

**Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada**

**William Roberto Schluchting**

**Uso de Linfócitos B em Terapia Gênica.**

**Ribeirão Preto, Agosto 2008.**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**William Roberto Schluchting**

**Uso de Linfócitos B em Terapia Gênica.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para  
obtenção do título de Mestre em Ciências, área de  
concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Arlete Aparecida Martins Coelho-Castelo

**Ribeirão Preto, Agosto 2008.**

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>III</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 - TERAPIA GÊNICA.....	1
1.2. USO DE CÉLULAS NA TERAPIA GÊNICA .....	5
1.3 LINFÓCITOS B NA TERAPIA GÊNICA.....	7
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>11</b>
2.1 - OBJETIVO GERAL .....	11
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>12</b>
3.1 ANIMAIS.....	12
3.2. OBTENÇÃO DOS PLASMÍDIOS RECOMBINANTES PIRES-IL12, PIRES E P-EGFP-C2 .....	12
3.3. MARCAÇÃO DOS PLASMÍDIOS COM ALEXA 488.....	13
3.4. QUANTIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS PURIFICADOS .....	14
3.5. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DOS PLASMÍDEOS.....	14
3.6. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS E LINFÓCITOS B.....	15
3.7. TRANSFEÇÃO POR ELETROPORAÇÃO DOS LINFÓCITOS B .....	15
3.8. TRANSFEÇÃO POR CONTATO DOS LINFÓCITOS B .....	16
3.9. TRANSFERÊNCIA ADOTIVA DOS LINFÓCITOS B TRANSFECTADOS .....	16
3.10. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DOSAGEM DE CITOCINAS.....	16
3.11. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DOSAGEM DE ANTICORPOS .....	18
3.12. IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS DO BAÇO .....	19
3.13. OBTENÇÃO DA LINHAGEM B16F10 DE MELANOMA .....	20
3.13.1. Avaliação do desenvolvimento tumoral .....	20
3.13.2. Dissociação da massa tumoral para análise por citometria de fluxo .....	21
3.13.3. Avaliação da expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo .....	21
3.13.4. Processamento histológico .....	23
3.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	23
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
4.1. CARACTERIZAÇÃO DOS VETORES USADOS NA TRANSFEÇÃO DOS LINFÓCITOS B .....	24
4.2. LINFÓCITOS B EXPRESSAM PROTEÍNAS RECOMBINANTES APÓS A ELETROPORAÇÃO .....	26

4.3. TRANSFEÇÃO DE LINFÓCITOS B POR CONTATO.....	31
4.5. AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE TRANSFEÇÃO NO FENÓTIPO OU ATIVIDADE DE LINFÓCITOS B .....	35
4.6. DETECÇÃO DE PLASMÍDEO EM OUTRAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS APÓS A TRANSFERÊNCIA ADOTIVA. .....	40
4.7. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DOS LINFÓCITOS B TRANSFECTADOS EM TERAPIA GÊNICA .....	42
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>



## RESUMO

Recentemente nosso grupo descreveu que os linfócitos B podiam capturar DNA plasmidial e expressar proteína *in vivo* após a vacinação gênica. Essas células apresentam uma maquinaria de produção protéica altamente eficiente, favorecendo o uso das mesmas na transferência de genes e expressão *in vivo* de proteínas. Desse modo, o objetivo do nosso trabalho foi utilizar os linfócitos B para mediar transferência de moléculas para animais. Usamos o plasmídeo que codifica a proteína fluorescente verde (GFP) para padronizar a transfecção e avaliação da expressão dessa proteína *in vitro* e *ex vivo*. A transfecção foi avaliada por eletroporação e contato. Ambas as estratégias se mostraram eficientes. Nossos resultados mostram que os linfócitos B foram capazes de expressar a GFP por quinze dias após a transferência adotiva para animais deficientes em linfócitos B. Linfócitos B transfectadas com plasmídeo que codifica a IL-12 foram capazes de expressar a proteína *in vitro* e secretá-la. Para avaliar se o processo de transfecção poderia interferir com o fenótipo do linfócito B a expressão de algumas moléculas de ativação foram avaliadas nos linfócitos B transfectados. Não houve alteração da expressão de CD40, CD80, CD86 e MHC classe II após transferência adotiva dos linfócitos por até 15 dias. Além disso, a produção de IgG não foi alterada. No entanto houve uma diminuição da produção de IgM nos animais transfectados com linfócitos B codificando a IL-12, sugerindo que essa alteração possa ser decorrente da ação da IL-12 na troca de isotipos de imunoglobulinas. A eficiência dos linfócitos B transfectados em terapia gênica foi avaliada usando modelo de melanoma B16F10 em animais deficientes de IL-12 (IL-12 KO). Os

animais IL-12 KO que receberam transferência adotiva de  $1 \times 10^6$  linfócitos B transfectados com plasmídeo da IL-12, mostraram redução do peso tumoral e uma maior sobrevivência, quando comparados aos controles. A análise histológica mostrou que os animais que receberam os linfócitos B transfectados com plasmídeo da IL-12 apresentavam redução da área tumoral e maior número de células apoptóticas. Além disso, o perfil de células infiltrantes no tumor mostrou um aumento no número de linfócitos T CD4 e CD8 e NK, apenas nos animais que receberam a transferência adotiva. Em conjunto esses mostram que a transferência de linfócitos B expressando IL-12 foi funcional e capaz de conter o desenvolvimento tumoral. Esses resultados abrem perspectivas para o uso de linfócitos B em terapia gênica, visando à transferência de proteínas ou sua atividade de apresentação de antígenos.

## ABSTRACT

We have recently described that B lymphocytes capture plasmid DNA and express the encoded protein after the gene vaccination. In fact, B lymphocytes are highly efficient in producing proteins, suggesting that it can be used for transfection approaches. In this way, the present study aims to determine if B lymphocytes are suitable to be used in gene therapy. In order to evaluate the transfection and protein expression *in vitro* and *ex vivo* we used the plasmid that encodes the green fluorescent protein (GFP). Our results showed that B lymphocytes were able to express the GFP *in vivo* up to 15 days after adoptive transfer to B cell-deficient mice. When this experiment was carried out in mice that received B lymphocytes transfected with IL-12 encoding plasmid, there was no change in the expression of CD40, CD80, CD86 and MHC class II in B lymphocytes and in the levels of serum IgG. However, the level of IgM showed a decrease after adoptive transference of B lymphocytes. We hypothesized that the IL-12 production *in vivo* could be involved in *class switch*. The biological role of IL-12 gene-transfected B lymphocytes was evaluated in a B16F10 murine tumor model, using IL-12-deficient mice (IL-12 KO). The mice that received  $1 \times 10^6$  B lymphocytes transfected with a plasmid coding for IL-12 showed a reduction in tumor area and lower mortality rate when compared to WT or IL-12 KO mice. The former mice also presented a higher number of T CD4, TC8 and NK infiltrated into the tumor. Taken together the results showed that B lymphocytes can be helpful to introduced/reconstitute protein *in vivo*. This data open novel perspective to use of B lymphocytes in gene therapy.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 - Terapia gênica

No final dos anos 70, cientistas se propuseram algo revolucionário, para a época, ao qual denominaram de “cirurgia gênica”, visando o tratamento de doenças adquiridas hereditariamente (FLOTTE, T.F. 2007). Em 14 de setembro de 1990, uma garota de quatro anos de idade que sofria de uma desordem genética, na qual levava a não produção de adenosina deaminase (ADA), uma enzima essencial para o corpo. Este foi o primeiro caso de terapia gênica nos Estados Unidos. William French Anderson e colaboradores do National Institutes of Health's Clinical Center em Bethesda, Maryland, usaram leucócitos do sangue da garota para inocular o gene da adenosina deaminase (ADA), retornando essas células transfectadas para a paciente. Esse procedimento não a curou, os glóbulos brancos tratados geneticamente só funcionaram por poucos meses e o processo teve de ser freqüentemente repetido (CULVER K. *et al.*, 1991; ROSENBERG L.E.. 1990; BLAESE *et al.*, 1995; FLOTTE, T.R. 2007).

Apesar disso o uso da terapia gênica estava estabelecido, com possibilidades de aplicações em diferentes patologias, incluindo doenças infecciosas. Atualmente, o termo terapia gênica engloba várias estratégias gênicas para tratamento não só de desordens genéticas, mas também de câncer, doenças auto-imunes e doenças infecciosas. Na década de 90, com o surgimento das vacinas gênicas o desenvolvimento de vetores para expressão gênica *in vivo*, passou a ser um alvo de estudo adicional (GURANATHAN, S. *et al.*, 2000).

Uma abordagem interessante, usando terapia gênica está sendo desenvolvida em pacientes com câncer no cérebro, onde o gene introduzido no organismo, é desenhado para que às células tumorais respondam melhor as drogas usadas na quimioterapia. A terapia gênica também pode ser usada em pacientes que tiveram artérias bloqueadas, assim estimulando a angiogênese no local próximo à obstrução, assim melhorando a circulação (JINNAH, H.A. e FRIEDMANN, T. 1995; FLOTTE, T.F. 2007).

Pode-se dividir a abordagem usando terapia gênica para tratamentos de doenças em basicamente em dois tipos de estratégias: A- a que usa injeção direta de vetores; e B- a que utiliza células manipuladas (*ex vivo*), usando ou não transfecção com vetores virais ou plasmidiais, e restituídas ao paciente (FLOTTE, T.F. 2007).

Como toda estratégia de intervenção ou imunoterapia, primeiramente há necessidade de se identificar, isolar e/ou amplificar o gene de interesse para o futuro tratamento. A escolha do método a ser usado e vetor, em geral, estão diretamente relacionados com a patologia e com o custo benefício de cada tratamento. O uso de vetor viral, classicamente retrovírus, tem como objetivo tratar doenças através da introdução de determinado gene no organismo para substituir aquele que não é funcional (FLOTTE, T.F. 2007; Gardlík, R. *et al.*, 2005). Atualmente, esse conceito foi ampliado, sendo usado para descrever intervenções profiláticas e/ou terapêuticas que utilizem material gênico, quer seja ele DNA ou RNA (PASCOLO, S. 2008).

Um dos pontos-chaves em terapia gênica é a escolha do vetor, que são veículos no qual será introduzido o gene de interesse. Em geral utiliza-se um plasmídeo bacteriano, com promotor eucariótico, ou vetores virais tais como o retrovírus, o adenovírus e o adeno associado vírus.

Os principais alvos da terapia gênica, até hoje, são doenças como: hemofilia, anemias, a deficiência de  $\alpha$ -1-antitripsina, doenças neurodegenerativas, câncer, AIDS e doenças cardíacas. Dentre elas, o câncer ocupa local de destaque e, mais recentemente, terapias visando corrigir o fator VIII e IX da coagulação também têm ganhado destaque (JANG, J.H. *et. al.*, 2007; LYON, A.R. *et. al.*, 2008).

O uso de vetores virais para a terapia gênica tem sido amplamente utilizado, os vírus têm uma capacidade natural de infecção de diferentes tipos celulares, sendo adaptado ao uso da maquinaria da célula para encapsular seu material genético. Isso favorece o uso desses vetores para transportar e expressar o material genético desejado, embora o tamanho do gene a ser inserido deva obedecer a um determinado tamanho, para não interferir com o encapsulamento. Os adenovírus têm sido utilizados como veículos de transferência gênica em vários casos. Estes vírus normalmente causam infecções no trato respiratório e são mais fáceis e mais estáveis de trabalhar do que os retrovírus, apresentando resultados mais seguros, pois normalmente não ocorre infecção após a injeção no hospedeiro. Outros vetores virais também usados são os vírus influenza, o vírus Sindbis e o herpes vírus que infectam células do sistema nervoso. Cada um destes vetores virais pode ser modificado para minimizar o risco de causar doenças e ativar o sistema imune (WANG, H. *et al.*, 2005).

O uso de vetores virais tem obtido sucesso na transferência *ex vivo* de genes para a medula óssea para o tratamento de câncer. Entretanto, os vetores virais, tais como o retrovírus, podem se integrar ao genoma e, embora haja o benefício de uma produção da molécula em questão por longo tempo, essa inserção no genoma pode trazer consequências adversas a médio ou longo prazo. Para reduzir esse “feito colateral” alguns pesquisadores têm usado construções retrovirais, ou não, que visam a inserção localizada no genoma

(RYU B. Y. *et al.*, 2008). Outro inconveniente do uso de alguns vetores virais, em determinadas abordagens terapêuticas, advêm das proteínas do capsídeo que os mesmos possuem. Isso é particularmente prejudicial quando há necessidade de novas doses (*booster*), pois a resposta imune gerada contra tais proteínas, na primeira inoculação, praticamente neutraliza as doses de reforço. Assim, o uso de vetores virais em estratégias de profilaxia e/ou terapia podem não apresentar o resultado desejado. (DAVIS, P.B. e COOPER, M.J. 2006).

Neste caso, os vetores plasmidiais que são mais estáveis e geralmente não integrativos, podem ser uma opção para profilaxia de doenças infecciosas ou mesmo terapia (GURUNATHAN, S. *et al.*, 2000). A administração de vetores plasmidiais para o uso em terapia gênica tem obtido bons resultados, visto que o organismo não apresenta efeitos adversos após a sua inoculação. Um dos pontos positivos para o uso de vetores plasmidiais em vacinas gênicas são as seqüências imunoestimulatórias que esses vetores carregam na sua estrutura denominadas de motivos CpG. Esses motivos se constituem de seqüência de citosina e guanina não metiladas, comuns nos genomas bacterianos, mas não tão freqüentes nos eucarióticos. Essas seqüências interagem com receptores do tipo Toll, em geral o Toll-like 9 (TLR9), presentes em células apresentadoras de antígenos e outros linfócitos, agindo como um adjuvante. A sinalização mediada por motivos CpGs leva ao recrutamento de moléculas adaptadoras como o MyD88, resultando na produção de IL-12. Recentemente, foi mostrada a importância da estrutura do carboidrato presente nos DNA plasmidiais na interação do Toll-9 (HAAS, T. *et al.*, 2008). Do ponto de vista de profilaxia contra doenças infecciosas ou câncer o uso de plasmídeo se mostra eficiente por ativar uma resposta do tipo Th1. A ativação de um perfil de linfócitos T do tipo Th1 está envolvida com controle de várias doenças infecciosas e tumores (GURANATHAN, S. *et al.*, 2000), sendo o DNA

plasmideal alvo de várias abordagens em terapia gênica. Além disso, o risco da produção de anticorpos anti-DNA, é relativamente pequeno, reduzindo, consideravelmente, o desencadeamento de doenças auto-imunes (GURUNATHAN, S. *et al.*, 2000; PRUD'HOMMER, G.J. *et al.*, 2007; DELIMA, D.S. 2006).

O uso de vetores plasmidiais em terapia gênica já foi comprovado em diferentes modelos experimentais como leishmaniose (CARTER, K.C. *et al.*, 2007), tripanossomíase (CHOU, B. *et al.*, 2007), raiva (TESOURO-CRUZ, E. *et al.*, 2008) e tuberculose (LOWRIE, D.B. *et al.*, 1999), entre outros.

Um dos grandes problemas envolvendo o uso de vetores quer sejam virais ou plasmidiais é o direcionamento dos mesmos, *in vivo*. Isso tende a levar ao uso de altas doses para se conseguir o efeito desejado, ou o uso de sistemas de liberação. Existem diferentes formulações usadas para entrega dos vetores *in vivo*. As formulações mais usadas são os lipossomas e microesferas de PLGA (RAWAT, M. *et al.*, 2008; TAHARA, K. *et al.*, 2008). Como esses sistemas tendem a proteger os vetores é possível se usar baixas doses do vetor com resultados eficazes (LIMA, K.M. *et al.*, 2003; ROSADA, R.S. *et al.*, 2006). Por outro lado, o uso de células eucarióticas para a transferência gênica tem sido bastante explorado em terapia gênica, desde que as células a serem utilizadas podem ser provenientes do próprio paciente.

