

GABRIELA DE FRANÇA MENEZES

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE
IMUNIDADE ESPECÍFICA CONTRA CÉLULAS NEOPLÁSICAS PELA TRANSFEÇÃO
DE MONÓCITOS COM RNA TUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

São Paulo

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

GABRIELA DE FRANÇA MENEZES

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE
IMUNIDADE ESPECÍFICA CONTRA CÉLULAS NEOPLÁSICAS PELA TRANSFEÇÃO
DE MONÓCITOS COM RNA TUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto

São Paulo

2008

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

© reprodução total

Menezes, Gabriela de França.

Desenvolvimento de método de avaliação da indução de imunidade específica contra células neoplásicas pela transfecção de monócitos com RNA tumoral / Gabriela de França Menezes. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Jose Alexandre Marzagão Barbuto.

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

Versão do título para o inglês: Development of a method for evaluating the induction of specific immunity against tumor cells by monocytes' transfection with tumor RNA.

Descritores: 1. Câncer 2. Imunoterapia 3. Monócitos 4. Transfecção 5. RNA 6. Proliferação linfocitária I. Barbuto, Jose Alexandre Marzagão II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. III. Título.

ICB/SBIB182/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gabriela de França Menezes.

Título da Dissertação: Desenvolvimento de método de avaliação da indução de imunidade específica contra células neoplásicas pela transfecção de monócitos com RNA tumoral.

Orientador(a): Jose Alexandre Marzagão Barbuto.

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

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 38130900 - telefax: (55) (011) 3818-7438
e-mail: icbtedir@icb.usp.br

Decl. CEP SH.044.08

DECLARAÇÃO

Em adendo ao parecer 747/CEP, de 11.10.06, informo que o título do Projeto foi alterado para "***Desenvolvimento de método de avaliação da indução de imunidade específica contra células neoplásicas pela transfecção de monócitos com RNA tumoral***" não apresentando restrições quanto às modificações do projeto, que as mesmas não afetam os aspectos éticos da pesquisa.

São Paulo, 10 de julho de 2008.

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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.77330 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

PARECER 747/CEP

São Paulo, 17 de outubro de 2006.

Prezada Senhora,

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB em sua 69ª reunião realizada em 11.10.06, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "**Desenvolvimento de método de avaliação da indução de imunidade específica contra células neoplásicas pela transfecção de monócitos com mrna tumora**" manifesta-se que em relação à Ética não há obstáculo, todavia a apresentação de Biossegurança deve ser regularizada junto a CTNBio.

Situação do projeto: Projeto aprovado com recomendação

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

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

Ilma. Sra.
GABRIELA DE FRANÇA MENEZES
Departamento de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

À minha família e ao meu Rodrigo pelo
apoio e carinho durante o caminho de
mais uma realização em minha vida.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo em minha vida!

Agradeço ao Prof. Dr. José Alexandre M. Barbuto por me receber em seu laboratório e contribuir para minha formação.

Agradeço também aos pesquisadores Dr. Fernando Soares, do Hospital A. C. Camargo, e à Dr. Anamaria Aranha Camargo, do Instituto Ludwig de Pesquisa em Câncer, pela colaboração no trabalho.

Agradeço ao Banco de Sangue do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, e a todos os doadores de sangue, pela doação das câmaras de redução plaqueta-aférese, da qual extraía as células usadas nos experimentos.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Imunologia que cederam parte de seus laboratórios e equipamentos, e também por contribuírem com idéias e soluções.

Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Imunologia por sua ajuda. Principalmente à Célia e Marilú, nossas divertidas técnicas.

Agradeço a todos os colegas do Departamento pela amizade e discussões imunológicas muito esclarecedoras. Agradeço aos que me receberam assim que cheguei ao laboratório, e que dividiram comigo pouco ou muito tempo durante esses anos, mas que certamente fizeram a minha estada no laboratório mais divertida: João Paulo, Clara, Márcio, Renato, Andréia, Marisa, Giovana, Ana Paula, Roberto, Bruno, Patty, e também Juliana e Cíntia (nossas vizinhas de laboratório); e também aos que foram chegando ao longo da minha jornada, mas que já se tornaram amigos: Graziela, Isabella, Lilian, Patrícia Toniolo, Cristiano, Vivian, Bruna, Léo, Daniel, Ana Carolina. E desde já peço desculpas caso eu tenha eventualmente me esquecido de alguém.

Agradeço à FAPESP pelo apoio financeiro, sem o qual seria impossível a execução do trabalho.

"Aventure-se, pois da mais
insignificante pista surgiu toda riqueza
que o homem já conheceu"

John Masefield

RESUMO

Menezes GF. Desenvolvimento de método de avaliação da indução de imunidade específica contra células neoplásicas pela transfecção de monócitos com RNA tumoral [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

A abordagem imunoterapêutica do câncer tem sido cada vez mais explorada. Dentro desse contexto, as vacinas baseadas no uso de células dendríticas vêm gerando resultados promissores, mas ainda não completamente satisfatórios. Entre os fatores que tornam esta abordagem atraente, mas que, ao mesmo tempo, a limitam, está o uso de material antigênico obtido do próprio paciente. Se este uso permite uma grande especificidade de tratamento, a quantidade de material limita seu uso, dificultando a manutenção do tratamento por períodos prolongados. Assim, o presente projeto pretendeu estabelecer as condições de extração e amplificação de mRNA tumoral, como fonte renovável de antígenos. Já a avaliação da eficácia da vacina tem se baseado na obtenção de melhora clínica, o que, embora ideal, retarda a adoção de correções e aperfeiçoamentos das estratégias vacinais. Neste ponto, a avaliação da resposta imune celular específica contra células tumorais, induzida pela vacinação poderia contribuir significativamente. Portanto, foi nosso objetivo, também, avaliar a transfecção de monócitos com RNA tumoral total para geração de células mimetizando as células tumorais. Para a padronização desta transfecção, diferentes concentrações de RNA total (0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg, 5 µg e 10 µg) obtido da linhagem de adenocarcinoma mamário humano SK-BR-3 foram usadas em diferentes tempos de transfecção (12h, 24h e 48h), e a eficiência das transfecções avaliada pela expressão do antígeno Her-2/neu. Como instrumento de avaliação da resposta celular de linfócitos T estimulados com monócitos transfectados foi usado o ensaio de proliferação linfocitária, e a secreção de citocinas induzidas durante a co-cultura dos linfócitos com os monócitos transfectados. Num primeiro momento, monócitos transfectados com RNA tumoral total foram capazes de induzir linfoproliferação, com produção de IFN- γ durante a co-cultura, sendo que a maior dose transfectada e o maior tempo de transfecção induziram a melhor resposta linfoproliferativa. Num segundo momento, essa indução de linfoproliferação foi perdida, assim como a produção de citocinas durante a co-cultura. Coincidentemente, nesse segundo momento, a linhagem tumoral usada, SK-BR-3, deixou de expressar o antígeno Her-2/neu. A transfecção foi refeita com RNA total de SK-BR-3 confirmadamente Her-2/neu.

positiva, e voltou-se a ter indução de linfoproliferação pelos monócitos transfectados. Assim, foi confirmada que a presença de antígenos específicos na amostra de RNA tumoral total é importante para indução de proliferação, e que só a transfecção passiva com RNA não é suficiente para ativar essa resposta. Esses resultados indicaram ser possível o desenvolvimento de um método para avaliação, pelo uso de RNA extraído de células tumorais, das respostas celulares induzidas contra células tumorais em pacientes com câncer que foram vacinados.

Palavras-chave: Câncer, Imunoterapia, Monócitos, Transfecção, RNA, Proliferação linfocitária.

ABSTRACT

Menezes GF. Development of a method for evaluating the induction of specific immunity against tumor cells by monocytes' transfection with tumor RNA [Master thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

The cancer immunotherapeutic approach has been increasingly exploited. In this context, the use of vaccines based on dendritic cells are generating promising results, but still not completely satisfactory. Among the factors that make this approach attractive, but at the same time limited, is the use of patient's antigenic material. If this allows the use of a very specific treatment, the amount of material restricts its use, making difficult to maintain the treatment for long periods. Thus, the aim of this project was establish the conditions for extraction and amplification of mRNA tumor, as renewable source of antigens. The measure of vaccine effectiveness has been based on clinical improvement, which, although ideal, delays fixes adoption and improvement of vaccine strategies. At this point, the evaluation of specific cellular immune response against tumor cells, induced by vaccination could significantly help. So was our aim too, to evaluate the monocytes' transfection with total tumor RNA for generation tumor mimicking cells. Different total RNA concentrations (0.1 µg, 0.5 µg, 1 µg, 5 µg and 10 µg) from the human mammary adenocarcinoma strain SK-BR-3 were used at different times of transfection (12h, 24h and 48h), and the transfection efficiency was evaluated by the expression of Her-2/neu antigen. The lympho-stimulatory potencial of this transfected monocytes was evaluated with lymphocyte proliferation test and cytokines secreted during co-culture of lymphocytes and the transfected monocytes. Initially, monocytes transfected with total tumor RNA were able to induce lymphoproliferation, with IFN-γ production during co-culture, and the highest dose and longer time of transfection induced the best lymphoproliferative answer. After, this lymphoproliferation induction was lost, as well as the cytokines production during co-culture. Coincidentally, in this period, the tumor strain used, SK-BR-3, lost the antigen Her-2/neu expression. The transfection was done again with total RNA from a SK-BR-3 confirmed Her-2/neu positive, and came back the induction of lymphoproliferation by transfected monocytes. Thus, it was confirmed that the presence of specific antigens in tumor total RNA sample is important for induction of proliferation, and that only the RNA passive transfection was not sufficient to enable this response. These results indicated that the development of a

method for evaluation the cellular responses induced against tumor cells in cancer patients who were vaccinated, with the use of RNA extracted from tumor cells, is possible.

