

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA
E APLICADA

**Efeito terapêutico da vacina DNA-Hsp65
em melanoma B16F10**

Giovanna Ribeiro dos Santos

Ribeirão Preto
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA
E APLICADA

**Efeito terapêutico da vacina DNA-Hsp65 em
melanoma B16F10**

**Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutora em
Ciências, Área de concentração:
Imunologia Básica e Aplicada.**

**Orientador: Prof. Dr. Célio Lopes
Silva
Co-orientador (a): Profa. Dra. Arlete
Aparecida Martins Coelho-Castelo**

Ribeirão Preto

2008

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto /
USP

Ribeiro-Santos, Giovanna

Efeito antitumoral da vacina DNA-Hsp65 em modelo B16F10. Ribeirão Preto, 2008.
187p. : il.; 28cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área
de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Dr. Célio Lopes Silva.

1. Câncer 2. Vacina de DNA 3. Hsp65 4. Resposta imunológica.

*“Sei que a arte é irmã da ciência,
ambas filhas de um Deus fugaz
Que faz num momento e no mesmo momento
Desfaz...”*

*Quanta
Gilberto Gil*

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Carlos Roberto Pereira dos Santos (in memorian) e Geni Ribeiro dos Santos, pela confiança, apoio e amor incondicionais.
Pelo exemplo de força e por todo carinho: Muito obrigada, amo vocês...*

*À minha família, presente em todos os momentos, especialmente à minha tia Eidi Sueli dos Santos Aguiar, ao Norberto dos Santos Aguiar e aos meus primos queridos Murilo Augusto dos Santos Aguiar e Gustavo Henrique dos Santos Aguiar.
Obrigada pelo apoio!*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Célio Lopes Silva, pela oportunidade, pela confiança, pela compreensão nos momentos difíceis, pelo exemplo de persistência, pelos ensinamentos e pela contribuição em minha formação profissional. Muito obrigada!

À professora Dra. Arlete Aparecida Martins Coelho-Castelo, pela co-orientação, pela atenção em diversos momentos e pela grande contribuição com sugestões e discussões para o desenvolvimento e enriquecimento deste trabalho. Obrigada por tudo!

À professora Dra. Vânia Luiza Deperon Bonato pela colaboração durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores Dr. José Alexandre Barbuto, Dr. Roger Chammas, Dr. Ademilson Panunto Castelo e Dra. Isabel de Miranda Santos, pela participação no julgamento deste trabalho, pelas excelentes sugestões e contribuições na elaboração final desta tese.

Ao professor Dr. Sergio Britto Garcia, pela avaliação dos cortes histológicos, pela confiança e pela ajuda.

À técnica Rosângela Orlandin Lopes e à aluna Patrícia Modiano, pela simpatia e auxílio na realização dos cortes histológicos e à aluna Aline Turatti pela realização das marcações por imunoistoquímica.

Ao professor Dr. Marcello André Barcinski pela doação das células B16F10 e à aluna Luize Lima por todo o auxílio e amizade nas fases iniciais do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada que auxiliam e se preocupam com nossa formação acadêmico-profissional.

À querida secretária Ana Cristine Silva Ferreira, pelo carinho, dedicação e por ser um exemplo de competência nos serviços prestados à pós-graduação. Obrigada por estar presente e disposta sempre que precisei.

À Izaíra Tincane Brandão (Iza) pelo apoio técnico nos experimentos, pela ajuda, pela disponibilidade e por toda dedicação. Muito obrigada!

À Ana Paula Masson (Aninha), pelo apoio técnico, pelas longas conversas e pela amizade. Muito obrigada!

Ao Walter Miguel Turato pela ajuda indispensável nos experimentos de citometria de fluxo, pelo profissionalismo, pelas conversas filosóficas e pelas risadas.

Às minhas queridas Juliana Issa Hori (Japa), Luciana Previato de Almeida, Marina E. Singarete (Marininha), Wendy Martin Rios e Patrícia Rodrigues Marques de Souza, pela amizade, conselhos e consolos! Obrigada pela ajuda com os experimentos, pelas risadas, brincadeiras e por tornarem inesquecíveis muitos momentos...

Aos amigos e colegas do nosso laboratório, deste e de outros tempos... especialmente Ana Paula Trombone (PAT), Sandra Aparecida dos Santos, Carlos Rodrigo Zárate-Blades (Kaká), Rodrigo Ferracine Rodrigues, Deison Soares de Lima, Rogério da Silva Rosada e Liliana Massis, pelas discussões, pelas colaborações, pelas idéias, pelo apoio, pelas risadas, pelas conversas e pelo próprio convívio. Obrigada!

A todos do Grupo de Pesquisa que contribuíram de maneira direta ou indireta com este trabalho, especialmente à Pryscilla Fanini Wowk, Julio César Lorenzi, Eduardo Cury Fiúza (Dudu), Thiago Malardo (Thi), Rubens dos Santos Junior (Rubinho), Marina Oliveira e Paula, Alan Berlese e Ana Flávia Gembre, pelo apoio, pelas discussões, pelas idéias e por todo o auxílio. À Sheila Batsev pela grande ajuda nos “bastidores”. Muito obrigada!

A todos do Núcleo de Pesquisas em Tuberculose (NPT), especialmente ao Rogério Carvalho (Mirim), pela disponibilidade e ajuda. Obrigada!

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, por todos os momentos compartilhados.

Ao prof. Dr. Ramon Kaneno, pela colaboração com meu crescimento acadêmico, pela orientação durante o mestrado, por toda a atenção e amizade.

Aos meus queridos da UNESP-Botucatu, especialmente ao Fabriciano Pinheiro (Mix), Aline Lisie Ramos (Sky), Mariana Maschieto (Milka), Gustavo Bueno Gregoracci (Dãa...), Luís Henrique Franco (Beraba), Amanda Gonçalves (Xu), Lígia Martins (Já), Lindsey Castoldi (Texugo), Francisco Tadeu Paroli (Pleura), Rodrigo Otávio Alves de Lima (Biziu), Paula Baloni (Malaga), Daniel Dias Rosa (Tank) e Juliana Bordon, presentes em momentos importantes, presentes sempre... obrigada por mostrarem o verdadeiro sentido da palavra amigo!

Aos meus amigos tão especiais Ana Melissa Médola Vicente Valsichi (Mel), Ana Cláudia Teixeira, Raul Fonseca, Luciana Lanchote, Marcelo Gobara, Ana Lúcia Mori e Alex Ribeiro Rezende, por serem verdadeiros presentes em minha vida. Amo vocês!

Àqueles cujo nome não foi explicitamente citado, mas de grande importância em minha história. Muito obrigada!

Apoio financeiro:

FAPESP, FAEPA, CAPES, CNPq

Índice

Abreviaturas e Siglas.....	5
1. Resumo	9
2. Abstract.....	11
3. Introdução	13
3.1. Câncer	13
3.2. Resposta imunológica e Câncer	14
3.3. Imunoterapias Antitumorais.....	17
3.4. Proteínas de Choque Térmico (Hsps) e Resposta Imunológica	21
3.5. Hsps e Neoplasias	23
3.6. Desenvolvimento da Vacina DNA-Hsp65	33
4. Objetivos	37
5. Materiais e Métodos	39
5.1. Animais e linhagem B16F10 de melanoma	39
5.2. Padronização do modelo experimental: Concentração de células B16F10 e avaliação de metástases espontâneas.....	39
5.3 Formulações Vacinais.....	40
5.3.1. Purificação dos plasmídeos	40
5.3.2. Obtenção de Lipossomas pelo método da desidratação-rehidratação (DRVs).....	40
5.3.2.1. Lipossomas Extrudados: LEs	40
5.3.2.2. Lipossomas obtidos pelo método DRV	41
5.3.2.3. DNA associado à superfície externa de lipossomas extrudados	41
5.4. Transfecção in vitro das células B16F10.....	42
5.4.1. Marcação do DNA plasmídeo	42
5.4.2. Padronização da eletroporação das células B16F10.....	42
5.4.3. Avaliação da proliferação celular de B16F10 após eletroporação	43
5.5. Delineamentos experimentais	44
5.5.1. Delineamento Experimental I: Tratamentos por via intratumoral	44
5.5.1.1. Estudo de sobrevida e da resposta imune induzida pela Vacina DNA-Hsp65..	44
5.5.1.2. Estudo de sobrevida e da resposta imune induzida pela vacina DNA-Hsp65 adsorvida a lipossomas DRV	46
5.5.2. Delineamento Experimental II: Estudo de sobrevida e da resposta imune induzida pelas células B16F10 previamente transfectadas com DNA-Hsp65	46
5.6. Avaliação da expressão gênica no tumor	47
5.6.1. Obtenção do RNA total do tumor.....	47
5.6.2. Confecção do DNA complementar (cDNA).....	48
5.6.3. “Real-time PCR”	49
5.7. Avaliação da expressão da Hsp65 recombinante (rHsp65) no tumor	50
5.7.1. Obtenção da rHsp65	50
5.7.2. Extração de proteínas do tecido tumoral	51
5.7.3. Avaliação da expressão da proteína recombinante Hsp65 no tumor por Western Blot	51
5.8. Obtenção do lisado total de células B16F10	53

5.9. Análise de marcadores de superfície celular	53
5.9.1 Dissociação da massa tumoral	53
5.9.2. Avaliação da expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo	54
5.10. Teste de citotoxicidade.....	55
5.10.1. Padronização do teste de citotoxicidade	55
5.10.2 Obtenção de células T CD8 por separação com esferas magnéticas	56
5.10.3 Avaliação da citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8.....	57
5.11. Dosagem de proteínas por Coomassie.....	58
5.12 Avaliação por imunoistoquímica	59
5.13. Análise estatística.....	59
6. Resultados.....	61
6.1. Inóculo de células B16F10 e metástases espontâneas	61
6.2. Caracterização da vacina DNA-Hsp65	64
6.3. Transfecção in vitro das células B16F10.....	66
6.4. Expressão da proteína recombinante Hsp65 (rHsp65) no tumor.....	68
6.4.1. Caracterização da proteína recombinante Hsp65	68
6.4.2. Análise da expressão da proteína recombinante Hsp65 no tumor	69
6.5. Padronização da obtenção de linfócitos T CD8 para teste de citotoxicidade	71
6.6. Padronização da recuperação de células do tumor para a análise por citometria de fluxo.....	72
6.7. Sobrevida e resposta imune induzida pelo tratamento com a vacina DNA-Hsp65..	74
6.7.1. Sobrevida I.....	74
6.7.2. Sobrevida II	76
6.7.3. Resposta imunológica induzida pela dose única da Vacina DNA-Hsp65	79
6.7.3.1. Massa tumoral	79
6.7.3.2. Células imunes infiltrantes no tumor e lise específica mediada por células T CD8	80
6.7.3.3. Expressão gênica no ambiente tumoral	84
6.8. Estratégia usando células tumorais transfectadas com plasmídeos Vetor ou DNA-Hsp65	88
6.8.1. Análise da Sobrevida	88
6.8.2. Resposta imunológica induzida pelas células tumorais transfectadas com plasmídeos Vetor ou DNA-Hsp65.....	89
6.8.2.1. Análise da Massa tumoral	89
6.8.2.2. Avaliação das células infiltrantes no tumor e lise específica mediada por células T CD8.....	90
6.8.2.3. Expressão gênica no ambiente tumoral	94
6.9. Uso de DNA plasmídeo encapsulado em vesículas lipossomais	98
6.9.1. Sobrevida e resposta imune induzida pela vacina DNA-Hsp65 adsorvida a lipossomas DRV	98
6.9.2. Resposta imunológica induzida pela vacina DNA-Hsp65 adsorvida a lipossomas DRV	99
6.9.2.1. Massa tumoral	99
6.9.2.2. Células imunes infiltrantes no tumor e lise específica mediada por células T CD8	100
7. Discussão	104
8. Conclusões.....	117

9. Referências Bibliográficas.....	119
10. Anexos.....	136
10.1. Equação para comparação da expressão de genes de interesse entre amostras...	136
10.2. Indução da proliferação das células totais de baço em co-cultura	138
10.3. Avaliação da especificidade do anticorpo anti-Vac1	140
10.4. Certificados do comitê de ética	143
11. Manuscrito.....	146

Abreviaturas e Siglas

Abreviaturas e Siglas

ACS – “American Cancer Society”

APC – célula apresentadora de antígeno profissional

B16F10 – linhagem de melanoma de camundongo singênico para C57BL/6

BCG - bacilo de Calmette-Guérin

BSA – albumina sérica bovina

CD – célula dendrítica

cDNA - DNA complementar

CJCL – célula J774 transfectadas com o gene da Hsp65 de *M. leprae*

CpG - sequência de nucleotídeos de citosina-fosfato-guanina

D.O. - densidade óptica

DAB - diaminobenzidina

DEPC - dietilpirocarbonato

DNA - ácido desoxirribonucleico

DOPE - L- α -dioleoil fosfatidiletanolamina;

DOTAP-1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano;

DRV - método da desidratação-reidratação

DTH - hipersensibilidade retardada

DTT - ditioneitol

EPC - L- α -fosfatidilcolina de ovo

Fc γ R - receptor para porção Fc da imunoglobulina de isotipo G

FITC - isotiocianato de fluoresceína

GATA-3 – ativador transcricional que se liga à sequência 5'-AGATAG-3'

GM-CSF – fator estimulador de colônia de granulócito e macrófago

HE – coloração com hematoxilina e eosina

HPV - vírus do papiloma humano

Hsp – proteína de choque térmico

Hsp65 – proteína de choque térmico de 65kDa de *Mycobacterium leprae*

i.d. – intradérmica

i.m. – intramuscular

i.p. – intraperitonal

i.t. – intratumoral
IFN – interferon
IgG - imunoglobulina de isotipo G
IKDC - célula dendrítica produtora de IFN- γ
IL – interleucina
INCA – Instituto Nacional de Câncer
IPTG - isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
J774 – macrófago de linhagem tumoral originários de camundongos
LAL – lisado de amebócitos de *Limulus*
LDH – enzima lactato desidrogenase
MCP-1 - proteína 1 quimioatraente de monócitos
MHC - complexo principal de histocompatibilidade
Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*
NF- κ B – fator nuclear - κ B
NK – célula “Natural Killer”
NKT – célula T com marcador de “Natural Killer”
NO – óxido nítrico
NPT - Núcleo de Pesquisa em Tuberculose
PAMP - padrões moleculares associados a patógenos
PBS – solução salina tamponada com fosfato
PE - ficoeritrina
PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonila
pVAX-Hsp65 – Vacina de DNA que codifica a proteína Hsp65 do *M. leprae*
RAG2 - gene 2 de ativador da recombinação
“Real-time PCR” - Reação em cadeia da polimerase em tempo real
rhIL-2 - IL-2 recombinante humana
rHsp65 – proteína recombinante de choque térmico de 65kDa de *Mycobacterium leprae*
RNA - ácido ribonucléico
RNA_m - RNA mensageiro
s.c. – subcutânea
SBF – Soro Bovino Fetal
STAT1 - transdutor de sinal e ativador de transcrição 1
T – Terapêutico
TAE - tampão de Tris-base, ácido acético e EDTA

TAP – transportadores associados ao processamento antigênico

TB – Tuberculose

T-bet – membro da família T-box de fatores de transcrição

TCR - receptor de célula T

TGF- β - fator β de transformação do crescimento

Th1 – célula T auxiliar tipo 1

Th2 – célula T auxiliar tipo 2

TLR – receptor tipo *Toll*;

TNF - fator de necrose tumoral

TRAIL - ligante indutor de apoptose associado ao fator de necrose tumoral

Treg - células T regulatórias

UICC - União Internacional Contra o Câncer

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

OMS – Organização Mundial da Saúde.

Resumo

1. Resumo

O câncer é um importante problema de saúde pública mundial e uma das causas mais relevantes de morbidade e mortalidade em crianças e adultos. Apesar dos inúmeros progressos no tratamento, incluindo aprimoramentos cirúrgicos, quimioterápicos e radioterápicos, a cura da maior parte das neoplasias ainda depende da identificação precoce da afecção, não sendo, muito freqüentemente, possível após a disseminação metastática da doença. Assim, novas abordagens terapêuticas são continuamente investigadas e dentre elas, a imunoterapia representa uma forma de crescente relevância. Dentre as novas estratégias imunológicas para imunoterapia de tumores, vale a pena ressaltar o uso de imunomoduladores como as proteínas de choque térmico (Hsp). As características das Hsps em facilitar a apresentação de peptídeos tumorais, estimular a secreção de citocinas inflamatórias por células apresentadoras de antígenos e mediar a maturação de células dendríticas, fazem delas excelentes candidatas para o desenvolvimento de vacinas contra o câncer e doenças infecciosas. Nosso grupo vem desenvolvendo uma vacina de DNA (DNA-Hsp65) que se mostrou eficiente na profilaxia e terapia de doenças infecciosas, doenças autoimunes, alergia e câncer. No presente trabalho, decidimos analisar mais detalhadamente, do ponto de vista imunológico, a ação da vacina DNA-Hsp65 em modelo experimental em camundongos inoculados com melanoma B16F10. Num grupo de animais o DNA-Hsp65 foi inoculado por via intratumoral e no outro foi feita transferência de células B16F10 previamente transfectadas com a vacina DNA-Hsp65. A vacina DNA-Hsp65 mostrou capacidade de retardar o desenvolvimento do tumor e aumentar a sobrevida dos animais. Essa atenuação do crescimento tumoral e o aumento da taxa de sobrevivência foram correlacionados com o aumento da porcentagem de linfócitos T CD4 e T CD8 ativados, considerados importante indicador de resposta contra tumores. A vacina também induziu aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície de células dendríticas no sítio tumoral, favorecendo uma apresentação antigênica eficiente num ambiente ativador da resposta imune. Além disso, foi observado aumento significativo da porcentagem de lise específica das células de melanoma B16F10 mediada por linfócitos T CD8 citotóxicos. Assim sendo, os dados aqui apresentados mostram o potencial antitumoral da vacina DNA-Hsp65 por meio da estimulação da resposta imunológica e ao mesmo tempo abrem perspectivas para estudos futuros que possam aumentar a efetividade dessa vacina no combate a tumores.

Abstract

2. Abstract

The ability of heat shock proteins (Hsps) to participate in innate and adaptive immune responses makes them promising candidates for vaccines against cancer and infectious diseases vaccines. The antitumoral activity of *hsp65* gene has been shown by different groups. In a clinical trial phase I in advanced head and neck cancer-bearing patients, our group showed the feasibility of DNA-Hsp65 vaccine and four out of 14 patients presented partial response. Two of these patients are still alive after 3 years trial ending. To determine whether DNA-Hsp65 can play a protector role in an experimental melanoma tumor model, we used two different approaches using different treatment were assessed: 1) DNA-Hsp65 intratumoral therapy and 2) transference of B16F10 electroporated *in vitro* with DNA-Hsp65. We observed that both strategies displayed antitumoral activity, which was mainly evidenced by enhancement of survival rate and tumor growth delay (tumor weight). This antitumoral activity showed correlation with increased percentages of activated lymphocytes (CD4/CD44hi, CD8/CD44hi) infiltrate in tumor mass, enhancement in CD86 co-stimulatory molecule expression in APCs and CD8 T lymphocytes specific lysis. Besides, gene expression in tumors was modulated by DNA-Hsp65 intratumoral treatment, leading to increase of Tbet and IL-17 gene expression. Our data indicate new perspectives for assays concerning Hsp65 and tumors interaction and also point out the importance in establishing immunological markers in neoplastic treatments for efficiency evaluation. Altogether, these data provide knowledge basis for new analysis that may enhance the effectiveness of vaccine based in Hsps in tumor combat.

Introdução

3. Introdução

3.1. Câncer

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública da atualidade. Sua incidência no Brasil, como em todo o mundo, cresce num ritmo que acompanha o envelhecimento populacional decorrente do aumento da expectativa de vida. Segundo a União Internacional Contra o Câncer (UICC), o número de novos casos/mortes por câncer no ano de 2002 foi de 10 milhões e 6 milhões, respectivamente. Para o ano de 2020, a previsão é de 15 milhões de novos casos e 12 milhões de mortes por câncer no mundo (INCA, 2008a). Estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) revelam que mais de 470 mil novos casos da doença surgirão no Brasil nos próximos anos. Do mesmo modo, de acordo com a “*American Cancer Society*” (ACS), a probabilidade de um homem ou uma mulher norte-americana desenvolverem algum tipo de tumor ao longo da vida são de 50 e 33%, respectivamente (ACS, 2007).

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem tecidos e órgãos, com possibilidade de se espalhar para outras regiões do corpo (metástase). Estas células são capazes de dividir-se de maneira agressiva e determinar a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (INCA, 2008b).

Até recentemente o câncer era visto como uma doença terminal, ligada exclusivamente a procedimentos de alta complexidade. Hoje, o diagnóstico, incluindo o estadiamento (avaliação da extensão ou a gravidade da neoplasia), é considerado fundamental para seu tratamento adequado (OMS, 2006). Além do mais, o diagnóstico precoce aumenta consideravelmente a possibilidade de cura para algumas neoplasias e reduz a morbidade resultante da doença e seu tratamento.

Atualmente, tumores primários são tratados pela combinação de terapias e na maior parte dos casos incluem cirurgia, radioterapia local e quimioterapia. Mesmo quando o tumor foi aparentemente totalmente removido, micrometástases de células tumorais latentes ou do tumor primário freqüentemente levam ao reaparecimento do tumor e ao fracasso da terapia. Assim, torna-se necessário não apenas o desenvolvimento de estratégias para eliminar todo o tumor eficientemente, mas também a estimulação da

resposta imunológica de modo que o sistema imune possa manter vigilância sobre células tumorais residuais (Zitvogel et al., 2008a).

O câncer é amplamente considerado como uma doença genética que resulta de alterações em oncogenes, genes supressores de tumor e genes de estabilidade genômica. Entretanto, o microambiente da célula tumoral, o estroma e a imunidade também desempenham importante papel na doença. Em grande parte das neoplasias avançadas, as células tumorais têm de prevalecer sobre as barreiras intrínsecas (autônomas da célula) e extrínsecas (mediadas pelo sistema imune) para o desenvolvimento do câncer. Apenas quando as células tumorais “triunfam” sobre o controle do sistema imunológico é que ocorre a progressão e morte do hospedeiro. De certa forma isso explica o aumento da incidência de alguns tumores sólidos em pacientes imunossuprimidos, casos de regressão tumoral espontânea e o prognóstico positivo de linfócitos T citotóxicos tumor-específicos, reforçando a idéia de que o sistema imune desempenha um papel crucial na progressão neoplásica (Zitvogel et al., 2008a).

3.2. Resposta imunológica e Câncer

O conceito de vigilância imune diz que o sistema imunológico pode reconhecer e destruir precursores de câncer e, em muitos casos, destruí-los antes de se tornarem clinicamente detectáveis. A teoria da vigilância imunológica contra tumores surgiu em 1909, proposta por Paul Ehrlich (Ehrlich, 1909 citado em Dunn et al., 2004). Contudo, a importância e até mesmo a existência desse fenômeno foi debatida por décadas, ressurgindo recentemente (Khong and Restifo, 2002; Dunn et al., 2004; Zitvogel et al., 2006). Hoje está claro que o sistema imune desempenha um papel importante no controle tumoral tanto em animais quanto em seres humanos.

De maneira geral, a partir dos conhecimentos científicos atuais, é possível identificar alguns tipos celulares e diversas moléculas envolvidas na vigilância imunológica do câncer.

Linfócitos T CD8 citotóxicos podem reconhecer e matar células estromais e/ou neoplásicas de forma restrita ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e dependente de perforina. Em paralelo, elas podem secretar citocinas antiangiogênicas como IFN- γ . Já os linfócitos T CD4 auxiliares do tipo 1 (Th1) podem reconhecer peptídeos tumorais apresentados via MHC de classe II e estimular ou converter à produção de IFN- γ , que inibe a angiogênese. As células dendríticas produtoras de IFN- γ

(IKDCs) também têm grande participação nessa vigilância imunológica, elas são consideradas a maior fonte dessa citocina, podendo matar células neoplásicas de forma dependente de TRAIL ou perforina além de realizarem apresentação cruzada de antígenos tumorais às células T. Em relação às células “natural killer” T (NKT), elas podem reconhecer glicolipídeos ligados à molécula CD1d na superfície de células apresentadoras, lisando células tumorais de forma MHC independente, além de secretarem IFN- γ dependente de IL-12 e CD40. Finalmente, anticorpos que se ligam ao tumor podem desempenhar atividade tumoricida por meio de efeitos antiproliferativos diretos, pela indução da lise mediada por complemento ou pela citotoxicidade de células NK e macrófagos dependente de imunoglobulina de isotipo G (IgG) (ADCC) (resposta imune antitumoral revisada por Dunn et al., 2002; Zitvogel et al, 2006).

É bem estabelecido que camundongos deficientes de componentes essenciais da imunidade inata ou adquirida são mais susceptíveis ao desenvolvimento de tumores espontâneos ou induzidos por agentes químicos. Esse é o caso de animais deficientes nos seguintes elementos: gene 2 ativador de recombinação (*rag2*), falta da qual resulta na ausência de células T, células B e células T com marcador de “natural killer” (NKT); cadeia β e γ do receptor de célula T (TCR), falta que leva à ausência de células T $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$; segmento gênico *J α 281*, deficiência que reduz o número de células invariantes NKT que expressam TCRs com *V α 14–J α 281*; transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 (STAT1), fator de transcrição necessário para a sinalização mediada por IFN- γ ; perforina; ou ligante indutor de apoptose associado ao fator de necrose tumoral (TNF) (TRAIL) (revisado por Zitvogel et al., 2006).

A presença de linfócitos infiltrantes no tumor é um marcador prognóstico bastante útil em diversos tipos de neoplasia. Em pacientes com carcinoma de cólon, a existência de RNA mensageiro (RNA_m) de moléculas expressas em células efetoras de padrão Th1 tais como perforina, T-bet, IFN- γ , entre outras, está correlacionada com redução da capacidade metastática e aumento do tempo de sobrevida (Pages et al., 2005). Em contraste, em pacientes com carcinoma renal, a presença de um polimorfismo no receptor para a citocina IL-4, o qual resulta no aumento da sinalização para essa citocina e leva a um predomínio do padrão Th2 de resposta, é um indicador independente de prognóstico ruim para o paciente (Nakamura et al., 2006)

Juntos, os dados de estudos em humanos e modelos animais reforçam a idéia de que a vigilância imunológica contra o câncer envolve linfócitos T CD8, células Th1 e NK

(Khong and Restifo, 2002; Zitvogel et al., 2006) e é localmente suprimida por células T regulatórias (Treg) e produtos do tumor (Muller and Scherle, 2006).

Além disso, estudos recentes começam a avaliar o papel da subpopulação de células Th17 nas neoplasias. A diferenciação desses linfócitos é primariamente dependente de IL-6 e TGF- β , enquanto a IL-23, originalmente considerada como principal direcionadora da diferenciação, parece ser importante na manutenção da resposta mediada por esses linfócitos. As células Th17 produzem IL-17 e estão relacionadas com a indução de autoimunidade e respostas inflamatórias (Reiner, 2007), entretanto, as informações sobre sua relevância na biologia do câncer são limitadas e contraditórias. Ao mesmo tempo em que alguns trabalhos apontam a IL-17 como responsável pelo crescimento do câncer (Tartour et al., 1999; Langowski et al., 2006), outros relatos mostram evidências de que a IL-17 pode proteger contra o desenvolvimento da neoplasia por meio da rejeição tumoral mediada pelo sistema imunológico (Hirahara et al., 2001; Hirahara et al., 2000; Benchetrit et al., 2002; Kottke et al., 2007). Muranski et al. (2008) revelaram que células Th17 com TCR transgênico para a proteína 1 relacionada à tirosinase (TRP-1) (expressa especificamente em melanócitos e células de melanoma), polarizadas *in vitro* e transferidas para camundongos portadores de melanoma B16F10 avançado, foram as únicas capazes de aumentar a sobrevivência dos animais quando comparadas com células com TCR transgênico para TRP-1 de padrão Th1 ou Th0, caracterizadas pela secreção de diferentes citocinas.

Em relação ao desenvolvimento do câncer, dados de diferentes estudos sustentam o conceito de que um processo de dois passos facilita o seu surgimento, primeiro o evento intrínseco oncogênico e segundo a deficiência de reconhecimento ou atividade efetora da imunidade inata e adaptativa contra as células tumorais (Nakachi et al., 2004; Imai et al., 2000; Hayashi et al., 2006).

As neoplasias podem apresentar vários mecanismos para se evadir da resposta imunológica, os quais são considerados não relacionados às outras características da carcinogênese e resultam da pressão seletiva exercida pelo sistema imunológico. Essas “estratégias” são denominadas como seleção imunológica ou imunoedição (Dunn et al., 2002; Zitvogel et al., 2006). Nesse sentido, as células tumorais podem apresentar perda ou diminuição da expressão de moléculas do MHC de classe I (Algarra et al., 1997; Zheng et al., 1999; Cabrera et al., 1996; Cabrera et al., 2000), perda de antígenos de superfície (Hofbauer et al., 1998; Jager et al., 1996; Lee et al., 1998) e imunodominância (Schreiber et al., 2002); defeito na sinalização de receptores indutores

de apoptose como Fas (Davidson et al., 1998) e TRAIL (Takeda et al., 2001); falta de coestimulação (Schwartz, 1990); apoptose de células T ativadas (Zaks et al., 1999); imunossupressão local pela presença de citocinas como IL-10 (Segura et al., 1997; Seung et al., 1999) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Saito et al., 1998); e pela atuação imunorregulatória das células Treg (Khong and Restifo, 2002; Shevac, 2004). Além disso, em modelos experimentais, tumores avançados invariavelmente subvertem a resposta imunológica. De uma forma característica, células T CD8 específicas são ativadas no estágio de iniciação do processo de carcinogênese, porém demonstram perda da atividade citotóxica em estágios mais tardios da expansão tumoral (Huang et al., 2005). Já os linfócitos T CD4 demonstram progressiva perda de atividade antitumoral (Zhou et al., 2004), enquanto o número de células Treg aumenta (Sakaguchi et al., 2004). Assim, essa “tolerância” às células tumorais parece ser necessária para o desenvolvimento do câncer, mesmo em passos iniciais da tumorigênese (Willimsky and Blankenstein, 2005).

Embora os tratamentos de câncer ainda tendam a considerá-lo e tratá-lo como um fenômeno celular intrínseco, a importância atribuída à resposta imunológica no combate a tumores tem crescido consideravelmente. Numerosos ensaios clínicos têm combinado tratamentos convencionais com imunoterapias (revisado em Zitvogel et al., 2008 – por exemplo Roberts et al., 2007; Ding et al., 2005) e alguns estudos sugerem a criação de uma sinergia entre esses dois. Dessa forma, a busca por imunoterapias eficientes que possam ser utilizadas tanto sozinhas como em associação com outros tratamentos é de grande interesse.

3.3. Imunoterapias Antitumorais

O termo imunoterapia se refere a toda abordagem que vise a mobilização ou manipulação do sistema imunológico para o benefício terapêutico do paciente. O objetivo moderno da imunoterapia contra o câncer consiste na estimulação do sistema imunológico para restaurar sua capacidade em reconhecer e destruir células neoplásicas, o que poderia complementar estratégias convencionais de combate aos tumores (Steinman and Mellman, 2004).

As imunoterapias estão sendo cada vez mais aceitas na clínica para diferentes tumores, incluindo melanoma (Rosenberg, 2001; Kershaw et al., 2005), linfoma (Grillo-Lopez et al., 2002) e neoplasias induzidas por vírus (Heslop et al., 1996; Kershaw et al.,

2005). Nesse contexto, há numerosas estratégias para tentar aumentar a resistência dos pacientes ao câncer, o que inclui a ativação imunológica inespecífica por meio de componentes microbianos ou citocinas; imunoterapia passiva com transferência para o paciente de anticorpos e/ou células T e imunoterapias antígeno-específicas ativas (Banchereau and Palucka, 2005).

Dados da literatura mostram que a imunoterapia passiva com transferência de anticorpos pode ser clinicamente efetiva no caso de tumores de célula B e subpopulações de tumores de mama tratados, respectivamente, com anticorpos anti-CD20 (Maloney et al., 1994) e anti-HER-2 (Valone et al., 1995). No entanto, esse tipo de abordagem apresenta como limitação a necessidade de que as proteínas-alvo estejam expressas na superfície celular, o que raramente ocorre (Banchereau and Palucka, 2005). Em contraste com os alvos de anticorpos, os alvos para células T são geralmente peptídeos derivados de proteínas intracelulares, as quais são apresentadas em associação às moléculas do MHC. A identificação de antígenos tumorais humanos (Rosenberg, 1997; Boon et al., 1994) encorajou o desenvolvimento de terapias com transferência adotiva de células T específicas.

Entretanto, até o presente momento, as estratégias consideradas mais atrativas são as de imunoterapia ativa capazes de induzir uma resposta imunológica inata e adaptativa contra o tumor. Nessa estratégia ocorre primeiramente a produção de citocinas, as quais polarizam para um padrão de resposta Th1, e conseqüentemente atraem e amadurecem células apresentadoras de antígenos que apresentarão epítomos às células T, promovendo assim a ativação e não tolerância dessas células. Dessa forma, estabelece-se uma resposta imune efetora específica e memória imunológica capazes de manter uma vigilância contínua contra células neoplásicas emergentes (Banchereau and Palucka, 2005).

Nesse contexto, as vacinas terapêuticas para câncer apresentam-se como uma estratégia muito interessante. Essas vacinas tiveram início principalmente com o uso de lisados celulares totais em combinação com adjuvantes (Mitchell et al., 1989; Piccirillo and Shevac, 2001) ou produtos protéicos liberados no sobrenadante de culturas celulares (Bistrin et al., 1988; Miller et al., 1995). Outros enfoques de vacinas para câncer são baseados em tumores autólogos e seus vários produtos, incluindo células tumorais modificadas (Hara et al., 2004) e proteínas de choque térmico (Hsps) derivadas de tumor ou outras fontes (Hara et al., 2004; Botte, 2007). Em relação às células tumorais modificadas, um ensaio clínico de fase I com 35 pacientes portadores de

câncer de pulmão, vacinados com células tumorais autólogas irradiadas e transfectadas para secretarem fator estimulador de colônia de granulócito e macrófago (GM-CSF), demonstrou que na maior parte dos pacientes ocorreu um infiltrado de macrófagos, granulócitos e linfócitos nos sítios metastáticos, assim como resposta de hipersensibilidade retardada (DTH) contra células tumorais não modificadas. Por outro lado, a correlação desses eventos com a melhora clínica foi menos clara, uma vez que apenas cinco pacientes apresentaram estabilização da doença (Nouri-Shirazi et al., 2000). As abordagens imunoterapêuticas utilizando Hsps serão discutidas nos itens subseqüentes.

Uma das abordagens mais recentes de vacinas contra neoplasias é baseada no uso de células dendríticas (Nestle et al., 2001). As células dendríticas são importantes células apresentadoras de antígenos e podem ser preenchidas com corpúsculos apoptóticos de tumor (Nouri-Shirazi et al., 2000), lisados tumorais, RNA tumoral (Heiser et al., 2001; Nair et al., 2002) e DNA tumoral (Whiteside et al., 2002). Muitas dessas preparações têm demonstrado imunogenicidade e potencial para rejeição tumoral em modelos animais e ensaios clínicos. Um estudo bastante interessante com pacientes portadores de neoplasias progressivas (carcinoma celular renal ou melanoma metastático) descreveu resultados utilizando vacinação com híbrido de células tumorais autólogas e células dendríticas alogeneicas. A vacina foi administrada a cada seis semanas e dos 35 pacientes avaliados, 71% apresentaram estabilização de até 19 meses no desenvolvimento tumoral (Barbutto et al., 2004).

Além dos estudos com células dendríticas, na última década, os avanços na tecnologia do DNA recombinante para o desenvolvimento de novas vacinas permitiram a introdução de novas estratégias para a obtenção e produção de antígenos, assim como foram otimizadas novas maneiras de se administrar e apresentar esses antígenos para as células do sistema imunológico. Essas estratégias abriram caminho para inovações, particularmente no contexto do desenvolvimento de vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes (Wolff et al., 1990; Gurunathan et al., 2000). Dentre essas estão as vacinas de DNA ou vacinas gênicas (Spier, 1996).

As vacinas de DNA oferecem uma estratégia precisa, porém flexível para disponibilizar antígenos ao sistema imune (Rice et al., 2008). Além disso, são consideradas potentes estratégias para a geração de forte resposta imune humoral e celular (Huygen, 1998; Gurunathan et al., 2000; Silva, 2004). Essas vacinas são constituídas de plasmídeos bacterianos contendo um promotor viral que controla a

expressão do gene de interesse dentro de uma célula eucariótica, levando à transcrição do RNAm no núcleo e à tradução da proteína no citosol (Donnelly et al., 2005). Quando o DNA é administrado, o organismo passa a produzir o antígeno por meios próprios, sem os efeitos indesejáveis da introdução de um agente infeccioso patogênico ou de vacinas contendo subunidades protéicas e adjuvantes (Spier, 1996). Dessa forma, o indivíduo vacinado é capaz de induzir uma resposta imunológica celular e humoral específica, bem como memória imunológica. Além disso, a introdução do DNA plasmideal possibilita a geração de antígenos endógenos e, conseqüentemente, a ativação de linfócitos T CD8.

A vacinação com DNA pode ser feita em várias espécies animais, por diversas vias e esquemas. O custo de produção das vacinas gênicas em larga escala é significativamente menor do que o custo de produção das vacinas de células dendríticas, protéicas recombinantes, peptídeos sintéticos e outras. O controle de qualidade é mais fácil, e a comercialização não necessita de uma rede de refrigeração, uma vez que estas vacinas são estáveis à temperatura ambiente. Tais fatores facilitam o transporte, a distribuição e o estabelecimento de amplos programas de imunizações em regiões de difícil acesso.

Em pacientes com câncer, o número de estudos detalhados que abordam a utilização de vacina de DNA é pequeno. Desses poucos estudos, foram reportadas estratégias de imunização com DNA em ensaios clínicos envolvendo melanoma (Rosenberg et al., 2003; Tagawa et al., 2003; Smith et al., 2005; Triozzi et al., 2005), câncer de próstata (Mincheff et al., 2000; Pavlenko et al., 2004; Miller et al., 2005; Todorova et al., 2005), linfoma de célula B (Timmerman et al., 2002), câncer de cólon e reto (Conry et al., 2002) e carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (Michaluart et al., 2008 – comentado em detalhes mais à frente). A população de pacientes desses estudos normalmente consiste de indivíduos com doenças metastáticas avançadas que já passaram por vários tipos de terapias. Geralmente a inoculação da construção de DNA plasmideal é bem tolerada, raramente envolvendo toxicidade sistêmica.

Os mecanismos envolvidos na ativação da resposta imunológica humoral e celular, pelas vacinas de DNA plasmideais, ainda não foram completamente elucidados. Alguns autores propõem que a indução da resposta imune possa ter início após a transfecção de uma célula não APC, enquanto outros autores têm demonstrado a importância de células CD11b ou CD11c derivadas da medula óssea na indução da resposta imunológica (Gurunathan et al., 2000). De qualquer modo, antígenos produzidos no citoplasma da

célula hospedeira são processados por várias enzimas e os fragmentos resultantes apresentados na superfície celular juntamente com moléculas de classe I do MHC para linfócitos T CD8. Por outro lado, parte dos antígenos produzidos são secretados sem sofrerem processamento, podendo estimular tanto linfócitos B a produzirem anticorpos específicos, como serem endocitados por outras APCs e assim estimularem linfócitos T CD4 via moléculas de MHC de classe II (Liu, 2003). Além disso, foi demonstrado pelo nosso grupo, que células B podem capturar o DNA plasmideal *in vivo*, sugerindo que essas células também possam participar do processo de apresentação de antígeno em modelos de vacinas de DNA (Coelho-Castelo et al., 2003).

As vacinas gênicas podem também ser adjuvantes por mimetizarem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por meio da estimulação de receptores celulares do tipo Toll (TLR), dando início à resposta imune inata. Um elemento crucial do DNA bacteriano são as seqüências de nucleotídeos de citosina-fosfato-guanina (CpGs) não metilados, que diferem do padrão dos eucariotos. Essas seqüências CpGs têm capacidade imunoestimulatória sobre células que expressam TLR9, tais como células B e dendríticas, e podem atuar indiretamente sobre outros tipos celulares por meio da produção de citocinas desencadeando uma cascata de ativação, proliferação e diferenciação de células NK, linfócitos T e monócitos/macrófagos (Krieg, 2002).

Dessa forma, dependendo do antígeno codificado, as vacinas de DNA têm o potencial de estimular segmentos da resposta imunológica inata e adaptativa, o que é considerado ideal para o tratamento de tumores.

Na tentativa de contribuir para novas estratégias imunoterapêuticas de combate ao câncer, nosso grupo vem desenvolvendo uma vacina de DNA que codifica a proteína de choque térmico de 65 kDa (Hsp65) de *Mycobacterium leprae*.

3.4. Proteínas de Choque Térmico (Hsps) e Resposta Imunológica

As Hsps, também conhecidas como chaperoninas, são moléculas altamente conservadas entre as espécies e desempenham papel importante no dobramento e translocação de proteínas e montagem de complexos protéicos. Apesar da maior parte das Hsps ser expressa constitutivamente, sua expressão pode ser aumentada devido a diversas perturbações fisiológicas e estressores como um mecanismo de proteção celular (Lindquist and Craig, 1988). Essas proteínas estão subclassificadas de acordo com o seu

peso molecular. As famílias mais importantes são da calreticulina, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp110 e as de baixo peso molecular (Rutherford and Lindquist, 1998).

As funções imunológicas das Hsps começaram a ser relatadas nos anos 1980s quando foi observado que preparações homogêneas de certas Hsps isoladas de células tumorais induziam resposta contra o câncer, enquanto preparações correspondentes de tecidos normais não o faziam (Srivastava et al., 1998). A imunogenicidade das Hsps derivadas de tumor resultava da associação das mesmas com peptídeos gerados pela degradação de proteínas expressas por células das quais as Hsps eram purificadas. Dessa forma, as Hsps derivadas de células tumorais estavam não-covalentemente associadas a peptídeos derivados de antígenos tumorais, do mesmo modo que as Hsps provenientes de tecidos não tumorais apresentavam-se complexadas com peptídeos normais e por isso não eram capazes de induzir resposta antitumoral específica (Srivastava, 2002a).

A interação do complexo Hsp-peptídeo com APCs, como macrófagos e células dendríticas, por um lado, leva à apresentação de peptídeos antigênicos a linfócitos T CD4 e CD8 e, por outro lado, desencadeia uma cascata de eventos não antígeno-específicos que ativam as APCs e promovem a resposta imunológica (Srivastava, 2002b).

Essa ligação do complexo Hsp-peptídeo com CD91 leva à internalização dos complexos em compartimentos endossomais não acídicos, seguidos da transferência do complexo ou do peptídeo sozinho ao citosol (Basu et al., 2001) por um mecanismo ainda não compreendido. Os peptídeos são processados por proteassomas e transportados para o interior do retículo endoplasmático por meio de transportadores associados ao processamento antigênico (TAP) (Takahashi et al., 1990). Os peptídeos são então ligados às moléculas de MHC classe I e apresentados para células T CD8. Uma proporção relativamente pequena dos complexos Hsp-peptídeo internalizados via CD91 entram em compartimentos acídicos, onde os peptídeos são associados a moléculas de MHC de classe II, levando à estimulação das células T CD4. Assim, os peptídeos complexados com Hsps podem ser apresentados tanto via moléculas do MHC de classe I como do MHC de classe II.

Em adição à resposta imune específica contra o peptídeo associado às Hsps, a interação das próprias Hsps com as APCs leva a algumas reações independentes do peptídeo. Tais respostas incluem a secreção de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1, IL-12 e GM-CSF por macrófagos (Srivastava, 1984); indução de óxido nítrico por

macrófagos e células dendríticas (Botte, 2007; Panjwani et al., 2002); secreção de quimiocinas como proteína 1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) (Lehner et al., 2000); maturação de células dendríticas por aumento da expressão de MHC de classe II, CD86 e CD40 (Zheng et al., 2001; Souza, tese em andamento); e translocação de NF- κ B ao núcleo de macrófagos e células dendríticas, o que poderia ser o evento inicial de todos os acima descritos (Basu et al., 2000).

Dessa forma, as propriedades das Hsps, formando complexos e auxiliando na apresentação de peptídeos, inclusive peptídeos antigênicos; estimular a secreção de citocinas inflamatórias por APCs; e mediar a maturação de células dendríticas fazem delas únicas do ponto de vista imunológico (Srivastava 2002; Souza, tese em andamento). Essas características também permitem a utilização das Hsps no desenvolvimento de vacinas profiláticas e terapêuticas contra doenças infecciosas (Lowrie et al., 1999) e câncer (Michaluart et al., 2008).

3.5. Hsps e Neoplasias

A utilização das Hsps no tratamento de tumores é bastante interessante, pois não implica na identificação de epítomos imunogênicos específicos, direcionando a resposta imune a um repertório antigênico maior com redução do aparecimento de variantes que possam escapar. Sendo assim, o uso das Hsps parece ser aplicável para qualquer tipo de neoplasia e os estudos tanto em modelo experimental como ensaios clínicos abrangem um grande espectro de tumores, como melanoma, carcinoma renal, câncer pancreático, câncer de cólon, linfoma de célula B, entre outros (Srivastava, 2002b).

A literatura sobre o uso das Hsps em ensaios pré-clínicos no tratamento de neoplasias é bastante vasta, envolvendo diferentes metodologias, tais como: vacinas de Hsps derivadas de tumor; complexos Hsp-peptídeos ou Hsp-proteína reconstituídos *in vitro*; proteínas de fusão Hsp-antígeno; terapias celulares e vacinas de DNA (Binder, 2006). A **Tabela 1** sumariza ensaios pré-clínicos com utilização *in vitro* e *in vivo* das Hsps, com evidências de seu potencial tanto na profilaxia quanto na terapia de tumores.

Especificamente em relação à terapia gênica com Hsps, diferentes enfoques têm contribuído para geração de forte resposta imunológica contra o tumor. Por exemplo, Huang et al. (2004) demonstraram potente efeito antitumoral, protetor e terapêutico, induzido por células tumorais B16 ligadas a superantígenos e transfectadas com gene da Hsp70 em camundongos C57BL/6. Outros autores observaram que a inoculação

intradérmica de DNA plasmidial com o gene da Hsp70 e um gene com transcrito citotóxico com ação específica em melanócitos, não apenas promoveu destruição de melanócitos normais como também induziu uma resposta antígeno-específica dependente de células T CD8 citotóxicas que erradicaram completamente tumores melanoma B16 estabelecidos (Daniels et al., 2004).

Hara et al. (2004) observaram que a introdução do gene da Hsp65 de *M. tuberculosis* em células tumorais aumentava o efeito antitumoral da terapia com BCG e recentemente, Ren et al. (2008) relataram que a injeção intratumoral de adenovírus oncolítico expressando Hsp70 prolongou a sobrevida em camundongos portadores de melanoma B16 por meio do aumento da resposta imune.

