey P < 0,05 para citocinas vs MLT 1 μ M. Cito = Citocinas (GM-CSF e IL-4).

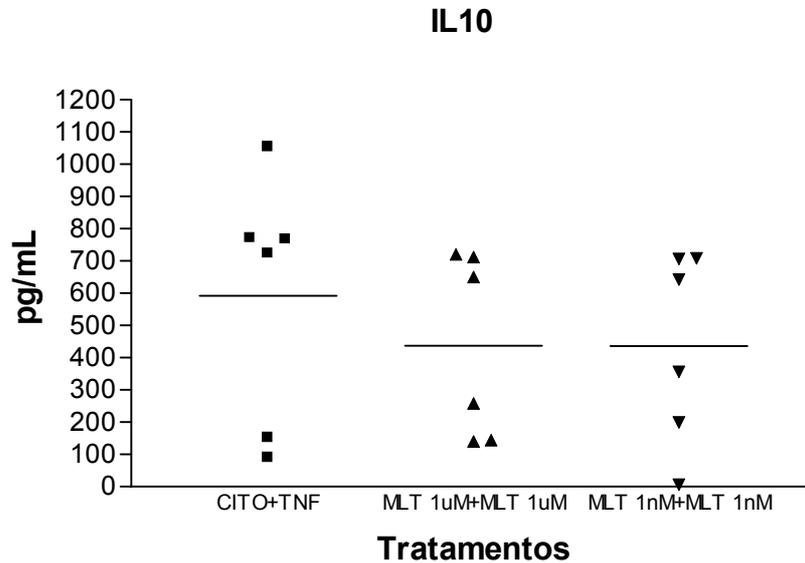


Figura 26. Produção de IL-10 por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou diferenciadas por MLT 1 μ M e ativadas por MLT 1 μ M ou diferenciadas por MLT 1nM e ativadas por MLT 1nM (n=5). Anova p = 0,0816. Cito = Citocinas (GM-CSF e IL-4).

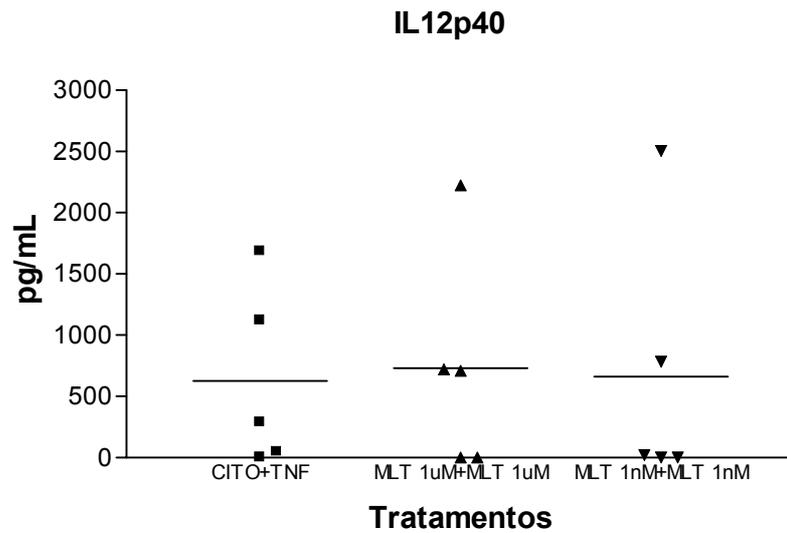


Figura 27. Produção de IL-12p40 por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou diferenciadas por MLT 1 μ M e ativadas por MLT 1 μ M ou diferenciadas por MLT 1nM e ativadas por MLT 1nM (n=5). Anova p = 0,8020. Cito = Citocinas (GM-CSF e IL-4).

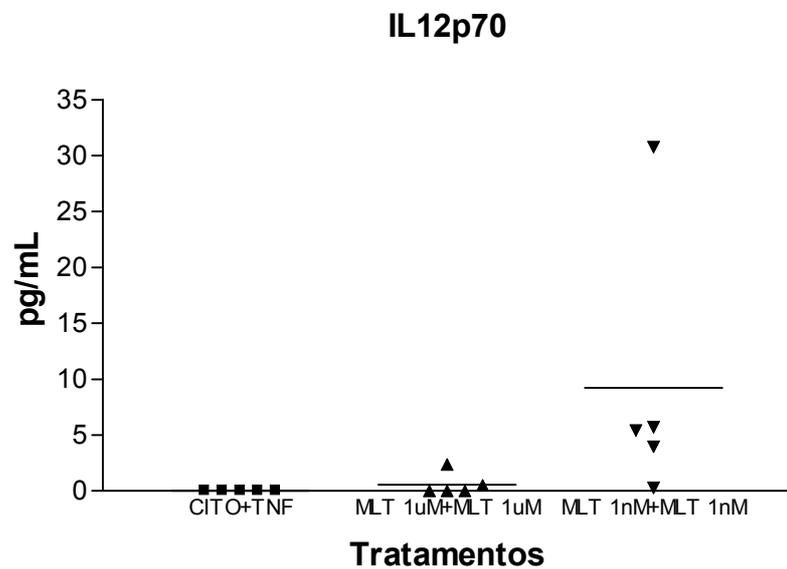


Figura 28. Produção de IL-12p70 por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou diferenciadas por MLT 1 μ M e ativadas por MLT 1 μ M ou diferenciadas por MLT 1nM e ativadas por MLT 1nM (n=5). Anova p = 0,1343. Cito = Citocinas (GM-CSF e IL-4).

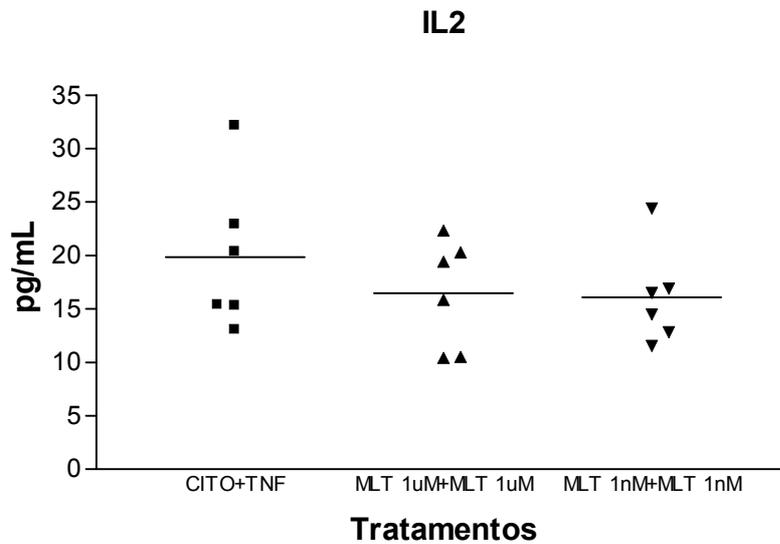


Figura 29. Produção de IL-2 por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou diferenciadas por MLT 1 μ M e ativadas por MLT 1 μ M ou diferenciadas por MLT 1nM e ativadas por MLT 1nM (n=5). Anova p = 0,3952. Cito = Citocinas (GM-CSF e IL-4).

4.4 Efeito da ativação por MLT combinada com TNF- α em células diferenciadas por citocinas

Células diferenciadas por citocinas foram submetidas a ativação por MLT (concentração de 1 μ M ou 1nM) combinada com TNF- α , a partir do quinto dia de cultura, para que se pudesse avaliar os efeitos da combinação deste hormônio com essa citocina, usualmente utilizada para ativação de células dendríticas cultivadas *in vitro*. Como controle padrão foram feitas DCs da maneira usual (citocinas + TNF- α).

4.4.1 Fenótipo de membrana

A tabela 3 mostra os dados obtidos para os marcadores CD14, CD80, CD83, CD86 e CD11c, através das médias e desvios padrão das porcentagens de células positivas para estes marcadores.

Tabela 3. Porcentagem dos marcadores de membrana de células ativadas com MLT combinada com TNF- α .

Marcador	n	Anova (p)	Estímulos		
			TNF- α	MLT 1 μ M + TNF- α	MLT 1 η M + TNF- α
CD14	9	0,0674	1,288 \pm 1,845	1,820 \pm 3,446	3,570 \pm 4,383
CD80	9	0,3802	17,75 \pm 20,26	11,50 \pm 9,735	13,58 \pm 8,634
CD83	9	0,2966	2,601 \pm 4,862	7,497 \pm 12,42	2,506 \pm 2,215
CD86	9	0,7374	19,94 \pm 13,60	21,82 \pm 15,95	23,53 \pm 19,64
CD11c	6	0,4840	11,36 \pm 9,990	10,83 \pm 13,95	6,395 \pm 3,829

4.4.2 Aloestimulação pelas células ativadas por MLT combinada com TNF- α em células diferenciadas por citocinas

Os resultados de 6 experimentos onde estas células foram usadas como estimuladoras de PBMC não-aderentes, são mostrados na figura 30.

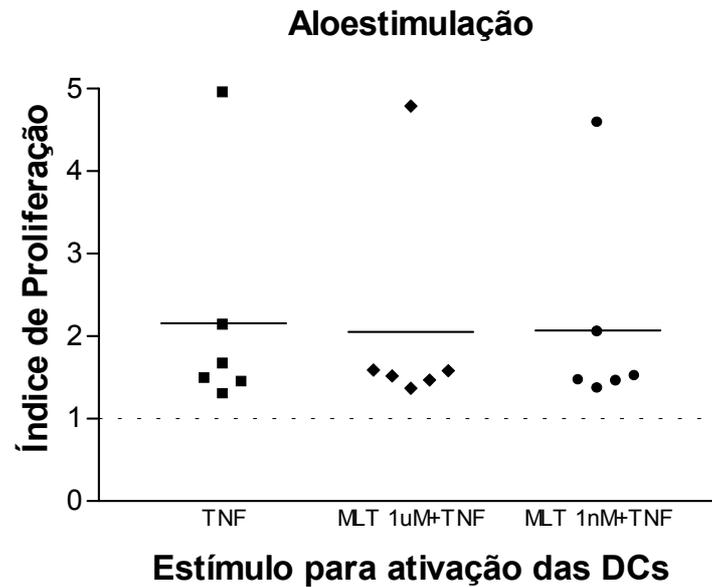


Figura 30. Resposta proliferativa dos linfócitos quando em contato com células estimuladoras diferenciadas com citocinas e ativadas com TNF- α ou MLT 1 μ M com TNF- α ou MLT 1nM com TNF- α (n = 6). Anova p = 0,4911.

4.4.3 Produção de citocinas

Foram dosadas as citocinas IFN- γ , IL-10, IL-12p40, IL-12p70 e IL-2 no sobrenadante das culturas de DCs obtidas pelo cultivo com citocinas e ativação com MLT 1 μ M ou MLT 1nM combinada ao TNF- α ou com TNF- α isoladamente. Os resultados para estas dosagens são apresentados a seguir.