Keywords: Cancer, Immunotherapy, Monocytes, Transfection, RNA, Lymphocyte proliferation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Imunohistoquímica para expressão de Her-2/neu por células dendríticas transfectadas ou não com RNA total extraído de células da linhagem tumoral humana de adenocarcinoma mamário humano, SK-BR-3, que superexpressa Her-2/neu.....25
- Figura 2. Histogramas representativos da expressão das moléculas de superfície HLA-DR, CD14, CD80 e CD86 na superfície de monócitos não transfectados ou transfectados, 10^6 células, por 24h com RNA tumoral total de SK-BR-3, nas doses de 0,1 μ g, 0,5 μ g, 1 μ g e 10 μ g.....41
- Figura 3. Potencial linfo-estimulador de monócitos transfectados com RNA tumoral total em co-cultura por 7 dias com linfócitos autólogos.....43
- Figura 4. Potencial linfo-estimulador de monócitos transfectados por 12h com RNA tumoral total, nas doses de 0,1 μ g, 0,5 μ g, 1 μ g e 10 μ g.....45
- Figura 5. Potencial linfo-estimulador de monócitos transfectados por 24h com RNA tumoral total, nas doses de 0,1 μ g, 0,5 μ g, 1 μ g e 10 μ g.....46
- Figura 6. Potencial linfo-estimulador de monócitos transfectados por 48h com RNA tumoral total, nas doses de 0,1 μ g, 0,5 μ g, 1 μ g e 10 μ g.....47
- Figura 7. Detecção de IFN- γ nos sobrenadantes das co-culturas de 7 dias entre linfócitos e monócitos não-transfectados ou transfectados com 0,1 μ g, 0,5 μ g, 1 μ g e 10 μ g com RNA tumoral total por 12h, 24h e 48h.....49
- Figura 8. Perfil de migração por eletroforese em gel de agarose das amostras de RNA total, comparando dois métodos diferentes de isolar o RNA total de SK-BR-3.....51

Figura 9. Percentual de células positivas para as moléculas de superfície HLA-DR e HLA-A,B,C nos monócitos não transfectados ou transfectados por 12h, 24h e 48h com RNA tumoral total de SK-BR-3, nas doses de 1 µg e 10 µg.....	54
Figura 10. Percentual de células positivas para as moléculas de superfície CD14 e CD206 nos monócitos não transfectados ou transfectados por 12h, 24h e 48h com RNA tumoral total de SK-BR-3, nas doses de 1 µg e 10 µg.....	55
Figura 11. Percentual de células positivas para as moléculas de superfície CD80 e CD86 nos monócitos não transfectados ou transfectados por 12h, 24h e 48h com RNA tumoral total de SK-BR-3, nas doses de 1 µg e 10 µg.....	56
Figura 12. Percentual de células positivas para as moléculas de superfície CD83 e Her-2/neu nos monócitos não transfectados ou transfectados por 12h, 24h e 48h com RNA tumoral total de SK-BR-3, nas doses de 1 µg e 10 µg.....	57
Figura 13. Histogramas representativos da expressão das moléculas de superfície HLA-DR, HLA-A,B,C, CD14 e CD206 na superfície de monócitos não transfectados ou transfectados por 24h com RNA tumoral total de SK-BR-3, nas doses de 0,1 µg 0,5 µg, 1µg e 10µg.....	59
Figura 14. Histogramas representativos da expressão das moléculas de superfície CD80, CD86, CD83 e do antígeno Her-2/neu na superfície de monócitos não transfectados ou transfectados por 24h com RNA tumoral total de SK-BR-3, nas doses de 0,1 µg 0,5 µg, 1µg e 10µg.....	60
Figura 15. Média da intensidade média de fluorescência (MFI) das moléculas de superfície HLA-DR, HLA-A,B,C, CD14 e CD206 em monócitos não transfectados ou transfectados com 0,5 µg, 1 µg, 5 µg e 10 µg de RNA tumoral total de SK-BR-3 por 12h, 24h e 48h.....	62
Figura 16. Média da intensidade média de fluorescência (MFI) das moléculas de superfície CD80, CD86, CD83 e Her-2/neu em monócitos não transfectados ou transfectados com 0,5 µg, 1 µg, 5 µg e 10 µg de RNA tumoral total de SK-BR-3 por 12h, 24h e 48h.....	64

Figura 17. Média do MFI das moléculas de superfície HLA-DR, HLA-A,B,C, CD14, CD206, C80, CD86, CD83 e Her-2/neu em monócitos não transfectados ou transfectados com 10 µg de RNA tumoral total por 12h, 24h e 48h.....	66
Figura 18. Potencial linfo-estimulador de monócitos transfectados com RNA tumoral total em co-cultura por 5 dias com linfócitos autólogos.....	68
Figura 19. Média da porcentagem de proliferação linfocitária.....	69
Figura 20. Média da produção das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4 e IL-10 durante 5 dias de co-cultura entre os monócitos não transfectados e transfectados por 12h com as doses de 0,5 µg, 1 µg, 5 µg e 10 µg de RNA tumoral total e linfócitos.....	72
Figura 21. Média da produção das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4 e IL-10 durante 5 dias de co-cultura entre os monócitos não transfectados e transfectados por 24h com as doses de 0,5 µg, 1 µg, 5 µg e 10 µg de RNA tumoral total e linfócitos.....	73
Figura 22. Média da produção das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4 e IL-10 durante 5 dias de co-cultura entre os monócitos não transfectados e transfectados por 48h com as doses de 0,5 µg, 1 µg, 5 µg e 10 µg de RNA tumoral total e linfócitos.....	74
Figura 23. Média da produção das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-2, IL-4 e IL-10 durante 5 dias de co-cultura entre os monócitos não transfectados e transfectados por 12h, 24h e 48h com 10 µg de RNA tumoral total e linfócitos.....	76
Figura 24. Média da porcentagem de células positivas para os dos marcadores de superfície HLA-DR, HLA-A,B,C, CD14, CD206, CD80, CD86, CD83 e Her-2neu nas células SKBR-3.....	77
Figura 25. Histogramas representativos da expressão das moléculas de superfície HLA-DR, HLA-A,B,C, CD14, CD206, CD80, CD86, CD83 e Her-2/neu na superfície de SK-BR-3.....	78

Figura 26. Média do MFI das moléculas HLA-DR, HLA-A,B,C, CD14, CD206, CD80, CD86, CD83 e Her-2/neu na superfície das células SK-BR-3.....	78
Figura 27. Imunohistoquímica para detecção de Her-2/neu nas amostras das células SK-BR-3.....	79
Figura 28. Imunohistoquímica para detecção de Her-2/neu na nova amostra das células SK-BR-3.....	80
Figura 29. Perfil de migração por eletroforese em gel de agarose das amostras de RNA total, comparando dois métodos diferentes de isolar o RNA total de SK-BR-3.....	81
Figura 30. Potencial linfo-estimulador de monócitos transfectados com RNA tumoral total, isolado com diferentes técnicas, em co-cultura por 5 dias com linfócitos autólogos.....	82
Figura 31. Esquema da estratégia usada para amplificação do mRNA tumoral extraído das células SK-BR-3.....	83
Figura 32. Perfil de migração por eletroforese em gel de agarose dos produtos de transcrição reversa e PCR.....	85
Figura 33. Esquema da estratégia usada para transcrição <i>in vitro</i> do material amplificado por PCR.....	86
Figura 34. Perfil de migração por eletroforese em gel de agarose dos produtos de transcrição <i>in vitro</i>	87

