

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Geração de vacinas antitumorais de células dendríticas humanas sensibilizadas com RNA de células tumorais pré-tratadas com agentes antineoplásicos.

Aluna: Marianna Bartelega Magalhães

Orientador: Ramon Kaneno

Monografia apresentada ao
Instituto de Biociências de Botucatu,
como parte das exigências para obtenção do
Título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

BOTUCATU – SP

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Geração de vacinas antitumorais de células dendríticas humanas sensibilizadas com RNA de células tumorais pré-tratadas com agentes antineoplásicos.

Aluna: Marianna Bartelega Magalhães

Orientador: Ramon Kaneno

Monografia apresentada ao
Instituto de Biociências de Botucatu,
como parte das exigências para obtenção do
Título de Bacharel em Ciências Biomédicas.

BOTUCATU – SP

2010

1. Agradecimentos.

Primeiramente sou grata àqueles sem os quais eu não alcançaria meus sonhos e nem sequer os teria almejado. Pelos pensamentos positivos, o suporte emocional e financeiro durante toda a vida e, principalmente, pelo presente mais precioso já recebido, a dádiva da fraternidade. Ana Maria e Antonio, vocês serão eternamente meu porto seguro. Ao José, irmão querido, pelas tardes calmas e ensolaradas, as experiências compartilhadas, o carinho imensurável e a eterna admiração recíproca. Obrigada por sua existência. Por todos os ensinamentos, pela experiência transmitida, a ajuda financeira, a compreensão profunda e a torcida indispensável ao meu sucesso, agradeço ao padrinho e avô, Domingos. À irmã que a vida cedeu, Carina, obrigada pela presença constante, pela compreensão, ajuda e pelos sorrisos mais sinceros já vivenciados. À Natália, cuja distância e tempo não separou e nem nos causou diferenças, agradeço a confiança e alegria compartilhadas. Aos amigos que tornaram os dias botucatuenses menos tórridos e que fizeram todo o esforço ser recompensado, agradeço imensamente. Sem vocês eu não seria hoje uma Biomédica. Pelas conversas infindáveis, as discussões políticas, as noites não dormidas, a realização de sonhos que pareciam impossíveis, mas que foram apenas desafios, agradeço à Massa. Pela ajuda constante, paciência, resignação e a capacidade de motivar todo meu ser em pequenas atitudes, obrigada Dia. Pela convivência e vivência partilhadas, agradeço ao amigo mais dedicado, por me ensinar lições de vida que jamais serão esquecidas, Gabriel, obrigada. Agradeço à Universidade Estadual Paulista por todos os ensinamentos obtidos, pelos grandes docentes cujas lições foram preciosas. Obrigada IBB Jr por me tornar uma pessoa mais consciente e preparar-me para quando este dia chegasse. Agradeço aos Médicos da Alegria, pelo aprendizado do valor à vida, à alegria e à saúde e pelos momentos indescritíveis vivenciados. Ao orientador dedicado, agradeço a oportunidade cedida, a confiança depositada, o aprendizado diário, a paciência com minhas imperfeições e ao constante estímulo profissional. Ramon, as maiores lições não estarão apenas listadas nesse trabalho, mas me acompanharão sempre nos novos caminhos a serem percorridos. MUITÍSSIMO obrigada.

2. Sumário

1. Agradecimentos.	4
2. Sumário	5
3. Resumo	6
4. Introdução.	7
5. Delineamento Experimental.	13
6. Metodologia.	13
6.1 Determinação das concentrações efetiva mínima e não tóxica dos agentes antineoplásicos.	13
6.2 Obtenção do RNA de células tumorais.....	14
6.3 Transfecção de DCs com RNA de células tumorais.....	14
6.4 Geração de células dendríticas humanas.	15
6.5 Reação mista de linfócitos (MLR).....	16
6.6 Geração de células T citolíticas e ensaio de linfocitotoxicidade.	16
6.7 Análise estatística	16
7. Análise de Resultados.	17
8. Conclusão.....	24
9. Referências Bibliográficas	26

3. Resumo

O câncer colorretal (CCR) é a terceira causa mais comum de câncer no mundo em ambos os sexos e a segunda causa em países desenvolvidos. Seu tratamento convencional é baseado na cirurgia associada à radioterapia e à quimioterapia em dose máxima tolerável, para tentativa de eliminação massiva das células tumorais. Tal abordagem, no entanto, pode causar efeitos colaterais importantes, entre eles as alterações hematopoiéticas e a supressão da resposta imune. As vacinas de células dendríticas mostram-se como opção terapêutica promissora para muitos tipos de câncer, havendo diferentes protocolos de preparação e sensibilização dessas células para dirigir a resposta antitumoral específica. Alguns agentes antineoplásicos em doses ultrabaixas mostraram modular positivamente as células dendríticas (DCs) e, na célula tumoral, promover alterações na transcrição de vários genes imunologicamente relevantes. Considerando que, em estudos prévios, tais mudanças transcricionais resultaram em aumento de imunogenicidade das células tumorais, hipotetizamos que o RNA das células pré-tratadas deve ser mais eficiente do que o RNA das células originais para preparação de vacinas de células dendríticas. Assim, objetivamos avaliar se o tratamento de células do tumor de cólon humano (HT-29) com PAC ou 5-FU/LEUCO torna seu RNA mais eficiente para preparação dessas vacinas. Para essa investigação, DCs humanas geradas a partir de monócitos de sangue periférico foram transfectadas com RNA total das células tumorais pré-tratadas e, a seguir, testadas quanto à capacidade de apresentação de antígenos e indução de células T citolíticas específicas. Apesar da baixa viabilidade celular pós eletroporação, os resultados obtidos sugerem que o tratamento de células tumorais com concentrações não tóxicas de 5-FU ou PAC promove alteração de expressão gênica favorecendo a indução de linfócitos T citolíticos.

4. Introdução.

O câncer colorretal (CCR) é a terceira causa mais comum de câncer no mundo em ambos os sexos e a segunda causa em países desenvolvidos [1, 2]. Nos Estados Unidos, a incidência da doença em 2004 foi de quarenta e oito casos a cada cem mil pessoas [3] e, em 2008, o CCR foi considerado a terceira maior causa de mortes relacionadas a câncer, com cento e quarenta e nove mil novos casos e cinquenta mil mortes [4]. No Brasil, o risco estimado para 2008, foi de treze casos novos a cada cem mil homens e quinze para cada cem mil mulheres, sendo observadas as maiores taxas nas regiões sul e sudeste [1].

O CCR é causado por alterações consecutivas nos genes que controlam a proliferação celular, a apoptose e o reparo no DNA de células epiteliais localizadas no intestino grosso e reto. Essa afecção ocorre principalmente devido a alterações no gene APC, localizado no cromossomo 5q2.1, podendo ocorrer esporadicamente ou em famílias que apresentam polipose adenomatosa, cujo caráter é autossômico dominante [5]. As ocorrências esporádicas mostraram ser fortemente influenciadas por diversos fatores extrínsecos, associados à dieta rica em gorduras e proteínas [6], pobre em frutas, vegetais e cereais [7], além de hábitos sedentários associados ao uso de álcool e tabaco[6].

