

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeito da concentração citostática de 5-Fluorouracil sobre a imunogenicidade de células de câncer de colorretal murino MC-38.

Aluna: Carolina Mendonça Gorgulho

Orientador: Professor Ramon Kaneno

Monografia entregue ao Instituto de Biociências de Botucatu, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Botucatu - SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Gorgulho, Carolina Mendonça.

Efeito da concentração citostática de 5-fluorouracil sobre a imunogenicidade de células de câncer colorretal murino MC-38 / Carolina Mendonça Gorgulho. – Botucatu :[s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Ramon Kaneno

Capes: 21102007

1. Intestino grosso – Câncer. 2. Quimioterapia.

Palavras-chave: Câncer colorretal; Células dendríticas; Imunologia de tumores; Quimioterapia.

Agradecimentos

Agradeço meus pais, Rafael e Marisa, e meu irmão Caio, por todo o apoio durante minha graduação em Botucatu. Sem eles não teria conseguido atingir meu objetivo de me formar em uma Universidade pública.

Quero também expressar a minha enorme gratidão à Marcela Rodrigues de Camargo, que é, para mim, uma brilhante professora, a quem devo muito do meu amadurecimento acadêmico. Uma profissional justa e determinada, que abraça a equipe e nos motiva, com quem eu desenvolvi não somente uma relação profissional de apoio e confiança, mas também uma amizade.

Agradeço minhas colegas de laboratório, Carolina de Almeida Araújo, Cecília Pessoa Rodrigues, Fabiana Albani Zambuzi, Victoria Elizabeth Galvão, Juliana Cristina Longo Frederico e Graziela Gorete Romagnoli, com quem tive a grande alegria de trabalhar e com quem passei muitas horas fazendo experimentos, trabalhando e estudando. Cada uma, com seu jeito, me fez ver a importância de certas atitudes frente ao trabalho em laboratório: comprometimento e persistência, a curiosidade e a vontade de fazer ciência, o estudo e dedicação, o questionamento, o empenho e a disciplina, o valor da experiência.

Gostaria também de lembrar dos professores do Departamento de Imunologia, que tive o prazer de conhecer durante a graduação e estágio, de toda a equipe técnica do Departamento de Microbiologia e Imunologia pelo trabalho realizado e da Dra. Marcimara Penitenti, da Fundação Amaral Carvalho de Jahú, pela disponibilidade em ajudar e pela colaboração em meu trabalho.

Ao Renan, um enorme obrigada por ter me acompanhado, por compartilhar comigo minhas frustrações e também minhas conquistas, por ser um amigo quando eu precisei de apoio, me desafiar e me fazer sair da minha zona de conforto.

Por fim, agradeço muito meus amigos Ligia Rocha, Luis Otavio Targa, Luiza de O. Silva, Bruno Kanno, Gabriel Cohen e muitos outros que conheci durante a graduação. Meus dias em Botucatu não seriam os mesmos sem vocês. Sou imensamente grata por termos cruzado nossos caminhos, por termos crescido e amadurecido juntos.

Agradeço minhas amigas de infância Ana Claudia Levy, Helena Char e Rafaela Cantarin. Nenhuma forma de homenagem a essas pessoas maravilhosas parece ser suficiente para expressar a minha alegria em tê-las por perto.

Finalmente, agradeço imensamente meu orientador, Professor Ramon Kaneno, quem me deu a oportunidade de descobrir minha alegria em fazer pesquisa, me ensinou a importância do estudo, da dedicação, do rigor. Quem me fez almejar coisas que eu nunca imaginaria. Muito obrigada pela confiança.

Sumário

1. Resumo

2. Introdução

3. Delineamento Experimental

4. Material e Métodos

4.1 - Cultura de células tumorais

4.2 - Modelo murino

4.3 - Geração de células dendríticas murinas

4.4 - Fenotipagem das células dendríticas

4.5 - Avaliação dos linfócitos T citotóxicos (CTL) gerados

4.5.1 - Ensaio de citotoxicidade

4.5.2 - Quantificação da produção de IFN- γ e IL-10

4.6 - Análise estatística

5. Análise de Resultados

5.1 - Análise de sobrevida e evolução tumoral

5.2 - Ensaio de Citotoxicidade

5.3 - Fenotipagem das células dendríticas

5.4 - Produção de IFN- γ

5.5 - Produção de IL-10

6. Discussão

7. Referências Bibliográficas

1 – Resumo

A quimioterapia é o tratamento padrão para pacientes com os mais variados tipos de câncer, (sendo o 5 Fluorouracil -5Fu- a droga de escolha no caso do câncer colorretal) mas ela está associada a efeitos colaterais que podem ser muito severos. A exposição de células tumorais a agentes antineoplásicos, em dose baixa e não citotóxica, pode torná-las mais imunogênicas, enquanto que a exposição de células dendríticas (DC) a esses agentes antineoplásicos pode aumentar sua capacidade de induzir resposta antitumoral *in vitro*. O objetivo deste estudo é verificar se o tratamento *in vitro* de células tumorais MC38 com 5-Fu (dose não citotóxica) pode induzir a expressão de moléculas que aumentem suas características imunogênicas, fazendo com que elas sejam mais facilmente identificadas pelo sistema imune. Para isso, camundongos da linhagem C57/Bl-6 foram inoculados subcutaneamente com células MC38 e sete dias depois foram vacinados com DC sensibilizadas com antígenos tumorais obtidos a partir da lise de células MC38 mantidas em cultura e previamente tratadas com 5-Fu, em dose não citotóxica (DC-5Fu), para que a performance das DC sensibilizadas pudesse ser comparada à performance das DC selvagens.

2 - Introdução

Considerado um problema de saúde mundial e responsável por milhões de mortes ao redor do mundo, o câncer é atualmente uma das maiores causas de mortalidade e o câncer colorretal (CCR) está entre os quatro tipos mais comuns da doença no Brasil [1] e no mundo pode chegar ao terceiro lugar [2]. O Instituto Nacional de Câncer estimou que o número de novos casos de CCR no Brasil chegará a 30 mil no ano de 2012, entre homens e mulheres[1].