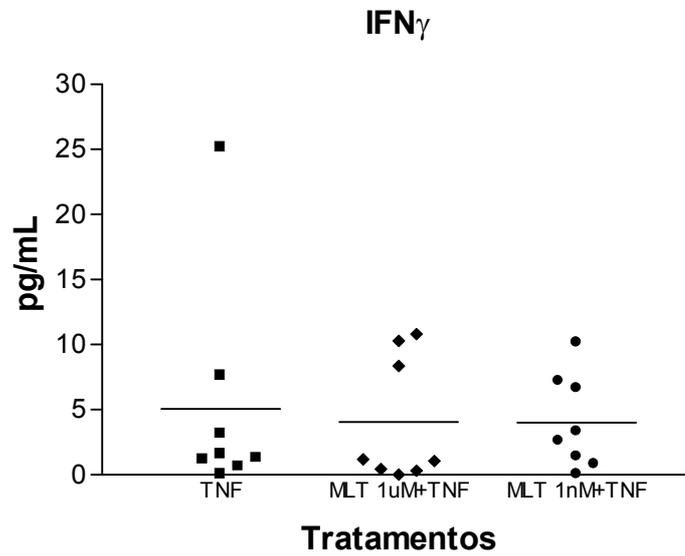


Figura 31. Produção de IFN- γ por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou por MLT 1 μ M combinada com TNF- α ou ativadas por MLT 1nM combinada com TNF- α . Anova p = 0,8889.

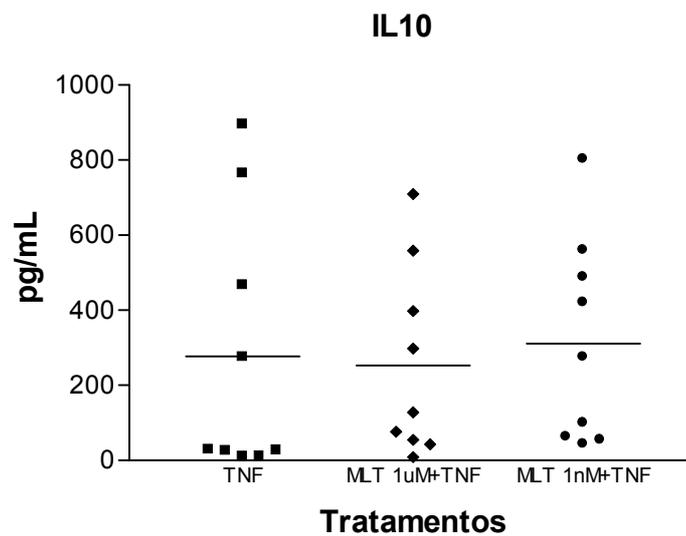


Figura 32. Produção de IL-10 por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou por MLT 1 μ M combinada com TNF- α ou ativadas por MLT 1nM combinada com TNF- α . Anova p = 0,3512.

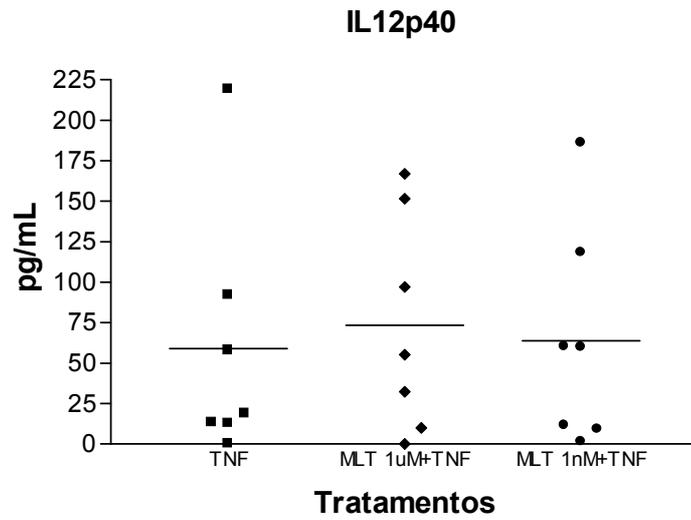


Figura 33. Produção de IL-12p40 por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou por MLT 1 μ M combinada com TNF- α ou ativadas por MLT 1nM combinada com TNF- α . Anova $p = 0,0034$. Teste de Tukey não apresentou diferenças.

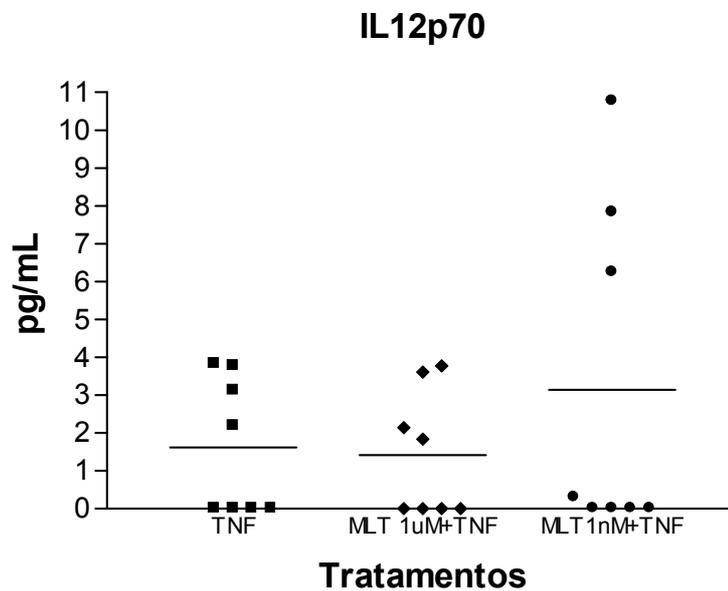


Figura 34. Produção de IL-12p70 por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou por MLT 1 μ M combinada com TNF- α ou ativadas por MLT 1nM combinada com TNF- α . Anova $p = 0,4522$.

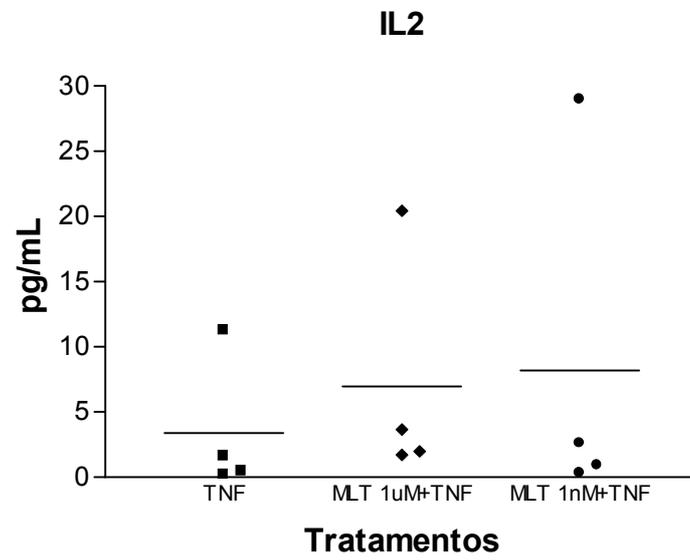


Figura 35. Produção de IL-2 por células diferenciadas por citocinas e ativadas por TNF- α ou por MLT 1 μ M combinada com TNF- α ou ativadas por MLT 1nM combinada com TNF- α . Anova p = 0,7143.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho investigou a ação da MLT sobre a diferenciação e ativação de PBMC em células dendríticas e os resultados indicaram que a MLT tem, de fato, a capacidade de afetar este tipo celular. Inicialmente, para verificar a ação da MLT sobre a diferenciação, as células mononucleares do sangue periférico foram mantidas em culturas, que receberam MLT em concentrações “fisiológica” e “farmacológica”. Estes dois níveis de dose foram assim chamados, seguindo o descrito por Garcia-Mauriño *et al.* (1997), embora haja discussão quanto ao que seriam níveis fisiológicos de MLT, uma vez que estes variam amplamente, dependendo das condições ambientais e dos tecidos analisados (REITER; TAN 2003). Como controle para a diferenciação das PBMC em DC, as células foram cultivadas com as citocinas, GM-CSF e IL-4, em condições usualmente utilizadas (KOMI *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2002; BARBUTO *et al.*, 2004).

A expressão da molécula de CD14, marcador típico de monócitos e macrófagos e que deve deixar de ser expresso em DC (CANING *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2002), em culturas estimuladas por MLT, tanto em concentração de 1 μ M quanto de 1 η M, foi mais intensa que nas culturas estimuladas apenas com citocinas. O que poderia sugerir que a MLT não é capaz de induzir a diferenciação de PBMC em DC. De fato, embora não haja relatos sobre a alteração na expressão marcadores para células dendríticas ou mesmo monócitos e macrófagos, por efeito da MLT, trabalhos anteriores com essa substância mostraram efeito sobre ativação de monócitos e macrófagos, com produção de reativos do oxigênio e aumento da citotoxicidade sobre células tumorais (MORREY *et al.*, 1994). Por outro lado, a citocina IL-4, sabidamente, diminui a expressão do marcador CD14 na diferenciação de PBMCs em DCs (LAUENER *et al.*, 1990), embora haja relatos de manutenção da expressão deste marcador em DCs, o que denotaria uma célula imatura com alta capacidade fagocítica, como mostrado em estudo no qual se utilizou GM-CSF e IL-4 para diferenciação juntamente com histamina.

Este estudo mostra, que o cultivo destas células com histamina, provoca a manutenção das moléculas CD14 na superfície celular e diminui a expressão de CD1a, levando a célula a apresentar um fenótipo de DC com aumentada capacidade fagocítica e de produção de citocinas, porém mostrando baixa atividade aloestimuladora (KATOH *et al*, 2005). É interessante notar, porém, que a MLT induziu a diminuição da expressão de CD14 nas células (quando comparada à expressão de células mantidas em cultura pelo mesmo período, sem estímulo – dados não mostrados), sugerindo como hipótese, uma cinética diferente de perda do CD14 em células tratadas com a MLT, mas não ausência de diferenciação das PBMC em DCs. Ainda vale ressaltar que em culturas tratadas com a combinação de MLT com citocinas a expressão de CD14 foi baixa, semelhante a daquelas tratadas apenas com citocinas. Da mesma forma, culturas diferenciadas com citocinas e ativadas com TNF- α , MLT 1 μ M, MLT 1 η M ou ainda BCG mostraram níveis igualmente baixos deste marcador. Aparentemente confirmando os efeitos da IL-4 (diminuindo) e da MLT (“aumentando”) a expressão do CD14, células que foram diferenciadas e ativadas por MLT apresentaram maior expressão deste marcador que aquelas diferenciadas e ativadas por citocinas. Por outro lado, e de certa forma inesperadamente, células de culturas diferenciadas por MLT e ativadas com TNF- α expressaram níveis de CD14 praticamente iguais e baixos.

O marcador CD80, juntamente com o CD86, constitui um dos principais sinais co-estimuladores para os linfócitos T (LANIER *et al*, 1995; DILIOGLOU; CRUSE; LEWIS, 2003) e sua expressão é característica das DCs. Desta forma é relevante nossa observação de que a população de células diferenciadas sob ação da MLT, independentemente da dose, mostrou maior frequência de células CD80+ do que a população diferenciada sob ação das citocinas GM-CSF e IL-4. Este aumento da expressão de CD80 é compatível com estudos que relatam aumento na apresentação de antígenos sob influência da MLT. Num destes estudos, macrófagos esplênicos de camundongos tratados com MLT apresentaram aumento de

expressão de moléculas de MHC de classe II, da produção de IL-1 e TNF- α e tiveram sua capacidade de estimulação antígeno-específica de linfócitos T aumentada (PIOLI *et al*, 1993). Assim, em contraposição à aparente “deficiência” da MLT na indução da diferenciação de PBMC em DCs, esta expressão aumentada de CD80 pelas células tratadas com MLT, sugere que este hormônio é capaz de induzir esta diferenciação. É possível até mesmo especular que a população de macrófagos esplênicos do trabalho anteriormente citado esteja, na verdade, “contaminada” por DCs, geradas pelo tratamento com MLT. Ainda confirmando este efeito, encontramos expressão de CD86 equivalente em PBMC diferenciadas sob ação da MLT ou de citocinas.