LISTA DE ABREVIATURAS

CTL - linfócito T citotóxico

DCs - células dendríticas

DNA – ácido desoxirribonucléico

DTH - hipersensibilidade do tipo tardio

HER-2/neu - receptor humano de fator de crescimento epidérmico-2

IL – interleucina

MFI – intensidade média de fluorescência

MHC - complexo principal de histocompatibilidade

MLR - reação mista de linfócitos

mRNA - RNA mensageiro

NK- células natural killer

pb – pares de bases

PBMC – células mononucleares de sangue periférico

PBS - salina tamponada com fosfato

PGE2 - prostaglandina E2

R-10 - RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino

RNA - ácido ribonucléico

SK-BR-3 - linhagem de adenocarcinoma mamário humano

TAA - antígenos associados ao tumor

TGF- β - fator de crescimento transformante β

TLR – receptor tipo toll

VEGF - fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	28
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Cultura de células tumorais	31
3.2	Isolamento de RNA com Trizol	31
3.3	Isolamento de RNA total com o Kit SV RNA total isolation system	32
3.4	Quantificação do RNA e eletroforese em gel de agarose	33
3.5	Separação de células mononucleares do sangue	33
<i>3.5.1</i>	<i>Separação de monócitos</i>	<i>34</i>
<i>3.5.2</i>	<i>Separação de linfócitos T por roseta de hemácias de carneiro modificadas</i>	<i>34</i>
3.6	Transfecção dos monócitos	35
3.7	Análise das moléculas de superfície por citometria de fluxo	35
3.8	Ensaio de proliferação linfocitária	36
<i>3.8.1</i>	<i>Marcação dos linfócitos T com CFSE</i>	<i>36</i>
<i>3.8.2</i>	<i>Co-cultura</i>	<i>36</i>
3.9	ELISA para citocinas	37
3.10	Imunocitoquímica	38
3.11	Transcrição reversa e amplificação do mRNA de SK-BR-3	38
3.12	Transcrição in vitro do mRNA de SK-BR-3	39
3.13	Análise estatística	39
4	RESULTADOS	40
4.1	Análise fenotípica dos monócitos transfectados com RNA tumoral total isolado das células SK-BR-3	40
4.2	Potencial linfo-estimulador de monócitos transfectados com RNA tumoral total isolado das células SK-BR-3	42
4.3	Efeito da dose e do tempo de RNA tumoral total transfectado nos monócitos sobre a resposta linfo-estimuladora	43
4.4	Citocinas liberadas	48
4.5	Comparação entre as diferentes técnicas de isolar o RNA total de SK-BR-3	50
4.6	Análise fenotípica dos onócitos transfectados com RNA tumoral total isolado (com kit) das células SK-BR-3	52

4.7	Potencial linfo-estimulador de monócitos transfectados com RNA isolado (com kit) das células SK-BR-3	67
4.8	Citocinas liberadas	70
4.9	Análise fenotípica da linhagem de adenocarcinoma mamário humano SK-BR-3 ..	77
4.10	Imunocitoquímica	79
4.11	MLR com monócitos tranfectados com RNA extraído de SK-BR-3 Her-2/neu positiva e células não aderentes autólogas	80
4.12	Transcrição reversa e amplificação do mRNA de SK-BR-3	83
4.13	Transcrição in vitro do mRNA de SK-BR-3	85
5	DISCUSSÃO	88
6	CONCLUSÃO	96
	REFERÊNCIAS	97

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo devido às altas taxas de mortalidade. As estimativas para o ano de 2008, válidas também para 2009, apontam que ocorrerão 466.730 novos casos de câncer no Brasil, acompanhando a mesma expectativa mundial (Ministério da Saúde, 2007).

O aparecimento de um tumor está associado à ocorrência de alterações genéticas, de origem hereditária e/ou ambiental, que se acumulam progressivamente no material genético de uma célula normal. A base da doença está em rápidas mudanças no genoma, principalmente associadas a genes de controle do ciclo celular. O crescimento maligno desse tumor precisa de pelo menos 6 alterações genéticas essenciais e conjuntas: alta suficiência em sinais de crescimento, falta de reconhecimento dos sinais inibitórios de crescimento, evasão de apoptose, perda do limite de potencial replicativo, angiogênese, invasão tecidual e metástase (Hanahan e Weinberg, 2000).

Após décadas de estudos e rápidos avanços, a pesquisa em câncer gerou inúmeros conhecimentos acerca do desenvolvimento e progressão de um tumor. Também houve inúmeros progressos no tratamento do câncer, incluindo aprimoramentos cirúrgicos, quimioterápicos e radioterápicos. Entretanto, a cura da maior parte das neoplasias ainda depende de sua identificação precoce, não sendo possível, muitas vezes, após a disseminação metastática da doença. Assim, novas abordagens terapêuticas são continuamente investigadas e dentre elas, a imunoterapia representa uma forma de crescente relevância (Gilboa, 2004a).

A imunoterapia de tumores transformou-se com a descoberta que o sistema imune humano é capaz de responder a tumores espontâneos ao reconhecer antígenos tumorais. Assim sendo, não há dúvidas de que o câncer está submetido à vigilância imune (Parmiani, 2002; Hamilton, 2008; Lu, 2008). Dessa maneira, a caracterização de antígenos tumorais tem implicações tanto para o conhecimento da natureza do processo oncológico, quanto para a possibilidade de realizar intervenções imunológicas na forma de imunoterapia ativa e passiva, estando dentre essas a vacinação (Hamilton, 2008).

A partir da descoberta dos antígenos tumorais, começou-se a descrição freqüente desses antígenos característicos de células neoplásicas, incluindo produtos de oncogenes ou genes supressores de tumor (Hom, 1991; van der Bruggen, 1991; Labrecque, 1993; Abrams,

1996; Chen, 1997) e de outros genes, nem sempre de função bem estabelecida, mas seguramente antigênicos nos pacientes com câncer (Hom, 1991; van der Bruggen, 1991; Chen, 1997).

Confirmada a existência de antígenos tumorais, a progressão da neoplasia num indivíduo imunocompetente parece paradoxal. Todavia, ao se analisar a interação entre as neoplasias e o sistema imune, este aparente paradoxo se explica. As neoplasias se estabelecem no indivíduo porque desenvolveram diversos mecanismos de escape capazes de evitar o reconhecimento eficaz dos antígenos tumorais pelo sistema imune ou mesmo, de suplantar os mecanismos efetores ativados naquele paciente (Barbutto, 1999), tornando-se pouco imunogênicos.

A maior razão para essa baixa imunogenicidade é que os antígenos associados ao tumor (TAA – sigla do inglês tumor associated antigens) são em sua maioria antígenos normais próprios e poucos são neo-antígenos tumor-específicos (Pardoll, 2003; Gross, 2007). Apesar dessa baixa imunogenicidade dos antígenos tumorais, os novos antígenos imunogênicos seriam capazes de desencadear uma resposta imune caso não houvesse, ainda, os mecanismos de escape. O escape à resposta imune não está somente relacionado à falta de expressão de antígenos, mas também à baixa expressão de moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade do tipo I (MHC I – sigla do inglês major histocompatibility complex) (Kageshita, 1999; Koopman, 2000; Hallermalm, 2004), e/ou defeitos e alterações na maquinaria de processamento antigênico (Kageshita, 1999; Gross, 2007), o que permite que o tumor não apresente antígenos, e assim, não seja reconhecido pelo sistema imune. Alguns tumores, entretanto, mantém a expressão de MHC I e seus antígenos, mas evadem da resposta imune evitando que o tumor seja alvo de lise por linfócitos T e células “natural killer” (NK), através da baixa expressão de Fas, ou sua secreção (Jodo, 1998; Roth, 2001) e também de FasL solúvel (Roth, 2001; Hallermalm, 2004) neutralizando as ações pró-apoptóticas no microambiente tumoral. As células tumorais podem também inativar a cascata de sinalização intracelular pró-apoptótica induzida pela interação Fas/FasL (Roth, 2001; Gross, 2007).

A secreção de fatores imunossupressores, como citocinas (Lu, 2008) e outros mediadores, também constituem um mecanismo de escape, dentre esses fatores estão: fator de crescimento transformante β (TGF- β) (Roth, 2001; Sombroek, 2002; Bellone, 2006), interleucina (IL) 10 (Huang, 1998; Sombroek, 2002; Bellone, 2006), IL-6 (Sombroek, 2002;

Bellone, 2006), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF – sigla do inglês vascular endotelial growth factor) (Yamamoto, 1996; Sombroek, 2002; Bellone, 2006), e prostaglandina E2 (PGE2) (Huang, 1998; Sombroek, 2002; Pockaj, 2004) vêm sendo constantemente descritos. Recentemente, foi descoberto que exossomos, liberados por tumores, carregando TAA e moléculas imunossupressoras também influenciam o mecanismo de escape e o crescimento tumoral (Iero, 2008).

Todos esses mecanismos de escape atrapalham a indução de resposta tumoral por linfócitos e células NK, podendo causar ainda a indução de tolerância em linfócitos T através desses mecanismos. Assim, a ativação de mecanismos efetores alternativos ou o recrutamento de maior número de efetores contra a neoplasia poderia, em tese, controlar a doença. Esta hipótese é fortalecida por inúmeras descrições de sucessos terapêuticos de abordagens imunológicas, tanto em modelos experimentais quanto na clínica (Rosenberg, 1997; Barbuto, 1999; Buzaid, 2000).

Uma das imunoterapias tumorais utilizadas é a vacinação com células dendríticas (DCs) fusionadas às células tumorais do paciente (Dall'Oglio, 2003; Barbuto, 2004). As DCs são as únicas células capazes de desencadear uma resposta imune primária dos linfócitos (Steinman e Witmer, 1978; Steinman, 1981; Steinman, 1983; Banchereau e Steinman, 1998; Steinman, 1999) e, em determinadas situações, até quebrar estados de tolerância imunológica já estabelecidos (Boog, 1985).