As possíveis causas da origem das neoplasias são inúmeras e algumas delas ainda desconhecidas. Porém, muito já se sabe a respeito das características presentes nas células tumorais que as tornam tão bem sucedidas no organismo humano, dentre elas, sua capacidade de crescimento independente de estímulos exógenos e seu potencial para disseminação metastática [3]. Hanahan e Weinberg descreveram seis atributos biológicos associados a esses fenômenos: a) sinalização contínua de promotores da proliferação; b) evasão de sinais inibitórios do crescimento; c) resistência à apoptose; d) potencial ilimitado de divisão e crescimento; e) angiogênese e f) capacidade de infiltração e metástase [3]. Além disso, é possível apontar também a capacidade de evasão do sistema imune [4] como um fator fundamental para o estabelecimento de um tumor.

No caso do CCR, a predisposição genética está presente em pouco mais de 25% dos casos (25 – 30%) [5], classificados como câncer colorretal hereditário. Entretanto, a grande maioria dos casos de CCR são classificados como esporádicos, indicando que além da carga genética, outros fatores de risco devem contar para o desenvolvimento do CCR, como idade avançada, ocorrência de doenças inflamatórias crônicas do intestino, alimentação rica em proteína animal e pobre em fibras, estilo de vida sedentário, etilismo e tabagismo [1].

O tratamento padrão para o CCR consiste na remoção cirúrgica do tumor e radioterapia, associada ou não à quimioterapia [1]. Bosset et al demonstraram que a quimioterapia pré-operatória reduz o risco de progressão da doença em pacientes submetidos à radioterapia [6]. O quimioterápico de escolha para o tratamento do CCR é

o 5-fluorouracil (5-FU), sendo que sua primeira utilização em ensaios clínicos foi publicada em 1957, no trabalho de Heidelberger et al [7].

Nas últimas duas décadas, o leque de possibilidades para o tratamento do CCR se expandiu muito; porém, as opções atuais de tratamento não são exatamente ideais [8]. O regime de quimioterapia tradicional, baseado na administração de drogas citotóxicas em doses máximas toleráveis (ou seja, a maior dose possível, cujos efeitos colaterais não sejam incompatíveis com a vida) apresenta taxas satisfatórias de estabilização da doença e cura de pacientes [9]. Entretanto, tal regime se apresenta de forma controversa quando confrontamos a eficácia da atividade antitumoral dos quimioterápicos com seus efeitos colaterais, como a toxicidade observada em vários sistemas do paciente [10]. Assim, os sintomas provocados pela adoção da quimioterapia em regime convencional incluem perda de peso e apetite, náuseas, fraqueza, perda de cabelo e diarreia devido a lesões no trato gastrintestinal, sendo este último sintoma característico da infusão em longo prazo de 5-FU [1] [11].

Um aspecto importante das drogas citotóxicas administradas em doses máximas toleráveis é que elas podem causar imunossupressão, pois atuam sobre células em rápida proliferação, sem discriminar células tumorais das células saudáveis [12], afetando a produção de leucócitos e prejudicando drasticamente a imunocompetência do paciente. Desse modo, os pacientes sob o tratamento em regime de dose máxima tolerável precisam de longos intervalos (cerca de 3 semanas) entre a aplicação do agente antineoplásico para se recuperarem dos efeitos adversos ocasionados pelo tratamento. Tais intervalos, entretanto, podem ser também aproveitados pelas células tumorais para seu crescimento, favorecendo o aparecimento de variantes resistentes ao tratamento.

Nesse contexto, começou a ser proposto um novo regime de tratamento quimioterápico, denominado quimioterapia metronômica, cujo nome faz referência à administração contínua de baixas doses de quimioterápicos, sem a necessidade de longos períodos de pausa entre um ciclo e outro, evitando a recidiva de células tumorais resistentes ao tratamento [10]. O alvo principal deste regime de tratamento seriam as células endoteliais que compõem a parede dos vasos sanguíneos presentes no tumor,

impedindo a angiogênese [13] e conseqüentemente, prejudicando o crescimento do tumor.

A ciclofosfamida, um quimioterápico tradicional utilizado no tratamento de inúmeros tipos de tumores, quando usada em doses baixas e contínuas, tem ação altamente imunomodulatória, através da indução da produção de IFN- γ e **consequente** polarização da maturação de células T auxiliares (Th) para um fenótipo antitumoral Th1. Observa-se estimulação de linfócitos T citotóxicos (CTL) tumor-específicos, além da modulação positiva de células dendríticas (DCs) e depleção da população de células T regulatórias [14]. Desse modo, grande parte da ação do quimioterápico em regime metronômico não se baseia na indução de toxicidade em células tumorais, mas sim na restauração e modulação positiva dos mecanismos imunológicos antitumorais que são drasticamente prejudicados durante a progressão do câncer. A baixa toxicidade e o sucesso na estimulação da imunidade antitumoral abrem campo para a utilização desta estratégia em conjunto com outras formas de terapia, principalmente abordagens imunoterapêuticas, buscando ações sinérgicas entre os dois tratamentos.

Tanto a resposta imune humoral quanto a celular contribuem para a eliminação de células tumorais. Porém, na maioria dos casos a regressão do tumor está relacionada à resposta celular [15]. Células do sistema imune como as apresentadoras de antígenos (APCs), as Th e as CTL apresentam, dentro da imunidade antitumoral, interações importantíssimas e é nestas interações que se baseia a imunoterapia [16].

O processo de indução à imunidade antitumoral pode ser descrito em três eventos: a) apresentação de antígenos tumor-associados; b) seleção e ativação de células T específicas, bem como de efetores não-específicos e c) estabelecimento das células T específicas na região do tumor, levando à eliminação de células tumorais [17].

Células tumorais podem expressar antígenos em sua superfície e as APCs processam, externalizam e os disponibilizam para reconhecimento por parte das células T, iniciando uma resposta celular adaptativa. Entre as APCs profissionais, as DCs possuem várias características que as tornam as apresentadoras mais eficientes para o desencadeamento de uma resposta imune protetora.