Tabela 1. Formas de utilização das Hsps na imunoterapia contra o câncer em ensaios pré-clínicos

Hsp utilizada	Origem da Hsp	Forma de utilização	Via de imunização	Ensaio	Proteção	Referência
Hsp65	<i>M. leprae</i> e célula CJCL (permanentemente transfectada)	Lisado total das células transfectadas e proteína recombinante livre e em lipossomas	s.c.	Profilático	Redução do tumor, aumento de sobrevida	(Botte, 2007)
AFP-Hsp70	<i>M. tuberculosis</i>	Vacina de DNA	i.m.	Terapêutico	Suprime o crescimento tumoral	(Lan et al., 2007)
Calreticulina ou GP96	Célula MethA	Proteína tumoral purificada	s.c.	Profilático	100% e 66%	(Basu and Srivastava, 1999)
CEAΔ-Hsp70l1	Humana	CDs carregadas com Proteína de fusão purificada + CD imatura	Transferencia adotiva de espenócitos de camundongos imunizados	Terapêutico	37,5%	(Wu et al., 2005)
CRT-E6 e Sig-E6-LAMP-1	Coelho	Vacina de DNA	i.d.	Profilático e Terapêutico	100% (P) e diminuição do número de metástases pulmonar (T)	(Peng et al., 2005)
CRT-E7	Coelho	Adenovírus expressando proteína de fusão	i.p.	Profilático e terapêutico	100% (P) e 100% (T)	(Gomez-Gutierrez et al., 2007)

Diversas	Célula B16	CDs pulsionadas com células tumorais B16 após choque térmico + Hipertermia local causada por lipossomas catiônicos magnéticos em por campo magnético	s.c.	Terapêutico	60%	(Tanaka et al., 2005)
Diversas (Predominante Hsp60 e Hsp90)	Células A20	Exossomos de células tumorais após choque térmico	s.c.	Profilático e terapêutico	80% (P) e 40% (T)	(Chen et al., 2006)
E7CTL-Hsp70	<i>M. tuberculosis</i>	Vírus adeno-associado codificando proteína de fusão Hsp-peptídeo	i.m.	Terapêutico	Impediu o crescimento tumoral	(Liu et al., 2000)
E7-Hsp70	Camundongo	Vacina de DNA	i.m.	Profilático	60%	(Li et al., 2006)
GP96	Célula UV6139SJ	Proteína tumoral purificada	s.c.	Profilático	Redução do volume tumoral	(Janetzki et al., 1998)
GP96	Células de hepatoma ascítico Zajdela	Proteína tumoral purificada	s.c.	Profilático	Redução do volume tumoral	(Srivastava and Das, 1984)
GP96 e Hsp70	Células B16	Proteína tumoral purificada	s.c.	Terapêutico	80% e Diminuição do número de metástases pulmonares	(Tamura et al., 1997)
CRT-E7 + CRT-E6	Coelho	Vacina de DNA	i.d.	Terapêutico	Diminuição do número de nódulos pulmonares	(Peng et al., 2006)
GP96-IG	Células tumorais	Células tumorais E.G7 secretoras de GP96-IG	s.c.	Profilático	Os animais imunizados com GP96 foram 10 vezes mais resistentes que o controle	(Yamazaki et al., 1999)

Introdução

GP96-VSV8CTL	Células de fígado de camundongo	Complexo Hsp-peptídeo reconstituído	s.c.	Profilático	80%	(Blachere et al., 1997)
GRP170	Camundongo	Célula B16 secretora de Hsp	s.c.	Profilático	20% (desafio com 5×10^5 células) e 100 % (desafio com 1×10^5 células)	(Wang et al., 2006b)
Hsp105	Camundongo	CD pulsada com Hsp recombinante	i.p.	Profilático	Desafio com célula B16 – 62,5% Desafio com célula C26 – 80%	(Yokomine et al., 2006)
Hsp110 + GM-CSF	Camundongo	Célula CT26 transfectada	s.c.	Profilático	100%	(Wang et al., 2002)
Hsp110 e GRP170	Célula de carcinoma cólon 26	Proteína tumoral purificada	s.c.	Profilático e Terapêutico	Diminuição do crescimento tumoral (P) e aumento de sobrevivência (T)	(Wang et al., 2001)
Hsp110-GP100	Camundongo	Complexo Hsp-proteína reconstituído artificialmente	i.p.	Profilático e Terapêutico	20% (P) Retardo da morte (T)	(Wang et al., 2003)
Hsp27, Hsp60, Hsp70 e Hsp90	Células tumorais 4T1	CDs carregadas com Hsp + Fração citoplasmática de <i>Salmonella typhimurium</i>	s.c.	Profilático e Terapêutico	86% (P) e diminuição no número de metástases pulmonar (T)	(Shilling et al., 2007)
Hsp65	<i>M. leprae</i>	Vacina de DNA complexada em lipídeos catiônicos	i.p.	Terapêutico	90% camundongos CBA/J 35% em camundongos BALB/C	(Lanuti et al., 2000)
Hsp65	<i>M. leprae</i>	Célula J774 transfectada	i.p.	Profilático	100%	(Lukacs et al., 1993)
Hsp65	<i>M. bovis</i>	Célula 3LL transfectada	i.p.	Profilático	Contenção do aumento da massa tumoral	(Tan et al., 2001)
Hsp65	<i>M. leprae</i>	Célula B16 transfectada	i.p.	Profilático	70%	(Wells et al., 1997)

Introdução

Hsp65e7	<i>M. bovis</i>	Proteína de fusão	s.c.	Terapêutico	82%	(Chu et al., 2000)
Hsp65-MUC1CTL	<i>M. bovis</i>	Proteína de fusão	s.c.	Profilático e Terapêutico	73%(P) e 75%(T)	(Li et al., 2006a)
Hsp65-X10-bhCGCTP37	<i>M. bovis</i>	Proteína de fusão	s.c.	Profilático	Diminuição de metástases pulmonares.	(Yankai et al., 2006)
Hsp70	Células tumorais B16	Proteína purificada de tumor não-autólogo	s.c.	Terapêutico	50%	(Casey et al., 2003)
Hsp70	Fígado de camundongo	Proteína purificada	s.c.	Profilático	63%	(Ciupitu et al., 2002)
Hsp70	Derivada de CD fusionada com célula tumoral	Proteína purificada	s.c.	Profilático	100%	(Enomoto et al., 2006)
Hsp70	Humana	Expressa em adenovírus	i.t.	Terapêutico	100%	(Huang et al., 2003)
Hsp70	Célula SCCVII carcinoma	Célula tumoral irradiada com terapia foto-dinâmica	i.p.	Terapêutico	Redução do volume tumoral	(Korbelik and Sun, 2006)
Hsp70	Hipertermia local com lipossomas catiônicos magnéticos	Inoculação de CDs imaturas no local da hipertermia	i.t.	Terapêutico	60%	(Tanaka et al., 2005)
Hsp70	Derivada de célula A20	CDs carregadas com HSP derivada de célula tumoral	s.c.	Terapêutico	100%	(Iuchi et al., 2006)
Hsp70	Derivada de célula tumoral P815	CD pulsionada com Hsp purificada	s.c.	Profilático	Retardo no crescimento	(Ueda et al., 2004)

Hsp70	Camundongo	Hipertermia local causada por lipossomas catiônicos magnéticos em por campo magnético	i.t.	Terapêutico	Destruição de células tumorais e resposta imune contra o tumor	(Kawai et al., 2005)
Hsp70 e GP96	Células tumorais B16	CDs carregadas com lisado de células B16	s.c.	Profilático e Terapêutico	Retardo no crescimento tumoral	(Kotera et al., 2001)
Hsp70 e Hsp90 induzíveis	Lisado tumoral de célula PANC02 após ser submetida a choque térmico	CDs carregadas com lisado tumoral	s.c.	Terapêutico	Retardo do crescimento tumoral	(Kim et al., 2006)
Hsp70 e HSV-TK	Humana	Adenovírus co-expressando Hsp70 e HSV-TK	i.t.	Terapêutico	100%	(Ren et al., 2004)
Hsp70 e SEA-TM	Camundongo	Expressas na superfície de células B16	s.c.	Profilático e Terapêutico	80%(P e T)	(Huang et al., 2005)
Hsp70 induzível	Célula CMT93 ou célula K1735	Célula CMT93 ou célula K1735 após choque térmico + CD (não pulsionada)	s.c.	Profilático	Célula CMT93 100% e célula K1735 20%	(Todryk et al., 2004)
Hsp70l1-OVACTL	Humana	Complexo Hsp-peptídeo reconstituído <i>in vitro</i>	s.c.	Profilático	60%	(Wan et al., 2004)
Hsp70-OVA-BIP	Camundongo	Complexo Hsp-peptídeo reconstituído <i>in vitro</i>	i.d.	Profilático e Terapêutico	40% (P) e retardo no crescimento tumoral (T)	(Moroi et al., 2000)
Lisado celular rico em chaperonas	Células 12B1	CDs carregadas com Lisado celular rico em chaperonas	s.c.	Profilático e Terapêutico	90%(P) e 75% (T)	(Zeng et al., 2003)
MAGE-1-Hsp70	<i>M. tuberculosis</i>	Vacina de DNA	i.m.	Terapêutico	30%	(Ye et al., 2004)
mE6Δ/mE7/HSP70Δ	<i>M. tuberculosis</i>	Proteína de fusão	s.c.	Profilático	25%	(Lu et al., 2007)

Introdução

Múltiplas Chaperonas derivadas de tumor (Hsp70, Hsp90, GP96, CRT)	Células tumorais 12B1	Proteínas purificadas	s.c..	Profilático e Terapêutico	Retarda o crescimento tumoral e prolonga a sobrevivência (P e T)	(Graner et al., 2003)
Múltiplas Chaperonas derivadas de tumor (Hsp70, Hsp90, GP96, CRT)	Células tumorais A20	Proteínas purificadas	s.c..	Profilático	10-30%	(Graner et al., 2000)
Sig-E7-Hsp70	Humana	Vacina de DNA contendo peptídeo sinal	i.m.. e i.d..	Profilático e Terapêutico	100% (P) e Redução tumoral (T)	(Hauser et al., 2004)
Hsp70 e B16- SEA	Humana	Células B16 com superantígeno ancorado à membrana e transfectadas com gene da Hsp70	s.c.	Profilático e Terapêutico	Aumento de sobrevida, proliferação linfocitária e supressão crescimento tumoral	(Huang et al., 2004)
Hsp70	Humana	Adenovírus oncolítico expressando Hsp70	i.t.	Terapêutico	Aumento de sobrevida e supressão do crescimento tumoral	(Ren et al., 2008)
Hsp70	Células leucêmicas A20 de camundongo	Proteína purificada	s.c.	Profilático	Aumento da produção de Ac e da citotoxicidade depende de Ac	(Jimbo et al., 2008)
Hsp70	Células de fibrossarcoma WEHI expostas a hipertermia	Lisado total	s.c.	Terapêutico	Aumento da atividade citotóxica específica e mudança para padrão Th1	(Hashemi et al., 2007)
PSCA-Hsp70	Humana	Vacina de DNA	i.m.	Terapêutico	Aumento da resposta T CD8 específica e inibição do crescimento de tumores PSCA ⁺	(Zhang et al., 2007)
Hsp65 e BCG	<i>M. tuberculosis</i>	Vacina de DNA codificando Hsp65. BCG administrado separadamente	i.p.	Profilático	Aumento de sobrevida com participação das células T CD4	(Hara et al., 2004)
MAGE-1/Hsp70/MAGE-3	<i>M. tuberculosis</i>	Proteína de fusão em nanoemulsão	s.c.	Profilático	10-20%	(Ge et al., 2006)

Hsp70-gene com transcrito citotóxico específico	Gene da Hsp70 de camundongo	Vacina de DNA	i.d.	Terapêutico	Rejeição parcial do tumor , aumento de sobrevida e resposta autoimune contra melanócitos normais	(Daniels et al., 2004)
---	-----------------------------	---------------	------	-------------	--	------------------------

Versão modificada da Tabela apresentada na dissertação de Botte (2007).

i.m. – intramuscular; i.d.. –intradérmica; i.t.. – intratumoral; i.p.. – intraperitoneal; s.c. – subcutânea; CTL – linfócitos T citotóxicos; CDs – células dendríticas.

Além dos ensaios pré-clínicos, a promissora ação das Hsps tem levado à intensa pesquisa clínica. Li et al. (2005) observaram que a administração de um complexo formado por Hsp-peptídeo tumoral autólogo combinado à quimioterapia induziu resposta clínica em 7 dos 8 pacientes testados, correlacionada com aumento da produção de IFN- γ na corrente sangüínea, por células T específicas e NK.

Atualmente, muitos ensaios clínicos utilizando Hsps no combate ao câncer estão em andamento ou já finalizados (**Tabela 2**) (www.clinicaltrials.gov), embora apenas parte dos resultados tenha sido publicada até o momento.

Tabela 2. Ensaios clínicos que utilizam Hsps no tratamento de neoplasias

Tratamento	Condição	Título oficial (em inglês)	Ensaio	Status	Referência
Hsp70	Leucemia mielóide crônica	A Feasibility and Toxicity Study of Vaccination With HSP70 for the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia in the Chronic Phase	Fase I	Completo	n.p.
Complexo derivado do tumor gp96-peptídeo (HSPPC-96 ou Oncophage)	Melanoma	A Phase III Study of Heat Shock Protein-Peptide Complex (HSPPC-96) Versus Physician's Choice Including Interleukin-2 and/or Dacarbazine/Temozolomide-Based Therapy and/or Complete Tumor Resection in Stage IV Melanoma	Fase III	Em andamento	n.p.
Complexo derivado do tumor gp96-peptídeo (HSPPC-96 ou Oncophage)	Tumores de cérebro e sistema nervoso central	Phase I/II Trial of Heat Shock Protein Peptide Complex-96 (HSPPC-96) Vaccine for Patients With Recurrent High Grade Glioma	Fase I e Fase II	Recrutando pacientes	n.p.
Complexo derivado do tumor gp96-peptídeo associado a IFN- α e GM-CSF	Melanoma	A phase II trial of vaccination with autologous, tumor-derived heat-shock protein peptide complexes Gp96, in combination with GM-CSF and interferon-alpha in metastatic melanoma patients	Fase II	Completo	Pilla et al., 2006
Vacina de DNA: pNGVL4a-Sig/E7(detox)/Hsp70	Cancer cervical ou Lesão pré-neoplásica	Vaccine Therapy in Preventing Cervical Cancer in Patients With Cervical Intraepithelial Neoplasia	Fase I e Fase II	Em andamento	n.p.
Complexo derivado do tumor gp96-peptídeo (HSPPC-96 ou Oncophage)	Linfoma não-Hodkin	Experience with heat shock protein-peptide complex 96 vaccine therapy in patients with indolent non-Hodgkin lymphoma.	Fase II	Completo	Oki et al., 2007
Complexo derivado do tumor gp96-peptídeo (HSPPC-96 ou Oncophage)	Cancer pancreático	A Phase I Pilot Trial of Immunotherapy With Autologous Tumor-Derived gp96 Heat Shock Protein - Peptide Complex (HSPPC-96) in Patients With Resected Pancreatic Adenocarcinoma	Fase I	Completo	Maki et al., 2007
Vacina de célula tumoral autóloga e Complexo Hsp-peptídeo 96 (HSPPC-96 ou Oncophage)	Sarcoma recorrente	A Phase II Trial of Active Specific Immunotherapy in Patients With Recurrent Soft Tissue Sarcoma Using Autologous Tumor-Derived Heat Shock Protein-Peptide Complex (HSPPC-96)	Fase II	Completo	n.p.

Complexo derivado do tumor gp96-peptídeo (HSPPC-96 ou Oncophage)	Carcinoma renal	An adjuvant autologous therapeutic vaccine (HSPPC-96; vitespen) versus observation alone for patients at high risk of recurrence after nephrectomy for renal cell carcinoma: a multicentre, open-label, randomised phase III trial.	Fase III	Completo	Wood et al., 2008
Complexo derivado do tumor gp96-peptídeo (HSPPC-96 ou Oncophage) com ou sem rhIL-2	Carcinoma renal metastático	Vaccination of metastatic renal cell carcinoma patients with autologous tumour-derived vitespen vaccine: clinical findings	Fase II	Completo	Jonash et al., 2008
Vacina DNA-Hsp65 de <i>M. leprae</i>	Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço	Phase I trial of DNA-Hsp65 immunotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck	Fase I	Completo	Michaluart et al., 2008
n.p. – resultados não publicados					

Nesse contexto, nosso grupo também observou resultados importantes tanto nos ensaios pré-clínicos quanto no ensaio clínico de fase I quando foi utilizada a terapia gênica com Hsp65 de *M. leprae* no tratamento de tumores. Tais resultados serão abordados no tópico subsequente.

3.6. Desenvolvimento da Vacina DNA-Hsp65

No início da década de 90, Silva et al. (1992) iniciaram os estudos utilizando a Hsp65 de *M. leprae* como antígeno para o desenvolvimento de uma vacina contra tuberculose. Estudos envolvendo a transferência adotiva de macrófagos transfectados com vetor retroviral expressando o antígeno Hsp65, induziu proteção contra desafio com cepa virulenta de *M. tuberculosis* (Mtb) H37Rv, em modelo experimental (Silva et al., 1992). Posteriormente, foi demonstrado que plasmídeos contendo o gene *hsp65* também protegeram camundongos contra subsequente desafio com Mtb (Lowrie et al., 1994). Quando administrada por via intramuscular em camundongos desafiados com Mtb ou previamente infectados com os bacilos por via endovenosa, a vacina DNA-Hsp65 apresentou efeito profilático e terapêutico, respectivamente (Lowrie et al., 1997; Lowrie et al., 1999; Bonato et al., 2004). Esses efeitos benéficos da vacina foram associados à participação de células T CD4 e T CD8 produtoras de IFN- γ e produtos citotóxicos, característicos do perfil Th1 de resposta (Silva et al., 1996; Bonato et al., 1998; Lowrie and Silva, 2000). Hoje, o Núcleo de Pesquisa em Tuberculose (NPT) vem se preocupando cada vez mais com a otimização dessa vacina, tanto na redução da dose (Lima et al., 2003); sistemas carreadores, modo e rota de administração (Gonçalves, 2006; Rosada et al., 2008; Souza et al., 2008 – em processo de publicação); bem como na sua biodistribuição (Coelho-Castelo et al., 2006) e segurança (Lima, 2006).

Dentre as estratégias de otimização da vacina DNA-Hsp65 empregadas pelo grupo, uma das abordagens mais efetivas na profilaxia da tuberculose foi a utilização da mesma carreada por lipossomas catiônicos obtidos pelo método da desidratação-reidratação (DRV). De fato, com uma quantidade 16 vezes menor de DNA, essa formulação quando administrada por via intranasal, demonstrou eficiência em primar a resposta imunológica num padrão Th1 protetor, sendo evidente a diminuição significativa do número de unidades formadoras de colônia no pulmão e manutenção da arquitetura pulmonar dos animais vacinados (Rosada et al., 2008).

Basicamente, os lipossomas ou vesículas de fosfolipídios, são agregados de fosfolipídios em estruturas de bicamada, contendo um volume aquoso central circundado por uma ou várias lamelas concêntricas, formando partículas unilamelares ou multilamelares. Durante sua formação, os lipossomas encapsulam parte do meio aquoso em que se encontram dispersos e a bicamada é capaz de acomodar moléculas

hidrofóbicas e hidrofílicas, comportando-se como uma membrana semipermeável com relação ao material encapsulado no volume aquoso das vesículas (Winterhalter and Lasic, 1993; Crommelin and Scherier, 1994). Quando comparados aos outros sistemas carreadores, os lipossomas, além de protegerem as biomoléculas da degradação por nucleases e proteases, sustentam uma liberação controlada do material encapsulado, são biodegradáveis, atóxicos, não imunogênicos, possuem propriedades adjuvantes e são capazes de interagir com as células, pela similaridade de composição das suas membranas (Gregoriadis, 1995; Goyal et al, 2005).

O potencial uso da Hsp65 contra neoplasias foi observado durante os passos iniciais de pesquisa e desenvolvimento de nossa vacina. Nesse contexto, Silva et al. (1993) notaram que macrófagos tumorais da linhagem J774 transfectados com o vetor retroviral pZIPNeoSV(X) carreando o gene da Hsp65 de *M. leprae*, quando injetados na cavidade peritoneal de camundongos, perdiam a capacidade de desenvolvimento de tumor enquanto os animais injetados com a linhagem parental ou transfectada apenas com o vetor desenvolviam massas tumorais volumosas e agressivas. Posteriormente, Lukacs et al. (1993) obtiveram resultados interessantes utilizando camundongos Balb/c imunizados com 4 doses de células CJCL (células J774 permanentemente transfectadas com o gene *hsp65*). Os autores observaram que animais imunizados com as células transfectadas e posteriormente desafiados com a linhagem parental (J774) não apresentavam quaisquer evidências de tumor.

Igualmente, nosso grupo observou que camundongos imunizados com células tumorais J774, Wehi164 ou Pu518 expressando Hsp65 de *M. leprae* e posteriormente desafiados com a linhagem parental, tiveram regressão tumoral significativa. Ainda, observou-se que tanto as populações de células T CD8 como as de T CD4, recuperadas dos animais portadores de tumor previamente vacinados, foram altamente citotóxicas às células de mesma linhagem não transfectadas, indicando um aumento no reconhecimento de antígenos tumorais após a transferência do gene *hsp65* (Silva et al., em preparação).

Numa outra abordagem para avaliação do efeito antitumoral da Hsp65, utilizando a proteína recombinante Hsp65 (rHsp65), nosso grupo observou que animais imunizados com lisado das células CJCL e desafiados com a linhagem parental, inoculados ou não com rHsp65, apresentaram sobrevida semelhante. Entretanto, num protocolo semelhante, quando a rHsp65 foi encapsulada em lipossomas para protegê-la da ação de

proteases, os animais injetados com rHsp65 tiveram aumento de sobrevida e retardo no crescimento tumoral (Botte, 2007).

Esses resultados levaram nosso grupo a propor um estudo clínico de fase I em pacientes terminais com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (sobrevida média de 6 meses), com o intuito de avaliar a segurança, a dose máxima tolerada e a eficácia preliminar da imunoterapia com DNA-Hsp65 nesse tipo de neoplasia. A vacina foi administrada em 21 pacientes com tumor operável e recorrente. Cada paciente recebeu 3 injeções intratumorais, guiadas por ultra-som, nas doses de 150, 600 ou 400µg de DNA-Hsp65, com 21 dias de intervalo entre cada inoculação. Observou-se que a dose máxima tolerada foi de 400µg e que a imunoterapia foi bem tolerada. Nenhum paciente apresentou alterações com indícios de reações auto-imunes. Do mesmo modo, notou-se que quatro dos 14 pacientes que completaram o tratamento apresentaram resposta parcial, dois dos quais estão vivos após mais de três anos da finalização do ensaio (Michaluart et al., 2008).

A idéia da terapia intratumoral foi baseada nas propriedades das Hsps, uma vez que sua introdução diretamente no sítio tumoral poderia levar à complexação com antígenos do tumor, favorecendo a apresentação de diferentes epítomos das células neoplásicas tanto aos linfócitos T CD4 quanto CD8. Além disso, pelas características adjuvantes do DNA plasmideal e das próprias Hsps, poderia haver uma estimulação da resposta imunológica inata no local, favorecendo a produção de citocinas e maturação das células dendríticas num contexto não tolerogênico.

Assim, com base no que foi exposto anteriormente e em decorrência dos resultados obtidos até o momento, nos propusemos investigar de forma mais detalhada, o papel desempenhado pela vacina DNA-Hsp65 no combate a tumores, em modelo de melanoma B16F10, elucidando possíveis formas de atuação no tratamento do câncer. Duas abordagens principais do uso do DNA-Hsp65 foram avaliadas, a terapia administrada por via intratumoral e a inoculação de células B16F10 transfectadas *in vitro* com a vacina DNA-Hsp65. Além disso, avaliamos também a utilização do tratamento intratumoral da vacina DNA-Hsp65 carregada em lipossomas DRV, numa tentativa de melhorar a resposta imunológica.

Objetivos

4. Objetivos

Baseados nas propriedades das Hsps em formar complexos com antígenos tumorais, a hipótese do presente trabalho é de que a introdução da vacina DNA-Hsp65 diretamente no sítio tumoral poderia levar à complexação com antígenos do tumor e favorecer a apresentação de diferentes epítomos das células neoplásicas tanto aos linfócitos T CD4 quanto CD8. Além disso, devido às características adjuvantes do DNA plasmideal e das próprias Hsps, poderia haver estimulação da resposta imunológica inata no local, favorecendo a produção de citocinas e maturação das células dendríticas num contexto não tolerogênico.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antitumoral da vacina DNA-Hsp65 no combate a tumores, em modelo de melanoma B16F10, por meio de duas abordagens principais do uso dessa vacina: terapia administrada por via intratumoral e a inoculação de células B16F10 transfectadas *in vitro* com a vacina DNA-Hsp65. Paralelamente, investigar a utilização do tratamento intratumoral da vacina DNA-Hsp65 carregada em lipossomas DRV.

Materiais e Métodos

5. Materiais e Métodos

5.1. Animais e linhagem B16F10 de melanoma

Camundongos da linhagem C57BL/6, entre 5-8 semanas, provenientes do Biotério de Animais Isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP (FMRP-USP) foram utilizados nos experimentos.

A linhagem de células tumorais utilizada nos estudos foi a B16F10, gentilmente cedida pelo Dr. Marcello Barcinski do Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro. A cultura dessas células foi realizada em meio RPMI-1640 (Sigma, St Louis, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2mM de L-glutamina (Sigma), 1 mM piruvato de sódio (Sigma) e 20mg/ml de gentamicina (Gibco-Invitrogen) e mantidas em estufa a 37°C com densidade de 5% de CO₂. Após atingir a densidade celular desejada, as suspensões celulares foram descoladas das garrafas de cultura com 0,02% EDTA em PBS e as células foram contadas para determinação da viabilidade, ressuspensas em solução salina estéril e livre de endotoxinas.

5.2. Padronização do modelo experimental: Concentração de células B16F10 e avaliação de metástases espontâneas

Camundongos C57BL/6 (n = 27) foram inoculados por via subcutânea (s.c.) no flanco com 5×10^4 , 10^5 , ou 5×10^5 células B16F10. Três camundongos por grupo foram mortos por deslocamento cervical nos dias 10, 15 e 20 para avaliação da massa tumoral (g) e determinação da dose de células mais adequada ao nosso protocolo.

Para análise histológica da ocorrência de metástases espontâneas, foram retirados um fragmento do tumor e um fragmento de pulmão, coração, rins e quando possível, linfonodo inguinal (drenante do tumor). Os materiais obtidos na necropsia nos dias 10, 15 e 20 foram colocados em frascos contendo formalina tamponada a 10%. Posteriormente, os fragmentos foram lavados por 12 horas em água, colocados em cassetes plásticos e mantidos em álcool 70% até o momento do recorte e inclusão em parafina. O processamento histológico seguiu o método convencional e os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Foram feitos 5 cortes de 5µm de cada órgão e 2 cortes de cada tumor emblocado. A avaliação da ocorrência espontânea de metástases foi realizada em

microscópio óptico nos aumentos de 100, 200 e 400x pelo Prof. Dr. Sergio Britto Garcia do Departamento de Patologia da FMRP-USP.

5.3 Formulações Vacinais

5.3.1. Purificação dos plasmídeos

Para realização desse protocolo, uma colônia de bactérias *E. coli* transformada com o plasmídeo pVAX (Vetor) (Invitrogen) ou o plasmídeo recombinante pVAX-Hsp65 (DNA-Hsp65) foi cultivada em placa contendo meio LB Agar (Sigma, Germany) e canamicina (50mg/ml), inoculada em 10ml de LB BROTH BASE (Gibco BRL, Scotland) com canamicina (50µg/ml) e cultivada durante 8 horas a 37°C sob agitação de 250rpm (Incubador shaker series 25, New Brunswick, Edison, EUA). A cultura inicial foi diluída 1/500 em 2,5l de LB contendo canamicina (50µg/ml) e novamente incubada a 37°C sob agitação de 250rpm durante 16 horas.

Após o crescimento, a massa de bactérias foi sedimentada por centrifugação a 4000g por 10 minutos a 4°C. Os plasmídeos pVAX e pVAX-Hsp65 foram purificados por cromatografia de troca iônica conforme as instruções do Endofree Plasmid Giga KitTM (QIAGEN Inc., Valencia, EUA). O DNA obtido foi quantificado no Gene Quant (Pharmacia Biotech) e, em seguida, as amostras de DNA foram digeridas para caracterização e análise da integridade do DNA em gel de agarose 1%. A concentração de endotoxinas na amostra de DNA foi determinada pelo teste de LAL (Limulus Amebocyte Lysate).

5.3.2. Obtenção de Lipossomas pelo método da desidratação-rehidratação (DRVs)

5.3.2.1. Lipossomas Extrudados: LEs

Os lipossomas extrudados foram preparados pelo método de Bangham (Bangham et al., 1965; New, 1990). Soluções estoque para cada um dos lipídios foram preparadas em clorofórmio e armazenadas a -20°C. As soluções lipídicas foram adicionadas na proporção molar percentual DOTAP/DOPE/EPC (25/25/50) em balão de fundo redondo e homogeneizadas durante 5 minutos em evaporador rotatório (ART LAB), em seguida a evaporação do solvente foi realizada sob vácuo relativo de 650mmHg até a formação do filme seco. A seguir, o filme foi hidratado com água de padrão para injeção. Estas

estruturas lipossomais foram, posteriormente, extrudadas 5 vezes em extrusora de aço inox, com volume de 10ml e camisa térmica para a circulação de água, modelo T.001 da Lipex Biomembranes Inc., sob pressão aproximada de 15kgf/cm^2 , utilizando membrana de polycarbonato com diâmetro nominal de poros de 100nm.

5.3.2.2. Lipossomas obtidos pelo método DRV

Os lipossomas DRV foram preparados por meio do método da desidratação-reidratação (Kirby and Gregoriadis, 1984). O método consiste em três etapas: (i) preparação prévia de lipossomas catiônicos extrudados, descrito no item 5.3.3.1.; (ii) desidratação através de liofilização (com congelamento das amostras em nitrogênio líquido e liofilização durante 24 horas); (iii) reidratação das partículas liofilizadas em temperatura superior à de transição de fases dos lipídios. Neste caso, utilizou-se temperatura de 4°C e agitação em vórtice.

5.3.2.3. DNA associado à superfície externa de lipossomas extrudados

A associação/complexação do DNA à superfície externa dos lipossomas DRVs foi realizada por meio da incubação em temperatura baixa (entre 0 e 12°C), obtida com banho de gelo. Basicamente, a solução de plasmídeo foi adicionada em solução de DRV obtido conforme descrito no item 5.3.2.2. e agitada com vórtice durante 40 segundos. As estruturas coloidais geradas foram denominadas DRV-pVAX-Hsp65 (grupo DRV-DNAHsp65). O diâmetro hidrodinâmico e distribuição de tamanhos das estruturas coloidais foram determinados por espalhamento da luz, através de espectroscopia de correlação de fótons (PCS) utilizando laser de alta potência, em equipamento Malvern Autosizer 4700.

A formulação dos lipossomas, a encapsulação dos plasmídeos, a caracterização físico-química e o aprimoramento dessas construções foram realizados pela Dra. Lucimara Gaziola de la Torre, sob supervisão da Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana do Departamento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP. A determinação das dimensões, caracterização por microscopia eletrônica e determinação da citotoxicidade das estruturas DRV foi realizada previamente (Rosada et al., 2008).

5.4. Transfecção in vitro das células B16F10

5.4.1. Marcação do DNA plasmideal

O DNA plasmideal (pVAX-Hsp65 ou pVAX) foi marcado com fluorocromo Alexa 488 (verde) ou Alexa 594 (vermelho), utilizando-se o sistema ULYSIS® (Molecular Probes, Eugene, EUA), com algumas modificações. Esse sistema de marcação utiliza um método químico denominado de Universal Linkage System™ (ULS) que permite a ligação estável do fluorocromo na porção N₇ da base guanina. Para realização da marcação, todo o procedimento foi realizado em ambiente estéril sob proteção da luz. Em um tubo de ultracentrifugação de 0,2ml foram pipetados 1µl de DNA plasmideal na concentração de 10µg/µl e 19µl do tampão de marcação. Em seguida, o DNA foi desnaturado a 95°C por 5 minutos no termociclador (MJ Research – PTC 200). Após esse período, o tubo foi colocado em gelo e foi adicionado 1µl do reagente ULS (contendo o fluorocromo) e 3,5µl do tampão de marcação. A reação foi incubada a 80°C por 15 minutos. DNA foi precipitado pela adição de 100µl de isopropanol à amostra, sendo mantido por toda a noite a -20°C.

Após esse período, o tubo com a amostra foi centrifugado a 12.000g durante 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em água estéril livre de DNase (QIAGEN). O DNA marcado foi armazenado a -20°C até o momento de uso.

5.4.2. Padronização da eletroporação das células B16F10

A técnica de eletroporação foi utilizada por facilitar a entrada do DNA plasmideal (vacina DNA-Hsp65) devido à abertura de poros na membrana das células. Primeiramente, as células B16F10 mantidas em cultura foram removidas da garrafa e a viabilidade foi avaliada em câmara de Neubauer com azul de Trypan a 0,2%. A suspensão celular foi centrifugada a 1.500g por 10 minutos e ressuspendida em meio Opti-MEN 1 (Gibco-Invitrogen) na concentração de 5×10^5 células/ml, sendo distribuídos 200µl dessa suspensão de células em cubetas de eletroporação de 4mm². Em seguida, foram adicionados 10µg de DNA-Hsp65 marcado com Alexa 488 (marcação descrita item 5.4.1.) a 2 cubetas distintas e foram testados 2 protocolos de

eletroporação (Gene Pulser Xcell Electroporation System – BIO RAD). Para cada protocolo, foi utilizado como controle da eletroporação uma cubeta apenas com células, denominado Mock.

Protocolo 1:

Foi utilizada uma modificação dos parâmetros de eletroporação descritos por Cemazar et al., (1998) no qual há utilização de células B16F1. Resumidamente, foram dados 2 fusos de 600V com intervalos de 5 segundos entre cada fuso e pulsos no sistema “square wave”.

Protocolo 2:

Foram utilizados parâmetros de eletroporação pré-estabelecidos para células Hela. Foram dados pulsos com 500 μ F, resistência (Ω) ∞ e 160V no sistema “exponential decay”.

Os passos seguintes foram comuns aos 2 protocolos:

Assim, após terminada a eletroporação, a viabilidade das células foi avaliada em câmara de Neubauer com 0,2% de azul de Trypan. Em seguida, a porcentagem de células transfectadas foi avaliada por FACS. Para tanto, as células B16F10 foram centrifugadas a 1500g por 10 minutos, ressuspensas em 200 μ l de Formol a 1% em PBS e analisadas quanto à marcação com Alexa 488, o que indica a entrada do DNA-Alexa 488 nas mesmas.

5.4.3. Avaliação da proliferação celular de B16F10 após eletroporação

Células B16F10 foram colocadas em cubetas estéreis para eletroporação e eletroporadas segundo o Protocolo 2 (descrito item 5.4.2.). Em seguida, a suspensão de células foi transferida para um tubo estéril de 15ml do tipo Falcon, centrifugadas a 1500g por 10 minutos e ressuspensas em meio RPMI completo. As células foram transferidas, em triplicata, para placa de cultura de 96 poços (Corning NY, USA) na concentração de 10^5 células/poço em 100 μ l de meio RPMI completo. As células foram divididas da seguinte forma:

Células Mock – células eletroporadas sem adição de DNA

Células + Vetor – células eletroporadas em presença de 10µg do vetor (pVAX)

Células + DNA-Hsp65 – células eletroporadas em presença de 10µg da vacina (pVAX-Hsp65)

Células B16 selvagens - células não eletroporadas (controle positivo)

Devido à rápida proliferação da linhagem B16F10, a adição de 0,5µCi de [³H] – timidina/poço foi feita assim que as células foram plaqueadas e a cultura foi mantida em estufa com 5% CO₂ a 37°C por 30h. Após esse período, as culturas foram recuperadas por meio de um coletor de células (Inotech) em papel de fibra de vidro e colocados em frascos contendo líquido de cintilação (OptiPhase ‘HiSafe’ 3- Perkin). A incorporação da [³H] – timidina foi determinada em contador de cintilação β.

5.5. Delineamentos experimentais

Os delineamentos dos grupos experimentais encontram-se abaixo e as figuras esquemáticas estão apresentadas nos resultados.

5.5.1. Delineamento Experimental I: Tratamentos por via intratumoral

Camundongos C57BL/6 fêmeas foram aleatoriamente distribuídos em grupos os quais foram inoculados s.c. no flanco com 5×10^4 células de linhagem de melanoma B16F10, singeneica para os mesmos. Dez dias após a implantação do tumor [volume do tumor (diâmetro maior² x diâmetro perpendicular) = $\sim 8\text{mm}^3$], o tratamento por via intratumoral com diferentes formulações foi iniciado. Foram realizados 3 delineamentos experimentais.

5.5.1.1. Estudo de sobrevida e da resposta imune induzida pela Vacina DNA-Hsp65

Os animais receberam 1, 2 ou 3 injeções intratumorais de 100µl de solução salina, do Vetor (pVAX) ou da Vacina DNA-Hsp65 (pVAX-Hsp65) na concentração de 1µg/µl, com 4 dias de intervalo entre cada inoculação.

Os grupos experimentais (n = 5 - 6) foram os seguintes:

Grupo Salina: Animais tratados com 1 inoculação de 100µl de salina

Grupo Vetor: Animais tratados com 1 inoculação de 100µl de vetor pVAX (1µg/µl)

Grupo DNA-Hsp65: Animais tratados com 1 inoculação de 100µl de pVAX-Hsp65 (1µg/µl)

Grupo Salina (2x): Animais tratados com 2 inoculações de 100µl de salina

Grupo Vetor (2x): Animais tratados com 2 inoculações de 100µl de vetor pVAX (1µg/µl)

Grupo DNA-Hsp65 (2x): Animais tratados com 2 inoculações de 100µl de pVAX-Hsp65 (1µg/µl)

Grupo Salina (3x): Animais tratados com 3 inoculações de 100µl de salina

Grupo Vetor (3x): Animais tratados com 3 inoculações de 100µl de vetor pVAX (1µg/µl)

Grupo DNA-Hsp65 (3x): Animais tratados com 3 inoculações de 100µl de pVAX-Hsp65 (1µg/µl)

Os animais foram acompanhados até sua morte para avaliação da sobrevida.

Posteriormente, por ter sido o protocolo vacinal mais interessante, a resposta imune induzida pela Vacina DNA-Hsp65 em dose única foi avaliada. Desse modo, os animais (n = 6 - 7 por grupo) foram tratados com 1 dose de 100µl (1µg/µl) da Vacina DNA-Hsp65 (pVAX-Hsp65), Vetor (pVAX) ou Salina e ao final de 18 dias todos os animais foram mortos para obtenção de células do lavado peritoneal, remoção do baço e do tumor.

As células do lavado peritoneal e o baço foram removidos de forma estéril para realização de co-cultura e posterior teste de citotoxicidade. O tumor foi removido, pesado e, quando possível, dividido em 3 fragmentos para análise histológica e imunoistoquímica, avaliação das células imunes infiltrantes por citometria de fluxo e

obtenção do RNA mensageiro (RNAm) total para avaliação da expressão gênica de T-bet, GATA-3 e IL-17 por RT-PCR em tempo real.

5.5.1.2. Estudo de sobrevida e da resposta imune induzida pela vacina DNA-Hsp65 adsorvida a lipossomas DRV

Os animais receberam por via intratumoral uma única dose de 100µl da Vacina DNA-Hsp65 (pVAX-Hsp65) ou de lipossomas DRV adsorvidos com pVAX-Hsp65 (DRV-pVAX-Hsp65) na concentração de 1µg/µl e 0,5µg/µl respectivamente ou Salina como controle.

Os grupos experimentais (n = 12) foram os seguintes:

Grupo Salina: Animais tratados com 100µl salina;

Grupo DNA-Hsp65: Animais tratados com 100µl de pVAX-Hsp65 (1µg/µl)

Grupo DRV-DNAHsp65: Animais tratados com 100µl de lipossomas DRV contendo pVAX-Hsp65 (0,5µg/µl) associado à sua superfície (DRV-pVAX-Hsp65)

Seis animais de cada grupo foram mortos ao final de 22 dias, permitindo assim um maior tempo para liberação da vacina pela formulação. Foram obtidas as células do lavado peritoneal e foram removidos baço e tumor. As células do lavado peritoneal e o baço foram removidos de forma estéril para realização de co-cultura e posterior teste de citotoxicidade. O tumor foi removido, pesado e dividido em 2 fragmentos para análise histológica e avaliação das células imunes infiltrantes por citometria de fluxo.

Paralelamente, 6 animais de cada grupo foram acompanhados até sua morte para análise da taxa de sobrevivência.

5.5.2. Delineamento Experimental II: Estudo de sobrevida e da resposta imune induzida pelas células B16F10 previamente transfectadas com DNA-Hsp65

Camundongos C57BL/6 foram aleatoriamente distribuídos em 3 grupos os quais foram inoculados s.c. no flanco com 5×10^4 células B16F10 viáveis previamente eletroporadas na presença ou não de 10µg de DNA plamideal (Vetor ou Vacina DNA-Hsp65).

Os grupos experimentais (n = 6 – 7) foram os seguintes:

Grupo B16-Mock: Animais que receberam células eletroporadas não transfectadas

Grupo B16-Vetor: Animais que receberam células transfectadas com o vetor pVAX

Grupo B16-DNAHsp65: Animais que receberam células transfectadas com a vacina DNA-Hsp65 (pVAX-Hsp65)

Ao final de 18 dias de experimento, os grupos foram mortos para obtenção de células do lavado peritoneal, remoção do baço e do tumor. As células do lavado peritoneal e o baço foram removidos de forma estéril para realização de co-cultura e posterior teste de citotoxicidade. O tumor foi removido, pesado e, quando possível, dividido em 3 fragmentos para análise histológica e imunoistoquímica, avaliação das células imunes infiltrantes por citometria de fluxo e obtenção do RNAm total para avaliação da expressão gênica de T-bet, GATA-3 e IL-17 por RT-PCR em tempo real.

Para o estudo de sobrevivência, os animais foram acompanhados até sua morte.

Nos estudos de sobrevivência, por questões éticas, os animais que se apresentavam caquéticos ou com dificuldade de locomoção foram sacrificados por deslocamento cervical e a data do sacrifício foi utilizada como dia da morte na análise.

5.6. Avaliação da expressão gênica no tumor

5.6.1. Obtenção do RNA total do tumor

O fragmento de tumor destinado à detecção do RNAm para Hsp65 foi colocado em criotubos novos com 1ml de Trizol (Invitrogen, USA). Os tubos foram deixados no gelo e o tumor foi homogeneizado. O tumor homogeneizado foi congelado a - 70°C até o momento da manipulação.

Logo após descongeladas, as amostras foram transferidas para um tubo de ultracentrifugação de 1,5 ml livre de RNase. Em seguida as amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas e 200µl de clorofórmio foram adicionados. O material foi agitado vigorosamente por 15 segundos e mantido por 3 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C e a fase aquosa foi cuidadosamente retirada e transferida para um novo tubo. O RNA, presente na fase aquosa, foi precipitado com 500µl de isopropanol por no mínimo 16 horas a -20°C. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C e o precipitado foi ressuspensionado em 500µl de etanol 75% em água Milli-Q com 0,1% de dietilpirocarbonato (Sigma) (água DEPC 0,1%). Em seguida, a amostra foi novamente centrifugada a 7500g por 6 minutos a 4°C, ressuspensionada em 20µl de água livre de RNases (GIBCO) e estocada a -70°C. O RNA total de cada amostra foi quantificado por espectrofotometria a 260nm utilizando o aparelho GeneQuant II_{TM} (Amershan, BioSciences, Upsala, Suécia).

Para avaliar a integridade dos RNAs, foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1,5% com tampão de Tris-base, ácido acético e EDTA (tampão TAE) 50x diluído para 1x em água DEPC. Previamente, a cuba, o suporte e os “pentes” foram tratados com NaOH 1M durante 30 minutos, e em seguida os materiais foram lavados com água DEPC 0,1%. A corrida eletroforética foi realizada a 50V por cerca de 2 horas e a visualização das bandas foi feita em luz ultravioleta no aparelho Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

5.6.2. Confecção do DNA complementar (cDNA)

O RNA total foi tratado com a enzima DNase I amplification grade (Invitrogen) para completa degradação de DNA, eliminando assim a possibilidade de contaminação com o DNA genômico ou plasmideal. A digestão foi realizada segundo as instruções do fabricante. Os RNAs foram diluídos em água DEPC 0,1% e a concentração final foi acertada para 1µg/µl. Para cada 1µg de RNA foram adicionados 1µl de tampão de reação DNase I 10x, 1µl DNase I Amp Grade (1U/µl) e completados para 10µl com água DEPC (concentração final DNase de 0,1 U/µl). A reação foi mantida por 15 minutos a 25°C e inativada com a adição de 1µl de EDTA 25mM seguido de 15 minutos de incubação a 65°C.

O cDNA foi sintetizado a partir 1 µl de amostra (1µg/µl) com primer oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen) com 1µl da enzima transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen) em 10µl de solução de volume final contendo tampão da enzima 5x (2,5µl), DTT 1M (2,5µl), MgCl₂ (0,5µl) e 1µl da mistura de desoxinucleotídeos sintéticos (adenina, guanina, citosina e timidina) (concentração final de 1:10 para cada desoxinucleotídeo

diluídos em água de PCR). O produto final da reação foi dosado por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 a 280nm utilizando-se o aparelho GeneQuant II_{TM} (Amersham, BioSciences, Suécia).

5.6.3. “Real-time PCR”

Para cada reação foram utilizados 200ng ou 1µg de cDNA de acordo com a necessidade, 0,1µg/µl de cada *primer* (sense e anti-sense) e 12,5 µl de Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) em um volume final de reação de 25 µl. A temperatura de anelamento utilizada foi de 58°C, e os genes amplificados e os *primers* utilizados estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3. *Primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real

Primer	Seqüência
β-actina sense	AGC TGC GTT TTA CAC CCT TT
β-actina anti-sense	AAG CCA TGC CAA TGT TGT CT
GATA-3 sense	AGG AGT CTC CAA GTG TGC GAA
GATA-3 anti-sense	TTG GAA TGC AGA CAC CAC CT
T-bet sense	CCC CTG TCC AGT CAG TAA CTT
T-bet anti-sense	CTT CTC TGT TTG GCT GGC T
IL-17 sense	TGC CCT CCA CAA TGA AAA GA
IL-17 anti-sense	AAC ACG AAG CAG TTT GGG AC

As reações foram feitas no aparelho Rotor-gene (Corbett Life Science, Mortlake, NSW, Australia) e a expressão relativa de cada gene nas amostras foi calculada. O cálculo foi feito como descrito por Zhu et al. (2003) (mais detalhes – ver Anexo 1). Resumidamente, os dados foram inseridos na equação 2 (Anexo 1), $\rho_x = (1+E\beta)^{[\Delta Ct_{\beta}^{AB} - (R\beta/Rx) (\Delta Ct_{\beta}^{BA})]}$, essencialmente equivalente a: [expressão gênica relativa dos Grupos Vetor ou DNA-Hsp65; B16-Vetor ou B16-DNAHsp65, normalizados pela β – actina] / [expressão gênica relativa dos Grupos Salina ou B16-Mock, respectivamente, normalizados pela β-actina]

5.7. Avaliação da expressão da Hsp65 recombinante (rHsp65) no tumor

5.7.1. Obtenção da rHsp65

O gene da Hsp65 de *M. leprae* foi clonado no vetor pET28 (Novagen) e a proteína expressa em *E. coli* (cepa ER2566). A cepa congelada contendo a construção de interesse foi plaqueada em meio LB ágar contendo canamicina (30µg/ml) e incubada a 37°C durante a noite. No dia seguinte, uma colônia isolada foi semeada em 10ml de meio LB contendo canamicina (30µg/ml) durante a noite a 37°C e 250rpm. Na manhã do dia seguinte, este 10 ml do inóculo inicial foram diluídos em 1:5 (volume final de 50ml) em meio LB contendo canamicina (30µg/ml) e incubado a 37° C e 250rpm por 6 horas.