Em estudo de nosso laboratório utilizando essa técnica, DCs derivadas de doadores sadios fundidas com células tumorais dos pacientes foram usadas como agentes imunizadores em portadores de carcinoma renal ou melanoma metastático. Esta abordagem conseguiu obter benefício clínico em cerca de 75% dos pacientes, por um período mediano próximo a 6 meses. Além do mais, a sobrevida mediana dos doentes portadores de melanoma foi de 13 meses, e a dos portadores de carcinoma renal, de mais de 21 meses (Barbuto, 2004), o que, comparado a dados de literatura pode ser considerado promissor (Gogas, 2004; Motzer, 2004a; Motzer, 2004b; Kaufmann, 2005).

A avaliação funcional do benefício clínico conseguido com essa técnica precisa ser aperfeiçoada. Se por um lado, hoje é possível analisar, *in vitro*, inúmeras respostas linfocitárias estimuladas por DCs diferenciadas *in vitro*, não se pode fazer uma correlação direta e absoluta destas respostas com o sucesso clínico de um tratamento que as induza. Apesar de uma melhora clínica real, não é possível prever se o paciente teve uma resposta

imune específica ao tumor. Se pensarmos que o tumor possui diversos mecanismos de escape, podemos acreditar que o sistema imune desses pacientes não responderia, naturalmente, a antígenos tumorais específicos.

As avaliações possíveis de serem feitas atualmente se restringem à melhora clínica do paciente, incluindo exames clínicos, tomografia computadorizada e ressonância magnética. Verifica-se se houve estabilização da doença, sem o surgimento de novas metástases, ou se há recidiva tumoral, mesmo após ressecção cirúrgica do tumor. Também é possível uma análise indireta da imunidade do paciente, com reações de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH – sigla do inglês *delayed type hypersensitivity*) contra antígenos comuns, e resposta linfocitária do paciente, *in vitro*, em reação mista de linfócitos (MLR – sigla do inglês *mixed lymphocyte reaction*) com DC alogênica, células tumorais autólogas, e à vacina. Nos casos observados por nosso grupo, o número de respondedores à DTH aumentou após a vacinação com DC fusionada à célula tumoral. Também foi observado que a cada dose de vacina recebida, os linfócitos passaram a ser mais responsivos na MLR (Barbuti, 2004).

Apesar desses métodos indiretos de avaliar a resposta imune induzida nos pacientes vacinados, a avaliação ideal dessa resposta deveria ser feita frente a células tumorais do paciente e estas, muito freqüentemente, não estão disponíveis ou não se prestam aos ensaios que se pretende realizar. Na verdade, a disponibilidade da quantidade ideal de células tumorais constitui um obstáculo também à preparação de vacinas individualizadas como as de DCs.

Uma estratégia capaz de contornar a baixa disponibilidade de células tumorais tem sido estudada recentemente e propõe a transfecção das células dendríticas com RNA (sigla do inglês *ribonucleic acid*) total e RNA mensageiro (mRNA) das células tumorais (Gilboa, 1998; Boczkowski, 2000; Mitchell, 2000; Nair, 2002; Gao, 2007). Essa metodologia tem a vantagem de permitir a amplificação *in vitro* do mRNA, o que tornaria possível a produção ilimitada da vacina a partir de uma pequena amostra inicial do tumor, com a vantagem também de poder tratar pacientes com tumores ainda pequenos. Na verdade, esta estratégia já tem sido explorada com resultados animadores (Heiser, 2002; Nair, 2002; Gilboa, 2004b; Jarnjak-Jankovic, 2005; Mu, 2005) e nosso laboratório também já foi capaz de conseguir a expressão de antígenos tumorais por células dendríticas incubadas com RNA extraído de linhagem tumoral (Fig. 1).

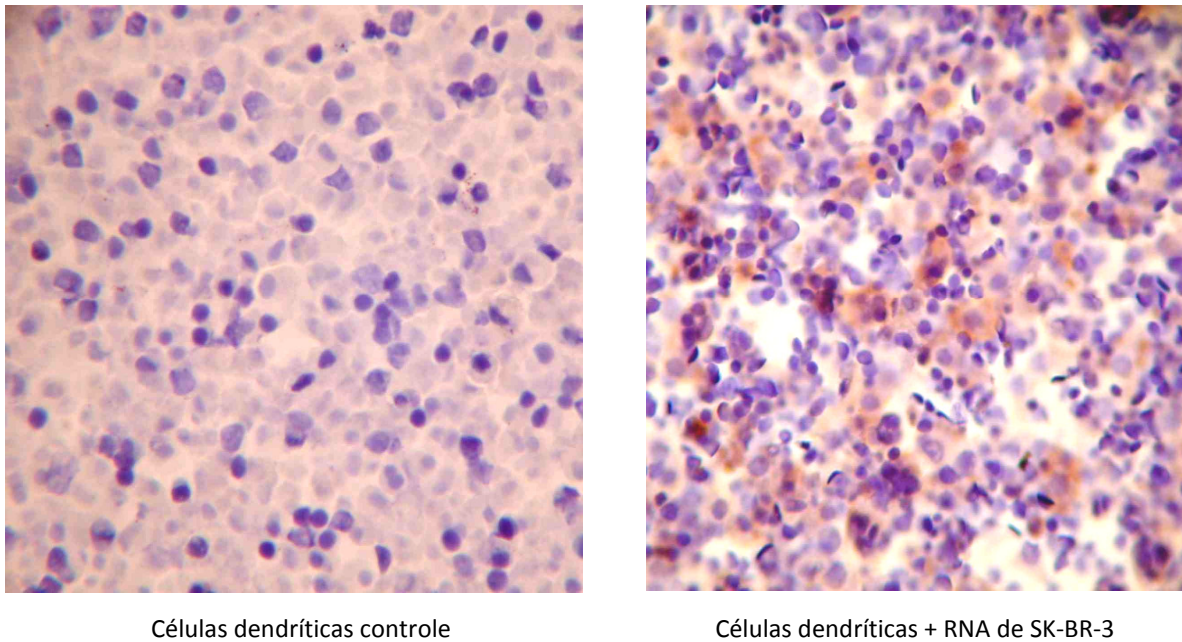


Figura 1. Imunohistoquímica para expressão de Her-2/neu por células dendríticas transfectadas ou não com RNA total extraído de células da linhagem tumoral humana de adenocarcinoma mamário humano, SK-BR-3, que superexpressa Her-2/neu.

Tal estratégia, além do mais, permite que se desenvolva um método potencialmente relevante para a avaliação da resposta induzida pela vacinação: a transfecção de monócitos do próprio paciente com RNA tumoral. Estes monócitos transfectados com o RNA tumoral poderiam tanto expressar as proteínas tumorais em sua superfície quanto apresentar esses antígenos tumorais via MHC, fazendo com que essas células se tornem antigênicas e possam ser usadas nos ensaios de avaliação da resposta celular. Essas células seriam em parte um mimetismo ou da célula tumoral, por expressar as proteínas tumorais, ou também um mimetismo da vacina, já que esse monócito pode passar a expressar os antígenos tumorais via MHC.

Os monócitos são células precursoras de DCs e macrófagos, que assim que saem da medula óssea ou circulação sanguínea rapidamente se diferenciam em um desses tipos celulares. Essas células são especializadas em fagocitose, com processamento e apresentação de antígenos, e com maior capacidade de fagocitose nos tecidos do que na circulação sanguínea. Após fagocitose do antígeno, as enzimas proteolíticas encontradas nos endossomos de monócitos e lisossomos dos macrófagos degradam os antígenos (Randolph, 2007). Os peptídeos gerados dessa degradação são apresentados via MHC do tipo II para as células do sistema imune, gerando resposta imune caso o antígeno seja imunogênico.

No uso do RNA como antígeno tumoral, entretanto, é necessária uma transfecção para que esse material seja colocado dentro da célula. Os métodos de transfecção consistem em colocar o RNA artificialmente dentro da célula por lipotransfecção, eletroporação ou transfecção passiva. A transfecção passiva foi usada originalmente como controle, e surpreendeu ao mostrar resultados semelhantes, e até superiores aos de lipotransfecção, na indução de linfócito T citotóxico (CTL – sigla do inglês cytotoxic T lymphocyte) específico (Gilboa, 2004b). Comparando-se a eficiência de transfecção dos três métodos por expressão de proteína conhecida, o método de eletroporação é superior. Entretanto, na análise funcional de eficiência, como indução de CTL, as três se mostraram igualmente eficazes. Sendo assim, a transfecção passiva se torna um método superior por não necessitar de reagentes adicionais que podem ser tóxicos como na lipotransfecção, nem fragilizar a célula transfectada como na eletroporação (Gilboa, 2004b). Após essa descoberta, vários trabalhos usam a transfecção passiva como via de “carregar” o antígeno na DC, sendo essa funcional nos testes de citotoxicidade (Heiser, 2000).

Pode-se pensar que a transfecção do RNA total causaria auto-imunidade por carrear também antígenos próprios, que são a maioria dos expressos em células tumorais, mas devemos lembrar que há tolerância para auto-antígenos. Apesar de haver a tolerância, Heiser (2000) analisou a possibilidade de auto-imunidade a partir da vacinação, mas os testes realizados tiveram resultados negativos.