A prevenção desse tipo de câncer requer a alteração do estilo de vida, porém o uso de alguns medicamentos tem demonstrado efeito protetor. Exemplos são os antiinflamatórios não esteroidais, que apresentam tais resultados em seus consumidores regulares [8]. No entanto, a terapia com essas drogas tem demonstrado aumento em complicações gastrointestinais [9], podendo assim restringir seu uso com fins preventivos.

A escolha do tratamento deve ser baseada no estadiamento do câncer, que pode ser feito através da análise genética e de comparações anatômicas e histológicas, melhorando a sua eficácia e o prognóstico do paciente. A cirurgia foi estabelecida como tratamento para a doença e pode ser curativa para 90% das descobertas precoces [3].

A droga 5-fluorouracil (5-FU) foi sintetizada pela primeira vez em 1957 e se tornou a droga de escolha para o tratamento do CCR, em geral associado à leucovorina (5-FU+LEUCO) [3]. O efeito do 5-FU baseia-se na inibição da enzima timidilato sintase (TS), cujos metabólitos incorporam-se ao RNA e ao DNA da célula, levando à redução na síntese e reparo de danos do DNA [10]. A combinação de 5-FU e leucovorina, numa grande variedade de doses e escalas terapêuticas, tem sido usada como padrão para o tratamento de câncer colorretal. Uma meta-análise publicada em 1992 mostrou que apesar da taxa de sobrevivência não ser maior nos pacientes que usavam 5-FU+leucovorina, a taxa de resposta era significativamente maior, em relação aos pacientes cuja administração era apenas de 5-FU [11].

Outras drogas utilizadas na terapia do câncer colorretal são azacitidina (AZA) e paclitaxel (PAC). A azacitidina é um análogo do nucleosídeo citosina, com um anel heterocíclico alterado capaz de promover a hipermetilação em regiões regulatórias de genes. O uso da droga permite que genes supressores tumorais retomem sua atividade normal e que a doença seja controlada [12]. Já o paclitaxel mostra múltiplas ações no sistema imune exercendo diferentes efeitos sobre suas células. Ele regula a produção de várias citocinas e estimula ou inibe diferentes linfócitos, exibindo efeitos inibitórios sobre neoplasias e doenças autoimunes [13].

A destruição apoptótica de células tumorais, induzida por agentes quimioterápicos antineoplásicos, expõe uma grande quantidade de antígenos ao sistema imune, induzindo sua ativação. Na presença de células apoptóticas, os antígenos são preferencialmente apresentados através de células apresentadoras de antígenos (APCs) e há maior ativação de células T CD8⁺. O uso de altas doses de drogas antineoplásicas, no entanto, pode levar a uma exposição exagerada ao sistema imune, aumento na captura de antígenos tumorais e, conseqüentemente, induzir a tolerância [14]. Há também ampliação na supressão da medula óssea, levando à redução da função e viabilidade de células com origem hematopoética, incluindo as células dendríticas (DCs).

Os sintomas relacionados à quimioterapia são inicialmente anorexia e náusea, seguidos por estomatites e diarreia. Ulcerações mucosas podem ocorrer ao longo do trato gastrointestinal e podem levar a diarreia fulminante, choque e morte, especialmente em pacientes que recebam infusões contínuas de 5-FU. Os efeitos tóxicos relacionados às máximas doses terapêuticas toleráveis se devem a supressão da medula óssea, causada pela droga. A leucopenia geralmente ocorre entre o nono e décimo quarto dia após a primeira administração, ocorrendo trombocitopenia e anemia em alguns casos. Perda de cabelo, mudanças na unhas, dermatites, aumento da pigmentação e atrofia da pele, além de manifestações neurológicas e mielopatia também são relatados como efeitos colaterais [15].

Uma alternativa a esse esquema de tratamento é a administração metronômica dos quimioterápicos, cujo esquema baseia-se na administração de doses mais baixas, porém com maior frequência. Desse modo, a ocorrência dos efeitos colaterais é minimizada, há permanência prolongada dos níveis sanguíneos do agente antineoplásico e preservação da atividade das células do sistema imune.

Estudos prévios com alguns agentes quimioterápicos demonstraram que ao contrário da dose máxima tolerável, doses ultrabaixas promovem aumento na maturação de DCs e na apresentação de antígenos [16]. DCs pré-tratadas em concentrações baixas e não citotóxicas com paclitaxel, metotrexato, doxorubicina, vinblastina, vincristina e mitomicina C, mostraram um aumento no potencial de apresentação de antígenos OVA para células T CD8⁺ antígeno-específicas. Além disso, foi determinado que o aumento da habilidade apresentadora de antígenos está correlacionado a componentes do MHC classe I da maquinaria de processamento de antígenos (APM) [16].

Na mesma linha de investigação, observou-se que a exposição de células do tumor de colon humano HCT-116 a doses ultrabaixas de paclitaxel, leva ao aumento na expressão de

componentes da maquinaria de processamento de antígenos pela via citosólica e ao aumento na atividade de transcrição de vários genes dessas células, ampliando sua imunogenicidade [17].

A resposta imune esperada contra células tumorais deve envolver os dois aspectos do sistema imunológico, o humoral e o celular. Embora ambos devam ser capazes de reconhecer e atacar antígenos tumor-associados e/ ou tumor-específicos, a imunidade celular específica é aceita como a mais importante na resistência aos tumores e, apesar disso, em cânceres avançados, incluindo o colorretal, há evidência considerável de sua depleção [18]. Linfócitos T são capazes de reconhecer diferentes epítomos antigênicos associados às moléculas de histocompatibilidade de classe I das células tumorais, ou associados às moléculas de classe II, localizadas na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs).

As células dendríticas (DCs) estão presentes nos órgãos linfóides, nos epitélios da pele, nos tratos gastrointestinal e respiratório, bem como na maioria dos órgãos parenquimatosos [19]. Essas células são as APCs mais eficazes para iniciar as respostas dos linfócitos T e apresentam a propriedade singular de expressar peptídeos associados tanto aos antígenos de histocompatibilidade de classe I quanto aos de classe II, devido ao fenômeno de *cross-priming* ou *cross-presentation*. Tal fenômeno permite que os antígenos tumorais sejam processados pela via endocítica e apresentados a linfócitos T auxiliares (T CD4⁺) através do MHC classe II, e que as proteínas endógenas sejam processadas pela via citosólica e apresentadas aos linfócitos T citotóxicos (T CD8⁺) através do MHC classe I.

Há uma associação entre a progressão tumoral e a supressão ou o mau funcionamento do sistema imune, uma vez que esse é regulado pelas células dendríticas devido à produção de citocinas, à capacidade de apresentação de antígenos para linfócitos T imaturos, além da polarização e balanceamento da resposta imune [20]. Essa plasticidade nas funções das DCs é regulada por algumas citocinas que podem tanto promover a imunidade quanto favorecer a indução de tolerância [21].