## 1.2. Uso de células na terapia gênica

Outra abordagem em terapia gênica se refere ao uso células como veículo de transporte do material genético para o organismo. *Stem-cells* ou células mesenquimais são as principais células usadas, atualmente, nesse tipo de estratégia. Como o caso da distrofia

muscular de Duchenne, onde se tenta corrigir a distrofina mutada que gera a doença usando *stem-cells* transfectadas ou a transferência do gene da proteína CTRF na fibrose cística (DEL VECCHIO, F. *et al.*, 2005). Outro alvo interessante tem sido transfectar *Stem-cells* com gene que codificam as proteínas do fator 8 e do fator 9 da cascata de coagulação, visando o tratamento em pacientes hemofílicos (ZUBLER, R. H. 2006; HIGH, K. A. 2003; ZALDUMBIDE, A e HOEBEN, R. C. 2007). Em geral, os estudos utilizando *stem-cells* têm mostrado eficiência na produção de proteínas heterólogas, sendo que alguns já se encontram em fase clínica (BURT, R, K. *et al.*, 2005)

Dentro deste contexto estão as células dendríticas que são consideradas as principais células apresentadoras de antígenos (APC). Um dos pontos chave para o uso de células dendríticas em imunoterapia é baseado no seu processo de captura do antígeno, apresentação e ativação de linfócitos T, com conseqüente ativação da resposta imunitária (CHIODONI, C. *et al.*, 1999; HARSHYNE, L. A. *et al.*, 2001). Para imunoterapia de tumores o uso de células dendríticas é bastante atraente, uma vez que as mesmas podem induzir uma resposta imunitária eficaz, que o paciente, na maioria das vezes, não consegue induzir, não só por mecanismos de escape relacionados ao tumor como os decorrentes da não reatividade do organismo pela tolerância imunológica como por exemplo os antígenos tumorais são os antígenos próprios encontrados pelo sistema imune em desenvolvimento, ou as células tumorais podem apresentar seus antígenos de uma forma tolerogênica. Dessa forma essas células têm sido utilizadas em várias terapias contra o câncer, tais como o melanoma, carcinoma renal e câncer de pulmão. A estratégia, nesse caso consiste na transfecção de células dendríticas autólogas ou não, com antígenos específicos ou um *pool* do lisado tumoral antes de serem reintroduzidos nos pacientes, visando à ativação do sistema imune. Essa técnica demonstra uma eficiência muito alta, mas, assim como sua

eficiência o seu custo também é elevado (BARBUTO, J. A. *et al.*, 2004; HIRSCHOWITZ, E. A. *et al.*, 2004). Além da transfecção direta com antígenos protéicos, algumas abordagens utilizam a transfecção usando vetores ou mesmo moléculas de RNA (PASCOLO, S. 2008). Em todas as abordagens citadas, a eficiência também depende da patologia, dose e vetores usados. A transfecção das células dendríticas com RNA total de tumor tem mostrado ser uma abordagem promissora, estimulando uma resposta imunitária capaz de conter o desenvolvimento tumoral (CEPPI, M. *et al.*, 2005).

### 1.3 Linfócitos B na terapia gênica

Os linfócitos têm sido considerados atrativos nesse sistema, tendo em vista a sua fácil manipulação em cultura, a facilidade de transfecção *in vitro* e o posterior retorno para o paciente. Os linfócitos do sangue periférico são mais facilmente manipulados do que seus precursores na medula óssea, por serem mais amplamente diferenciados, não sofrendo ativação quando se transfecta um gene para estes linfócitos (CULVER, K *et al.*, 1991).

Os linfócitos B representam de 5 a 15% da população de linfócitos circulantes e são classicamente definidos pela presença de imunoglobulinas de membrana. Estes marcadores são produzidos pelas próprias células e inseridos na membrana durante a maturação dos linfócitos B, onde se estabelecem na superfície da membrana (LI, J. *et al.*, 2004; YOUINOU, P. 2007; LAROSA, D. F. e ORANGE, J. S. 2008; WELNER, R. S. *et al.*, 2008).

Os linfócitos B têm como receptor de reconhecimento antigênico, dois isotipos de imunoglobulinas em sua superfície, sendo elas IgM e IgD com sítios de ligação idênticos.

As moléculas de imunoglobulina formam o complexo receptor de antígeno em linfócitos B ou simplesmente o BCR associados a moléculas acessórias que consistem dos heterodímeros de Ig $\alpha$  e Ig $\beta$ , estes ligados entre si por pontes dissulfeto. Esses heterodímeros interagem com os segmentos transmembrana do receptor imunoglobulina e, da mesma forma que os componentes celulares do complexo TCR-CD3, estão envolvidos na ativação celular (LI, J. *et al.*, 2004; YOUINOU, P. 2007; LAROSA, D. F. e ORANGE, J. S. 2008; WELNER, R. S. *et al.*, 2008).

Os linfócitos B também são células apresentadoras de antígenos profissionais, sendo que o aspecto mais explorado desse mecanismo é na ativação de linfócitos T CD4, nos centros germinativos (RODRIGUEZ-PINTO, D. 2005; ABBAS A. K. e LICHTMAN, A. H. 2008).

Os linfócitos B têm características de produção de anticorpos e tem um papel importante em doenças autoimunes pela produção de auto anticorpos. Entretanto os linfócitos B não são, considerados, em geral, como fontes de produção de citocinas. Alguns estudos usando *Toxoplasma gondii* e *Heligmosomides polygyrus* tem elegantemente demonstrado que linfócitos B, assim como os linfócitos T, podem produzir um amplo espectro de citocinas. Recentes estudos com experimentos com componentes inflamatórios, como colites, encefalomiélites, alérgica e artrite tem demonstrado que os linfócitos B produzem quantidades suficientes de IL-10, assim auxiliando na redução da inflamação (SUGIMOTO, K *et al.*, 2007).

Vários estudos falharam em demonstrar a produção de IL-12p70 por linfócitos B. No entanto, mais recentes estudos demonstram que tanto linfócitos B de humanos quanto de murinos produzem uma grande quantidade de IL-12, em resposta a estimulação combinada do receptor de célula B(BCR)/CD40 e CpG. Como a IL-12 é considerada o fator crucial da

indução de linfócitos T helper1 (Th1), sendo pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, como interferon gama (INF- $\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (SUGIMOTO, K et.al, 2007). Além disso como descreve Marana (1997), em que demonstrou claramente quem a IL-12 poderia ser uma alternativa de quimioterapia em pacientes com carcinoma de colo de útero. Além disso, a IL-12 pode apresentar um potencial em imunoterapia contra tumores sólidos, por estimular eficientemente, células NK (ZHANG, C. et al. 2008). O tratamento de melanomas com IL-27, que pertence a família IL-6/IL-12, tem mostrado uma atividade antiproliferativa, podendo também ter uma aplicação anti-tumoral (YOSHIMOTO T, et al. 2008).

Devido a sua maquinaria de síntese de imunoglobulinas, que resulta na produção elevada dos níveis dessas glicoproteínas *in vivo*, os linfócitos B podem ser uma alternativa atraente para a produção de moléculas *in vivo*, quando comparado ao uso de outras células. Isso inclui o baixo custo na facilidade de obtenção e manutenção das mesmas. A manutenção de linfócitos B *in vitro*, requer cuidados e, a cultura para ser mantida por mais tempo, necessita de fatores de crescimento, como em qualquer cultivo celular (DRAUBER, A. e VON BERGWELT-BAILDON, M. *et al.*, 2008).

Do ponto de vista da reconstituição de proteínas *in vivo*, em patologias que não necessitem diretamente da correção genômica, os linfócitos B poderiam ser utilizadas para expressão *in vivo*, de proteínas em imunoterapia. Além disso, como é uma célula apresentadora de antígeno, também pode ser utilizada no sentido de ativar o sistema imunitário. A idéia inicial de que a apresentação por linfócitos B induzia a um padrão Th2, tem sido repensada no contexto do desenvolvimento da resposta imune (ABBAS A. K. e LICHTMAN, A. H. 2008). Além disso, em vacinas de DNA, linfócitos B agem como

apresentadoras de antígenos levando padrão de ativação Th1 (ALMEIDA, L. P. *et al.*, 2008).

Alguns trabalhos têm mostrado que o uso de plasmídios contendo promotores de anticorpos, quando injetados diretamente no baço de camundongos, é capturado por linfócitos B induzindo expressão da molécula alvo e proteção (ZANETTI, M. *et al.*, 2004). No entanto, pouquíssimos trabalhos têm explorado o uso de linfócitos B em terapia gênica, principalmente como veículos de transferência de moléculas *in vivo* e livres da injeção intra-esplênica.

Avaliando a biodistribuição de DNA plasmidial em vacinas de DNA, Coelho-Castelo e colaboradores (2003), observaram, pela primeira vez, que linfócitos B capturavam DNA plasmidial e expressavam a proteína *in vivo*, após a inoculação intramuscular. Dessa forma, esses dados mostraram que não somente a inoculação intra-esplênica era capaz de levar os linfócitos B a capturarem o vetor, abrindo perspectivas do uso dessas células em abordagens de terapia gênica. O papel de linfócitos B como APC em modelos de vacinas de DNA foram recentemente comprovadas (ALMEIDA, L. P. *et al.*, 2008). Assim, o uso de linfócitos B como veículos de entrega de um gene também pode ser expandido, quando se visa à indução de uma resposta imune, fazendo com que essa população celular mostre uma plasticidade quanto ao seu uso em terapia gênica.

## **2. OBJETIVOS**

### 2.1 - Objetivo geral

Analisar o papel de linfócitos B na produção de proteínas heterólogas após transfecção *in vitro*, usando plasmídeo codificando GFP ou IL-12.

### 2.2 - Objetivos específicos

- Determinar a cinética da produção das proteínas *in vitro* e *ex vivo*;
- Avaliar possíveis alterações nos linfócitos B após a eletroporação;
- Avaliar a eficiência do uso de linfócitos B transfectados com IL-12 em imunoterapia usando modelo de melanoma experimental.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57Bl/6 WT e C57Bl/6 deficientes de IL-12 (IL-12KO), ou C57Bl/6 deficientes de células B (BKO), SPF (Specific Patogen Free), machos, com 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Biotério de Animais Isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas de São Paulo – USP (ICB). Os animais foram mantidos em isoladores de animais, com temperatura, umidade, fluxo de ar e ciclo de luz claro/escuro controlados, com livre acesso à água e ração.

#### 3.2. Obtenção dos plasmídios recombinantes pIRES-IL12, pIRES e p-EGFP-C2

Os plasmídeos pIRES-IL12, pIRES(vetor) e p-EGFP-C2 foram purificados por cromatografia de troca iônica, sendo utilizado Endofree Plasmid Giga Kit™(QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). Uma colônia de bactérias *Echerichia coli* DH5 $\alpha$ ™ transformada com o plasmídeo recombinante pIRES-IL12, ou com plasmídeo pIRES ou com o plasmídeo p-EGFP-C2, foram retiradas de placas contendo meio LB Agar (SIGMA, Germany) e

canamicina na concentração de 50µg/ml. A colônia foi inoculada em 5.0 ml de caldo LB Broth Base ((Invitrogen, Life Technologies) com kanamicina (50µg/ml) e incubadas durante 8 horas a 37°C sob agitação vigorosa (250 RPM) (Incubador shaker series 25, New Brunswinck, Edison, New Jersey, USA). A cultura inicial foi diluída 1/500 em 2,5 litros de caldo LB Broth Base, contendo canamicina (50µg/ml) e incubada a 37°C sob agitação (250 rpm) por 16 horas. Após incubação o material foi centrifugado a 5.500 rpm por 15 minutos a 4°C e o sedimento ressuspenso em 125ml de tampão P1 (Tris-HCl 50mM pH8,0; EDTA 10mM e RNase 100µg/ml). Em seguida foram adicionados 125ml de tampão P2 (NaOH 200mM; SDS 1%) e após 5 minutos adicionou-se 125ml de tampão P3 (acetato de potássio 3,0M pH 5,5). O material foi filtrado, adicionado ao tampão ER (para remoção do LPS ) e mantido no gelo por 30 minutos. O filtrado foi aplicado à resina da QIAGEN™ previamente equilibrada com o tampão QBT (NaCl 750mM; MOPS 50mM pH7,0; etanol 15% e Triton X-100 0,15%). Após a aplicação do filtrado, a resina foi lavada com 600ml de tampão QC (NaCl 1,0M; MOPS 50mM pH 7,0; etanol 15%) e o DNA plasmidial foi eluído com 30ml de tampão QF (NaCl 1,25M; MOPS 50mM pH 7,0; etanol 15%). O DNA eluído foi precipitado em 52,5 ml de isopropanol e em seguida centrifugado a 14000 rpm por 45 minutos a 4°C e o sedimento ressuspendido em 0,5 – 1,0 ml de água.

### 3.3. Marcação dos plasmídios com Alexa 488

O plasmídeo pIRES-IL12 foi marcado com fluorocromo Alexa 488 (verde), utilizando-se o sistema ULYSIS® (Molecular Probes, Eugene Oregon, USA), 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 N<sub>7</sub> da base guanina. Foram utilizados 10 µg de por marcação. O plasmídeo pIRES-IL12 a ser marcado foi ressuspensão em 19 µl do tampão de marcação e desnaturado a 95°C durante 5 minutos. As amostras foram colocadas em gelo para a adição de 2 µl do reagente ULS (contendo o fluorocromo) e mais 1 µl do tampão de marcação. A reação foi incubada a 90°C por 20 minutos. O foi purificado do excesso do reagente ULS através da precipitação com isopropanol (*overnight*, -20°C). Em seguida, foi ressuspensão em água estéril e armazenado a -70°C até o momento de uso.

#### 3.4. Quantificação dos plasmídeos purificados

A quantificação dos plasmídeos pIRES-IL12p70, pIRES e p-EGFP-C2 foi realizada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm utilizando o aparelho Gene Quant II™ (GE Biotech, Cambridge – England).

#### 3.5. Avaliação da integridade dos plasmídeos

Para verificar se os plasmídeos e/ou inserto da IL-12 e GFP estão realmente íntegros, um micrograma de cada plasmídeo foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich, Germany) a 1%. As amostras foram ressuspensas em tampão de eletroforese 6 vezes concentrado (0,25% azul de bromofenol; 40% de sucrose em água) e o material submetido a eletroforese em tampão TAE (Tris-acetato 40mM; EDTA 1mM pH8.3). A corrida foi realizada a 100V por 45 minutos utilizando o aparelho da Life Technologies Inc., Modelo 250 (BRL). O padrão de 1Kb DNA *Ladder* (Invitrogen, Life Technologies) foi utilizado como marcador de peso molecular. O gel foi corado com

0,5µg/ml de brometo de etídeo (Invitrogen) e a visualização foi feita em luz ultravioleta no ImageMaster VDS(GE Biotech).

### 3.6. Obtenção de macrófagos peritoneais e linfócitos B

Os linfócitos B foram obtidos por seleção negativa de células do baço de animais eutanasiados, os órgãos foram retirados com material estéril. Os órgãos foram macerados em meio RPMI 1640 (Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA) e as hemácias foram lisadas com tampão contendo TRIS-base (0,17M pH 7,65) e 0,16M de cloreto de amônio, estéril e livre de endotoxinas. Foi feita a determinação do número de células viáveis em câmara de Neubauer (corante azul de tripan). Rapidamente, após a lise das hemácias, as células do baço foram incubadas com *beads* magnéticas contendo o anticorpo anti-CD43 ligado (MACS<sup>®</sup> MicroBeads system – Miltenyi Biotec). A fração não ligada (negativa) é constituída por linfócitos B em repouso, e foi coletada seguindo-se o protocolo do fabricante. Quando necessário, os macrófagos foram obtidos da cavidade peritoneal por lavagem com salina gelada, e usados nos experimentos de contato.