As DCs foram descritas pela primeira vez como células de Langerhans, residentes da pele, em 1868 [18] e pouco se sabia sobre suas funções e sua importância na imunidade. Quando localizadas nos tecidos como pele e órgãos linfoides, elas apresentam uma morfologia muito característica, que é a presença de prolongamentos ou processos citoplasmáticos, os quais lhes conferem um formato estrelado [18]. Hoje, sabe-se que elas são um conjunto extremamente complexo de células mielo-derivadas CD34⁺[19], que podem ser encontradas em todos os tecidos do organismo, onde exercem seu papel de sentinelas do ambiente, apresentando os diversos antígenos capturados para células da imunidade adaptativa [20] fazendo, então, o link entre a imunidade inata e a adaptativa [21]. Em investigações iniciais sobre a função das DCs acreditava-se que elas eram exclusivamente imunogênicas, mas com o aprimoramento do conhecimento sobre estas células, concluiu-se que elas possuem um papel ambíguo, estimulando tanto a iniciação de uma resposta imune quanto sua regulação, assumindo um caráter tolerogênico [19]. Michielsen et al (2012) [22] demonstraram que no câncer, especificamente, as DCs infiltrantes no sítio tumoral parecem ter sua ação imunogênica extremamente prejudicada, através da inibição de seu desenvolvimento ou de suas funções normais, por fatores secretados no microambiente tumoral, como a interleucina 10 (IL-10). O mesmo grupo observou que DCs tratadas com meio de cultura proveniente de uma cultura de 72 horas de células tumorais apresentaram diminuição da expressão de marcadores de superfície característicos do processo de maturação, além de apresentarem uma produção diminuída de IL-12 quando sensibilizadas com lipolissacarídeo [22].

Para as células T (CD8⁺ e CD4⁺), é primordial o contato com uma APC para que se tornem linfócitos efetores antígeno-específicos e iniciarem uma resposta adequada [20]. No geral, dependendo da condição de captura destes antígenos, as APCs irão interagir com subpopulações diferentes de células T, utilizando moléculas específicas, as moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC). Quando um antígeno é capturado do ambiente extracelular, ele entra na APC através da via endocítica, para ser processado e apresentado na forma de complexo peptídeo-MHC de classe II na superfície da APC, e

assim estará disponível para reconhecimento por parte das células T CD4⁺ ou Th [18]. No caso de infecções virais e células transformadas, onde a fonte do antígeno é intracelular, ele será processado e apresentado na superfície da célula em conjunto com o MHC de classe I, para reconhecimento pelas células T CD8⁺ [23], que se tornarão linfócitos T citotóxicos (CTL). Neste contexto, as DCs possuem uma ferramenta exclusiva que lhes confere alta eficiência na apresentação de antígenos, a ***cross-presentation***. Com ela, DCs são capazes de apresentar antígenos extracelulares em sua superfície através do MHC de classe I, interagindo com os linfócitos T CD8⁺ e promovendo sua ação citotóxica [23]. Além disso as DCs conseguem, em pequeno número, primar uma grande quantidade de linfócitos T, exigindo baixa concentração de antígenos para fazê-lo [18].

As DCs podem ser divididas em duas categorias de acordo com o grau de desenvolvimento: imaturas e maduras [19]. Quando imaturas, as DCs são eficientes captadoras e processadoras de antígenos e são encontradas preferencialmente nos tecidos periféricos [19] mas não possuem sinais co-estimulatórios como os marcadores de superfície CD40, CD54 e CD86, necessários para a interação com linfócitos e a geração de CTL antígeno-específicos [18]. A interação com um antígeno tem a capacidade de ativar uma DC imatura, provocando mudanças fenotípicas como o aumento da expressão das moléculas co-estimulatórias citadas acima, aumento da expressão de MHC de classe II [20] e aquisição da molécula CCR7 [24], que confere à DC a capacidade de migração para órgãos linfóides [19], onde elas irão interagir com diversas células do sistema imune, como linfócitos T, e orquestrar o início de uma resposta tanto antígeno-específica por parte dos CTL como também direcionar o desenvolvimento de células Th para um fenótipo Th1 [19].

Finalmente, através de sua refinada maquinaria de apresentação de antígenos, as DCs são as células-chaves na iniciação da resposta imune, uma vez que parecem ser imprescindíveis na estimulação de linfócitos T ***naive***, além de agir sobre sua modulação. Existem, no microambiente tumoral, CTL tumor-específicos, mas há poucas evidências de que estas células estejam sendo ativadas; entretanto, a ação destes linfócitos parece ser acentuada quando as DCs são expostas a antígenos tumorais ***ex vivo*** e com sua posterior

administração na forma de vacina [18]. A estimulação da comunicação entre as DCs e as células T tem o potencial de aumentar a resposta antitumoral [25]; assim, a utilização de vacinas de DCs se mostra uma abordagem promissora no tratamento do câncer. Entretanto, a estratégia de sensibilização das DCs e a natureza dos antígenos utilizados para tal, são provavelmente os parâmetros mais importantes a serem analisados [17].

Existem muitos métodos de sensibilização das DCs para produção de vacinas, como a utilização de peptídeos, células tumorais em apoptose, RNA tumoral [17], entre outros. Dentre as metodologias existentes, o uso de lisato de células tumorais tem sido constantemente descrito, configurando-se como uma das estratégias mais comuns de sensibilização de DCs [26]. Li et al. já documentaram que a vacinação com DCs mielo-derivadas sensibilizadas com lisato de células tumorais induziu resposta específica **ex vivo**, por parte das CTL, em uma linhagem de células de tumor gástrico murino [27]. Também foi demonstrado que a vacinação com DCs sensibilizadas com lisato de células tumorais induziu resposta específica de CTL no caso da linhagem CT26 de câncer de cólon murino [16]. De fato, a utilização de lisato de células tumorais como ferramenta para sensibilizar DCs apresenta muito potencial, pois mimetiza processos fisiológicos através dos quais um tumor induz resposta imune **in vivo** [16], específica para cada indivíduo e tipo tumoral.

Visto que a quimioterapia é uma constante para a grande maioria dos pacientes, sua interação com a imunoterapia tem sido amplamente investigada. Em particular, os efeitos imunomodulatórios associados ao uso da quimioterapia de baixa dose também tem requerido o estudo de sua interação com a imunoterapia. Assim, na tentativa de maximizar os benefícios do quimioterápico, minimizar seus efeitos adversos e aprimorar a resposta antitumoral do paciente, diversas vacinas imunoterapêuticas de DCs têm sido propostas e administradas em conjunto com a quimioterapia em baixas doses. De fato, muitos grupos já demonstraram a vantagem do tratamento aliando estes dois elementos, em contraste com a monoterapia. He et al (2011) demonstraram que a associação entre uma vacina de células tumorais de próstata murina modificadas em sua superfície para expressarem GM-CSF e baixas doses de paclitaxel gerou melhor resposta de sobrevida e

de infiltração de CTL no sítio tumoral quando comparado à administração de GM-CSF sozinho [21].