Em pacientes com câncer, o sistema de DCs funciona abaixo dos níveis normais devido à influência de múltiplos fatores locais e sistêmicos, derivados do tumor e do estroma. As alterações observadas envolvem a eliminação da função das DCs, além do bloqueio da sua diferenciação, indução da apoptose, e diminuição de quimiocinas atrativas. No entanto, a ação de fatores como cirurgia, radiação, quimioterápicos e terapia hormonal pode interferir nas suas funções e viabilidade [20].

Como a apresentação de antígenos pelas próprias células tumorais é insuficiente para induzir uma resposta imune adequada, é necessário maior número de APCs [22]. Assim, o papel central das DCs na imunidade anti-tumoral sustentou o desenvolvimento das vacinas anti-tumorais baseadas em células dendríticas e há, atualmente, uma variedade de métodos propostos para sua produção. Embora essa terapia seja uma proposta promissora, a otimização dos protocolos de vacinas de DCs ainda é necessária para ampliar o sucesso de futuros testes clínicos [22].

A simples presença de DCs no microambiente tumoral não necessariamente conduz à ativação de uma resposta imune anti-tumoral, uma vez que citocinas e fatores de crescimento derivados do tumor podem suprimir a função das DCs ou condicioná-las à induzir células T supressoras. Para que ocorra a maturação e ativação de DCs em poderosas APCs, sinais de perigo são requisitos essenciais. Imunopotenciadores e citocinas são reconhecidos como forte ativadores de DCs, e GM-CSF e IFN- α têm sido usados como adjuvantes em vacinas contra o câncer [21].

Alguns autores propõem o uso de RNA obtido de células tumorais para a sensibilização das DCs. Essas células, quando transfectadas com RNA codificador de antígenos tumor-associados ou RNAm total da célula tumoral, podem induzir uma potente resposta de células T contra múltiplos epítomos [23, 24]. Essa transfecção pode ser realizada com o uso de um vetor viral que transporta o RNAm tumoral para o interior da DC ou por eletroporação, que consiste em um método físico de introdução do RNA tumoral em uma célula dendrítica [25, 26].

Vantagens importantes dessa técnica são a falta de dependência no tipo HLA do paciente e o potencial de apresentação de múltiplos epítomos imunogênicos derivados dos produtos do RNA introduzido. Essa estratégia também evita qualquer risco de integração de genes externos ao genoma das células hospedeiras porque os RNA transfectados permanecem no citoplasma, onde eles são expressos e degradados [27].

A partir do cenário exposto, hipotetizamos que o tratamento prévio de células tumorais com doses não citotóxicas ou efetivas mínimas de drogas antitumorais provoca alterações na transcrição de genes associados à imunogenicidade das células tumorais, tornando seu RNA mais eficiente para sensibilização de células dendríticas.

Assim, objetivamos verificar a viabilidade do uso do RNA de células tumorais pré-tratadas com paclitaxel ou 5-fluorouracil+leucovorina na sensibilização de células dendríticas.

5. Delineamento Experimental.

Células da linhagem de câncer de cólon humano HT-29 foram tratadas *in vitro* por 72 horas com 5-FU/LEU e PAC, à concentração efetiva mínima ou à concentração não-tóxica. O RNA total das células pré-tratadas ou dos controles (células originais não tratadas, mantidas pelo mesmo tempo de cultura) foi utilizado para sensibilização de DCs imaturas, através de transfecção por eletroporação. As DCs resultantes foram então testadas quanto a sua capacidade de estimulação de linfócitos em cultura mista (MLR) e de indução de linfócitos T citolíticos.

6. Metodologia.

6.1 *Determinação das concentrações efetiva mínima e não tóxica dos agentes antineoplásicos.*

Células de câncer de cólon humano da linhagem HT-29, gentilmente cedidas por Michael R. Shurin (University of Pittsburgh – PA, USA), foram mantidas em cultura em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 25M de Hepes, 1mM de l-glutamina, 1% de aminoácidos não-essenciais e 0.1% de piruvato de sódio (meio completo) a 37° C, sob tensão de 5% de CO₂. Após repicagem ou descongelamento das mesmas, foram feitas culturas de 4x10³ células por poço em placa de 96 alvéolos de fundo plano. Após 24 horas foram adicionados paclitaxel (PAC), ou 5-fluorouracil (5-FU) em concentrações decrescentes, mantido por 72 horas. O efeito da droga foi avaliado pelo método de citotoxicidade do MTT para determinação das doses efetivas mínimas (DEM) e das doses não tóxicas (DNT) de cada droga. As concentrações determinadas para paclitaxel foram de 100µM a 0.005nM. As concentrações utilizadas para 5-fluoracil foram de 50µM a 0.01µM. Após o estabelecimento das DEM e DNT de 5-FU, foram feitas culturas com as respectivas doses associadas às seguintes concentrações decrescentes de leucovorina, de 1000ng/ml a 0.03ng/ml.

6.2 *Obtenção do RNA de células tumorais.*

Após a determinação da DEM e da DNT, células tumorais foram cultivadas sob 5 condições de trabalho:

CTR. Controle de Células HT-29 não tratadas com droga.

5-FU/Leu EM. Células HT-29 tratadas com a dose efetiva mínima de 5-fluoracil.

5-FU/Leu NT. Células HT-29 tratadas com a dose não tóxica de 5-fluoracil.

PAC EM. Células HT-29 tratadas com a dose efetiva mínima de paclitaxel.

PAC NT. Células HT-29 tratadas com a dose não tóxica de paclitaxel.

As culturas foram mantidas em tratamento por 72h para posterior extração de RNA pelo método do Trizol®. Após tratamento das amostras com DNase (Deoxyribonuclease – Sigma®), a concentração e a pureza do RNA foram analisadas em espectrofotômetro (NanoVue®) nas seguintes relações de absorbância: A260/280nm e A260/230nm [29]. A integridade dos ácidos nucleicos foi verificada através do kit AccessQuick™ RT-PCR System, através do qual foi realizada a reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase, cujos resultados foram observados pela eletroforese em gel de agarose.

6.3 *Transfecção de DCs com RNA de células tumorais.*

Uma relação de dez microgramas de RNA total de células HT-29 pré-tratadas com as drogas foi usada para a transfecção de 4×10^6 DCs por eletroporação. A diferença de potencial utilizada foi de 30V durante 0.7s, por amostra. Desse modo as DCs foram preparadas nas seguintes condições:

1. DCs ã elet. Células dendríticas não eletroporadas.
2. DCs. Células dendríticas eletroporadas, porém não sensibilizadas com o RNA tumoral.