### 3.7. Transfecção por eletroporação dos linfócitos B

Os linfócitos B obtidos foram eletroporadas no GenePulser Xcell<sup>™</sup> (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA), a 300 V, 150 µF e 100 Ω, em meio Opti-MEM (Invitrogen, Life Technologies), com 10 µg de cada plasmídeo pIRES-IL12, pEGFP-C2 e

pIRES vetor para cada  $1 \times 10^6$  células e plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^6$  em placas de 48 poços com fundo em U. As células foram mantidas em cultura a  $37^\circ\text{C}$  em meio RPMI 1640 com 10% de SBF inativado e antibióticos (completo).

### 3.8. Transfecção por contato dos linfócitos B

Os linfócitos B obtidos por seleção negativa, como foi descrito anteriormente, foram submetido ao contato com os plasmídeos pIRES-IL12, pEGFP-C2, pIRESvetor, sendo os linfócitos B plaqueados, na concentração de  $1 \times 10^6$  em meio Opti-MEM (Invitrogen) por poço e logo após foram colocadas  $10 \mu\text{g}$  de cada plasmídeo em cada poço. Duas horas após esta adição, cada poço recebeu o complemento com meio de cultura RPMI 1640 (Invitrogen) completo com 10% de soro fetal bovino inativado, assim dando continuidade a cultura por um maior tempo.

### 3.9. Transferência adotiva dos linfócitos B transfectados

Linfócitos B ( $1 \times 10^6$ ) transfectados ou não com o pIRES-IL12 injetados por via endovenosa em camundongos pelo plexo retro-orbital de cada camundongos C57BL/6, IL-12 KO ou BKO. Em algumas situações a transferência adotiva foi realizada utilizando-se linfócitos B transfectados com pEGFP-C2.

### 3.10. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas

Placas de 96 poços de poliestireno (Maxisorp Nunc-Immuno Plates, Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com 100µL da solução de anticorpo monoclonal purificado específico para interleucina 5 (IL-5), interleucina 10 (IL-10), IL-12 ou IFN-γ (BD PharMingen) diluído em tampão de ligação (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1M pH 9,0) numa concentração final de 1mg/mL. As placas foram incubadas à 4°C por 16h. Após sucessivas lavagens com solução PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) as placas foram incubadas com 200µL/poço da solução de bloqueio, constituída de PBS contendo 10% de soro bovino fetal, durante 1 hora, a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas e foram adicionadas 100µL/poço das amostras juntamente com a curva padrão de das respectivas citocinas recombinantes recombinante, diluídas em PBS/SBF 10%/Tween 0,05% e incubadas por 16h a 4°C. Após lavagem, foi feita incubação por 1h a temperatura ambiente com os anticorpos monoclonais adequados conjugados com biotina (BD Pharmingen), adicionando-se 100µL/poço do anticorpo diluído em PBS/SBF 10%/Tween 20 0,05% numa concentração final de 0,5mg/mL. Após lavagem, adicionou-se 100µL/poço de solução de avidina biotina peroxidase StrepAB kit™ (Dako, Carpinteria, CA, USA) sendo incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. As placas foram reveladas pela adição do substrato OPD (Sigma) após novo procedimento de lavagem. A reação foi interrompida pela adição de 50µL/poço de ácido sulfúrico 16% (Merck, Germany). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de placa (µQuant, Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) a 490 nm. A determinação das concentrações de citocinas nas amostras foi feita por interpolação dos resultados de absorbância obtidos em relação aos da curva padrão. A dosagem de TNF-α foi feita utilizando-se o kit BD OptEIA™ Set (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) seguindo-se

o protocolo do fabricante. A revelação da reação foi realizada na presença do substrato tetrametilbenzidina (TMB).

### 3.11. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para dosagem de anticorpos

A produção de anticorpos totais foi avaliada por ELISA a partir dos soros de animais normais e soros de animais que receberam linfócitos B após vinte dias de transferência adotiva, sendo os soros dos dois grupos coletados em vinte dias após o início do experimento. Placas de poliestireno de 96 poços (Maxisorp Nunc-Immuno plates), foram recobertas com 0,1 mL de soro dos animais, diluído em tampão de ligação ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  14,3mM e  $\text{NaHCO}_3$  10,3Mm pH 9,6), e incubadas durante a noite, a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas (0,05% de Tween 20 em PBS) e bloqueadas por 1 hora a 37°C (1% gelatina). Após lavagem, as amostras foram adicionadas e incubadas por 2 horas, a 37°C. A seguir, as placas foram lavadas novamente e anticorpos monoclonais, anti-IgG total e anti-IgM total, conjugados a biotina (PharMingen), foram adicionados para detecção de anticorpos totais. Após lavagem, as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos com StreptAB kit (Dako). Para detecção dos anticorpos, o substrato OPD (Sigma, St Louis, USA) foi adicionado; a reação foi finalizada pela adição de 50 uL de uma solução a 16% de ácido sulfúrico. A leitura da absorbância foi realizada em 490nm em espectrofotômetro de placa.

### 3.12. Imunofenotipagem das células do baço

Após os tempos determinados, os animais foram eutanasiados e o baço foi retirado e macerado. Após determinação do número total de células, estas foram distribuídas em tubos de poliestireno ( $1 \times 10^6$  células em  $100 \mu\text{L}$  por tubo), e incubadas durante 30 min, a  $4^\circ\text{C}$ , com anticorpo anti-CD16/CD32 (Fc Block<sup>TM</sup>- BD PharMingen), na concentração de  $0,5 \mu\text{g}/10^6$  células. Posteriormente, as células foram incubadas com os respectivos anticorpos monoclonais de interesse, ( $0,5 - 0,75 \mu\text{g}$  de anticorpo/ $1 \times 10^6$  células), durante 30 min, a  $4^\circ\text{C}$ , no escuro. Após o tempo de incubação as células foram lavadas com 2mL de PBS 1X contendo 2% de SFB, centrifugadas a 400 g, por 10 min a  $4^\circ\text{C}$  e ressuspensas em  $300 \mu\text{l}$  de PBS 1X contendo 1% de formol tamponado para a fixação das células. As preparações celulares foram adquiridas no aparelho FACS<sup>TM</sup> (Becton & Dickinson). Foram avaliados no mínimo 10.000 eventos por tubo e analisados através do programa CellQuest® ((Becton & Dickinson), de acordo com parâmetros de tamanho (*forward side scatter* - FSC), granularidade (*side scatter* - SSC) e intensidade de fluorescência dos anticorpos marcados com ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC) e CyChrome (Cy).

Tabela dos anticorpos usados nos experimentos de FACS

<b>FITC</b>	<b>Cy</b>	<b>PE</b>
Controle IgG2a de rato	Controle	Controle IgG2a de rato
CD19	CD4	CD19
CD11b		CD40
CD11c		MHCII(Iad)

### 3.13. Obtenção da linhagem B16F10 de melanoma

A linhagem de células tumorais de camundongo utilizada nos estudos foi a B16F10, gentilmente cedida pelo Dr. Marcello Barcinski do Instituto Nacional do Câncer (INCA)-Rio de Janeiro e pelo Prof Célio Lopes Silva, do Núcleo em Pesquisa em Tuberculose. A cultura dessas células foi realizada em meio RPMI-1640 (Invitrogen) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2 mM de L-glutamina (Sigma), 1 mM piruvato de sódio (Sigma) e 20 mg/ml de gentamicina e mantidas em estufa a 37°C com densidade de 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingir a densidade celular desejada (de acordo com o número de animais inoculados) as suspensões celulares foram descoladas das garrafas de cultura com 0,02% EDTA em PBS e as células viáveis foram contadas e injetadas via subcutânea (SC) no flanco dos animais em solução salina estéril e livre de endotoxina.

#### 3.13.1. Avaliação do desenvolvimento tumoral

Camundongos C57Bl/6 WT (n= 4), e camundongos IL- 12 KO (n= 4) que receberam ou não transferência adotiva de linfócitos B de animais WT transfectados com plasmídeo da IL-12, foram inoculados no flanco, via subcutânea, com  $5 \times 10^4$  de células B16F10. Os animais foram avaliados quanto ao tamanho da massa tumoral (g) e o tempo de sobrevivência em dias. Além disso, foram feitos cortes histológicos da área tumoral de todos os grupos. As amostras foram colocadas em formalina tamponada para avaliação histopatológica. Parte das amostras foram divididas para a análise de citometria de fluxo, usando FACSort (Beckton & Dickson).

### 3.13.2. Dissociação da massa tumoral para análise por citometria de fluxo

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

Após o período de incubação, as células foram dispersas com o auxílio de uma seringa de 10 ml. A suspensão contendo as células e os fragmentos de tumor foram centrifugados a 1500 rpm, 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 ressuspensionados em tampão de lise e centrifugados a 1500 rpm para a coleta do precipitado. Este foi ressuspensionado em 5 ml de meio RPMI completo 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 1500 rpm, ressuspensionadas em meio de cultura, coradas com azul de trypan 0,2% e contadas em Câmara de Neubauer.

### 3.13.3. Avaliação da expressão de marcadores de superfície por citometria de fluxo

As populações de células do tumor obtidas por meio do procedimento descritos no item 3.1.2 foram caracterizadas pela expressão de marcadores de superfície utilizando anticorpos conjugados a PE e Cy5. O número de células nas suspensões foi acertado para  $1 \times 10^6$  células/ml em PBS. A seguir, 100  $\mu$ l de cada suspensão celular foram distribuídos em tubos FACS. As células foram, então, incubadas com anticorpo anti-CD16/CD32 (Fc Block™ - PharMingen) na concentração de 0,5  $\mu$ 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  $\mu$ 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 as células coletadas através de centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento celular ressuspensionado em 500  $\mu$ l de PBS contendo 1% de formaldeído, para a fixação das células. As preparações celulares foram adquiridas no FACSsort (Becton & Dickinson) e foram coletados 50.000 eventos das amostras. A caracterização das populações de linfócitos T do infiltrado tumoral foi realizada com anticorpos: anti-CD4, anti-CD8, e anti-NK1.1. Foram utilizados anticorpos conjugados com PE e Cy5, além dos isotipos controle foram utilizados em todos os experimentos para o ajuste das fluorescências FL1 (PeCy5), FL2 (PE). A avaliação da expressão de marcadores de superfície foi realizada por citometria de fluxo, como descrito no item 3.1.2, usando os monoclonais na tabela abaixo.

PE	PeCy5
	CD4
CD8	

NK1.1	
-------	--

#### 3.13.4. Processamento histológico

O fragmento tumoral obtido na necropsia após a morte natural dos animais, foram colocados em frascos contendo formalina tamponada 10%. Posteriormente, estes 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) para análise histopatológica do tumor a qual foi realizada em microscópio óptico pela Profa Dra. Simone Gusmão Ramos do Departamento de Patologia dessa Unidade.

#### 3.14. Análise estatística

Para realização da análise estatística utilizou-se o programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software Inc.) e foi empregado o teste One-Way ANOVA não paramétrico seguido do pos-teste de Dunns.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Caracterização dos vetores usados na transfecção dos linfócitos B**

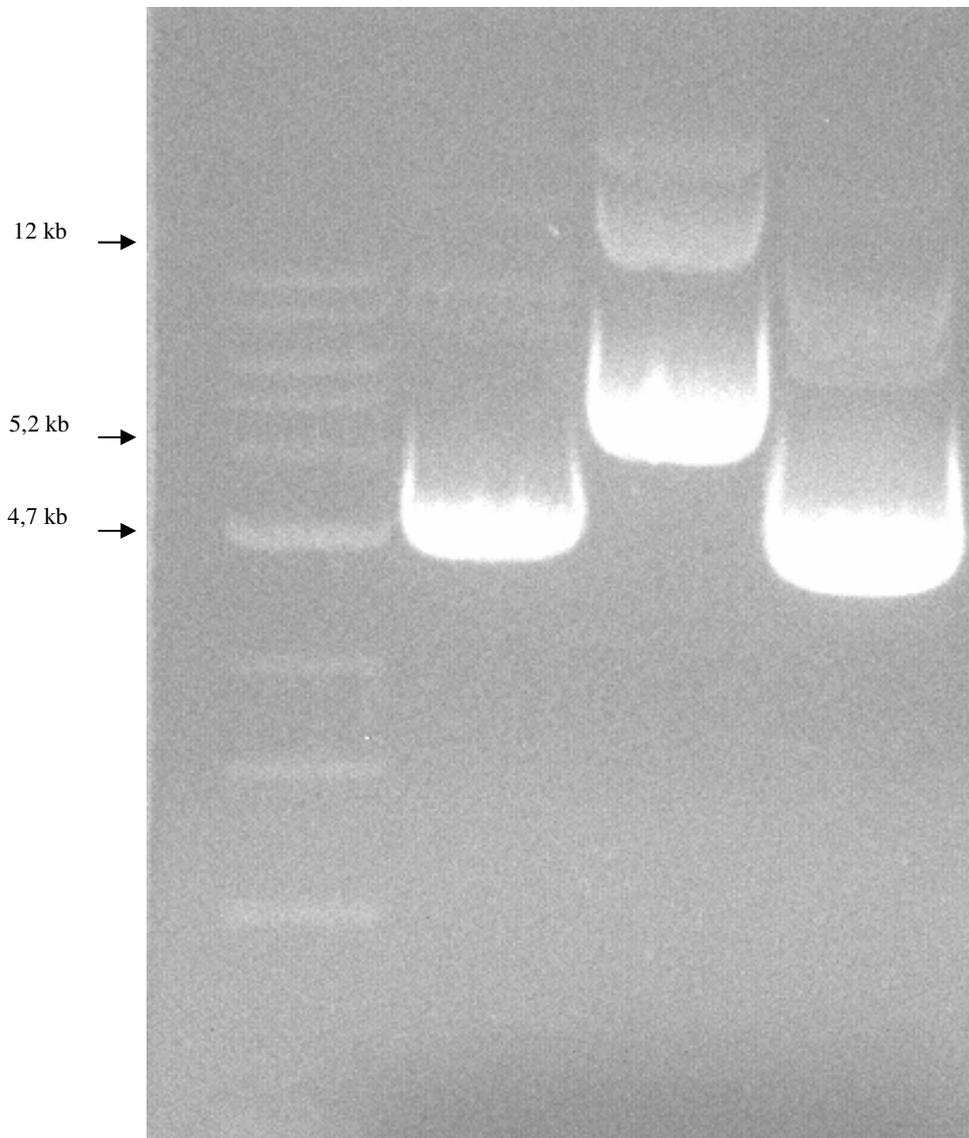
Para realizarmos os experimentos com transfecção dos linfócitos B, optamos por usar os plasmídeos pEGFP-C2 e pIRES-IL12, que codificam, respectivamente, a proteína fluorescente verde e a interleucina 12. Antes de transfectar os plasmídeos nos linfócitos B, verificou-se a integridade dos mesmos. A análise da eletroforese em gel de agarose (1%) mostrou que o pIRESvetor mostrou um perfil eletroforético correspondente a 4.9kb (Fig 1, pista B). Por outro lado, o pIRES-IL12 produziu uma banda de aproximadamente 5.2kb, (Fig 1, pista C) já o pEGFP-C2 mostrou perfil eletroforético correspondente 4.7kb, (Fig 1, pista D).