A linhagem de adenocarcinoma mamário humano SK-BR-3 é um bom modelo de neoplasia para esse tipo de estudo por superexpressar o antígeno HER-2/neu (receptor humano de fator de crescimento epidérmico-2 – do inglês human epidermal growth factor receptor 2), que poderia servir como um marcador de transfecção. Se a transfecção fosse realizada com sucesso, essa proteína poderia passar a ser expressa em membrana, e/ou apresentada em MHC I, e ainda seria possível obter resposta CTL específica à linhagem tumoral. Assim, transfectando passivamente os monócitos com RNA total isolado de SK-BR-3 veríamos se essas células passariam a expressar o antígeno conhecido, e se essa célula se tornaria estimuladora de linfócitos T.

Essa metodologia nos daria a oportunidade de tentar avaliar a indução de resposta imune específica também dos pacientes que recebem a vacina de DC fusionada às células tumorais *in vitro*, antes mesmo que esses recebam a vacina. Se fosse obtida resposta linfocitária frente a monócitos transfectados com RNA de tumor, tudo dentro do contexto

autólogo, poderíamos já inferir se o sistema imunológico desse paciente seria capaz de responder ao tumor após vacinação, o que tornaria possível uma prévia avaliação do uso de DC fusionada às células tumorais como indutor de resposta imune.

Assim, o presente projeto pretendeu, por um lado, estabelecer as condições de extração e amplificação de mRNA tumoral bem como sua transcrição *in vitro*. Por outro lado, pretendeu-se também estudar as condições de transfecção de monócitos com o RNA total obtido de linhagem tumoral conhecida (SK-BR-3), analisando a expressão de um antígeno sabidamente expresso pelas mesmas (Her-2/neu), como demonstrado no experimento referido anteriormente (Fig. 1). As condições estabelecidas nestes experimentos foram usadas para a transfecção de monócitos com RNA tumoral. Uma vez que no caso de RNA obtido de amostras clínicas de tumor, não há indicadores seguros para a eficácia da transfecção, nos experimentos de padronização desta transfecção utilizou-se Her-2/neu como antígeno conhecido.

É interessante, ainda, notar que, além de fornecer um método de avaliação das respostas celulares contra células tumorais em pacientes com câncer, este projeto permitiu que se adquirisse domínio de metodologia que poderia ser usada para o preparo de vacinas antitumorais a partir de amostras muito pequenas do tumor dos pacientes. Tal metodologia poderia ser aplicada para a vacinação de portadores de tumores ainda pequenos que, ao menos em teoria, poderiam se beneficiar mais de uma abordagem imunoterapêutica.

2 OBJETIVOS

O objetivo do projeto foi desenvolver um método de avaliação da resposta imune celular contra antígenos tumorais e, paralelamente, aprimorar a metodologia de transfecção de células da linhagem mononuclear com RNA tumoral. Especificamente pretendeu-se:

- Obter e amplificar *in vitro* mRNA de células tumorais.
- Estabelecer condições eficazes de transfecção de monócitos do sangue periférico humano, com RNA extraído de células de adenocarcinoma mamário humano SK-BR-3, *in vitro*. Como parâmetro de eficácia desta transfecção, foi avaliada a expressão do antígeno HER-2/neu, superexpresso na linhagem.
- Avaliar o potencial linfo-estimulador dos monócitos transfectados com o RNA tumoral. A resposta linfocitária foi avaliada pela resposta proliferativa e pelo padrão de secreção de citocinas induzido.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Tampão TBE 10x

Tris-base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA 0,5M	40 mL
Água deionizada	1000 mL

O tampão é diluído para TBE 1x em água tratada com DEPC.

Água DEPC 0,01%

DEPC solução	100 µL
Água deionizada	1 L

Gel de agarose 1%

Agarose (Gibco)	0,4 g
Tampão TBE 1x	40 mL

Azul de bromofenol 1x

Glicerol	5 mL
Azul de bromofenol	0,02 g
TBE 1x	5 mL

Salina Tamponada com Fosfato (PBS) - pH 7,0

NaCl	80 g
Na ₂ HPO ₄	11,6 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
KCL	2,0 g
Água deionizada	1 L

Tampão PBS-BSA 0,5%

BSA (Sigma)	0,5 g
-------------	-------

Tampão PBS 100 mL

Tampão PBS-BSA 0,5% formaldeído 2%

BSA (Sigma) 0,5 g
Formaldeído 40% 5 mL
Tampão PBS 80 mL

Tampão PBS-BSA 0,1%

BSA (Sigma) 0,1 g
Tampão PBS 100 mL

Esterilização por filtração com filtro de 0,22 µm.

Tampão de lise de hemácias – tampão Tris-Cloreto de Amônio

Tampão Cloreto de Amônio

NH₄Cl 2,14 g
Água deionizada 250 mL

Esterilização por filtração com filtro de 0,22 µm.

Tampão Tris (pH 7,3)

Tris-base 1,025 g
Água deionizada 50 mL

Esterilização por filtração com filtro de 0,22 µm.

Preparar na hora do uso misturando-se 1 volume de Tris para 9 volumes de cloreto de amônio.

Tampões para ELISA

Tampão de Captura - 0,1 M de Carbonato de Sódio (pH 9,5)

NaHCO₃ 8,4 g
Na₂CO₃ 3,56 g
Água deionizada 1 L

Tampão de Bloqueio

PBS contendo 10% de Soro Bovino Fetal

Tampão de Lavagem

PBS contendo 0,05% de Tween 20.

Solução de parada

H₂SO₄ 2N

3.1 Cultura de células tumorais

As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco Life Technologies - Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), agora chamado de R-10, com antibiótico penicilina-estreptomicina (Gibco) na concentração de 10 unidades/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina, em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C até que formassem a monocamada, quando eram retiradas para os ensaios ou para semeadura em novas garrafas.

A nova amostra da linhagem de adenocarcinoma mamário humano SK-BR-3 (Her-2/neu positiva) foi doada pela Dr. Anamaria Aranha Camargo do Instituto Ludwig de pesquisa sobre o câncer.

3.2 Isolamento de RNA com Trizol

As células SK-BR-3 foram soltas da garrafa de cultura com tripsina (Gibco), lavadas com R-10, e divididas em microtubos com 1×10^7 células em cada um. Após centrifugação a 290 x g por 10 min a 18 °C foi colocado 1 mL do reagente Trizol (Gibco) por microtubo. A lise das células foi conseguida por pipetagens repetidas. As amostras foram incubadas por 5 min em temperatura ambiente. Após incubação foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio e os tubos foram balançados vigorosamente por 15 segundos. As amostras foram novamente incubadas por 3 min em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas em 12000

x g por 15 min a 4 °C. Após centrifugação retirou-se a fase aquosa contendo o RNA transferindo-a para um novo tubo ao qual foi adicionado 0,5 mL de isopropanol. As amostras foram incubadas por 10 min a temperatura ambiente. Seguiu-se uma centrifugação em 12000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 75%. As amostras foram misturadas em vortex e centrifugadas a 7500 x g por 5 min a 4 °C. O RNA precipitado no microtubo foi seco “ao ar” por 5 min. Foi adicionado 0,02 mL de água livre de RNase para ressuspensão do RNA seguido de uma incubação por 10 min a 60 °C. As amostras foram estocadas a -80 °C.

3.3 Isolamento de RNA total com o Kit SV RNA total isolation system

As células SK-BR-3 foram retiradas da cultura com tripsina (Gibco) e colocadas em tubo de 50 mL para centrifugação a 500 x g por 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e procedeu-se 2 lavagens em 20 mL de salina tamponada com fosfato (PBS). Após as lavagens, as células foram divididas em microtubos de maneira a se ter 5×10^6 células por tubo. Os microtubos foram centrifugados, o sobrenadante descartado e com o precipitado seguiu-se o protocolo de extração de RNA total do kit SV RNA total isolation system (Promega – Madison, WI, USA). Ao precipitado foi adicionado 175 µL do tampão de lise com β-mercaptoetanol e o tubo foi agitado com vortex. Depois foi adicionado 350 µL do tampão de diluição, misturou-se por inversão de tubo 4 vezes e o material foi colocado em banho-maria a 70 °C por 3 min. Após a incubação centrifugou-se a amostra a 14000 x g por 10 min a 18 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado 200 µL de etanol 95%, e a amostra homogeneizada por pipetagem. A mistura foi transferida para a coluna e centrifugou-se a 14000 x g por 1 min a 18 °C. Ao final da centrifugação o precipitado foi descartado e à coluna adicionou-se 600 µL da solução de lavagem com etanol, centrifugou-se a 14000 x g por 1 min a 18 °C. O precipitado foi novamente descartado e na coluna colocou-se uma mistura contendo 40 µL do tampão essência amarela, 5 µL de $MnCl_2$ 0,09 M e 5 µL de DNase I, e procedeu-se incubação por 15 min a temperatura ambiente. Adicionou-se, após término da incubação, 200 µL da solução de parada de DNase com etanol e centrifugou-se a 14000 x g por 1 min a 18 °C. Foi adicionado 600 µL da solução de lavagem com etanol e centrifugou-se a 14000 x g por 1 min a 18 °C.