Apesar dos bons resultados obtidos pela terapia metronômica em pacientes que não toleram a terapia convencional, o uso prolongado das drogas antineoplásicas, mesmo em baixa concentração, pode determinar quadro de imunossupressão [9], fazendo-se necessário estabelecer um regime de tratamento que garantisse a integridade da imunocompetência do paciente e que fosse capaz de modular positivamente o funcionamento do sistema imune. Por essa razão, a capacidade dos quimioterápicos de modular o funcionamento do sistema imune tornou-se um atributo com alto potencial terapêutico e deve ser investigado mais profundamente.

Kaneno et al. (2011) demonstraram que o tratamento *in vitro* de células de tumor de cólon humano com uma concentração não citotóxica de agentes antineoplásicos aumentou a expressão de genes ligados à imunogenicidade tumoral, como aqueles relacionados às proteínas de choque térmico ou a antígenos tumor-associados e aumentou a expressão de componentes da maquinaria de apresentação de antígenos ligada ao MHC de classe I; além disso, quando DCs humanas foram pulsadas *in vitro* com lisato de células tumorais tratadas com a dose não citotóxica dos quimioterápicos, foram capazes de induzir mais eficientemente a geração de CTL tumor-específicas [28]. Finalmente, foi observado também que o tratamento de DCs, segundo o mesmo regime de quimioterápicos, aumentou a expressão de marcadores de superfície como CD-83 e CD-40, sugerindo um aumento do estímulo à maturação e à interação com células T [9].

Tanto a modulação positiva das DCs quanto o aumento da imunogenicidade das células tumorais sugerem que tal regime de tratamento pode ser muito útil na restauração da função das DCs *in vivo* em pacientes imunocomprometidos ou na incorporação da técnica à elaboração de vacinas de DCs mais eficazes. Entretanto, é necessário verificar se tal fenômeno ocorre *in vivo*, para que o protocolo adotado apresente potencial de uso terapêutico.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi verificar se o tratamento *in vitro* de células de tumor colorretal murino MC38 com 5-Fu, em dose não citotóxica, favorece as DCs no estabelecimento de uma resposta antitumoral em animais portadores de tumor.

3 - Delineamento experimental

Camundongos C57/Bl-6 foram subcutaneamente implantados com cerca de 5×10^5 células MC-38. Dez dias após a implantação do tumor, os animais foram tratados com vacinas de DCs sensibilizadas com antígeno solúvel proveniente do lisato de células tumorais pré-tratadas com doses não tóxicas de 5-FU (inoculação peritumoral). A aplicação da vacina foi repetida pelo menos 2 vezes em intervalos de 15 dias. Os animais foram acompanhados para avaliação clínica e evolução do crescimento tumoral através da medida do diâmetro até o 30º dia pós-implantação.

4 - Material e métodos

4.1 - Cultura de células tumorais e preparação do antígeno tumoral (lisato)

Células de câncer de cólon murino MC-38 foram mantidas em cultura em meio apropriado a 37º C, sob tensão de 5% de CO₂. As células foram tratadas com 5-fluorouracil (5-FU) em dose não tóxica (DNT – 0,05 µM) por 48 horas. Após esse período, as células foram recolhidas por descolamento com solução de tripsina, e congeladas a -80 °C. As células foram lisadas por descongelamento rápido em banho-maria a 37 °C, seguido de congelamento rápido em nitrogênio líquido. O procedimento foi repetido 5 vezes e as células foram centrifugadas a 13000 rpm por 15 minutos. O lisato, sobrenadante resultante da centrifugação, foi recolhido e congelado. Também foram preparados lisatos de células não tratadas com a droga. O volume de lisato foi quantificado quanto ao teor proteico utilizando solução de BSA como padrão. O lisato foi usado para sensibilização das DCs, por 24 horas, utilizando 100 microgramas de proteína para 1×10^6 DCs, o que corresponde à proporção de 5 células tumorais para 1 DC.

4.2 - Modelo murino

Camundongos C57BL/6 foram inoculados s.c. com 5×10^5 células MC-38, derivadas de tumor de cólon murino. O crescimento tumoral foi acompanhado pela medida de seu diâmetro no 7º, 14º, 24º e 30º dias. Os animais foram inoculados na região peritumoral com as vacinas de DC sensibilizadas com lisato de células tumorais pré-tratadas com 5-FU, 10 dias após a implantação das células tumorais, com repetição do tratamento após 7 e 14 dias. Os animais tratados e respectivos controles foram sacrificados 30 dias pós-implantação.

4.3 - Geração de vacinas de células dendríticas murinas

Células dendríticas murinas foram geradas a partir de precursoras isoladas da medula óssea dos fêmures e tíbias de um camundongo normal. Após lavagem e lise de hemácias presentes na suspensão, linfócitos T e B foram depletados pelo uso de anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e anti-B220 e complemento. A suspensão celular foi então cultivada em placas de 6 alvéolos por 18 horas, a 37º C, sob tensão de 5% de CO₂. Após esse período, as placas foram lavadas para recuperação das células não-aderentes, que foram cultivadas em placas de 6 alvéolos na presença de 40 ng/ml de IL-4 e GM-CSF por 6 dias. As DC imaturas foram cultivadas com antígenos tumorais solúveis de células tumorais (MC-38) pré-tratadas com 5-FU, em dose não tóxica.

4.4 - Fenotipagem das DCs

DCs obtidas no 6º dia de cultura (DCs imaturas) foram avaliadas por citometria de fluxo quanto à expressão dos marcadores de ativação e maturação. Assim, as suspensões celulares foram lavadas, ressuspensas em PBS e distribuídas em tubos de polipropileno para citometria (BD). A marcação e análise por citometria foi realizada como previamente descrito por Tourkova et al [29]. Anticorpos monoclonais para os marcadores de MHC-II, CD86, CD40 e CD11c conjugados com FITC ou PE foram adicionados à suspensão de DC e incubados por 30 min a 4°C. FITC-IgG e PE-IgG murinos foram usados como controles isotípicos. Os dados foram analisados pelo Cell

Quest e WinMDI e os resultados expressos em intensidade de fluorescência média (MFI) e porcentagem de células marcadas (%).