De maneira surpreendente, os experimentos que fizeram uso da MLT para ativar DCs diferenciadas por ação das citocinas indicaram que o hormônio tem efeito equivalente ao TNF- α ou ao BCG na ativação das células, ao menos quanto à expressão de CD80 e CD86. Esta observação parece sugerir que a ação da MLT sobre as PBMC seria “completa”, isto é induziria desde sua diferenciação em DCs, até sua ativação. Também semelhante foi a expressão dos marcadores CD80 e CD86 entre as condições testadas nos experimentos em que se usou MLT para diferenciação e TNF- α para ativação ou MLT para diferenciação e ativação das células. Entretanto, é preciso notar que não obtivemos níveis elevados de expressão da maioria dos marcadores estudados, o que exige cautela na elaboração de conclusões. De qualquer forma, os resultados obtidos nos ensaios de aloestimulação, indicam que as células obtidas nestas culturas tinham atividade compatível com a de DCs, que deverá ser, no entanto, investigada com maior profundidade no futuro.

É interessante que também para a expressão da molécula de CD83, apresentada como um marcador da ativação das DCs (ZHOU; TEDDER, 1995), obtivemos baixa frequência de células positivas. Todavia, e de maneira sugestiva, nas culturas diferenciadas e ativadas com MLT, observamos expressão maior desta molécula. Mais uma vez, os resultados parecem

sugerir que a MLT parece ser capaz de induzir desde a diferenciação até a ativação de DCs a partir de PBMC do sangue periférico humano. Vale lembrar que a molécula CD83 pode ser encontrada no citoplasma de monócitos, macrófagos e células dendríticas, sendo translocada para a superfície após ativação das células, o que pode acontecer muito rapidamente com o uso de LPS, mas permanecendo estável apenas em DCs (CAO; LEE; LU, 2005).

A molécula CD11c, uma integrina com função na adesão de monócitos, macrófagos e DCs, componente de receptores para diferentes ligantes (LPS, fibrinogênio e fatores do complemento), marcadora da origem mielóide de uma célula (CORBI; LOPEZ-RODRIGUEZ, 1997) e frequentemente usada para identificar as DCs (SUMMERS *et al*, 2001; NUNEZ *et al*, 2004), foi expressa em porcentagens maiores nas culturas tratadas com MLT do que nas culturas tratadas apenas com citocinas. Esta observação, mais uma vez reforça a capacidade da MLT induzir a diferenciação das PBMC em DCs.

As células diferenciadas com o uso da MLT apresentaram fenótipo compatível com o de DCs, também quanto à expressão das moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade, isto tanto para as de classe I, necessárias à apresentação antigênica principalmente para os linfócitos T CD8+ (GAO; JAKOBSEN, 2000), quanto para as de classe II, necessárias à apresentação de antígenos aos linfócitos T auxiliares CD4+(KONIG, 2002). Na verdade, células tratadas com MLT apresentaram níveis mais elevados de expressão das moléculas de classe II, fenômeno que já havia sido descrito em (PIOLI *et al*, 1993; JIANG-SHIEH *et al*, 2005).

Verificou-se também a presença de moléculas CD1a, um marcador fenotípico encontrado em células de Langerhans, um subtipo de célula dendrítica encontrado principalmente na pele (ATHANASAS-PLATISIS *et al*, 1995; GATTI *et al*, 2000). A expressão deste marcador não se mostrou diferente entre os tratamentos dados às culturas. Da mesma forma, não encontramos diferença na expressão do CD40, molécula expressa em DCs,

e cuja interação com a molécula ligante de CD40 (CD40L) em células murinas T CD4⁺ retorna à DC sinais de maturação, com aumento da expressão de MHC de classe II, CD80 e CD86, acompanhado de aumento na apresentação de antígenos tumorais endocitados, pelo MHC de classe I e classe II (WATANABE *et al*, 2003). Já a molécula CCR7, que tem expressão aumentada nas células dendríticas maduras, apresentou-se em níveis mais altos em células de culturas tratadas com MLT para diferenciação e ativação. Indução semelhante da expressão de CCR7 foi conseguida por pesquisadores utilizando PGE₂, ou estímulo por CD40L (SCANDELLA *et al*, 2002).

De forma semelhante ao observado para a expressão de marcadores de membrana, as PBMC diferenciadas sob estímulo da MLT tiveram padrão de secreção de citocinas muito semelhante ao das células diferenciadas sob ação de GM-CSF, IL-4 e TNF- α . Na verdade há diversos relatos de efeitos do tratamento com MLT sobre a produção de citocinas. Por exemplo, esplenócitos de camundongos apresentaram aumento da produção de IL-1 β , TNF- α , IFN- γ e M-CSF, enquanto a produção de TGF- β 1 se manteve inalterada (LIU; NG; FUNG, 2001), células U-937 e Jurkat, mostraram aumento da produção de IL-6 e IL-2 (GARCIA-MAURIÑO *et al*, 2000), e macrófagos sinoviais, obtidos de pacientes com artrite reumatóide tiveram aumento da produção de IL-12 (CUTOLO *et al*, 1999). Na verdade, até mesmo as variações dos níveis de IL-2, IL-6, IL-10 e IL-12 no sangue de voluntários saudáveis foram correlacionadas aos níveis circulantes da MLT (LISSONI *et al*, 1998).

Por outro lado, a MLT provocou a redução da produção de TNF- α e IFN- γ por monócitos obtidos de sangue de doadores saudáveis tratados *in vitro* com este hormônio (FJÆRLI *et al*, 1999). Em nossos experimentos, porém, não houve diferença na produção de TNF- α por células tratadas com MLT isoladamente ou combinada às citocinas, quando comparada à de células diferenciadas sob ação de GM-CSF e IL-4. Na verdade, esta observação é coerente com dados da literatura, que relatam níveis semelhantes de produção de

TNF- α por DCs, quando não se acrescentam estímulos adicionais, como LPS ou antígenos tumorais (CARLOS *et al*, 2005).

Por outro lado, observamos um aumento significativo da produção de IFN- γ por células diferenciadas sob ação da MLT. Este efeito se confirmou na análise de células diferenciadas e ativadas com MLT, pois estas mostraram os níveis mais altos de produção desta citocina. O IFN- γ é produzido por linfócitos T, células NK, monócitos ativados e células dendríticas, sofrendo influência, neste último tipo celular, da IL-12, que estimula fracamente a produção de IFN- γ em células imaturas e altas quantidades em células maduras quando combinada com IL-18 (YAMAGUCHI *et al*, 2005). O efeito da MLT sobre a produção de IFN- γ , é uma observação que nos parece relevante e que pode levar uma diferença funcional significativa entre células diferenciadas por ação da MLT e aquelas diferenciadas por ação das citocinas, GM-CSF e IL-4. Embora este ponto não tenha sido mais explorado no presente trabalho, ele deverá ser objeto de investigações futuras.

Em contraste ao observado para o IFN- γ , não obtivemos diferenças significativas entre os tratamentos quanto à produção de IL-10 e IL-12p40. Em todas as culturas de células imaturas, obtivemos valores superiores aos relatados na literatura para IL-12p40 e inferiores para IL-10, produzidas por DCs tratadas com LPS *in vitro* por 18 horas. No entanto, para DCs não tratadas os valores de IL-10 e IL-12p40 foram superiores aos relatados na literatura (CARLOS *et al*, 2005). Constatamos também produção de IL-12p70 em nossas culturas, mas estas dosagens foram feitas em poucos experimentos e obtivemos níveis inferiores aos relatados, ao menos para células ativadas com LPS (HEYSTEK *et al*, 2003).

Estudos realizados recentemente, mostraram que as DCs são capazes de produzir IL-2, quando estimuladas por IL-15 e após contato com linfócitos T (FEAU *et al*, 2005). Nossos resultados mostraram baixa produção desta citocina, sem diferença entre os tratamentos, indicando que a MLT não supre a necessidade da IL-15 e do contato com os linfócitos.

A análise da produção de citocinas por células diferenciadas sob ação de GM-CSF e IL-4 e ativadas pelos diferentes tratamentos (TNF- α , MLT 1 μ M ou MLT 1 η M ou BCG), não mostrou diferenças significativas entre estes. Vale notar que a produção de IFN- γ mostrou-se inferior àquela obtida nas culturas antes da ativação e, como dito, ao contrário do observado nestas últimas, não foi diferente entre os grupos. Não foi possível a análise da produção do TNF- α devido à sua adição às culturas. A produção de citocinas por células diferenciadas com citocinas e ativadas com MLT e TNF- α , foi, mais uma vez, semelhante entre os diferentes tratamentos, com exceção da IL-12p40, que mostrou-se significativamente elevada nas culturas em que se usou MLT.

Em conclusão, pudemos observar que a MLT foi capaz de induzir a diferenciação de PBMC de indivíduos saudáveis em cultura. As células obtidas nas culturas apresentaram fenótipo de membrana, potencial aloestimulador e padrão de secreção de citocinas semelhantes aos apresentados por células tratadas com GM-CSF, IL-4 e TNF- α e compatíveis com o de DCs. Desta forma, acreditamos ter obtido evidências que justificam o estudo mais aprofundado do fenômeno. Além do mais, considerando o custo da MLT e o das citocinas, é possível prever que o uso deste hormônio poderá, eventualmente, levar a uma maneira mais econômica de se obter células dendríticas humanas para utilização em protocolos de imunoterapia.

6 CONCLUSÃO

O tratamento *in vitro* com MLT foi capaz de induzir a diferenciação de PBMCs em DCs, tanto isoladamente quanto em combinação com as citocinas GM-CSF e IL-4. Este mesmo tratamento ainda foi capaz de produzir alterações fenotípicas compatíveis com a ativação de DCs, de maneira também semelhante ao feito pelo TNF- α . Especificamente, pôde-se verificar que:

- A MLT, usada isoladamente, induziu expressão da molécula CD80 e CD11c maior do que a induzida pelas citocinas GM-CSF e IL-4, níveis semelhantes de CD86 e manteve níveis mais elevados de CD14 em PBMCs cultivados por 5 dias na presença de níveis fisiológicos (1nM) e farmacológicos (1 μ M) da droga.
- As células obtidas nas culturas estimuladas por MLT por 5 dias apresentaram secreção de IL-12p40, IL-2, IL-10 e IL-12p70 em níveis semelhantes aos secretados por células diferenciadas sob ação de GM-CSF e IL-4, e níveis mais elevados de TNF- α e IFN- γ .
- Em células diferenciadas com citocinas e ativadas com TNF- α , MLT ou BCG, a MLT mostrou-se capaz de induzir alterações fenotípicas semelhantes aos outros estímulos de ativação/maturação, levando à expressão semelhante dos marcadores CD14, CD80, CD83, CD86 e CD11c.
- Células diferenciadas e ativadas com MLT apresentaram expressão aumentada de CCR7 e HLA-DR e CD14 e expressão equivalente dos demais marcadores (CD1a, CD11c, CD40, CD80, CD83, CD86 e HLA-I). Estas células também apresentaram maior secreção de IFN- γ .