3. CTR. Células dendríticas eletroporadas com o RNA de tumor não tratado com drogas.
4. 5-FU EM. Células dendríticas eletroporadas com o RNA de tumor pré-tratado com a dose efetiva mínima de 5-fluoracil em associação com a dose de escolha de leucovorina.
5. 5-FU NT. Células dendríticas eletroporadas com o RNA de tumor pré-tratado com a dose não tóxica de 5-fluoracil em associação com a dose de escolha de leucovorina.
6. PAC EM. Células dendríticas eletroporadas com o RNA de tumor pré-tratado com a dose efetiva mínima de paclitaxel.
7. PAC NT. Células dendríticas eletroporadas com o RNA de tumor pré-tratado com a dose não tóxica de paclitaxel.

Imediatamente após a eletroporação as células foram diluídas a $10^6/\text{ml}$ em meio completo suplementado com GM-CSF e IL-4, ficando em repouso por 48 horas antes de qualquer outro procedimento [30].

6.4 *Geração de células dendríticas humanas.*

Células dendríticas foram geradas a partir de monócitos de sangue periférico de doadores voluntários do Banco de Sangue do Hemocentro de Botucatu, que assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da FMB. As células mononucleares foram separadas através do gradiente Ficoll Hypaque e cultivadas em placas de 6 poços. Após remoção das células não aderentes por lavagens consecutivas, as células aderentes restantes foram cultivadas em meio RPMI completo, suplementado com 80ng/ml de (rh)IL-4 e (rh)GM-CSF. Após 5 dias de cultivo, as células frouxamente aderidas foram recolhidas com auxílio de uma pipeta, lavadas com meio completo e a concentração celular foi ajustada de acordo com os ensaios propostos.

6.5 *Reação mista de linfócitos (MLR).*

A atividade funcional das DCs foi avaliada através da medida de sua habilidade em estimular a proliferação de linfócitos T alogênicos de indivíduos normais, enriquecidos por passagem em coluna de nylon. As células foram co-cultivadas em placas de 96 alvéolos de fundo em “U” nas seguintes proporções entre células dendríticas e linfócitos T (CD:T): 1:1, 1:3, 1:10 e 1:30. A proliferação de linfócitos foi avaliada pela capacidade de transformação do MTT em formazana seguida de leitura espectrofotométrica em leitor de ELISA a 540 nm.

6.6 *Geração de células T citolíticas e ensaio de linfocitotoxicidade.*

Para a geração de células T citolíticas, uma suspensão rica em linfócitos T, enriquecida por passagem em coluna de nylon, foi co-cultivada com DCs autólogas transfectadas com RNA de células tumorais, 48h após a eletroporação. Foram adicionados 10ng/ml de IL-7 e 30U/ml de IL-2 à cultura, sendo que a estimulação com IL-2 foi repetida a cada 3 dias para manutenção do crescimento de linfócitos ativos. A suspensão de linfócitos foi recolhida e lavada no 14º dia de cultura para avaliação da atividade citotóxica das células obtidas. Para avaliar a atividade citotóxica das células T obtidas, foi adicionada à suspensão uma cultura de células tumorais previamente preparada em placa de 96 alvéolos de fundo plano. O conjunto foi incubado por 4 horas a 37°C sob tensão de 5% de CO₂, seguindo-se duas lavagens com meio completo para remoção dos linfócitos em suspensão e dos fragmentos de células tumorais mortas. As células vivas residuais foram então coradas com MTT por duas horas, seguindo-se leitura espectrofotométrica como anteriormente descrito.

6.7 *Análise estatística*

A análise estatística dos dados foi realizada pela análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas, sendo consideradas significantes as diferenças cujas probabilidades de erro forem menores que 5% ($p < 0.05$).

7. Análise de Resultados.

7.1 Determinação das DEM e DNT de 5-fluoracil.

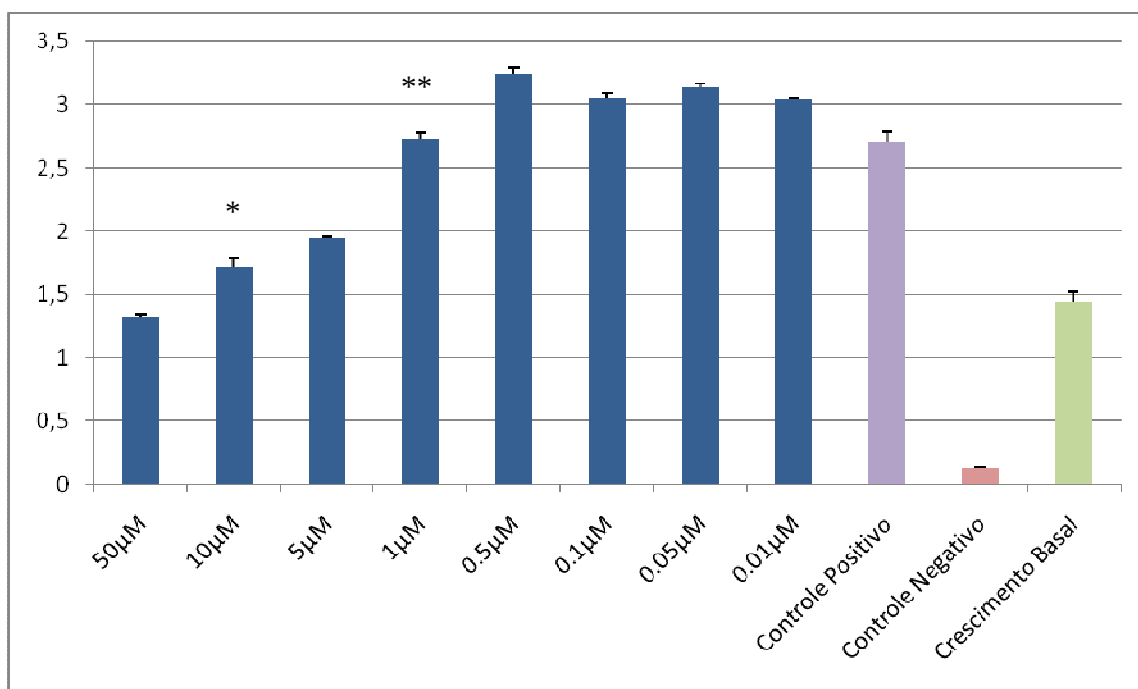


Gráfico 1: Determinação da dose efetiva mínima e dose não tóxica de 5-FU sobre células HT-29. A monocamada de células tumorais foi submetida à incubação com concentrações decrescentes da droga, variando de 50µM a 0.01µM por 72h a 37°C, sob tensão de 5% de CO₂. Após esse período as células viáveis foram coradas com MTT. Considerou-se como DEM aquela capaz de interromper o crescimento, sem provocar a morte células (ação citostática). Considerou-se como DNT aquela incapaz de impedir a proliferação celular mas que não tivesse efeito estimulador do crescimento. *p<0.05 vs controle negativo e controle positivo. ** p<0.05 vs controle negativo e crescimento basal.