4.5 – Avaliação dos linfócitos T citotóxicos (CTL) gerados

4.5.1 – Ensaio de Citotoxicidade

O ensaio foi realizado tomando-se como células efectoras esplenócitos obtidos dos animais portadores de tumor, submetidos ao tratamento com a vacina de DC. A atividade citotóxica da suspensão de CTLs gerados *in vivo* foi determinada através de ensaio de MTT. Brevemente, 100 microlitros de células tumorais (1×10^5 /ml), foram distribuídas em placas de 96 alvéolos de fundo plano e incubadas por 24 h. O mesmo volume de células efectoras foi adicionado aos alvéolos (em triplicatas), nas proporções efectora:alvo de 50:1 a 6:1. Os controles de lise máxima e espontânea foram preparados com células-alvo incubadas com meio completo ou 10 microlitros de tampão de lise, respectivamente. Após 4 horas de incubação em estufa de CO₂, os alvéolos foram lavados 3 vezes com 100 microlitros de meio completo para remoção dos linfócitos e fragmentos de células lisadas, seguido da adição de 100 microlitros de solução de MTT a (1 mg/ml, Sigma) e incubação por 90 minutos adicionais. Ao final desse período, a placa foi centrifugada e o sobrenadante aspirado com uma pipeta multicanais. Cem microlitros de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada alvéolo e gentilmente homogeneizadas para dissolução dos cristais. Após 5 min à temperatura ambiente, a placa foi lida em um leitor de ELISA usando o comprimento de onda de 540nm.

4.6.2 – Quantificação da produção de IFN- γ e IL-10

Para verificar a capacidade de produção de citocinas *in vitro*, foi feita uma co-cultura de linfócitos T dos animais tratados e MC-38. Após 24 horas, o sobrenadante foi recolhido e congelado para posterior análise. A quantificação de IFN- γ e IL-10 foi realizada com o kit ELISA MAXTM Deluxe Set da empresa BioLegend, conforme instruções do fabricante.

4.7 - Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada pela aplicação da análise de variância (ANOVA), seguida de análise de grupos múltiplos pelo teste de Tukey. Para os grupos de resultados que não passaram pelo teste de normalidade, foi aplicado teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. As diferenças entre os tratamentos foram consideradas significantes quando a probabilidade de erro foi menor que 5% ($p < 0.05$).

5 – Análise de Resultados

5.1 – Sobrevida e evolução tumoral

Os camundongos foram divididos em 4 grupos: DC-5Fu; DC-WT; DC e PBS. O grupo DC-5Fu recebeu vacina de DCs sensibilizadas com lisato de células MC-38 pré-tratadas com 5-Fu; o grupo DC-WT recebeu DCs sensibilizadas com lisato não tratados com a droga; o grupo DC recebeu DCs não sensibilizadas com lisato e o grupo PBS recebeu somente solução salina. A medição dos tumores foi feita nos dias de vacinação e no dia do sacrifício, utilizando a fórmula: $(d1+d2/2)^2 \times \Pi$, onde d1 e d2 são medidas de diâmetros opostos e $\Pi = 3,14$. A evolução da área tumoral calculado nas diferentes medições está apresentada na Figura 1.

Observa-se que o tratamento com a vacina DC-5Fu retardou a evolução do tumor nos animais, quando comparado ao controle, desde a primeira aplicação. Observa-se também que a vacina DC-WT teve efeito protetor menor que DC-5Fu, indicando que o pré-tratamento das células tumorais com o antineoplásico favorecem a eficácia da vacina. Para nossa surpresa, os animais tratados com DC não sensibilizadas, tiveram redução de 100% da massa tumoral ao 30º dia.

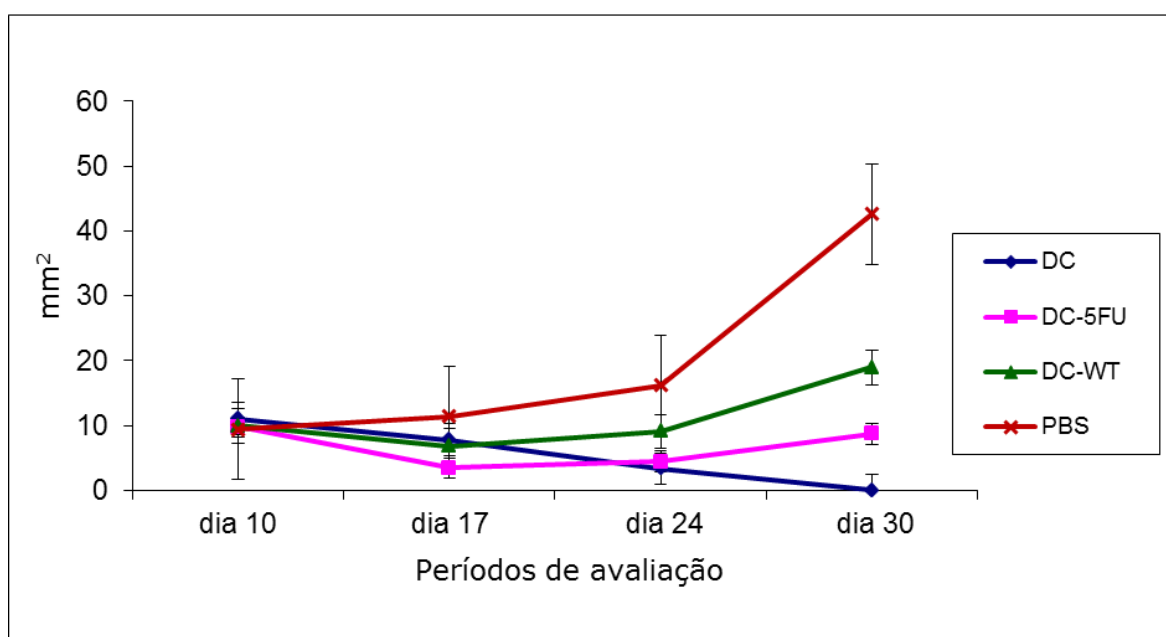


Figura 1: Evolução do volume tumoral subcutaneamente implantado em animais

C57Bl/6, durante os 30 dias de tratamento com vacinas DC. Dados representativos de 3 experimentos independentes (n=4).

5.2 – Fenotipagem das células dendríticas

Em vista dos resultados obtidos, avaliamos o perfil fenotípico das DCs submetidas aos diferentes tratamentos (6º dia de cultura). A análise dos marcadores CD11c, CD40, CD86 e MHC-II, mostra que os tratamentos não induziram diferença relevante na expressão desses marcadores. Chamou-nos a atenção, o fato de que mesmo as células não sensibilizadas expressaram níveis elevados dos marcadores de ativação/maturação CD40, e CD80, como pode ser observado na Figura 2.