- Em ensaios de aloestimulação as DCs obtidas após tratamento com MLT mostraram atividade equivalente às diferenciadas sob ação das citocinas GM-CSF e IL-4.
- O uso combinado da MLT com citocinas (GM-CSF, IL-4 e TNF- α), quer na diferenciação, quer na ativação das células, não levou a alterações significativas do fenótipo das células, quando comparadas às tratadas apenas com as citocinas.

Estes efeitos apontam para um efeito MLT sobre PBMC, levando à sua diferenciação em DCs. Tais efeitos podem estar relacionados à atividade imunomoduladora do tratamento com MLT e merecem ser, mais profundamente, explorados.

REFERÊNCIAS

AKAZA, H.; HINOTSU, S.; ASO, Y.; KAKIZOE, T.; KOISO, K.. Bacillus Calmette-Guerin treatment of existing papillary bladder cancer and carcinoma in situ of the bladder. The bladder cancer BCG study group. **Cancer**, v.75, n.2, p.552-9, Jan. 15, 1995.

ALATRASH, G; HUTSON, T. E.; MOLTO, L.; RICHMOND, A.; NEMEC, C.; MEKHAIL, T.; ELSON, P.; TANNENBAUM, C.; OLENCKI, T.; FINKE, J.; BUKOWSKI, R. M. Clinical and immunologic effects of subcutaneously administered interleukin-12 and interferon alfa-2b: phase I trial of patients with metastatic renal cell carcinoma or malignant melanoma. **J. Clin. Oncol.**, v.22, n. 14, p.2891-900, Jul 15, 2004.

AL-BADER, T.; CHRISTODOULIDES, M.; HECKELS, J. E.; HOLLOWAY, J.; SEMPER, A. E.; FRIEDMANN, P.S. Activation of human dendritic cells is modulated by components of the outer membranes of *Neisseria meningitidis*. **Infect. Immun.**, v.71, n.10, p.5590-7, Oct., 2003.

ARENDRT, J. The Pineal Gland, Circadian Rhythms and Photoperiodism. In: REDFERN, P.H., LEMMER, B.(Ed). **Handbook of Experimental Pharmacology**. v 125. Physiology and Pharmacology of Biological Rhythms. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1997. Cap. 14, p.375-414.

ATHANASAS-PLATIS, S. ; SAVAGE, N. W. ; WINNING, T. A. ; WALSH, L. J. Induction of the CD1a Langerhans cell marker on human monocytes. **Arch. Oral Biol.**, v.40, n.2, p.157-60, 1995.

BAGLEY, K. C.; ABDELWAHAB, S. F.; TUSKAN, R. G.; FOUTS, T. R.; LEWIS, G. K. Cholera toxin and heat-labile enterotoxin activate human monocyte-derived dendritic cells and dominantly inhibit cytokine production through a cyclic AMP-dependent pathway. **Infect Immun.**, v.70, n.10, p.5533-9, Oct., 2002.

BAGLEY, K. C.; ABDELWAAHAB, S. F.; TUSKAN, R. G.; LEWIS, G. K. Pasteurella multocida toxin activates human monocyte-derived and murine bone marrow-derived dendritic cells in vitro but suppresses antibody production in vivo. **Infect. Immun.**, v.73, p.413-21, 2005.

BANCHEREAU, J. Dendritic Cells: Therapeutic Potentials. **Transf. Sci.**, v.18, n. 2, p.313-26, 1997.

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

BANDYOPADHYAY, D.; BANDYOPADHYAY, A.; DAS, P. K.; REITER, R. J. Melatonin protects against gastric ulceration and increases the efficacy of ranitidine and omeprazole in reducing gastric damage. **J. Pineal Res.**, v.33, p.1-7, 2002.

BARBUTO, J. A. M.; ENSINA, L. F. C.; NEVES, A. R.; BERGAMI-SANTOS, P. C.; LEITE, K. R. M.; MARQUES, R.; COSTA, F.; MARTINS, S. C.; CAMARA-LOPES, L. H.;

BARBUTO, J. A. M. Vacina terapêutica contra o câncer. **Scientific American Brasil**, Ed. 38, julho, 2005. Disponível em <<http://sciam.uol.com.br>>. Acesso em: 03/02/06.

BARJAVEL, M. J.; MAMDOUH, Z.; RAGHBATE, N.; BAKOUCHE, O. Differential expression of the melatonin receptor in human monocytes. **J. Immunol.**, v. 160, p.1191-7, 1998.

BECKER, S.; WARREN, M. K.; HASKILL, S. Colony-stimulating factor-induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free culture. **J. Immunol.**, v.139, p. 3703-9, 1987.

BERGES, C.; NAUJOKAT, C.; TINAPP, S.; WIECZOREK, H.; HÖH, A.; SADEGHI, M.; OPELZ, G.; DANIEL, V. A cell line model for the differentiation of human dendritic cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 333, p. 896-907, 2005.

BINKLEY, S. Circadian Rhythms. In: **The Pineal: endocrine and nonendocrine function**. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall, 1988a. Cap. 8, p. 116-27.

BINKLEY, S. Pineal Function in Humans. In: **The Pineal: endocrine and nonendocrine function**. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall, 1988b. Cap. 12, p. 185-202.

BIRBECK, M. S.; BREATHNACH, A. S.; EVERALL, J. D. An electron microscopic study of basal melanocytes and high level clear cells (Langerhans cells) in vitilligo. **J. Invest. Dermatol.**, v.37, p. 51-64, 1961.

BOOG, C.J.; KAST, W. M.; TIMMERS, H. T.; BOES, J.; DE WAAL, L. P.; MELIEF, C. J.; Abolition of specific immune response defect by immunization with dendritic cells. **Nature**, v.318, N.6041, P.59-62, Nov 7-13, 1985.

BUBENIK, G. A. ; BLASK, D. E. ; BROWN, G. M. ; MAESTRONI, G. J. M. ; PANG, S. F.; REITER, R. J. ; VISWANATHAN, M. ; ZISAPEL, N. Prospects of the clinical utilization of melatonin. **Biol. Signals. Recept.**, v.7, p.195-219, 1998.

BUZAID, A. C.; ROBERTONE, A.; KISALA, C.; SALMON, S. E. Phase II study of interferon alfa-2a, recombinant (Roferon-A) in metastatic renal cell carcinoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 5, p. 1083-1089, 1987.

BUZAID, A. C.; LEGHA, S. S. Combination of chemotherapy with interleukin-2 and interferon-alfa for the treatment of advanced melanoma. **Semin. Oncol.**, v. 21 (6 suppl 14), p. 23-28, 1994.

BUZIO, C.; ANDRULL, S.; SANTI, R.; PAVONE, L.; PASSALACQUA, R.; POTENZONI, D.; FERROZZI, F.; GIACOSA, R.; VAGLIO, A.. Long term immunotherapy with low-dose interleukin-2 and interferon- γ in the treatment of patients with advanced renal cell carcinoma. **Cancer**, v.92, n. 9, p.2286-96, Nov.1, 2001.

CANING, M. O.; GROTENHUIS, K.; de WIT, H.; RUWHOF, C.; DREXHAGE, H. A. 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)2D3) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. **Eur. J. Endocrinol.**, v.145, p.351-57, 2001.

CAPELLI, E.; CAMPO, I.; PANELLI, S.; DAMIANI, G.; BARBONE, M. G. S.; LUCHELLI, A.; CUCCIA, M. Evaluation of gene expression in human lymphocytes activated in the presence of melatonin. **Int. Immunopharmacology**, v.2, p.885-92, 2002.

CARLOS, C. A.; DONG, H. F.; HOWARD, O. M. Z.; OPPENHEIM, J. J.; HANISCH, F. G.; FINN, O. J. Human tumor antigen MUC1 is chemotactic for immature dendritic cells and elicits maturation but does not promote Th1 type immunity1. **J. Immunol.**, v.175, p. 1628-1635, 2005.

CARRILO-VICO, A; GARCÍA-PERGAÑEDA, A.; NAJI, L.; CALVO, J. R.; ROMERO, M. P.; GUERRERO, J. M. Expression of membrane and nuclear melatonin receptor mRNA and protein in the mouse immune system. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.60, p.2272-8, 2003a.

CARRILO-VICO, A.; GARCÍA-MAURIÑO, S.; CALVO, J. R.; GUERRERO, J. M. Melatonin counteracts the inhibitory effect of PGE2 on IL-2 production in human lymphocytes via its mt1 membrane receptor. **FASEB J.**, v. 17, p. 755-7, April, 2003b.

CARRILO-VICO, A.; CALVO, J. R.; ABREU, P.; LARDONE, P. J.; GARCÍA-MAURIÑO, S.; REITER, R. J.; GUERRERO, J. M. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. **FASEB J.**, v.18, p.537-9, 2004.

CAUX, C.; VANBERVLIET, B.; MASSACRIER, C.; DEZUTTER-DAMBUYANT, C.; SAINT-VIS, B.; JACQUET, C.; YONEDA, K; IMAMURA, S.; SCHMITT; BANCHEREAU, J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF + TNF- α . **J. Exp. Med.**, v.184, p.695-706, 1996.

CAUX, C. ; MASSACRIER, C.; VANBERVLIET, B.; DUBOIS, B.; DURAND, I.; CELLA, M.; LANZAVECCHIA, A.; BANCHEREAU, J. CD 34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony stimulating factor plus tumor necrosis factor- α : II. Functional analysis. **Blood.**, v.90, n.4, p.1458-70, Aug.15, 1997.

CAO, W.; LEE, S. H.; LU, J. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. **Biochem. J.**, v.385, (pt 1), p. 85-93, Jan. 1, 2005.

CHEN, L. D; LEAL, B. Z; REITER, R. J.; ABE, M.; SWEREYNEK, E.; MELCHIORRI, D.; MELTZ, M. L.; POEGGELER, B. Melatonin inhibitory effect on growth of ME-180 human cervical cancer cells is not related to intracellular glutathione concentrations. **Cancer Lett.**, v.91, p.153-9, 1995.

CHEN, Z.; MOYANA, T.; SAXENA, A.; WARRINGTON, R.; JIA, Z.; XIANG, J. Efficient antitumor immunity derived from maturation of dendritic cells that had phagocytosed apoptotic/necrotic tumor cells. **Int. J. Cancer**, v.93, n. 4, p.539-48, Aug.15, 2001.

CHEN, J. C.; NG, C. J.; CHIU, T. F.; CHEN, H. M. Altered neutrophil apoptosis activity is reversed by melatonin in liver ischemia-reperfusion. **J. Pineal Res.**, v. 34, p.260-4, 2003.

CHU, X.; NEWMAN, J.; PARK, B.; NARES, S.; ORDONEZ, G.; IACOPINO, A. M.. *In vitro* alteration of macrophage phenotype and function by serum lipids. **Cell Tissue Res.**, v. 296, p.331-7, 1999.