A

B

C

D

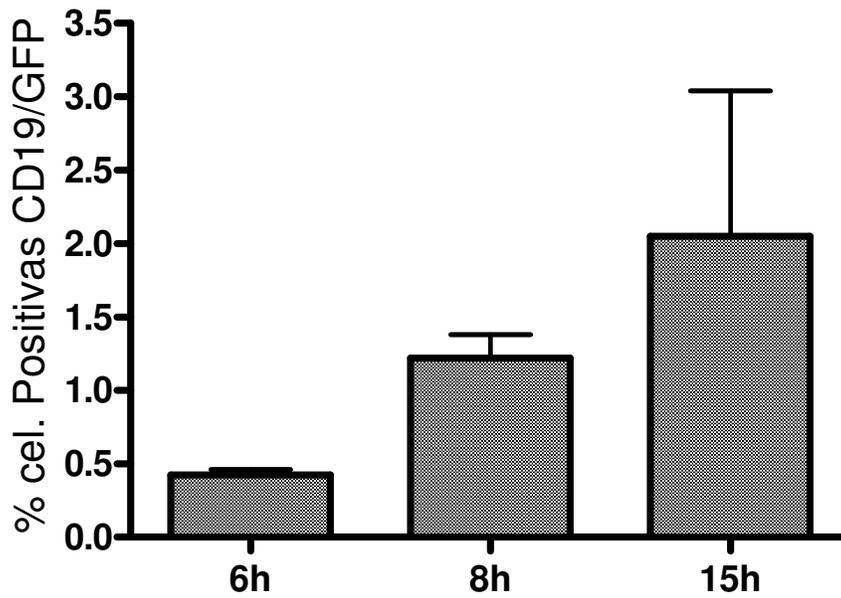


**Figura 1. Perfil eletroforético dos plasmídeos pIRES, pIRES-IL12 e pEGFP-C2.** Os plasmídios resultantes da purificação pelo kit da QUIAGEN™ foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo para a visualização das bandas. Pista **B**: pIRES; Pista **C**: pIRES-IL12; Pista **D**: pEGFP-C2 ; Pista **A**: Padrão de pares de bases, expresso em 1 Kb. As bandas foram visualizadas pela coloração com brometo de etídeo.

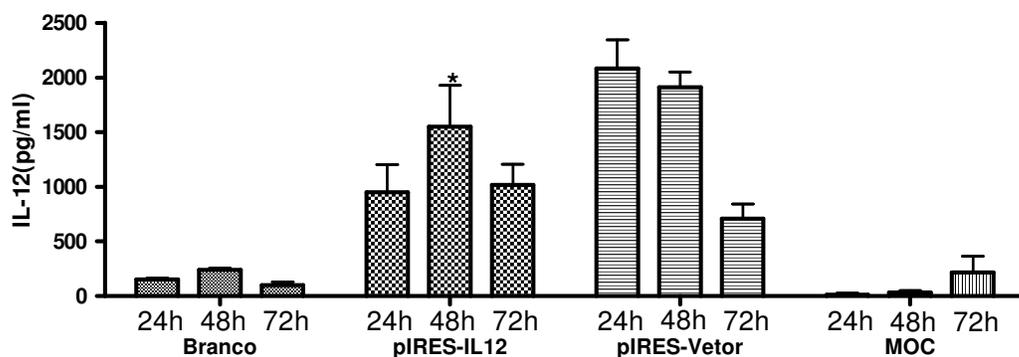
#### 4.2. Linfócitos B expressam proteínas recombinantes após a eletroporação

Os linfócitos B, obtidos por seleção negativa, foram usados nos experimentos com transfecção pelos plasmídeos pIRES, pIRES-IL12 e pEGFP-C2.

A primeira transfecção foi realizada pelo método de eletroporação e as células plaqueadas na concentração de  $1 \times 10^6$  em placas de 96 poços com fundo em U. Inicialmente, realizamos a cinética de expressão *in vitro*, usando o vetor que codifica a proteína fluorescente verde para validar nosso sistema. Como podem ser observados na Figura 2, os linfócitos B foram capazes de expressar essa proteína por um período de 15 horas em cultura. Nosso próximo passo foi, então, avaliar a cinética de produção da IL-12. A Figura 3 mostra que após a eletroporação com o plasmídeo que codifica a IL-12, foi possível detectar a presença dessa citocina nos linfócitos B transfectados, com pico de produção em torno de 48 horas. Esses resultados mostraram que os linfócitos B podiam ser transfectadas com vetores plasmidiais, codificando diferentes proteínas, sendo que neste sistema de eletroporação usando células de animais WT, os linfócitos B transfectados apenas com vetor também induziram algum nível de IL-12 (Figura 3).

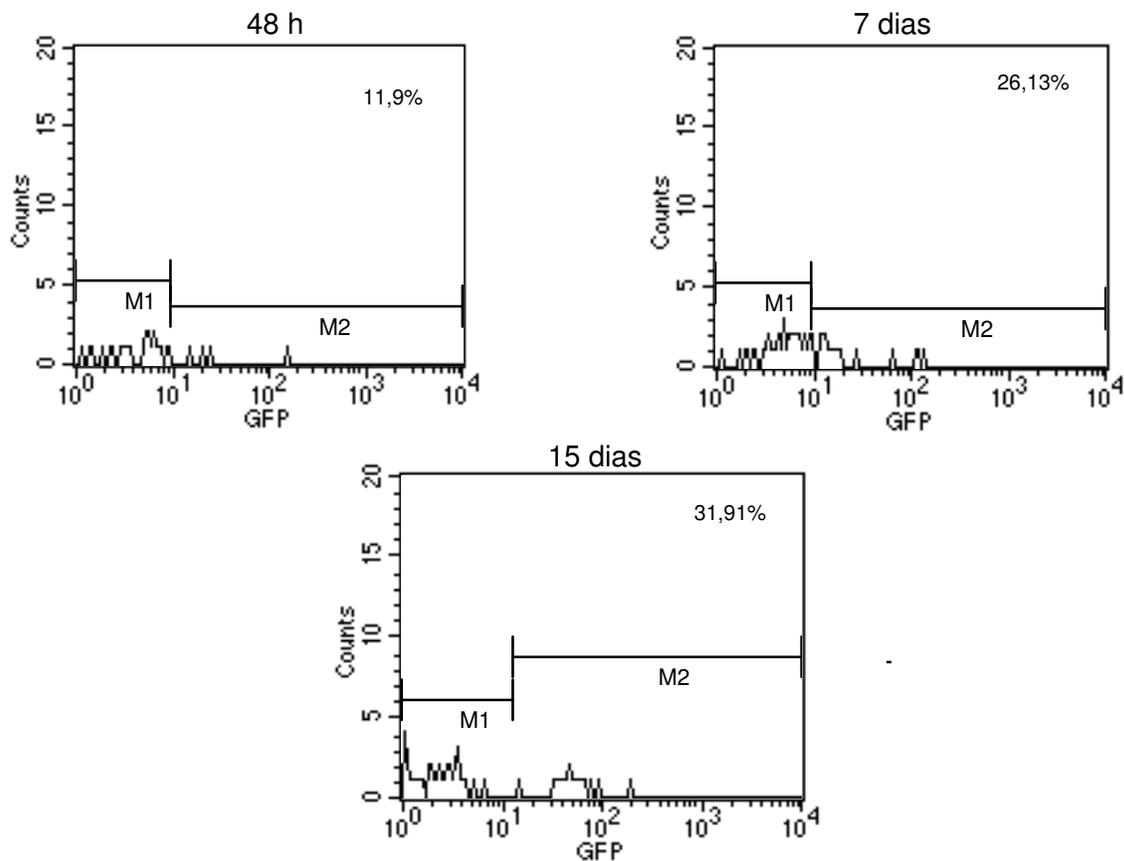


**Figura 2. Expressão de GFP em linfócitos B eletroporados com o plasmídio pEGFP-C2 -** Linfócitos B de animais WT foram eletroporados com o plasmídio pEGFP-C2, na concentração de 10 $\mu$ g plasmídios para cada 10<sup>6</sup> linfócitos B e colocados em cultura. Após os diferentes tempos, a presença de GFP em linfócitos B foi detectada por citometria de fluxo. Os ensaios foram repetidos 3 vezes.



**Figura 3. Dosagem de IL-12 em sobrenadante de culturas de linfócitos B eletroporadas.** Linfócitos B de animais WT foram eletroporados com o plasmídeo pIRES-IL12 ou vetor, na concentração de 10 $\mu$ g de DNA plasmidial para cada 10<sup>6</sup> células, e incubados em estufa de CO<sub>2</sub> a 37° C. Após diferentes períodos de incubação, o sobrenadante foi recolhido e a detecção de IL-12 realizada por ensaio imunoenzimático. Os resultados estão expressos em picogramas por mililitro (pg/ml). MOC representam os linfócitos B submetidos apenas ao processo de eletroporação. O asterisco indica p < 0,05 quando comparado ao grupo Branco. Os ensaios foram repetidos 3 vezes.

Uma vez que os linfócitos B produziam as proteínas *in vitro*, no caso da IL-12, também foi capaz de secretá-la, fomos avaliar a expressão das mesmas *in vivo*, usando, inicialmente, a expressão de GFP como modelo. Para certificarmos de que a produção da GFP era decorrente dos linfócitos B transfectados optamos por usar transferência para animais deficientes de linfócitos B. Como podem ser observados pela análise da Figura 4, os linfócitos B transferidos para animais deficientes de célula B, foram capazes de manter a expressão *in vivo* da GFP por até quinze dias após a transferência adotiva. Quarenta e oito horas após a transferência adotiva, 11,9 % dos linfócitos B expressavam a proteína GFP, enquanto que após 7 e 15 dias (26,13 e 31,91 % ) das células expressavam GFP, sugerindo a eficiência do modelo.

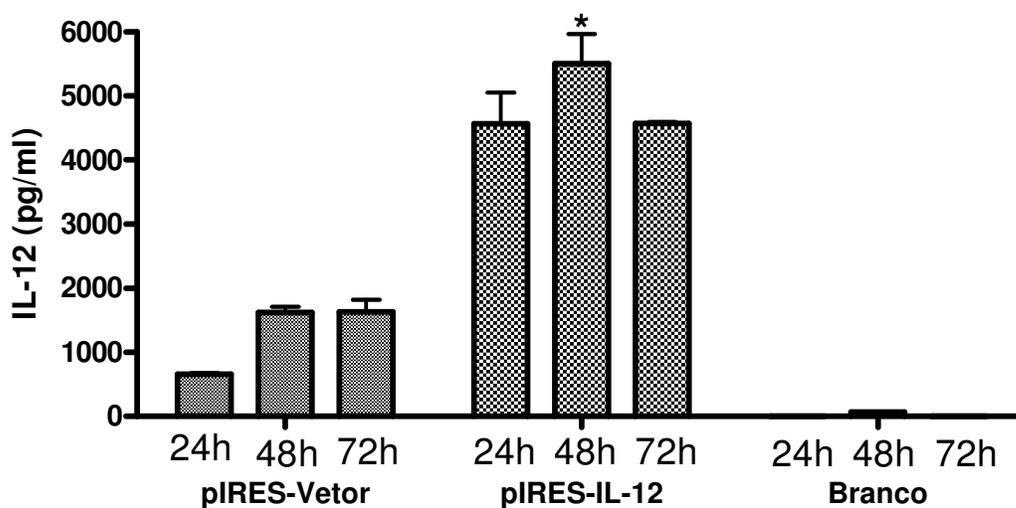


**Figura 4. Expressão de GFP em linfócitos B eletroporados com o plasmídeo pEGFP-C2.** Linfócitos B de animais WT foram eletroporados com o pEGFP-C2, na concentração de 10µg para cada 10<sup>6</sup> células. As células foram transferidas adotivamente para os camundongos deficientes de linfócitos B (BKO). Após diferentes períodos, indicados na figura, a presença de GFP em linfócitos B foi determinada por citometria de fluxo. Os ensaios foram repetidos 3 vezes.

#### 4.3. Transfecção de Linfócitos B por contato

Depois de comprovada a expressão heteróloga de proteínas pelos linfócitos B usando a técnica de eletroporação, decidiu-se fazer a transfecção por contato para observar se também por essa técnica era possível que linfócitos B capturassem o plasmídeo e expressassem a proteína. Os linfócitos B foram colocados em contato com os plasmídeos pIRES, pIRES-IL12, para a avaliação da produção da interleucina 12 (IL-12) por ELISA. A Figura 5 mostra que os linfócitos B produziam IL-12 vinte e quatro horas após a transfecção, com um pico de produção em quarenta e oito horas. A produção inespecífica de IL-12 pode ser observada nos animais cujas células foram transfectadas apenas com vetor. No entanto essa produção é bastante reduzida quando comparada aos dados de

eletroporação da fig. 3. Esses dados mostram que o aumento no nível de expressão da IL-12 foi decorrente da produção proveniente das células transfectadas com plasmídeo que codifica IL-12 e não de um efeito inesperado do CpG sobre os linfócitos B dos animais WT usados na transfecção. Assim, podemos sugerir que tanto o processo de eletroporação quanto o de contato é capaz de levar a transfecção de linfócitos B.

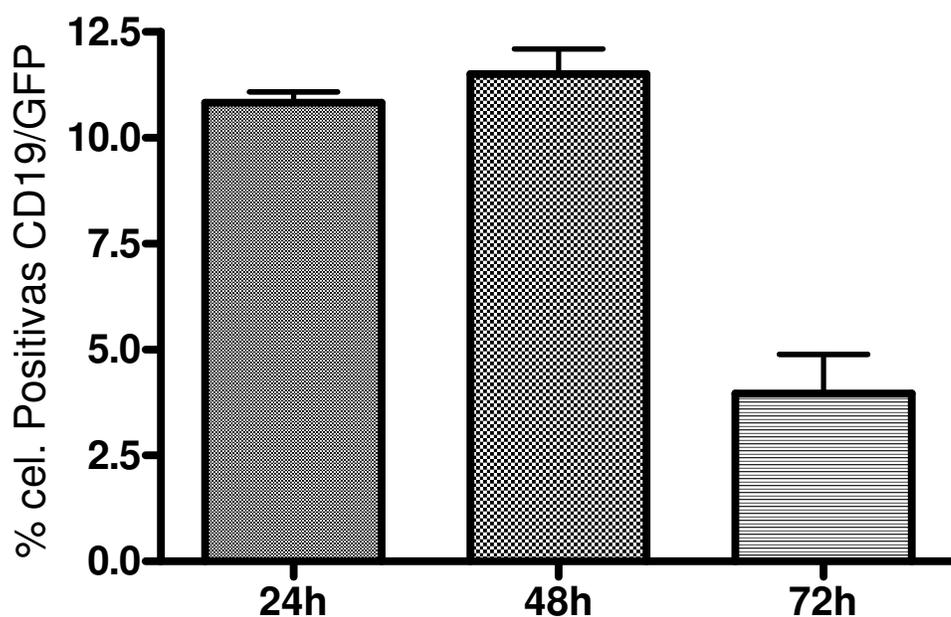


**Figura 5. Dosagem de IL-12 do sobrenadante de cultura de linfócito B após transfecção por contato com diferentes vetores.** Os Linfócitos B de animais selvagens foram purificados e colocados em cultura com plasmídeo pIRES-IL12 ou vetor por determinados períodos de tempo. Após cada período determinado, o sobrenadante era colhido e usado para detecção da citocina IL12 por ELISA. Branco representa linfócitos B não transfectadas. O Asterisco indica  $p < 0,05$  em relação ao grupo Branco e Vetor. Os ensaios foram repetidos 3 vezes.

#### 4.4. Linfócitos B de animais IL-12KO não produzem IL-12 após transfecção

Para excluir a participação da IL-12 endógenas do camundongo C57Bl/6, nós realizamos os mesmos experimentos em animais deficientes de IL-12 (IL-12 KO). De modo inesperado, os linfócitos B provenientes desses animais quando transfectados com o plasmídeo que codifica a IL-12 não induzia a produção dessa proteína *in vitro*. Para verificar se o fenômeno observado era restrito aos linfócitos B, realizamos transfecção em macrófagos peritoneais desses animais. Novamente não foi possível detectar níveis de IL-12 no sobrenadante de cultura, em nenhum dos tempos analisados (Dados não mostrados). Por outro lado, quando os linfócitos B de animais IL-12 KO eram transfectados com o plasmídeo pEGFP-C2, foi possível se detectar a expressão da proteína fluorescente verde nessas células (Figura 6), sugerindo que os linfócitos B dos animais deficientes de IL-12 estavam funcionais. Cabe ressaltar que obtivemos o mesmo resultado para IL-12, quando os experimentos foram realizados por eletroporação, excluindo a interferência do método

nesses resultados. A partir desses dados as análises usando o plasmídeo para IL-12 foram realizadas em linfócitos B de animais C57BL/6 WT.