A cultura de células tumorais com concentrações variáveis de 5-FU indicou que à 10µM, essa droga exerce efeito citostático, sem morte celular expressiva. Na concentração de 50µM, o número de células viáveis foi ligeiramente inferior ao controle de crescimento basal, semelhante aos dados obtidos com 100µM em experimento piloto (dados não demonstrados).

A dose não tóxica foi considerada como aquela que não exerce qualquer efeito supressivo sobre o crescimento espontâneo das células, comparável portanto, ao controle

positivo, sendo determinada a concentração 1 μ M. Nota-se que em concentrações mais baixas (0.5 μ M a 0.01 μ M) a adição de 5-FU passa a estimular o crescimento das células tumorais.

7.2 Determinação da melhor associação entre 5-FU e Leucovorina.

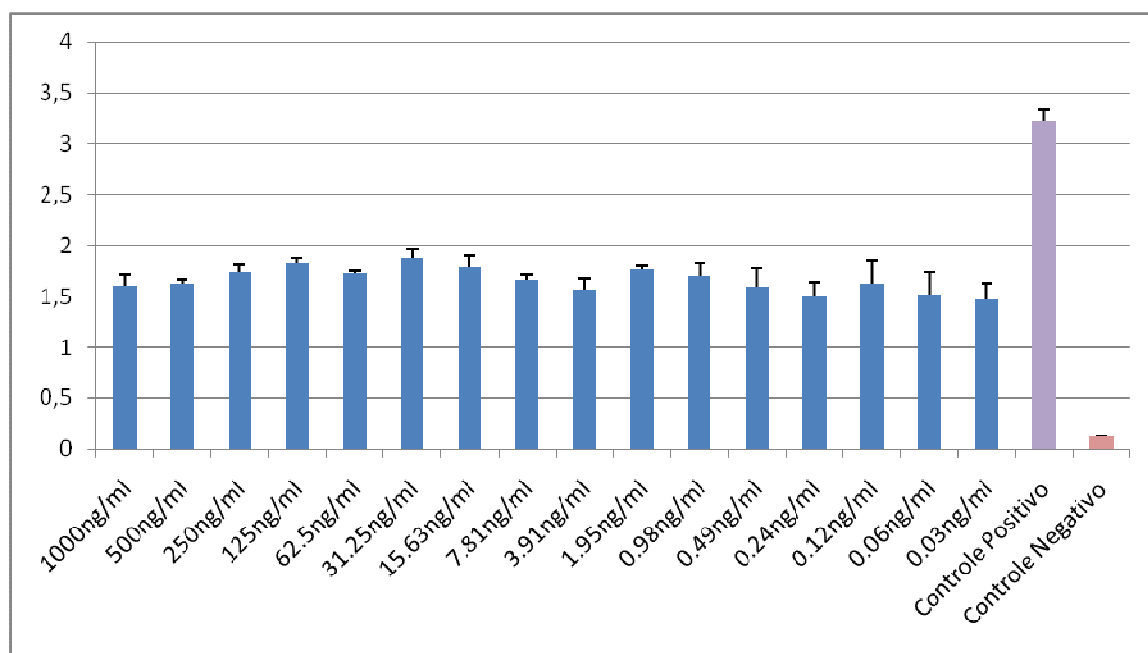


Gráfico 2: Efeito da associação entre 5-FU e Leucovorina. Células tumorais foram tratadas com a DEM de 5-FU associada às concentrações variáveis de leucovorina. O controle positivo refere-se a células cultivadas na ausência de drogas e o controle negativo refere-se a alvéolos sem células. As culturas foram mantidas com as drogas por 72 horas, seguidas de lavagem e coloração pelo MTT.

Visto que na clínica o 5-FU é usado em associação com leucovorina, buscamos estabelecer uma dose de ácido fólico que não interferisse na viabilidade das células alvo nem na ação do 5-FU nas doses de trabalho selecionadas. Assim, a concentração de 5-FU foi fixada em 10 μ M (DEM), adicionando-se concentrações variáveis de leuco. O Gráfico 2 mostra que mesmo em concentrações tão elevadas quanto 100ng/ml, a leuco não altera a viabilidade das células nem interfere no efeito citostático da DEM de 5-FU.

Na clínica o esquema de associação entre 5-FU e leuco para o tratamento de câncer colorretal é de 20mg de leucovorina para 425mg de 5-FU por 5 dias com intervalo de 28 dias.

Desse modo para a DEM de 10 μ M e para a DNT de 1 μ M foram utilizadas as doses de 62,5ng/ml e 6,25ng/ml de leucovorina, respectivamente.