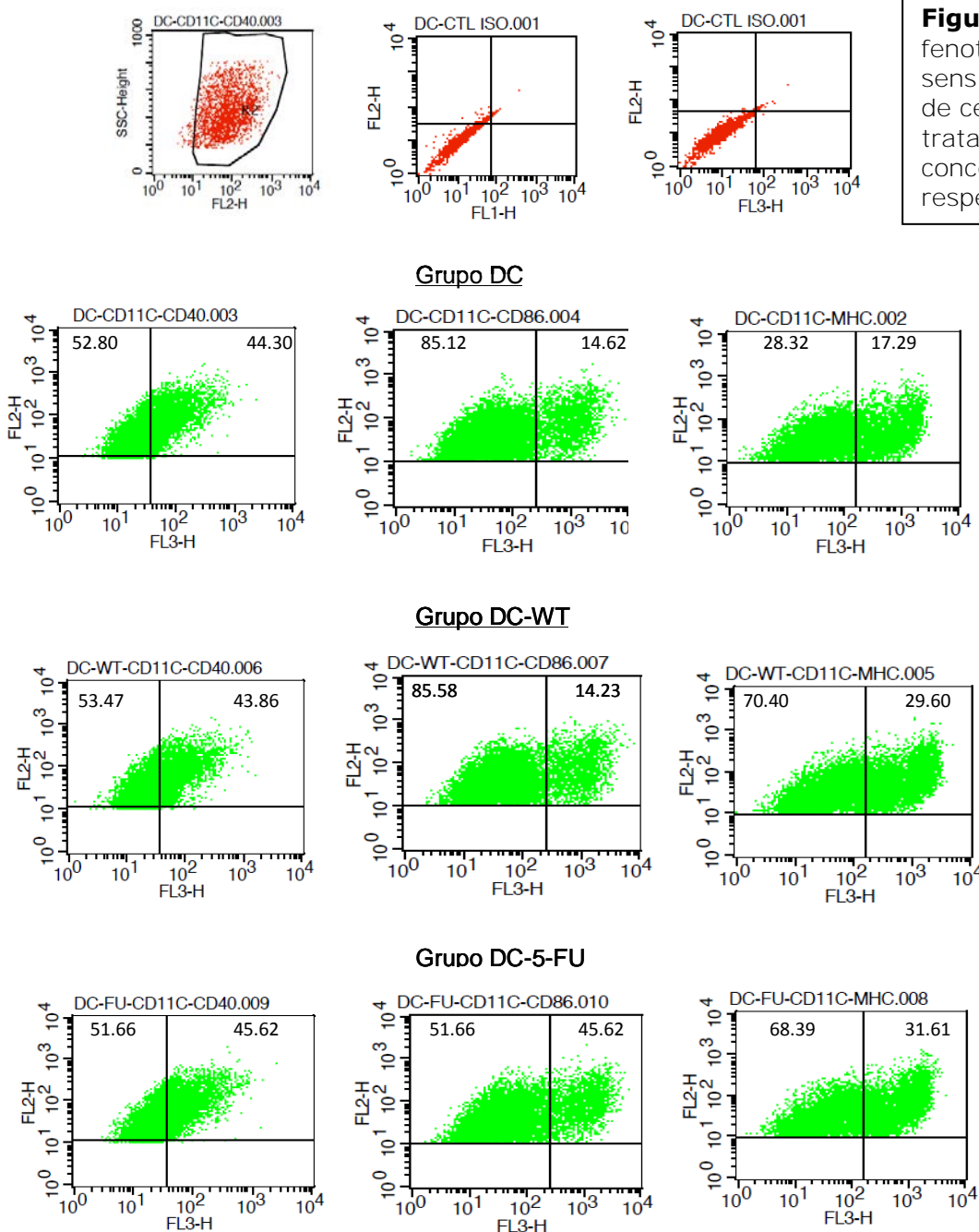


Figura 2 – Análise fenotípica de DCs sensibilizadas com lisatos de células tumorais pré-tratadas com baixa concentração de 5-FU e respectivos controles.

5.3 – Ensaio de Citotoxicidade

Para avaliar o desenvolvimento de células citotóxicas específicas, esplenócitos dos animais portadores de tumor foram adicionados a uma monocamada de células MC-38, cultivadas em placa de 96 alvéolos. Os resultados ilustrados na Figura 3 indicam que os esplenócitos do grupo tratado com a vacina DC-WT tinham capacidade lítica aumentada nas duas primeiras proporções, mas esta tendência não se manteve nas demais. Não houve diferença entre os grupos tratados com a vacina DC, DC-5FU e o controle.

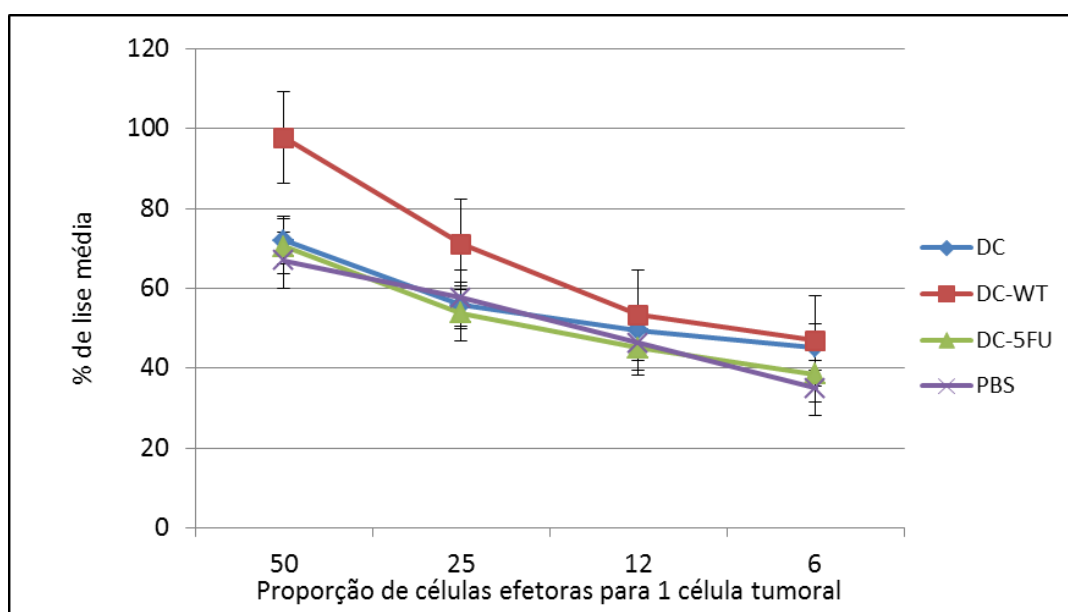


Figura 3: Atividade citotóxica de esplenócitos de animais portadores de tumor sobre células tumorais MC-38. Análise realizada por ensaio de metabolização do MTT, aos 30 dias de implantação tumoral. N=4.