**Figura 6. Detecção de GFP em linfócitos B de animais deficientes para IL-12 transfectados com pEGFP-C2.** Os linfócitos B provenientes de animais IL-12 KO foram purificados e colocados em cultura para transfecção, por contato, com o plasmídeo pEGFP-C2. Após diferentes períodos de tempo, as células foram recuperadas e a detecção da GFP determinada por citometria de fluxo. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

#### 4.5. Avaliação do processo de transfecção no fenótipo ou atividade de linfócitos B

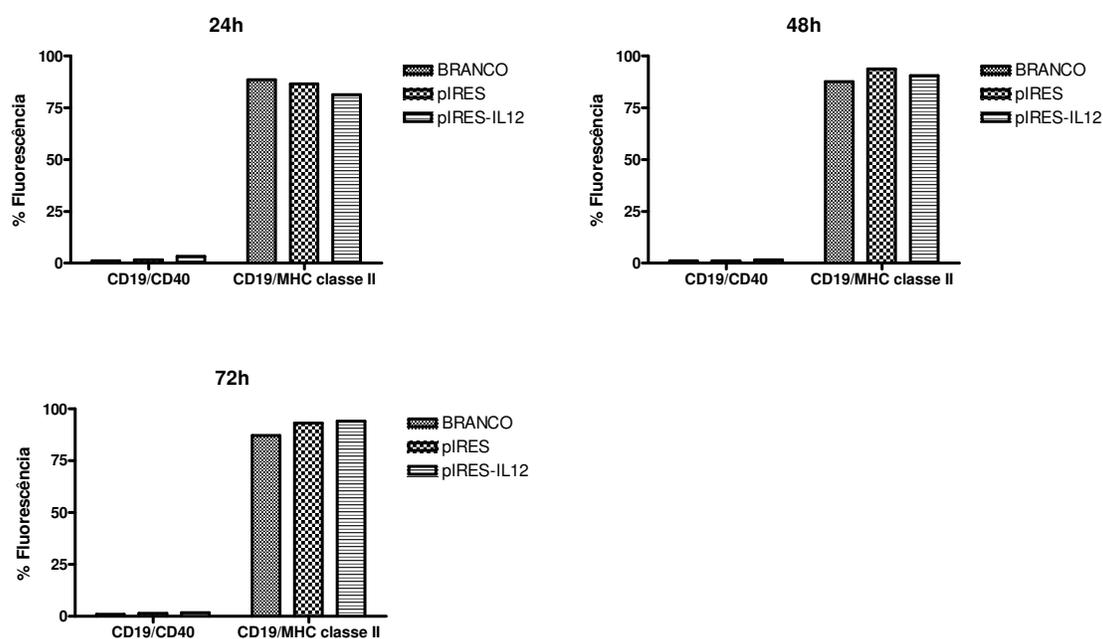
Para avaliar se o processo de transfecção podia levar a uma alteração fenotípica dessas células ou um comprometimento de suas funções, nós avaliamos o perfil de diferentes marcadores na superfície celular e a produção de anticorpos.

Inicialmente se avaliou *in vitro* a expressão das moléculas de ativação de linfócitos B, nos linfócitos transfectados com o plasmídeo contendo o gene da IL-12 e transferidos adotivamente para animais deficientes de linfócitos B (BKO). Como podemos observar pela análise da figura 7, não ocorreram modificações na expressão das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e CD40 após 72 horas.

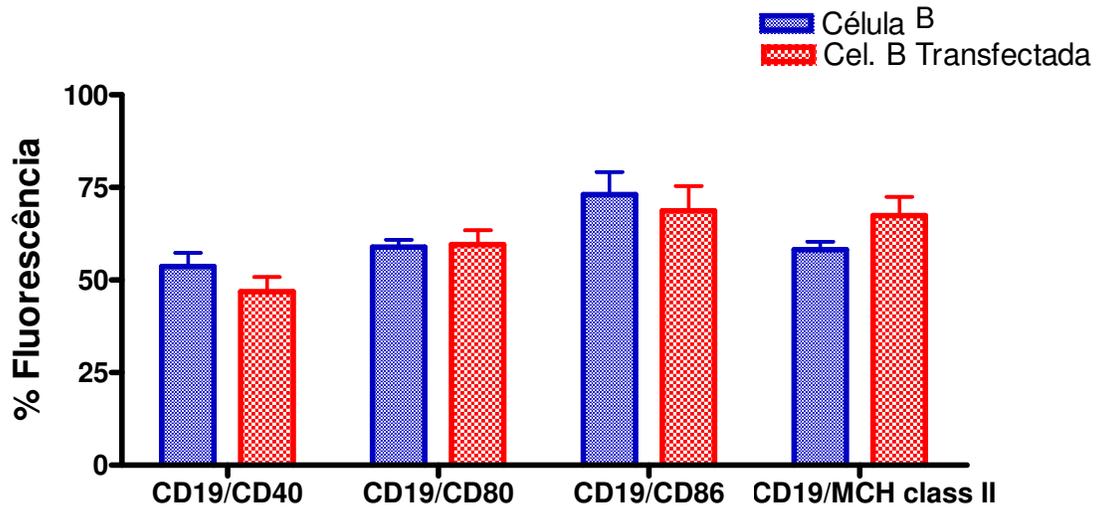
Para avaliar se *in vivo*, os linfócitos B transfectados também não alteravam seu fenótipo, realizamos transferência adotiva de linfócitos B transfectados ou não com o plasmídeo que codifica a IL-12 e o fenótipo das células transfectadas avaliados até 15 dias após a transfecção (Figuras 8 e 9, respectivamente). A análise das figuras 8 e 9 mostra que os linfócitos B transfectados não mostraram alteração do fenótipo com relação as moléculas do complexo principal de classe II, CD80, CD86 e CD40, quando comparados aos linfócitos

não transfectados. Esses dados sugerem que a transfecção de linfócitos B com DNA plasmideal não altera seu fenótipo de ativação mesmo *in vivo*.

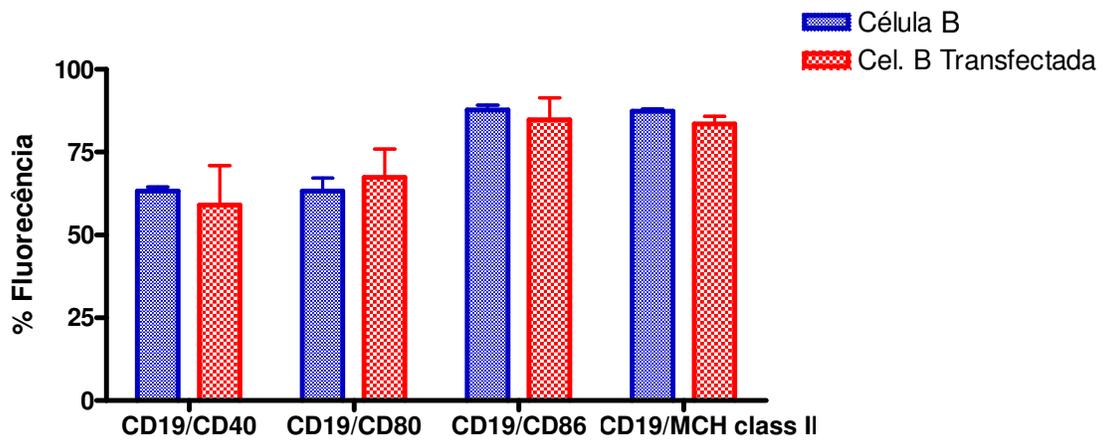
Outro parâmetro importante a ser avaliado foi à produção de anticorpos. Assim, após a transferência de linfócitos B transfectadas com plasmídeo IL-12, foi avaliado o nível de IgM e IgG totais no soro dos animais recipientes. A Figura 10 mostra que 20 dias após a transferência adotiva, não houve alteração nos níveis de IgG quando comparado aos animais que não receberam a transferência adotiva. Por outro lado, os níveis de IgM diminuem nos animais que receberam os linfócitos B.



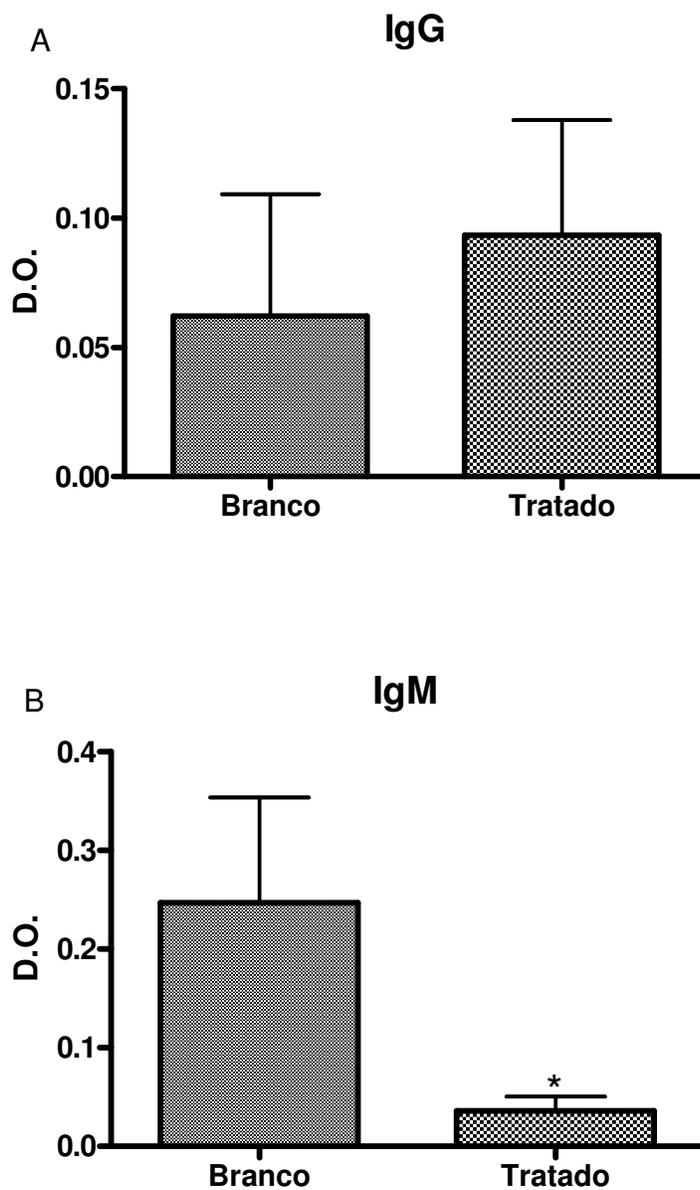
**Figura 7. Detecção da expressão moléculas de MHC classe II e CD40 em células B transfectadas com o plasmídeo pIRES-IL12, mantidas *in vitro*.** Linfócitos B, provenientes de camundongos C57BL/6 foram purificados e colocados em cultura com plasmídeo pIRES-IL12 ou com o vetor por diferentes período. Após os períodos indicados na legenda, a presença de moléculas de MHC de classe II ou CD40 foi determinada por análise por citometria de fluxo. Os gráficos são representativos de dois experimentos independentes. O gráfico representa a porcentagem de expressão das moléculas dada pela intensidade de fluorescência.



**Figura 8. Detecção da presença moléculas co-estimulatórias em linfócitos B sete dias após a transfecção com plasmídeo da IL-12.** Os linfócitos B de animais C57Bl/6 foram transfectados com o plasmídeo da IL-12 e as células transferidas adotivamente para camundongos BKO. A análise da expressão foi realizada sete dias após a transferência para: MHC classe II, CD40, CD80 e CD86. Os valores estão expressos em porcentagem de expressão dada pela intensidade de fluorescência. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.



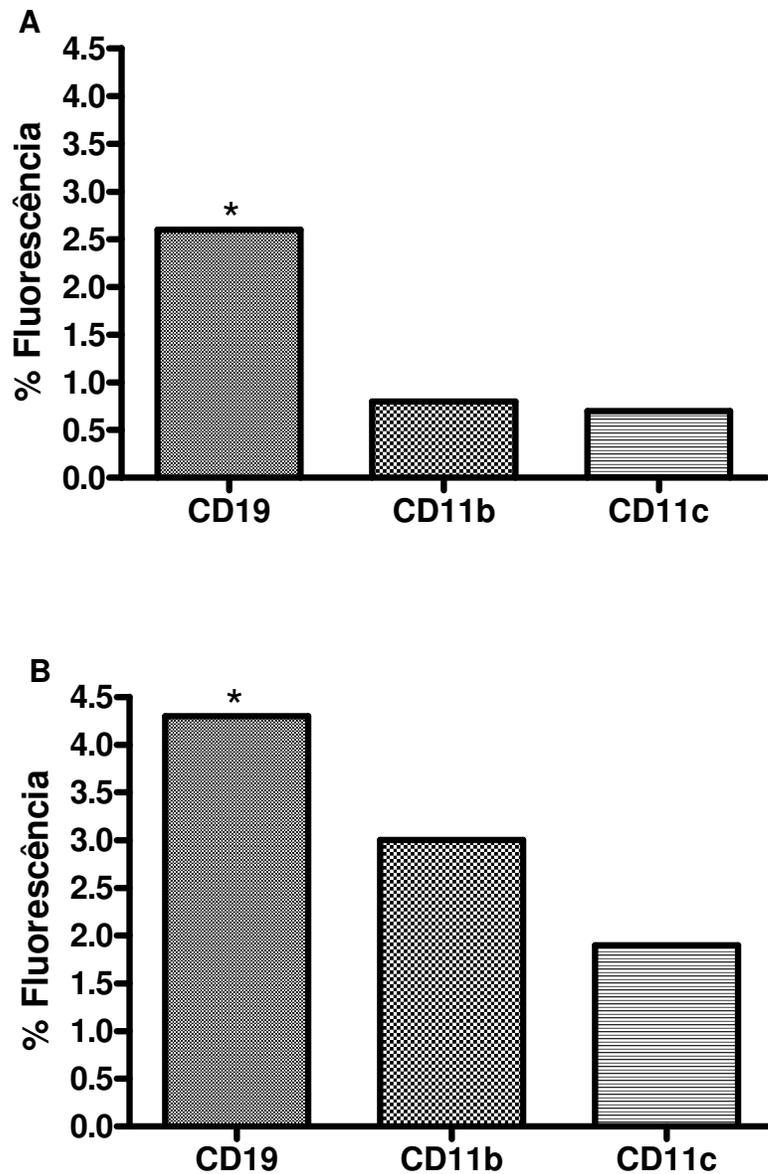
**Figura 9. Detecção da expressão de moléculas co-estimulatórias em linfócitos B quinze dias após a transfecção com o plasmídeo da IL-12.** Os linfócitos B de animais C57Bl/6 foram transfectados com o plasmídeo da IL-12 e as células transferidas adotivamente para os camundongos BKO. A análise da expressão foi realizada quinze dias após a transferência para: MHC classe II, CD40, CD80 e CD86. Os valores estão expressos em porcentagem de expressão dada pela intensidade de fluorescência. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.



**Figura 10. Detecção de IgM e IgG total em soro de animais transfectados com linfócitos B.** Linfócitos B transfectados com pIRES-IL12 foram transferidos adotivamente para camundongos IL-12 KO. Vinte dias após a transferência adotiva, o soro dos animais recipientes foram coletados e a detecção de IgG e IgM total avaliada por ELISA. Branco se refere ao animal que não recebeu transferência adotiva de células e tratado aos que receberam.

#### 4.6. Detecção de plasmídeo em outras subpopulações de células após a transferência adotiva.

Para avaliar se, após a transferência de linfócitos B contendo o plasmídeo pIRES-IL12, esse plasmídeo poderia ser liberado *in vivo* e capturado por outras células, nós avaliamos o *pool* de células do baço dos animais que receberam linfócitos B transfectadas em dois períodos de tempo. A figura 11 mostra que vinte quatro horas após a transferência adotiva, o DNA plasmidial estava presente quase que exclusivamente os linfócitos B, no entanto após 20 dias foi possível detectar uma pequena quantidade de plasmídios nas populações CD11b e CD11c.