Após este tempo, o inóculo foi dividido em duas partes e cada uma delas foi diluída 50x em meio LB contendo canamicina (30µg/ml) e incubada por 3 horas a 37°C e 250rpm, perfazendo um volume final total de 2,5l. A indução da expressão da proteína foi realizada quando a densidade óptica (DO) em 600nm atingiu o valor de 0,6 pela adição de IPTG para uma concentração final de 0,3mM. A cultura foi incubada a 30° C e 250rpm durante a noite. No dia seguinte, as células foram coletadas por centrifugação a 4000g por 15 minutos e ressuspensas em tampão 1 (Na₂HPO₄ a 0,02M, NaCl a 0,15M e imidazol a 50mM pH7,2) na proporção de 25ml para cada 10g de sedimento (40% massa/volume). As células foram rompidas por ultra-som em 5 pulsos de 30 segundos (60Hz). A suspensão foi centrifugada a 20000g por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspendido em tampão 1 contendo uréia a 2M e 1% de Tween 20 na proporção 10% m/v e a suspensão resultante foi homogeneizada à temperatura ambiente por 10 minutos. Este procedimento foi realizado uma segunda vez, porém com o tampão sem Tween 20. A suspensão resultante desta segunda homogeneização foi centrifugada a 20.000g por 15 minutos, o sedimento ressuspendido em tampão U1 (Uréia a 5M, Na₂HPO₄ a 0,02M, NaCl a 0,15M e imidazol a 50mM, pH7,2) 10% m/v. A suspensão foi mantida por agitação suave à temperatura ambiente por 1 hora e centrifugada a 20000g por 20 minutos. O sobrenadante foi recolhido e filtrado em membrana 0,45µm.

Após determinação da quantidade de proteínas do extrato bacteriano pelo método de Coomassie Reagent Assay (Pierce), a amostra foi submetida à cromatografia em coluna HisTrap Chelating HP em sistema ÄKTA purifier (GE) tendo como limite de injeção a quantidade de 12mg/ml de resina. A coluna foi equilibrada com tampão U1, sendo este

usado para retirar material não adsorvido à coluna. As proteínas adsorvidas à coluna foram eluídas com tampão U2 (Uréia 5M, Na₂HPO₄ 0,02M, NaCl 0,15M e imidazol 300mM, pH = 7,2). A amostra eluída foi dialisada contra PBS em membrana de celulose (Dyalisis tubing cellulose - 33mm x 21mm) (Sigma-Aldrich). Essa preparação foi analisada quanto à quantidade de proteínas utilizando-se Coomassie Reagent Assay (Pierce). A homogeneidade da preparação foi avaliada por SDS-PAGE a 10% desnaturante, com as proteínas coradas por azul de Comassie. A concentração de endotoxinas na rHsp65 foi determinada pelo teste de Limulus Amebocyte Lysate (LAL) (CAMBREX) e a mesma foi utilizada como controle positivo para análise da expressão da proteína recombinante no ambiente tumoral.

5.7.2. Extração de proteínas do tecido tumoral

Camundongos C57BL/6 foram s.c. injetados com 5×10^4 células B16F10. Dez dias após a implantação tumoral, 27 animais foram tratados por via intratumoral com 100µl (1µg/µl) de DNA-Hsp65 (n = 18) ou solução salina isotônica (n = 9). Após 1, 4 ou 8 dias do tratamento, os animais foram mortos para remoção do tumor, o qual foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido. Os tumores foram mantidos a -70°C até o momento do processamento (período máximo de 1 mês).

O material tumoral, ainda congelado, foi macerado com auxílio de pilão e cadinho. Adicionaram-se entre 300 e 500µl de tampão de lise RIPA (Tris a 50mM, pH 8,0, NaCl a 150mM, Duodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 0,1%, IgePal a 1%, Deoxiglicolato de sódio a 0,5%) acrescido de um coquetel de inibidores de proteases [leupeptina 10 µg/ml; 1mM de ditioneitol (DTT); 1mM de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e 1mM de EDTA] (AMRESCO Sólton, Ohio). Após homogeneização, o material foi deixado a 4°C por 30 minutos sob agitação constante. Em seguida, o mesmo foi centrifugado a 20.000g por 25 minutos a 4°C e o sobrenadante foi recolhido e fervido por 10 minutos. Todas as amostras foram quantificadas pelo método colorimétrico de Coomassie (Coomassie Bradford - Protein Assay Kit – PIERCE, IL).

5.7.3. Avaliação da expressão da proteína recombinante Hsp65 no tumor por Western Blot

Aos sobrenadantes obtidos (item 5.7.2.) de cada amostra foi acrescido tampão da amostra numa concentração final de 40mM de Tris-HCl pH 6,8, 72mM SDS, glicerol a

10%, azul de bromofenol 0,01% e 2-mercaptoetanol a 2,5%. Foram aplicados 1,8µg das amostras e 2,5µg da proteína rHsp65 purificada (controle positivo), em seguida, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (tampão de corrida-Tris-base a 125mM, glicina a 960mM, SDS a 170mM, pH 8,3) por 30 minutos a 50V e em seguida 1 hora e 30 minutos a 100V, para análise do tamanho das proteínas (kDa), foi aplicado no gel o padrão de “peso” molecular (proteínas com massas moleculares conhecidas e utilizadas como marcador) (Invitrogen ou Fermentas). Foram feitos dois géis, um deles foi corado com Comassie para visualização do padrão de corrida das proteínas extraídas do tumor e o outro foi utilizado para a avaliação da expressão da proteína recombinante por *Western Blot*. Para isso, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitocelulose (Life Technologies) por 1 hora e 30 minutos a 100V (Tampão de transferência-Tris-base 22,7mM, glicina 61mM, metanol 18,3%, pH 8,3). Em seguida, a membrana foi incubada com tampão de bloqueio (PBS 1X, 10% BSA-Albumina Bovina (INLAB), 0,05% Tween 20) por toda a noite a 4°C e em seguida a membrana foi lavada (PBS 1x, 0,05% Tween 20). Previamente, o anticorpo anti-Vac1 policlonal* foi adsorvido com 1ml de lisado total de células B16F10 (~ 7mg/ml de proteína) por 1 hora a 4°C para redução de background na marcação. Na sequência, o anticorpo anti-Vac 1, com lisado celular, foi diluído 1:1000 em tampão de bloqueio e incubado com a membrana por 2 horas em temperatura ambiente. Após esse período, a membrana foi novamente lavada e incubada com o anticorpo de cabra anti-IgG total de camundongo conjugado com peroxidase (Molecular Probes) diluído 1:5000 em tampão de bloqueio por 1 hora a temperatura ambiente. A membrana foi revelada com diaminobenzidina (DAB) (Vector Peroxydase Substrate Kit).

* O anticorpo anti-Vac1 foi produzido em camundongos Balb/c pela imunização com 50µg da proteína recombinante Vac1 juntamente com adjuvante incompleto de Freund em três doses com intervalos de 15 dias; o soro foi coletado 20 dias após a última imunização. A proteína recombinante Vac1 compreende 5 epítomos da Hsp65 e foi expressa e purificada em nosso laboratório (Rios, dissertação em andamento).

5.8. Obtenção do lisado total de células B16F10

As células B16F10 foram lisadas utilizando-se sonicador (Vibra Cell – Sonic Materials). Inicialmente, a sonda do sonicador foi tratada com solução de NaOH a 1M por 1 hora para eliminação de endotoxinas e em seguida lavada exaustivamente com água Milli-Q. Paralelamente, células tumorais B16F10 mantidas em cultura foram removidas da garrafa e transferidas para um tubo estéril de 50ml do tipo Falcon. A suspensão celular foi centrifugada a 1500g por 10 minutos e ressuspendida em solução salina isotônica. O procedimento foi repetido 3 vezes para total remoção do meio RPMI. Logo após, em cabine de fluxo laminar, a suspensão de células foi submetida a 3 ciclos de sonicação de 30 segundos (40A) com intervalos de 1 minuto em gelo entre cada ciclo. Em seguida, o lisado foi centrifugado a 1500g por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o pellet descartado.

As proteínas do lisado total obtido foram quantificadas por Coomassie, a concentração de endotoxinas foi determinada pelo teste de LAL (CAMBREX) e a solução foi congelada a - 20°C até o momento de uso.

5.9. Análise de marcadores de superfície celular

5.9.1 Dissociação da massa tumoral

Foram testados 2 protocolos de digestão enzimática com Liberase (Liberase Blendzyme – Roche) para obtenção de células do tumor e como controle da reação, um fragmento de pulmão foi digerido pelos mesmos protocolos.

Três camundongos C57BL/6 foram inoculados com 10^6 células B16F10 e após intervalo de 7 dias, tumor e pulmão foram retirados e divididos para seguir dois protocolos distintos de digestão.

Protocolo 1

Os fragmentos de tumor foram cortados em fragmentos ainda menores e transferidos para tubos de 50ml contendo 15ml de meio Hanks livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} (Invitrogen) e Liberase (6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) para cada amostra e, em seguida, incubados a 37°C, sob agitação constante, durante 30 minutos.

Protocolo 2

Os fragmentos de tumor foram cortados em fragmentos ainda menores e transferidos para tubos de 50ml contendo 10ml de meio RPMI com 0,03g de EDTA e Liberase (6µg/µl) para cada amostra e, em seguida, incubados a 37°C, sob agitação constante, durante 2 horas e 30 minutos.

Após o período de incubação, o procedimento foi idêntico para os 2 protocolos. Dessa forma, as células foram divulsionadas com o auxílio de uma seringa de 10ml. A suspensão contendo as células e os fragmentos de tumor ou pulmão foi centrifugada a 1500g, durante 5 minutos, e o precipitado ressuspensionado em 10 ml de meio RPMI com 10% de soro bovino fetal para bloquear a ação da Liberase. Em seguida, as células e o restante dos fragmentos teciduais foram ressuspensos em tampão de lise e centrifugados a 1500g para a coleta do precipitado. Este foi ressuspensionado em 5 ml de RPMI incompleto e transferido para uma peneira de aço inoxidável (malha no 100, SIGMA) para a obtenção das células isentas dos fragmentos teciduais. Na sequência, as células foram coletadas por centrifugação a 1500g, ressuspensionadas em meio de cultura ou PBS, contadas em Câmara de Neubauer com azul de trypan 0,2% e marcadas com anticorpo anti-CD4 (FITC) e anti-CD8 (PE) para escolha do protocolo de dissociação mais adequado.

5.9.2. Avaliação da expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo

Os fragmentos de tumor obtidos dos diferentes grupos experimentais foram dissociados por meio do Protocolo 1 (descrito no item 5.9.1.) e as populações das células imunes infiltrantes no tumor foram caracterizadas pela expressão de marcadores de superfície utilizando anticorpos conjugados a FITC ou PE, avaliados por citometria de fluxo.

A caracterização das populações de linfócitos T do infiltrado tumoral foi realizada com anticorpos anti-CD4, anti-CD8, e anti-CD44. Para caracterização das células dendríticas e macrófagos, foram respectivamente utilizados anticorpos anti-CD11c e anti-CD11b e analisados quanto à expressão de CD86.

O número de células nas suspensões foi acertado para 1×10^6 células/ml em PBS. A seguir, 100µl de cada suspensão celular foram distribuídos em tubos para citometria de fluxo. As células foram, então, incubadas com anticorpo anti-CD16/CD32 (Fc Block™

- PharMingen) na concentração de $0,5\mu\text{g}/10^6$ células durante 45 minutos a 4°C para evitar a ocorrência de ligações inespecíficas. Posteriormente, as células foram incubadas com os respectivos anticorpos monoclonais de interesse ($0,5 - 0,75 \mu\text{g} / 10^6$ células) durante 30 minutos, a 4°C , no escuro. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS contendo 2% de soro bovino fetal por tubo, sendo o precipitado celular coletado por meio de centrifugação a 1500g durante 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento celular ressuspensionado em 500 μl de PBS contendo 1% de formaldeído para a fixação das células. As preparações de células tumorais foram adquiridas no FACSsort (Becton & Dickinson) e foram coletados aproximadamente 50.000 eventos.

5.10. Teste de citotoxicidade

5.10.1. Padronização do teste de citotoxicidade

Seis camundongos C57BL/6 foram injetados s.c. com 5×10^4 células B16F10 e após 10 dias da implantação do tumor os animais foram mortos para obtenção de macrófagos do lavado peritoneal (Protocolo 2) e remoção do baço de forma estéril.

Dois protocolos foram testados:

Protocolo 1:

Baço de 3 animais foram removidos e colocados em placas de Petri estéreis, contendo 2ml de RPMI 1640 (SIGMA) incompleto. Em seguida, os baços foram macerados, ressuspensionados em tampão de lise e centrifugados a 1500g por 10 minutos. O sedimento celular foi ressuspensionado em meio RPMI e a partir dessa suspensão os linfócitos T CD8 foram obtidos.

Protocolo 2:

Foram coletadas células do lavado peritoneal e baço de 3 animais. Os macrófagos do lavado peritoneal, coletados em solução salina isotônica, foram contados, centrifugados e ressuspensionados em meio RPMI completo. Os mesmos foram plaqueados em placa de cultura de 24 poços (Corning NY, EUA) na concentração de 2×10^5 células por poço e deixados aderir por 2 horas. Em seguida, essa cultura de macrófagos foi pulsada com 30 μg de lisado total de células B16F10. Paralelamente, os baços removidos foram macerados, ressuspensionados em tampão de lise e centrifugados a 1500g por 10 minutos.

As células foram ressuspensas em meio RPMI completo e a concentração celular foi acertada para 5×10^6 células/poço colocadas em co-cultura com os macrófagos previamente plaqueados. A co-cultura foi deixada em estufa a 37°C com 5% CO₂ por 4 dias.

Após esse período, o meio juntamente com as células foi removido com auxílio de pipeta e os poços foram lavados com 4ml de PBS estéril livre de endotoxinas. A partir dessa suspensão, as células T CD8 foram obtidas.

Os passos seguintes foram comuns aos dois protocolos:

A obtenção dos linfócitos T CD8 (células efetoras) foi realizada por separação com esferas magnéticas adsorvidas com anticorpos anti-CD8 e foi avaliada a citotoxicidade específica mediada pelas células T CD8 contra as células tumorais B16F10 (células alvo). O ensaio foi realizado em triplicata e foram empregadas as razões 1:1, 5:1 e 20:1 (efetora:alvo). Finalmente, a co-cultura alvo-efetora nas diferentes razões foi incubada por 4 ou 18 horas, a citotoxicidade por liberação de lactato desidrogenase (LDH) foi avaliada e o protocolo mais adequado foi selecionado.

5.10.2 Obtenção de células T CD8 por separação com esferas magnéticas

Após a obtenção e contagem das células totais de baço da co-cultura (Protocolo 2 item 5.10.1.), foi realizada a separação dos linfócitos T CD8 (células efetoras) com esferas magnéticas adsorvidas com anticorpos anti-CD8 (Miltenyi Biotec, Auburn, EUA) para posterior realização do teste de citotoxicidade. As células totais foram centrifugadas a 1500g durante 10 minutos para remoção do meio RPMI. O botão celular foi ressuspendido em tampão de separação por esferas magnéticas (PBS livre de Ca²⁺ e Mg²⁺ com soro bovino fetal a 0,5%, ACD a 0,6% e azida a 0,01%) e para cada 10⁷ células foram adicionados 10µl de anticorpos anti-CD8 complexados a esferas magnéticas. A suspensão celular foi homogeneizada e incubada a 4°C durante 15 minutos. Decorrido este período, foram acrescentados 1-2 ml do tampão e a suspensão celular foi centrifugada por 5 minutos a 1500g. O sobrenadante foi vertido e as células ressuspensas em 500µl de tampão para um máximo de 10⁸ células.

Paralelamente, colunas LS (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), para separação de células ligadas a esferas magnéticas, foram calibradas com o tampão de separação descrito acima. Uma vez prontas, as suspensões de células foram aplicadas às colunas

acopladas a um campo magnético. Após a aplicação da amostra, as colunas foram lavadas com o tampão de separação, removendo-se as células não CD8⁺.

Para obtenção das células T CD8, a coluna foi desacoplada do campo magnético e transferida para um tubo estéril tipo Falcon e novamente lavada com tampão. Em seguida, com auxílio da pressão de um êmbolo, as células T CD8 antes ligadas à coluna, foram liberadas e recolhidas para realização do teste de citotoxicidade.

Devido à obtenção de baixa quantidade de células T CD8, no experimento do delineamento 5.5.1.2. a co-cultura foi pulsada com 5000UI de IL-2 recombinante humana (rhIL-2) para cada 5×10^5 células de baço (Proleukin – Interleucina- 2 recombinante IL-2r Aldesleucina) (mais detalhes – ver Anexo 2).

5.10.3 Avaliação da citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8

A suspensão de células T CD8 (células efetoras) foi centrifugada por 10 minutos a 1500g, ressuspendida em meio RPMI 1640 livre de Vermelho Fenol (Gibco-Invitrogen) com 1% de soro bovino fetal, sendo sua concentração avaliada em câmara de Neubauer em 0,2% de Trypan. Após a contagem, as células T CD8 foram colocadas em placas de 96 poços de fundo em “U” (Corning Nova Iorque, EUA). Paralelamente, as células B16F10 (células alvo) mantidas em cultura foram contadas em câmara de Neubauer com 0,2% de Trypan e ressuspendidas no mesmo meio das células T CD8. A seguir, as células B16F10 foram colocadas em co-cultura com os linfócitos T CD8 previamente pipetados na razão de 20:1 (efetoras:alvo). O estudo foi realizado em triplicata.

A co-cultura foi mantida em estufa a 37°C com densidade de 5% de CO₂ por 18 horas. Após esse período, as placas foram centrifugadas a 1500g por 10 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para uma placa nova. Os sobrenadantes foram avaliados quanto à liberação de LDH utilizando Cytotoxicity Detection Kit (Roche Applied Science). Aos sobrenadantes foi adicionada uma mistura de reação contendo diaforase (catalisador) e solução de revelação (sal tetrazolium). A seguir, a placa foi incubada a temperatura ambiente sob proteção da luz e a leitura foi realizada em leitor de ELISA a 490nm após 25 - 30 minutos de incubação.

O princípio do teste consiste na avaliação indireta da quantidade de LDH liberada pela lise da célula-alvo. Primeiramente, a LDH liberada reduz NAD⁺ em NADH⁺ H⁺ pela oxidação do lactato em piruvato. Na segunda reação enzimática, 2H são transferidos de NADH⁺ H⁺ ao sal tetrazolium pelo catalisador dando origem ao sal

formazan, o qual é vermelho e solúvel. A intensidade da coloração vermelha é proporcional à quantidade de LDH liberada pela lise celular.

A porcentagem de lise específica foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{Lise específica (\%)} = [(E - \text{Le efet}) - \text{Le alvo}] / (L \text{ max} - \text{Le alvo}) \times 100$$

Na qual:

E - liberação experimental de LDH na co-cultura de células alvo e efetoras;

Le efet - liberação espontânea de LDH pelas células efetoras em meio de cultura;

Le alvo - liberação espontânea de LDH pelas células alvo em meio de cultura;

L max - liberação máxima de LDH pelas células alvo (células alvo incubadas na presença de 1% de Triton X-100 em meio de cultura).

Além disso, foi feito um controle branco, também em triplicata, obtendo-se a quantidade de LDH presente no meio de cultura. O valor de absorbância obtido desse controle é subtraído de todos os demais valores.

5.11. Dosagem de proteínas por Coomassie

A quantificação protéica da rHsp65 e das proteínas totais do tumor, tanto do lisado das células B16F10 em cultura como da massa tumoral removida dos animais, foi realizado por meio do Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, foram colocados 50µl da solução protéica em diferentes diluições e 200µl da solução de revelação em placa de fundo reto (Corning, NY, USA). A leitura da absorbância foi realizada a 595nm em leitor de placas (µQuant – BioTech instruments) e a concentração de proteína foi determinada pela equação da reta obtida da regressão linear de uma curva de proteína padrão de albumina sérica bovina (BSA). O princípio do método consiste na ligação do corante de Coomassie, por adsorção física à arginina, à histidina e aos aminoácidos aromáticos. Quando o corante se liga a proteínas em solução ácida, a absorbância passa de 465nm (marrom) para 595nm (azul), quanto mais intensa a cor azul, maior a concentração protéica.

5.12 Avaliação por imunoistoquímica

Os cortes foram desparafinizados em xilol e gradualmente reidratados de acordo com a rotina histológica. A recuperação antigênica foi feita em panela de vapor por 40 minutos em ácido cítrico (2,1g em 1000ml de água destilada), pH 6,0. Em seguida, a peroxidase endógena foi inativada pela adição de 3% de peróxido de hidrogênio em PBS e ligações inespecíficas do anticorpo primário foram evitadas por adição de soro de cavalo (Novocastra) 1:50 em PBS. As lâminas foram então incubadas com anticorpo primário anti-caspase-3 (Novocastra) na diluição de 1:100 em tampão de bloqueio. O anticorpo foi incubado por 12 horas em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram incubadas por 60 minutos com anticorpo secundário biotinilado, anti-IgG universal (Novocastra) diluído 1:200. Posteriormente, foi adicionado o complexo avidina-biotina conjugada com peroxidase (Vector Laboratories Inc., CA, USA) diluído 1:100 em PBS por 45 minutos que se ligará à biotina do anticorpo secundário. A reação foi identificada após a revelação por tratamento com kit de revelação com DAB por 5 minutos (Vector laboratories). O reagente DAB é oxidado na presença de H_2O_2 (presente no tampão) e peroxidase, resultando numa coloração marrom, insolúvel em álcool que precipita no local da atividade enzimática. A seguir foi feita a contra coloração com Hematoxilina de Harris, os cortes foram desidratados, passados pelo xilol e cobertos com lamínulas em meio de inclusão. As reações de imunoistoquímica foram avaliadas com microscopia de luz. Foi realizada avaliação qualitativa das células fortemente marcadas, varrendo-se toda a lâmina nos aumentos de 100, 200 e 400x.

5.13. Análise estatística

As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan – Meier e as diferenças avaliadas pelo de log rank. Os dados do RT-PCR em tempo real foram analisados por Teste t de Student ou por Mann Whitney. Os demais parâmetros foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) e para a comparação dos resultados obtidos foi utilizado o teste Tukey. Para todas as comparações foi considerado $p < 0,05$.

Resultados

6. Resultados

6.1. Inóculo de células B16F10 e metástases espontâneas

A fim de determinar a dose de células e o dia para início do tratamento nos experimentos, avaliamos a massa tumoral (g) nos tempos de 10, 15 e 20 dias após a inoculação subcutânea (s.c.) no flanco direito de 5×10^4 , 10^5 ou 5×10^5 células B16F10 (**Figura 1**). Como esperado, a massa tumoral obtida variou de acordo com a dose inicial de células injetadas e aos 10 dias de implantação, a dose de 5×10^4 células B16F10 resultou numa massa tumoral visível com menos de 0,1g. Assim, devido ao rápido desenvolvimento desse tumor, foi escolhido o inóculo de 5×10^4 células, pois o mesmo apresentou crescimento mais lento, o que poderia facilitar a ação de um tratamento com uma vacina de DNA. Do mesmo modo, foi feita a escolha de 10 dias de implantação para início do tratamento por via intratumoral, pois a atividade antitumoral da vacina num momento mais precoce poderia ser favorecida.

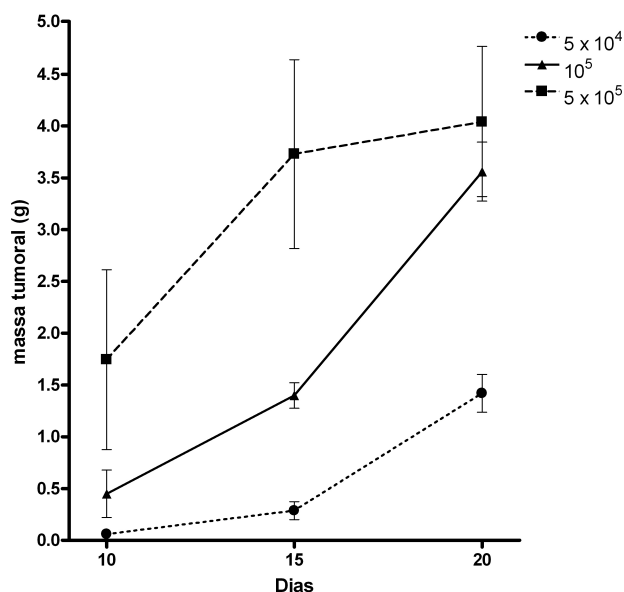


Figura 1. Avaliação da massa tumoral a partir da injeção de quantidades diferentes de células B16F10. Camundongos C57BL/6 ($n = 27$) foram inoculados s.c. no flanco com 5×10^4 , 10^5 , ou 5×10^5 células B16F10 e 3 camundongos por grupo foram mortos nos dias 10, 15 e 20 para avaliação da massa tumoral (g). Valores expressos em Média $\pm$ DP.

A avaliação histológica da ocorrência de metástases espontâneas foi feita em 5 cortes de cada órgão, sendo eles, coração, rins, pulmão, baço, fígado e, quando possível, no linfonodo inguinal, drenante do tumor. Como pode ser observado na **Figura 2**, os órgãos retirados não apresentaram alterações histológicas, mesmo após o tempo máximo do experimento (20 dias) na maior dose de células inoculadas (5×10^5). Dessa forma, nossas análises imunológicas puderam se restringir ao sítio primário de inóculo.

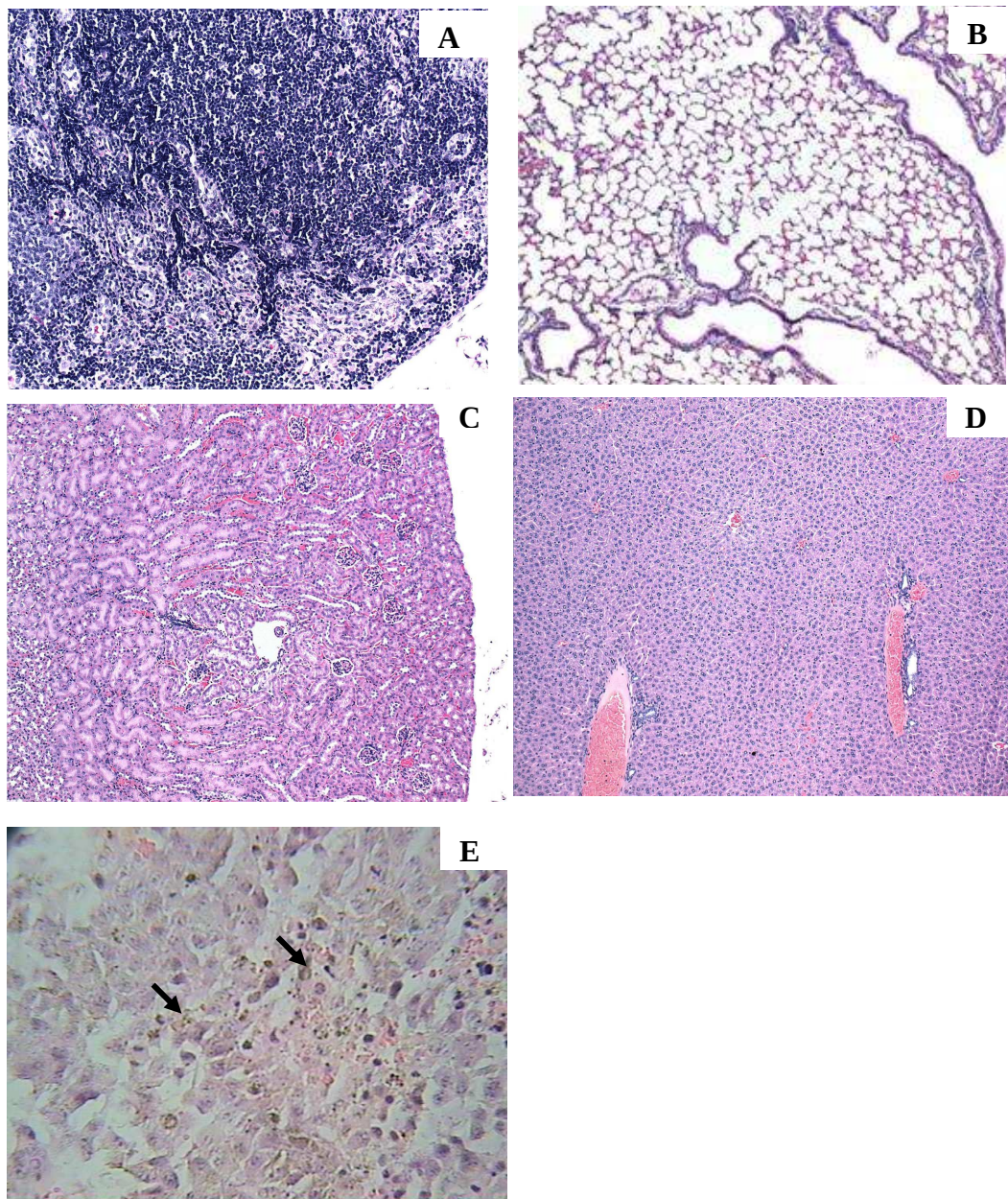


Figura 2. Cortes histológicos de órgãos e tumor de camundongos C57BL/6 inoculados com 5×10^5 células B16F10 e mortos ao final de 20 dias de experimento. (A) linfonodo inguinal; (B) pulmão; (C) rim e (D) fígado, corados com HE (100x), nos quais não se observa a ocorrência de metástases. (E) Corte histológico de tumor B16F10, corado com HE (100x). Células ricas em melanina (seta).

6.2. Caracterização da vacina DNA-Hsp65

A fim de avaliar a integridade dos DNAs plasmideais pVAX e pVAX-Hsp65 devido aos mesmos serem a base para as diferentes estratégias vacinais usadas no presente estudo. Para avaliar a presença do gene da Hsp65 e dos fragmentos gênicos, bem como a integridade do DNA plasmideal purificado, foram realizadas digestões de DNA com a enzima *Bam*HI. Após a digestão, os plasmídeos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com brometo de etídio. Os resultados apresentados na **Figura 3** mostram que a digestão do plasmídeo pVAX (Vetor) gerou uma banda de 3.000pb (canaleta 2 - **Figura 3 A**), correspondente ao número de pares de base do vetor, de acordo com o padrão de pares de base mostrado na canaleta 1. A digestão do plasmídeo pVAX-Hsp65 (vacina DNA-Hsp65) promoveu a linearização do plasmídeo, revelando uma banda com 6.000pb (canaleta 2- **Figura 3 B**). Como esperad, a eletroforese de ambos plasmídeos sem a digestão resultou em mais de uma banda, características das diversas formas do DNA plasmideal.

É importante ressaltar que não foi observada a presença de DNA genômico ou RNA contaminando os plasmídeos utilizados como tratamento. Amostras de DNA plasmideal, nessas condições, foram usados nas injeções de DNA nu.

A concentração de endotoxinas na amostra de DNA determinada pelo teste de LAL (*Limulus ameobocyte lysate*) estava abaixo do limite de detecção do teste:

- pVAX – LAL negativo (0EU/μg)
- pVAX-Hsp65 – LAL negativo (0EU/μg)

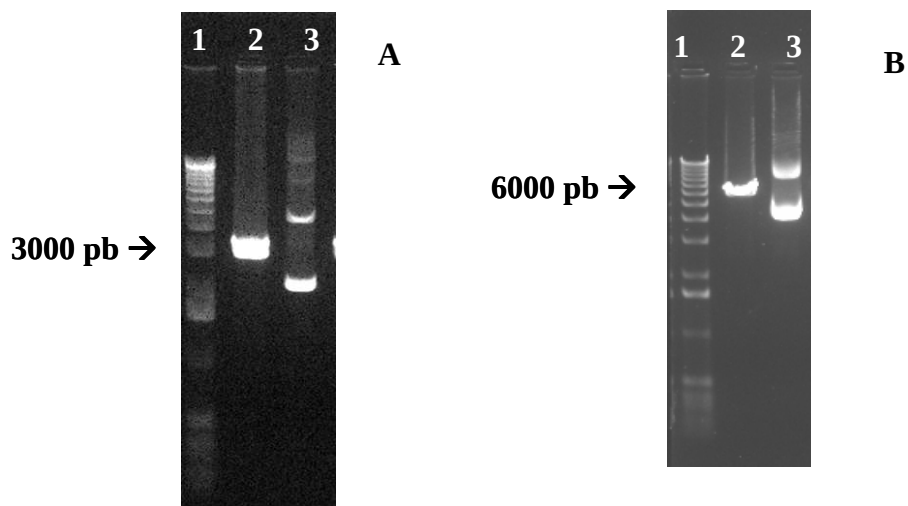


Figura 3. Perfil eletroforético do DNA plasmideal purificado – (A) pVAX e (B) pVAX-Hsp65.

Foram digeridos 1µg de cada amostra de DNA plasmideal ou não com a enzima Bam HI e submetidos a eletroforese gel de agarose (1%). Em ambos os géis (A) e (B), a Canaleta 1 indica o padrão de pares de base de 1Kb PLUS DNA *Ladder* (GIBCO-USA); a Canaleta 2: o pVAX e pVAX-Hsp65 digerido com *Bam*HI, respectivamente; na Canaleta 3 ambos vetores não digeridos. pb = pares de bases. As bandas foram visualizadas pela coloração com brometo de etídeo.

6.3. Transfecção in vitro das células B16F10

Em uma das estratégias vacinais foram usadas células tumorais B16F10 transfectadas com DNA-Hsp65 e dois protocolos de eletroporação foram avaliados (descrito item 5.4.2.). As células submetidas tanto ao Protocolo 1 quanto ao Protocolo 2 tiveram taxa de transfecção superior a 95% (**Figura 4 B e 4 C**) e como esperado, as células Mock de ambos os protocolos foram negativas para a marcação com Alexa 488, que marcava o DNA plasmideal (**Figura 4 A** ilustra células Mock submetidas ao Protocolo 2). Dessa forma, de acordo com a porcentagem de transfecção, os dois Protocolos apresentaram resultados bastante satisfatórios, entretanto, a viabilidade celular no Protocolo 1 foi bastante inferior (40 – 50%) à viabilidade observada no Protocolo 2 (~ 75%).

Paralelamente, as células submetidas ao Protocolo 2 foram avaliadas quanto à sua capacidade proliferativa *in vitro* por incorporação de [³H] – timidina (**Figura 4 D**). Observamos que as células eletroporadas, na presença ou não de DNA plasmideal, mantiveram sua capacidade proliferativa (cpm), porém numa taxa inferior às células não eletroporadas (redução de ~ 25%). Assim, optamos pela utilização do Protocolo 2 para os demais ensaios de transfecção e apesar dessa diminuição na taxa de proliferação decorrente do processo de eletroporação, mantivemos o número de 5×10^4 células B16F10 injetadas nos animais.

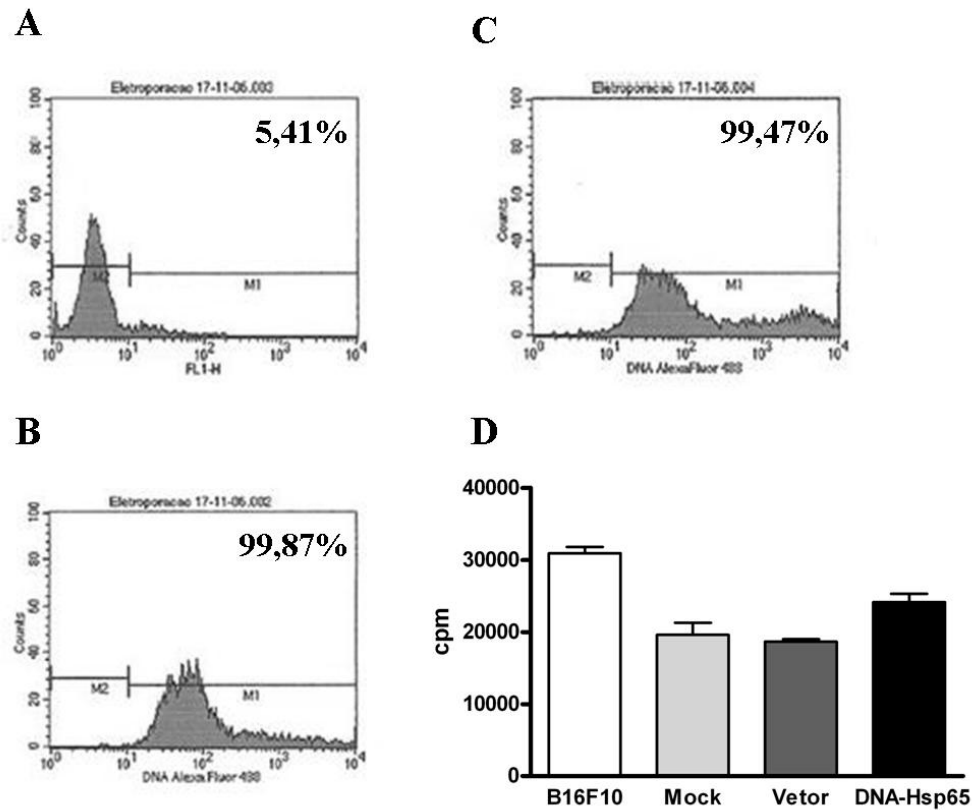


Figura 4. A-C Porcentagem das células B16F10 transfectadas com DNA – Alexa 488. (A) Indica a ausência de marcação das células quando eletroporadas na ausência de DNA marcado. As células foram submetidas ao (B) Protocolo 1* ou ao (C) Protocolo 2** de eletroporação na presença de 10µg de DNA plasmideal marcado com Alexa 488. A taxa de transfecção foi avaliada por citometria de fluxo. (D) Proliferação *in vitro* das células B16F10 após eletroporação pelo Protocolo 2 na presença de 10µg de DNA plasmideal (vetor ou DNA-Hsp65) ou apenas meio de cultura, células não manipuladas (B16F10) foram utilizadas como controle positivo. Assim que eletroporadas, as células foram colocadas em cultura e adicionadas de [3H] – timidina (0,5µCi/poço). Após 30 horas, as células foram coletadas e a leitura em contagem por minuto (cpm) foi realizada em contador de cintilação β. As células eletroporadas apenas com meio (Mock) ou com DNA plasmideal (Vetor ou DNA-Hsp65) não diferiram na proliferação ($p > 0,05$). Estatística feita por ANOVA.

* (B) Protocolo 1: 2 fusos, 600 V, 5 s de intervalo - “square wave”

** (C) Protocolo 2: 500 µF, resistência (Ω) ∞ e 160 V - “exponential decay”

6.4. Expressão da proteína recombinante Hsp65 (rHsp65) no tumor

6.4.1. Caracterização da proteína recombinante Hsp65

A rHsp65 obtida após indução do plasmídeo que a codifica e purificação em colunas de níquel foi utilizada como controle positivo na avaliação da expressão da proteína recombinante no ambiente tumoral após tratamento com DNA-Hsp65. A proteína recombinante, obtida como descrita no Material e Métodos, foi submetida a eletroforese em condições dissociantes e redutoras (SDS-PAGE). Observamos elevado grau de pureza da rHsp65 utilizada e que a mesma se encontrava com a massa molecular esperado de 65 kDa (canaleta 2 – **Figura 5**). A concentração de endotoxinas nas amostras de proteína foi determinada pelo teste de LAL (Limulus amebocyte lysate) e se encontrava dentro dos padrões adequados, expressos abaixo:

- rHsp65 – LAL 21,57 EU/μg

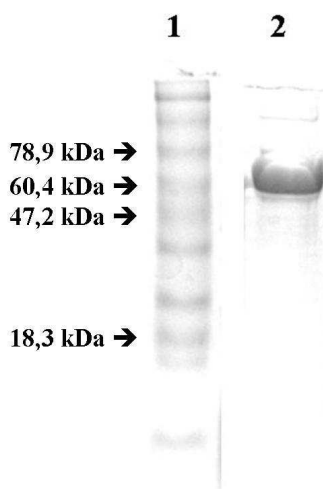


Figura 5. Perfil eletroforético da proteína recombinante Hsp65 (rHsp65). A rHsp65 foi purificada em coluna HisTrap Chelating HP em sistema ÄKTA purifier (GE), e submetida a SDS-PAGE em gel 10%. Canaleta 1: padrão de peso molecular BenchMark™ Pré-stained protein Ladder (Invitrogen); Canaleta 2: 2,5μg da rHsp65. O gel foi corado com azul de Coomassie para visualização das bandas.

6.4.2. Análise da expressão da proteína recombinante Hsp65 no tumor

Para avaliar se a inoculação intratumoral da vacina DNA-Hsp65 estava levando à expressão da proteína recombinante Hsp65 no local, a presença da proteína recombinante Hsp65 em tumores de animais tratados com solução salina isotônica ou com a vacina DNA-Hsp65 foi analisada por *Western Blot*. Esse dado foi obtido após o tratamento/injeção com DNA plasmideal nu. A avaliação da especificidade do anticorpo anti-Vac1 utilizado, foi previamente realizada e está apresentada no Anexo 3.

Como pode ser observado na **Figura 6**, o lisado celular obtido dos tumores de animais tratados com solução salina isotônica, não mostraram presença de banda correspondente a rhsp65, independentemente do tempo avaliado (**Figura 6** Canaletas 2 - 4). Por outro lado, o lisado proveniente dos tumores dos animais tratados com a vacina DNA-Hsp65, mostrou a expressão da proteína rHsp65 após o intervalo de 4 e 8 dias do tratamento (Canaletas 6 e 7). Além disso, nessas condições experimentais, observa-se que após 4 dia é possível detectar a presença da rHsp65 (canaleta 6), essa produção tende a aumentar por volta do dia 8 (canaleta 7). Esses dados mostram que após a transfeção em células B16F10 a rhsp65 é expressa.

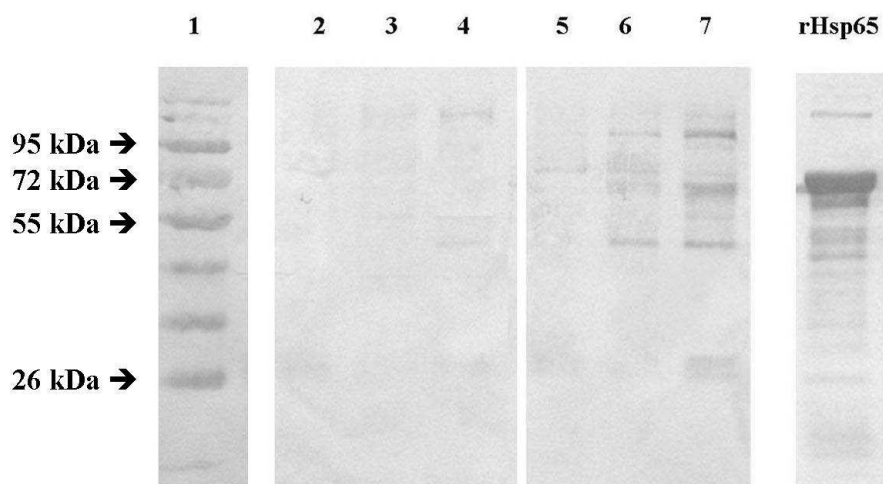


Figura 6. *Western Blot* de tumores B16F10 de animais tratados por via intratumoral com salina (Canaletas 2 – 4) ou vacina DNA-Hsp65 (Canaletas 5 – 7). Após a corrida eletroforética, as bandas protéicas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com anticorpo primário policlonal, anti-Vac1 (anti-Hsp65). A reação foi revelada com DAB em tampão com H_2O_2 após incubação com anticorpo secundário de cabra anti-IgG total de camundongo conjugado à peroxidase. Canaleta 1: padrão de peso molecular prestained (protein molecular weight marker). Canaletas 2 e 5: 1 dia após tratamento; Canaletas 3 e 6: 4 dias após o tratamento; Canaletas 4 e 7: 8 dias após o tratamento. rHsp65: proteína Hsp65 recombinante purificada em coluna HisTrap Chelating HP em sistema ÄKTA purifier (GE).

6.5. Padronização da obtenção de linfócitos T CD8 para teste de citotoxicidade

A fim de obter células T CD8 citolíticas utilizadas na avaliação dos diferentes tratamentos antitumorais, foram testados 2 protocolos visando otimizar a obtenção de linfócitos T CD8 específicos às células B16F10. No Protocolo 1, as células T CD8 foram obtidas a partir do baço logo após sua excisão, no protocolo 2, as células totais foram deixadas em co-cultura na presença de células apresentadoras de antígenos (APCs) pulsadas com lisado total das células B16F10 para a proliferação das células específicas já primadas. Obtivemos resultados satisfatórios usando o protocolo 2 (**Tabela 4**). A resposta citotóxica obtida foi apropriada, pois as células efectoras foram capazes de lisar as células alvo. Assim, utilizamos o Protocolo 2 para obtenção das células T CD8 nos demais experimentos de citotoxicidade com a razão 20:1 (efetoras:alvo).

Em relação ao tempo de incubação das células alvo em presença das efectoras, com 18 horas observamos lise enquanto 4 horas foram insuficientes mesmo para o Protocolo 2.

Tabela 4. Lise específica (%)* das células B16F10 (alvo) mediada pelas células T CD8 (efetoras) (razão efetora:alvo de 20:1)

	Incubação (h)	
	4	18
Protocolo 1	n.d.**	n.d.
Protocolo 2	n.d.	10,2 ± 1,46

*Lise específica (%) = $[(E - Le_{efet}) - Le_{alvo}] / (L_{max} - Le_{alvo}) \times 100$. Na qual, E - liberação experimental de lactato desidrogenase (LDH) na co-cultura de células alvo e efectoras; Le efet - liberação espontânea de LDH pelas células efectoras em meio de cultura; Le alvo - liberação espontânea de LDH pelas células alvo em meio de cultura; L max - liberação máxima de LDH pelas células alvo (células alvo incubadas na presença de 1% de Triton X-100 em meio de cultura). ** não detectável

6.6. Padronização da recuperação de células do tumor para a análise por citometria de fluxo

A fim de recuperar as células presentes no tumor para avaliação fenotípica dos tipos celulares infiltrantes no ambiente tumoral após os diferentes tratamentos, 2 protocolos de digestão enzimática foram testados. Observamos que ambos os protocolos se mostraram eficientes para dissociar a massa tumoral, permitindo a análise do fenótipo das células presentes no tumor por citometria de fluxo. Entretanto, o Protocolo 1 de digestão se mostrou mais adequado aos nossos objetivos por apresentar menor número de células mortas (contagem com azul de Tripán), provavelmente devido ao menor tempo de incubação com o coquetel enzimático. O resultado da marcação teste CD4/CD8 das células imunes infiltrantes após digestão da massa tumoral pelo Protocolo 1 está ilustrado na **Figura 7**.