Após descartar o precipitado, foi adicionado mais 250 μL da solução de lavagem com etanol e centrifugou-se na rotação máxima da centrífuga por 2 min a 18 °C. A coluna foi transferida para um novo microtubo e adicionou-se 100 μL de água livre de nuclease, centrifugou-se a 14000 x g por 1 min a 18 °C, e a amostra de RNA foi estocada a -80 °C.

3.4 Quantificação do RNA e eletroforese em gel de agarose

A quantificação do RNA total extraído pelos 2 métodos foi feita por espectrofotometria. E a integridade do material verificada em gel de agarose 1%. Uma alíquota de 1 μL do RNA foi diluída em tampão de corrida azul de bromofenol e analisada no gel de agarose 1%.

3.5 Separação de células mononucleares do sangue

As células foram separadas de câmara de leuco-redução de plaqueta-aférese doadas pelo banco de sangue do Hospital Alemão Oswaldo Cruz. As câmaras continham aproximadamente 7,5 mL de produto, que foi diluído em PBS para um volume final de 20 mL. Em tubo de 50 mL foi colocado 12 mL de meio de separação de linfócitos (Cambrex - East Rutherford, NJ, USA) e, em seguida, foi transferido, com muito cuidado, 20 mL do produto diluído, evitando-se a mistura com o meio de separação de linfócitos. O tubo foi centrifugado a 900 x g por 30 min a 18 °C, sem freio. Após a centrifugação, a nuvem de células mononucleares foi retirada com pipeta Pasteur e colocada em novo tubo cônico de 50 mL, onde previamente havia-se colocado 10 mL do tampão Hanks (Gibco). O volume do tubo foi completado com o tampão para 40 mL e seguiu-se centrifugação a 600 x g por 10 min a 18 °C. O sobrenadante foi desprezado e a amostra ressuspensa em 40 mL de Hanks. Centrifugou-se a 300 x g por 10 min a 18 °C. Novamente desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 40 mL de Hanks, prosseguiu-se uma centrifugação a 200 x g por 10 minutos a 18 °C. Após essa última centrifugação, as amostras foram congeladas em soro fetal bovino (Gibco) e DMSO (Tera Pharmaceuticals – Buena Park, CA, USA) numa relação de 9 volumes de soro para 1 de DMSO numa concentração final de 3×10^7 células por tubo.

3.5.1 *Separação de monócitos*

Para separação dos monócitos, as células mononucleares totais que haviam sido congeladas, eram descongeladas no meio R-10 com antibiótico e mantidas por duas horas em placa de cultura em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ para aderência. Após as duas horas as células não-aderentes eram retiradas e as células aderentes eram consideradas os monócitos para uso nos experimentos de transfecção.

3.5.2 *Separação de linfócitos T por roseta de hemácias de carneiro modificadas*

As células não-aderentes retiradas após as 2 horas de aderência foram contadas e centrifugadas em tubo de 15 mL a 290 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 1 mL de meio R-10, acrescentando-se 0,5 mL de soro fetal bovino e 1 mL de suspensão de hemácias de carneiro modificadas com hidrobrometo 2-aminoetilisotioureonio (AET - Sigma-Aldrich – St Louis, MO, USA). A mistura foi homogeneizada com micropipeta e centrifugada a 200 x g por 5 min a 4 °C. A amostra foi colocada no gelo e no escuro por 1 hora. Após incubação foram retirados 10 µL do fundo do tubo e a formação de rosetas foi observada em microscópio. Com a confirmação da formação de rosetas foram adicionados 3 mL do meio de separação de linfócitos (Cambrex) no fundo do tubo e seguiu-se centrifugação a 900 x g por 35 min a 4 °C, sem freio. Formava-se um gradiente de densidade com as hemácias modificadas juntamente com os linfócitos T no fundo do tubo. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado, as células ressuspensas em 1 mL do tampão de lise de hemácias. Após incubação no gelo por 2 minutos foram adicionados 10 mL de meio R-10 e prosseguiu-se centrifugação a 290 x g por 10 min a 4 °C. Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensado em 10 mL de meio R-10. Após isso os linfócitos T foram corados para uso no experimento de proliferação.

3.6 Transfecção dos monócitos

As células eram descongeladas e colocadas 5×10^6 células/mL para aderência em placa de 12 poços. Após a retirada das células não-aderentes, foi repostado o meio de cultura R-10 nos poços e colocada a quantidade de RNA a ser transfectada passivamente, nada no controle, 0,5 μg , 1 μg , 5 μg e 10 μg de RNA total extraído da linhagem SK-BR-3. As placas foram mantidas em estufa com 5% de CO_2 a 37 °C pelo tempo necessário a cada transfecção: 12horas, 24horas e 48horas. Após esse tempo, a placa foi mantida por 5 min no gelo para soltar as células, que foram retiradas da placa com micropipeta e colocadas em microtubos para irradiação a 12,5 Gy em fonte de céσιο – ^{137}Cs . Após a irradiação as células eram lavadas com R-10 e usadas para análise das moléculas de superfície, e também como células apresentadoras no ensaio de proliferação.

3.7 Análise das moléculas de superfície por citometria de fluxo

As células foram soltas de maneira adequada e colocadas em microtubos numa concentração de 2×10^5 células para marcação com os anticorpos. Os microtubos foram centrifugados a 18000 x g por 10 seg a 4 °C e o sobrenadante foi dispensado. Foi adicionado 200 μL de PBS-BSA 0,5% e seguiu-se a mesma centrifugação. O último passo foi repetido mais uma vez. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 30 μL de PBS-BSA 0,5%. Foram adicionados 2 μL dos anticorpos específicos de cada marcação mostrados na tabela I, e após adição dos anticorpos as amostras foram incubadas por 20 minutos a 4 °C no escuro, como controle utilizou-se células sem marcação com os anticorpos. Ao término da incubação foram adicionadas à amostra 200 μL de PBS-BSA 0,5%, e seguiu-se a centrifugação a 18000 x g por 10 seg a 4 °C. O sobrenadante foi dispensado, e o processo de lavagem repetido por duas vezes para retirada do excesso de anticorpos. No final o sobrenadante foi dispensado e a amostra ressuspensa em 200 μL de PBS-BSA 0,5% adicionado de formaldeído 2% para fixação das células. No dia seguinte as amostras foram submetidas à leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences – San Diego, CA, USA), com leitura de um total de 10000 células por reação. Para análise dos resultados foi utilizado o software Flowjo (Tree Star, Inc – Ashland, OR, USA).

Tabela 1. Anticorpos monoclonais utilizados na citometria de fluxo.

Especificidade	Clone	Origem	Marcação	Fabricante
HLA-DR	G46-6 (L243)	IgG2a, κ de camundongo	FITC/APC	BD
HLA-A,B,C	G46-2.6	IgG1, κ de camundongo	PE	BD
CD14	M5E2	IgG2a, κ de camundongo	FITC/PE	BD
CD206	19.2	IgG1, κ de camundongo	PE	BD
Her-2/neu	Neu 24.7	IgG1, κ de camundongo	PE	BD
CD80	L307.4	IgG1, κ de camundongo	PE/ PE-Cy TM 5	BD
CD83	HB15e	IgG1, κ de camundongo	PE-Cy TM 5	BD
CD86	2331(fun-1)	IgG1, κ de camundongo	FITC/ PE-Cy TM 5	BD

3.8 Ensaio de proliferação linfocitária

3.8.1 Marcação dos linfócitos T com CFSE

Os linfócitos T separados foram contados e centrifugados a 290 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante era desprezado e as células ressuspensas em 1 mL de PBS-BSA 0,1% a cada 10^7 células com adição de 2 μ L de succinimidil éster diacetato carboxifluoresceína - CFSE 5mM (Invitrogen). As células foram incubadas em estufa a 37 °C, no escuro por 10 min. Após o tempo de incubação foi adicionado 5 mL de meio de cultura gelado, e seguiu-se incubação no gelo por 5 min. As células foram centrifugadas a 290 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e repetiu-se duas vezes a lavagem. As células foram contadas antes da última centrifugação e ressuspensas de maneira que tivessem 1×10^5 células em 100 μ L do meio R-10.

3.8.2 Co-cultura

Para co-cultura, foi plaqueado 1×10^4 monócitos transfectados passivamente com RNA total da linhagem SK-BR-3 em 100 μ L de R-10 em placa de 96 poços fundo em U, ao qual foi adicionado 100 μ L de linfócitos T autólogos com a quantidade de 1×10^5 células formando a relação apresentadora:respondedora de 1:10. Como controle foi mantido um poço só com linfócitos, um poço só com monócitos, um poço com linfócito ao qual era adicionado fitohemaglutinina A (PHA - Sigma-Aldrich – St Louis, MO, USA) – um mitógeno, e um poço

com monócitos sem transfectar e linfócitos. As placas foram mantidas por 5 dias em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C e após esse tempo o sobrenadante foi recolhido, as células ressuspendidas em 200 µL de PBS-BSA 0,5% e usadas para leitura de proliferação no FACSCalibur (BD), utilizando-se 10000 células por reação. Para análise dos resultados foi utilizado o software Winmdi (Purdue University- West Lafayette, IN, USA) e o software Flowjo (Tree Star).