7.3 Determinação das DEM e DNT de Paclitaxel.

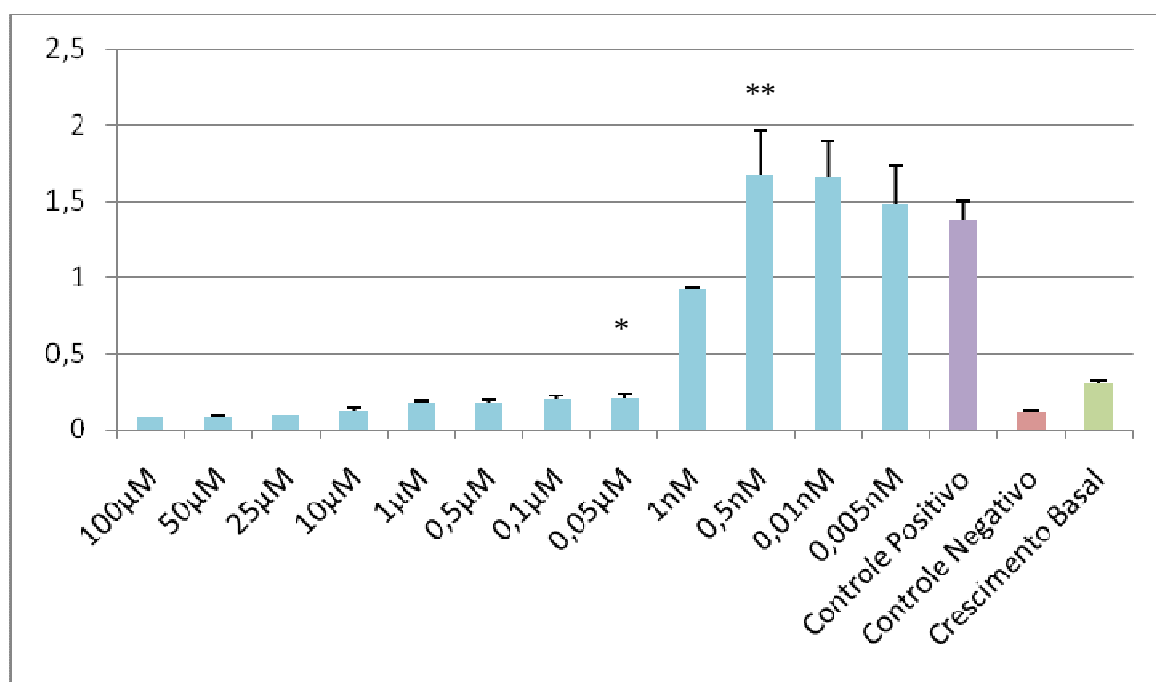


Gráfico 3: Determinação da dose efetiva mínima (DEM) e da dose não tóxica (DNT) de Paclitaxel sobre células HT-29. A monocamada de células tumorais foi submetida à incubação com concentrações decrescentes da droga, variando de 100 μ M a 0.005nM por 72h a 37°C, sob tensão de 5% de CO₂. Após esse período as células viáveis foram coradas com MTT. Considerou-se como DEM aquela capaz de interromper o crescimento, sem provocar a morte células (ação citostática). Considerou-se como DNT aquela incapaz de impedir a proliferação celular mas que não tivesse efeito estimulador do crescimento. *p<0.05 vs controle negativo e controle positivo. ** p<0.05 vs controle negativo e crescimento basal. Ensaio representativo de um dos 4 ensaios realizados.

Os dados ilustrados no Gráfico 3 indicam que a dose citostática de (DEM) de paclitaxel foi da ordem de 0.05 μ M, equivalente ao crescimento basal em 24 horas de cultura. A dose não tóxica foi estabelecida como 0.5nM permitindo crescimento celular equivalente ao controle positivo.

7.4 Avaliação da concentração, pureza e integridade do RNA.

	CTR	5-FU EM	5-FU NT	PAC EM	PAC NT
Quantificação	795,2µg/ml	2856µg/ml	1954µg/ml	1314µg/ml	1235µg/ml
A260/280	1.984	2.006	1.954	1.966	1.943
260/230	1.898	1.910	1.802	1.961	1.832

Tabela 1: Avaliação da concentração e pureza do RNA por espectrofotômetro NanoVue

A quantificação e análise da pureza do RNA obtido foram avaliadas por espectrofotometria em comprimento de onda não-visível. O RNA puro deve ter uma relação A260/280 entre 1.9 e 2.1, sendo que valores abaixo dessa faixa indicam contaminação por proteínas e valores superiores indicam contaminação por DNA. A relação A260/230 deve estar entre 1.8 e 2.3, sendo que taxas inferiores indicam contaminação com reagentes usados na extração, como fenol e sal. Como pode ser observado na Tabela 1, as amostras obtidas pela técnica de extração por Trizol® não mostraram indicação de contaminação por proteínas ou reagentes.

Para avaliar a integridade do RNA obtido, foi sintetizado um cDNA pela ação da transcriptase reversa e, a partir desse, foram realizadas análises qualitativas através de eletroforese em gel de agarose. Como controles foram utilizados H₂O-nuclease-free e RNA extraído de células de câncer colorretal da linhagem HT-29 não tratado com DNase.

O *primer* de β -actina utilizado possui a sequência forward AAG TGT GAC GTT GAC ATC CGT AA e a sequência reverse TGC CTG GGT ACA TGG TGG TA, sendo que ambas dão origem a um produto de 76 pares de base [31]. O leadder utilizado para marcação possui seu menor fragmento a 100 pares de bases.

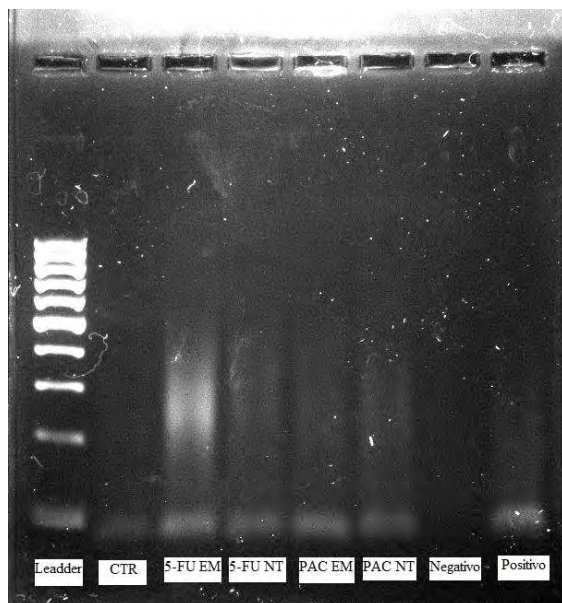


Figura 1: Gel de eletroforese para identificação do gene beta-actina

Como demonstrado na Figura 1, verificou-se que o RNA não está degradado, sendo então apropriado para sensibilizar células dendríticas através da transfecção por eletroporação.

7.5 Viabilidade Celular Após a Eletroporação.

A técnica foi iniciada com um total de 5×10^6 células dendríticas por grupo. No entanto, a contagem de células após eletroporação e 48 horas de cultivo apontou uma baixa viabilidade celular após o processo, como demonstrado na Tabela 2. As células morreram devido à descarga elétrica ou foram perdidas durante a transferência da cubeta de eletroporação para o tubo de ensaio. Os dados referem-se a apenas um ensaio, visto que nos dois ensaios prévios não foi possível obter DCs suficientes para os procedimentos propostos.

	DCs	CTR	5-FU EM	5-FU NT	PAC EM	PAC NT
Viabilidade	20%	24%	22%	24%	28%	28%

Tabela 2: Viabilidade das DCs após processo de eletroporação, avaliado pela técnica de incorporação do azul de trypan.