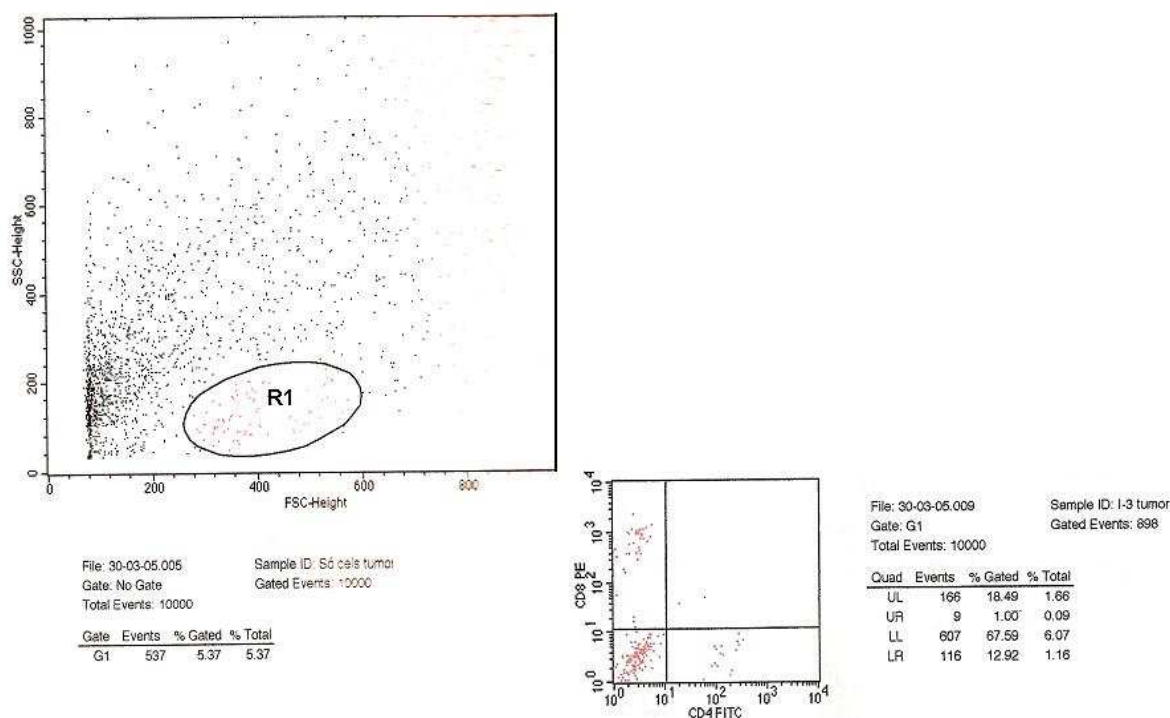
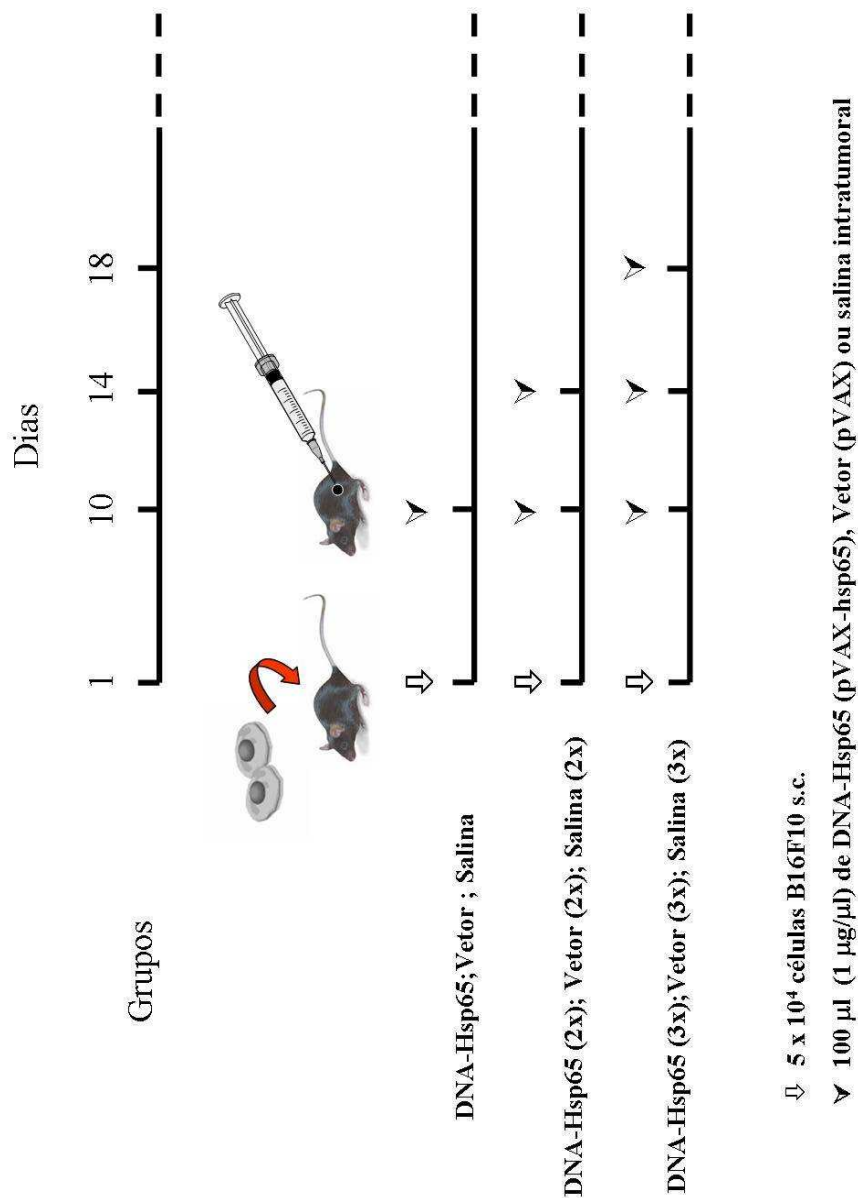


Figura 7: Eficiência na dissociação enzimática do tumor permitindo avaliação por citometria de fluxo (“gate” R1 - marcadores de superfície por CD4-FITC e CD8-PE).

Tratamento intratumoral com a vacina DNA-Hsp65 em diferentes doses:
Sobrevida



6.7. Sobrevida e resposta imune induzida pelo tratamento com a vacina DNA-Hsp65

6.7.1. Sobrevida I

A fim de avaliar se a terapia intratumoral com a vacina DNA-Hsp65 alteraria o tempo de sobrevivência dos animais tratados, a sobrevida dos mesmos foi acompanhada. O experimento foi realizado 2 vezes de forma independente e a **Figura 8** é representativa para ambas as repetições. Devido ao rápido crescimento tumoral, todos os animais haviam morrido antes do dia 45 do experimento (**Figura 8**). Além disso, como pode ser observado na **Figura 8 A**, embora o tratamento com a vacina DNA-Hsp65 não tenha sido capaz de eliminar a massa tumoral, os animais que receberam uma única dose vacinal tiveram sobrevida significativamente maior em relação aos controles (**Figura 8**).

Os Grupos DNA-Hsp65 (2x) e DNA-Hsp65 (3x) não apresentaram aumento significativo de sobrevida quando comparados aos respectivos controles (**Figura 8 B e C**). Não detectamos diferença significativa entre os grupos tratados com vetor ou salina para nenhum dos delineamentos experimentais de 1, 2 ou 3 injeções.

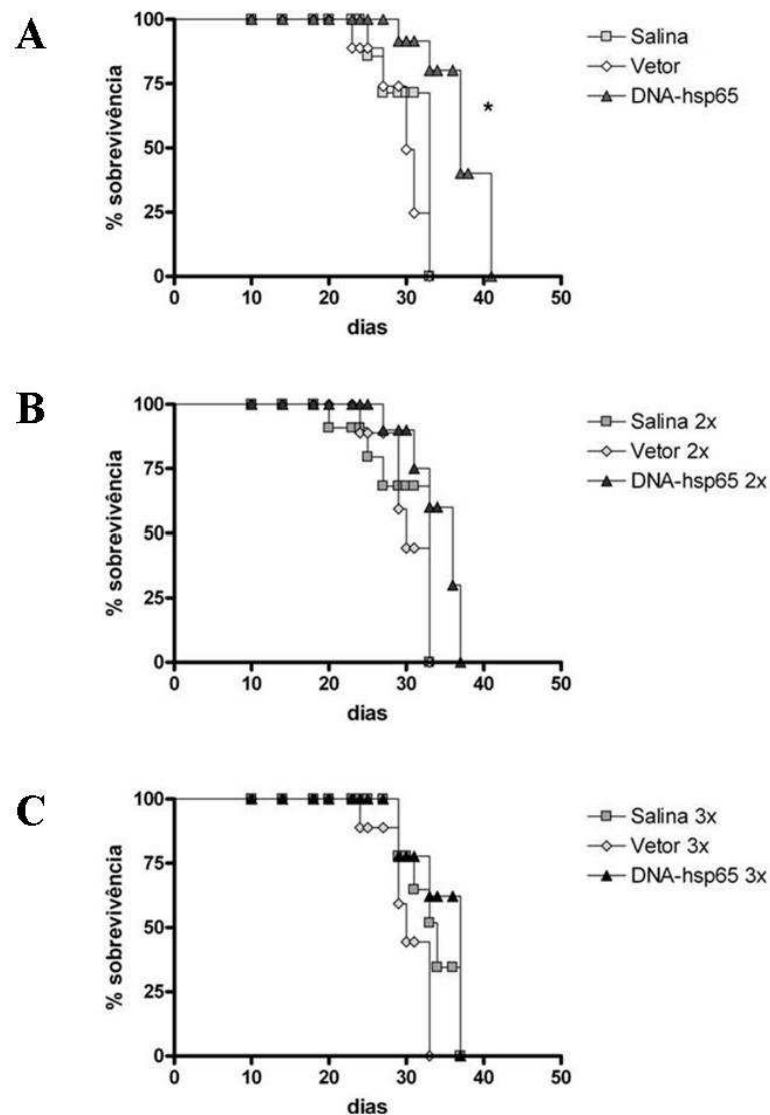


Figura 8. Porcentagem de sobrevivência de animais tratados com 1 (A), 2 (B) ou 3 (C) inoculações intratumorais. Camundongos C57BL/6 foram inoculados s.c. com 5×10^4 células B16F10. Dez dias após a implantação do tumor os animais receberam 1, 2 ou 3 injeções intratumorais de 100µl de salina, do vetor (pVAX) ou da vacina DNA-Hsp65 (pVAX-Hsp65) (1µg/µl). Todos os animais foram acompanhados até sua morte para avaliação da taxa de sobrevida.

* $p < 0,05$ em relação aos Grupos Salina e Vetor.

Curvas de Kaplan-Meier e diferenças avaliadas pelo teste de log rank.

6.7.2. Sobrevida II

Os resultados obtidos nesta segunda etapa de experimento de sobrevida reproduzem o mesmo padrão anteriormente observado, no qual embora todos os animais tenham morrido antes de 50 dias de experimento, o grupo tratado com a dose única da vacina DNA-Hsp65 demonstrou sobrevida maior, estatisticamente significante, quando comparado aos demais grupos controles (**Figura 9**). Para redução do número de animais utilizados, apenas um grupo controle Salina (tratado com 1 dose de salina) foi realizado, pois não havia sido observada diferença entre os Grupos Salina e Salina 3x. (**Figura 8**).

Em relação aos animais tratados com 3 doses da vacina DNA-Hsp65, não observamos aumento significativo de sobrevida quando comparados aos animais dos grupos controle, também como já havíamos demonstrado. Além disso, quando comparados os Grupos DNA-Hsp65 (1x) e DNA-Hsp65 (3x), notamos que os animais tratados com a dose única da vacina tiveram taxa de sobrevivência significativamente maior. Outra constatação importante foi o fato dos animais tratados com uma dose da vacina exibirem movimentação e explorar olfatório por período superior aos demais grupos.

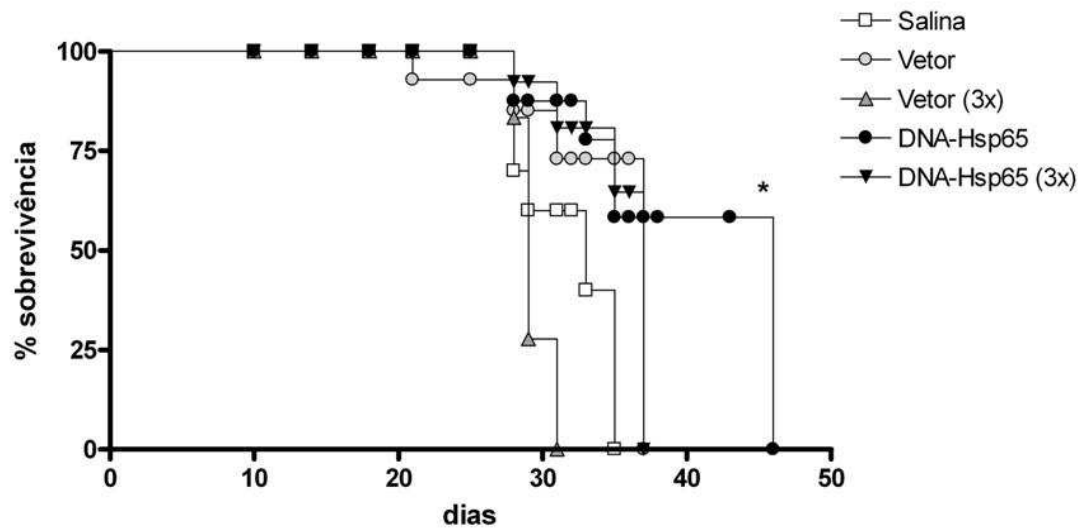


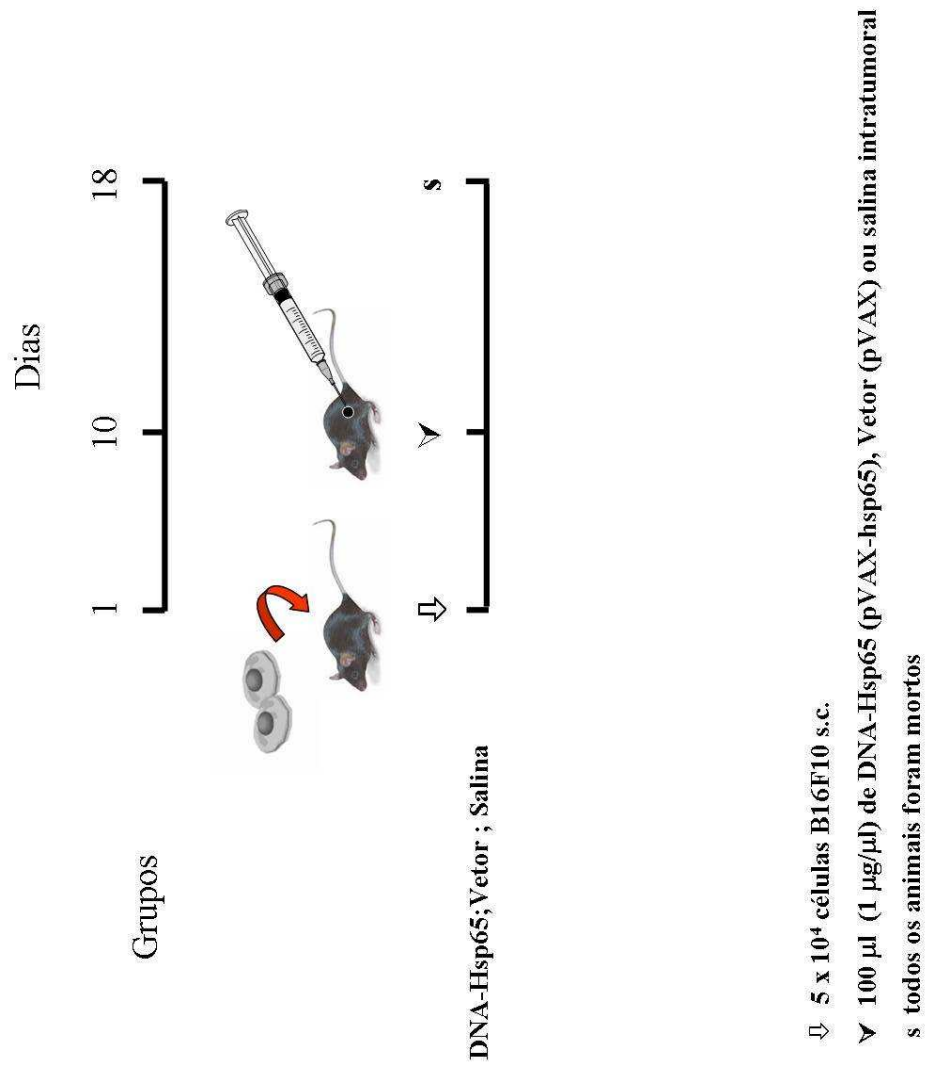
Figura 9. Porcentagem de sobrevivência de animais tratados com 1 ou 3 inoculações intratumorais.

Camundongos C57BL/6 foram inoculados s.c. com 5×10^4 células B16F10. Dez dias após a implantação do tumor os animais receberam 1 ou 3 injeções intratumorais de 100 μ l (1 μ g/ μ l) de Vetor (pVAX) ou de Vacina DNA-Hsp65 (pVAX-Hsp65) com 4 dias de intervalo entre cada inoculação. Paralelamente, um grupo foi injetado com 1 dose de 100 μ l de salina por via intratumoral. Todos os animais foram acompanhados até sua morte para avaliação da taxa de sobrevida.

* $p < 0,05$ em relação aos demais Grupos.

Curvas de Kaplan-Meier e diferenças avaliadas pelo teste de log rank.

**Tratamento intratumoral com a Vacina DNA-Hsp65 dose única:
Resposta imunológica**



6.7.3. Resposta imunológica induzida pela dose única da Vacina DNA-Hsp65

6.7.3.1. Massa tumoral

Os animais tratados com a vacina DNA-Hsp65 não apresentaram massa tumoral (g) significativamente menor em relação aos grupos Vetor e Salina (**Figura 10**). O experimento foi realizado 3 vezes de forma independente e a **Figura 10** é representativa para todas as repetições. Notamos que embora houvesse diferença de massa tumoral dos animais entre os experimentos, a razão entre as médias das massas dos diferentes grupos se manteve constante (**Tabela 5**).

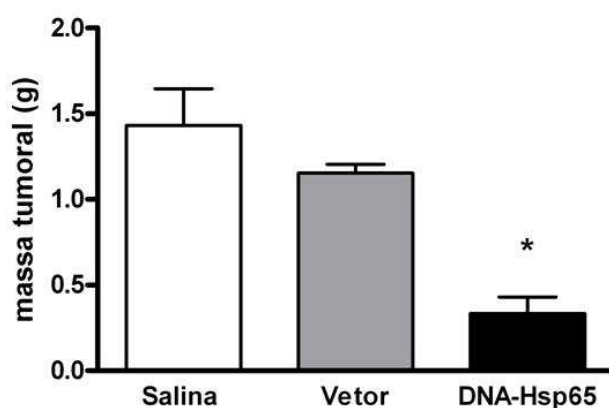


Figura 10. Massa tumoral (g). Camundongos C57BL/6 foram inoculados s.c. no flanco direito com 5×10^4 células de melanoma B16F10. Dez dias após a implantação do tumor os animais receberam uma injeção intratumoral de 100µl de salina, do vetor (pVAX) ou da vacina DNA-Hsp65 (pVAX-Hsp65) na concentração de 1µg/µl. Ao final de 18 dias os animais foram mortos para remoção e pesagem do tumor. Dados apresentados em média $\pm$ DP.

* $p < 0,05$ em relação aos Grupos Salina e Vetor.

Estatística feita por ANOVA seguida de teste Tukey

Tabela 5. Razão entre as médias de massa tumoral entre os diferentes grupos.

Dados de 3 experimentos independentes.

Grupos	Razão entre as massas (média $\pm$ DP)
DNA-Hsp65/Salina	0,24 $\pm$ 0,0088
Vetor/Salina	1,16 $\pm$ 0,3440
DNA-Hsp65/Vetor	0,22 $\pm$ 0,0623

6.7.3.2. Células imunes infiltrantes no tumor e lise específica mediada por células T CD8

As células imunes infiltrantes no tumor e a lise específica mediada por células T CD8 foram avaliadas a fim de determinar se animais tratados com a vacina DNA-Hsp65 por via intratumoral apresentariam diferença no recrutamento de células do sistema imunológico (células CD4, CD8 e APCs) para o sítio tumoral e se ocorreria alteração da lise específica de células B16F10 mediada por linfócitos T CD8.

Observamos que o tratamento com a vacina DNA-Hsp65 nu, em dose única, aumentou significativamente a porcentagem de células imunes infiltrantes no tumor (**Figura 11**). Embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa na porcentagem de células CD4/CD44hi (**Figura 11 A**), constatamos uma tendência a esse aumento, o que pode sugerir um recrutamento mais tardio dessa população. Interessantemente, observamos um aumento significativo das células T CD8, com fenótipo ativado (CD8/CD44hi) (**Figura 11 B**), bem como aumento significativo da população de APCs com expressão de moléculas co-estimulatórias (CD11b/CD86) (**Figura 11 C**), em relação ao grupo Salina. A população CD11c/CD86, composta principalmente por células dendríticas, foi superior ao grupo Salina e ao grupo Vetor (**Figura 11 D**).

Em relação à citotoxicidade específica, notamos o aumento significativo da lise específica das células tumorais mediada por linfócitos T CD8 obtidos de animais tratados com a vacina DNA-Hsp65 (**Figura 12**). A análise qualitativa da marcação de caspase-3 por imunistoquímica (**Figura 13**) evidenciou a existência do evento de apoptose (células fortemente marcadas) nos tumores, os quais foram mais frequentes no grupo DNA-Hsp65 e praticamente não foram encontradas células marcadas no grupo Salina.

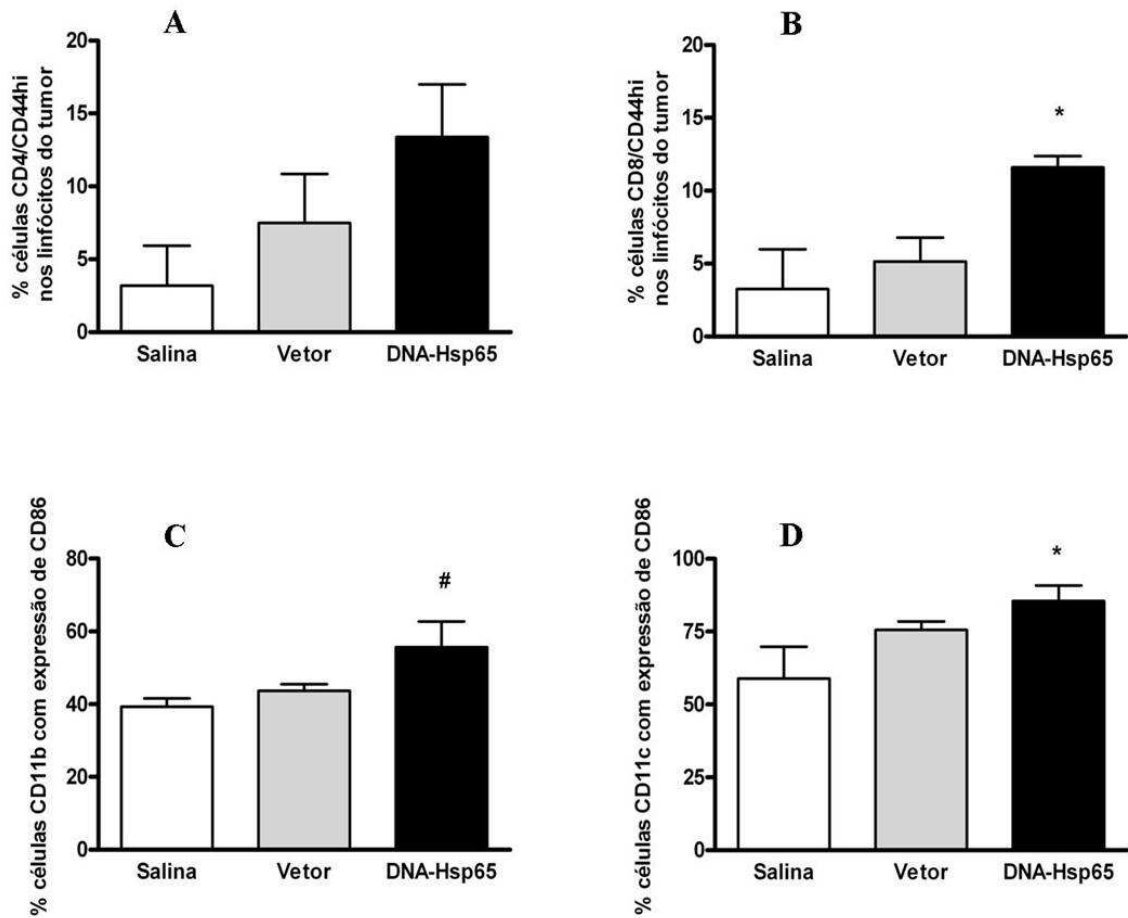


Figura 11. Porcentagem de células imunes infiltrantes do tumor com expressão de (A) CD4/CD44hi; (B) CD8/CD44hi; (C) CD11b/CD86 e (D) CD11c/CD86. Camundongos C57BL/6 foram inoculados s.c. com 5×10^4 células B16F10. Dez dias após a implantação do tumor os animais receberam 1 injeção intratumoral de 100µl de salina, do vetor (pVAX) ou da vacina DNA-Hsp65 (pVAX-Hsp65) na concentração de 1µg/µl. Ao final de 18 dias os animais foram mortos para retirada do tumor e avaliação das populações celulares citometria de fluxo. Dados apresentados em média $\pm$ DP.

* $p < 0,05$ em relação aos Grupos Salina e Vetor

$p < 0,05$ em relação ao Grupo Salina

Estatística feita por ANOVA seguida de teste Tukey

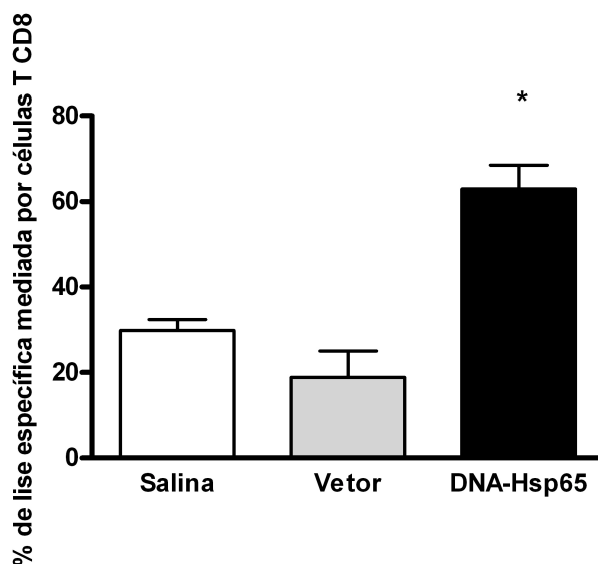


Figura 12. Porcentagem de lise específica de células tumorais mediada por células T CD8. Camundongos C57BL/6 foram inoculados s.c. com 5×10^4 células B16F10. Dez dias após a implantação do tumor os animais receberam uma injeção intratumoral de 100 μ l de salina, do vetor (pVAX) ou da vacina DNA-Hsp65 (pVAX-Hsp65) na concentração de 1 μ g/ μ l. Ao final de 18 dias, os animais foram mortos para remoção do baço, as células foram colocadas em co-cultura com monocamada de macrófagos pulsados com lisado total do tumor. Após 4 dias, as células T CD8 (efetoras) foram purificadas e colocadas em contato com as células B16F10 (alvo) por 18h. Após esse período, a taxa lise específica das mesmas foi avaliada. Razão efetora: alvo de 20:1. Dados apresentados em média $\pm$ DP.

* $p < 0,05$ em relação aos Grupos Salina e Vetor.

Estatística feita por ANOVA seguida de teste Tukey

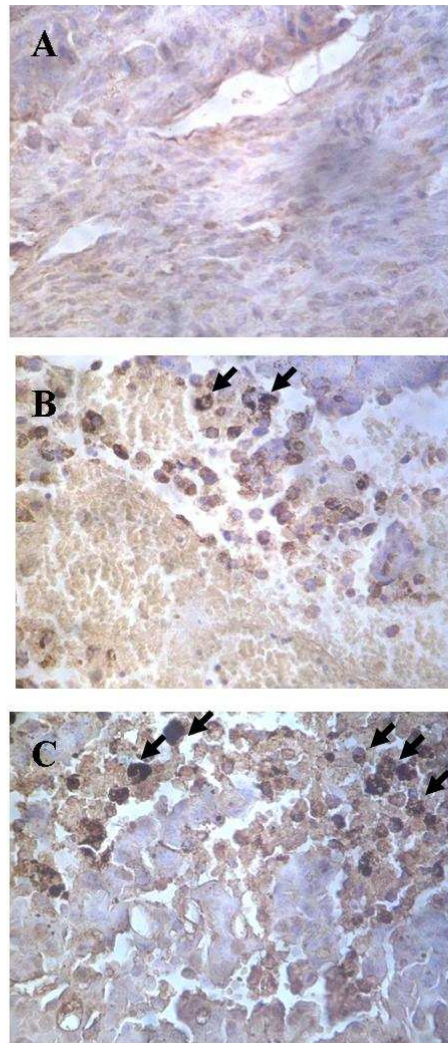


Figura 13. Corte histológico do tumor (400x) marcado com anti-caspase-3 (setas). Camundongos C57BL/6 foram inoculados s.c. com 5×10^4 células B16F10. Dez dias após a implantação do tumor os animais receberam uma injeção intratumoral de 100 μ l de salina (A), do vetor (pVAX) (B), ou da vacina DNA-Hsp65 (pVAX-Hsp65) (C) na concentração de 1 μ g/ μ l. Ao final de 18 dias os animais foram mortos para retirada do tumor e avaliação e avaliação da expressão de caspase-3 por imunoistoquímica.

6.7.3.3. Expressão gênica no ambiente tumoral

Para avaliarmos a influência da terapia intratumoral com DNA plasmideal na expressão gênica no sítio tumoral, optamos por detectar 3 genes envolvidos com 3 padrões diferentes da resposta imunológica. Foram avaliadas por RT-PCR em tempo real as mensagens dos genes de T-bet e GATA-3, respectivamente relacionados aos padrões de resposta Th1 e Th2, e o gene da citocina IL-17, relacionada ao padrão Th17. Para isso, o RNA mensageiro (RNA_m) obtido a partir dos tumores dos animais que receberam a dose única de vacina DNA-Hsp65, vetor ou salina por via intratumoral foi avaliado quanto à integridade (**Figura 14 A**), revelando as 2 bandas características das formas mais espiralada (28 S) e menos espiralada (18 S). A qualidade do cDNA foi avaliada por PCR em tempo real para o gene da β – actina (**Figura 14 B**) e sua amplificação foi usada para a normalização das amostras. Os resultados da quantificação relativa (em relação ao grupo salina) dos genes de GATA-3, T-bet e IL-17 estão ilustrados na **Figura 15**. Observamos que a inoculação da vacina DNA-Hsp65 induziu um aumento significativo na expressão gênica de T-bet (padrão Th1) quando comparado ao Vetor. Observamos também que os animais tratados com DNA-Hsp65 apresentaram maior expressão do gene de IL-17. Interessante comentar que a amplificação do gene de IL-17 só foi obtida em todos os grupos quando 1 μ g de cDNA foi utilizado, pois a amplificação gênica do tumor proveniente dos animais do grupo Salina não pôde ser detectada quando partimos da quantidade inicial de 200ng de cDNA. Mesmo assim, um animal do referido grupo não exibiu amplificação para o gene de IL-17 (dado não mostrado).

Não foi observada diferença quanto à expressão do gene de GATA-3.

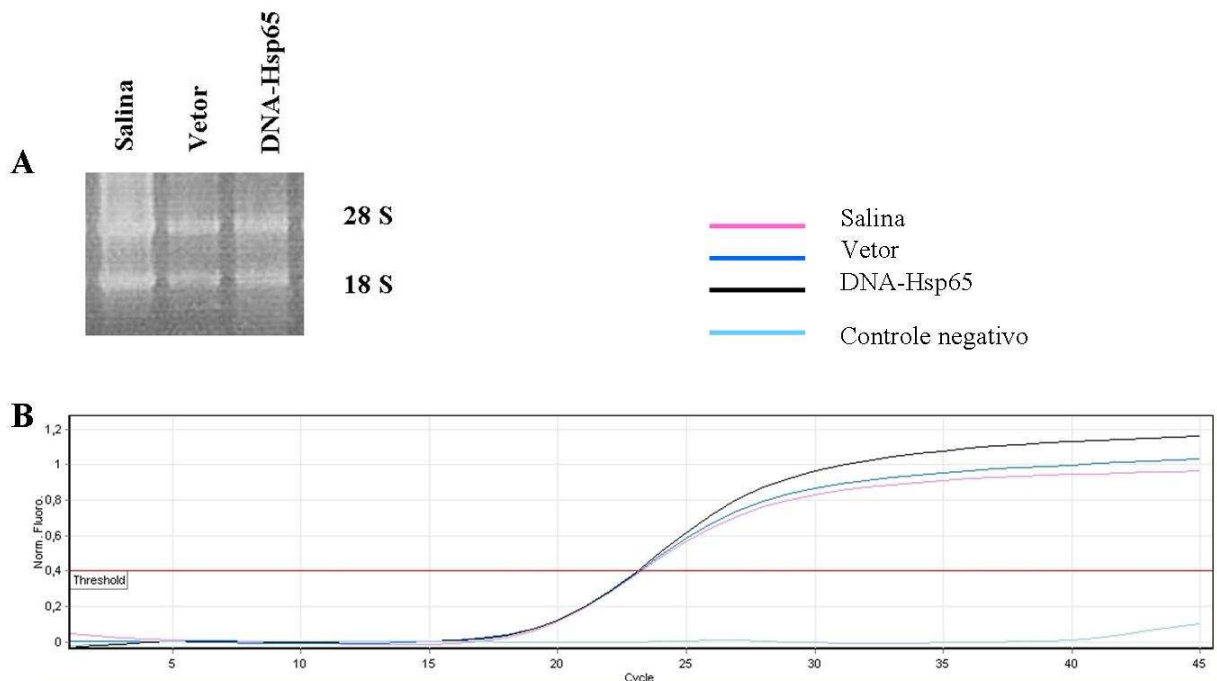


Figura 14. Resultado da reação de RT – PCR em tempo real. (A) Eletroforese em gel de agarose 1,5% para análise da integridade do mRNA, mostrando as duas bandas, 28S e 18S. (B) Curva de fluorescência normalizada para análise quantitativa da amplificação do gene da β -actina. Camundongos C57BL/6 foram inoculados s.c. com 5×10^4 células B16F10. Dez dias após a implantação do tumor os animais receberam uma injeção intratumoral de 100 μ l de salina, do vetor (pVAX) ou da vacina DNA-Hsp65 (pVAX-Hsp65) na concentração de 1 μ g/ μ l. Ao final de 18 dias, os animais foram mortos para remoção do tumor, extração do RNA e realização de RT-PCR em tempo real.

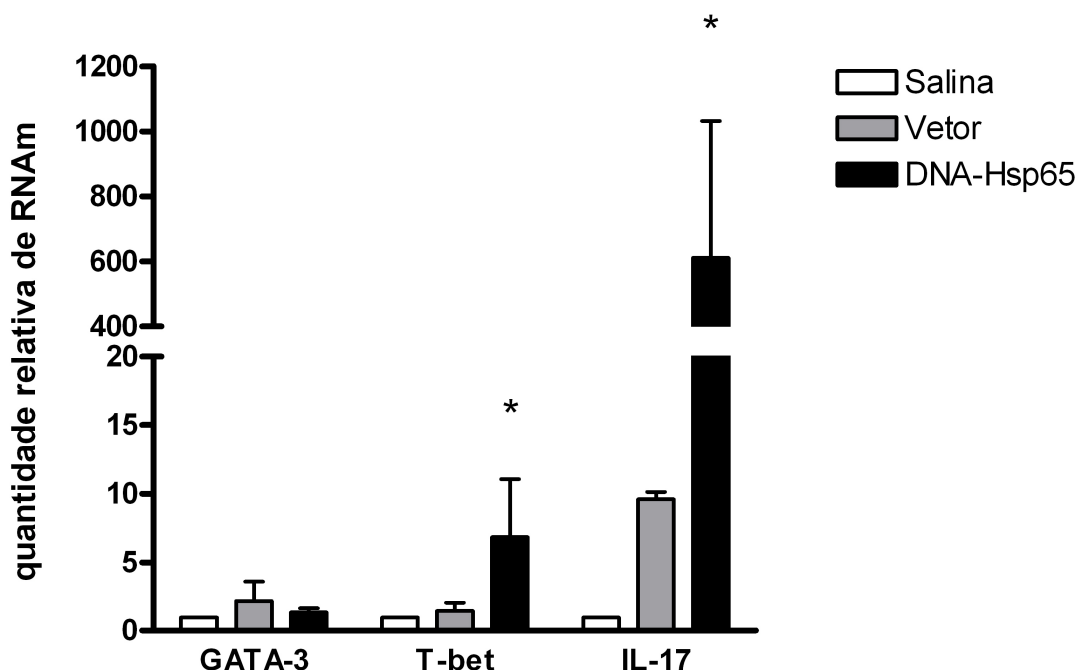
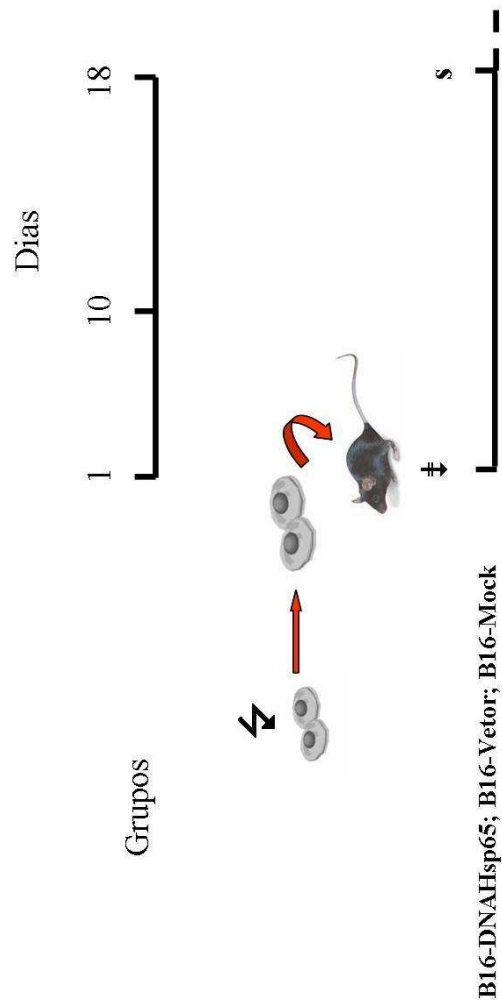


Figura 15. Quantidade relativa de RNAm dos genes GATA-3, T-bet e IL-17. Camundongos C57BL/6 foram inoculados s.c. com 5×10^4 células B16F10. Dez dias após a implantação do tumor os animais receberam 1 injeção intratumoral de 100µl de salina, do vetor (pVAX) ou da vacina DNA-Hsp65 (pVAX-Hsp65) na concentração de 1µg/µl. Ao final de 18 dias, os animais foram mortos para remoção do tumor, extração do RNA e realização de RT-PCR em tempo real. Para a ilustração gráfica do padrão de expressão gênica, os dados da expressão dos genes nos Grupos Vetor e DNA-Hsp65, normalizados pelo controle interno β -actina estão apresentados em relação aos valores obtidos no grupo Salina. Os dados foram inseridos na equação 2 (Anexo 1), $\rho x = (1+E\beta) \left[\frac{\Delta Ct_{AB}}{\beta} - (R\beta/Rx) \left(\frac{\Delta Ct_{BA}}{x} \right) \right]$, essencialmente equivalente a: [expressão gênica relativa dos Grupos Vetor ou DNA-Hsp65, normalizados pela β -actina] / [expressão gênica relativa do Grupo Salina, normalizados pela β – actina]. Dados apresentados em média $\pm$ DP.

* $p < 0,05$ em relação ao Grupo Vetor.

Expressão gênica relativa de GATA-3 e T-bet comparados por teste t de Student e de IL-17 por Mann Whitney.

Células B16F10 previamente transfectadas com DNA-Hsp65:
Sobrevida e Resposta Imunológica



⚡ transfecção por eletroporação de células B16F10 na presença de 10 µg de DNA plasmídeoal pVAX-Hsp65 (B16-DNAHsp65), pVAX (B16-Vetor) ou meio de cultura (B16-Mock)

‡ 5 x 10⁴ células B16F10 s.c. viáveis previamente eletroporadas

s metade dos animais foram mortos

6.8. Estratégia usando células tumorais transfectadas com plasmídeos Vetor ou DNA-Hsp65

6.8.1. Análise da Sobrevida

A fim de avaliar se a transferência de células B16F10 previamente transfectadas com a vacina DNA-Hsp65 alteraria o tempo de sobrevivência dos animais, a sobrevida dos mesmos foi acompanhada. Observamos que os animais injetados com as células tumorais previamente transfectadas com a vacina DNA-Hsp65 tiveram sobrevida significativamente maior do que os demais grupos. De forma diferente dos animais tratados por via intratumoral com o vetor pVAX, o Grupo B16-Vetor teve sobrevida superior ao B16-Mock. O experimento foi realizado 2 vezes de forma independente e a **Figura 16** é representativa para ambos.

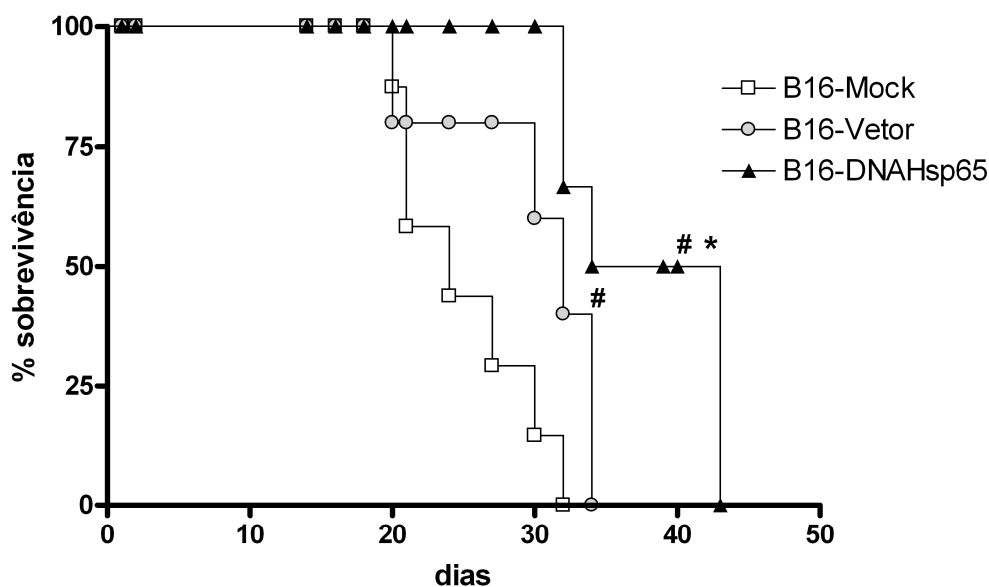


Figura 16. Porcentagem de sobrevivência de animais inoculados com células B16-Mock (eletroporadas e não transfectadas), B16-Vetor (transfectadas com o vetor pVAX) ou B16-DNAHsp65 (transfectadas com a vacina DNA-Hsp65). Camundongos C57BL/6 foram injetados com 5×10^4 células B16F10 eletroporadas em presença de $10\mu\text{g}$ de DNA plasmideal e acompanhados até sua morte para avaliação da taxa de sobrevida.

$p < 0,05$ em relação ao Grupo Salina

* $p < 0,05$ em relação ao Grupo Vetor

Curvas de Kaplan-Meier e diferenças avaliadas pelo teste de log rank.

6.8.2. Resposta imunológica induzida pelas células tumorais transfectadas com plasmídeos Vetor ou DNA-Hsp65

6.8.2.1. Análise da Massa tumoral

Como pode ser visto na **Figura 17**, os animais que receberam as células tumorais transfectadas com o gene da Hsp65 (Grupo B16-DNAHsp65) apresentaram massa tumoral (g) significativamente menor do que os demais grupos. Ainda, o grupo B16-Vetor teve sua massa tumoral estatisticamente menor que o grupo B16-Mock. O experimento foi realizado 3 vezes de forma independente e a **Figura 17** é representativa para as repetições. Assim como para o tratamento intratumoral, notamos que, a razão entre as médias das massas dos diferentes grupos se manteve constante (**Tabela 6**).

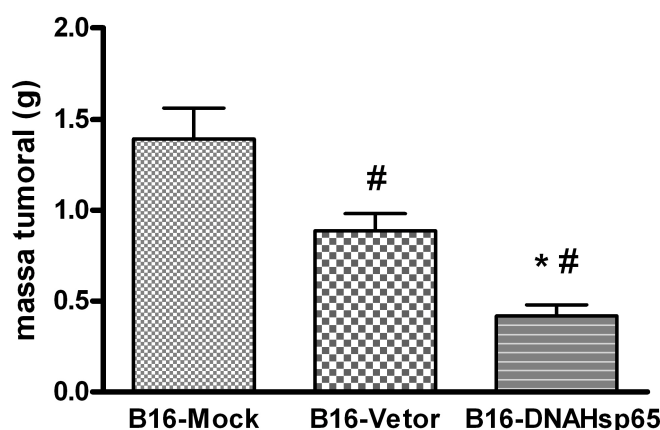


Figura 17. Massa tumoral (g). Animais inoculados com células B16-Mock (eletroporadas e não transfectadas), B16-Vetor (transfectadas com o vetor pVAX) ou B16-DNAHsp65 (transfectadas com a vacina DNA-Hsp65). Camundongos C57BL/6 foram injetados com 5×10^4 células B16F10 eletroporadas em presença de 10µg de DNA plasmideal. Ao final de 18 dias os animais foram mortos para remoção e pesagem do tumor. Dados apresentados em média $\pm$ DP.

$p < 0,05$ em relação ao Grupo Salina

* $p < 0,05$ em relação ao Grupo Vetor

Estatística feita por ANOVA seguida de teste Tukey

Tabela 6. Razão entre as médias de massa tumoral entre os diferentes grupos.

Dados de 3 experimentos independentes.

Grupos	Razão entre as massas (média $\pm$ DP)
B16-DNAHsp65/B16-Mock	0,35 $\pm$ 0,0261
B16-Vetor/B16-Mock	0,61 $\pm$ 0,0260
B16-DNAHsp65/B16-Vetor	0,57 $\pm$ 0,0662

6.8.2.2. Avaliação das células infiltrantes no tumor e lise específica mediada por células T CD8

As células imunes infiltrantes no tumor e a lise específica mediada por células T CD8 foram avaliadas a fim de determinar se animais que receberam células B16F10 previamente transfectadas com a vacina DNA-Hsp65 apresentariam diferença no recrutamento de células do sistema imunológico (células CD4, CD8 e APCs) para o sítio tumoral e se ocorreria alteração da lise específica de células B16F10 mediada por linfócitos T CD8.

Notamos que as células T CD4/CD44hi e T CD8/CD44hi infiltrantes no tumor encontravam-se em porcentagens aumentadas no grupo B16-DNAHsp65 quando comparado ao grupo B16-Mock. Do mesmo modo, as células CD11c (predominantemente dendríticas) apresentavam maior expressão da molécula co-estimulatória CD86 em relação ao grupo B16-Mock. O grupo B16-Vetor não diferiu estatisticamente do Grupo B16-Mock nem do B16-DNAHsp65 para nenhuma dos fenótipos avaliados (**Figura 18**).