**Figura 11. Detecção de DNA plasmidial *ex vivo* após a transferência adotiva de linfócitos B transfectados com pIRES-IL12.** O plasmídeo pIRES-IL12 marcado com ALEXA 488 foi transferido para linfócitos B de animais WT e posteriormente transferido adotivamente para animais deficientes IL-12. Vinte quatro horas (A) ou 20 dias (B) após a transferência, as células dos animais foram obtidas do baço e a presença de plasmídeo determinada por citometria de fluxo.

#### 4.7. Avaliação da eficiência dos linfócitos B transfectados em terapia gênica

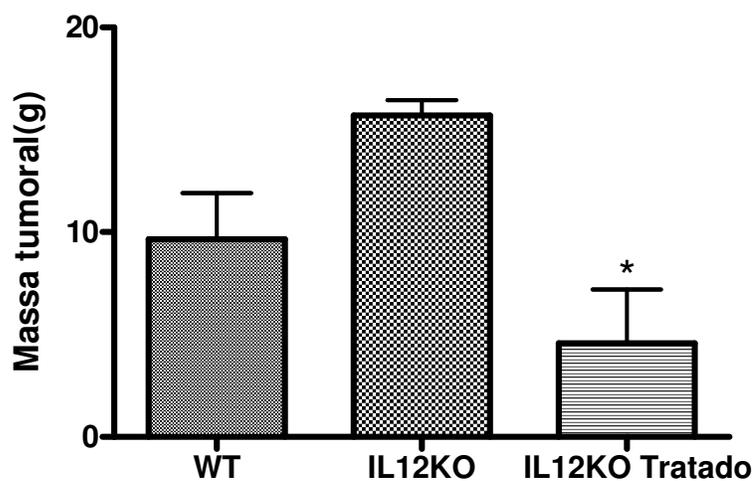
Com o objetivo de avaliar se os linfócitos B transfectados eram capazes de desempenhar algum papel *in vivo*, optamos por usar o modelo de melanoma murino. Dessa forma, quarenta e oito horas após a injeção subcutânea da linhagem tumoral B16F10, os animais recebiam intravenosamente  $1 \times 10^6$  linfócitos B transfectados com plasmídio da IL-12. Podemos avaliar pelo gráfico da Figura 12 que os animais que receberam células B transfectadas com o plasmídio da IL-12 mostraram uma redução da massa tumoral quando comparados aos animais selvagens ou deficientes de IL-12 que não receberam a transferência adotiva. Essa redução da massa tumoral foi estatisticamente significativa em relação aos animais IL12 KO sem transferência de células B com os que receberam.

A curva de sobrevivência (Figura 13) mostra que os animais deficientes de IL-12, mas que receberam linfócitos B transfectados com o plasmídio da IL-12 teve uma sobrevivência maior, quando comparado aos demais grupos. Os animais selvagens (WT) ou deficientes de IL-12 apresentaram curva de sobrevivência semelhante, morrendo por volta do dia 35 após o desafio.

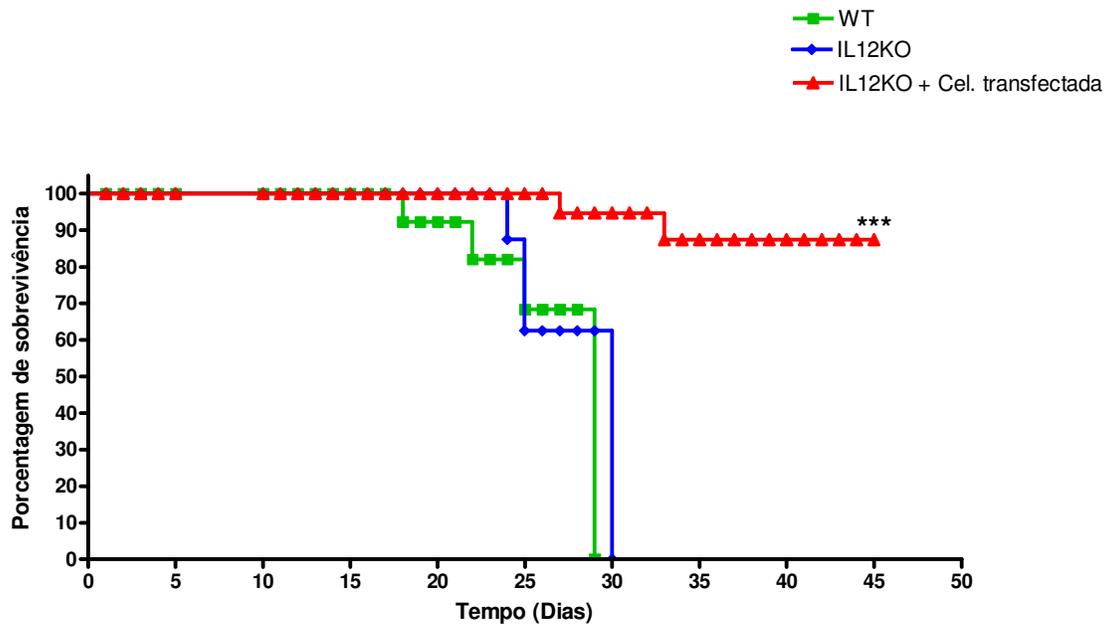
Para avaliar se a transferência de linfócitos B com plasmídio da IL-12 era capaz de induzir um recrutamento celular, a presença de subpopulações CD4, CD8 e NK intra-tumoral foi avaliada. A Figura 14 mostra que os animais que receberam linfócitos B transfectados com o plasmídio da IL-12 mostraram aumento estatisticamente significativo de todas as populações avaliadas quando comparados aos animais deficientes de IL-12. Além disso, o baço desses animais mostrou aumento na população NK e em linfócitos T CD4 e CD8 ativados (Figura 15). Em conjunto, esses dados sugerem que a transferência de

linfócitos B contendo plasmídio da IL-12 foi capaz de induzir a expressão desta citocina *in vivo*, cuja ação biológica foi capaz de controlar o desenvolvimento tumoral.

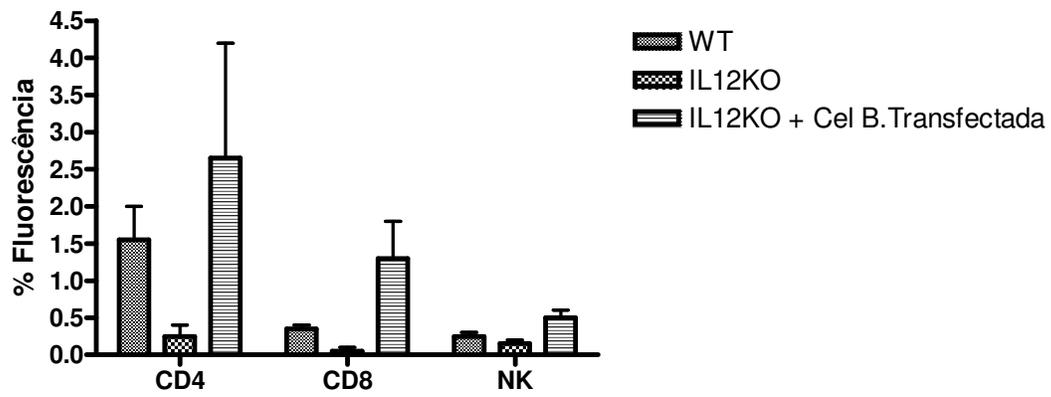
Os dados obtidos das análises histológicas do tumor corroboram nossos resultados prévios. É possível notar pela análise da Figura 16 que os animais que receberam os linfócitos B transfectadas mostraram ausência de células tumorais viáveis, ou seja células vivas, quando comparadas aos grupos sem tratamento. É possível se detectar um maior número de células tumorais em processo de necrose isquêmicas e células tumorais com núcleo retraído sugestivo de apoptose nos animais que receberam linfócitos B transfectadas com IL-12.



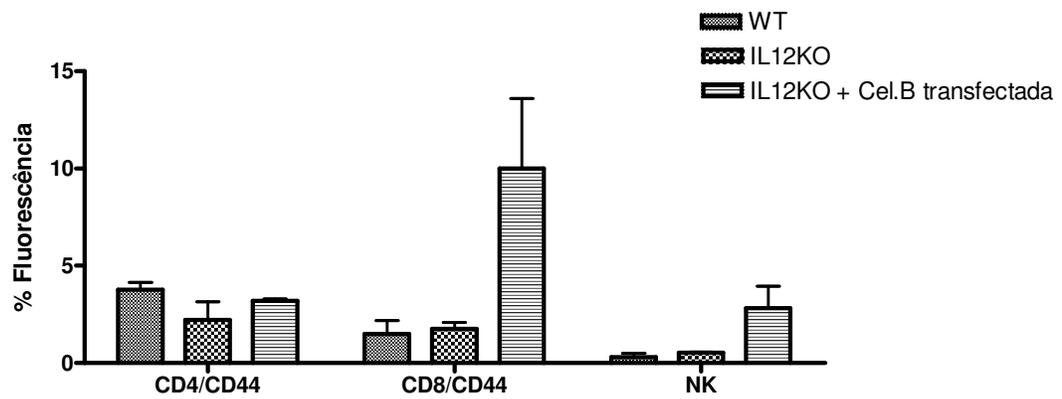
**Figura 12. Determinação da massa tumoral em animais portadores de melanoma que receberam transferência adotiva de linfócitos B codificando IL-12.** A massa tumoral foi obtida de cada animal no momento do óbito, ou do sacrifício. O material recolhido foi pesado e a massa expressa em gramas. O asterisco indica  $p < 0,05$  quando comparado grupo IL- 12 KO e IL-12 KO que receberam linfócitos B transfectadas plasmídeo que codifica a IL-12.



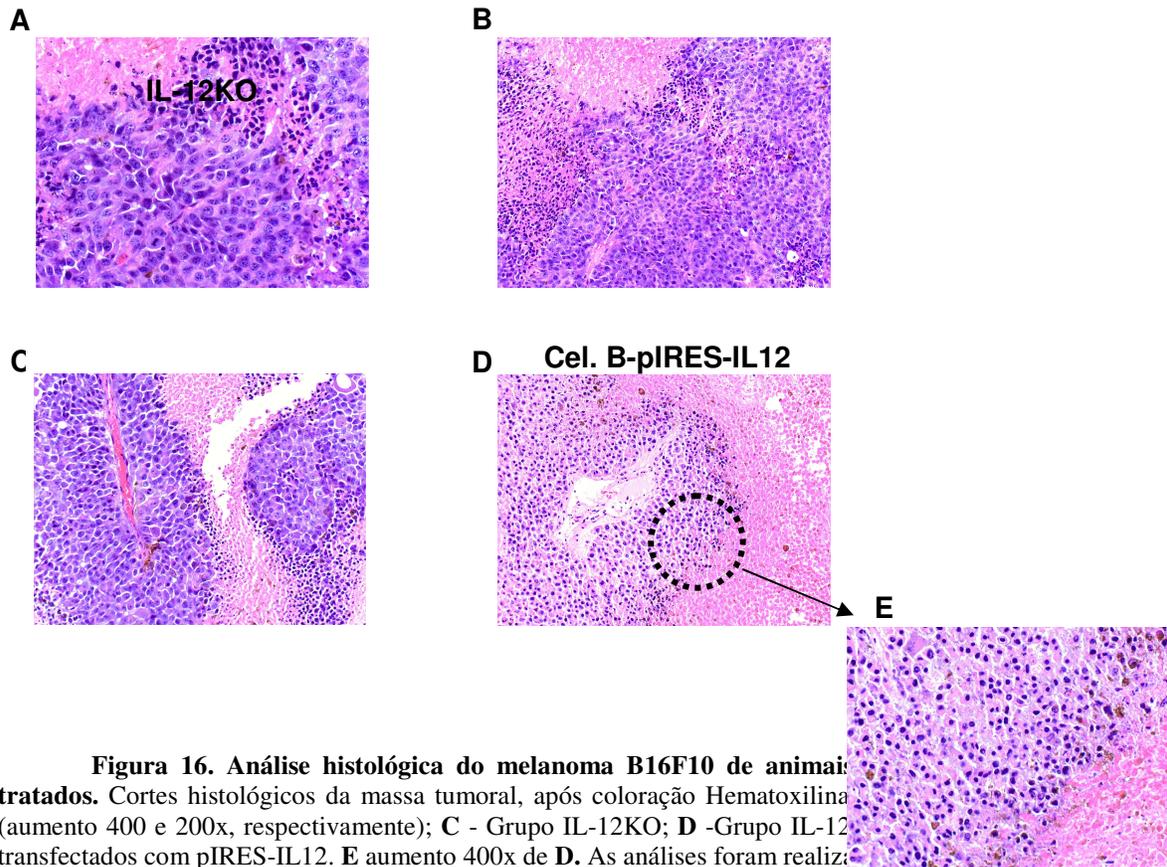
**Figura 13. Sobrevida dos animais desafiados com o melanoma B16F10.** Após o desafio com melanoma, os animais receberam ou não linfócitos B de animais WT transfectadas com plasmídeo da IL-12. O asterisco indica  $p < 0,05$  quando comparado ao grupo IL12KO e WT.



**Figura 14. Porcentagem do fenótipo das populações celulares obtidas do melanoma B16F10.** Após os diferentes tratamentos, o tumor foi obtido de cada grupo, e as subpopulações presentes no tecido intra-tumoral detectados por citometria de fluxo.



**Figura 15. Porcentagem do fenótipo das populações celulares presentes no baço de animais portadores de melanoma B16F10.** Células do baço de animais selvagens, deficientes de IL-12 e deficientes de IL-12 que receberam a transferência adotiva de linfócitos B foram divulsionadas e submetidas à análise por citometria de fluxo para detecção das subpopulações celulares indicadas.



**Figura 16. Análise histológica do melanoma B16F10 de animais WT e IL-12KO.** Cortes histológicos da massa tumoral, após coloração Hematoxilina e Eosina (aumentos de 400 e 200x, respectivamente); **C** - Grupo IL-12KO; **D** - Grupo IL-12 transfetado com pIRES-IL12. **E** aumento 400x de **D**. As análises foram realizadas em animais WT e IL-12KO.

## 5. DISCUSSÃO

Esse trabalho mostra, pela primeira vez, a utilização de linfócitos B como uma ferramenta em terapia gênica, sendo capaz de levar a expressão *in vivo* de uma molécula biologicamente ativa. Os resultados discutidos abaixo abrem perspectivas para a aplicação de linfócitos B em modelos de terapia gênica.

A terapia gênica saiu de modelos experimentais para ensaios clínicos, quando o grupo do Dr. William French Anderson realizou a primeira transferência de leucócitos totais transfectados com gene da proteína adenosina deaminase (ADA) para um paciente que sofria com a imunodeficiência severa combinada (SCID) (CULVER K. *et al.*, 1991; ROSENBERG L.E.. 1990; BLAESE *et al.*, 1995; FLOTTE, T.R. 2007). Com novos ensaios e aplicações a terapia gênica se mostrou eficaz não só contra doenças de caráter hereditário, mas também contra doenças infecciosas, sendo essa última abordagem mais recente. Um ponto crucial para sucesso da terapia gênica é a escolha de vetores para se efetuar a transferência gênica. Os mais comuns são os vetores virais, tais como o retrovírus, o adenovírus e o adenovírus-associado; os vetores plasmidiais com promotor eucariótico também são amplamente utilizados em diferentes modelos (JANG, J.H. *et al.* 2007; LYON, A.R. *et al.* 2008), como no caso de leishmaniose, tripanossomíase, raiva e tuberculose, .