5.4 – Efeito das vacinas sobre a produção in vitro de IFN- γ e IL-10 por esplenócitos desafiados com células tumorais.

O passo seguinte foi avaliar a capacidade de produção de IFN- γ e IL-10, por parte dos esplenócitos dos animais estudados. Como pode-se observar na Figura 4A, o tratamento com a vacina DC-5FU induziu a produção de níveis mais elevados de IFN- γ que os demais grupos. Em relação à produção de IL-10, embora o grupo DC-5FU tenha

produzido níveis ligeiramente mais elevados que os demais, a diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 4B).

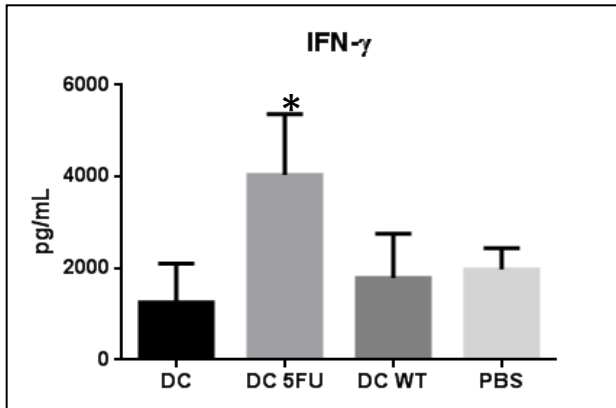


Figura 4a

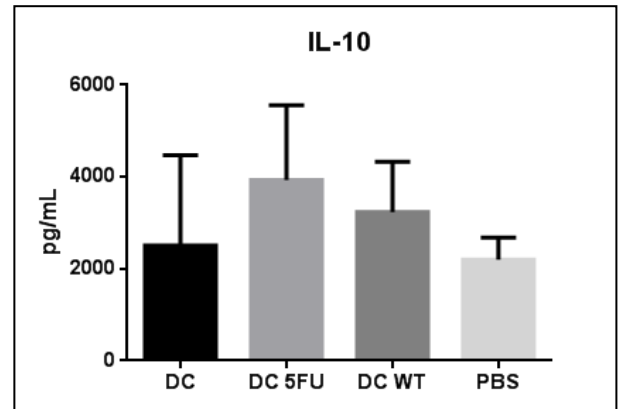


Figura 4b

Figura 4: Produção in vitro de citocinas pelos esplenócitos de animais portadores de tumor tratados com as diferentes vacinas. Análise realizada no sobrenadante de cultura de esplenócitos desafiados com células tumorais. A) quantificação de IFN-g; B) quantificação de IL-10. * $p < 0,05$ em comparação com os demais grupos. Dados representativos de 3 ensaios independentes. N=4.

6 – Discussão

O câncer vem se tornando um problema de saúde pública cada vez mais grave. As estratégias de tratamento disponíveis atualmente estão longe de ser ideais. O regime de quimioterapia tradicional é um tratamento bem estabelecido e apresenta resultados satisfatórios de regressão tumoral, porém os efeitos colaterais do uso dos quimioterápicos em doses máximas toleráveis podem ser extremamente graves prejudicando a qualidade de vida dos pacientes e diminuindo a eficácia do tratamento. Sendo assim, estudos que busquem estratégias inovadoras para o tratamento do câncer são extremamente importantes para o aperfeiçoamento do cuidado ao paciente.

Observamos previamente que os agentes antimicrotúbulos vincristina, vinblastina e paclitaxel (PAC) ou os antimetabólitos 5-aza-2-deoxicitidina e metotrexato induziram aumento na expressão de moléculas CD83 e CD40. A expressão da molécula co-estimulatória CD80 foi reforçada pelo tratamento com vinblastina, paclitaxel, azacitidina, metotrexato e mitomicina C. Além disso, a azacitidina, o metotrexato e a mitomicina C aumentaram a habilidade das DCs em estimular a proliferação de linfócitos T alogênicos [9]. Além disso, a incubação de linfócitos T com DCs sensibilizadas com células tumorais pré-tratadas com paclitaxel resulta na geração de CTL com maior atividade citotóxica específica que o grupo controle e que o pré-tratamento tornou as células tumorais mais sensíveis à ação das CTL [28].

Assim, considerando que o 5-FU é o agente antineoplásico de escolha para o tratamento de pacientes com câncer colorretal, no presente trabalho procuramos verificar se o tratamento *in vitro* de células neoplásicas murinas MC-38 com essa droga aumenta sua imunogenicidade e se a utilização de lisatos destas células favoreceria a atividade antitumoral das DCs em animais portadores de tumor.

A vacina DC-5Fu promoveu regressão tumoral de aproximadamente 80%, quando comparada ao controle. Além disso, os esplenócitos dos animais portadores de tumor tratados com esta vacina produziram maior quantidade de IFN- γ **quando desafiados com** células MC-38 *in vitro*. Tais resultados indicam que, de fato, o tratamento das células

tumorais com baixas concentrações de 5-Fu parece aumentar sua imunogenicidade e favorecer o estabelecimento *in vivo* de uma resposta antitumoral mais eficiente.

Observamos que as DC, por si só, foram suficientes para retardar o crescimento tumoral, sem necessidade de sensibilização prévia com antígenos tumorais. Este achado não causa surpresa, visto que outros autores já relataram achado semelhante em alguns grupos experimentais. Imaginamos inicialmente que as DC administradas nesses animais sofressem maturação *in vivo*, capturando e processando antígenos tumorais relevantes, propiciando um ambiente de resposta imune que se sobrepusesse ao estado de imunossupressão estabelecido pelas células tumorais. Entretanto, a fenotipagem dessas células indica que mesmo aos 6 dias de cultura e sem a inclusão dos lisatos tumorais, as DC mostraram níveis de expressão de CD 40, CD80 e MHC II similares às células sensibilizadas. Os esplenócitos dos animais deste grupo apresentaram capacidade lítica semelhante ou levemente maior do que os de animais tratados com as DCs sensibilizadas, observação compatível com a proteção alcançada.