Quanto à citotoxicidade específica mediada pelas células T CD8 provenientes do baço, notamos aumento da porcentagem de lise específica mediada por células provenientes de camundongos do grupo B16-DNAHsp65 em relação ao grupo B16-Mock (**Figura 19**).

A análise qualitativa da marcação de caspase-3 por imunistoquímica (**Figura 20**) evidenciou a existência do evento de apoptose (células fortemente marcadas) nos tumores, os quais foram mais freqüentes no grupo B16-DNAHsp65.

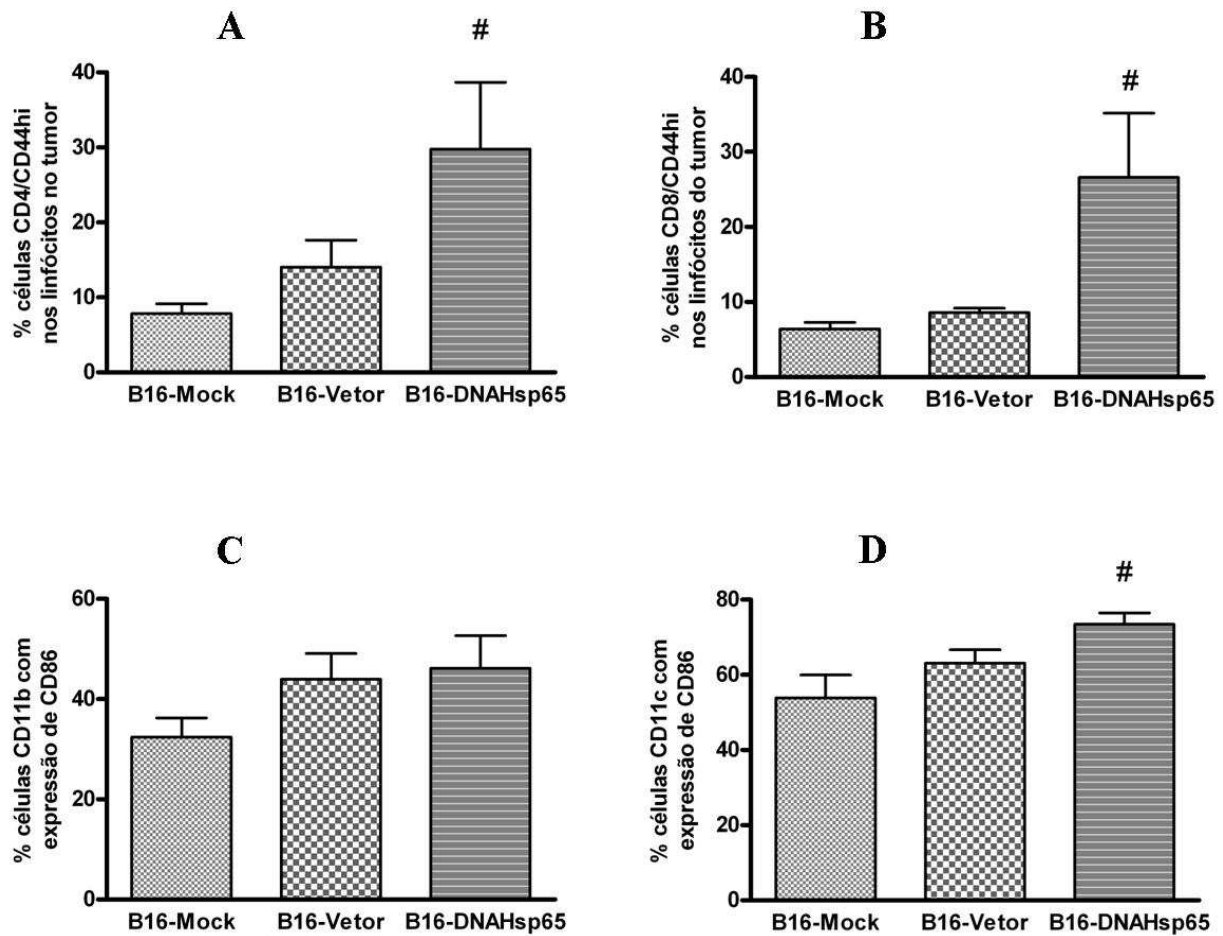


Figura 18. Porcentagem de células imunes infiltrantes do tumor com expressão de (A) CD4/CD44hi, (B) CD8/CD44hi, (C) CD11b/CD86 e (D) CD11c/CD86. Animais inoculados com células B16-Mock (eletroporadas e não transfectadas), B16-Vetor (transfectadas com o vetor pVAX) ou B16-DNAHsp65 (transfectadas com a vacina DNA-Hsp65). Camundongos C57BL/6 foram injetados com 5×10^4 células B16F10 eletroporadas em presença de 10µg de DNA plasmideal. Ao final de 18 dias os animais foram mortos para retirada do tumor e avaliação das populações celulares citometria de fluxo. Dados apresentados em média $\pm$ DP.

[#] $p < 0,05$ em relação ao Grupo Salina

Estatística feita por ANOVA seguida de teste Tukey

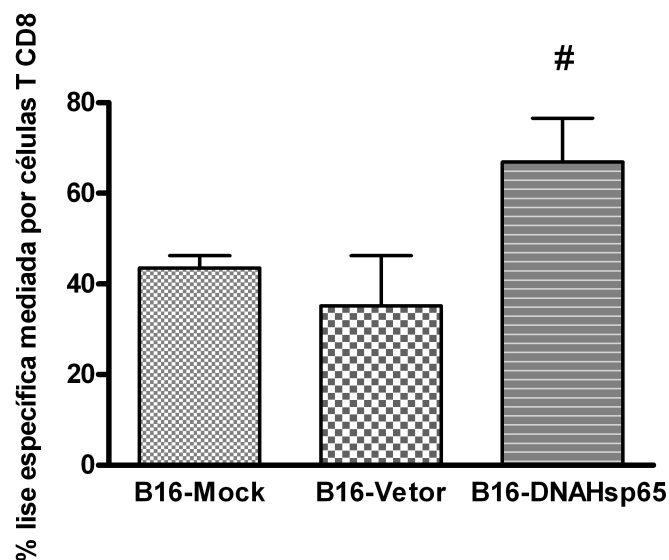


Figura 19. Porcentagem de lise específica de células tumorais mediada por células T CD8. Animais inoculados com células B16-Mock (eletroporadas e não transfectadas), B16-Vetor (transfectadas com o vetor pVAX) ou B16-DNAHsp65 (transfectadas com a vacina DNA-Hsp65). Camundongos C57BL/6 foram injetados com 5×10^4 células B16F10 eletroporadas em presença de 10 μ g de DNA plasmideal. Ao final de 18 dias, os animais foram mortos para remoção do baço, as células foram colocadas em co-cultura com monocamada de macrófagos pulsados com lisado total do tumor. Após 4 dias, as células T CD8 (efetoras) foram purificadas e colocadas em contato com as células B16F10 (alvo) por 18 horas. Após esse período, a taxa lise específica das mesmas foi avaliada. Razão efetoras: alvo de 20:1. Dados apresentados em média $\pm$ DP.

$p < 0,05$ em relação ao Grupo Salina

Estatística feita por ANOVA seguida de teste Tukey.

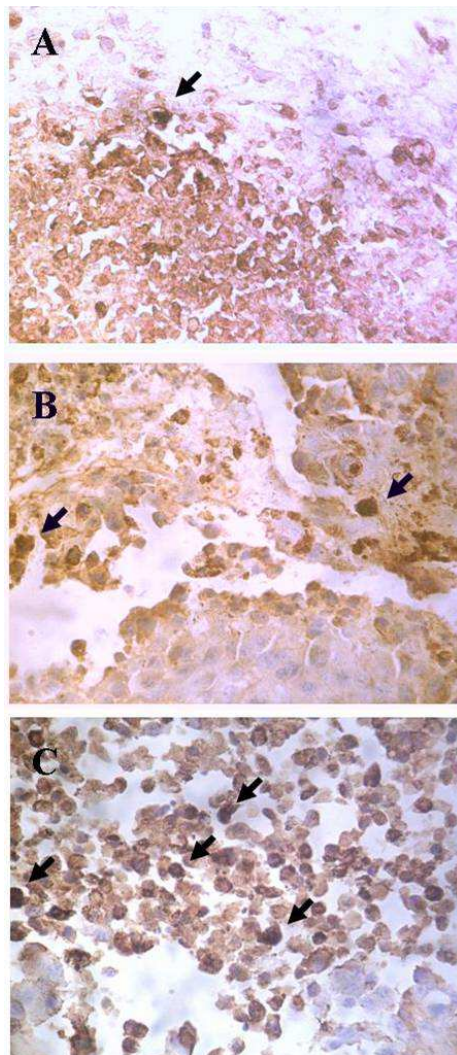


Figura 20. Corte histológico do tumor (400 x) marcado com anti-caspase-3 (setas). Animais inoculados com células (A) B16-Mock (eletroporadas e não transfectadas), (B) B16-Vetor (transfectadas com o vetor pVAX) ou (C) B16-DNAHsp65 (transfectadas com a vacina DNA-Hsp65). Camundongos C57BL/6 foram injetados com 5×10^4 células B16F10 eletroporadas em presença de $10\mu\text{g}$ de DNA plasmideal. Ao final de 18 dias os animais foram mortos para retirada do tumor e avaliação da expressão de caspase-3 por imunohistoquímica.

6.8.2.3. Expressão gênica no ambiente tumoral

Para avaliarmos a influência da transfecção prévia das células B16F10 com DNA plasmideal na expressão gênica no sítio tumoral, optamos por detectar genes envolvidos com 3 padrões diferentes da resposta imunológica. Foram avaliadas por RT-PCR em tempo real as mensagens dos genes de T-bet e GATA-3, respectivamente relacionados aos padrões de resposta Th1 e Th2, e o gene da citocina IL-17, relacionada ao padrão Th17.

O RNAm obtido a partir dos tumores dos animais que receberam as células eletroporadas, na presença ou não de DNA plasmideal, foi avaliado quanto à integridade (**Figura 21 A**), revelando as 2 bandas características das formas mais espiralada (28S) e menos espiralada (18S). A qualidade do cDNA foi avaliada por PCR em tempo real para o gene da β -actina (**Figura 21 B**) e sua amplificação foi usada para a normalização das amostras. Os resultados da quantificação relativa (em relação ao Grupo B16-Mock) dos genes de GATA-3, T-bet e IL-17 estão ilustrados na **Figura 22**. Destacamos o visível aumento na expressão de T-bet nos Grupo B16-DNAHsp65 e Grupo B16-Vetor em relação ao GrupoB16-Mock. Assim como para o tratamento intratumoral, o Grupo B16-Mock não exibiu qualquer amplificação para o gene da IL-17 na concentração inicial de 200 ng de cDNA, sendo necessário partir de uma quantidade maior (1 μ g de cDNA), apesar disso, 2 animais do grupo B16-Mock não exibiram nenhuma amplificação para este gene (dado não mostrado).

Não foi observada diferença quanto à expressão do gene de GATA-3.

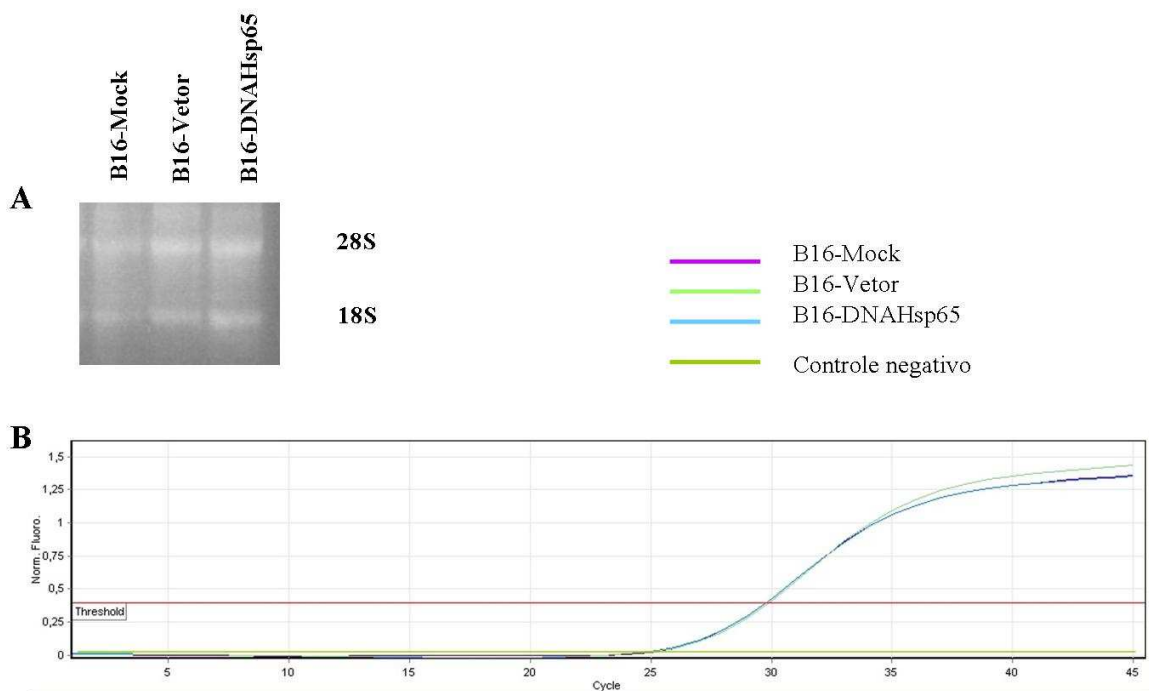


Figura 21. Resultado da reação de RT-PCR em tempo real. (A) Eletroforese em gel de agarose 1,5% para análise da integridade do mRNA, mostrando as duas bandas, 28S e 18S. (B) Curva de fluorescência normalizada para análise quantitativa da amplificação do gene da β -actina. Animais inoculados com células B16-Mock (eletroporadas e não transfectadas), B16-Vetor (transfectadas com o vetor pVAX) ou B16-DNAHsp65 (transfectadas com a vacina DNA-Hsp65). Camundongos C57BL/6 foram injetados com 5×10^4 células B16F10 eletroporadas em presença de $10\mu\text{g}$ de DNA plasmideal. Ao final de 18 dias, os animais foram mortos para remoção do tumor, extração do RNA e realização de RT-PCR em tempo real.

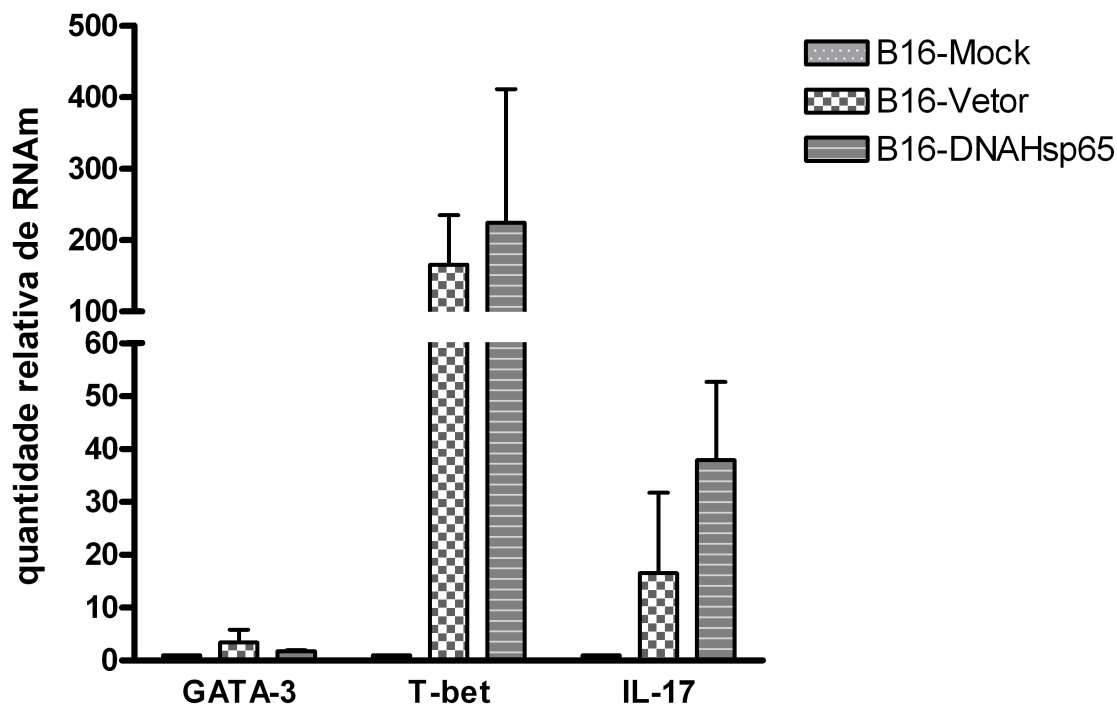
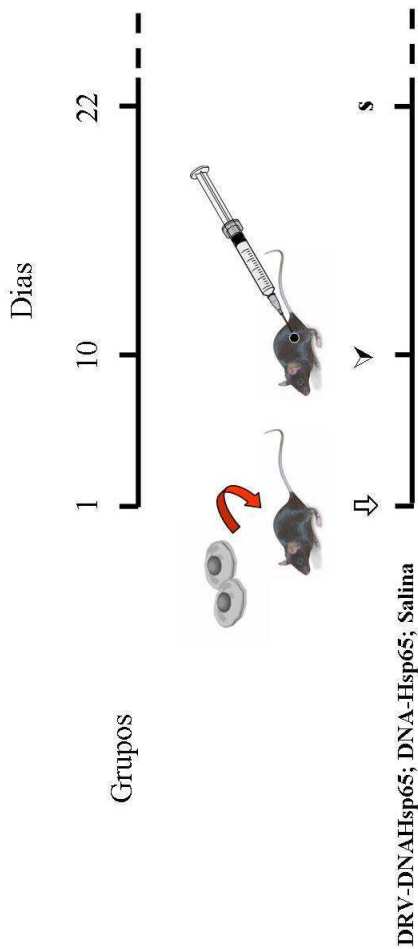


Figura 22. Quantidade relativa de RNAm dos genes GATA-3, T-bet e IL-17. Animais inoculados com células B16-Mock (eletroporadas e não transfectadas), B16-Vetor (transfectadas com o vetor pVAX) ou B16-DNAHsp65 (transfectadas com a vacina DNA-Hsp65). Camundongos C57BL/6 foram injetados com 5×10^4 células B16F10 eletroporadas em presença de $10\mu\text{g}$ de DNA plasmideal. Ao final de 18 dias, os animais foram mortos para remoção do tumor, extração do RNA e realização de RT-PCR em tempo real. Para a ilustração gráfica do padrão de expressão gênica, os dados da expressão dos genes nos Grupos B16-Vetor e B16-DNAHsp65, normalizados pelo controle interno β -actina estão apresentados em relação aos valores obtidos no grupo B16-Mock. Os dados foram inseridos na equação 2 (Anexo 1), $\rho x = (1+E\beta)^{\left[\Delta C_t^{AB} - (R\beta/Rx)(\Delta C_t^{BA}) \right]}$, essencialmente equivalente a: [expressão gênica relativa dos Grupos B16-Vetor ou B16-DNAHsp65, normalizados pela β -actina] / [expressão gênica relativa do Grupo B16-Mock respectivamente, normalizados pela β -actina]. Dados apresentados em média $\pm$ DP. Expressão gênica relativa comparada por teste t de Student.

**Tratamento intratumoral com a vacina DNA-Hsp65 adsorvida a lipossomas DRV:
Sobrevida e Resposta Imunológica**



↓ 5 x 10⁴ células B16F10 s.c.
▼ 100 µl (0,5 µg/µl) de DRV-DNAHsp65 (DRV-pVAX-hsp65),
(1 µg/µl) DNA-Hsp65 (pVAX-Hsp65) ou salina intratumoral
s metade dos animais foram mortos

6.9. Uso de DNA plasmideal encapsulado em vesículas lipossomais

6.9.1. Sobrevida e resposta imune induzida pela vacina DNA-Hsp65 adsorvida a lipossomas DRV

Para avaliar se a vacina DNA-Hsp65 adsorvida a lipossomas DRV aumentaria a taxa de sobrevivência em relação aos animais tratados com a vacina DNA-Hsp65 nu, a sobrevida dos mesmos foi acompanhada. Observamos que a injeção intratumoral com DNA em lipossoma (DRV-DNAHsp65) não alterou a sobrevida dos animais quando comparado ao Grupo Salina. Além disso, os animais que receberam injeção de DNA nu mostraram sobrevida maior quando comparados àqueles tratados com DNA encapsulado ou tratados com salina (**Figura 23**).

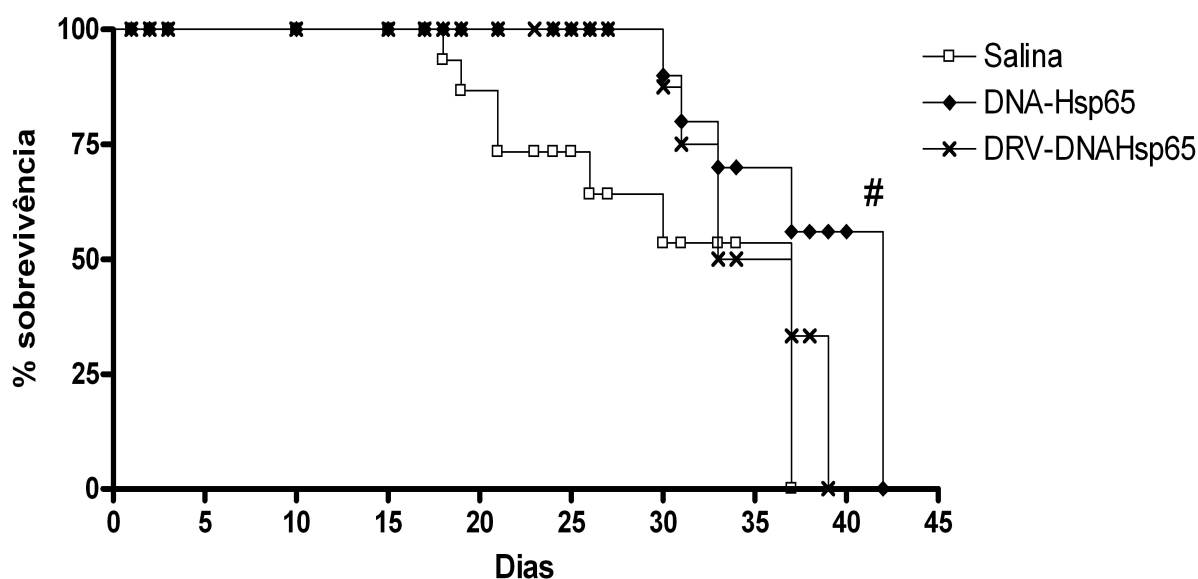


Figura 23. Porcentagem de sobrevivência de animais tratados com salina ou vacina DNA-Hsp65 adsorvida ou não à superfície de lipossomas DRV. Camundongos C57BL/6 foram injetados s.c com 5×10^4 células B16F10 no flanco. Dez dias após a implantação do tumor, os animais receberam 100 μ l de Salina (Grupo Salina), pVAX-Hsp65 (Grupo DNA-Hsp65) (1 μ g/ μ l), DRV-pVAX-Hsp65 (Grupo DRV-DNAHsp65) (0,5 μ g pVAX-Hsp65/ μ l). Todos os animais foram acompanhados até sua morte para avaliação da taxa de sobrevida.

$p < 0,05$ em relação ao Grupo Salina.

Curvas de Kaplan-Meier e diferenças avaliadas pelo teste de log rank.

6.9.2. Resposta imunológica induzida pela vacina DNA-Hsp65 adsorvida a lipossomas DRV

6.9.2.1. Massa tumoral

Podemos observar que o resultado de massa tumoral (**Figura 24**) indicou que os tumores do grupo DNA-Hsp65 se encontravam significativamente menores em relação ao Grupo Salina. No grupo DRV-DNAHsp65, não houve diferença estatística quando comparado ao controle Salina.

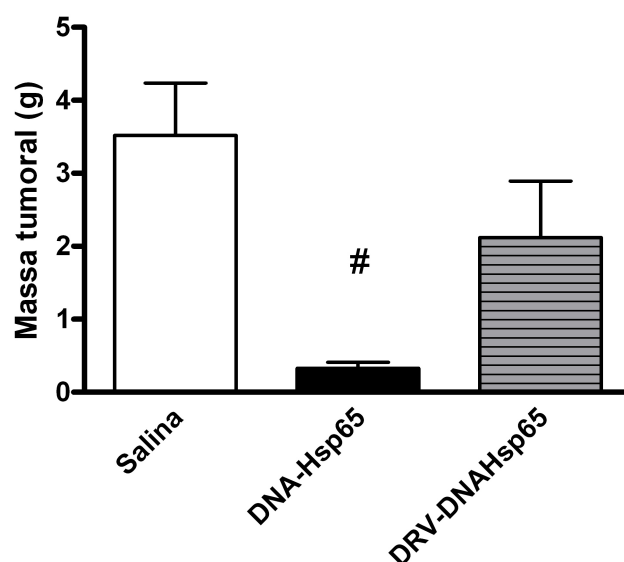


Figura 24. Massa tumoral (g). Camundongos C57BL/6 foram injetados s.c com 5×10^4 células B16F10 no flanco. Dez dias após a implantação do tumor, os animais receberam 100 μ l de Salina (Grupo Salina), pVAX-Hsp65 (Grupo DNA-Hsp65) (1 μ g/ μ l), DRV-pVAX-Hsp65 (Grupo DRV-DNAHsp65) (0,5 μ g pVAX-Hsp65/ μ l). Ao final de 22 dias os animais foram mortos para remoção e pesagem do tumor. Dados apresentados em média $\pm$ DP.

$p < 0,05$ em relação ao Grupo Salina.

Estatística feita por ANOVA seguida de teste Tukey.

6.9.2.2. Células imunes infiltrantes no tumor e lise específica mediada por células T CD8

As células imunes infiltrantes no tumor e a lise específica mediada por células T CD8 foram avaliadas a fim de determinar se animais tratados por via intratumoral com a vacina DNA-Hsp65 adsorvida a lipossomas DRV apresentariam diferença quando comparado à terapia com DNA-Hsp65 nu no recrutamento de células do sistema imunológico (células CD4, CD8 e APCs) para o sítio tumoral e se ocorreria aumento da lise específica de células B16F10 mediada por linfócitos T CD8.

O resultado das células infiltrantes na massa tumoral, após essa estratégia, está apresentado na **Figura 25**. Observamos que o tratamento com a vacina DNA-Hsp65 na forma DNA nu aumentou significativamente a porcentagem de células T CD4/CD44hi e T CD8/CD44hi (**Figura 25 A e B**) quando comparado aos demais grupos. Porém, o uso de DNA-Hsp65 encapsulado em lipossomas DRV foi o menos eficiente em recrutar as subpopulações T CD4 e CD8 para a área tumoral, observando-se redução na porcentagem dessas células quando comparada a outras estratégias. Por outro lado, houve um aumento na expressão de CD86 nas células CD11c, estatisticamente significativo, mesmo quando comparado ao grupo DRV-DNAHsp65 e grupo DNA-Hsp65.

Em relação ao ensaio de citotoxicidade, constatamos aumento significativo de lise específica de células B16F10 mediada por linfócitos T CD8 nos grupos tratados com DNA-Hsp65 adsorvido ou não a lipossomas. Além disso, o grupo DRV-DNAHsp65 apresentou maior porcentagem de lise específica mesmo quando comparado ao grupo DNA-Hsp65 (**Figura 26**). No entanto, se analisarmos a porcentagem de lise específica nos diferentes tratamentos, observamos que não há diferença entre as estratégias utilizadas na indução da citotoxicidade.

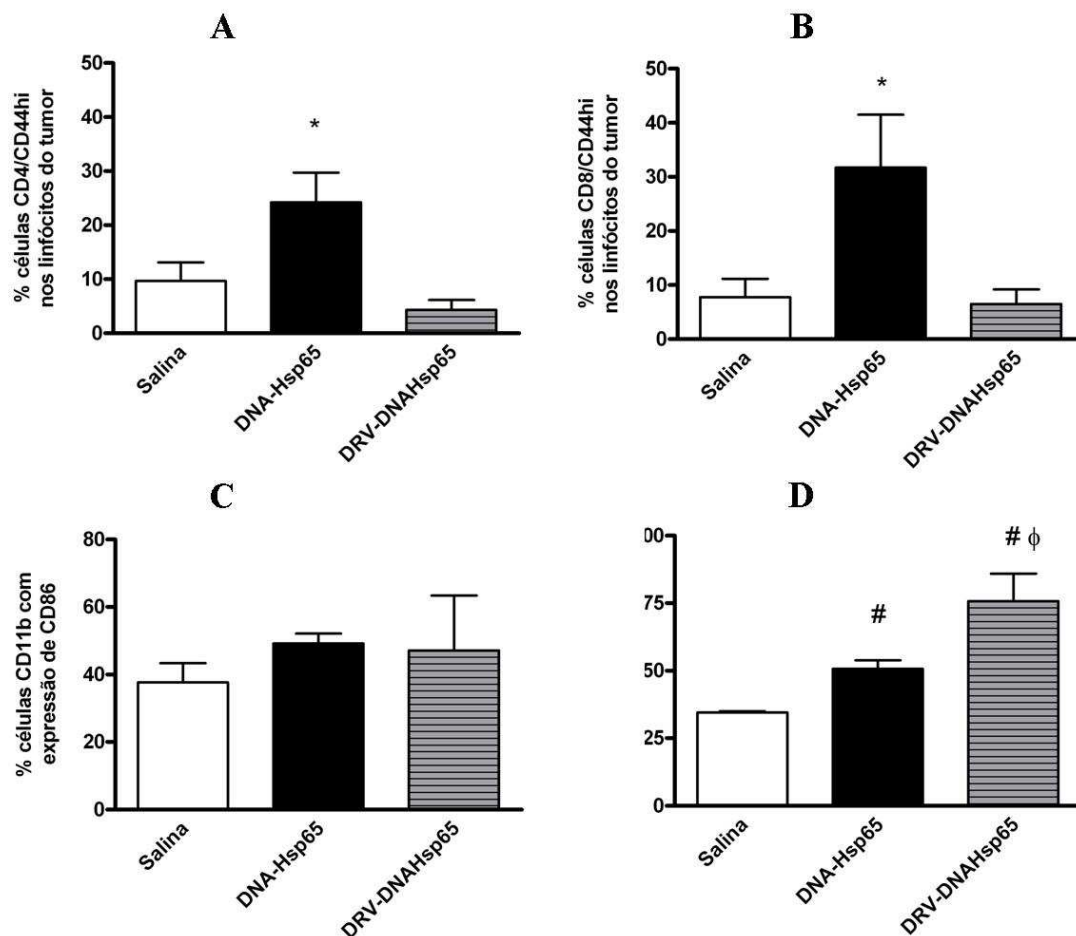


Figura 25. Porcentagem de células imunes infiltrantes do tumor com expressão de (A) CD4/CD44hi, (B) CD8/CD44hi; (C) CD11b/CD86 e (D) CD11c/CD86. Camundongos C57BL/6 foram injetados s.c com 5×10^4 células B16F10 no flanco. Dez dias após a implantação do tumor, os animais receberam 100μl de Salina (Grupo Salina), pVAX-Hsp65 (Grupo DNA-Hsp65) (1μg/μl), DRV-pVAX-Hsp65 (Grupo DRV-DNAHsp65) (0,5μg pVAX-Hsp65/μl). Ao final de 22 dias os animais foram mortos para retirada do tumor e avaliação das populações celulares citometria de fluxo. Dados apresentados em média ± DP.

* $p < 0,05$ em relação aos Grupos Salina e DRV-DNAHsp65

$p < 0,05$ em relação ao Grupo Salina

φ $p < 0,05$ em relação ao Grupo DNA-Hsp65

Estatística feita por ANOVA seguida de teste Tukey.

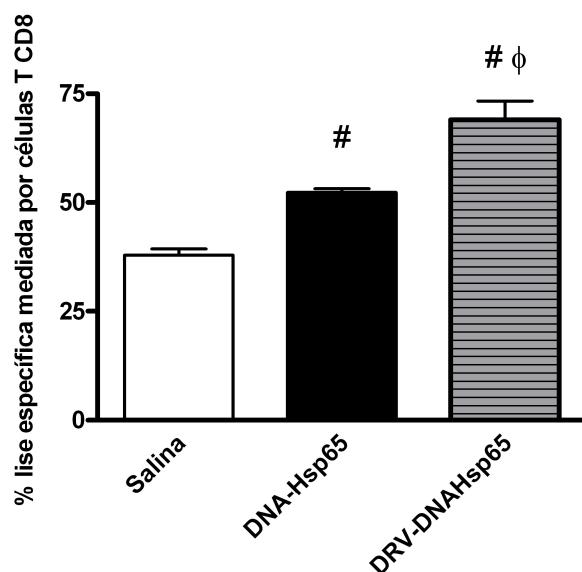


Figura 26. Porcentagem de lise específica de células tumorais mediada por células T CD8.

Camundongos C57BL/6 foram inoculados s.c. com 5×10^4 células B16F10. Dez dias após a implantação do tumor, os animais receberam 100μl de Salina (Grupo Salina), pVAX-Hsp65 (Grupo DNA-Hsp65) (1μg/μl), DRV-pVAX-Hsp65 (Grupo DRV-DNAHsp65) (0,5μg pVAX-Hsp65/μl). Ao final de 22 dias os animais foram mortos para remoção do baço, as células foram colocadas em co-cultura com monocamada de macrófagos pulsados com lisado total do tumor. Após 4 dias, as células T CD8 (efetoras) foram purificadas e colocadas em contato com as células B16F10 (alvo) por 18 horas. Após esse período, a taxa lise específica das mesmas foi avaliada. Dados apresentados em média $\pm$ DP.

$p < 0,05$ em relação ao Grupo Salina

φ $p < 0,05$ em relação ao Grupo DNA-Hsp65

Estatística feita por ANOVA seguida de teste Tukey

Discussão

7. Discussão

A idéia de que as células neoplásicas podem “evadir” do reconhecimento imune contém implicitamente o conceito de que os tumores podem ser destruídos pela resposta imunológica, tanto de forma espontânea quanto como resultado de uma intervenção imunoterapêutica (Khong and Restifo, 2002). Diversas células e moléculas da imunidade inata e adaptativa participam do reconhecimento e destruição das células tumorais, um processo conhecido como vigilância imunológica. Entretanto, as células neoplásicas evitam essa vigília por meio do desenvolvimento de clones pouco imunogênicos (seleção imunológica) e também pela supressão ativa da resposta imunológica (subversão imunológica) (Zitvogel et al., 2006). Dessa forma, inúmeras estratégias terapêuticas no combate ao câncer envolvem a utilização de moléculas que possam aumentar a apresentação de antígenos tumorais ou mesmo estimular o sistema imunológico, atuando muitas vezes como “sinais de perigo” (Todryk et al., 2000).

Nesse contexto, as proteínas de choque térmico (Hsps), além de alvo imunológico contra uma série de doenças infecciosas, começaram a ser descritas no início da década de 90 também pelo potencial uso contra neoplasias devido à sua capacidade de estimular a imunidade inata e suas propriedades em induzir resposta antígeno-específica aos peptídeos Hsp-associados (Srivastava, 2002a). Desse modo, iniciou-se em 1993 o desenvolvimento de pesquisas com Hsps na área de imunoterapias antitumorais em nossas linhas de investigação, no modelo de linfoma não-Hodgkin (Silva et al, 1993). Diferentes trabalhos na literatura têm documentado que as Hsps apresentam características muito promissoras no combate a neoplasias (Srivastava, 2002a; Ren et al., 2008), o que explica sua utilização em diferentes abordagens de tratamento antitumoral, inclusive ensaios clínicos (Wood et al., 2008; Michaluart et al., 2008).

No presente estudo, abordamos a utilização da vacina DNA-Hsp65, desenvolvida por nosso grupo, em três estratégias principais: 1) o tratamento por via intratumoral com DNA plasmideal nu na massa já implantada; 2) a transferência de células tumorais previamente transfectadas com os DNA plasmideais e 3) o uso de DNA encapsulado em lipossomas obtidos pelo método da desidratação-rehidratação (DRV) inoculado por via intratumoral. Dessa forma, podemos considerar nossa abordagem em dois pontos distintos. O primeiro envolve dois enfoques que visam uma terapia contra o tumor, usando tanto DNA nu em diferentes doses, como encapsulado em lipossomas. O

segundo foi uma estratégia para tentarmos avaliar, mesmo que indiretamente, o efeito do DNA-Hsp65 e da proteína no desenvolvimento do melanoma. Assim, usamos células tumorais transfectadas com a vacina DNA-Hsp65 para acompanhar o desenvolvimento tumoral.

Nossos resultados mostram o potencial antitumoral da vacina DNA-Hsp65 tanto quando administrada *in situ* como quando transfectada previamente. Além disso, do ponto de vista de aplicação clínica, nossos dados são importantes por indicar um conjunto de possíveis parâmetros de avaliação que possam servir como biomarcadores para auxiliar na validação da eficácia clínica de novas estratégias terapêuticas contra o câncer.

Como uma tradição de nosso laboratório, a primeira abordagem foi usar o DNA-Hsp65 nu para analisar alguns parâmetros. Inicialmente, avaliamos a sobrevida dos animais tratados com 1, 2 ou 3 doses de 100µg da vacina DNA-Hsp65 e observamos que, embora todos os animais tivessem morrido antes de 50 dias de experimento, o grupo tratado com a dose única da vacina DNA-Hsp65 apresentou sobrevida maior, estatisticamente significativa, quando comparado aos demais grupos controles. A maior sobrevida observada com apenas uma dose de DNA plasmideal quando comparado com as demais inoculações nos grupos DNA-Hsp65 2x e DNA-Hsp65 3x é bastante intrigante do ponto de vista da resposta imune. Uma hipótese aventada para explicar tal resultado poderia ser decorrente de excessiva estimulação antigênica, pelo curto intervalo de tempo entre as doses, o que poderia causar deleção das células T ativadas (Fonseca et al., 2007). Entretanto, estudos futuros são necessários para compreensão dos mecanismos envolvidos nessa resposta.

Por outro lado, o fato da estratégia de uma dose ter sido a única com capacidade de aumentar a sobrevida dos animais é mais promissor também por outras razões, pois dentre as estratégias de otimização, objetiva-se a redução da quantidade de material genético introduzido bem como a diminuição do número de injeções administradas (Rosada et al., 2008), tornando o procedimento menos invasivo, principalmente por se tratar de inoculações intratumorais.

Na avaliação da sobrevivência dos animais que receberam as células tumorais previamente transfectadas, observamos que, da mesma forma que o tratamento por via intratumoral na dose única, o grupo que recebeu as células transfectadas com DNA-Hsp65 (B16-DNAHsp65) apresentou uma taxa de sobrevivência significativamente

maior quando comparado aos grupos B16-Vetor e B16-Mock. Contudo, de maneira diferente do grupo Vetor, que não diferiu do grupo Salina, o grupo B16-Vetor teve aumento na porcentagem de sobrevivência em relação ao grupo B16-Mock, possivelmente devido à estimulação inespecífica da resposta imunológica promovida pelo vetor *per se*. Apesar da transfecção com o gene da Hsp65 não ter protegido completamente os animais contra o desenvolvimento de massa tumoral, aparentemente, o mesmo conseguiu retardar o crescimento neoplásico, provavelmente pelos mesmos mecanismos de quando realizamos o tratamento intratumoral com a vacina. Esse resultado é bastante importante, pois com uma quantidade muito menor da vacina, conseguimos atingir resultados semelhantes à terapia. O retardo no desenvolvimento tumoral nas células transfectadas pode indicar alguma ação da Hsp65 ou do DNA plasmideal, que *in vivo*, possam agir sobre células do sistema imune. Desse modo, os dados até agora discutidos sugerem que a estrutura do DNA plasmideal e, principalmente, a Hsp65 tenham alguma ação antitumoral ao interagir diretamente com células imunes presentes no tumor, ou indiretamente, induzindo, nas células tumorais, a expressão de moléculas necessárias à resposta imunológica. Embora nossos dados não nos permitam uma conclusão definitiva sobre os mecanismos da Hsp65, eles abrem perspectivas para uma avaliação mais aprofundada.

O potencial das Hsps na imunoterapia de tumores tem sido bastante explorado e apresenta resultados promissores inclusive no aumento de sobrevida. Hashemi et al. (2007) demonstraram que animais portadores de fibrosarcoma WEHI-164 e tratados com uma vacina de lisado total de células WEHI-164 com expressão aumentada de Hsp70 apresentaram sobrevida maior quando comparados ao grupo tratado apenas com o lisado tumoral.

Resultados obtidos em outro trabalho de nosso grupo mostraram o potencial da proteína recombinante Hsp65 (rHsp65) no combate a tumores. Tal estudo utilizou a rHsp65 como adjuvante em associação com lisado tumoral da célula CJCL (linhagem transfectada permanentemente com o gene da Hsp65). No estudo, foram realizadas 3 imunizações nos dias -10, 0 (dia do desafio tumoral) e 10 em camundongos inoculados intraperitonealmente (i.p.) com a linhagem tumoral parental J774 e se observou que esses animais tiveram uma redução de 1,9x no aumento da massa corpórea total, bem como apresentaram maior taxa de sobrevida quando comparados ao grupo salina desafiado (Botte, 2007). Assim como o estudo clínico de fase I realizado por nosso

grupo em pacientes terminais com carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (sobrevida média de 6 meses) no qual avaliamos a segurança da vacina DNA-Hsp65 e sua indução de resposta clínica. Dos 21 pacientes tratados, 4 apresentaram redução do volume tumoral e 2 estão vivos após quase 3 anos do término do ensaio (Michaluart et al., 2008).

Além disso, no estudo atual, optamos por avaliar, sobretudo a resposta imunológica no sítio tumoral, pois existem muitas evidências mostrando a correlação positiva entre a presença de linfócitos no tumor e o aumento de sobrevida de pacientes para diferentes tipos de câncer como, por exemplo, mama (Rilke et al., 1991), bexiga (Lipponen et al., 1992), cólon (Nacapoulou et al., 1981; Nalto et al., 1998), próstata (Epstein et al., 1976), ovário (Deligdish et al., 1982), reto (Jass, 1986) e neuroblastoma (Palma et al., 1978). Em alguns casos, uma correlação mais refinada mostrou que os linfócitos T CD8 são a população relevante que afeta a taxa de sobrevivência (Nalto et al., 1998).

Dados da literatura mostram também que a presença de linfócitos infiltrantes pode ser considerada um importante marcador prognóstico em numerosos tipos de câncer, em particular nos casos de melanoma, carcinoma de cólon (Zitvogel et al., 2004) e carcinoma de ovário (Tomšová et al., 2008). Além disso, em pacientes com carcinoma de cólon e reto, a presença de RNA mensageiro (RNAm) no tumor codificando moléculas expressas por células efectoras do tipo Th1 como granzima B, granulicina, T-bet, IFN- γ , entre outras, havia redução de invasão metastática e aumento de sobrevida (Pages et al., 2005)

No presente trabalho, observamos que, após a terapia com DNA-Hsp65 na dose única, ocorreu aumento significativo da expressão de moléculas co-estimulatórias nas populações de células apresentadoras de antígenos (APCs), CD11b/CD86 e CD11c/CD86, compostas principalmente por macrófagos e células dendríticas. Ressaltamos também o aumento significativo das células T CD8 com fenótipo ativado, (CD8/CD44^{hi}), consideradas como uma das populações celulares mais importantes no combate a tumores devido à sua capacidade citolítica (por exemplo Enomoto et al., 2006) e, como discutido anteriormente, por sua correlação com o aumento da taxa de sobrevivência. Além disso, o tratamento por via intratumoral com a vacina de DNA-Hsp65 também foi capaz de retardar o desenvolvimento neoplásico, avaliado pela massa tumoral. O aumento da porcentagem de lise específica mediada pelas células T CD8 e a presença de caspase-3 no tecido vacinado sugere que tal mecanismo possa estar

envolvido no controle do desenvolvimento tumoral. No entanto, como não temos nenhuma correlação direta entre a ação de T CD8 e aumento de capase-3 no tumor, não podemos excluir que outros mecanismos estejam participando da indução dessa caspase, inclusive a própria ação do DNA ou da Hsp65 (envolvidas em apoptoses). A análise histopatológica mostrou a existência de extensas áreas de necrose e a marcação imunoistoquímica evidenciou a presença de apoptose, tal aspecto é interessante para estudos futuros em relação ao mecanismo de ação da vacina.

O uso das células tumorais transfectadas foi capaz de induzir a ativação de células T CD8 específicas ao tumor. No nosso caso, as células tumorais foram provenientes de cultura, entretanto numa situação diferente, as células tumorais transfectadas poderiam ser originárias da massa tumoral do paciente sem a necessidade de separação das células dendríticas do indivíduo, favorecendo ensaios clínicos futuros, dentre outros fatores, pela redução de custos.

De modo semelhante à terapia intratumoral, a abordagem de tratamento com as células B16F10 previamente transfectadas com o gene da Hsp65 retardou o desenvolvimento tumoral em relação aos seus controles. A transfecção prévia com a vacina também demonstrou aumento significativo da porcentagem de linfócitos T infiltrantes com fenótipo ativado (CD4/CD44hi e CD8/CD44hi) e da expressão de CD86 na população CD11c quando comparado ao Grupo B16-Mock. Embora tais resultados estejam em discordância com os observados por Tarrant et al. (2004), os quais descrevem que os animais que receberam as células B16F10 transfectadas com o gene da Hsp65 de micobactéria não exibiram qualquer retardo no crescimento do tumor. As discrepâncias entre nossos estudos e os de Tarrant et al (2004) possivelmente sejam devidas aos diferentes métodos de transfecção empregados e ao vetor utilizado pelos autores.

Lukacs et al. (1993) observaram total perda da capacidade de desenvolvimento tumoral nas células de linfoma J774 transfectadas permanentemente com o gene da Hsp65 por vetor retroviral, diferentemente, no nosso caso, a transfecção prévia das células B16F10 com a vacina DNA-Hsp65 não foi capaz de conter completamente o desenvolvimento neoplásico. Apesar disso, nossos dados indicam potencial redução de desenvolvimento do tumor e aumento da imunogenicidade das células transfectadas com o gene da Hsp65 como observado por Lukacs et al. Uma divergência importante é o uso de retrovírus pelos autores, o que pode manter a expressão da Hsp65 por mais

tempo quando comparado à nossa transfecção com DNA plasmideal. Outro aspecto que concorre para a diferença dos dados obtida pode ser atribuído às linhagens tumorais distintas e, assim como no trabalho de Tarrant et al. (2004), à diferente forma de transfecção.

Um resultado bastante intrigante foi o aumento de sobrevida e menor massa tumoral do grupo B16-Vetor quando comparado ao grupo B16-Mock, uma vez que o vetor, quando inoculado na forma de injeção intratumoral, não teve potencial de aumentar a sobrevida nem de conter o desenvolvimento neoplásico. Possivelmente, a ação da estrutura do vetor, um DNA plasmideal, que apresenta seqüências de citosina-fosfato-guanina (CpG), conhecidamente capazes de se ligar a receptores do tipo Toll 9 e desencadear uma cascata de sinalização que induz produção de citocinas de padrão Th1 (Krieg, 2002; Klinman et al., 2004), possa estar envolvido nos resultados obtidos. Nesse caso, a eletroporação com o vetor poderia facilitar sua ação nas células tumorais, quando comparado à injeção intratumoral, na qual a molécula tem menos acesso às células alvo.