7.6 Reação Mista de Linfócitos.

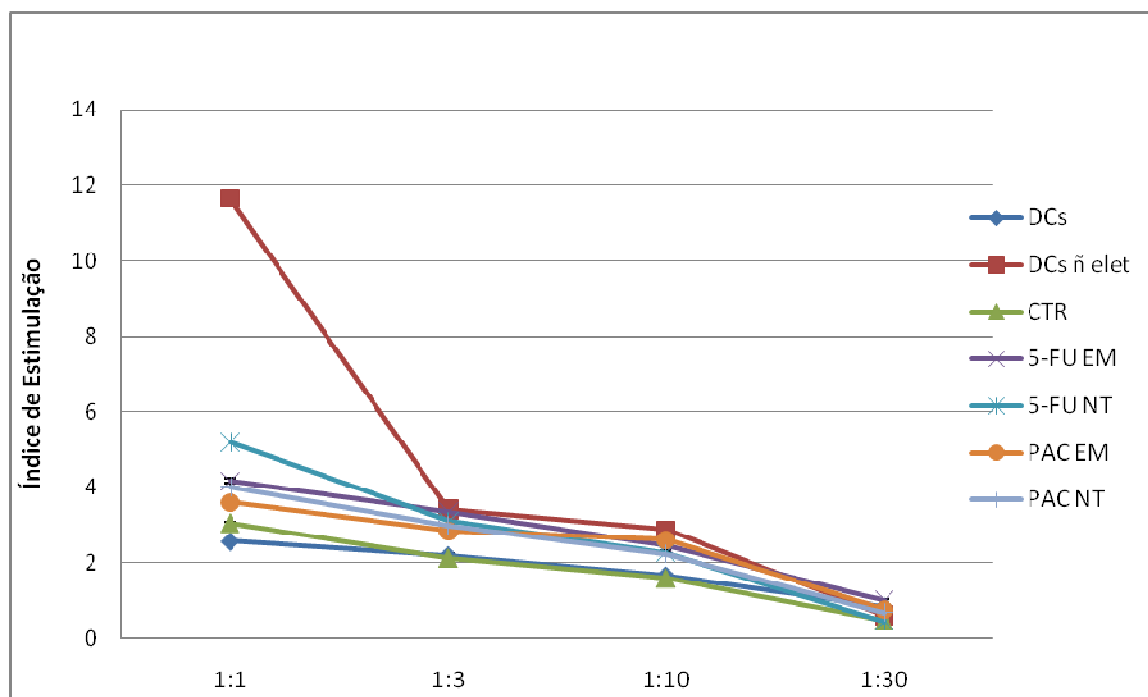


Gráfico 4: Reação Mista de Linfócitos. Determinação do Índice de Estimulação de Linfócitos pelas diferentes concentrações de células dendríticas eletroporadas com RNA de células tumorais HT-29 previamente tratadas com agentes antineoplásicos

O Gráfico 4 ilustra o papel de apresentação de antígenos exercido pelas DCs em reação com linfócitos T alogênicos. Observa-se que DCs não eletroporadas apresentaram maior capacidade de apresentação de antígenos que as células submetidas ao processo de eletroporação, independentemente do tratamento prévio a que foram expostos.

Entre as DCs eletroporadas, entretanto, as células transfectadas com o RNA de tumor pré-tratado com 5-FU (DEM e DNT) parecem ter maior eficiência que as DCs eletroporadas com RNA de tumor original (CTR) ou apenas submetidas à carga elétrica (DCs).

7.7 Indução de Linfócitos T Citolíticos.

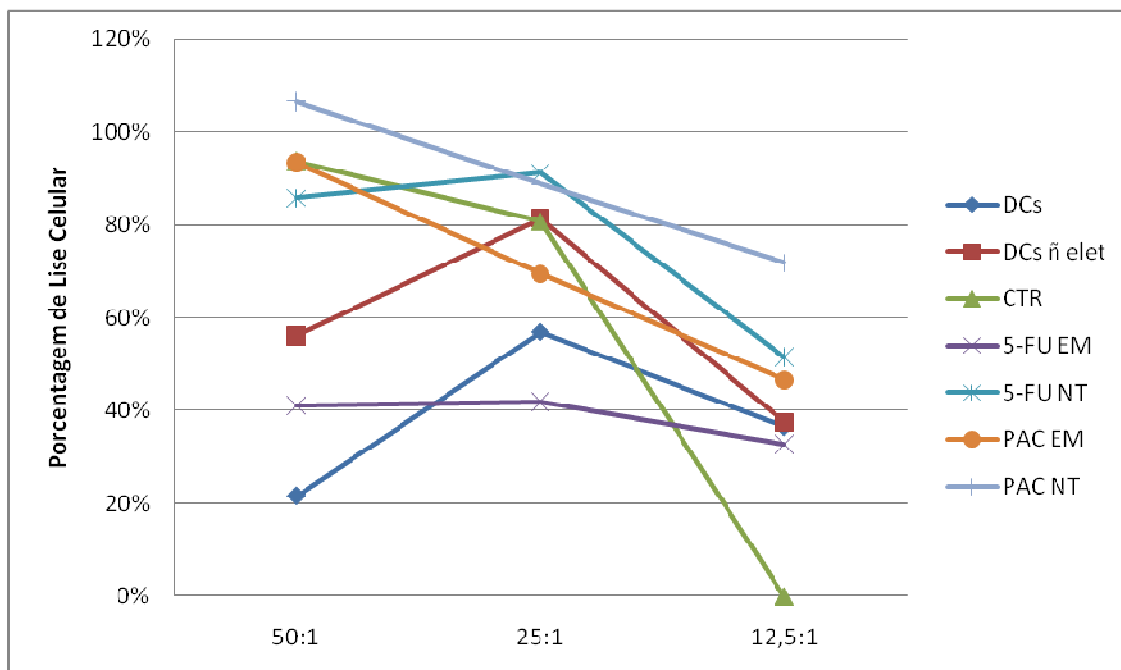


Gráfico 5: Ensaio de Linfocitotoxicidade. Linfócitos, obtidos após 14 dias de cultura com DCs autólogas eletroporadas com RNA de tumor pré-tratado com 5-FU ou PAC, foram testados quanto à capacidade de reconhecer especificamente células HT-29.

Como pode ser observado no Gráfico 5, a interação de linfócitos T com DCs eletroporadas com RNA de tumor pré-tratado com 5-FU induziu a geração de maior quantidade de células citolíticas específicas para HT-29, em comparação com DCs não eletroporadas (DCs ã elet) ou apenas submetidas à descarga elétrica. Por outro lado, os resultados sugerem que a introdução de RNA tumoral, mesmo sem tratamento prévio do tumor, é suficiente para aumentar a capacidade de apresentação de antígenos autólogos aos linfócitos T.

8. Conclusão.

Células dendríticas transfectadas com antígenos tumorais têm sido consideradas uma alternativa para a preparação de vacinas antitumorais. Esse estudo procurou verificar a eficiência da eletroporação de DCs com RNA proveniente de tumores pré-tratados a baixas doses de antineoplásicos, além da possível indução de alterações em suas atividades funcionais. A introdução do RNA diretamente no citoplasma das células faz com que a tradução seja ignorada e o gene alvo possa ser imediatamente transcrito em proteína. No entanto qualquer método de transfecção, incluindo a eletroporação, pode induzir efeitos adversos imprevistos às células transfectadas, incluindo à viabilidade, proliferação e funcionalidade [2]. A literatura aponta significância entre grupos eletroporados com tratamentos diferenciados, inclusive com resultados positivos tanto para o uso de células dendríticas maduras quanto imaturas [32].

Em nosso estudo, se tomarmos apenas os grupos eletroporados os dados sugerem que o tratamento prévio do tumor com DNT de 5-FU e PAC promove alteração da expressão gênica que favoreceu tanto a estimulação alogênica quanto a geração de linfócitos T citolíticos.

Os dados aqui apresentados precisam ser confirmados com maior número de experimentos, visto que dois dos três ensaios realizados não resultaram em número suficiente de DCs para testar todas as variáveis propostas. Assim, esses dados preliminares sugerem que o tratamento de células tumorais com concentrações não tóxicas de 5-FU ou PAC promove alteração de expressão gênica que favorece a indução de linfócitos T citolíticos, corroborando com dados previamente observados pelo grupo.