A eficiência da sensibilização de DCs com lisatos totais de células tumorais não é uma unanimidade. De fato, alguns autores observaram que os lisatos podem ter um papel inibidor da ação de DCs, especialmente quando a carga antigênica é muito elevada, determinando um estado de supressão do papel apresentador. Nesse sentido, Jackson et al (2008) [30] observaram, em DCs humanas e murinas em desenvolvimento, que o tratamento das DCs com lisato de células de melanoma reduziu a ativação da via p38 MAPK (Proteína kinase ativada por mitógeno). Tal via é ligada à regulação positiva da maturação das DCs e da produção de IL-12, com consequente melhora da resposta Th1. Por outro lado, essa via aumenta a função de p44/42, proteínas ligadas à regulação positiva da produção de IL-10 [30], que induz a queda na expressão dos marcadores CD40, CD80 e CD86 (marcadores de ativação e maturação), queda da secreção de IL-12 e aumento da produção de IL-10 [30].

Nossos resultados são compatíveis também com outros estudos recentes do grupo que têm mostrado que DCs transfectadas com RNA de células pré-tratadas com 5-FU ou PAC retardam o crescimento tumoral *in vivo*, nesse caso, concomitantemente com

aumento da expressão de CD40, 86 e MHC II nas células do grupo 5-FU (dados não publicados). Essa concordância também se aplica à observação de que a administração combinada de baixas concentrações de 5-FU e vacinas DC sensibilizadas com lisato tumoral leva à regressão tumoral completa em 75% dos animais (dados não publicados).

Assim, ainda que a caracterização *in vitro* da resposta imune induzida pelas vacinas DC não tenham sido elucidativas, nossos resultados indicam que os fenômenos observados *in vitro* em trabalhos prévios, podem estar atuando *in vivo*, favorecendo o uso de quimioterápicos em baixas doses para a modulação da resposta imune.

7 – Referências Bibliográficas

- [1] Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; Ministério da Saúde; Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil 2011 [cited; Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=1>
- [2] International Agency for Research on Cancer; GLOBOCAN 2008. 2008 [cited; Available from: <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>
- [3] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
- [4] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- [5] Tarraga-Lopez PJ. Should we prevent colorectal cancer? *Rev Esp Enferm Dig*. 2011 Oct;103(10):503-7.
- [6] Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med*. 2006 Sep 14;355(11):1114-23.
- [7] Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, et al. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*. 1957 Mar 30;179(4561):663-6.
- [8] Braun MS, Seymour MT. Balancing the efficacy and toxicity of chemotherapy in colorectal cancer. *Ther Adv Med Oncol*. 2011 Jan;3(1):43-52.
- [9] Kaneno R, Shurin GV, Tourkova IL, Shurin MR. Chemomodulation of human dendritic cell function by antineoplastic agents in low noncytotoxic concentrations. *J Transl Med*. 2009;7:58.
- [10] Scharovsky OG, Mainetti LE, Rozados VR. Metronomic chemotherapy: changing the paradigm that more is better. *Curr Oncol*. 2009 Mar;16(2):7-15.
- [11] Hardman GEL, L.E. Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics: Vol. 9. 1996.

- [12] Lui WMF, D.W.; Smith, P.; Dalglish, A.G. . Pre-treatment with chemotherapy can enhance the antigenicity and immunogenicity of tumours by promoting adaptive immune responses. *Br J Cancer*. 2010.
- [13] Pasquier E, Kavallaris M, Andre N. Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Aug; 7(8): 455-65.
- [14] Sistigu A, Viaud S, Chaput N, Bracci L, Proietti E, Zitvogel L. Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. *Semin Immunopathol*. 2011 Jul; 33(4):369-83.
- [15] Zeh HJ, Stavelly-O'Carroll K, Choti MA. Vaccines for colorectal cancer. *Trends Mol Med*. 2001 Jul; 7(7): 307-13.
- [16] Wu YG, Wu GZ, Wang L, Zhang YY, Li Z, Li DC. Tumor cell lysate-pulsed dendritic cells induce a T cell response against colon cancer in vitro and in vivo. *Med Oncol*. 2010 Sep; 27(3): 736-42.
- [17] Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Fay J, Palucka K. Dendritic cell based tumor vaccines. *Immunology letters*. 2000 Sep 15; 74(1):5-10.
- [18] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19; 392(6673): 245-52.
- [19] Fricke I, Gabrilovich DI. Dendritic cells and tumor microenvironment: a dangerous liaison. *Immunol Invest*. 2006; 35(3-4): 459-83.
- [20] Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer*. 2012 Apr; 12(4):265-77.
- [21] He Q, Li J, Yin W, Song Z, Zhang Z, Yi T, et al. Low-dose paclitaxel enhances the anti-tumor efficacy of GM-CSF surface-modified whole-tumor-cell vaccine in mouse model of prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2011 May; 60(5): 715-30.
- [22] Michielsen AJ, O'Sullivan JN, Ryan EJ. Tumor conditioned media from colorectal cancer patients inhibits dendritic cell maturation. *Oncoimmunology*. Aug 1; 1(5): 751-3.
- [23] Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2012 Aug; 12(8):557-69.

- [24] Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23: 975-1028.
- [25] Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 2007 Sep 27; 449(7161): 419-26.
- [26] D. RJP-PESAKAZND. Tumour antigen-loaded mouse dendritic cells maturing in the presence of inflammatory cytokines are potent activators of immune response in vitro but not in vivo. *Oncol Rep*. 2009.
- [27] Li YL, Wu YG, Wang YQ, Li Z, Wang RC, Wang L, et al. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with tumor lysates induce anti-tumor immunity against gastric cancer ex vivo. *World J Gastroenterol*. 2008 Dec 14; 14(46): 7127-32.
- [28] Kaneno R, Shurin GV, Kaneno FM, Naiditch H, Luo J, Shurin MR. Chemotherapeutic agents in low noncytotoxic concentrations increase immunogenicity of human colon cancer cells. *Cell Oncol (Dordr)*. 2011 Apr; 34(2): 97-106.
- [29] Tourkova IL, Yurkovetsky ZR, Shurin MR, Shurin GV. Mechanisms of dendritic cell-induced T cell proliferation in the primary MLR assay. *Immunology letters*. 2001 Sep 3; 78(2): 75-82.
- [30] Jackson AM, Mulcahy LA, Zhu XW, O'Donnell D, Patel PM. Tumour-mediated disruption of dendritic cell function: inhibiting the MEK1/2-p44/42 axis restores IL-12 production and Th1-generation. *International journal of cancer*. 2008 Aug 1; 123(3): 623-32.