3.9 ELISA para citocinas

Os sobrenadantes recolhidos das co-culturas foram usados para dosagem das citocinas IL-4, IL-10, IL-2, TNF e IFN-γ por ELISA utilizando os kits OptEIA para citocinas (BD Biosciences) seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, placas de 96 poços fundo chato foram cobertas com 50 µL/poço de anticorpo de captura diluídos 1:250 em tampão de captura. As placas foram seladas e incubadas por 18 horas a 4 °C. Foram lavadas três vezes, na lavadora automática de ELISA, com 300 µL/poço de tampão de lavagem, ao final retirava-se o excesso de tampão de lavagem batendo a placa contra uma superfície coberta com papel absorvente. As placas foram bloqueadas com 200 µL/poço de tampão de bloqueio e incubada a temperatura ambiente por 1 hora. Após incubação as placas foram lavadas com 300 µL/poço do tampão de lavagem, retirando-se o excesso de tampão no final. Foram colocados 45 µL/poço das amostras e das diluições utilizadas para fazer a curva padrão das citocinas em duplicata, a placa foi selada e incubada a temperatura ambiente por 2 horas. Após essa nova incubação as placas foram lavadas cinco vezes com 300 µL/poço, retirando-se excesso do tampão de lavagem no final. Foi adicionado 50 µL/poço do anticorpo de detecção diluído 1:250 e de SAV-HRP diluídos em tampão de bloqueio, a placa foi incubada por 1 hora no escuro a temperatura ambiente. Seguiu-se uma lavagem de sete vezes com 300 µL/poço de tampão de lavagem, retirando-se bem o excesso de tampão no final. Adicionou-se 50 µL/poço da solução de substrato e incubou-se por 30 min no escuro a temperatura ambiente. Foram adicionados 50 µL/poço da solução de parada e a densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro com filtro de 450nm. Para análise dos resultados foi utilizado o software SOFT max Pro (Molecular Devices – Union City, CA, USA).

3.10 Imunohistoquímica

A imunohistoquímica para o antígeno Her-2/neu foi realizada no departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo, em colaboração com o Dr. Fernando Soares. Foi usado o anticorpo primário anti-oncoproteína Her-2/neu (Dako – Via Real Carpinteria, CA, USA), no sistema de amplificação streptavidina-biotina (Kit LSAB – Dako).

3.11 Transcrição reversa e amplificação do mRNA de SK-BR-3

Para obtenção da primeira fita do cDNA, 300 ng do RNA total extraído com o kit foi submetida à transcrição reversa, num volume final de 20 µl, com 10 pmol do primer modificado de oligo-dT [5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT(30)VN-3'], onde V (G, A ou C) e N (G, T, A ou C) (IDT – Integrated DNA Technologies – Coralville, IA, USA), e 1 µL do mix de dNTPs 10 mM (Promega). Após incubação da reação a 70 °C por 15 min, esta foi refrigerada a 4 °C por 5 min, quando foi adicionado uma mistura contendo 200 unidades da enzima de transcrição reversa SuperScript III (Invitrogen – Carlsbad, CA, USA) com 4 µL do seu tampão 5x, 1 µL de DTT 0,1 M (Invitrogen), e 40 unidades de RNase OUT (Invitrogen). A reação foi mantida a 25 °C por 5 min, e depois por mais 1 hora a 42°C. Após essa primeira hora de transcrição reversa foi adicionado 10 pmol do primer T7 strand switch (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCGGG-3') (IDT) e a reação foi mantida mais 1 hora a 42 °C para obtenção da fita complementar. A inativação da reação foi feita a 70 °C por 15 minutos.

O cDNA foi amplificado pela adição de 2 µl do produto da reação de transcrição reversa em 50 µl de volume final da reação de PCR contendo 20 pmol dos seguintes primers: T7 PCR (5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3') (IDT) e 3' PCR (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') (IDT). As condições de amplificação foram adaptadas para a enzima GoTaq DNA polimerase (Promega) com adição de 2,5 unidades da enzima GoTaq DNA polimerase com 10 µL do seu tampão 5x, 1 µL do mix de dNTPs 10 mM (Promega) e 3 µL de MgCl₂ 25 mM (Promega). A condição do ciclo foi a seguinte: 2 min de desnaturação inicial a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 seg para desnaturação, 60 °C por 30 seg para anelamento, e 64 °C por 3 min para extensão, com uma extensão final a 64 °C por 5 min.

O produto da PCR foi purificado com o kit Purelink PCR purification kit (Invitrogen) e em seguida quantificado por espectrofotometria e estocado em -20°C .

As reações foram adaptadas de Boczkowski (2000).

3.12 Transcrição *in vitro* do mRNA de SK-BR-3

Para transcrição foi utilizado o DNA purificado, colocando-se num volume final de 15 μL : 200 ng do DNA resultante da PCR com 2 μL do tampão 5x da enzima, 5 μL de DTT 0,1 M (Invitrogen), 2 μL do mix de NTPs 10 mM (Invitrogen), com ou sem 2 μL de cap 5' 50 mM (Promega). Após uma incubação de 15 min a 37°C foi adicionado 50 unidades da enzima T7 RNA polimerase e manteve-se a reação por mais 15 min a 37°C . Parte do produto de mRNA dessa reação foi usada para verificação de integridade em eletroforese e o restante foi estocado a -80°C .

3.13 Análise estatística

Inicialmente, foi feito um teste de distribuição para avaliar se a distribuição era Gaussiana. Uma vez que os dados apresentaram distribuição normal, foi realizada a análise de variâncias (ANOVA) com o pós-teste de Tukey, que compara todos os grupos entre si. Considerou-se significância estatística quando o teste apresentou $p < 0,05$. A análise estatística dos resultados foi auxiliada pelo software GraphPad Prisma (Graphpad Software Inc. – La Jolla, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Análise fenotípica dos monócitos transfectados com RNA tumoral total isolado das células SK-BR-3

Resultados preliminares haviam mostrado que células transfectadas passivamente com RNA total extraído com Trizol da linhagem de adenocarcinoma mamário humano SK-BR-3 passavam a expressar um antígeno conhecido dessa linhagem, nesse caso o Her-2/neu, que é superexpresso nessa linhagem (Fig. 1). Visto que essas células passavam a expressar a proteína, ela poderia também apresentar, via MHC, peptídeos antigênicos provenientes da linhagem tumoral.

Com o intuito de verificar se essa transfecção com RNA tumoral total causava alguma modificação na expressão de moléculas de superfície nesses monócitos, foi avaliado o perfil de expressão das seguintes moléculas de superfície: HLA-DR, CD14, CD80 e CD86. A molécula HLA-DR (MHC de classe II) foi analisada por ser a molécula que apresenta peptídeos antigênicos para reconhecimento pelo TCR dos linfócitos T. CD14 é o receptor “scavenger” característico de monócitos e macrófagos, e marcador dessas células. CD80 e CD86 são moléculas co-estimuladoras importantes na ativação linfocitária.

Foram avaliados os monócitos transfectados por 12h, 24h ou 48h com as doses de 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg e 10 µg de RNA tumoral total extraídos das células SK-BR-3, como controle utilizaram-se monócitos sem transfectar. Tanto o controle quanto os monócitos transfectados apresentaram a mesma expressão das moléculas de superfície, independente do tempo e da dose de transfecção. A figura 2 mostra a expressão das moléculas quando os monócitos foram transfectados por 24h, sendo representativa de todos os tempos utilizados.