COLEMAN, M.; GOLDENBERG, D. M.; SIEGEL, A. B.; KETAS, J. C.; ASHE, M.; FIORE, J. M.; LEONARD, J. P. Epratuzumab: targeting B-cell malignancies through CD22. **Clin Cancer Res.**, v. 9 (10 Pt 2), p.3991S-4S, 2003.

CONTI, A; MAESTRONI, G. J. M. The clinical neuroimmunotherapeutic role of melatonin in oncology. **J. Pineal Res.**, v.19, p.103-10, 1995.

CORBI, A. L.; LOPEZ-ROGRIGUEZ, C. CD11c integrin gene promoter activity during myeloid differentiation. **Leuk. Lymphoma**, v. 25, n.5-6, p. 415-25, May,1997.

CORVOL, H.; FITTING, C.; CHADELAT, K.; JACQUOT, J.; TABARY, O.; BOULE, M.; CAVAILLON, J.M.; CLEMENT, A. Distinct cytokine production by lung and blood neutrophils from children with cystic fibrosis. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v.284, p. L997-L1003, 2003.

COS, S.; BLASK, D. E; LEMUS-WILSON, A.; HILL, A. B. Effects of melatonin on the cell cycle kinetics and "estrogen-rescue" of MCF-7 human breast cancer cells in culture. **J. Pineal Res.**, v.10, p.36-42, 1991.

COS, S.; FERNÁNDEZ, F.; SÁNCHEZ-BARCELÓ, E. J.. Melatonin inhibits DNA synthesis in MCF-7 human breast cancer cells *in vitro*. **Life Sci.**, v.58, N.26, p.2447-53, 1996a.

COS, S., VERDUGA, R.; FERNANDEZ-VIADERO, C.; MEGIAS, M.; CRESPO, D. Effects of melatonin on the proliferation and differentiation of human neuroblastoma cells in culture. **Neurosci. Lett.**, v.216, p.113-6, 1996b.

COUTANT, F.; PERRIN-COCON, L.; AGAUGUÉ, S.; DELAIR, T.; ANDRÉ, P.; LOTTEAU. Mature dendritic cell generation promoted by lysophosphatidylcholine. **J. Immunol.**, v. 169, p.1688-95, 2002.

CROWLEY, M. T.; INABA, K.; WITMER-PACK, M. D.; GEZELTER, S.; STEINMAN, R. M. Use of the fluorescence activated cell sorter to enrich dendritic cells from mouse spleen. **J. Immunol. methods**, v.133, n.1, p.55-66, 1990.

CURRIER, N. L.; SUN, L. Z.-Y.; MILLER, S. C. Exogenous melatonin: quantitative enhancement *in vivo* of cells mediating non-specific immunity. **J. Neuroimmunol.**, v.104, p.101-8, 2000.

CUTOLO, M.; VILLAGGIO, B.; CANDIDO, F.; VALENTI, S.; GIUSTI, M.; FELLI, L.; SULLI, A.; ACCARDO, S. Melatonin influences interleukin-12 and nitric oxide production by primary cultures of rheumatoid synovial macrophages and THP1 cells. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.876, p.246-54, June 22, 1999.

DE VRIES, I. J.; LESTERHUIS, W. J.; SCHARENBERG, N. M.; ENGELEN, L. P.; RUITER, D. J.; GERRITSEN, M. J.; CROOCKEWIT, S.; BRITTEN, C. M.; TORENSMA, R.; ADEMA G. J.; FIGDOR, C. G.; PUNT, C.J. Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients. **Clin. Cancer Res.**, v.9, n.14, p.5091-100, Nov. 1, 2003.

DE LAUNOIT, Y.; PASTEELS, J. L.; L'HERMITE, M.; L'HERMITE-BALERIAUX, M.. *In vitro* effect of melatonin on cell cycle kinetics of mammary cancer cell lines (Abstract). **Endocr. Soc.**, v.72, p.59, 1990.

DELGADO, M.; REDUTA, A.; SHARMA, V.; GANEA, D. VIP/PACAP oppositely affects immature and mature dendritic cell expression of CD80/CD86 and the stimulatory activity for CD4+ T cells. **J. Leu. Biol.**, v.75, n.6, p.1122-30, June, 2004.

DILIOGLOU, S.; CRUSE, J. M.; LEWIS, R. E. Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 75, p.217-27, 2003.

DUTCHER, J.P.; LOGAN, T.; GORDON, M.; SOSMAN, J.; WEISS, G.; MARGOLIN, K.; PALSSE, T.; MIER, J.; LOTZE, M.; CLARK, J.; ATKINS, M. Phase II trial of interleukin 2, interferon alpha, and 5-fluorouracil in metastatic renal cell cancer: a cytokine working group study. **Clin. Cancer Res.**, v.6, n. 9, p.3442-50, Sep, 2000.

EGELER, R. M.; FAVARA, B. E.; MEURS, M.V.; LAMAN, J. D.; CLAASSEN, E. Differential in situ cytokine profiles of langerhans-like cells and T cells in langerhans cells hystiocytosis: abundant expression of cytokines relevant to disease and treatment. **Blood.**, v. 94, N. 12, p.4195-4201, 1999.

FAUSCH, S. C. ; DA SILVA, D. M; KAST, W. M.. Differential uptake and cross-presentation of human papillomavirus virus-like particles by dendritic cells and langerhans cells. **Cancer Res.**, v.63, p.3478-82, July 1,2003.

FEAU, S.; FACCHINETTI, V.; GRANUCCI, F.; CITTERIO, S.; JARROSSAY, D.; SERESINI, S.; PROTTI, M. P.; LANZAVECCHIA, A.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Dendritic cell-derived IL-2 production is regulated by IL-15 in humans and in mice. **Blood**, v.105, p.97-702, 2005.

FEDELE, G.; FRASCA, L.; PALAZZO, R.; FERRERO, E.; MALAVASI, F.; AUSIELLO, C. M. CD38 is expressed on human mature monocyte-derived dendritic cells and is functionally involved in CD83 expression and IL-12 induction. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, n.5, p.1342-50, May, 2004.

FJÆRLI, O.; LUND, T.; ØSTERUD, B. the effect of melatonin on cellular activation processes in human blood. **J. Pineal Res.**, v. 26, p. 50-5, 1999.

FONG, L.; ENGLEMAN, E.G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. **Annu. Ver. Immunol.**, v.18, p.245-73, 2000.

FREUDENTHAL, P.; STEINMAN, R. M. The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.87, n.19, p.7698-702, Oct, 1990.

GABRILOVICH, D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. **Nature reviews Immunology**, v. 4, p. 941-52, Dec. 2004.

GAO, G. F.; JAKOBSEN, B. K. Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with T-cell receptor. **Immunol. Today**, v.21, n.12, p.630-6, Dec., 2000.

GARCIA-MAURIÑO, S.; GONZALEZ-HABA, M. G.; CALVO, R. R.; RAFII-EL-IDRISSI, M.; SANCHEZ-MARGALET, V.; GOBERNA, R.; GUERRERO, J. M.. Melatonin enhances IL-2, IL-6 and IFN- γ production by human circulating CD4⁺ cells. **J. Immunol.**, v.159, p.574-81, 1997.

GARCIA-MAURIÑO, S.; POZO, D. ; CARRILLO-VICO, A. ; CALVO, J. R. ; GUERRERO, J. M. Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. **Life Sci.**, v.65, p.2143-50, 1999.

GARCIA-MAURIÑO, S. ; POZO, D. ; CALVO, J. R. ; GUERRERO, J. M. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. **J. Pineal Res.**, v. 29, n.3, p.129-37, Oct., 2000.

GARCIA-PERGAÑEDA, A.; POZO, D.; GUERRERO, J. M.; CALVO, J. R. Signal transduction for melatonin in human lymphocytes: involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. **J. Immunol.**, v.159, n.8, p.3774-81, Oct. 15, 1997.

GATTI, E.; VELLECA, M. A.; BIEDERMANN, B. C.; MA, W.; UNTERNAEHRER, J.; EBERSOLD, M. W.; MEDZHITOV, R.; POBER, J. S.; MELLMAN, I. Large-scale culture and selective maturation of human Langerhans cells from granulocyte colony-stimulating factor-mobilized CD34⁺ progenitors. **J. Immunol.**, v.164, p.3600-7, 2000.

GOGAS, H.; BAFALOUKOS, D.; ARAVANTINOS, G.; FOUTZILAS, G.; TSOUTSOS, D.; PANAGIOTOU, P.; FRANGIA, K.; KALOFONOS, H. P.; BRIASOULIS, E.; CASTANA, O.; POLYZOS, A.; PECTASIDES, D.; IOANNOVICH, J.; HELLENIC COOPERATIVE ONCOLOGY GROUP. Vinorelbine in combination with interleukin-2 as second-line treatment in patients with metastatic melanoma. A phase II study of the Hellenic Cooperative Oncology Group. **Cancer Invest.**, v.22, n.6, p.832-9, 2004.

GROUARD, G.; RISSOAN, M-C.; FILGUEIRA, L.; DURAND, I.; BANCHEREAU, J.; LIU, Y-J. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. **J. Exp. Med.**, v.185, p.1101-11, 1997.

GURULI, G.; PFLUG, B. R.; PECHER, S.; MAKARENKIVA, V.; SHURIN, M. R.; NELSON, J. B. Function and survival of dendritic cells depend on endothelin-1 and endothelin receptor autocrine loops. **Blood**, v.104, n.7, p.2107-15, Oct. 1, 2004.

HART, D. N. J.; FABRE, J. W. Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. **J. Exp. Med.**, v.154, p.347-61. 1981.

HART, D. N.; MACKENZIE, J. L. Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v.168, p.157-70, 1988.

HASSAN, R.; WILLIAMS-GOULD, J.; WATSON, T.; PAI-SCHERF, L.; PASTAN, I. Pretreatment with rituximab does not inhibit the human immune response against the immunogenic protein LMB-1. **Clin. Cancer Res.**, v.10 (1 Pt 1), p.16-8, Jan..1, 2004.

HERXHEIMER, A.; WATERHOUSE, J. The prevention and treatment of jet lag. **BMJ.**, v. 326, p.296-7, 2003.

HEYSTEK, H. C; den DRIJVER, B.; KAPSENBERG, M. L; van LIER, R. A.; de JONG, E. Type I IFNs differentially modulate IL-12p70 production by human dendritic cells depending on the maturation status of the cells and counteract IFN-gamma-mediated signaling. **Clin. Immunol.**, v.107, n.3, p.170-7, June, 2003.

HILL, S. M.; BLASK, D. E. Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture. **Cancer Res.**, v.48, p.6121-6, 1988.

HOEFSMIT, E. C.; DUIJVESTIJN, A. M.; KAMPERDIJK, E. W. A. Relation between Langerhans cells, veiled cells and interdigitating cells. **Immunobiology**, v.161, p.255-65, 1982.

HOFMOCKEL, G.; LANGER, W.;THEISS, M.; GRUSS, A.; FROHMÜLLER, H. G. W. Immunochemotherapy for metastatic renal cell carcinoma using a regimen of interleukin-2, interferon- γ and 5-fluorouracil. **J. Urol.**, v.156, p.18-21, 1996 .

INABA, K.; GRANELLI-PIPERNO, A.; STEINMAN, R.M. Dendritic cells induce T lymphocyte to release B cell stimulating factors by an interleukin-2 dependent mechanism. **J. Exp. Med.**, v.158, p.2040-57, 1983.