Diversos estudos mostram que o sistema imune responde às seqüências CpG por meio da ativação de uma resposta semelhante ao padrão Th1 e podem ser exploradas na terapia contra o câncer (Schreiber, 2001; Kunikata et al., 2004). Historicamente, sua importância foi destacada na terapia contra tumores, pois a resposta imune antitumoral induzida pelo extrato do bacilo de Calmette-Guérin (BCG) contra tumor de bexiga foi atribuída à presença do DNA bacteriano, mais especificamente aos motivos CpG presentes no cromossomo micobacteriano (Krieg, 2002). No nosso caso, embora sejam necessários estudos futuros e, permaneça não esclarecida a razão pela qual a forma de entrada do vetor faça extrema diferença para sua atuação, os resultados de expressão gênica no ambiente tumoral vêm elucidar que realmente a ação antitumoral no grupo B16-Vetor está correlacionada com a estimulação do sistema imunológico.

O fator de transcrição T-bet é essencial para a expressão de genes que levam à resposta de padrão Th1, tais como a diferenciação de células T *naive* e outros tipos celulares da resposta imunológica. Ao mesmo tempo, a expressão de T-bet redireciona a diferenciação das células T, por exemplo, células Th2 transduzidas com T-bet passam a produzir IFN- γ e reprimem a expressão de IL-4 e IL-5 (Szabo et al., 2000). O fator T-bet também desempenha importante papel na diferenciação de linfócitos T citotóxicos e ativação de células “natural killer” (NK) (Glimcher et al., 2004; Sullivan et al., 2003) e

enquanto células T CD8 T-bet^{-/-} estimuladas *in vitro* produzem quantidades equivalentes de IFN- γ , sua atividade citotóxica antígeno-específica *in vivo* é gravemente impedida (Sullivan et al., 2003).

Esses dados da literatura reforçam o que obtivemos em nossos resultados de expressão gênica, pois exclusivamente os grupos com resposta antitumoral tiveram aumento da expressão do fator T-bet. Nesse sentido, os animais tratados com a vacina DNA-Hsp65, por via intratumoral, apresentaram aumento significativo da expressão gênica relativa de T-bet quando comparado ao grupo Vetor. Novamente, na abordagem de transfecção prévia das células tumorais, o grupo transfectado apenas com o vetor apresentou expressão gênica relativa de T-bet semelhante ao grupo transfectado com a vacina, o que volta a indicar que o vetor pVAX, introduzido diretamente no citosol das células tumorais está, de alguma forma, ativando o sistema imunológico contra o tumor, mesmo que de forma inespecífica. A partir do que podemos chamar como “primer”, a resposta imunológica no ambiente tumoral se desenvolveria podendo levar à ativação de uma imunidade adaptativa. Vale a pena ressaltar que para qualquer dos enfoques de tratamento avaliados, não houve modulação da expressão gênica de GATA-3 (padrão Th2 de resposta).

Enquanto a presença do fator de transcrição T-bet, relacionada com o padrão de resposta Th1, é amplamente documentada como desejável na indução de uma resposta imune contra tumores (por exemplo Werneck et al. 2008), o papel da IL-17 em neoplasias é controverso. Alguns trabalhos mostram que a IL-17 está envolvida com o crescimento de tumores cervicais humanos em camundongos *nude* e é associada ao aumento dos níveis de expressão de IL-6 no sítio tumoral (Tartour et al., 1999), a qual, em quantidades aumentadas está correlacionada com potencial invasivo de carcinomas cervicais (Pages et al., 1999). Langowski et al. (2006) apontaram a IL-17 como responsável pela promoção do câncer e que o eixo IL-23/IL-17 poderia implicar na causa da neoplasia. No entanto, outras evidências indicam que a IL-17 pode proteger contra o desenvolvimento do câncer por meio de rejeição tumoral mediada pelo sistema imunológico (Hirahara et al., 2001; Hirahara et al., 2000; Benchetrit et al., 2002). Nesse sentido, Benchetrit et al., 2002 demonstraram que a IL-17 inibiu o crescimento de dois tipos de tumores hematopoiéticos, mastocitoma P815 e plasmocitoma J558L, em camundongos imunocompetentes. Kottke et al. (2007) mostraram ainda que a

autoimunidade mediada por células Th17, induzida por Hsp70, pode ser explorada como imunoterapia contra carcinoma metastático de próstata.

Um trabalho publicado recentemente mostrou que células Th17 adotivamente transferidas tiveram ação principal na destruição de melanoma B16 avançado e que, inesperadamente, o efeito terapêutico dessas células foi devido à produção de IFN- γ , enquanto a depleção de IL-17 e IL-23 teve pouco impacto na terapia (Muranski et al. 2008). Ao contrário dos dados obtidos por esses autores e, diferentemente dos trabalhos que apontam a citocina IL-17 como deletéria no desenvolvimento do câncer, no presente trabalho, a IL-17 parece desempenhar importante papel na resposta imunológica antineoplásica e o aumento de sua expressão gênica parece estar relacionado com proteção contra o crescimento do tumor, uma vez que, assim como para o fator de transcrição T-bet, os grupos com maior sobrevida e menor massa tumoral tiveram maior expressão gênica relativa de IL-17 (grupos DNA-Hsp65, B16-Vetor e B16-DNAHsp65).

Dessa forma, assim como argumentado por Benchetrit et al. (2002) e Bronte (2008), consideramos que, possivelmente, a IL-17 tenha papel pleiotrópico, e assim como outras citocinas, possa desempenhar atividades antagonistas na regulação do desenvolvimento neoplásico, sendo assim, outros fatores devem ser levados em consideração, como a imunogenicidade do modelo tumoral e as condições do hospedeiro.

O ensaio de citotoxicidade trouxe mais uma das possíveis formas de atuação da nossa vacina, visto que os animais tratados por via intratumoral com a vacina DNA-Hsp65 apresentaram maior porcentagem de lise específica das células B16F10 mediada por linfócitos T CD8 quando comparado aos seus respectivos controles. Por outro lado, o grupo B16-DNAHsp65 apresentou citotoxicidade específica superior apenas quando comparado ao grupo B16-Mock, complementando os dados anteriores de que o vetor, quando introduzido diretamente no citosol da célula tumoral, parece desempenhar algum papel que contribua com a resposta imune contra a mesma.

Com relação ao ensaio de citotoxicidade propriamente dito, embora possa ser questionada a utilização de proteínas exógenas (lisado tumoral) para a realização da co-cultura e obtenção dos linfócitos T CD8 específicos aos antígenos das células B16F10, a ocorrência de apresentação cruzada é um evento não incomum. Olazabal et al. (2008) demonstraram que macrófagos são capazes de fagocitar antígenos protéicos, solúveis ou

não, e apresentar seus peptídeos via MHC de classe I, estimulando assim a proliferação e produção de citocinas por linfócitos T CD8. Isso justifica nossa metodologia que tinha por objetivo privilegiar as células já primadas e específicas ao tumor, com menor interferência das células *naïve* em nossa avaliação de lise específica.

Além das seqüências CpG que podem estimular inespecificamente a resposta imune (Ishii et al., 2004), as Hsps são altamente imunogênicas e podem auxiliar na apresentação de antígeno do tumor, por seu papel de chaperona (Srivastava and Maki, 1991). Desse modo, nossa vacina DNA-Hsp65, para ambas as abordagens, parece ser capaz de aumentar a sobrevivência dos animais e retardar o desenvolvimento neoplásico por meio da estimulação da resposta imunológica contra o tumor, a qual é evidenciada pelo aumento de moléculas co-estimulatórias nas APCs, aumento na porcentagem de linfócitos T com fenótipo ativado no sítio tumoral e maior citotoxicidade específica.

Finalmente, numa tentativa de otimização do tratamento intratumoral, optamos por avaliar a utilização de estruturas lipossomais para oferecer o DNA às células tumorais. Os lipossomas, quando comparados a outros sistemas carreadores, além de protegerem as biomoléculas da degradação por nucleases e proteases, sustentam uma liberação controlada do material encapsulado, possuem propriedades adjuvantes e são capazes de interagir com as células pela similaridade de composição das suas membranas (Gregoriadis, 1995; Goyal et al., 2005).

Nesse contexto, decidimos utilizar lipossomas DRV, pois dentre as formulações testadas por nosso grupo, foi a que apresentou maior eficiência em primar a resposta imunológica em um padrão Th1 protetor na prevenção da tuberculose experimental (Rosada et al., 2008). Ao mesmo tempo, optamos pelo enfoque de tratamento de massa tumoral já implantada para otimização, devido à transfecção prévia das células neoplásicas representar uma situação não real de tratamento. Na literatura, freqüentemente, apenas tumores extremamente pequenos, não vascularizados ou “metástases” microscópicas hepáticas ou pulmonares podem ser tratadas. Em outros casos, o tratamento é realizado antes do desafio tumoral e, nessas circunstâncias, a proteção pode não mimetizar um cenário clínico real e sua relevância para pacientes humanos com doença estabelecida é verdadeiramente incerta.

Além disso, a opção por modelos mais próximos do que ocorre na clínica pode auxiliar também na detecção das limitações da abordagem testada e na busca por estratégias que visem minimizar essas limitações. No nosso caso mesmo, embora o

tratamento com a dose única seja feito numa massa tumoral visível e palpável, a eficiência da vacina se restringe ao período inicial de desenvolvimento do tumor (10 dias após implantação), uma vez que, quando o tratamento com a dose única foi iniciado num momento tardio, numa massa tumoral maior (14 dias após implantação), a terapia falhou em conter o desenvolvimento neoplásico, em estimular o aporte de células do sistema imune e em aumentar a citotoxicidade contra células B16F10 (dado não mostrado).

A tentativa de otimização com a vacina adsorvida aos lipossomas DRV não gerou uma resposta melhor frente ao melanoma B16F10. Observamos que os tumores do grupo DNA-Hsp65 se encontravam significativamente menores em relação ao grupo Salina e apesar da tendência à redução da massa tumoral no grupo DRV-DNAHsp65, não houve diferença quando comparado ao controle. A ocorrência de algumas diferenças na ação da própria vacina de DNA nu, como, por exemplo, o não aumento na expressão de CD86 na população CD11c pode ter ocorrido por causa do período de avaliação diferente, pois para os demais estudos, os parâmetros foram analisados no dia 18, enquanto neste caso, o dia 22 foi escolhido. Optamos por avaliar os parâmetros imunológicos no dia 22 devido à utilização de estruturas de liberação controlada do DNA, no caso lipossomas DRV, pois como visto na expressão da proteína recombinante no tumor, a mesma começa a ser detectada 4 dias após a injeção do DNA-Hsp65. Portanto, acreditamos que a análise no dia 18, como normalmente realizada nos experimentos de dose única fosse demasiadamente precoce para liberação, transcrição, tradução da proteína Hsp65 e atuação numa resposta contra o tumor. Um dos problemas com sistemas de liberação *in vivo* é que embora protejam a molécula, podem dificultar sua liberação para o interior da célula. Enquanto em patologias nas quais o tempo de indução da resposta imune não precisa ser imediato pelo próprio ciclo replicativo do patógeno (lento), nos casos como dessa neoplasia, esse retardo na liberação da molécula de DNA plasmideal para transcrição e tradução poderia explicar nossos dados. Futuramente, análises de RT-PCR ou mesmo *Western Blot* poderão ajudar a esclarecer essa questão.

Embora o grupo DRV-DNAHsp65 tenha apresentado maior expressão de CD86 na superfície das células dendríticas e maior percentual de lise específica mediada por células T CD8, inclusive quando comparado ao grupo DNA-Hsp65, isso não refletiu numa resposta antitumoral efetiva com aumento de sobrevida (principal parâmetro de

resposta). O aumento da citotoxicidade específica, por ser um ensaio funcional e a maior expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície de uma importante APC como a célula dendrítica, poderia indicar que a vacina em lipossomas atuaria de maneira mais eficiente contra a neoplasia, entretanto, devido ao rápido crescimento do tumor e à observação prévia do não benefício da terapia quando administrada num momento mais tardio (dado não mostrado) nos sugere que a vacina DNA-Hsp65 adsorvida ao lipossoma DRV parece não ter sido capaz de promover uma resposta no momento adequado. Não descartamos porém, que a utilização de adjuvantes, como quantidades adicionais de CpG, possa estimular o sistema imunológico, minimizando o efeito da liberação mais lenta e permitindo, por fim, que a formulação lipossomal exerça efeitos benéficos à terapia.

Os resultados aqui apresentados reforçam o que nosso grupo havia observado sobre o potencial da Hsp65 no combate a tumores pela estimulação da resposta imunológica (Silva et al., 1992; Botte, 2007; Michaluate et al., 2008), o que é bastante relevante, pois mesmo numa situação na qual terapias convencionais contra o câncer são empregadas, o sistema imunológico pode desempenhar importante papel. Zitvogel et al. (2008) relatam inclusive que a resposta imunológica local é necessária para que a quimioterapia tenha seu melhor efeito e que em algumas neoplasias, pacientes portadores de defeitos no sistema imunológico têm um prognóstico particularmente negativo. Do mesmo modo, a resposta imune induzida contra células tumorais durante a vigilância imunológica, pode contribuir com a eficácia da radio ou quimioterapia.

Pode ser argumentado que a necessidade de introdução de uma formulação diretamente no tumor restrinja os tipos de câncer que possam vir a ser tratados com a mesma. No entanto, os avanços tecnológicos em equipamentos para obtenção de imagens *in vivo* e em tempo real (por exemplo. Explore Ultra – GE) indicam que mesmo tumores em órgãos internos poderão receber inoculações intratumorais guiadas.

Assim, nossos resultados mostram a importância da Hsp65 na ativação e indução de alguns mecanismos imunológicos no combate ao câncer, como já discutidos para outras Hsp. Os dados aqui apresentados refletem a necessidade de se determinar parâmetros imunológicos como controle de ação antitumoral, mas também abrem perspectivas para novos ensaios entre a relação a Hsp65 e tumor, uma vez que a vacina se mostrou capaz de estimular a resposta imunológica contra a neoplasia. Em conjunto, os dados obtidos mostram o potencial antitumoral da abordagem do DNA nu e da transfecção prévia e e

ao mesmo tempo abrem perspectivas para estudos futuros que possam aumentar a efetividade dessa vacina no combate a tumores.

Conclusões

8. Conclusões

A vacina DNA-Hsp65 mostrou capacidade de retardar o desenvolvimento do tumor e aumentar a sobrevida dos animais. Essa atenuação do crescimento tumoral e o aumento da taxa de sobrevivência podem estar correlacionados principalmente com aumento da porcentagem de linfócitos T CD8 ativados, considerados importante indicador de resposta contra tumores. A vacina também induziu aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície de células dendríticas no sítio tumoral, favorecendo uma apresentação antigênica eficiente num ambiente ativador da resposta. Além disso, o aumento da porcentagem de lise específica das células de melanoma B16F10 mediada por linfócitos T CD8 citotóxicos mostra indução de uma das mais relevantes respostas contra o câncer. A vacina também se mostrou capaz de atuar no nível de expressão gênica, modulando os genes de T-bet e IL-17 no ambiente tumoral. Assim sendo, os dados aqui apresentados mostram o potencial antitumoral da vacina DNA-Hsp65 por meio da estimulação da resposta imunológica.

Referências Bibliográficas

9. Referências Bibliográficas

ACS Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta: 2007.

Algarra I, Collado A, Garrido F. Altered MHC class I antigens in tumors. *Int J Clin Lab Res* 1997; 27: 95-102.

Banchereau J and Palucka AK. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 296-306.

Bangham AD; Standish MM; Watkins JC. Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. *J Molec Biol* 1965; 13: 238-

Barbuto JA, Ensina LF, Neves AR, Bergami-Santos P, Leite KR, Marques R, Costa F, Martins SC, Camara-Lopes LH, Buzaid AC. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunol Immunothe.* 2004; 53: 1111-1118.

Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava P K. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 2001; 14: 303–313.

Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver maturation signal to dendritic cells and activate the NFκB pathway. *Int Immunol* 2000; 12: 1539–1546.

Basu S, Srivastava PK. Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity. *J Exp Med.* 1999;189: 797-802.

Benchetrit F, Ciree A, Vives V, Warnier G, Gey A, Sautès-Fridman C, Fossiez F, Haicheur N, Fridman WH, Tartour E. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* 2002; 99: 2114-2121.

Binder RJ. Heat shock protein vaccines: from bench to bedside. *Int Rev Immunol* 2006; 25: 353–375.

Blachere NE, Li Z, Chandawarkar RY, Suto R, Jaikaria NS, Basu S, Udon H, Srivastava PK. Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted *in vitro*, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity. *J Exp Med* 1997; 186: 1315-1322.

Bonato VL, Goncalves ED, Soares EG, Santos Junior RR, Sartori A, Coelho Castelo, AA, Silva CL. Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8+ cells, interferon-gamma recovery and reduction of lung injury. *Immunology* 2004; 113: 130-138.

Bonato VL, Lima VM, Tascon RE, Lowrie DB, Silva, CL. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and Mycobacterium tuberculosis-infected mice. *Infect Immun* 1998; 66: 169-175.

Boon T, Cerottini J C, Van den Eynde B, van der Bruggen P and Van Pel A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol* 1994; 12: 337-365

- Botte, DA. Avaliação do efeito anti-tumoral da proteína de choque térmico HSP65 formulada em lipossomas catiônicos. Dissertação, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, 2007.
- Bronte V. Th17 and cancer: friends or foes? *Blood* 2008;112:214.
- Bystryn JC, Oratz R, Harris MN, Roses DF, Golomb FM, Speyer JL. Immunogenicity of a polyvalent melanoma antigen vaccine in humans. *Cancer* 1988; 61: 1065-1070.
- Cabrera T, Fernandez MA, Sierra A, Garrido A, Herruzo A, Escobedo A, Fabra A, Garrido F. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Human Immunol* 1996; 50: 127-134.
- Cabrera T, Salinero J, Fernandez MA, Garrido A, Esquivias J, Garrido F. High frequency of altered HLA class I phenotypes in laryngeal carcinomas. *Human Immunol* 2000; 61: 499-506. *Cancer* 1995; 75: 495-502.
- Casey DG, Lysaght J, James T, Bateman A, Melcher AA, Todryk SM. Heat shock protein derived from a non-autologous tumour can be used as an anti-tumour vaccine. *Immunology* 2003;110: 105-111.
- Cemazar M, Jarm T, Miklavcic D, Lebar AM, Ithan A, Kopitar NA, Sersa G. Effect of electric-field intensity on electroporabilization and electrosensitivity of various tumor-cell lines in vitro. *Electro – and Magnetobiol* 1998; 17: 263-272.
- Chen W, Wang J, Shao C, Liu S, Yu Y, Wang Q, Cao X. Efficient induction of antitumor T cell immunity by exosomes derived from heat-shocked lymphoma cells. *Eur J Immunol* 2006; 36: 1598-1607.
- Chu NR, Wu HB, Wu TC, Boux LJ, Mizzen LA, Siegel MI. Immunotherapy of a human papillomavirus type 16 E7-expressing tumor by administration of fusion protein comprised of Mycobacterium bovis BCG Hsp65 and HPV16 E7. *Cell Stress Chaperones* 2000; 5: 401-405.
- Ciupitu AM, Petersson M, Kono K, Charo J, Kiessling R. Immunization with heat shock protein 70 from methylcholanthrene-induced sarcomas induces tumor protection correlating with *in vitro* T cell responses. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 163-170
- Coelho-Castelo AA, Santos Junior RR, Bonato VL, Jamur MC, Oliver C, Silva CL. B-lymphocytes in bone marrow or lymph nodes can take up plasmid DNA after intramuscular delivery. *Hum Gene Ther* 2003; 14: 1279-1285.
- Coelho-Castelo AA, Trombone AP, Rosada RS, Santos RR, Jr Bonato VL, Sartori A, Silva CL. Tissue distribution of a plasmid DNA encoding Hsp65 gene is dependent on the dose administered through intramuscular delivery. *Genet Vaccines Ther* 2006; 4: 1.
- Conry RM, Curiel DT, Strong TV, Moore SE, Allen KO, Barlow DL, Shaw DR, LoBuglio AF. Safety and immunogenicity of a DNA vaccine encoding carcinoembryonic antigen and hepatitis B surface antigen in colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2782-2787.
- Crommelin DJA and Scherleier H. Liposomes. *Kreuter. Nova Iorque, Marcek Dekker, Inc* 1994; 66: 73-190.

Daniels GA, Sanchez Perez L, Diaz RM, Kottke T, Thompson J, Lai M, Gough M, Karim M, Bushell A, Chong H, Melcher A, Harrington K, Vile RG. A simple method to cure established tumors by inflammatory killing of normal cells. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 1125-1132.

Davidson WF, Giese T, Fredrickson TN. Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas-Fas ligand interactions. *J Exp Med* 1998; 187: 1825-1838.

Deligdisch L, Jacobs AJ, Cohen CJ. Histologic correlates of virulence in ovarian adenocarcinoma. II. Morphologic correlates of host response. *Am J Obstet Gynecol* 1982;144: 885-889.

Ding A. The role of MyD88 and TLR4 in the LPS mimetic activity of Taxol. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2448-2457.

Donnelly JJ, Wahren B, Liu MA. DNA vaccines: progress and challenges. *J Immunol* 2005; 175: 633-639.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3: 991-998.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoeediting. *Immunity* 2004; 21: 137-148.

Enomoto Y, Bharti A, Khaleque AA, Song B, Liu C, Apostolopoulos V, Xing PX, Calderwood SK, Gong J. Enhanced immunogenicity of heat shock protein 70 peptide complexes from dendritic cell-tumor fusion cells. *J Immunol* 2006;177: 5946-5955

Ensaios clínicos com Hsps. Disponível em:
<<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=hsp+and+cancer>>. Acesso em: 08/08/2008.

Epstein NA, Fatti LP. Prostatic carcinoma: some morphological features affecting prognosis. *Cancer* 1976; 37: 2455-65.

Finn OJ. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat Rev Immunol* 2003;3: 630-641.

Fonseca DM, Silva CL, Paula MO, Soares EG, Marchal G, Horn C, Bonato VL. Increased levels of interferon-gamma primed by culture filtrate proteins antigen and CpG-ODN immunization do not confer significant protection against Mycobacterium tuberculosis infection. *Immunology* 2007;121: 508-517.

Fontaine P, Roy Proulx G, Knafo L, Baron C, Roy DC, Perreault C. Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus host disease. *Nature Med* 2001; 7: 789-794.

Galon J, Costes A, Sanchez Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313: 1960-1964.

Ge W, Sui YF, Wu DC, Sun YJ, Chen GS, Li ZS, Si SY, Hu PZ, Huang Y, Zhang XM. Mage-1/Heat shock protein 70/Mage-3 fusion protein vaccine in nanoemulsion enhances

cellular and humoral immune responses to MAGE-1 or MAGE-3 *in vivo*. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 841-849.

George AJ and Stevenson FK. Prospects for the treatment of B cell tumors using idiotypic vaccination. *Int Rev Immunol* 1989; 4: 271-310.

Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM, Biggs JC, Champlin RE, Gluckman E, Hoffmann RG, Jacobsen SJ, Marmont AM, McGlave PB et al. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med* 1988; 108: 806-814.

Gomez Gutierrez JG, Elpek KG, Montes de Oca Luna R, Shirwan H, Sam Zhou H, McMasters KM. Vaccination with an adenoviral vector expressing calreticulin-human papillomavirus 16 E7 fusion protein eradicates E7 expressing established tumors in mice. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 997-1007

Gonçalves ED, Bonato VL, da Fonseca DM, Soares EG, Brandão IT, Soares AP, Silva CL. Improve protective efficacy of a TB DNA-HSP65 vaccine by BCG priming. *Genet Vaccines Ther* 2007; 22: 5-7.

Goyal P, Goyal K, Vijaya Kumar SG, Singh A, Katore OP, Mishra DN. Liposomal drug delivery systems-clinical applications. *Acta Pharm* 2005; 55: 1-25.

Graner M, Raymond A, Akporiaye E, Katsanis E. Tumor-derived multiple chaperone enrichment by free-solution isoelectric focusing yields potent antitumor vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49: 476-484.

Graner MW, Zeng Y, Feng H, Katsanis E. Tumor-derived chaperone-rich cell lysates are effective therapeutic vaccines against a variety of cancers. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52: 226-234.

Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Trends Biotechnol* 1995; 13: 527-537.

Grillo Lopez AJ, Hedrick E, Rashford M, Benyunes M. Rituximab: ongoing and future clinical development. *Semin Oncol* 2002; 29: 105-112.

Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 927-974.

Hara I, Sato N, Miyake H, Muramaki M, Hikosaka S, Kamikono S. Introduction of 65 KDa antigen of Mycobacterium tuberculosis to cancer cells enhances anti-tumor effect of BCG therapy. *Microbiol Immunol* 2004; 48: 289-295.

Hashemi SM, Hassan ZM, Soudi S, Ghazanfari T, Kheirandish M, Shahabi S. Evaluation of anti-tumor effects of tumor cell lysate enriched by HSP-70 against fibrosarcoma tumor in BALB/c mice. *Int Immunopharmacol* 2007; 7: 920-927.

Hauser H, Shen L, Gu QL, Krueger S, Chen SY. Secretory heat-shock protein as a dendritic cell-targeting molecule: a new strategy to enhance the potency of genetic vaccines. *Gene Ther* 2004; 11: 924-932.

Hayashi T, Imai K, Morishita Y, Hayashi I, Kusunoki Y, Nakachi K. Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Res* 2006; 66: 563-570.

- Heiser A, Maurice MA, Yancey DR, Wu NZ, Dahm P, Pruitt SK, Boczkowski D, Nair SK, Ballo MS, Gilboa E, Vieweg J. Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA. *J Immuno*. 2001;166: 2953-2960.
- Heslop HE, Ng CY, Li C, Smith CA, Loftin SK, Krance RA, Brenner MK, Rooney CM. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med* 1996; 2: 551-555.
- Hirahara N, Nio Y, Sasaki S, Minari Y, Takamura M, Iguchi C, Dong M, Yamasawa K, Tamura K. Inoculation of human interleukin-17 gene-transfected Meth-A fibrosarcoma cells induces T cell-dependent tumor-specific immunity in mice. *Oncol* 2001;61:79-89.
- Hirahara N, Nio Y, Sasaki S, Takamura M, Iguchi C, Dong M, Yamasawa K, Itakura M, Tamura K. Reduced invasiveness and metastasis of Chinese hamster ovary cells transfected with human interleukin-17 gene. *Anticancer Res*. 2000; 20: 3137-3142.
- Hofbauer GF, Kamarashev J, Geertsen R, Boni R, Drummer R. Melan A/MART-1 immunoreactivity in formalin-fixed paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *Melanoma Res* 1998; 8: 337-343.
- Huang C, Yu H, Wang Q, Ma W, Xia D, Yi P, Zhang L, Cao X. Potent antitumor effect elicited by superantigen-linked tumor cells transduced with heat shock protein 70 gene. *Cancer Sci* 2004; 95: 160-167.
- Huang C, Yu H, Wang Q, Yang G, Ma W, Xia D, Chen X, Yi P, Shen F, Zheng H, Cao X. A novel anticancer approach: SEA-anchored tumor cells expressing heat shock protein 70 onto the surface elicit strong anticancer efficacy. *Immunol Lett* 2005; 101: 71-80
- Huang XF, Ren W, Rollins L, Pittman P, Shah M, Shen L, Gu Q, Strube R, Hu F, Chen SY. A broadly applicable, personalized heat shock protein-mediated oncolytic tumor vaccine. *Cancer Res* 2003; 63: 7321-7329.
- Huang Y, Obholzer N, Fayad R, Qiao L. Turning on/off tumor-specific CTL response during progressive tumor growth. *J Immunol* 2005; 175: 3110-3116.
- Huygen K. DNA vaccines: application to tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2: 971-978.
- Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 2000; 356: 1795-1799.
- INCA Magnitude do Câncer no Brasil Disponível em:
<http://www.inca.gov.br/situacao/arquivos/ocorrencia_magnitude_cancerbrasil.pdf> Acesso em: 14/7/2008.
- INCA O que é o câncer? Disponível em:
<http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=322>. Acesso em: 14/7/2008.
- Ishii KJ, Gursel I, Gursel M, Klinman DM. Immunotherapeutic utility of stimulatory and suppressive oligodeoxynucleotides. *Curr Opin Mol Ther* 2004; 6: 166-174.
- Ito A, Matsuoka F, Honda H, Kobayashi T. Heat shock protein 70 expression induces antitumor immunity during intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles. *Cancer Immunol Immunother* 2003; 52: 80-88.

- Iuchi Y, Torimoto Y, Sato K, Tamura Y, Jimbo J, Inamura J, Shindo M, Ikuta K, Ohnishi K, Kohgo Y. Combined use of dendritic cells enhances specific antileukemia immunity by leukemia cell-derived heat shock protein 70 in a mouse model with minimal residual leukemia cells. *Int J Hematol* 2006; 84: 449-458
- Jager E, Ringhoffer M, Karbach J, Arand M, Oesch F, Knuth A. Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8(+) cytotoxic-T-cell responses: Evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int J Cancer* 1996; 66: 470-476.
- Janetzki S, Blachere NE, Srivastava PK. Generation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes and memory T cells by immunization with tumor-derived heat shock protein gp96. *J Immunother* 1998; 21: 269-276.
- Jass JR. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. *J Clin Pathol.* 1986; 39: 585-589.
- Jimbo J, Sato K, Hosoki T, Shindo M, Ikuta K, Torimoto Y, Kohgo Y. Induction of leukemia-specific antibodies by immunotherapy with leukemia-cell-derived heat shock protein 70. *Cancer Sci* 2008; 99:1427-1434.
- Jonasch E, Wood C, Tamboli P, Pagliaro LC, Tu SM, Kim J, Srivastava P, Perez C, Isakov L, Tannir N. Vaccination of metastatic renal cell carcinoma patients with autologous tumour-derived vitespen vaccine: clinical findings. *Br J Cancer* 2008; 98: 1336-1341.
- Kawai N, Ito A, Nakahara Y, Futakuchi M, Shirai T, Honda H, Kobayashi T, Kohri K. Anticancer effect of hyperthermia on prostate cancer mediated by magnetite cationic liposomes and immune-response induction in transplanted syngeneic rats. *Prostat* 2005; 64: 373-381.
- Kershaw MH, Teng MWL, Smyth MJ, Darcy PK. Supernatural T cells: genetic modification of t cells for cancer therapy. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 928-940
- Khong HT , Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol* 2002; 3: 999-1005.
- Kim HS, Choo YS, Koo T, Bang S, Oh TY, Wen J, Song SY. Enhancement of antitumor immunity of dendritic cells pulsed with heat-treated tumor lysate in murine pancreatic cancer. *Immunol Lett* 2006; 103: 142-148.
- Kirby C, Gregoriadis G. Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnol* 1984; 2: 979-984.
- Klinman DM, Currie D, Gursel I, Verthelyi D. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol Rev* 2004;199: 201-216.
- Korbelik M, Sun J. Photodynamic therapy-generated vaccine for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 900-909.
- Kotera Y, Shimizu K, Mulé JJ. Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunization. *Cancer Res.* 2001; 61: 8105-8109.
- Kottke T, Sanchez-Perez L, Diaz RM, Thompson J, Chong H, Harrington K, Calderwood SK, Pulido J, Georgopoulos N, Selby P, Melcher A, Vile R. Induction of hsp70-mediated

- Th17 autoimmunity can be exploited as immunotherapy for metastatic prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 11970-11979
- Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 709-760.
- Kunikata N, Sano K, Honda M, Ishii K, Matsunaga J, Okuyama R, Takahashi K, Watanabe H, Tamura G, Tagami H, Terui T. Peritumoral CpG oligodeoxynucleotide treatment inhibits tumor growth and metastasis of B16F10 melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2004; 123:395–402.
- Lan YH, Li YG, Liang ZW, Chen M, Peng ML, Tang L, Hu HD, Ren H. A DNA vaccine against chimeric AFP enhanced by HSP70 suppresses growth of hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 1009-1016.
- Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K, Basham B, McClanahan T, Kastelein RA, Oft M. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*. 2006; 442: 461-465.
- Lanuti M, Rudginsky S, Force SD, Lambright ES, Siders WM, Chang MY, Amin KM, Kaiser LR, Scheule RK, Albelda SM. Cationic lipid:bacterial DNA complexes elicit adaptive cellular immunity in murine intraperitoneal tumor models. *Cancer Res* 2000; 60: 2955-2963.
- Lee KH, Panelli MC, Kim CJ, Riker AI, Bettinotti MP, Roden MM, Fetsch P, Abati A, Rosenberg SA, Marincola FM. Functional dissociation between local and systemic immune response during anti-melanoma peptide vaccination. *J Immunol* 1998; 161: 4183-4194.
- Lehner T, Bergmeier LA, Wang Y, Tao L, Sing M, Spallek R, van der Zee R. Heat shock proteins generate beta- chemokines which function as innate adjuvants enhancing adaptive immunity. *Eur J Immunol* 2000; 30: 594-603.
- Li D, Li H, Zhang P, Wu X, Wei H, Wang L, Wan M, Deng P, Zhang Y, Wang J, Liu Y, Yu Y, Wang L. Heat shock fusion protein induces both specific and nonspecific anti-tumor immunity. *Eur J Immunol* 2006a; 36: 1324-1336.
- Li Y, Subjeck J, Yang G, Repasky E, Wang XY. Generation of anti-tumor immunity using mammalian heat shock protein 70 DNA vaccines for cancer immunotherapy. *Vaccine* 2006b; 24: 5360-5370.
- Li Z, Qiao Y, Liu B, Laska EJ, Chakravarthi P, Kulko JM, Bona RD, Fang M, Hegde U, Moyo V, Tannenbaum SH, Ménoret A, Gaffney J, Glynn L, Runowicz CD, Srivastava PK. Combination of Imatinib Mesylate with Autologous Leukocyte-Derived Heat Shock Protein and Chronic Myelogenous Leukemia. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 4460-4468.
- Lima KM, Santos SA, Lima VM, Coelho Castelo AA, Rodrigues JM, Jr Silva CL. Single dose of a vaccine based on DNA encoding mycobacterial hsp65 protein plus TDM-loaded PLGA microspheres protects mice against a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene Ther* 2003; 10: 678-685.
- Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988; 22: 631-677.
- Lipponen PK, Eskelinen MJ, Jauhiainen K, Harju E, Terho R. Tumour infiltrating lymphocytes as an independent prognostic factor in transitional cell bladder cancer. *Eur J Cancer* 1992; 29: 69-75.

Liu DW, Tsao YP, Kung JT, Ding YA, Sytwu HK, Xiao X, Chen SL. Recombinant adeno-associated virus expressing human papillomavirus type 16 E7 peptide DNA fused with heat shock protein DNA as a potential vaccine for cervical cancer. *J Virol* 2000; 74: 2888-2894.

Liu MA. DNA vaccines: a review. *J Intern Med* 2003; 253: 402-410.

Lowe DB, Shearer MH, Jumper CA, Kennedy RC. Towards progress on DNA vaccines for cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64: 2391-2403.

Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, Ragno S, Tascon RE. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine* 1997; 15: 834-838.

Lowrie DB, Silva CL. Enhancement of immunocompetence in tuberculosis by DNA vaccination. *Vaccine* 2000; 18: 1712-1716.

Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, Lima VM, Faccioli LH, Stavropoulos E, Colston MJ, Hewinson RG, Moelling K, Silva CL. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 1999; 400: 269-271.

Lowrie DB, Tascon RE, Colston MJ, Silva CL. Towards a DNA vaccine against tuberculosis. *Vaccine* 1994; 12: 1537-1540.

Lu Y, Zhang Z, Liu Q, Liu B, Song X, Wang M, Zhao X, Zhao Q. Immunological protection against HPV16 E7-expressing human esophageal cancer cell challenge by a novel HPV16-E6/E7 fusion protein based-vaccine in a Hu-PBL-SCID mouse model. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 150-156.

Lukacs KV, Lowrie DB, Stokes RW, Colston MJ. Tumor cells transfected with a bacterial heat-shock gene lose tumorigenicity and induce protection against tumors. *J Exp Med* 1993; 178: 343-348.

Maki RG, Livingston PO, Lewis JJ, Janetzki S, Klimstra D, Desantis D, Srivastava PK, Brennan MF. A phase I pilot study of autologous heat shock protein vaccine HSPPC-96 in patients with resected pancreatic adenocarcinoma. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1964-1972.

Maletzki C, Linnebacher M, Kreikemeyer B, Emmrich J. Pancreatic cancer regression by intratumoural injection of live *Streptococcus pyogenes* in a syngeneic mouse model. *Gut* 2008; 57: 483-491

Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK, Waldichuk C, Rosenberg J, Grillo Lopez A, Levy R. Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood* 1994; 84: 2457-2466.

Michaluart P, Abdallah KA, Lima FD, Smith R, Moysés RA, Coelho V, Victora GD, Socorro Silva A, Volsi EC, Zárate Bladés CR, Ferraz AR, Barreto AK, Chammas MC, Gomes R, Gebrim E, Arakawa Sugueno L, Fernandes KP, Lotufo PA, Cardoso MR, Kalil J, Silva CL. Phase I trial of DNA-hsp65 immunotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Gene Ther* 2008 [Epub ahead of print]

Miller AM, Ozenci V, Kiessling R, Pisa P. (Immune monitoring in a phase 1 trial of a PSA DNA vaccine in patients with hormone-refractory prostate cancer. *J. Immunother* 2005; 28: 389-395.

Miller K, Abeles G, Oratz R, Zeleniuch-Jacquotte A, Cui J, Roses DF, Harris MN, Bystryn JC. Improved survival of patients with melanoma with an antibody response to immunization to a polyvalent melanoma vaccine.

Mincheff M, Tchakarov S, Zoubak S, Loukinov D, Botev C, Altankova I, Georgiev G, Petrov S, Meryman HT. Naked DNA and adenoviral immunizations for immunotherapy of prostate cancer: a phase I/II clinical trial. *Eur. Urol* 2000; 38: 208-217.

Mitchell MS. Perspective on allogeneic melanoma lysates in active specific immunotherapy. *Semin Oncol* 1998;25: 623-635.

Mocellin S, Mandruzzato S, Bronte V, Lise M, Nitti D. Part I: Vaccines for solid tumours. *Lancet Oncol* 2004; 5: 681-689.

Moroi Y, Mayhew M, Trcka J, Hoe MH, Takechi Y, Hartl FU, Rothman JE, Houghton AN. Induction of cellular immunity by immunization with novel hybrid peptides complexed to heat shock protein 70. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3485-3490.

Muller AJ, Peggy A, Scherle PA. Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 613-625.

Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, Paulos CM, Palmer DC, Touloukian CE, Ptak K, Gattinoni L, Wrzesinski C, Hinrichs CS, Kerstann KW, Feigenbaum L, Chan CC and Restifo NP. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* 2008; 112: 362-373

Nacapoulou L, Azaris P, Papacharalampous N, Davaris P. Prognostic significance of histologic host response in câncer of the large bowel. *Cancer* 1981; 47: 936-936.

Nair SK, Heiser A, Boczkowski D, Majumdar A, Naoe M, Lebkowski JS, Vieweg J, Gilboa E. Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nat Med* 2000; 6: 1011-1017.

Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, Ohtani H. CD8⁺ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 3491-3494.

Nakachi K, Hayashi T, Imai K, Kusunoki Y. Perspectives on cancer immuno-epidemiology. *Cancer Sci* 2004; 95: 921-929.

Nakamura E, Megumi Y, Kobayashi T, Kamoto T, Ishitoya S, Terachi T, Tachibana M, Matsushiro H, Habuchi T, Kakehi Y, Ogawa O. Genetic polymorphisms of the interleukin-4 receptor alpha gene are associated with an increasing risk and a poor prognosis of sporadic renal cell carcinoma in a Japanese population. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2620-2625.

Nestle FO, Banchereau J, Hart D. Dendritic cells: On the move from bench to bedside. *Nat Med* 2001; 7: 761-765.

Nouri Shirazi M, Banchereau J, Bell D, Burkeholder S, Kraus ET, Davoust J, Palucka KA. Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses. *J Immunol* 2000;165: 3797-3803.

Oki Y, McLaughlin P, Fayad LE, Pro B, Mansfield PF, Clayman GL, Medeiros LJ, Kwak LW, Srivastava PK, Younes A. Experience with heat shock protein-peptide complex 96 vaccine therapy in patients with indolent non-Hodgkin lymphoma.

Olazabal IM, Martín-Cofreces NB, Mittelbrunn M, Martínez Del Hoyo G, Alarcón B, Sánchez-Madrid F. Activation Outcomes Induced in Naive CD8 T-Cells by Macrophages Primed via "Phagocytic" and Nonphagocytic Pathways. *Mol Biol Cell* 2008;19:701-10.

Pagès F, Galon J, Karaschuk G, Dudziak D, Camus M, Lazar V, Camilleri Broët S, Lagorce Pagès C, Lebel Binay S, Laux G, Fridman WH, Henglein B. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces interleukin-18 receptor expression in B cells. *Blood* 2005; 105: 1632-1639.

Palma L, Di Lorenzo N, Guidetti B. Lymphocytic infiltrates in primary glioblastomas and recidiving gliomas. Incidence, fate, and relevance to prognosis in 228 operated cases. *J Neurosurg* 1978; 49: 854-861.

Panjwani NN, Popova L, Srivastava P K. Heat shock proteins gp96 and hsp70 activate release of nitric oxide by antigen presenting cells. *J Immunol* 2002; 168: 2997-3003.

Pardoll DM. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 227-238.

Pavlenko M, Roos AK, Lundqvist A, Palmborg A, Miller AM, Ozenci V, Bergman B, Egevad L, Hellstrom M, Kiessling R, Masucci G, Wersall P. et al. A phase I trial of DNA vaccination with a plasmid expressing prostate-specific antigen in patients with hormone-refractory prostate cancer. *Br. J. Cancer* 2004; 91: 688- 694.

Peng S, Tomson TT, Trimble C, He L, Hung CF, Wu TC. A combination of DNA vaccines targeting human papillomavirus type 16 E6 and E7 generates potent antitumor effects. *Gene Ther* 2006; 13: 257-265.

Peng S, Trimble C, Ji H, He L, Tsai YC, Macaes B, Hung CF, Wu TC. Characterization of HPV-16 E6 DNA vaccines employing intracellular targeting and intercellular spreading strategies. *J Biomed Sci* 2005;12: 689-700.

Pilla L, Patuzzo R, Rivoltini L, Maio M, Pennacchioli E, Lamaj E, Maurichi A, Massarut S, Marchianò A, Santantonio C, Tosi D, Arienti F, Cova A, Sovena G, Piris A, Nonaka D, Bersani I, Di Florio A, Luigi M, Srivastava PK, Hoos A, Santinami M, Parmiani G. A phase II trial of vaccination with autologous, tumor-derived heat-shock protein peptide complexes Gp96, in combination with GM-CSF and interferon-alpha in metastatic melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 958-968.

Reiner SL. Development in motion: helperTcells at work. *Cell*. 2007; 129: 33-36.

Ren W, Strube R, Zhang X, Chen SY, Huang XF. Potent tumor-specific immunity induced by an *in vivo* heat shock protein-suicide gene-based tumor vaccine. *Cancer Res* 2004; 64: 6645-6651.

Ren Z, Ye X, Fang C, Lu Q, Zhao Y, Liu F, Liang M, Hu F, Chen HZ. Intratumor injection of oncolytic adenovirus expressing HSP70 prolonged survival in melanoma B16 bearing mice by enhanced immune response. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 191-195.

Rice J, Ottensmeier CH, Stevenson FK. DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 108-120.

- Rilke F, Colnaghi MI, Cascinelli N, Andreola S, Baldini MT, Bufalino R, Della Porta G, Ménard S, Pierotti MA, Testori A. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int J Cancer* 1991; 49: 44-49.
- Roberts ZJ, Goutagny N, Perera PY, Kato H, Kumar H, Kawai T, Akira S, Savan R, van Echo D, Fitzgerald KA, Young HA, Ching LM, Vogel SN. The chemotherapeutic agent DMXAA potently and specifically activates the TBK1-IRF-3 signaling axis. *J Exp Med* 2007; 204: 1559-1569.
- Rosada RS, de la Torre LG, Frantz FG, Trombone AP, Zárate Bladés CR, Fonseca DM, Souza PR, Brandão IT, Masson AP, Soares EG, Ramos SG, Faccioli LH, Silva CL, Santana MH, Coelho-Castelo AA. Protection against tuberculosis by a single intranasal administration of DNA-hsp65 vaccine complexed with cationic liposomes. *BMC Immunol* 2008; 22: 9-38.
- Rosenberg S A, Yang JC, Sherry RM, Hwu P, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Restifo NP, Haworth LR, Seipp CA, Freezer LJ, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE. Inability to immunize patients with metastatic melanoma using plasmid DNA encoding the gp100 melanoma-melanocyte antigen. *Hum. Gene Ther* 2003; 14: 709-714.
- Rosenberg SA. Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. *Immunol. Today* 1997; 18: 175-182
- Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 2001; 411: 380-384.
- Rutherford SL and Lindquist, S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 1998; 396: 336-42,
- Saito H, Tsujitani S, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Relationship between the expression of vascular endothelial growth and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue. *Br J Cancer* 1998; 78: 1573-1577.
- Sakaguchi, S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 531-562.
- Schreiber H, Wu TH, Nachman J, Kast WM. Immunodominance and tumor scape. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 25-31.
- Segura JA, Barbero LG, Márquez J. Ehrlich ascites tumor unbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to *Staphylococcus aureus* enterotoxin B stimulation. *Immun Lett* 2000; 74: 111-115.
- Seung LP, Rowley DA, Schreiber H. Cytokines in cancer. In: Theze J, The cytokine Network and Immune Functions. *New York: Oxford University Press* 1999. p. 335-345.
- Shevach EM. Fatal attraction: tumors beckon regulatory T cells. *Nat Med* 2004; 9: 900-901.
- Shilling DA, Smith MJ, Tyther R, Sheehan D, England K, Kavanagh EG, Redmond HP, Shanahan F, O'Mahony L. Salmonella typhimurium stimulation combined with tumour-derived heat shock proteins induces potent dendritic cell anti-tumour responses in a murine model. *Clin Exp Immunol* 2007; 149: 109-116.
- Silva CL, Bonato VL, Lima KM, Coelho Castelo AA, Faccioli LH, Sartori A, De Souza AO, Leao SC Cytotoxic T cells and mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 197: 11-18.

Silva CL, Bonato VL, Lima KM, CoelhoCastelo AA, Faccioli LH, Sartori A, De Souza, AO, Leao SC. Cytotoxic T cells and mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 197: 11-18.

Silva CL, Lukacs K, Lowrie DB. Major histocompatibility complex non-restricted presentation to CD4⁺ T lymphocytes of Mycobacterium leprae heat-shock protein 65 antigen by macrophages transfected with the mycobacterial gene. *Immunology* 1993; 78: 35-42,

Silva CL, Palacios A, Colston MJ, Lowrie DB. Mycobacterium leprae 65hsp antigen expressed from a retroviral vector in a macrophage cell line is presented to T cells in association with MHC class II in addition to MHC class I. *Microb Pathog* 1992; 12: 27-38.

Silva CL, Silva MF, Pietro RC, Lowrie DB. Characterization of T cells that confer a high degree of protective immunity against tuberculosis in mice after vaccination with tumor cells expressing mycobacterial hsp65. *Infect Immun* 1996; 64: 2400-2407.