Algumas doenças já são alvo de ensaios clínicos utilizando *Stem-cell* transfectadas com gene da proteína de interesse como o caso da distrofia muscular de Duchenne, no qual se tenta corrigir a distrofina mutada que gera a doença ou a transferência do gene da proteína CTRF na fibrose cística (DEL VECCHIO, F. *et al.* 2005). Outro alvo interessante

tem sido transfectar *stem-cell* com gene que codificam as proteínas do fator 8 e do fator 9 da cascata de coagulação, visando o tratamento em pacientes hemofílicos (ZUBLER, R.H. 2006; HIGH, K. A.2003; ZALDUMBIDE, A e HOEBEN, RC. 2007).

Com base nestes dados realizamos um desenvolvimento baseado na transfecção de linfócitos B. A primeira evidência que linfócitos B eram capazes de capturar DNA plasmidial foi observada por Coelho-Castelo e col, (2003), após a vacinação intramuscular de camundongos com DNA plasmidial. Isso nos motivou a avaliar o papel dos linfócitos B em terapia gênica como transportadoras de genes para a expressão *in vivo*.

Para verificar a capacidade dos linfócitos B em produzir proteínas heterólogas usamos um gene repórter que codifica a proteína fluorescente verde (GFP), para obtermos alguns parâmetros iniciais. Dessa forma, os experimentos de padronização *in vitro* e *in vivo*, usaram células transfectadas com GFP. Posteriormente, para avaliar o real papel da transferência gênica em linfócitos B, optamos por usar o gene que codifica a citocina IL-12, uma vez que a mesma está envolvida em controle de diferentes doenças, tornando mais fácil a escolha de um modelo para avaliar a atividade biológica da proteína escolhida.

Nosso primeiro ensaio foi transfectar os plasmídios da GFP por eletroporação em linfócitos B de animais C57Bl/6 (WT). A expressão da GFP nos linfócitos foi monitorada *in vitro* por 15h (Figura 2), mostrando que o processo de transfecção era eficaz e linfócitos B submetidos a esse processo eram capazes de expressar a proteína heteróloga. Passamos, então, para a transfecção dos linfócitos B provenientes de animais deficientes da interleucina 12 (IL-12 KO) com o plasmídio que codifica essa citocina, visando a reconstituição da expressão dessa molécula nessas células. Porém, de forma surpreendente, as células provenientes dos animais IL-12 KO não produziam a IL-12, após a transfecção. Os animais IL-12 KO utilizados, foram obtidos do “Jackson Laboratory” cujo genótipo foi

alterado para não produzir a cadeia p40 da IL-12 (cadeia induzida após ativação; a p35 é constitutiva). Não achamos nada na literatura que desse suporte ao fenômeno observado, uma vez que o plasmídeo usado expressa duas cadeias p35 e p40 da IL-12, necessárias para a formação do heterodímero completo. Essas análises foram repetidas exaustivamente, usando linfócitos B ou macrófagos sempre com resultados negativos (dados não mostrados). Esse dado nos faz levantar a hipótese de que durante a construção do IL-12 KO houve a inserção de algum mecanismo de controle adicional que impede a produção da cadeia p40, uma vez que os linfócitos B de IL-12 KO produzem GFP (Figura 6). Assim, passamos a utilizar linfócitos B de animais selvagens (WT) nas transfecções. Sabendo que essas células têm a molécula da IL-12 funcional, nossa preocupação foi avaliar a possível influência da produção endógena de IL-12. Para isso consideramos como produção de IL-12 endógena, após a transfecção, aquela dada pelas células transfectadas apenas com vetor, usando eletroporação ou captura por contato (Figura 3 e 5, respectivamente). O processo de eletroporação mostrou uma produção de IL-12 após estímulo com vetor semelhante ao plasmídeo-IL12. Isso não foi observado quando a captura foi realizada por contato (Figura 5), sugerindo que o processo de eletroporação pode ocasionar alguma alteração adicional na célula levando a produção da IL-12 endógena. De fato, a ativação de células do sistema imunitário por motivos CpG, presentes na estrutura do vetor plasmídeo, ativa cascata de sinalização que culmina com a produção de IL-12 sendo a ligação dos CpGs em TLR9 (GURANATHAN, S. *et al.* 2000; WANG, *et al.* 2007). Os resultados obtidos pela captura por contato mostraram serem menos drásticos, favorecendo assim a visualização da IL-12 transfectadas em linfócitos B. Desse modo, optamos por dar continuidade aos experimentos usando a transfecção por contato.

Para avaliar se a transferência adotiva de linfócitos B levaria a uma expressão da proteína *in vivo*, foi realizada a transferência adotiva de linfócitos B de animais WT transfectadas com GFP para animais deficientes em linfócitos B, BKO. Dessa forma os linfócitos B analisados eram todas decorrentes da transferência adotiva. Houve expressão da GFP em linfócitos B por até 15 dias (Figura 4), sugerindo que os linfócitos B após transferência adotiva não perdiam a capacidade de produzir a proteína recombinante.

Uma vez que o sistema de linfócitos B parecia promissor fomos avaliar se a transferência de plasmídeo não poderia levar a alteração de fenótipo tornando-a ativada, uma vez que visávamos apenas analisar o papel dos linfócitos B na produção heteróloga de proteínas *in vivo*. São prováveis que linfócitos B transfectados possa ser utilizados como células apresentadoras de antígenos para estímulo do sistema imunológico como nos modelos de células dendríticas (KYTE, J. A. e GAUDERNACK, G. 2006). Optamos por avaliar a presença de moléculas co-estimulatórias ou que participem na indução da resposta imunitária para avaliar o fenótipo dos linfócitos B após transfecção ([Dallman, C. et al. 2003](#)). Tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o fenótipo das células não sofreu alteração (Figuras 7, 8 e 9), indicando que os linfócitos B usadas após transfecção não mostravam fenótipo de ativação e, conseqüentemente, não sendo capaz de ativar o sistema imunitário de uma forma inespecífica.

Como uma das principais funções dos linfócitos B é a produção de imunoglobulinas (ABBAS A. K. e LICHTMAN, A. H. 2008), qualquer estratégia que vise o uso dessas células tem que levar em consideração as prováveis alterações nesse mecanismo. Nossos resultados mostraram que a dosagem de IgG total no soro dos animais que receberam linfócitos B transfectadas com plasmídeo da IL-12 não mostraram diferença estatisticamente significativa quando comparado aos animais WT. Por outro lado, houve

uma diminuição de IgM observada 20 dias após a transferência adotiva de linfócitos B. Uma hipótese para explicar tal fato pode ser devido a própria ação da IL-12 heteróloga, liberada *in vivo*, a IL-12 influencia a produção de interferon gama (INF- $\gamma$ ), assim havendo troca de isotipo para IgG2a em murinos. Como foi dosado os níveis de IgG total, essa diferença não pode ser detectada em nossos ensaios.

Uma vez que nosso objetivo foi usar linfócitos B como veículo para expressão homóloga *in vivo*, outra questão a ser respondida diz respeito à captura do plasmídeo por outras células, após a transferência adotiva. Para avaliar tal ponto, os linfócitos B foram transfectadas com o DNA plasmidial marcado com AlexaFluor 488 e as células transferidas para animais WT. Embora as principais células portadoras do DNA plasmidial foram linfócitos B, pode-se observar que após 20 dias *in vivo*, outras células como CD11b e CD11c também mostravam marcação para o plasmídeo, sugerindo que as mesmas foram capazes de capturar o DNA plasmidial (Figura 11). Esses resultados sugerem que a veiculação de DNA plasmidial através de linfócitos B pode levar a ativação e/ou captura de outras células apresentadoras de antígenos, provavelmente após a morte dessas células. Embora os linfócitos B *naive* apresentem uma meia vida de 5 a 7 dias, não podemos excluir uma permanência maior das células transfectadas *in vivo*, o que refletiria os resultados mostrados na Figura 11, onde a maior porcentagem de plasmídeo, está em células CD19<sup>+</sup>. No entanto, como após 20 dias observa-se um aumento na população CD19<sup>+</sup> com marcação para o DNA plasmidial, podemos sugerir que linfócitos B do animal WT também capturaram o DNA plasmidial quando o mesmo foi liberado *in vivo*. Do ponto de vista da indução da resposta imunológica, esse mecanismo pode contribuir para a amplificação da molécula a ser apresentada para ativação do sistema imunológico. Além disso, a captura por outras células pode manter a expressão do antígeno *in vivo*, mesmo depois da morte dos

linfócitos B, após determinados períodos de tempo, com a morte dos linfócitos B, o plasmídeo liberado pode ser capturado por outras células. Em geral, quando o DNA plasmídeo é injetado na sua forma nu, ou encapsulado em diferentes formulações pode ser capturado por diferentes células do sistema imune (COELHO-CASTELO A. A. M. *et al.* 2003; TAHARA, K. *et al.* 2007). Com relação ao inóculo de células dendríticas isso ainda não foi determinado. O principal enfoque no uso de células dendríticas é na ativação do sistema imune, através de apresentação de antígenos. Nesses modelos as células dendríticas recuperadas de um paciente, e/ou diferenciadas *in vitro*, são eletroporadas com antígenos tumorais ou vetores virais que codificam antígenos tumorais específicos (BARBUTO, J. A. *et al.* 2004; YONEMITSU, Y. *et al.* 2008).

Desde que os linfócitos B se mostraram eficientes na produção de proteínas heterólogas tanto *in vitro* como *in vivo*, fomos avaliar o papel dessas células transfectadas com o plasmídeo da IL-12 no desenvolvimento de melanoma murino da linhagem B16F10. Os animais que receberam a transferência adotiva de linfócitos B portadora do plasmídeo da IL-12 mostraram uma redução da massa tumoral, quando comparado aos animais selvagens ou IL-12 *knockouts*. Além disso, a sobrevida nos animais transfectados com linfócitos B contendo gene da IL-12 mostraram uma sobrevida superior aos demais grupos. Os animais selvagens e IL-12 deficientes mostraram curva de sobrevida semelhante (Figuras 12 e 13, respectivamente). Em conjunto, esses resultados sugerem que o efeito biológico observado seja dependente da IL-12 produzida pelos linfócitos B transferidos, uma vez que os animais selvagens passam a ter linfócitos B capazes de produzir IL-12 após o desafio tumoral. Curiosamente, embora os animais IL-12 deficientes apresentaram um aumento significativo da massa tumoral a curva de sobrevivência foi similar ao animal selvagem. Isso sugere que os animais selvagens possam estar produzindo baixos níveis de IL-12 quando comparado

aos animais que receberam linfócitos B transfectadas. Os dados histológicos corroboram essas análises. Os animais selvagens mostraram um maior número de células viáveis, enquanto que nos deficientes de IL-12 a presença de células tumorais em necrose isquêmicas já era maior. Por outro lado, nos animais reconstituídos de IL-12 a quantidade de células tumorais em necrose isquêmicas, com núcleo pequeno, sugestivo de apoptose foi bem menor (Figura 16). O papel de IL-12 no controle do desenvolvimento tumoral já é bem estabelecido. No entanto, os animais deficientes de IL-12 utilizados, são deficientes da cadeia p40 da molécula, como já mencionado. Essa cadeia é compartilhada com a cadeia p19 da IL-23. Dessa forma os animais deficientes de IL-12 também são deficientes de IL-23 (BETTELLI, E. e KUCHOROO, V. K. 2005). A IL-23, por sua vez, está envolvida com a indução de linfócitos T CD4 do tipo TH17 secretores de IL-17, uma citocina pró-inflamatória. (AGGARWAL, S. *et al.* 2003). Talvez a ausência de duas citocinas importantes nesses animais, a que determina um padrão Th1 de resposta e outra com padrão pro- caracteristicamente inflamatório com aumento dos níveis de IL-1 e IL-6, respectivamente tenham levado a um maior dano tecidual. Por outro lado, a adição de linfócitos B expressando IL-12, nos animais IL-12 KO, foi capaz de aumentar a sobrevivência e o controle tumoral. É possível que a presença da cadeia p40 possa ter induzido a expressão de IL-23 e, conseqüentemente, de IL-17 nesses animais, resultado no fenótipo observado. Alguns trabalhos mostram correlação entre ausência de IL-23 e aumento do crescimento tumoral, corroborando nossa hipótese (LANGOWSKI, J. L. *et al.* 2006). A análise dos linfócitos infiltrantes do tumor (Figura 14) ou daqueles presentes no baço (Figura 15) mostram que a reconstituição dos animais IL-12 deficientes via transferência adotiva de linfócitos B- IL-12 mostrou um aumento da população T CD4, CD8 e NK quando comparados aos controles. Esses dados sugerem que a reconstituição com a IL-12 foi

eficiente em recrutar células intra-tumorais que possivelmente atuem no controle do mesmo. É possível que tanto IL-23 quanto IL-17 esteja envolvida. A participação de linfócitos T CD8 e NK infiltrantes na massa tumoral pode ser considerada um bom prognóstico na evolução humoral (BAJETTA, E. *et al.* 1998; MONTARINE, R. *et al.* 2000). De qualquer modo, nossos dados não nos permitem excluir que os linfócitos B também possam ter participado como APC nesse modelo.

Tomados em conjunto, nossos resultados mostraram que linfócitos B podem ser uma estratégia de escolha para uso em terapia gênica, carreando genes para expressão in vivo, que mantêm sua atividade biológica. Os processos de transfecção não interferem com o fenótipo dos linfócitos B usados. Esses dados são inovadores e abrem perspectivas para novas aplicações de linfócitos B em terapia gênica.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho nos permitem concluir que:

- Linfócitos B transfectados podem levar a produção in vivo de proteínas heterólogas biologicamente ativas, podendo ser uma nova ferramenta em Terapia Gênica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. E LITCHMAN, A. H. *Imunologia celular e molecular*. **Ed. Elsevier**. 6º edição. 2007.

AGGARWAL, S.; GHILARDI, N.; XIE, M. H.; DE SAUVAGE, F.J.; GURNEY, A.L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. J Biol Chem. Vol. 278: p. 1901-1904, 2003.

ANDERSON, E. J. R.; MCGRATH, M. A.; THALHAMER, T.; MCINNES, I. B. Interleukin-12 to interleukin 'infinity': the rationale for future therapeutic cytokine targeting. **Springer Semin Immun**. vol. 27: p.425-442. 2006.

BAJETTA, E.; DEL VECCHIO, M.; MORTARINI, R.; NADEAU, R.; RAKHIT, A.; RIMASSA, L.; FOWST, C.; BORRI, A.; ANICHINI, A.; PARMIANI, G. Pilot study of subcutaneous recombinant human interleukin 12 in metastatic melanoma. Clin Cancer Res. vol.4: p. 75-85. 1998.

BAJETTA, E.; DEL VECCHIO, M.; MORTARINI, R.; NADEAU, R.; RAKHIT, A.; RIMASSA, L.; FOWST, C.; BORRI, A.; ANICHINI, A.; PARMIANI, G. Pilot study of subcutaneous recombinant human interleukin 12 in metastatic melanoma. Clin Cancer Res. Vol.1: p.75-85. 1998.

BARBELLIDO, S. A.; TRAPERO, J. C.; SÁNCHEZ, J. C.; GARCÍA, M. A. P.; CASTAÑO, N. E.; MARTÍNEZ, A. B. Gene therapy in the management of oral cancer: **Review of the literature**. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. Vol.13: p.15-21. 2008.

BARBUTO, J.A.; ENSINA, L.F.; NEVES, A.R.; BERGAMI-SANTOS, P.; LEITE, K.R.; MARQUES, R.; COSTA, F.; MARTINS, S.C.; CAMARA-LOPES, L.H.; BUZUID, A.C. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. Cancer Immunol Immunother. Vol.53: p.1111-1118. 2004.

BAUM, C.; DU'LLMANN, J.; LI, Z.; FEHSE, B.; MEYER, J.; WILLIAMS, D.A.; VON KALLE, C. Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. **BLOOD**, n. 6 v.101: p. 2099 - 2114. 2003.

BETTELLI, E. E KUCHROO, V. K. IL-12 and IL-23 induced T helper cell subsets: birds of the same feather flock together. **JEM**. Vol. 201, n. 2: p. 169-171, 2005.

BLAESE RM, CULVER KW. Prospects for gene therapy of human disease. **Allergol Immunopathol (Madr)**, n.1 vol 19: p.25-28. 1991.