INABA, K.; STEINMAN, R. M. Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release. **J. Exp. Med.**, v.160, p.1717, 1984.

INABA, K.; STEINMAN R.M. Protein-specific helper T lymphocyte formation initiated by dendritic cells. **Science.**, v. 229, p. 475, 1985.

INABA, K.; METLAY, J. P.; CROWLEY, M. T.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells pulsed with protein antigens *in vitro* can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells *in situ*. **J. Exp. Med.**, v.172, p.631-40, 1990.

INGULLI, E.; MONDINO, A.; KHORUTS, A.; JENKINS, M. K.; *In vivo* detection of dendritic cell antigen presentation to CD4⁺ T cells. **J. Exp. Med.**, v.185,n.12, p.2133-41, June 16, 1997.

ITO, T.; INABA, M.; INABA, K.; TOKI, J.; SOGO, S.; IGUCHI, T.; ADACHI, Y.; YAMAGUCHI, K.; AMKAWA, R.; VALLADEAU, J.; SAELAND, S.; FUKUHARA, S.; IKEHARA, S. A CD1a⁺/Cd11c⁺ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. **J. Immunol.**, v. 163, p. 1409-19, 1999.

IYENGAR, B. Photomodulation of the melanocyte cell cycle by indoleamines. **Biol. Signals Recept.**, v.7, p.345-50, 1998.

IYENGAR, B. Melatonin and melanocyte functions. **Biol. Signals Recept.**, v.9, p.260-6, 2000.

JIANG-SHIEH, Y. F.; WU, C. H.; CHIEN, H. F.; WEI, I. H.; CHANG, M. L.; SHIEH, J. Y.; WEN, C. Y. Reactive changes of interstitial glia and pinealocytes in the rat pineal gland challenged with cell wall components from gram-positive and -negative bacteria. **J. Pineal Res.**, v. 38, n.1, p. 17-26, Jan., 2005.

KATOH, N.; SOGA, F.; NARA, T.; MASUDA, K.; KISHIMOTO, S. Histamine induces the generation of monocyte-derived dendritic cells that express CD14 but not CD1a. **J. Invest. Dermatol.**, v. 125, n.4, p. 753-60, Oct., 2005.

KIM, K. D.; LEE, H. G.; KIM, J. K.; PARK, S. N.; CHOE, Y. K.; KIM, S. J.; LEE, E.; LIM, J. S. Enhanced antigen-presenting activity and tumour necrosis factor- α -independent activation of dendritic cells following treatment with *Mycobacterium bovis bacillus* Calmette-Guérin. **Immunol.**, v.97, n.4, p.626-33, Aug., 1999.

KLINKERT, W. E. F.; LABADIE, J. H.; BOWERS W. E. Accessory and stimulating properties of dendritic cells and macrophages isolated from various rat tissues. **J. Exp. Med.**, v.156,n.1, p.1-19, July,1982.

KNIGHT, S. C.; BALFOUR, B. M.; O'BRIEN, J.; BUTTIFANT, L.; SUMERSKA, T.; CLARKE, J. Role of veiled cells in lymphocyte activation. **Eur. J. Immunol.**, v.12, n.12, p.1057-60, Dec, 1982.

KODALI, S.; DING, W.; HUANG, J.; SEIFFERT, K.; WAGNER, J. A.; GRANSTEIN, R. D. Vasoactive intestinal peptide modulates Langerhans cell immune function. **J. Immunol.**, v. 173, p.6082-8, 2004.

KOMI, J.; LASSILA, O. Nonsteroidal anti-estrogens inhibit the functional differentiation of human monocyte-derived dendritic cells. **Blood**, v.95, p.2875-82, 2000.

KOMI, J.; MÖTTÖNEN, R.; LUUKKAINEN, R.; LASSILA, O. Nonsteroidal anti-oestrogens inhibit the differentiation of synovial macrophages into dendritic cell. **Rheumatology**, v.40, p.185-91, 2001.

KÖNIG, R.; Interactions between MHC molecules and co-receptors of the TCR. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 14, p.75-83, 2002.

KRIPKE, M. L.; MUNN, C. G.; JEEVAN, A.; TANG, J. M.; BUCANA, C. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. **J. Immunol.**, v.145, n.9, p.2833-8, 1990.

KÜHLWEIN, E.; IRWIN, M. Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine expression. **J. Neuroimmunol.**, v.117, p. 51-7, 2001.

LARA, P. N. JR.; CHEE, K. G.; LONGMATE, J.; RUEL, C.; MEYERS, F. J.; GRAY, C. R.; EDWARDS, R. G.; GUMERLOCK, P. H.; TWARDOWSKI, P.; DOROSHOW, J. H.; GANDARA, D. R. Trastuzumab plus docetaxel in HER-2/neu-positive prostate carcinoma: final results from the California Cancer Consortium Screening and Phase II Trial. **Cancer**, v.100, n.10, p.2125-31, May, 2004.

LAUENER, R. P.; GOYERT, S. M.; GEHA, R. S.; VERCELLI, D. Interleukin 4 down-regulates the expression of CD14 in normal human monocytes. **Eur. J. Immunol.**, v. 11, p. 2375-81, Nov 20, 1990.

LANIER, L. L.; O'FALLON, S.; SOMOZA, C.; PHILLIPS, J. H.; LINSLEY, P. S.; OKUMURA, K.; ITO, D.; AZUMA, M. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production and generation of CTL. **J. Immunol.**, v.154, n.1, p.97-105, Jan. 1, 1995.

LEE, J. J.; TAKEI, M.; HORI, S.; INOUE, Y.; HARADA, Y.; TANOSAKI, R.; KANDA, Y.; KAMI, M.; MAKIMOTO, A.; MINEISHI, S.; KAWAI, H.; SHIMOSAKA, A.; HEIKE, Y.; IKARASHI, Y.; WAKASUGI, H.; TAKAUE, Y.; HWANG, T. J.; KIM, H. J.; KAKIZOE, T. The role of PGE2 in the differentiation of dendritic cells: how do dendritic cells influence T-cell polarization and chemokine receptor expression? **Stem Cells**, v.20, p.448-59, 2002.

LEGHA, S. S.; BUZAID, A. C. Role of recombinant interleukin-2 combination with interferon-alfa and chemotherapy in the treatment of advanced melanoma. **Semin. Oncol.**, v. 20 (6 suppl 9), p. 27-32, 1993.

LEONARD, J. P.; COLEMAN, M.; KETAS, J. C.; CHADBURN, A.; FURMAN, R.; SCHUSTER, M. W.; FELDMAN, E. J.; ASHE, M.; SCHUSTER, S. J.; WEGENER, W. A.; HANSEN, H. J.; ZICCARDI, H.; ESCHENBERG, M.; GAYKO, U.; FIELDS, S. Z.; CESANO, A.; GOLDENBERG, D. M. Pratumab, a humanized anti-CD22 antibody, in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: phase I/II clinical trial results. **Clin. Cancer Res.**, v.10, n.16, p.5327-34, Aug. 15, 2004

LERNER, A. B.; CASE, J. D.; TAKAHASHI, Y.; LEE, T.H.; MORI, W. Isolation of melatonin, pineal factor that lightens melanocytes. **J. Am. Chem. Soc.**, v.80, p. 2587, May 20, 1958.

LISSENI, P.; BRIVIO, F.; FUMAGALLI, L.; GRAMAZIO, F.; ROSSI, M.; EMANUELLI, G.; ALDERI, G.; LAVORATO, F. Immune effects of preoperative immunotherapy with high-dose subcutaneous interleukin-2 versus neuroimmunotherapy with low-dose interleukin-2 plus the neurohormone melatonin in gastrointestinal tract tumor patients. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents**, v. 9, p.31-3, 1995.

LISSENI, P.; BRIVIO, O.; BRIVIO, F.; BARNI, S.; TANCINI, G.; CRIPPA, D.; MEREGALLI, S. Adjuvant therapy with the pineal hormone melatonin in patients with lymph node relapse due to malignant melanoma. **J. Pineal Res.**, v.21, p.239-42, 1996a.

LISSENI, P.; PAOLOROSSO, F.; TANCINI, G.; BARNI, S.; ARDIZZOIA, A.; BRIVIO, F.; ZUBELEWICZ, B.; CHATIKHINE, V. Is there a role for melatonin in the treatment of neoplastic cachexia? **Eur. J. Cancer.**, v.32A, n.8, p.1340-3, 1996b.

LISSENI, P.; ROVELLI, F.; BRIVIO, F.; BRIVIO, O.; FUMAGALLI, L. Circadian secretions of IL-2, IL-12, IL-6 and IL-10 in relation to the light/dark rhythm of the pineal hormone melatonin in healthy humans. **Nat. Immun.**, v. 16, n.1, p.1-5, 1998.

LISSENI, P. Is there a role for melatonin in supportive care? **Support Care Cancer**, v.10, p.110-6, 2002.

LIU, F.; NG, T. B.; FUNG, M. C. Pineal indoles stimulate the gene expression of immunomodulating cytokines. **J. Neural Transm.**, v.108, n.4. p.397-405, 2001.

LIU, H. Y.; BUENAFE, A. C.; MATEJUK, A.; ITO, A.; ZAMORA, A.; DWYER, J.; VANDENBARK, A. A.; OFFNER, H. Estrogen inhibition of EAE involves effects on dendritic cell function. **J. Neurosci. Res.**, v.70, n.2, p.238-48, Oct 15, 2002.

LOPES, C.; DELYRA, J. L.; MARKUS, R. P.; MARIANO, M.; Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. **J. Pineal. Res.**, v. 23, p.72-8, 1997.

LOPES, C.; MARIANO, M.; MARKUS, R. P. Interaction between the adrenal and the pineal gland in chronic experimental inflammation induced by BCG in mice. **Inflamm. Res.**, v.50, p.06-11,2001.

LORENTZ, A. SCHWENGBERG, S.; SELLGE, G.; MANNS, M. P.; BISCHOFF, S. C. Human intestinal mast cells are capable of producing different cytokine profiles: role of IgE receptor cross-linking and IL-4. **J. Immunol.**, v. 164, 43-8, 2000.

LOTUFO, C. M. C.; LOPES, C.; DUBOCOVICH, M. L.; FARSKY, S. H. P.; MARKUS, R. P. Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adhesion to rat microcirculation. **Eur. J. Pharmacol.**, v.430, p. 351-7, 2001.

LUFT, T.; JEFFORD, M.; LUETJENS, P.; TOY, T.; HOCHREIN, H.; MASTERMAN, K. A.; MALISZEWSKI, C.; SHORTMAN, K.; CEBON, J.; MARASKOVSKY, E. Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets. *Blood*, v.100, n.4, p.1362-72, Aug., 2002.

LYONS, A. B.; PARISH, C. R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. **J. Immunol. Methods.**, v.171, p. 131, 1994.

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

MACKENSEN, A.; HERBST, B.; CHEN, J. L.; KOHLER, G.; NOPPEN, C.; HERR, W.; SPAGNOLI, G. C.; CERUNDOLO, V.; LINDEMANN, A. Phase I study in melanoma patients of a vaccine with peptide-pulsed dendritic cells generated in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. **Int. J. Cancer**, v.86, n.3, p.385-92, May 1, 2000.

MAESTRONI, G. J. M. Melatonin and immune-hematopoietic system. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.460, p.395-405, 1999.