Silva CL, Silva MF, Pietro RC, Lowrie DB. Protection against tuberculosis by passive transfer with T-cell clones recognizing mycobacterial heat-shock protein 65. *Immunology* 1994; 83: 341-346.

Silva CL, Bonato VL, Coelho-Castelo AA, De Souza AO, Santos SA, Lima KM, Faccioli LH, Rodrigues JM. Immunotherapy with plasmid DNA encoding mycobacterial hsp65 in association with chemotherapy is a more rapid and efficient form of treatment for tuberculosis in mice. *Gene Ther* 2005; 12: 281-287.

Smith CL, Dunbar PR, Mirza F, Palmowski MJ, Shepherd D, Gilbert SC, Coulie P, Schneider J, Hoffman E, Hawkins R, Harris AL, Cerundolo V. Recombinant modified vaccinia Ankara primes functionally activated CTL specific for amelanoma tumor antigen epitope in melanoma patients with a high risk of disease recurrence. *Int J Cancer* 2005; 113: 259-266.

Spier RE International meeting on the nucleic acid vaccines for the prevention of infectious disease and regulating nucleic acid (DNA) vaccines. Natcher Conference Center NIH, Bethesda, MD 5-8 February, 1996. *Vaccine* 1996; 14: 1285-1288.

Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2002a; 2: 185-194.

Srivastava P. Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: Chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol* 2002b; 20: 395-425.

Srivastava PK and Das MR. The serologically unique cell surface antigen of Zajdela ascitic hepatoma is also its tumor-associated transplantation antigen. *Int J Cancer* 1984; 33: 417-422.

Srivastava PK, Menoret A, Basu S, Binder RJ, McQuade KL. Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity* 1998; 8: 657-665.

Srivastava PK, Udono H, Blachere NE, Li Z. Heat shock proteins transfer peptides during antigen processing and CTL priming. *Immunogenetics* 1994; 39: 93-98.

Srivastava PK. Hypothesis: controlled necrosis as a tool for immunotherapy of human cancer. *Cancer Immunol* 2003; 3: 4.

Steinman RM, and Mellman I. Immunotherapy: bewitched, bothered, and bewildered no more. *Science* 2004; 305: 197-200.

Stevenson FK, Rice J and Zhu D. Tumor vaccines. *Adv Immunol* 2004; 82: 49-103.

Tagawa ST, Lee P, Snively J, Boswell W, Ounpraseuth S, Lee S, Hickingbottom B, Smith J, Johnson D, Weber JS. Phase I study of intranodal delivery of a plasmid DNA vaccine for patients with Stage IV melanoma. *Cancer* 2003; 98: 144-154.

Takeda K, Hayakawa Y, Smyth M, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, Iwakura Y, Yagita H, Okumura K. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nature Med* 2001; 7: 94-100.

Tamura Y, Peng P, Liu K, Daou M, Srivastava PK. Immunotherapy of tumors with autologous tumor-derived heat shock protein preparations. *Scienc* 1997; 278: 117-120.

Tan BH, Wang L, Gan YH. Immunomodulating activity of mycobacterial heat shock protein 65 in tumor cells. *Immunobiology* 2001; 203: 786-799.

Tanaka K, Ito A, Kobayashi T, Kawamura T, Shimada S, Matsumoto K, Saida T, Honda H. Intratumoral injection of immature dendritic cells enhances antitumor effect of hyperthermia using magnetic nanoparticles. *Int J Cancer* 2005; 116: 624-633.

Tanaka M, Kaneda Y, Fujii S, Yamano T, Hashimoto K, Huang SKS, Hoon DSB. Induction of a systemic immune response by a polyvalent melanoma-associated antigen DNA vaccine for prevention and treatment of malignant melanoma. *Molec Ther* 2002; 5: 291-299.

Taneichi M, Ishida H, Kajino K, Ogasawara K, Tanaka Y, Kasai M, Mori M, Nishida M, Yamamura H, Mizuguchi J, Uchida T. Antigen chemically coupled to the surface of liposomes are cross-presented to CD8+ T cells and induce potent antitumor immunity. *J Immunol.* 2006; 177: 2324-2330.

Tarrant JP, Walsh MJ, Blanchard MC, Lee TD, Hoskin DW, Giacomantonio CA. Reduced tumorigenicity of B16-F10 mouse melanoma cells transfected with mycobacterial antigen 85A. *Int J Oncol.* 2004;25:1693-1699.

Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, Claret E, Sastre-Garau X, Couturier J, Mosseri V, Vives V, Banchereau J, Fridman WH, Wijdenes J, Lebecque S, Sautès-Fridman C. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res* 1999; 59: 3698-3704.

Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, Claret E, Sastre-Garau X, Couturier J, Mosseri V, Vives V, Banchereau J, Fridman WH, Wijdenes J, Lebecque S, Sautès-Fridman C. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res* 1999; 59: 3698-3704.

Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, Claret E, Sastre-Garau X, Couturier J, Mosseri V, Vives V, Banchereau J, Fridman WH, Wijdenes J, Lebecque S, Sautès-Fridman C. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res* 1999; 59: 3698-3704.

Timmerman JM, Singh G, Hermanson G, Hobart P, Czerwinski DK, Taidi B, Rajapaksa R, Caspar CB, Van Beckhoven A, Levy R. Immunogenicity of a plasmid DNA vaccine

encoding chimeric idiotype in patients with B-cell lymphoma. *Cancer Res* 2002; 62: 5845-5852.

Todorova K, Ignatova I, Tchakarov S, Altankova I, Zoubak S, Kyurkchiev S, Mincheff M. Humoral immune response in prostate cancer patients after immunization with gene-based vaccines that encode for a protein that is proteasomally degraded. *Cancer Immun* 2005; 5: 1.

Todryk SM, Eaton J, Birchall L, Greenhalgh R, Soars D, Dalglish AG, Melcher AA, Pandha HS. Heated tumour cells of autologous and allogeneic origin elicit anti-tumour immunity. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 323-330.

Todryk SM, Melcher AA, Dalglish AG, Vile RG. Heat shock proteins refine the danger theory. *Immunology*. 2000; 99: 334-337.

Tomšová M, Melichar B, Sedláková I, Šteiner I. Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. *Gynec Oncol* 2008; 108: 415-420.

Trionzi PL, Aldrich W, Allen KO, Carlisle RR, LoBuglio AF, Conry RM. Phase I study of a plasmid DNA vaccine encoding MART-1 in patients with resected melanoma at risk for relapse. *J. Immunother* 2005; 28: 382-388.

Ueda G, Tamura Y, Hirai I, Kamiguchi K, Ichimiya S, Torigoe T, Hiratsuka H, Sunakawa H, Sato N. Tumor-derived heat shock protein 70-pulsed dendritic cells elicit tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and tumor immunity. *Cancer Sci* 2004; 95: 248-253.

Valone FH, Kaufman PA, Guyre PM, Lewis LD, Memoli V, Ernstoff MS, Wells W, Barth R, Deo Y, Fisher J, et al. Clinical trials of bispecific antibody MDX-210 in women with advanced breast or ovarian cancer that overexpresses HER-2/neu. *J. Hematother* 1995; 4, 471-475.

Van Der Bruggen P, Zhang Y, Chaux P, Stroobant V, Panichelli C, Schultz ES, Chapiro J, Van Den Eynde BJ, Brasseur F, Boon T. Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunol Rev* 2002; 188, 51-64.

Wan T, Zhou X, Chen G, An H, Chen T, Zhang W, Liu S, Jiang Y, Yang F, Wu Y, Cao X. Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant. *Blood* 2004; 103: 1747-1754.

Wang XY, Arnouk H, Chen X, Kazim L, Repasky EA, Subjeck JR. Extracellular targeting of endoplasmic reticulum chaperone glucose-regulated protein 170 enhances tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma. *J Immunol* 2006b; 177: 1543-1551.

Wang XY, Chen X, Manjili MH, Repasky E, Henderson R, Subjeck JR. Targeted immunotherapy using reconstituted chaperone complexes of heat shock protein 110 and melanoma-associated antigen gp100. *Cancer Res* 2003; 63: 2553-2560.

Wang XY, Kazim L, Repasky EA, Subjeck JR. Characterization of heat shock protein 110 and glucose-regulated protein 170 as cancer vaccines and the effect of fever-range hyperthermia on vaccine activity. *J Immunol* 2001; 166: 490-497.

Wang XY, Li Y, Manjili MH, Repasky EA, Pardoll DM, Subjeck JR. Hsp110 over-expression increases the immunogenicity of the murine CT26 colon tumor. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 311-319.

Wells AD, Rai SK, Salvato MS, Band H, Malkovsky M. Restoration of MHC class I surface expression and endogenous antigen presentation by a molecular chaperone. *Scand J Immunol* 1997; 45: 605-612.

Werneck MB, Lugo-Villarino G, Hwang ES, Cantor H, Glimcher LH. T-bet plays a key role in NK-mediated control of melanoma metastatic disease. *J Immunol*. 2008;180: 8004-8010.

Whiteside TL, Gambotto A, Albers A, Stanson J, Cohen EP. Human tumor-derived genomic DNA transduced into a recipient cell induces tumor-specific immune responses *ex vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 9415-9420.

WHO The World Health Organization's fight against cancer : strategies that prevent, cure and care. Geneva:2006.

Willimsky G and Blankenstein T. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* 2005; 437: 141-146.

Winterhalter M and Lasic DD. Liposome stability and formation: experimental parameters and theories on the size distribution. *Chem Phys Lipids* 1993; 64: 35-43.

Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990; 247: 1465-1468.

Wood C, Srivastava P, Bukowski R, Lacombe L, Gorelov AI, Gorelov S, Mulders P, Zielinski H, Hoos A, Teofilovici F, Isakov L, Flanigan R, Figlin R, Gupta R, Escudier B; C-100-12 RCC Study Group. An adjuvant autologous therapeutic vaccine (HSPPC-96; vitespen) versus observation alone for patients at high risk of recurrence after nephrectomy for renal cell carcinoma: a multicentre, open-label, randomised phase III trial. *Lancet* 2008; 372: 145-154.

Wu Y, Wan T, Zhou X, Wang B, Yang F, Li N, Chen G, Dai S, Liu S, Zhang M, Cao X. Hsp70-like protein 1 fusion protein enhances induction of carcinoembryonic antigen-specific CD8⁺ CTL response by dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 2005; 65: 4947-4954.

Yamazaki K, Nguyen T, Podack ER. Cutting edge: tumor secreted heat shock-fusion protein elicits CD8 cells for rejection. *J Immunol* 1999; 163: 5178-5182.

Yankai Z, Rong Y, Yi H, Wentao L, Rongyue C, Ming Y, Taiming L, Jingjing L, Jie W. Ten tandem repeats of beta-hCG 109-118 enhance immunogenicity and anti-tumor effects of beta-hCG C-terminal peptide carried by mycobacterial heat-shock protein HSP65. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345: 1365-1371.

Ye J, Chen GS, Song HP, Li ZS, Huang YY, Qu P, Sun YJ, Zhang XM, Sui YF. Heat shock protein 70/MAGE-1 tumor vaccine can enhance the potency of MAGE-1-specific cellular immune responses *in vivo*. *Cancer Immunol Immunother*. 2004; 53: 825-834.

Yokomine K, Nakatsura T, Minohara M, Kira J, Kubo T, Sasaki Y, Nishimura Y. Immunization with heat shock protein 105-pulsed dendritic cells leads to tumor rejection in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343: 269-278.

Zaks TZ, Chappell DB, Rosenberg SA, Restifo NP. Fas-mediated suicide of tumor-reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. *J Immunol* 1999; 162: 3273-3279.

- Zeng Y, Feng H, Graner MW, Katsanis E. Tumor-derived, chaperone-rich cell lysate activates dendritic cells and elicits potent antitumor immunity. *Blood* 2003; 101: 4485-4491.
- Zhang X, Yu C, Zhao J, Fu L, Yi S, Liu S, Yu T, Chen W. Vaccination with a DNA vaccine based on human PSCA and HSP70 adjuvant enhances the antigen-specific CD8⁺ T-cell response and inhibits the PSCA⁺ tumors growth in mice. *J Gene Med* 2007; 9: 715–726.
- Zheng H, Dai J, Stoilova D, Li Z. Surface targeting of an intracellular heat shock protein gp96 on tumor cells induces dendritic cell maturation and anti-tumor immunity. *J Immunol* 2001; 167: 6731-6735.
- Zheng H, Dai J, Stoilova D, Li Z. Surface targeting of an intracellular heat shock protein gp96 on tumor cells induces dendritic cell maturation and anti-tumor immunity. *J Immunol* 2001; 167: 6731–6735.
- Zheng P, Sarma S, Guo Y, Liu Y. Two mechanisms for tumor evasion of preexisting cytotoxic T-cell responses: lessons from recurrent tumors. *Cancer Res* 1999; 59: 3461-3467.
- Zhou G, Lu Z, McCadden JD, Levitsky HI, Marson AL. Reciprocal changes in tumor antigenicity and antigen-specific T cell function during tumor progression. *J Exp Med* 2004; 200: 1581-1592.
- Zhu G, Xiao H, Mohan VP, Tanaka K, Tyagi S, Tsen F, Salgame P, Chan J. Gene expression in the tuberculous granuloma: analysis by laser capture microdissection and real-time PCR. *Cellular Microbiol* 2003; 5: 445–453.
- Zhu G, Xiao H, Mohan VP, Tanaka K, Tyagi S, Tsen F, Salgame P, Chan J. Gene expression in the tuberculous granuloma: analysis by laser capture microdissection and real-time PCR. *Cellular Microbiol* 2003; 5: 445–453
- Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 2008a; 8: 59-73
- Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, André F, Tesniere A, Kroemer G. The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J Clin Invest* 2008b;118: 1991-2001.
- Zitvogel L, Casares N, Péquignot MO, Chaput N, Albert ML, Kroemer G. Immune response against dying tumor cells. *Adv Immunol* 2004; 84: 131-179.
- Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 715-727

Anexos

10. Anexos

10.1. Equação para comparação da expressão de genes de interesse entre amostras

As equações apresentadas foram extraídas na íntegra do trabalho de Zhu et al. 2003 para normalizar amostras com eficiências de “primers” diferentes.

Essa derivação é baseada na equação para amplificação exponencial de PCR:

$$X_T = X_0 (1+E)^{CT}$$

Na qual:

X_T - número limiar (threshold) de moléculas alvo

X_0 - número inicial de moléculas alvo (antes da amplificação)

E - eficiência da amplificação (PCR) do gene alvo

CT - sigla do inglês “cycle threshold”, número do ciclo no qual a fluorescência cruza o limiar determinado (para o gene alvo).

A equação da curva padrão, a qual representa graficamente o logaritmo da quantidade de gene alvo antes da amplificação (X_0) contra o CT , é a seguinte:

$$Y = RX + P \text{ (equação 1)}$$

Na qual:

$$X_0 = \log (X_0)$$

$$Y = CT$$

$$P = -R [\lg (X_T)]$$

$$R = -1/[\lg (1 + E)] \text{ (R é a inclinação da curva)}$$

Para o gene constitutivamente expresso β - actina (denominada β) e gene alvo (denominado x),

$$R\beta = -1/[\log (1 + E\beta)]$$

$$Rx = -1/[\log (1 + Ex)]$$

Dessa forma, a relação das eficiências de PCR entre os 2 genes é:

$$(1 + Ex) = (1 + E\beta)^{R\beta/Rx}$$

A razão do nível de expressão do gene X nas amostras A (controle – Salina ou B16-mock) e B (teste - Vetor ou DNA-Hsp65; B16-Vetor ou B16-DNAHsp65) (K_x) pode ser expressa como:

$$K_X = (1+E_X)^{CT_{XA}-CT_{XB}}$$

A razão do nível de expressão da β - actina na amostras A e B (K β) pode ser expressa como:

$$K_\beta = (1+E_\beta)^{CT_{\beta A}-CT_{\beta B}}$$

Utilizando a β - actina como controle interno, o nível de RNAm do gene X (ρ_x) na amostra A e B após calibração com K β é:

$$\rho_x = (1+E_\beta)^{[\Delta Ct_\beta^{AB} - (R_\beta/R_x)(\Delta Ct_x^{BA})]} \text{ (equação 2)}$$

10.2. Indução da proliferação das células totais de baço em co-cultura

Devido à obtenção de baixa quantidade de células T CD8, no delineamento 4.5.1.2, a co-cultura foi pulsada com 5000UI de IL-2 recombinante humana (rhIL-2) para cada 5×10^5 células de baço.

Para determinar a concentração de rhIL-2 (Proleukin – Interleucina- 2 recombinante IL-2r Aldesleucina) a ser utilizada na co-cultura prévia ao teste de citotoxicidade, foi avaliada a capacidade linfoproliferativa em resposta a concentrações crescentes de rhIL-2. Para isso, 3 camundongos C57BL/6 foram mortos para remoção estéril do baço. Os baços foram colocados em meio RPMI-1640 e em seguida divididos. As suspensões celulares foram lavadas e o sedimento celular coletado por meio de centrifugação a 1500g durante 10 minutos. O número de células nas suspensões dos baços foi ajustado para 5×10^6 células/ml em meio RPMI-1640 (Gibco-Invitrogen) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen), 2mM de L-glutamina (Sigma), 1mM piruvato de sódio (Sigma) e 20mg/ml de gentamicina (Gibco) e as células foram distribuídas em triplicata em placas de 96 poços, fundo chato (Corning), adicionando-se 100µl/poço. Em seguida, à cultura de células foi adicionada a rhIL-2 em diferentes concentrações (10, 25, 50, 250, 1000, 2500 e 5000UI) e como controle de proliferação basal e controle positivo foram utilizados, respectivamente, células apenas em meio e Concanavalina A (4µg para cada 5×10^5 células totais de baço). As células foram mantidas em cultura à 37°C com tensão de 5% de CO₂. Após 54 horas, 3A timidina triciada (³H-timidina) na concentração de 0,25µCi/poço foi adicionada à cultura. As células permaneceram em cultura por mais 18 horas. Após esse período, as células foram recuperadas por meio de um coletor de células (Inotech) em papel de fibra de vidro e colocados em frascos contendo líquido de cintilação (OptiPhase ‘HiSafe’ 3-Perkin). A incorporação da timidina – ³H foi determinada em contador de cintilação β.

Podemos observar a partir da **Figura - Anexo 1** que a concentração de 5000UI foi única capaz de estimular a proliferação das células de baço de camundongos e que diferiu estatisticamente do controle apenas com meio de cultura. Além disso, como esperado, as células apresentaram intensa proliferação quando na presença de Concanavalina A. Dessa forma, a concentração de 5000UI de rhIL-2 para cada 5×10^5 células foi utilizada na co-cultura realizada no ensaio com lipossomas DRV.

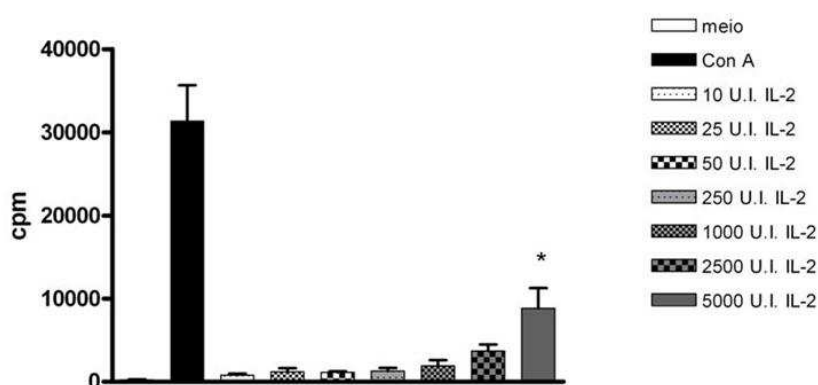


Figura - Anexo 1. Resposta linfoproliferativa de células de baço de camundongo em resposta ao estímulo com rhIL-2. 5×10^5 células foram distribuídas em triplicata em placas de 96 poços. Em seguida, à cultura de células foi adicionada a rhIL-2 em diferentes concentrações e os respectivos controles positivo (Concanavalina A) e basal (meio de cultura). Após 54 horas de cultura, foi adicionada 3A timidina triciada (^3H -timidina). As células permaneceram em cultura por mais 18 horas e foram recuperadas por meio de coletor de células. A incorporação da timidina – ^3H foi determinada em contador de cintilação β . * $p < 0,05$.
cpm – contagem por minuto; UI – unidades internacionais

10.3. Avaliação da especificidade do anticorpo anti-Vac1

Células tumorais humanas da linhagem HEK293 foram submetidas a situações de aumento de temperatura para avaliação da possível reação cruzada entre o anticorpo anti-Vac1 e Hsp60. Além disso, o anticorpo comercial anti-Hsp60 (Monoclonal antibody to Hsp60 – Clone Mab 11-13 – Imgenex) foi utilizado como controle positivo.

As células foram cultivadas em placas de 24 poços (Nunc) à temperatura de 37°C por um período de 18 horas, em seguida parte delas foram incubadas a 42°C e parte permaneceu a 37°C por 5 horas. Após esse período de cultura, foi retirado o meio de cultura das células, elas foram lavadas 2 vezes com PBS 1x (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 80mM e KH₂PO₄ 1,47mM, pH 7,2), foi adicionado 50µl de tampão de lise RIPA (Tris 50mM, pH 8,0, NaCl 150mM, Duodecil Sulfato de Sódio-SDS-0,1%, IgePal 1%, Deoxiglicolato de sódio 0,5%, coquetel de inibidores-Complete, EDTA free-Roche), as células foram homogeneizadas, coletadas e incubadas no gelo por 10 minutos, em seguida foram centrifugadas por 10 minutos a 10000g, 4°C e separado pellet e sobrenadante.

O pellet foi acrescido de 20µl de água e homogeneizado, 20µl do meio de cultura retirado das células e 20µl do sobrenadante foram separados e a todas essas amostras foi adicionado 5µl de tampão da amostra 5x (Tris-HCl 200mM pH 6,8, SDS 360mM, glicerol 41,6%, azul de bromofenol 0,05% 2-mercaptoetanol 12,5%). As amostras foram, então, fervidas por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (Tampão de corrida-Tris-base 125mM, glicina 960mM, SDS 170mM, pH 8,3) por 20 minutos a 50V e em seguida 1 hora e 30 minutos a 100V.

Após a eletroforese as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitocelulose (Life Technologies) por 1 hora e 30 minutos a 100V (Tampão de transferência-Tris-base 22,7mM, glicina 61mM, metanol 18,3%, pH 8,3), a membrana foi incubada com tampão de bloqueio (PBS 1X, 2%BSA-Albumina Bovina [INLAB], 0,05% Tween 20) por 2 horas a temperatura ambiente, lavada (PBS 1x, 0,05% Tween 20) e incubada com o anticorpo anti-Vac1 policlonal diluído 1:1000 ou com o anticorpo anti-Hsp60 diluído 1:10000 a 4°C *overnight*. No dia seguinte a membrana foi novamente lavada e incubada com o anticorpo de cabra anti- IgG de camundongo

(Molecular Probes) diluído 1:5000 por 1 hora a temperatura ambiente e revelada com DAB (Vector Peroxydase Substrate Kit).

Na **Figura – Anexo 2** observamos que o anticorpo policlonal anti-Vac1 produzido e purificado por nosso grupo não apresentou reatividade cruzada com Hsp60 induzida por estresse térmico. O anticorpo comercial anti-Hsp60, por sua vez, reconheceu a proteína recombinante Hsp65. Dessa forma, o anticorpo anti-Vac1 demonstrou especificidade para Hsp65 e foi utilizado para avaliação da presença da proteína recombinante no ambiente tumoral.

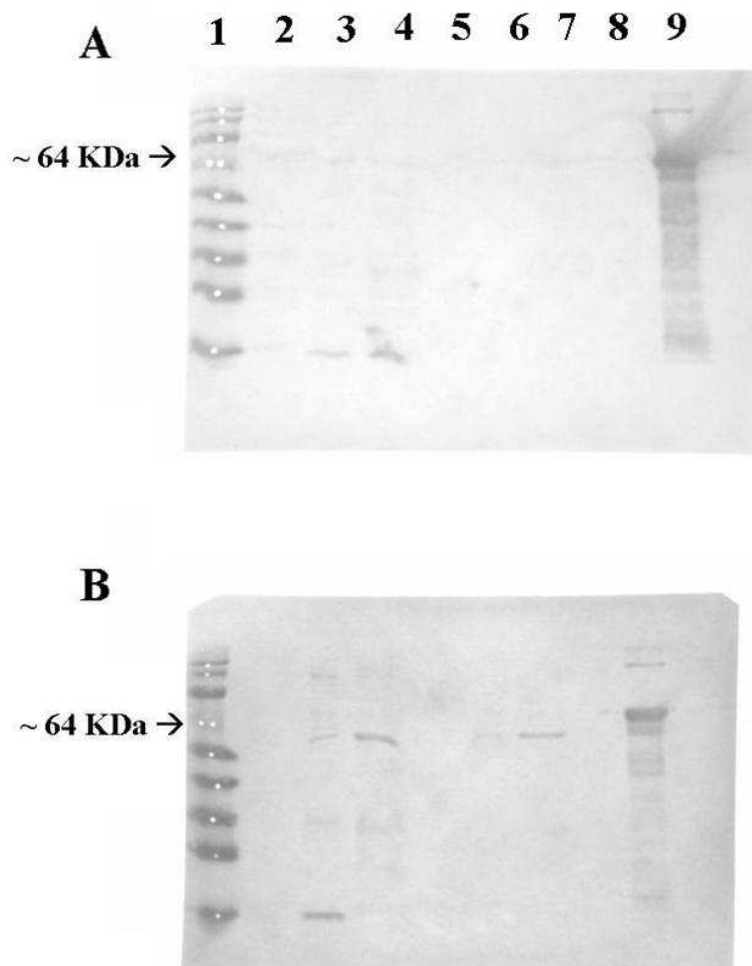


Figura - Anexo 2. *Western Blot* das células HEK293 incubadas com (A) anticorpo policlonal anti-Vac1 ou (B) anticorpo monoclonal anti-Hsp60. Nas Figuras A e B, canaleta 1: Ladder; canaletas 2 - 4: células incubadas a 37°C e canaletas 5 -7: células incubadas a 42°C; canaletas 2 e 5: meio de cultura; canaletas 3 e 6: pellet (fração celular insolúvel); canaletas 4 e 7: sobrenadante (fração celular solúvel); canaleta 8: vazia; canaleta 9: 2,5µg da proteína Hsp65 recombinante (64,15Kda) purificada em coluna HisTrap Chelating HP em sistema ÄKTA purifier (GE).

10.4. Certificados do comitê de ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
"CAMPUS" DE RIBEIRÃO PRETO
TELEFONE: PABX 602.3000 – FAX: (0XX16) 633.1586
14049-900 – RIBEIRÃO PRETO – ESTADO DE SÃO PAULO

Interessado(a): GIOVANNA RIBEIRO DOS SANTOS
Orientador(a): Prof. Dr. CÉLIO LOPES SILVA
Assunto: "Efeito terapêutico da vacina DNA-hsp65 em melanoma B16F10".

INFORMAÇÃO

O projeto intitulado "*Efeito terapêutico da vacina DNA-hsp65 em melanoma B16F10*" foi analisado pelo relator, que o *aprovou*.

Os membros da Comissão consideraram que é necessário explicitar se realmente será feita a punção e quais as condições para esse procedimento (se o animal estará anestesiado ou não).

Ribeirão Preto, 20 de julho de 2005.


Sandra Maria de Cara Galeani
Secretária da Comissão de Ética em
Experimentação Animal



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética em Experimentação Animal —



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 013/2005, sobre o projeto intitulado “*Efeito terapêutico da vacina DNA-hsp65 em melanoma B16F10*”, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Célio Lopes Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CETEA) em reunião de **05 de março de 2007**.

(We certify that the protocol nº 013/2005, about “*Therapeutic effect of DNA-Hsp65 against melanoma B16F10*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the COLLEGE OF MEDICINE OF RIBEIRÃO PRETO OF THE UNIVERSITY OF SÃO PAULO – ETHICAL COMMISSION OF ETHICS IN ANIMAL RESEARCH (CETEA) in **03/05/2007** meeting).

Ribeirão Preto, 07 de março de 2007.


Prof. Dr. JOÃO SANTANA DA SILVA
Deão da Comissão de Ética
em Experimentação Animal

Manuscrito

11. Manuscripto

Immunostimulating activity of DNA-Hsp65 against B16F10 melanoma

Abstract

The ability of heat shock proteins (Hsps) to participate in innate and adaptive immune responses makes them promising candidates for cancer and infectious diseases vaccines. The antitumoral activity of *hsp65* gene was shown by different groups and a clinical trial phase I in advanced head and neck cancer-bearing patients was recently published by us evidencing the DNA-Hsp65 vaccine feasibility and partial response in 4 out of 14 patients, 2 of which are still alive after 3 years trial ending. Therefore, the aim of this work was to increase the investigation on the role played by DNA-Hsp65 using an experimental melanoma tumor model. Two different approaches using different treatment were assessed, both intending to favor transfected Hsp65-tumor peptides complex formation: 1) DNA-Hsp65 intratumoral therapy and 2) transference of B16F10 electroporated *in vitro* with DNA-Hsp65. We observed that both strategies displayed antitumoral activity mainly evidenced by enhancement of survival rate and tumor growth delay (tumor weight). This antitumoral activity showed correlation with increased percentages of activated lymphocytes (CD4/CD44hi, CD8/CD44hi) infiltrating tumor mass, enhancement in CD86 co-stimulatory molecule expression in APCs and augmentation of CD8 T lymphocytes specific lysis. Besides, gene expression in tumors was modulated by intratumoral treatment with DNA-Hsp65 which has shown increase in Tbet and IL-17 gene expression levels. Our data indicate new perspectives for assays concerning Hsp65 and tumors interaction and also point out the importance in establishing immunological markers in neoplastic treatments for efficiency evaluation.

Altogether, these data provide knowledge basis for new analysis that may enhance the effectiveness of vaccine based in Hsps in tumor combat.

Introduction

Heat shock proteins (Hsps) are the most abundant and ubiquitous soluble intracellular proteins. They normally constitute up to 5% of the total intracellular proteins, however, under stress conditions their levels can raise to 15% or more (Srivastava 2002). It has been demonstrated that purified preparation of gp96, Hsp70, Hsp90 and other Hsps from normal or cancer cells are noncovalently associated with peptides, known as Hsp-peptide complexes (Menoret et al., 1999; Paz et al., 1999). When this complex interacts with an antigen presenting cell (APC), it can promote antigenic presentation of the peptide for both CD4 and CD8 T lymphocytes, and also, in a peptide-independent way. Hsps can stimulate APCs to secrete inflammatory cytokines, mature dendritic cells and induce immune response in a non-tolerogenic context (Srivastava and Amato, 2001; Souza *in course*). Therefore, concerning immune response, Hsps present some feasibility that allows them to induce innate and adaptive immunity. These properties also permit the utilization of these proteins in the development of prophylactic and therapeutic vaccines against cancers and infectious diseases (Castelli et al., 2004).

Our group has been developing a DNA vaccine that encodes the Hsp65 of *Mycobacterium leprae* (DNA-Hsp65). This vaccine had shown to be effective in inducing a preventive response against *M. tuberculosis* bacilli challenge (Lowrie et al., 1997; Bonato et al., 1998), as well as a therapeutic effect against established tuberculosis, even in immunosuppressed animals (Lowrie et al., 1999). This vaccine also induced upregulation of MHC class I and class II molecules on macrophages (Bonato et

al., 2004; Silva et al., 2005). The Hsp65 DNA vaccine showed also an antitumoral activity (Silva et al., 1993) since J774 tumor cells transfected with *hsp65* gene failed in induce tumoral growing in mice. Also, the transfection of J774 histiocytic sarcoma cells with *hsp65* gene resulted in reduced tumor development, and mice immunization with *hsp65*-transfected sarcoma cells was protective against unmodified parental tumor cells challenge (Lukacs et al., 1993). Later, different groups have found that mycobacterial *hsp65* gene transfer elicited a profound antitumoral effect (Silva *in preparation*; Hara et al., 2004; Michaluart et al., 2008). Recently, our group published a phase I clinical trial with advanced head and neck squamous cell carcinoma (~6 months survival) treated by intratumoral route with DNA-Hsp65. This study showed that DNA-Hsp65 immunotherapy is a feasible and safe approach in this type of cancer-bearing patients. Furthermore, partial response was observed in 4 out of 14 patients who concluded treatment, 2 of which are alive more than 3 years after trial completion (Michaluart et al., 2008). Taken together, these data indicate the remarkable potential of Hsp65 in cancer combat. Using a B16F10 tumor model, we evaluated the role of Hsp65 DNA vaccine delivery by two different approaches: 1) DNA-Hsp65 intratumoral therapy and 2) *in vitro* DNA-Hsp65 transfection of B16F10 cells followed by transference into mice. We observed that both strategies displayed antitumoral activity enhancing the survival rate. The treatment attenuated tumor growth and increased cytotoxicity activity mediated by CD8 T cells. Moreover, CD86 co-stimulatory molecule expression in APC was also increased. Taken together our data corroborate the antitumoral role of Hsp65 and indicate new perspectives for assays concerning the interaction between Hsp65 and tumors.

Materials and Methods

Animals and tumor cell lines

Specific pathogen-free (SPF) female C57BL/6 mice, 6–9 weeks old, were obtained from the local breeding facility of the University of São Paulo at Ribeirão Preto School of Medicine. Mice were housed at the laboratory facilities and provided with food and sterile water. All animal protocols were approved by the local ethics committee. B16F10 mouse melanoma cells were maintained in RPMI–1640 (Gibco – Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) and 2 mM L-glutamine (Life Technologies, Burlington, Ontario) at 5% CO₂ and 37°C in a humidified atmosphere. Adherent B16-F10 cells were subcultured by disrupting the cell monolayer with 0.02% EDTA (Life Technologies) in sterile endofree PBS.

Plasmids

The DNA-Hsp65 construction (Rosada et al., 2008) was derived from pVAX1 plasmid using the Endo-Free Plasmid Giga kit (Qiagen, Germany). The parental pVAX1 (vector) was used as one of the controls. The endo-free condition of plasmids was determined by the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test as recommended by European and US Pharmacopoeias (Tuomela et al., 2005) using the QCL 1000-LAL test kit (Cambrex).

B16F10 transfection

As standardized in our laboratory, B16F10 transfection was done by *in vitro* electroporation in GenePulser Xcell™ (Bio-Rad Laboratories) with 500µF, $\infty \Omega$ and 160V pulses in exponential decay mode. 10⁵ B16F10 tumor cells (5x10⁵ cells/ml) were electroporated with Opti-MEM medium (Gibco – Invitrogen) only (mock) or 10µg of

plasmid DNA (vector or DNA-Hsp65). Just after electroporation, cells were washed with RPMI-1640 medium, counted and s.c. injected (5×10^4 cells/mouse). Transfection rate was determined by flow cytometry (FACSort™ - BD Bioscience) with labeled vector or DNA-Hsp65. Plasmids DNA were labeled with Alexa Fluor 488 by Universal Linkage System (ULSTM) using the ULYSIS nucleic acid labeling kit (Invitrogen, Molecular Probes) as described by Trombone et al., 2007. B16F10 proliferation ability after electroporation was assessed by [^3H] methyl-thymidine (Amershan) incorporation. Briefly, 0.5 μCi of [^3H] methyl-thymidine was added to triplicate electroporated (mock or with plasmids DNA) and non-manipulated B16F10 cell suspension (positive control) (10^5 cells/well). The cells were incubated for 30h in humidified atmosphere under 5% CO_2 at 37°C and then collected with a semiautomatic cell harvester (Inotech) onto glass-fiber filter paper. [^3H]methyl-thymidine uptake was analyzed on a beta-scintillation counter (Beckman, 1900TR – Liquid Scintillation Analyzer). Results are presented in counts per minute (cpm).

Experimental designs

C57BL/6 mice were randomly distributed in 3 groups per treatment approach (n=12-14) and in order to evaluate DNA-Hsp65 antitumoral immune effects, two main approaches were studied: 1) Mice were s.c. inoculated with 5×10^4 B16F10 melanoma cells into the right flank. After 10 days [tumor volume ($\text{longest diameter}^2 \times \text{perpendicular diameter}$) = $\sim 8 \text{ mm}^3$], mice were treated by intratumoral route with 100 μl of saline (Saline group), vector (Vector group) or DNA-Hsp65 (DNA-Hsp65 group) (100 μg). 2) Mice were s.c. injected into the right flank with 5×10^4 viable B16F10 cells previously electroporated with plasmid DNA (B16-DNAHsp65 or B16-Vector groups) or just electroporated (B16-Mock).

For both approaches, eighteen days after experimental beginning, mice were killed for peritoneal macrophages removal and tumor and spleen rescue. Peritoneal macrophages and spleen were sterile removed for co-culture followed by cytotoxic test. Tumor mass was removed, weighted and, when possible, sliced into 3 fragments for histologic and imunohistochemistry analysis; evaluation of immune infiltrating cells by flow cytometry and total mRNA extraction for Tbet, GATA-3 e IL-17 gene expression assessment by Real-Time PCR. Besides, half of the groups' animals were followed for 50 days for survival rate determination at which point all mice had succumbed to tumor burden or were requisitely and appropriately euthanized. For either experimental designs, B16F10 cell viability, with or without electroporation, was greater than 75% determined by Trypan blue exclusion. All experiments were repeated at least twice in an independent fashion with similar results. Representative results are presented.

Analysis of tumor immune infiltrating cells

Before flow cytometry analysis, tumor mass received enzymatic treatment in order to dissociate the total cells. Briefly, the tumor was sliced and incubated with 15ml of RPMI medium containg 0,5 µg/µl of liberase (Roche) for 30min at 37°C. The samples were washed with RPMI medium supplemented with 10% FCS and was gently sieved to produce a cell suspension. Red blood cells were lysed and final dissociated cells were counted in Trypan blue. To evaluate immune infiltrating phenotypes, 1×10^6 cells/ml were stained with anti-CD4, anti-CD8 and anti-CD44. APC populations were assessed by anti-CD11c and anti-CD11b and anti-CD86. Tubes with control isotypes were performed to discount inespecific labeling. Analytical flow cytometry was performed using a FACSort and the data were analyzed using the CellQuest software (BD Biosciences).

Evaluation of recombinant Hsp65 (rHsp65) expression in tumor mass

To evaluate rHsp65 expression in tumor, C57BL/6 mice were s.c. injected with 5×10^4 B16F10 cells. After 10 days of tumor growth, animals received 100 μ g of DNA-Hsp65 (n=18) or saline (n=9) by intratumoral route. After 1, 4 or 8 days of intratumoral treatment, mice were killed for tumor removal, which was quickly frozen in liquid nitrogen. Frozen tumoral material was macerated in lysis buffer (Tris 50mM, pH 8.0, NaCl 150mM, SDS 0,1%, IgePal 1% and sodium deoxiglicolate 0,5%) plus protease inhibitors (leupeptine 10 μ g/ml; DTT 1mM; PMSF 1mM and EDTA 1mM) (AMRESCO). The suspension was incubated for 30min at 4°C with constantly agitation. Cell lysates were next centrifuged at 20000g for 25min at 4°C, the supernatant was collected and heated at 95°C for 10min. Total protein concentration was assayed by Bradford-Coomassie method (Pierce) and resolved by electrophoresis across a 10% SDS-PAGE (1,8 μ g of protein samples and 2,5 μ g of purified rHsp65 as a positive control). The rHsp65 was purified with HisTrap Chelating HP from pET28-Hsp65 transformed *E. coli*. SDS-PAGE-separated proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane using a semi-dry transfer apparatus (Bio-Rad, Mississauga). Blots were blocked overnight at 4°C with 10% bovine serum albumin (BSA) and 0.02% SDS in PBS and probed with pAb anti-Vac1 for 2h at room temperature (1:1000 in blocking buffer). Primary pAb was produced in Balb/c mice by immunization with a 5 epitope fusion protein from Hsp65. Unspecific binding was avoided by 1h incubation at 4°C with 7mg/ml of total B16F10 cell lysate. Blots were washed extensively and bound primary pAb was visualized with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes) added at 1:5000 for 1h at room temperature. Blots visualization

was achieved by using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma) and 0.025% hydrogen peroxide in 0.1M Tris-HCl, pH 7.4.

Specific cytotoxicity against B16F10 cells

To evaluate B16F10 specific lysis mediated by CD8 T cells, a two step procedure was done. Peritoneal macrophages (2×10^5) and total spleen cells (5×10^6) obtained from animals of both experimental schemes were co-cultured in 24 well plate (Nunc) pulsed with total B16F10 lysate (30 μ g of proteins). After 4 days of incubation in humidified atmosphere under 5%CO₂ at 37°C. CD8 T cells were purified with magnetic beads (Miltenyi Biotec) according to producer's instructions. CD8 T suspensions (effector cells) were centrifuged at 1500g for 10min and resuspended in RPMI-1640 medium without phenol red (Gibco-Invitrogen) supplemented with SBF 1%. B16F10 cells (target cells) were removed from culture bottle and resuspended in the same medium. Cells were counted in Trypan blue and distributed in triplicate in a "U"-bottomed 96-well microtiter plate (Nunc) (20:1 effector:target ratio). Co-culture was incubated for 18h at 37°C under 5% of CO₂ constant tension. After incubation, the lactate dehydrogenase (LDH) released in the culture medium was measured using a Cytotoxicity Detection Kit (Roche Applied Science) according to the manufacturer recommendations. Specific cytotoxicity was calculated as follows:

$$\% \text{ specific lysis} = 100 \times [(\text{experimental counts} - \text{effector spontaneous counts}) - (\text{target spontaneous counts}) / (\text{target maximal counts} - \text{target spontaneous counts})]$$

Relative gene expression in tumor mass

To evaluate gene expression in tumor microenvironment Real Time RT-PCR was performed. This way, RNA was extracted with TriZol reagent (Invitrogen) according to

the manufacturer protocol. The total RNA was treated with DNaseI amplification grade (Invitrogen) and cDNA synthesis used SuperScriptII (Invitrogen) according to producer's instructions. Primers sequences were: β -actin sense 5'-AGCTGCGTTTTACACCCTTT-3' and anti-sense 5'-AAGCCATGCCAATGTTGTCT-3'; GATA-3 sense 5'-AGGAGTCTCCAAGTGTGCGAA-3' and anti-sense 5'-TTGGAATGCAGACACCACCT-3'; T-bet sense 5'-CCCCTGTCCAGTCAGTAACTT-3' and anti-sense 5'-CTTCTCTGTTTGGCTGGCT-3'; IL-17 sense 5'-TGCCCTCCACAATGAAAAGA-3' and anti-sense 5'-AACACGAAGCAGTTTGGGAC-3'. Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) was used and the reactions were performed in Rotor-gene (Corbett Life Science, Mortlake, NSW, Australia). Relative levels of gene expression were calculated as described by Zhu et al. (2003). The following equation: $\rho x = (1+E\beta)^{[\Delta Ct_{AB} - (R\beta/Rx) (\Delta Ct_{BA})]}$ was used, basically equivalent to: [relative gene expression of Vector or DNA-Hsp65 groups; B16-Vector or B16-DNAHsp65, normalized by β -actin expression]/[relative gene expression of Saline or B16-Mock groups respectively, normalized by β -actin expression].

Statistical analysis

Survival curves were generated by the Kaplan-Meier method and differences between groups defined by log rank analysis. Real Time RT-PCR data were analyzed by Student t test or by Mann-Whitney non-parametric test. The other parameters were compared using analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey test. A p value of less than 0.05 was considered significant.

Results

The first experiments addressed the transfection procedures of both treatment strategies, B16F10 were transfected *in vitro* by electroporation and plasmid uptake was analyzed by flow cytometry. As expected, mock transfected cells (Figure 1A) showed just background fluorescence in Alexa-488 channel. On the other hand, electroporation with labeled vector (data not shown) or DNA-Hsp65 (Figure 1B) revealed that almost 100% of B16F10 were positive for Alexa-488 labeling, indicating that the electroporation method was effective to allow DNA uptake by B16F10 tumor cells. Besides, electroporated B16F10 cells showed viability greater than 75% when analyzed by Trypan blue. As shown in Figure 1C, electroporated cells, with or without plasmid DNA, maintained proliferation ability (cpm), but in a smaller rate when compared to non-electroporated cells (~25% reduction). These data revealed that B16F10 cells after electroporation did not change their proliferation ability. The dose of 10µg of plasmid DNA was used in all protocols because higher doses showed to be deleterious to cells (data not shown).

The transfection effectiveness of intratumoral treatment was assessed by immunoblot with pAb anti-Vac1 which is specific for Hsp65 and does not cross-react with eukaryotic Hsp60 induced by hyperthermia (data not shown). As demonstrated in Figure 2, tumor masses of animals treated with saline showed no expression of rHsp65 in any of the evaluated times. In contrast, in tumors cells recovered from DNA-Hsp65-treated animals it was possible to detect the rHsp65 expression after 4 days of plasmid DNA-Hsp65 injection and the expression was detected at least until the 8th day. The presence of other bands are probably due to protein degradation, supported by the results obtained with the purified rHsp65 (positive control) or by background labeling caused by pAb source (Balb/c mice). Is it possible to see a characteristic pattern of

bands as a result of its autocleavage properties (Portaro et al., 2002). Altogether, these data evidenced that transfection of plasmid DNA was successful in both treatment approaches.

To determine antitumoral potential of DNA-Hsp65 intratumoral therapy and B16F10 *in vitro* transfection with DNA-Hsp65, tumor weight was first analyzed. As indicated in Figure 3A and B, both treatment strategies with DNA-Hsp65 were able to reduce tumor growth rate when compared to respective controls evaluated by tumoral weight (g). The observed diminished tumor mass was accompanied by an enhanced survival of DNA-Hsp65 and B16-DNAHsp65 groups when analyzed by Log-Rank test, which were statistically higher than control groups (Figure 3C and D). It is interesting to note that the second treatment approach, which used a much lesser quantity of DNA vaccine, achieved similar results concerning survival rate and tumor weight. In addition to these findings, when the vector was directly introduced into the cells' cytosol (B16-Vector group) some antitumoral activity could be seen when compared to B16-Mock group (Figure 3B and D). This activity was not observed in the Vector and Saline groups (Figure 3A and C). These results indicate a possible 'nonspecific' activity due to the vector backbone effect on tumor growth. Besides that, it is interesting to comment that survival rates of different experimental designs and other doses were tested for the intratumoral treatment (data not shown), but the best results were obtained with a single dose of 100µg.

Since we were looking forward to clarifying the immune mediated antitumor effect of DNA-Hsp65 vaccine, it was important to analyze the tumor immune infiltrating cells. As showed in Figure 4, the DNA-Hsp65 group showed an enhancement in activated CD8 T lymphocytes (CD8/CD44^{hi}) percentage as well as a greater expression of CD86 co-stimulatory molecule in CD11b and CD11c cell populations, mainly constituted by

macrophages and dendritic cells, when compared to Vector and Saline groups. Although activated CD4 T cells did not exhibit statistically significant increase in its percentage, there was an increasing tendency towards it., which could have a biological importance. The second treatment strategy showed that the previous *in vitro* transfection with DNA-Hsp65 caused an enhancement in activated CD4 and CD8 T cells (Figure 5A and B) and a higher expression of CD86 in CD11c cells when compared to B16-Mock group (Figure 5D). The non-increase in CD86 expression in CD11b cells is possibly due to the way of plasmid DNA delivery (Figure 5C).