BLAESE, R.M.; CULVER, K.W.; MILLER, A.D.; CARTER, C.S.; FLEISHER, T.; CLERICI, M.; SHEARER, G.; CHANG, L.; CHIANG, Y.; TOLSTOSHEV, P.; GREENBLATT, J.J.; ROSENBERG, S.A.; KLEIN, H.; BERGER, M.; MULLEN, C.A.; RAMSEY, W.J.; MUUL, L.; MORGAN, R.A.; ANDERSON, W.F. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. **SCIENCE**, n.5235 vol.270: p.475-480. 1995.

BRELOER, M.; KRETSCHMER, B.; LÜTHJE, K. EHRLICH, S.; RITTER, U.; BICKERT, T.; STEEG, C.; FILLATREAU, S.; HOEHLIG, K.; LAMPROPOULOU, V.; FLEISCHER, B. CD83 is a regulator of murine B cell function in vivo. **Eur. J. Immunology**, vol.37: p.634-648. 2007.

BROEDL, U.C. & RADER, D.J. Gene therapy for lipoprotein disorders. **Expert Opinion on Biological Therapy**, n. 8 vol. 5: p. 1029-1038. 2005.

CARTER, K. C.; HENRIQUEZ, F. L. ET AL. DNA vaccination against the parasite enzyme gamma-glutamylcysteine synthetase confers protection against Leishmania donovani infection. **Vaccine**, vol. 25 n.22: p. 4502-4509. 2007.

CEPPI, M.; DE BRUIN, M. G. M.; SEUBERLICH, T.; BALMELLI, C.; PASCOLO, S.; RUGGLI, N.; WIENHOLD, D.; TRATSCHIN, J. D.; MCCULLOUGH, K. C.; SUMMERFIELD, A. Identification of classical swine fever virus protein E2 as a target for cytotoxic T cells by using mRNA-transfected antigen-presenting cells. **Journal of General Virology**, vol.86: p.2525-2534. 2005.

CHIODONI, C.; PAGLIA, P.; STOPPACCIARO, A.; RODOLFO, M.; PARENZA, M.; COLOMBO, M.P. Dendritic cells infiltrating tumors cotransduced with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and CD40 ligand genes take up and present endogenous tumor-associated antigens, and prime naive mice for a cytotoxic T lymphocyte response. **J Exp Med**, Vol.1: p. 125-133. 1999.

CHOU, B.; HISAEDA, H. ET AL. Critical contribution of immunoproteasomes in the induction of protective immunity against Trypanosoma cruzi in mice vaccinated with a plasmid encoding a CTL epitope fused to green fluorescence protein. **Microbes Infect**, Vol.10: p.241-250. 2007.

COELHO-CASTELO, A. A., SANTOS JUNIOR R. R., ET AL. B-lymphocytes in bone marrow or lymph nodes can take up plasmid DNA after intramuscular delivery. **Hum Gene Ther.** vol. 14 n.13: 1279-1285. 2003.

CULVER K, CORNETTA K, MORGAN R, MORECKI S, AEBERSOLD P, KASID A, LOTZE M, ROSENBERG SA, ANDERSON WF, BLAESE RM. Lymphocytes as cellular vehicles for gene therapy in mouse and man. **Proc Natl Acad Sci U S A.** vol. 88: p.3155-3159. 1991.

DALLMAN, C.; JOHNSON, P.W.; PACKHAM, G. Differential regulation of cell survival by CD40. **Apoptosis.** Vol. 8: p.45-53. 2003.

DRAUBE, A. E VON BERGWELT-BAILDON, M. Immortalized B cells: a neverending source of antigen-presenting cells for vaccines? **Expert Review Vaccines.** Vol. 7: p. 411-415. 2008.

DE VINUESA, C.G.; COOK, M.C.; BALL, J.; DREW, M.; SUNNERS, Y.; CASCALHO, M.; WABL, M.; KLAUS, G.G.; MACLENNAN, I.C. Germinal centers without T cells. **J. Exp. Med.** vol.3: p.485-494. 2000.

DEL VECCHIO, F.; FILARETO, A.; SPITALIERI P.; SANGIUOLO F.; NOVELLI, G. Cellular Genetic Therapy. **Transplantation Proceedings.** Vol.37: p.2657-2661. 2005.

DEL VECCHIO, M.; BAJETTA, E.; CANOVA, S.; LOTZE, M.T.; WESA, A.; PARMIANI, G.; ANICHINI, A. Interleukin-12: biological properties and clinical application. **Clin Cancer Res.** vol.16: p.4677-4685. 2007.

FLOTTE, T.R. Gene Therapy: The First Two Decades and the Current State-of-the-Art. **Journal of Cellular Physiology,** vol. 213: p.301-305. 2007.

GARDLÍK, R.; PÁLFFY, R.; HODOSY, J.; LUKÁCS, J.; TURNA, J.; CELEC, P. Vectors and delivery systems in gene therapy. **Med Sci Monit.** vol. 11: p. 110-121. 2005.

GILLESSEN, S.; CARVAJAL, D.; LING, P.; PODLASKI, F.J.; STREMLO, D.L.; FAMILLETTI, P.C.; GUBLER, U.; PRESKY, D.H.; STERN, A.S.; GATELY, M.K. Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. **Eur J Immunol.** vol. 25: p. 200-206. 1995.

GORIELY, S. E GOLDMAN M. The Interleukin-12 Family: New Players in Transplantation

Immunity? **American Journal of Transplantation**. vol.7: p.278-284. 2007.

HARSHYNE, L.A.; WATKINS, S.C.; GAMBOTTO, A.; BARRATT-BOYES, S.M. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. **J Immunol** vol.9: p.5840-5846. 2001.

HIGH, K. A. Update on Progress and Hurdles in Novel Genetic Therapies for Hemophilia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**. Vol. 2007 n. 1: p.466-472, 2007.

HIGH, K.A. Gene transfer as an approach to treating hemophilia. **Semin Thromb Hemost**. Vol.29: p.107-120, 2003.

HIRSCHOWITZ, E. A.; FOODY, T.; KRYSIO, R.; DICKSON, L.; STURGILL, J.; YANNELLI, J. Autologous Dendritic Cell Vaccines for Non-Small-Cell Lung Cancer. **Journal of Clinical Oncology**. Vol.22: p. 2808-2815, 2004.

HORN, P.A.; MORRIS, J.C.; NEFF, T.; KIEM, H.P. Stem cell gene transfer--efficacy and safety in large animal studies. **Molecular Therapy**, n.3 v.10: p.417-431, 2004.

HUTTER, H. Fluorescent reporter methods. **Methods Mol. Biol.** vol.351: p.155-173, 2006.

JANG J. H.; LIM, K.; SCHAFFER, D. V. Library Selection and Directed Evolution Approaches to Engineering Targeted Viral Vectors. **Biotechnology and Bioengineering**. Vol.98: p.515-524, 2007.

JINNAH, H.A.; FRIEDMANN, T. Gene therapy and the brain. **Br Med Bull**. vol.51: p.138-148, 1995.

KHADER, S.A. E COOPER, A.M. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. **Cytokine**. vol.41: p.79-83, 2008.

KOBAYASHI, M.; FITZ, L.; RYAN, M.; HEWICK, R.M.; CLARK, S.C.; CHAN, S.; LOUDON, R.; SHERMAN, F.; PERUSSIA, B.; TRINCHIERI, G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. **J Exp Med**. vol. 170: p.827-845, 1989.

LANGOWSKI, J. L.; ZHANG, X.; WU, L.; MATTSON, J.D.; CHEN, T.; SMITH, K.; BASHAM, B.; MCCLANAHAN, TERRILL.; KASTELEIN, R. A.; OFT, M. IL-23 promotes tumour incidence and growth. **Nature**. Vol.442: p. 461-465, 2006.

LANGRISH, C. L.; MCKENZIE B. S.; WILSON N. J.; MALEFYT R. W.; KASTELEIN R. A.; CUA D. J. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. **Immunological Reviews**. vol.202 : p.96-105, 2004.

LAROSA, D. F.; ORANGE, J. S. 1.Lymphocytes. **Journal of Allergy Clin Immunol**. vol.121: p.364-369, 2008.

LI, J.; BARREDA, D. R.; ZHANG, Y-A.; BOSHRA, H.; GELMAN, A. E.; LAPATRA, S.; TORT, L.; SUNYER, J. O. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. **Nature immunology**. vol.7: p.1116-1124, 2006.

LIMA, K. M.; SANTOS, S. A.; COELHO-CASTELO, A.A.M.; RODRIGUES JR., J.M.; SILVA, C.L. 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**. v.10: p.678-685, 2003.

LOWENSTEIN. P.R.; SOUTHGATE, T.D.; SMITH-ARICA, J.R.; SMITH, J.; CASTRO, M.G. Gene therapy for inherited neurological disorders: towards therapeutic intervention in the Lesch-Nyhan syndrome. **Prog. Brain Res**. vol.117:p.485-501, 1998.

LOWRIE, D. B., TASCAN, R. E. ET AL. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. **Nature** 400(6741): 269-271, 1999.

LYON, A. R.; SATO, M.; HAJJAR, R. J.; SAMULSKI, R. J.; HARDING, S. E. Gene therapy: targeting the myocardium. **Heart**. Vol.94: p.89-99, 2008.

MARANA, H.R.C. E ANDRADE, J.M. Estudo dos Linfócitos do Sangue Periférico de Pacientes com Carcinoma de Colo do Útero Submetidas à Quimioterapia Neoadjuvante. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia. 1997.

MORTARINI, R.; BORRI, A.; TRAGNI, G.; BERSANI, I.; VEGETTI, C.; BAJETTA, E.; PILOTTI, S.; CERUNDOLO, V.; ANICHINI. A. Peripheral Burst of Tumor-specific Cytotoxic T Lymphocytes and Infiltration of Metastatic Lesions by Memory CD81 T Cells in Melanoma Patients Receiving Interleukin 12. **Cancer Research**. vol.60: p.3559-3568,

2000.

MUELLER, C.; TORREZ, D.; BRAAG, S.; MARTINO, A.; CLARKE, T.; CAMPBELL-THOMPSON, M.; FLOTTE, T.R. Partial correction of the CFTR-dependent ABPA mouse model with recombinant adeno-associated virus gene transfer of truncated CFTR gene. **Journal Gene Medicine**, n.1 v.10: p.51-60, 2008.

OLIVE, D. Lymphocyte coreceptors. Med Sci (Paris). vol.12: p.1069-1074, 2006.

PASCOLO, S. Vaccination with messenger RNA (mRNA). **Handb Exp Pharmacol**. Vol.183: p. 221-235, 2008.

PRUD'HOMME, G.J.; DRAGHIA-AKLI, R.; WANG, Q. Plasmid-based gene therapy of diabetes mellitus. **Gene Therapy**. Vol.14:p.553-554, 2007.

RAWAT, M.; SINGH, D.; SARAF, S. Lipid carriers: a versatile delivery vehicle for proteins and peptides. **Yakugaku Zasshi**. Vol. 128: p. 269-280, 2008.

ROMAN, G.; PÁLFFY, R.; HODOSY, J.; LUKÁCS, J.; TURŇA, J.; CELEC, P. Vectors and delivery systems in gene therapy. **Medical Science Monitor**, n. 4 v.11: p.110–121. 2005.

Rosenberg LE. Treating genetic diseases: lessons from three children. Pediatr Res. vol.27: p.10-16. 1990.

ROSSI, J.J.; JUNE, C.H.; KOHN, D.B. Genetic therapies against HIV. **Nature Biotechnology**, n.12 vol.25: p.1444-1454, 2007.

SALMONS, B.; GUNZBURG, W.H. Targeting of retroviral vectors for gene therapy. **Human Gene Therapy**, n.2 v.4: p.129-141, 1993.

STERN, A.S.; PODLASKI, F.J.; HULMES, J.D.; PAN, Y.C.; QUINN, P.M.; WOLITZKY, A.G.; FAMILLETTI, P.C.; STREMLO, D.L.; TRUITT, T.; CHIZZONITE, R.; et al. Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 17: p.6808-6812, 1990.

TAHARA. K.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Development of Gene Delivery System Using PLGA Nanospheres. **YAKUGAKU ZASSHI**. Vol. 127: p.1541-

1548, 2007.

TESORO-CRUZ, E., CALDERON-RODRIGUEZ, R. ET AL. Intradermal DNA vaccination in ear pinnae is an efficient route to protect cats against rabies virus. Vet Res. **Vol. 39:** p. 16-27, 2008.

Trinchieri, G.; Wysocka, M.; D'Andrea, A.; Rengaraju, M.; Aste-Amezaga, M.; Kubin, M.; Valiante, N.M.; Chehimi, J. Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukin-12 is a key regulator of immune response and inflammation. Prog Growth Factor Res. vol. 4: p.355-368, 1992.

VOLLWEILER JL, ZIELSKE SP, REESE JS, GERSON SL. Hematopoietic stem cell gene therapy: progress toward therapeutic targets. Bone Marrow Transplant. vol. 32: p.1-7, 2003.

WANG, H.; SHAYAKHMETOV, D.M.; LEEGE, T.; HARKEY, M. LI, Q. A Capsid-Modified Helper-Dependent Adenovirus Vector Containing the  $\beta$ -Globin Locus Control Region Displays a Nonrandom Integration Pattern and Allows Stable, Erythroid-Specific Gene Expression. Journal of virology, n. 17 v.79: p. 10999 – 11013, 2005.

WANG, L.C.; LEE, J.H.; YANG, Y.H.; LIN, Y.T.; CHIANG, B.L. New biological approaches in asthma: DNA-based therapy. Curr. Med. Chem. n.14 vol.15: p. 1607-1618, 2007.

WELNER R. S.; PELAYO R.; KINCADE, P. W. Evolving views on the genealogy of B cells. Nature reviews immunology. vol.8: p.95-106, 2008.

WILSON, J.M.; GROSSMAN, M.; RAPER, S.E.; BAKER, J.R. JR; NEWTON, R.S.; THOENE, J.G. *Ex vivo* gene therapy of familial hypercholesterolemia. Human Gene Therapy, n.3 vol.2: p.179-222, 1992.

XU W.; TAMURA, T.; TAKATSU, K. CpG ODN mediated prevention from ovalbumin-induced anaphylaxis in mouse through B cell pathway. International Immunopharmacology. vol.8: p. 351–361, 2008.

YONEMITSU, Y.; UEDA, Y.; KINOH, H.; HASEGAWA, M. Immunostimulatory virotherapy using recombinant sendai virus as a new cancer therapeutic regimen. Front Biosci. Vol. 1: p. 4953-4959, 2008.

YOSHIMOTO T, MORISHIMA N, MIZOGUCHI I, SHIMIZU M, NAGAI H, ONIKI S, OKA M, NISHIGORI C, MIZUGUCHI J. Antiproliferative activity of IL-27 on melanoma, **J Immunol.** Vol.180 n 10: p.6527-35. 2008

YOUINOU P. B cell conducts the lymphocyte orchestra. **Journal of Autoimmunity.** vol.28: p. 143-151, 2007.

ZHANG C, ZHANG J, NIU J, ZHOU Z, ZHANG J, TIAN Z. Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. **Hum Immunol.** Vol.69, n 8: p.490-500, 2008

ZALDUMBIDE, A. E HOEBEN, R.C. How not to be seen: immune-evasion strategies in gene therapy. **Gene Therapy.** Vol. 15: p.239-246, 2008.

ZANETTI, M.; CASTIGLIONI, P.; RIZZI, M.; WHEELER, M.; GERLONI, M. B lymphocytes as antigen-presenting cell-based genetic vaccines. **Immunol. Rev.** vol.199: p.264-278, 2004.

ZUBLER, R. H. Ex vivo expansion of haematopoietic stem cells and gene therapy development. **Swiss med Wkly.** vol.136: p.795-799, 2006.

---

Arlete Aparecida Martins Coelho-Castelo

---

William Roberto Schluchting

# 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](#)