Os resultados obtidos nesse estudo mostram as dificuldades da metodologia escolhida para transfecção, uma vez que a viabilidade pós-eletroporação não ultrapassou os 30%. Além disso, a técnica se mostrou ineficaz para ampliação da capacidade de estimulação alogênica das

DCs, uma vez que não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de células dendríticas eletroporadas. Por outro lado, as células não eletroporadas mostraram-se estatisticamente melhores quanto a essa função. Evidentemente, os resultados de um único experimento não são suficientes para se chegar a uma conclusão, mas a voltagem baixa, a princípio escolhida para evitar dano celular, mas que revelou-se capaz de danificar a integridade celular e inapta à eficiência da transfecção.

Para que essa seja efetiva e apresente alterações funcionais mais satisfatórias devemos optar por novos métodos presentes hoje no mercado, como o uso de um reagente catiônico não-lipídico (Transmessenger Transfection Reagent; Quiagen®). Análises comparativas revelaram que a eletroporação resulta em altas porcentagens de células transfectadas e baixos níveis de expressão celular, enquanto o método Transmessenger® gera baixas porcentagens de células transfectadas e altos níveis de expressão celular. Para a apresentação de antígenos o segundo método demonstrou ser superior à eletroporação, mesmo que essa apresentação ocorra numa porcentagem menor de células [32, 33].

A Transfecção Magnética Assistida (MATra)® é uma outra alternativa que parece ser promissora. Ácidos nucleicos são primeiramente associados com partículas magnéticas. Explorando a força magnética, o fabricante alega que a dose completa de ácido nucleico é puxada e então liberada no interior da célula alvo, levando a uma eficiente transfecção.

Essas alternativas poderão ampliar a eficácia da transfecção, viabilizando o uso do RNA para sensibilização e produção de vacinas de células dendríticas, permitindo o surgimento de uma nova proposta terapêutica.

9. Referências Bibliográficas

1. INCA., I.N.d.C. 2009 [cited; Available from: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=325.
2. Zhao, Y., et al., High-Efficiency Transfection of Primary Human and Mouse T Lymphocytes Using RNA Electroporation. *Molecular Therapy*, 2005. **13**.
3. Health., N.C.I.U.N.I.o. *National Cancer Institute; US National Institutes of Health*. 2009 [cited 25/09/09]; Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancer-advances-in-focus/colorectal>.
4. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. *CA Cancer J Clin*, 2008. **58**(2): p. 71-96.
5. Su, L.K., et al., *Association between wild type and mutant APC gene products*. *Cancer Res*, 1993. **53**(12): p. 2728-31.
6. das Neves, F.J., I.E. Mattos, and R.J. Koifman, *[Colon and rectal cancer mortality in Brazilian capitals, 1980-1997]*. *Arq Gastroenterol*, 2005. **42**(1): p. 63-70.
7. Lock, K., et al., The global burden of disease attributable to low consumption of fruit and vegetables: implications for the global strategy on diet. . *Bull World Health Organ*, 2005. **83**.
8. Kune, G.A., S. Kune, and L.F. Watson, Colorectal cancer risk, chronic illnesses, operations and medications: case control results from the Melbourne Colorectal Cancer Study. 1988. *Int J Epidemiol*, 2007. **36**(5): p. 951-7.
9. Wolfe, M.M., D.R. Lichtenstein, and G. Singh, *Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(24): p. 1888-99.
10. Noordhuis, P., et al., 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Ann Oncol*, 2004. **15**(7): p. 1025-32.

11. Macdonald, J.S. and A.B. Astrow, *Adjuvant therapy of colon cancer*. Semin Oncol, 2001. **28**(1): p. 30-40.
12. Lammers, P.E. and A.F. Cashen, *Azacitidine: A review of its use in the management of myelodysplastic syndromes*. Clinical Medicine: Therapeutics, 2009: p. 1189-1197.
13. Javeed, A., et al., *Paclitaxel and immune system*. Eur J Pharm Sci, 2009. **38**(4): p. 283-90.
14. Nowak, A.K., et al., Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. J Immunol, 2003. **170**(10): p. 4905-13.
15. Hardman, J.G., et al., Pharmacology: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Vol. 9. 1996.
16. Shurin, G.V., et al., Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism. J Immunol, 2009. **183**(1): p. 137-44.
17. Kaneno, R.
18. Zbar, A.P., *The immunology of colorectal cancer*. Surg Oncol, 2004. **13**(2-3): p. 45-53.
19. Abbas, A.K. and A.H. Lichtman, *Imunologia Celular e Molecular*. 5 ed, ed. Elsevier. 2005.
20. Shurin, M.R. and G.S. Chatta, *Tumor Induced Immune Suppression*, ed. D.I. Gabrilovich and H. Andy. 2008: Springer.
21. Ferrantini, M., I. Capone, and F. Belardelli, *Dendritic cells and cytokines in immune rejection of cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(1): p. 93-107.

22. Berzofsky, J.A., et al., *Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections*. J Clin Invest, 2004. **114**(4): p. 450-62.
23. Boczkowski, D., et al., Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 465-72.
24. Nair, S.K., et al., Induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA. Int J Cancer, 1999. **82**(1): p. 121-4.
25. Saeboe-Larsen, S., E. Fossberg, and G. Gaudernack, mRNA-based electrotransfection of human dendritic cells and induction of cytotoxic T lymphocyte responses against the telomerase catalytic subunit (hTERT). J Immunol Methods, 2002. **259**(1-2): p. 191-203.
26. Van Tendeloo, V.F., et al., Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. Blood, 2001. **98**(1): p. 49-56.
27. Hosoi, A., et al., Dendritic cell vaccine with mRNA targeted to the proteasome by polyubiquitination. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **371**(2): p. 242-6.
28. Kaneno, R., et al., Chemomodulation of human dendritic cell function by antineoplastic agents in low noncytotoxic concentrations. J Transl Med, 2009. **7**: p. 58.
29. Sousa-Canavez, J.M., et al., Therapeutic dendritic cell vaccine preparation using tumor RNA transfection: A promising approach for the treatment of prostate cancer. Genet Vaccines Ther, 2008. **6**: p. 2.

30. Breckpot, K., et al., Attenuated expression of A20 markedly increases the efficacy of double-stranded RNA-activated dendritic cells as an anti-cancer vaccine. *J Immunol*, 2009. **182**(2): p. 860-70.
31. Govindarajan, B., et al., Tuberous sclerosis-associated neoplasms express activated p42/44 mitogen-activated protein (MAP) kinase, and inhibition of MAP kinase signaling results in decreased in vivo tumor growth. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(9): p. 3469-75.
32. A, M., et al., Electroporation of immature and mature dendritic cells: implications for dendritic cell-based vaccines. *Gene Therapy*, 2007.
33. Yu, H., L.A. Babiuk, and S. van Drunen Littel-van den Hurk, Immunity and protection by adoptive transfer of dendritic cells transfected with hepatitis C NS3/4A mRNA. *Vaccine*, 2007. **25**(10): p. 1701-11.