Additionally, CD8 T lymphocytes from spleen presented a specific lytic activity against B16F10 tumor cells when were assessed *in vitro* after a co-cultured period with peritoneal macrophages pulsed with total B16F10 lysate. The Figure 6A and B showed that the percentage of T CD8 with specific lysis against B16F10 cells was increased in DNA-Hsp65 treated animals from first and second approaches. Specific cytotoxicity of B16-DNAHsp65 group (Figure 6B) was larger only when compared to B16-Mock group, once again, some antitumoral effect could be due to the vector backbone when delivered inside the cells' cytosol. Furthermore, caspase-3 evaluation by immunohistochemistry on tumor sections revealed that, for both approach treatments, apoptosis was a more frequent event in tumors that received DNA-Hp65 (data not shown).

Finally, the endpoint for this study was to determine if DNA-Hsp65 could be involved in gene expression induction in the tumor site (Figure 7). This way, three well established genes involved in different patterns of immune response Tbet (Th1), GATA-3 (Th2) and IL-17 (Th17) were studied. The mRNA extracted from tumors showed the desirable integrity (Figure 7A and C). Real-Time PCR data were normalized by β -actin gene expression and Saline or B16-Mock values were taken as references for

approach one and two respectively. The analysis demonstrated that relative gene expression of Tbet and IL-17 was higher in DNA-Hsp65 group (Figure 7B). In contrast, B16-DNAHsp65 and B16-Vector groups did not show statistically significant difference in these relative gene expressions (Figure 7D). This similar induction of some genes expression between B16-Vector and B16-DNAHsp65 could be involved in the antitumor immune response induced in B16-Vector group, which did not occur between DNA-Hsp65 and Vector groups. No alteration was observed in GATA-3 gene expression.

Discussion

Several innate and adaptive immune effector cells and molecules participate in the recognition and destruction of cancer cells, a process that is known as cancer immunosurveillance. However, cancer cells avoid such immunosurveillance through the outgrowth of poorly immunogenic tumour-cell variants (immunosélection) and through active suppression of the immune response (immunosubversion) (Zitvogel et al., 2006). Many therapeutic strategies in cancer combat use molecules that may rise antigenic presentation of tumor peptides or broadly stimulate the immune system, sometimes acting as “danger signals” (Todryk, 2000). The ability of tumour-derived Hsp preparations in eliciting tumour-specific rejection started to be described in the beginning of 1990s and it is now clear that Hsps can stimulate and mediate an impressive array of innate and adaptive immune responses. In 1993 our group started to study Hsp65 antitumoral activity in a non-Hodgkin lymphoma model (Silva et al, 1993). Since then, different studies have documented that Hsps present really promising characteristics in neoplastic combat (Srivastava, 2002; Ren et al., 2008), what explains

their employment in different treatment strategies, including clinical assays (Wood et al., 2008; Michaluart et al., 2008).

In this work, we studied two approaches with the DNA-Hsp65 vaccine in s.c. B16F10 tumor experimental model. In the first one we used the DNA-Hsp65 injected by intratumoral route and in the second one we used *in vitro* DNA-Hsp65 transfection of B16F10 cells followed by tumor establishment *in vivo*. The first protocol aimed to clarify DNA-Hsp65 action as an antitumoral therapy and the second intended to evaluate, even if indirectly, DNA-Hsp65 vaccine and Hsp65 effects in the melanoma development. Our results demonstrated the DNA-Hsp65 antitumoral potential in both treatment strategies. Moreover, from a clinic point of view, our data assemble several parameters that could be used as biomarkers to aid new therapeutic strategies efficacy validation against cancer.

The survival assessment of B16-DNAHsp65 group, as observed for intratumoral treatment, presented an increased survival rate when compared to its controls. In contrast, while Vector group was not different from Saline group, B16-Vector group exhibited a greater percentage of survival when compared to B16-Mock, possibly due to immune response unspecific stimulation caused by the vector *per se*. Even though the transfection with Hsp65 gene did not totally protect against tumor development, it was able to delay the neoplastic growth, probably by similar mechanisms of intratumoral vaccine treatment. This is an important result because a much lesser quantity of DNA was able to reach similar results of therapy. In this sense, tumor growth attenuation suggests some Hsp65 or plasmid DNA activity that, *in vivo*, may act on immune cells and although our data do not support a definitive conclusion about Hsp65 mechanisms in antitumor immune response, they come up with some points to be better elucidated.

Moreover, since there are plenty of evidence showing a positive correlation between tumor infiltrating lymphocytes and survival enhancement for different cancer types (Zitvogel et al., 2004; Tomšová et al., 2008), we decided evaluate the immune response in tumor site. Thus, in the present study, we observed a statistically significance in the enhancement of CD8 T cells with an activated phenotype (CD8/CD44^{hi}), considered to be one of the most important cell population in a response against tumors. Also, after DNA-Hsp65 therapy, there was an increase in CD86 co-stimulatory molecule expression in APCs, CD11b and CD11c, mainly composed by macrophages and dendritic cells respectively. In addition, DNA-Hsp65 intratumoral treatment was able to promote a delay in tumor growth, as evaluated by tumor mass. The greater percentage of B16F10 specific lysis mediated by CD8 T lymphocytes and caspase-3 augmentation in vaccinated tumors suggests that this mechanism may be implicated in tumor development control. Nonetheless, since we do not have a direct correlation between CD8 T cells action, other mechanisms contribution to this caspase induction can not be excluded, including plasmid DNA or Hsp65 itself which are involved in apoptosis process. This is an interesting aspect for future investigations concerning this vaccine mechanism of action.

Likewise, in the second treatment approach, previously transfection with *hsp65* gene (B16-DNAHsp65 group) attenuated tumor growth when compared to its controls. In addition, there was an enhancement in the percentage of lymphocytes with activated phenotype (CD4/CD44^{hi} and CD8/CD44^{hi}) and in CD86 expression in CD11c population when compared to B16-Mock group. Our results do not reproduce what was seen by Tarrant et al., 2004, who described that animals which received mycobacteria Hsp65-transfected B16F10 cells did not presented any delay in tumor growth. These

divergences are possibly due to the different transfection methods and to a different vector used by the authors.

Lukacs et al. (1993) reported a total lost of tumor development ability by J774 lymphoma cells permanently transfected with a retrovirus encoding *hsp65* gene. Differently, in our case, the *in vitro* transfection of B16F10 cells with DNA-Hsp65 was not able to a total neoplastic growth retain. Nevertheless, our data point toward a potential tumor development attenuation and an immunogenicity enhancement of tumor transfected cells, like it was observed by Lukacs et al. An important discrepancy is the retrovirus vector used by the later authors is based in the Hsp65. The expression of Hsp65 delivery by retrovirus can maintain Hsp65 expression for a longer time when compared to plasmid DNA. Another aspect that might have influenced on the observed differences is the distinct tumor cell lines employed and, as well as in Tarrant et al. (2004) study, to the different transfection procedure.

A really intriguing result was the survival enhancement and tumor development attenuation in B16-Vector group when compared to B16-Mock group, since the vector, when injected by intratumoral route, did not show any capacity for tumor development delay or survival rate increase. Probably, the vector backbone of plasmid DNA with unmethylated CpG dinucleotides, known by its properties to bind to Toll-like receptors (TLR), mainly TLR-9, and trigger a signaling cascade that induces Th1 cytokine production (Krieg, 2002; Klinman et al., 2004) is involved in the observed results. In this way, many data report the CpG sequences use in cancer therapy (Schreiber, 2001; Kunikata et al., 2004) and the CpG itself can be one of the implicated in the antitumoral response. In this case, eletroporation with the vector could facilitate its action on tumor cells since the molecule could have a lower access to target cells in intratumoral injection. Although other investigations are necessary and it remains unsolved why the

way of vector entrance makes such a difference for its activity, the gene expression results in tumor site came to clarify that the antitumor action observed on B16-Vector group is associated to immune system stimulation.

T-bet transcription factor is essential for the expression of genes that culminate in a Th1 pattern of response, like the differentiation of naïve T cells and other immune cells subsets. Besides, in colorectal bearing-patients, the presence of mRNA encoding molecules expressed by effector Th1 cells (such as CD8 α , granzyme B, granulysin, T-bet, IFN γ and IFN-regulatory factor 1) and effector memory T cells correlates with reduced metastatic invasion and increased survival of the patient (Pages et al., 2005).

These reported data reinforce what we observed in our gene expression results, since just the groups with antitumoral response presented gene expression augmentation for T-bet factor. Thus, in the first strategy, animals treated with DNA-Hsp65 by intratumoral route showed a statistically significant rise when compared to Vector group. Once more, in the second approach, B16-Vector group showed a T-bet relative gene expression similar to B16-DNAHsp65 group, what suggest again that the pVAX vector, when directly placed into cells' cytosol is, somehow, activating the immunologic system against the tumor even if in an unspecific way.

Whereas T-bet transcription factor expression is extensively documented as favorable in antitumor immune response induction (i.e. Werneck et al., 2008), the role played by IL-17 in cancer is controversial. Some reports demonstrate that IL-17 participate in human cervical tumors development in nude mice and that this cytokine is associated with increased levels of IL-6 in tumoral site (Tartour et al., 1999), which in high quantities is correlated to invasive potential of cervical carcinomas (Pages et al., 1999). Langowski et al. (2006) suggested IL-17 as a responsible for cancer promotion and that the IL-17/IL-23 axis could be the cause of neoplasia. Nevertheless, other

evidences indicate that IL-17 could protect against cancer development by means of immune mediated-tumor rejection (Hirahara et al., 2001; Hirahara et al., 2000; Benchetrit et al., 2002). In this fashion, Benchetrit et al., 2002 demonstrated that IL-17 inhibited the growth of two haematopoietic types of tumor in immunocompetent mice. While Kottke et al. (2007) reported that autoimmunity Th17-mediated, induced by Hsp70, could be explored in order to treat metastatic prostate carcinoma.

A recent work showed that Th17 cells adoptively transferred played the most important part in B16 melanoma destruction and that, unexpectedly, their therapeutic effect was due to IFN- γ production while IL-17 and IL-23 depletion had little impact on therapy success (Muranski et al. 2008). Differently from these authors' data and, contrary from others that highlighted IL-17 deleterious activity in cancer development, in the present study, IL-17 seems to play a role in antineoplastic immune response and its gene expression appears to be correlated to protection against tumor growth. Likewise T-bet transcription factor, the groups with a greater survival rate and smaller tumor mass exhibited higher relative levels of IL-17 gene expression. Therefore, as argued by Benchetrit et al. (2002) and Bronte (2008), like other cytokines, IL-17 appears to be a pleiotropic cytokine that can play opposing effects on tumor development, thus, other factors should be taken into account like immunogenicity of tumor model and host conditions. The differences in quantity from B16-DNAHsp65 and DNA-Hsp65 groups concerning this gene expression are probably due to some superficial receptor interaction or even the higher plasmid quantity used in approach 1.

The cytotoxicity assay revealed an additional possibility for our vaccine antitumor effect, since animals treated with DNA-Hsp65 by intratumoral route displayed a greater specific lysis percentage of B16F10 cells mediated by CD8 T cells, contrasted to its controls. Alternatively, B16-DNAHsp65 group specific cytotoxicity was higher only

when compared to B16-Mock, complementing other data presented here that when the vector is straightly introduced into tumor cell's cytosol, it seems to be a factor that contribute to the immune response against the cell. Although it could be called in question the exogenous proteins use (tumor lysate) for co-culture and tumor specific CD8 T cells obtainment, cross presentation is not an unusual event in macrophages which can phagocytose antigenic proteins and present in MHC class I pathway (Olazabal et al., 2008).

Besides CpG sequences, which can stimulate immune response unespecifically (Ishii et al., 2004), the Hsps can induce innate and specific immune responses against tumor peptides (Srivastava and Maki, 1991). Hence, our DNA-Hsp65 vaccine, in both strategies, seems to be able to enhance animals survival and attenuate neoplastic development by means of immune response effect against tumor mass, which is evidenced by APCs co-stimulatory expression increase, enlargement in the percentage of T lymphocytes phenotypic activated in tumor site and greater specific cytotoxicity.

The data presented here emphasize what our group has been observing regarding Hsp65 potential in tumors combat by immune response stimulation (Silva et al., 1993; Michaluart et al., 2008), which is truly relevant as long as even in a situation where conventional therapies against cancer are being employed, the immune system can play an important role. Zitvogel et al. (2008) reviewed that local immune response is necessary for best chemotherapy outcome and for some neoplasias, immune defects – bearing patients have a particularly negative prognosis. In the same sense, tumor immunosurveillance may contribute to radio or chemotherapy success.

Since both of our strategies were able to induce an antitumoral immune response, we believe that they can possibly be used to enhance conventional therapies. Also, we are already investigating other strategies that could optimize DNA-Hsp65 vaccine

action, mainly the first approach because it corresponds to a situation that is closer to clinical treatment. Also, although it can be argued that the first approach feasibility implies direct injection into tumor mass and it would restrict tumor types that could be treated, technological advances in equipments to obtain *in vivo* and real time images (i.e. Explore Ultra – GE) point out that even tumors in internal organs will possibly receive guided intratumoral inoculations.

Our results show Hsp65 importance in some activation and induction immune mechanisms against cancer, as already discussed for other Hsps. Therefore, the data presented here not only reflect the importance in determining immunological parameters as controls for antitumoral activity but also open perspectives to new assays about Hsp65 and tumor interactions. Altogether, our data show antitumoral potential of DNA-Hsp65 vaccine, among other factors, by immunostimulation against cancer and can also provide knowledge basis for new analysis that may enhance this vaccine effectiveness in tumor combat.

Figure legends

Figure 1 (a and b) Percentage of B16F10 cells transfected with DNA - Alexa 488 labeled. It indicates (a) background staining when cells were electroporated in the absence of DNA or (b) cell staining after electroporation with 10µg of DNA-Hsp65-Alexa 488 labeled. Transfection percentage was evaluated by flow cytometry. (c) *In vitro* proliferation of electroporated B16F10 cells with 10µg of plasmid DNA (vector or DNA-Hsp65) or culture medium, non-manipulated B16F10 cells (B16F10) were used as positive control. After electroporation, B16F10 cells had been placed in culture plates and pulsed with [³H]methyl-thymidine (0.5µCi/well). After 30h, cells were collected and [³H]methyl-thymidine uptake was analyzed on a beta-scintillation counter. The

results are expressed as c.p.m. (counts per minute). Electroporation parameters : 500 μ F, $\infty \Omega$ and 160V pulses in exponential decay mode

Figure 2

Western Blot of B16F10 tumors from animals treated by intratumoral route with saline (Lines 2 - 4) or DNA-Hsp65 vaccine (Lines 5 - 7). Incubation with policlonal primary Ab anti-Vac1 (anti-Hsp65) was used followed by secondary Ab goat anti-mouse IgG. The reaction was disclosed with DAB. Line 1: molecular weight standard; lines 2 and 5: 1 day after treatment; lines 3 and 6: 4 days after the treatment; lines 4 and 7: 8 days after treatment. rHsp65: recombinant Hsp65 protein purified in HisTrap Chelating HP column in ÄKTA purifier system.

Figure 3

Tumor mass (g) and percentage of survival after DNA-Hsp65 treatment. (a and c) C57BL/6 mice were inoculated s.c. in the right flank with 5×10^4 cells of melanoma B16F10. Ten days tumor injection, animals were treated by intratumoral route with 1 injection of 100 μ l of Saline, Vector or DNA-Hsp65 vaccine (1 μ g/ μ l). (b and d) C57BL/6 mice were s.c. injected with 5×10^4 B16F10 cells electroporated with 10 μ g of plasmid DNA (B16-Vector and B16-DNAHsp65) or medium only (B16-Mock). (a and b) At the end of 18 days of experimental beginning, animals were killed for tumor weight evaluation (data presented as mean $\pm$ SD) or (b and d) animals were surveyed until death for survival assessment (presented as Kaplan – Meier curves). (a and c) * $p < 0.05$ when compared to Vector and Saline groups. (b and d) # $p < 0.05$ when compared to B16-Mock group; * $p < 0.01$ when compared to B16-Mock and $p < 0.05$ when compared to B16-Vector group

Figure 4

Percentage of immune cells infiltrating tumor (a) CD4/CD44hi; (b) CD8/CD44hi; (c) CD11b/CD86 and (d) CD11c/CD86. C57BL/6 mice were inoculated s.c. in the right flank with 5×10^4 cells of melanoma B16F10. Ten days tumor injection, animals were treated by intratumoral route with 1 injection of 100µl of Saline, Vector or DNA-Hsp65 vaccine (1µg/µl). At the end of 18 days of experimental beginning, animals were killed for tumor rescue and evaluation of cell populations by flow cytometry. Data presented as mean $\pm$ SD. * $p < 0.05$ when compared to Vector and Saline groups.

Figure 5

Percentage of immune cells infiltrating tumor (a) CD4/CD44hi; (b) CD8/CD44hi; (c) CD11b/CD86 and (d) CD11c/CD86. C57BL/6 mice were s.c. injected with 5×10^4 B16F10 cells electroporated with 10µg of plasmid DNA (B16-Vector and B16-DNAHsp65) or medium only (B16-Mock). At the end of 18 days of experimental beginning, animals were killed for tumor rescue and evaluation of cell populations by flow cytometry. Data presented as mean $\pm$ SD. # $p < 0.05$ when compared to B16-Mock group.

Figure 6

Percentage of specific lysis of tumor cells mediated by CD8 T lymphocytes. (a) C57BL/6 mice were inoculated s.c. in the right flank with 5×10^4 cells of melanoma B16F10. Ten days tumor injection, animals were treated by intratumoral route with 1 injection of 100µl of Saline, Vector or DNA-Hsp65 vaccine (1µg/µl). (b) C57BL/6 mice were s.c. injected with 5×10^4 B16F10 cells electroporated with 10µg of plasmid

DNA (B16-Vector and B16-DNAHsp65) or medium only (B16-Mock). At the end of 18 days from experimental beginning, animals were killed for spleen removal, the cells were placed in co-culture with a macrophages monolayer pulsed with 30µg of tumor lysate total proteins. After 4 days, the CD8 T cells (effector) were purified and put into contact with the cells B16F10 (target) by 18 h. After that period, the rate of these specific analysis was evaluated. Effector: target of 20:1 ratio. Data presented as mean ± SD. (a) *p<0.05 when compared to Vector and Saline groups. #p<0.05 when compared to B16-Mock group.

Figure 7

RNA integrity and relative expression levels of mRNA. (a and c) Electrophoresis in agarose gel 1.5% to assess RNA integrity, showing the two bands pattern 28S and 18S. (b) C57BL/6 mice were inoculated s.c. in the right flank with 5x10⁴ cells of melanoma B16F10. Ten days tumor injection, animals were treated by intratumoral route with 1 injection of 100µl of Saline, Vector or DNA-Hsp65 vaccine (1µg/µl). (d) C57BL/6 mice were s.c. injected with 5x10⁴ B16F10 cells electroporated with 10µg of plasmid DNA (B16-Vector and B16-DNAHsp65) or medium only (B16-Mock). (b and d) At the end of 18 days from experimental beginning, animals were killed for tumor obtaining, RNA extraction and RT-Real Time PCR performance. Relative levels of gene expression were calculated as described by Zhu et al. (2003). The following equation:
$$\rho_x = (1+E\beta)^{\left[\Delta Ct_{\beta}^{AB} - (R\beta/Rx) (\Delta Ct_x^{BA}) \right]}$$
 was used, basically equivalent to: [relative gene expression of Vector or DNA-Hsp65 groups; B16-Vector or B16-DNAHsp65, normalized by β-actine expression]/[relative gene expression of Saline or B16-Mock groups respectively, normalized by β-actine expression]. (b)*p<0.05 when compared to Vector

Figures

Figure 1

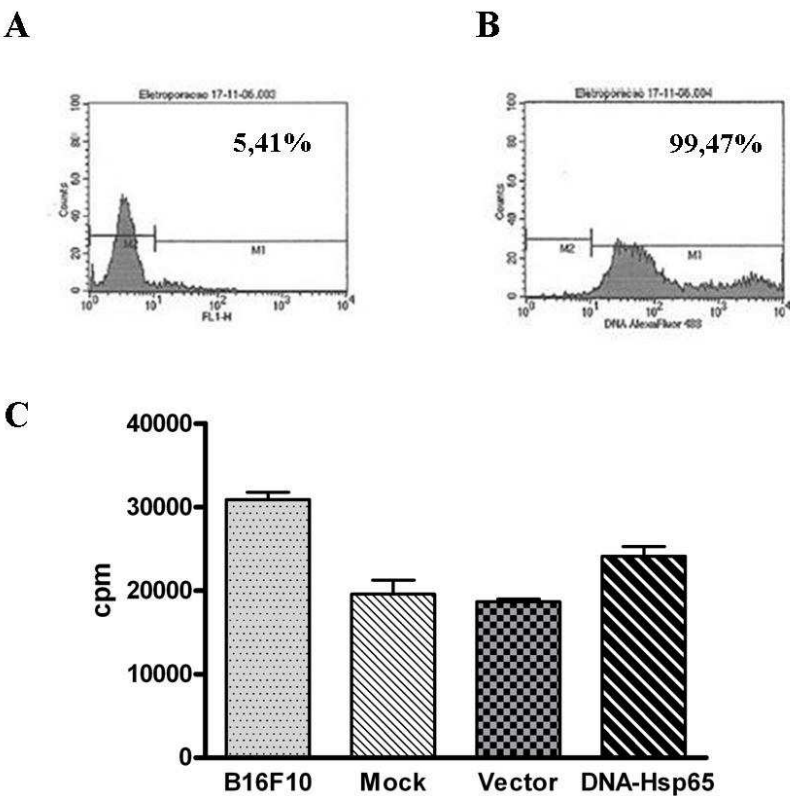


Figure 2

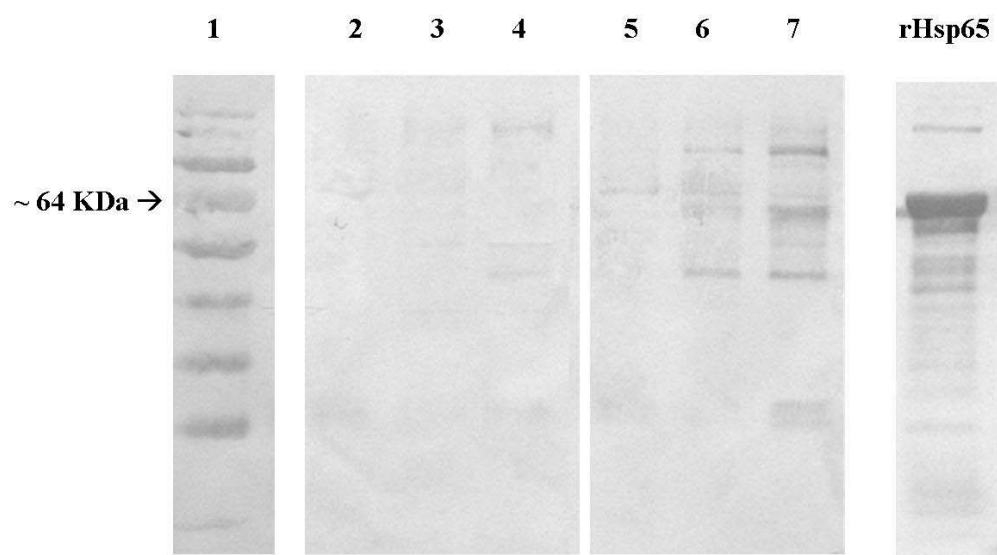


Figure 3

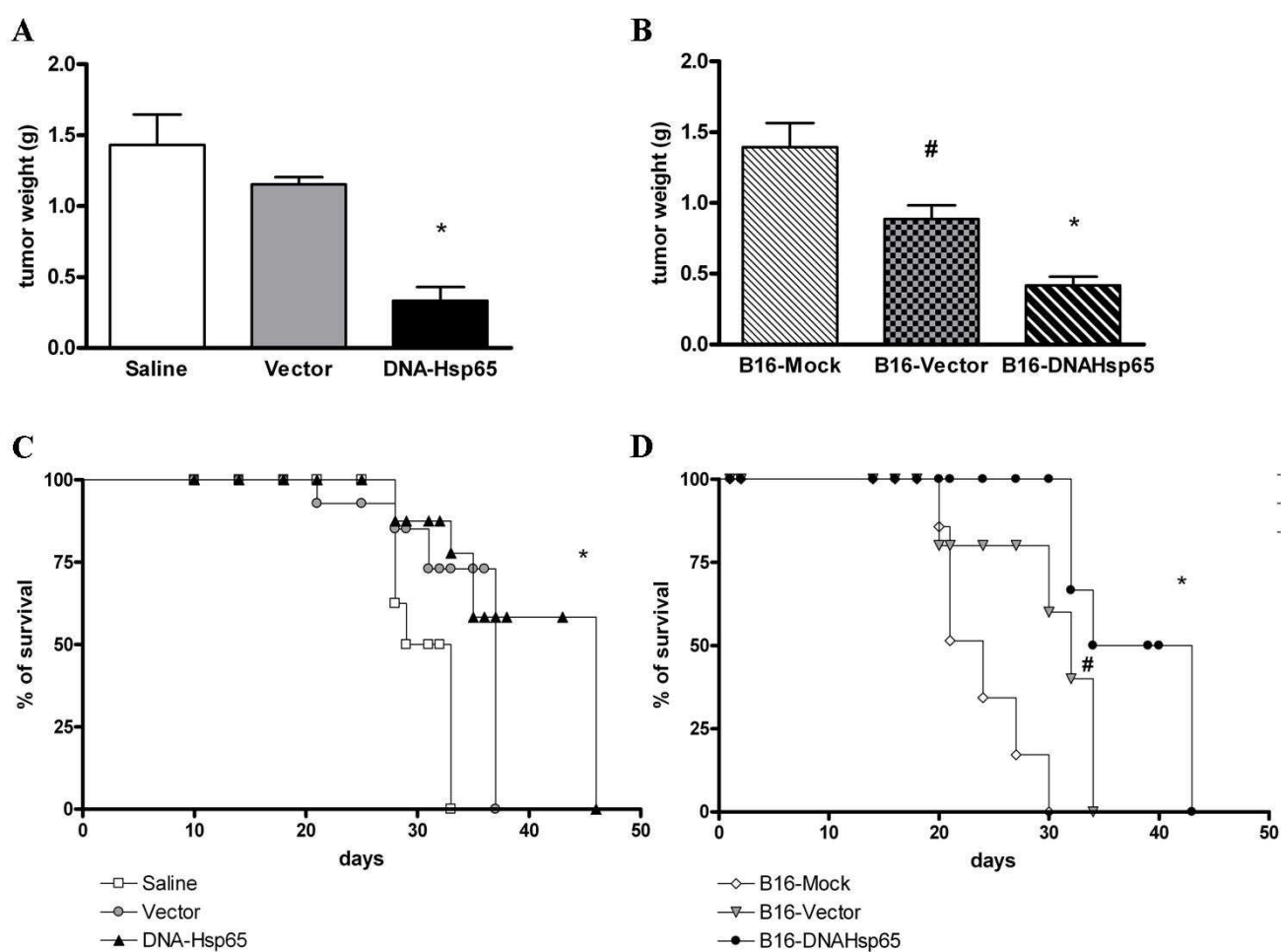


Figure 4

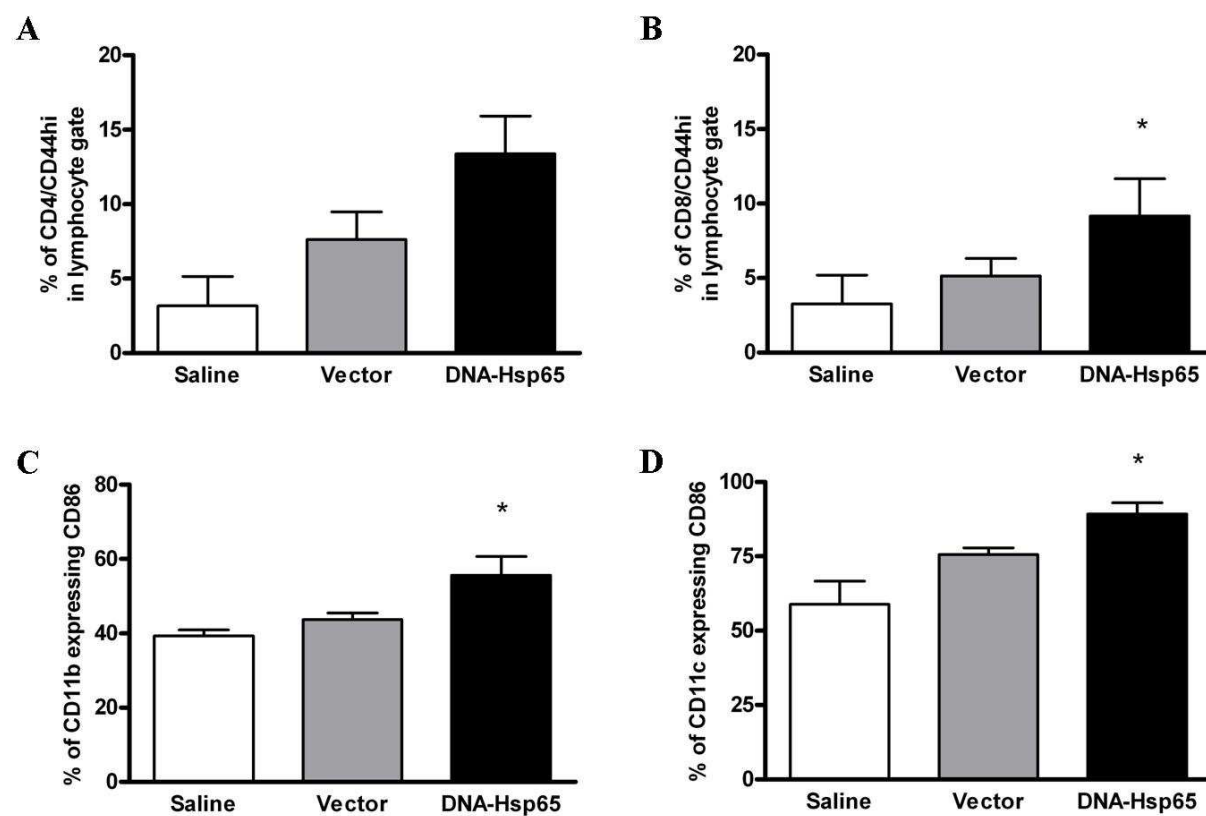


Figure 5

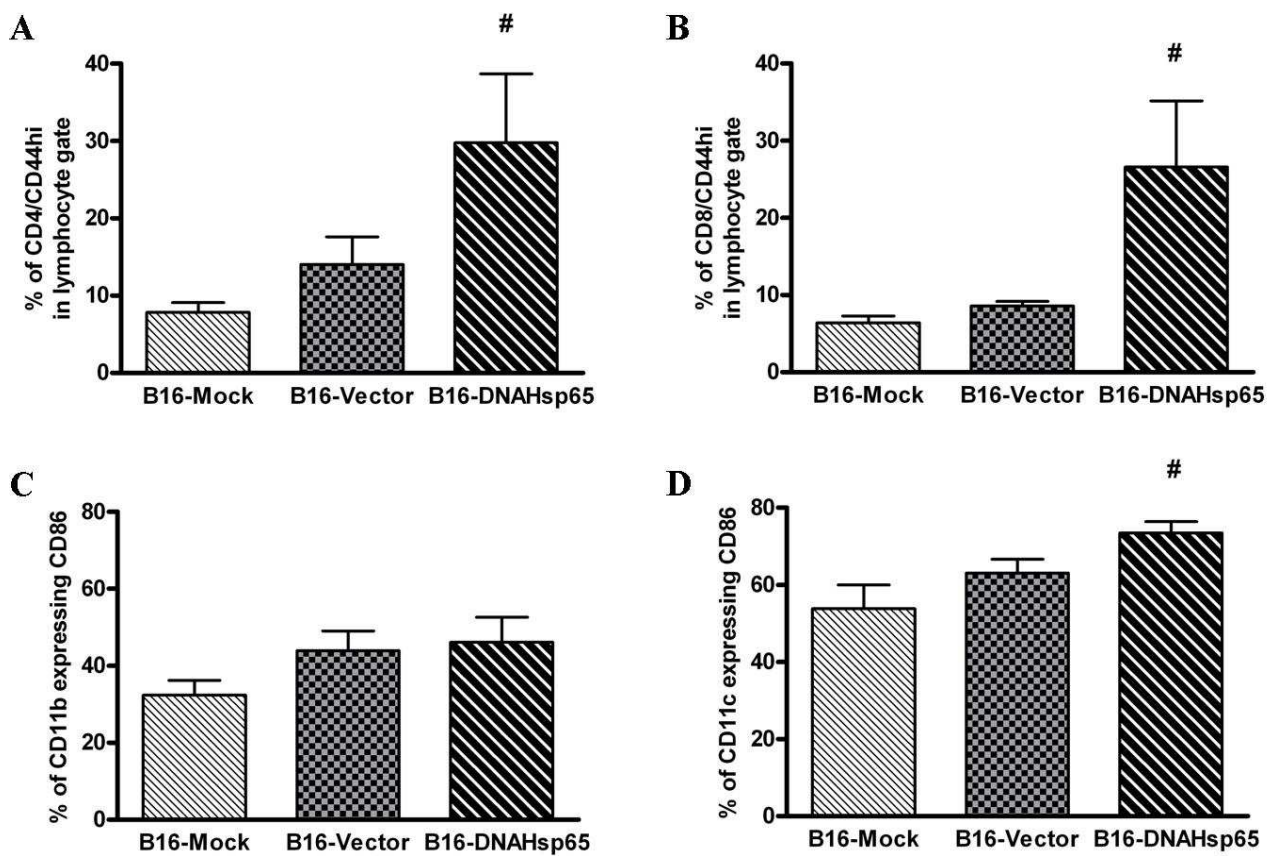


Figure 6

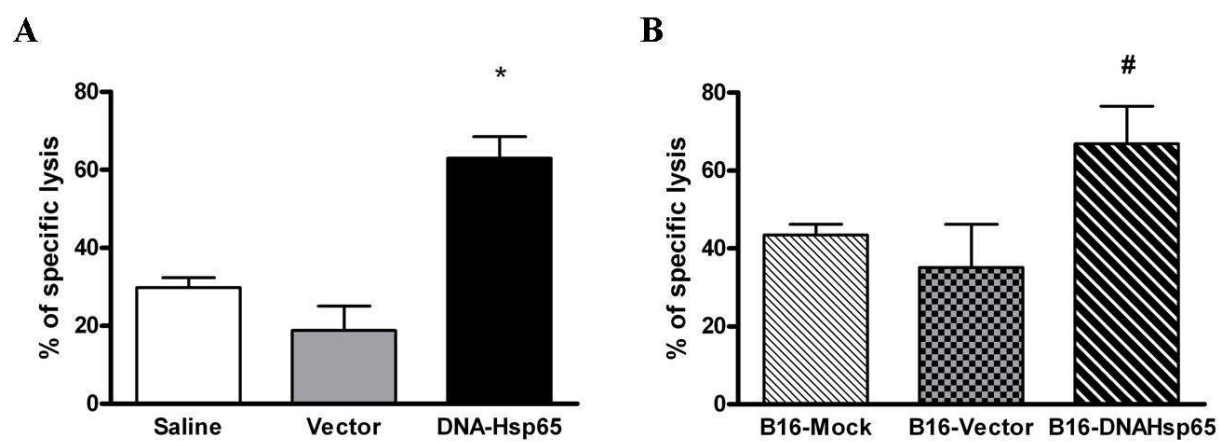
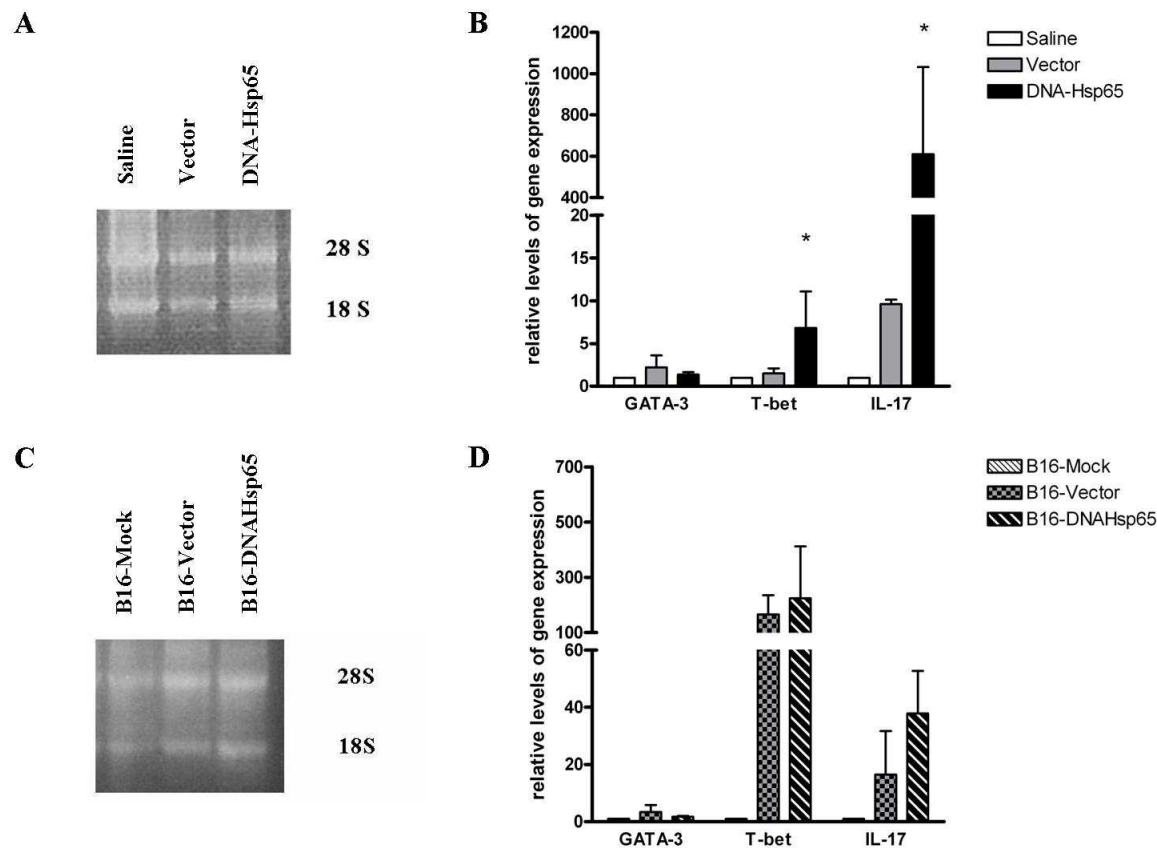


Figure 7



References

- Benchetrit F, Ciree A, Vives V, Warnier G, Gey A, Sautès-Fridman C, Fossiez F, Haicheur N, Fridman WH, Tartour E. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* 2002; 99: 2114-2121.
- Binder RJ and Srivastava PK. Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2005 Jun;6(6):593-9.
- Bonato VL, Goncalves ED, Soares EG, Santos Junior RR, Sartori A, Coelho Castelo, AA, Silva CL. Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8+ cells, interferon-gamma recovery and reduction of lung injury. *Immunology* 2004; 113: 130-138.
- Bonato VL, Lima VM, Tascon RE, Lowrie DB, Silva, CL. Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and Mycobacterium tuberculosis-infected mice. *Infect Immun* 1998; 66: 169-175.
- Bronte V. Th17 and cancer: friends or foes? *Blood* 2008;112:214. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 227–233.
- Castelli C, Rivoltini L, Rini F, Belli F, Testori A, Maio M, Mazzaferro V, Coppa J, Srivastava PK, Parmiani G. Heat shock proteins: biological functions and clinical application as personalized vaccines for human cancer. *Gene Ther* 2005; 12 Suppl 1: S131-138.
- Hara I, Sato N, Miyake H, Muramaki M, Hikosaka S, Kamikono S. Introduction of 65 KDa antigen of Mycobacterium tuberculosis to cancer cells enhances anti-tumor effect of BCG therapy. *Microbiol Immunol* 2004; 48: 289-295.
- Hirahara N, Nio Y, Sasaki S, Minari Y, Takamura M, Iguchi C, Dong M, Yamasawa K, Tamura K. Inoculation of human interleukin-17 gene-transfected Meth-A fibrosarcoma cells induces T cell-dependent tumor-specific immunity in mice. *Oncol* 2001;61:79-89.
- Hirahara N, Nio Y, Sasaki S, Takamura M, Iguchi C, Dong M, Yamasawa K, Itakura M, Tamura K. Reduced invasiveness and metastasis of Chinese hamster ovary cells transfected with human interleukin-17 gene. *Anticancer Res.* 2000; 20: 3137-3142.
- Ishii KJ, Gursel I, Gursel M, Klinman DM. Immunotherapeutic utility of stimulatory and suppressive oligodeoxynucleotides. *Curr Opin Mol Ther* 2004; 6: 166-174.
- Klinman DM, Currie D, Gursel I, Verthelyi D. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol Rev* 2004;199: 201-216.
- Kottke T, Sanchez-Perez L, Diaz RM, Thompson J, Chong H, Harrington K, Calderwood SK, Pulido J, Georgopoulos N, Selby P, Melcher A, Vile R. Induction of hsp70-mediated Th17 autoimmunity can be exploited as immunotherapy for metastatic prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 11970-11979

Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 709-760.

Kunikata N, Sano K, Honda M, Ishii K, Matsunaga J, Okuyama R, Takahashi K, Watanabe H, Tamura G, Tagami H, Terui T. Peritumoral CpG oligodeoxynucleotide treatment inhibits tumor growth and metastasis of B16F10 melanoma cells. *J Invest Dermatol* 2004; 123:395-402.

Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K, Basham B, McClanahan T, Kastelein RA, Oft M. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*. 2006; 442: 461-465.

Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ, Ragno S, Tascon RE. Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine* 1997; 15: 834-838.

Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, Lima VM, Faccioli LH, Stavropoulos E, Colston MJ, Hewinson RG, Moelling K, Silva CL. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 1999; 400: 269-271.

Menoret A, Peng P, Srivastava PK. Association of peptides with heat shock protein gp96 occurs in vivo and not after cell lysis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262: 813-818.

Michaluart P, Abdallah KA, Lima FD, Smith R, Moysés RA, Coelho V, Victora GD, Socorro Silva A, Volsi EC, Zárte Bladés CR, Ferraz AR, Barreto AK, Chammas MC, Gomes R, Gebrim E, Arakawa Sugueno L, Fernandes KP, Lotufo PA, Cardoso MR, Kalil J, Silva CL. Phase I trial of DNA-hsp65 immunotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Gene Ther* 2008 [Epub ahead of print]

Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, Paulos CM, Palmer DC, Touloukian CE, Ptak K, Gattinoni L, Wrzesinski C, Hinrichs CS, Kerstann KW, Feigenbaum L, Chan CC and Restifo NP. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* 2008; 112: 362-373

Olazabal IM, Martín-Cofreces NB, Mittelbrunn M, Martínez Del Hoyo G, Alarcón B, Sánchez-Madrid F. Activation Outcomes Induced in Naive CD8 T-Cells by Macrophages Primed via "Phagocytic" and Nonphagocytic Pathways. *Mol Biol Cell* 2008;19:701-10.

Pagès F, Galon J, Karaschuk G, Dudziak D, Camus M, Lazar V, Camilleri Broët S, Lagorce Pagès C, Lebel Binay S, Laux G, Fridman WH, Henglein B. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces interleukin-18 receptor expression in B cells. *Blood* 2005; 105: 1632-1639.

Paz P, Brouwenstijn N, Perry R, Shastri N. Discrete proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway and MHC I-dependent peptide trimming in the ER. *Immunity* 1999; 11: 241-251.

Portaro FC, Hayashi MA, De Arauz LJ, Palma MS, Assakura MT, Silva CL, de Camargo AC. The *Mycobacterium leprae* hsp65 displays proteolytic activity.

Mutagenesis studies indicate that the *M.leprae* hsp65 proteolytic activity is catalytically related to the HslVU protease. *Biochem* 2002; 41: 7400–7406.

Ren Z, Ye X, Fang C, Lu Q, Zhao Y, Liu F, Liang M, Hu F, Chen HZ. Intratumor injection of oncolytic adenovirus expressing HSP70 prolonged survival in melanoma B16 bearing mice by enhanced immune response. *Cancer Biol Ther* 2008; 7: 191-195.

Schreiber H, Wu TH, Nachman J, Kast WM. Immunodominance and tumor scape. *Semin Cancer Biol* 2002; 12: 25-31.

Silva CL, Bonato VL, Coelho-Castelo AA, De Souza AO, Santos SA, Lima KM, Faccioli LH, Rodrigues JM. Immunotherapy with plasmid DNA encoding mycobacterial hsp65 in association with chemotherapy is a more rapid and efficient form of treatment for tuberculosis in mice. *Gene Ther* 2005; 12: 281-287.

Silva CL, Lukacs K, Lowrie DB. Major histocompatibility complex non-restricted presentation to CD4+ T lymphocytes of Mycobacterium leprae heat-shock protein 65 antigen by macrophages transfected with the mycobacterial gene. *Immunology* 1993; 78: 35-42,

Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 185-194.

Srivastava PK and Amato RJ. Heat shock proteins: the 'Swiss Army Knife' vaccines against cancers and infectious agents. *Vaccine* 2001; 19: 2590-2597.

Srivastava PK and Maki RG. Stress-induced proteins in immune response to cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1991; 167: 109-123.

Tarrant JP, Walsh MJ, Blanchard MC, Lee TD, Hoskin DW, Giacomantonio CA. Reduced tumorigenicity of B16-F10 mouse melanoma cells transfected with mycobacterial antigen 85A. *Int J Oncol*. 2004;25:1693-1699.

Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, Claret E, Sastre-Garau X, Couturier J, Mosseri V, Vives V, Banchereau J, Fridman WH, Wijdenes J, Lebecque S, Sautès-Fridman C. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res* 1999; 59: 3698-3704.

Tomšová M, Melichar B, Sedláková I, Šteiner I. Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma. *Gynec Oncol* 2008; 108: 415–420.

Trombone AP, Silva CL, Lima KM, Oliver C, Jamur MC, Prescott AR, Coelho-Castelo AA. Endocytosis of DNA-Hsp65 alters the pH of the late endosome/lysosome and interferes with antigen presentation. *PLoS ONE*. 2007; 2:e923.

Tuomela M, Stanescu I, Krohn K. Validation overview of bio-analytical methods.

Werneck MB, Lugo-Villarino G, Hwang ES, Cantor H, Glimcher LH. T-bet plays a key role in NK-mediated control of melanoma metastatic disease. *J Immunol*. 2008;180: 8004-8010.

Wood C, Srivastava P, Bukowski R, Lacombe L, Gorelov AI, Gorelov S, Mulders P, Zielinski H, Hoos A, Teofilovici F, Isakov L, Flanigan R, Figlin R, Gupta R, Escudier B; C-100-12 RCC Study Group. An adjuvant autologous therapeutic vaccine (HSPPC-96; vitespen) versus observation alone for patients at high risk of recurrence after nephrectomy for renal cell carcinoma: a multicentre, open-label, randomised phase III trial. *Lancet* 2008; 372: 145-154.

Zhu G, Xiao H, Mohan VP, Tanaka K, Tyagi S, Tsen F, Salgame P, Chan J. Gene expression in the tuberculous granuloma: analysis by laser capture microdissection and real-time PCR. *Cellular Microbiol* 2003; 5: 445–453.

Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol* 2008a; 8: 59-73.

Zitvogel L, Casares N, Péquignot MO, Chaput N, Albert ML, Kroemer G. Immune response against dying tumor cells. *Adv Immunol* 2004; 84: 131-179.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)