MATYSZAK, M. K.; CITTERIO, S.; RESCIGNO, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation. **Eur. J. Immunol.**, v.30, p.1233-42, 2000.

MCNEEL, D. G.; KNUTSON, K. L.; SCHIFFMAN, K.; DAVIS, D. R.; CARON, D.; DISIS, M. L. Pilot study of an HLA-A2 peptide vaccine using flt3 ligand as a systemic vaccine adjuvant. **J Clin Immunol.**, v.23,n.1, p.62-72, Jan.,2003.

MOORE, C. B.; SIOPEL, T. D. Melatonin enhances cellular and humoral immune responses in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) via an opiate mechanism. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.131, p.258-63, 2003.

MORSE, M.A.; ZHOU, L. J.; TEDDER, T. F.; LYERLY, H. K.; SMITH, C. Generation of dendritic cells *in vitro* from peripheral blood mononuclear cells with granulocyte-macrophage-colony stimulating factor, interleukin-4, and tumor necrosis factor-alpha for use in cancer immunotherapy. **Ann. Surg.**, v.226, n.1, p.6-16, 1997.

MORREY, K. M.; MACLACHLAN, J. A.; SERKIN, C. D.; BAKOUCHE, O. Activation of human monocytes by the pineal hormone melatonin. **J. Immunol.**, v.153, p.2671-80, 1994.

MÜNZ, C.; DAO, T.; FERLAZZO, G.; COS, M.; GOODMAN, K, YOUNG, J. W. Mature myeloid dendritic cell subsets have distinct roles for activation and viability of circulating human natural killer cells. **Blood**, v.105, p.266-73, 2005.

NATARAJAN, M.; REITER, R. J.; MELTZ, M. L.; HERMAN, T. S. Effect of melatonin on cell growth, metabolic activity, and cell cycle distribution. **J. Pineal Res.**, v.31, p.228-33, 2001.

NESTLE, F.O.; ALIJAGIC, S.; GILLIET, M.; SUN, Y.; GRABBE, S.; DUMMER, R.; BURG, G.; SCHADENDORF, D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. **Nat. Med.**, v. 4, n.3, p.328-32, March, 1998.

NICOD, L. P. ; LIPSCOMB, M. F. ; WEISLER, J. C. ; TOEWS, G. B. Mononuclear cells from human lung parenchyma support antigen-induced T lymphocyte proliferation. **J. Leuk. Biol.**, v.45, n.4, p.336-44, Apr.,1989.

NUNEZ, R.; GARAY, N.; BRUNO, A.; VILLAFANE, C.; BRUNO, E.; FILGUEIRA, L. Functional and structural characterization of two populations of human monocyte-derived dendritic cells. **Exp. Mol. Pathol.**, v.77, n.2, p.104-15, Oct., 2004.

O'DOHERTY, U.; STEINMAN, R. M.; PENG, M.; CAMERON, P. U.; GEZELTER, S.; KOPELOFF, I.; SWIGGARD, W. J.; POPE, M.; BHARDWAJ, N. Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. **J. Exp. Med.**, v.178, p.1067-78, Sept, 1993.

O'DOHERTY, U.; PENG, M.; GEZELTER, S.; SWIGGARD, W. J.; BETJES, M.; BHARDWAJ, N.; STEINMAN, R. M. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. **Immunology**, v.82, p.487-93, 1994.

OLWEUS, J.; BITMANSOUR, A.; WARNKE, R.; THOMPSON, P. A.; CARBALLIDO, J.; PICKER, L. J.; LUND-JOHANSEN, F. Dendritic cell ontogeny: A human dendritic cell lineage of myeloid origin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.94, p.12551-6, Nov, 1997.

OOSTERWIJK-WAKKA, J. C. Vaccination of patients with metastatic renal cell carcinoma with autologous dendritic cells pulsed with autologous tumor antigens in combination with interleukin-2: a phase 1 study. **J. Immunother.**, v.25, p.500-8, 2002.

PADRIK, P.; LEPPIK, K.; ARAK, A. Combination therapy with capecitabine and interferon alfa-2A in patients with advanced renal cell carcinoma: a phase II study. **Urol. Oncol.**, v.22, p. 387-92, 2004.

PALUCKA, K. A.; TAQUET, N.; SANCHEZ-CHAPUIS, F.; GLUCKMAN, J. C. Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. **J. Immunol.**, v.160, p.4587-95, 1998.

PAN, J.; ZHANG, M.; WANG, J.; WANG, Q.; XIA, D.; SUN, W.; ZHANG, L.; YU, H.; LIU, Y.; CAO, X. Interferon-gamma is an autocrine mediator for dendritic cell maturation. **Immunol. Lett.** v.94, n.1-2, p.141-151, June 15, 2004.

PAPAZISIS, K. T.; KOURETAS, D.; GEROMICHALOS, G. D.; SIVRIDIS, E.; TSEKRELI, O. K.; DIMITRIADIS, D. A.; KORTSARIS, A. H.; Effects of melatonin on proliferation of cancer cell lines. **J. Pineal Res.**, v.25, p.211-8, 1998.

PARLAKPINAR, H.; SAHNA, E.; OZER, M. K.; OZUGURLU, F.; VARDI, N.; ACET, A. Physiological and pharmacological concentrations of melatonin protect against cisplatin-induced acute renal injury. **J. Pineal Res.**, v.33, n.3, p.161-6, Oct., 2002.

PAVLI, P.; WOODHAMS, C. E.; DOE, W. F.; HUME, D. A. Isolation and characterization of antigen-presenting dendritic cells from the mouse intestinal lamina propria. **Immunology**, v.70, n.1, p.40-7, May, 1990.

PERRIN-COCON, L.; COUTANT, F.; AGAUGUÉ, S.; DEFORGES, S.; ANDRÉ, P.; LOTTEAU. Oxidized Low-Density Lipoprotein Promotes Mature Dendritic Cell Transition from Differentiating Monocyte. **J. Immunol.**, v.167, p.3785-3891, 2001.

PERRIN-COCON, L.; AGAUGUÉ, S.; COUTANT, F.; MASUREL, A.; BEZZINE, S.; LAMBEAU, G.; ANDRÉ, P.; LOTTEAU, V. Secretory phospholipase A₂ induces dendritic cell maturation. **Eur. J. Immunol.**, v. 34, p.2293-2302, 2004.

PETRANKA, J.; BALDWIN, W.; BIERMANN, J.; JAYADEV, S.; BARRETT, J. C.; MURPHY, E. The oncostatic action of melatonin in an ovarian carcinoma cell line. **J. Pineal Res.**, v.26, p.129-36, 1999.

PETROVSKY, N.; HARRISON, L. C. Diurnal rhythmicity of human cytokine production. A dynamic disequilibrium in T helper cell type 1/T helper cell type 2 balance? **J. Immunol.**, v. 158, p.5163-68, 1997.

PIEMONTE, L.; MONTI, P.; ALLAVENA, P.; SIRONI, M.; SOLDINI, L.; LEONE, B. E.; SOCCI, C.; DI CARLO, V. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. **J. Immunol.**, v.162, p.6473- 81, 1999a.

PIEMONTE, L.; MONTI, P.; ALLAVENA, P.; LEONE, B. E.; CAPUTO, A.; DI CARLO, V. Glucocorticoids increase the endocytic activity of human dendritic cells. **Int. Immunol.**, v. 11, n.9, p.1519-26, 1999b .

PINZON-CHARRY, A.; MAXWELL, T.; LÓPEZ, J. A. Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. **Immunol. and Cell Biol.**, v.83, p.451-61, 2005.

PIOLI, C.; CAROLEO, C.; NISTICO, G.; DORIA, G. Melatonin increases antigen presentation and amplifies specific and non specific signals for T-cell proliferation. **Int. J. Immunopharmac.**, v.15, n.4, p. 463-8, 1993.

POLLARD, A. M.; LIPSCOMB, M. F. Characterization of murine lung dendritic cells: Similarities to Langerhans cells and thymic dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v.172, p.159-68, 1990.

PORCELLI, S. A. The CD1 family: a third lineage of antigen-presenting molecules. **Adv. Immunol.**, v. 59, p.1-98, 1995.

PORTIELJE, J.E.; GRATAMA, J. W.; VAN OJIK, H. H.; STOTER, G.; KRUIT, W. H. IL-12: a promising adjuvant for cancer vaccination **Cancer Immunol Immunother.**, v.52, n.3, p.133-44, Mar.,2003.

PRICKETT, T. C. R.; MCKENZIE, J. L.; HART, D. N. J. Characterization of interstitial dendritic cells in human liver. **Transplantation.**, v.46, p.754-61, 1988.

PROTA, G. Genetic and hormonal regulation of melanogenesis. **In: Melanins and melanogenesis.** San Diego, California: Academic Press, Inc., 1992. Chap.9, p. 185-207.

QI, W.; REITER, R. J.; TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; SIU, A. W.; GARCIA, J. J. Increased levels of oxidatively damaged DNA induced by chromium(III) and H₂O₂: protection by melatonin and related molecules. **J. Pineal Res.**, v.29, n.1, p.54-61, Aug., 2000.

RADNY, P.; CAROLI, U. M.; BAUER, J.; PAUL, T.; SCHLEGEL, C.; EIGENTLER, T. K.; WEIDE, B.; SCHWARZ, M.; GARBE, C. Phase II trial of intralesional therapy with interleukin-2 in soft-tissue melanoma metastases. **Br. J. Cancer**, v.89, n.9, p.1620-6, Nov. 3, 2003.

RAGHAVENDRA, V.; SINGH, V.; SHAJI, A. V.; VOHRA, H.; KULKARNI, S. K.; AGREWALA, J. N. Melatonin provides signal 3 to unprimed CD4⁺ T cells but failed to stimulate LPS primed B cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v.124, p.414-22, 2001.

RAM, P.T.; YUAN, L.; DAI, J.; KIEFER, T.; KLOTZ, DM.; SPRIGGS, L. L.; HILL, S. M. Differential responsiveness of MCF-7 human breast cancer cell line stocks to the pineal hormone, melatonin. **J. Pineal Res.**, v.28, p.210-8, 2000.

RANDOLPH, G. J.; BEAULIEU, S.; LEBECQUE, S.; STEINMAN R, M.; MULLER, W. A. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. **Science.**, v.282, p.480-3, 16 oct.,1998.

REDDY, M.; EIRIKIS, E.; DAVIS, C.; DAVIS, H. M.; PRABHAKAR, U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. **J. Immunol. Methods**, v. 293, p.127-42, 2004.

REITER, R. J.; TAN, D. X. What constitutes a physiological concentration of melatonin? **J. Pineal Res.**, v.34, p.79-80, 2003.

ROBERTS, J. E.; WIECHMANN, A.F.; HU, D.N. Melatonin receptors in human uveal melanocytes and melanoma cells. **J.Pineal Res.**, v.28, p.165-71, 2000.

ROCHESTER, C.L.; GOODELL, E. M.; STOLTENBORG, J. K.; BOWERS, W. E.; Dendritic cells from rat lung are potent accessory cells. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.138, n.1, p.121-8, Jul., 1988.

ROMANI, N.; LENZ, A.; GLASSEL, H.; STOSSEL, H.; STANZL, U.; MAJDIC, O.; FRITSCH, P.; SCHULER, G. Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. **J. Invest. Dermatol.**, v.93, n.5, p.600-9, Nov., 1989.

ROSENBERG, S. A.; YANG, J. C.; SCHWARTZENTRUBER, D. J.; HWU, P.; MARINCOLA, F. M.; TOPALIAN, S. L.; RESTIFO, N. P.; DUDLEY, M. E.; SCHWARZ, S. L.; SPIESS, P. J.; WUNDERLICH, J. R.; PARKHURST, M. R.; KAWAKAMI, Y.; SEIPP, C. A.; EINHORN, J. H.; WHITE, D. E. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. **Nat. Med.**, v.4, n.3, p.321-7, March, 1998.

ROSENZWAJG, M.; CANQUE, B.; GLUCKMAN, J.C. Human dendritic cell differentiation pathway from CD34+ hematopoietic precursor cells. **Blood.**, v.87, n.2, p.535-44, Jan 15, 1996.

ROVERE, P.; VALLINOTO, C.; BONDANZA, A.; CROSTI, M. C.; RESCIGNO, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; RUGARLI, C.; MANFREDI, A.A. Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. **J. Immunol.**, v.161, n.9, p.4467-71, Nov. 1, 1998.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cell is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and downregulated by tumor necrosis factor α . **J. Exp. Med.**, v.179, p.1109-18, 1994.

SAUTER, B.; ALBERT, M. L.; FRANCISCO, L.; LARSSON, M.; SOMERSAN, S.; BHARDWAJ, N. Consequence of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v.191, n.3, p.423-33, Feb. 7, 2000.

SAXON, A.; FELDHAUS, J.; ROBINS, R. A. Single step separation of human T and B cells using AET treated srbc rosettes. **J. Immunol. Methods**. v. 12, p. 285-288, 1976.

SCANDELLA, E.; MEN, Y.; GILLESSEN, S.; FORSTER, R.; GROETTRUP, M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. **Blood**, v.100, n.4., p.1354-61, Aug. 15, 2002.

SHAFER, L. L.; MCNULTY, J.; YOUNG, M. R. I. Assessment of melatonin's ability to regulate cytokine production by macrophage and microglia cell types. **J. Neuroimmunol.**, v. 120, p.84-93, 2001.

SHAJI, A. V.; KULKARNI, S. K.; AGREWALA, J. N. Regulation of secretion of IL-4 and IgG1 isotype by melatonin-stimulated ovalbumin-specific T cells. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 111: 181-5, 1998.

SHINOJIMA, T.; OYA, M.; KOHNO, H.; MARUMO, K.; MURAI, M. Dexamethasone and interleukin-2 combination therapy for advanced renal cell carcinoma in a patient with paraneoplastic inflammatory syndrome. **Int. J. Urol.**, v.11, n.7, p. 553-6, Jul., 2004

SHIU, S. Y. W. LI, L.; XU, J. N.; PANG, C. S.; WONG, J. T. Y.; PANG, S. F.. Melatonin-induced inhibition of proliferation and G1/S cell cycle transition delay of human choriocarcinoma Jar cells: Possible involvement of MT₂ (MEL 1_B) receptor. **J. Pineal Res.**, v.27, p.183-92, 1999.

SILBERBERG-SINAKIN, I.; THORBECKE, G. J.; BAER, R. L.; ROSENTHAL, S. A.; BEREZOWSKY, V. Antigen-bearing Langerhans cells in skin, dermal lymphatics and lymph nodes. **Cell. Immunol.**, v.25, n.2, p.137-51, Aug., 1976.

SILVA, S. O.; RODRIGUES, M. R.; XIMENES, V. F.; BUENO-DA-SILVA, A.E. B.; AMARANTES-MENDES, G. P.; CAMPA, A. Neutrophils as a specific target for melatonin and kynuramines: effects on cytokine release. **J. Neuroimmunol.**, v,156, p.146-52, 2004.

SLOMINSKI, A.; PRUSKI, D. Melatonin inhibits proliferation and melanogenesis in rodent melanoma cells. **Exp. Cell. Res.** v.206, p.189-94, 1993.

SLOMINSKI, A.; SEMAK, I.; PISARCHIK, A.; SWETMAN, T.; SZCZESNIEWSKI, A.; WORTSMAN, J. Conversion of L-Tryptophan to serotonin and melatonin in human melanoma cells. **FEBS Letters**, v.511, p.102-6, 2002.

SMYTH, C. M.; LOGAM, G.; BOADLE, R.; ROWE, P. B.; SMYTHE, J. A.; ALEXANDER, I. E. Differential subcellular localization of CD86 in human PBMC-derive macrophages and DCs, and ultrastructural characterization by immuno-electron microscopy. **International Immunol.**, v. 17, n.2, p.123-32, 2004.

SOUZA, A. V.; VISCONTI, M. A.; CASTRUCCI, A. M. L. Melatonin biological activity and binding sites in human melanoma cells. **J. Pineal. Res.** v.34, p.242-8, 2003.

SPRY, C.J.; PFLUG, A. J.; JANOSSY, G.; HUMPHREY, J. H. Large mononuclear (veiled) cells with "Ia-like" membrane antigens in human afferent lymph. **Clin. Exp. Immunol.**, v.39, n.3, p.750-5, Mar, 1980.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J. Exp. Med.**, v.137, p.1142-62, 1973.

STEINMAN, R. M.; LUSTIG, D. S.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. **J. Exp. Med.**, v.139, p.1431-45, 1974.

STEINMAN, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. **Annu. Rev. Immunol.**, v.9, p.271-96, 1991.

STROBL, H.; RIEDL, E.; SCHEINECKER, C.; BELLO-FERNANDEZ, C.; PICKL, W. F.; RAPPERSBERGER, K.; MAJDIC, O.; KNAPP, W.. TGF- β 1 promotes *in vitro* development of dendritic cells from CD 34+ hematopoietic progenitors. **J. Immunol.**, v. 157, p.1499-1507,1996.

STRUNK, D.; RAPPERSBERGER, K.; EGGER, C.; STROBL, H.; KRÖMER, E.; ELBE, A.; MAURER, D.; STINGL, G. Generation of human dendritic cells/langerhans cells from circulating CD34+ hematopoietic progenitor cells. **Blood**, v. 87,n.4, p.1292-1302, Feb. 15, 1996.

SUMMERS, K. L.; HOCK, B. D.; MCKENZIE, J. L.; HART, D. N. Phenotypic characterization of five dendritic cell subsets in human tonsils. **Am. J. Pathol.**, v.159, n.1, p.285-95, July, 2001.

SUZUKI, Y.; WAKITA, D.; CHAMOTO, K.; NARITA, Y.; TSUJI, T.; TAKESHIMA, T.; GYOBU, H.; KAWARADA, Y.; KONDO, S.; AKIRA, S.; KATOH, H.; NISHIMURA, T. Liposome-encapsulated CpG oligodeoxynucleotides as a potent adjuvant for inducing type 1 innate immunity. **Cancer Res.**, v.64, n.23, p.8754-60, Dec.1, 2004.

TAN, D-X.; MANCHESTER, L. C.; REITER, R. J.; QI, W-B.; ZHANG, M.; WEINTRAUB, S. T.; CABRERA, J.; SAINZ, R. M.; MAYO, J. C. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. **Biochem. Biophys. Acta.**, v.1472, p.206-14, 1999.

TAKAHASHI, T.; SASAKI, M.; ITOH, H.; YAMADERA, W.; OZONE, M.; OBUCHI, K.; HAYASHIDA, K.; MATSUNAGA, N.; SANO, H. Melatonin alleviates jet lag symptoms caused by an 11-hour eastward flight. **Psychiatry Clin. Neurosci.**, v.56, n.3, p.301-2, Jun., 2002.

TERMEER, C.; BENEDIX, F.; SLEEMAN, J.; FIEBER, C.; VOITH, U.; AHRENS, T.; MIYAKE, K.; FREUDENBERG, M.; GALANOS, C.; SIMON, J. C. Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. **J. Exp. Med.**, v.195, n.1, p.99-111, Jan. 7, 2002.

UPHAM, J.W.; LUNDAHL, J.; LIANG, I.; DENBURG, J.A.; O'BYRNE, P.M.; SNIDER, D.P. Simplified quantitation of myeloid dendritic cells in peripheral blood using flow cytometry. **Cytometry**. V. 40, p. 50-9, 2000.

VICARI, A. P.; CAUX, C.; TRINCHIERI, G. Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. **Seminars in Cancer Biology**, v. 12, p.33-42, 2002.

VILANI-MORENO, F. R.; LAURIS, J. R. P.; OPROMOLA, D. V. A. Cytokine quantification in the supernatant of mononuclear cell cultures and in bloodserum from patients with Jorge Lobo's disease. **Mycopathologia**, v. 158, p.17-24, 2004.

WAGENER, D.J.; WILS, J. A.; KOK, T. C.; PLANTING, A.; COUVREUR, M. L.; BARON, B. Results of a randomised phase II study of cisplatin plus 5-fluorouracil versus cisplatin plus 5-fluorouracil with alpha-interferon in metastatic pancreatic cancer: an EORTC gastrointestinal tract cancer group trial. **Eur. J. Cancer**, v.38, n.5, p.648-53, Mar., 2002.

WATANABE, S.; KAGAMU, H.; YOSHIZAWA, H.; FUJITA, N.; TANAKA, H.; TANAKA, J.; GEJYO, F. The duration of signaling through CD40 directs biological ability of dendritic cells to induce antitumor immunity. **J. Immunol.**, v. 171, p. 5828-36, 2003.

WHALEN, M. M.; DOSHI, R. N.; BADER, B. W.; BANKHURST, A. D. Lysophosphatidylcholine and Arachidonic Acid are required in the cytotoxic response of human natural killer cells to tumor target cells. **Cell. Physiol. Biochem.**, v. 9, p.297-309, 1999.

WHITESIDE, T. L.; ODOUX, C. Dendritic Cell Biology and Cancer Therapy. **Cancer Immunol. Immunother**, v. 53, p.240-8, 2004.

WITMER, M. D.; STEINMAN, R. M. The anatomy of peripheral lymphoid organs with emphasis on accessory cell: light microscopic, immunocytochemical studies of mouse spleen lymph node and Peyer's patch. **Am. J. Anat.**, v.170, p.465-81, 1984.

YAMAGUCHI, N.; FUJIMORI, Y.; FUJIBAYASHI, Y.; KASUMOTO, I.; OKAMURA, H.; NAKANISHI, K.; HARA, H. Interferon-gamma production by human cord blood monocyte-derived dendritic cells. **Ann. Hematol.**, v.84, n.7, p.423-8, Jul, 2005.

YING, S. W.; NILES, L. P.; CROCKER, C. Human malignant melanoma cells express high-affinity receptors for melatonin: antiproliferative effects of melatonin and 6-chromomelatonin. **Eur. J. Pharmacol.**, v.246, p.89-96, 1993.

ZHDANOVA, I.V.; WURTMAN, R. J.; REGAN, M. M.; TAYLOR, J. A.; SHI, J. P.; LECLAIR, O. U. Melatonin treatment for age-related insomnia. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.86, n.10, p. 4727-30, Oct, 2001.

ZHOU, L. J.; TEDDER, T. F. Human blood dendritic cells selectively Express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. **J. Immunol.**, v. 154, p.3821-35,1995.

ZHOU, L. J.; TEDDER, T. F. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.93, p.2588-92, 1996.