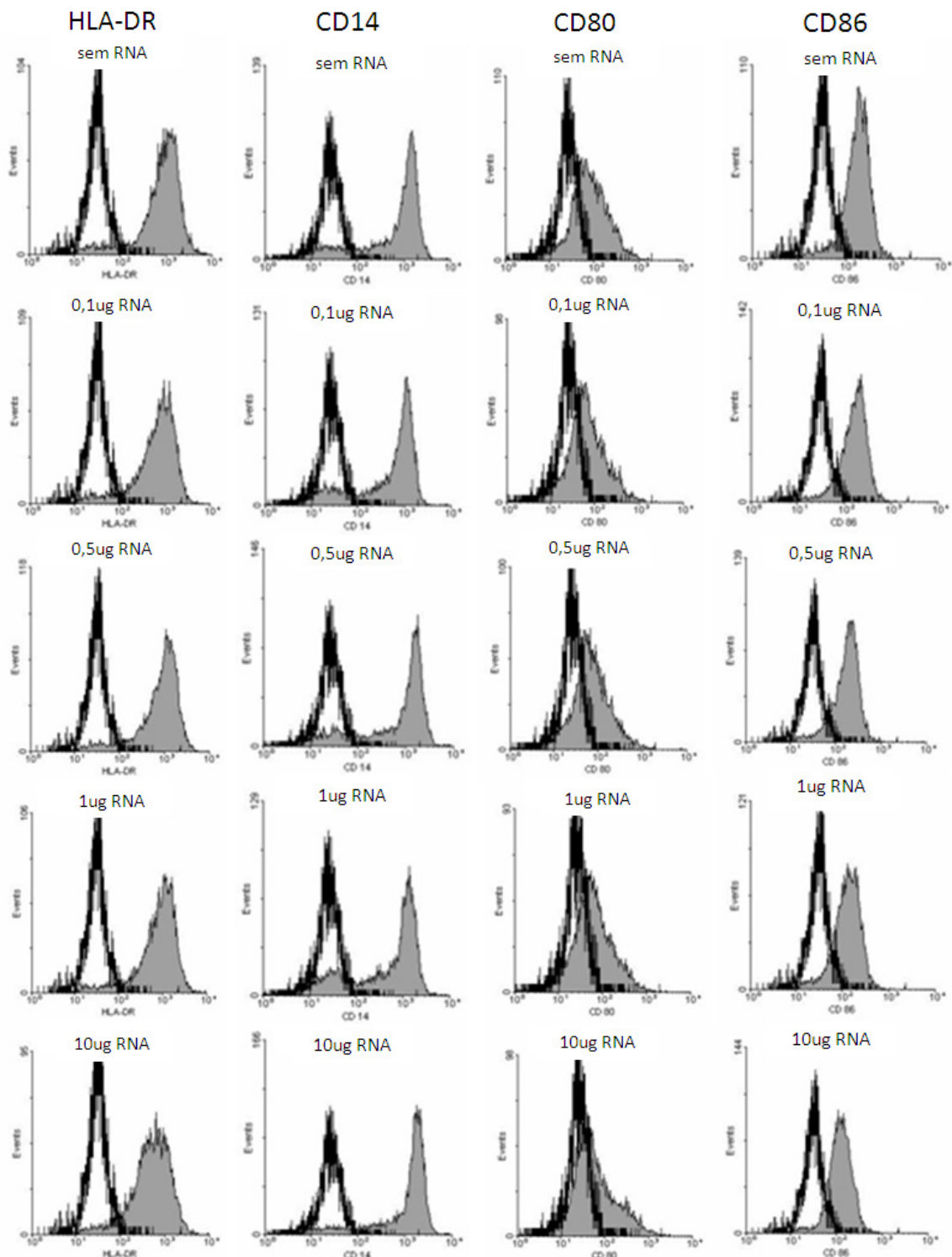


Figura 2. Histogramas representativos da expressão das moléculas de superfície HLA-DR, CD14, CD80 e CD86 na superfície de monócitos não transfectados ou transfectados, 10^6 células, por 24h com RNA tumoral total de SK-BR-3, nas doses de 0,1 μ g 0,5 μ g, 1 μ g e 10 μ g. O histograma vazio representa o controle de células não-marcadas e o histograma cheio (em cinza) a população marcada com os anticorpos específicos. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisadas as células viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) característicos de monócitos/macrófagos. Dado representativo de 2 experimentos independentes.

4.2 Potencial linfo-estimulador de monócitos transfectados com RNA tumoral total isolado das células SK-BR-3

Apesar de não ser notada nenhuma alteração na expressão das moléculas de superfície relacionadas à apresentação antigênica e co-estimulação, verificamos o potencial linfo-estimulador dessas células transfectadas passivamente (Fig. 3). Quando foi usado 1ug de RNA total extraído com Trizol para transfecção, por 24horas, dos monócitos, essas células foram capazes de induzir linfoproliferação autóloga, enquanto as células não transfectadas não apresentavam essa capacidade, e também a própria célula da linhagem tumoral SK-BR-3 não foi capaz de induzir uma proliferação linfocitária considerável. Os linfócitos que foram mantidos sem estímulos não proliferaram, como esperado, enquanto os linfócitos que receberam o estímulo do mitógeno fitohemaglutinina proliferaram mais intensamente do que as células que receberam o estímulo dos monócitos transfectados com RNA tumoral.

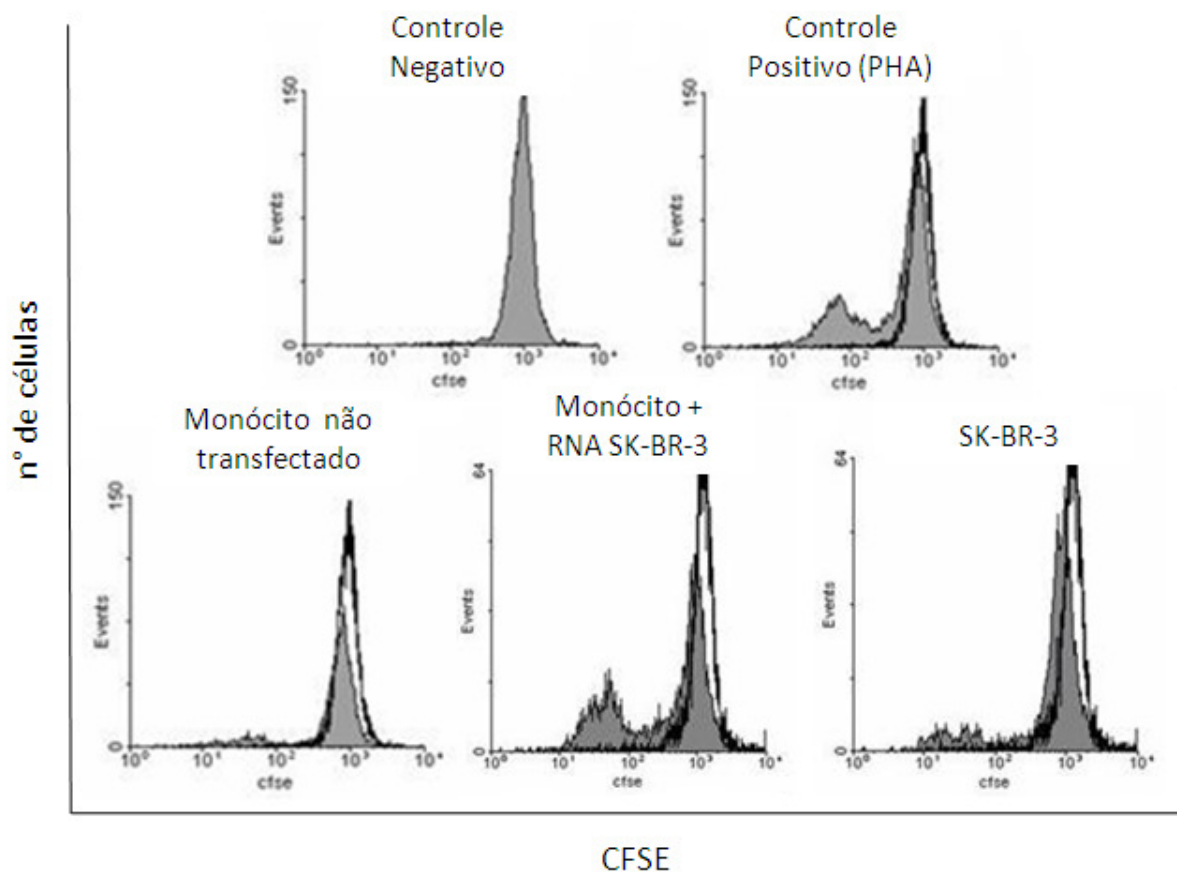


Figura 3. Potencial linfo-estimulador de monócitos transfectados com RNA tumoral total em co-cultura por 7 dias com linfócitos autólogos. Foram usados 10^4 monócitos não transfectados, 10^4 transfectados por 24h com $1 \mu\text{g}$ de RNA total de SK-BR-3, e 10^4 células SK-BR-3 como estimuladoras para 10^5 linfócitos autólogos. No controle negativo foram mantidos linfócitos sem estímulo. Como controle positivo foi estimulada proliferação linfocitária com o mitógeno PHA. Como controle de proliferação espontânea usou-se monócitos não transfectados em co-cultura com linfócitos autólogos. E os experimentais foram: linfoproliferação induzida por monócitos transfectados por 24h com $1 \mu\text{g}$ de RNA total de SK-BR-3, e linfoproliferação induzida pelas células SK-BR-3 em co-cultura com linfócitos. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisados os linfócitos viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) característicos de linfócitos. O histograma vazio representa o controle negativo de linfócitos que não receberam estímulos e o histograma cheio (em cinza) representa a população de linfócitos experimental. Representativo de 4 experimentos independentes.

4.3 Efeito da dose e do tempo de RNA tumoral total transfectado nos monócitos sobre a resposta linfo-estimuladora

Confirmado que monócitos transfectados com RNA tumoral total induziam proliferação dos linfócitos em co-cultura, investigamos o efeito da dose e do tempo de RNA usado nessa transfecção sobre a proliferação dos linfócitos. Como controle de proliferação espontânea foi usada a co-cultura de linfócitos com monócitos autólogos não-transfectados por 7 dias.

Independente do tempo de transfecção, a partir da dose de 0,1 µg de RNA tumoral total transfectado foi possível observar uma resposta linfoproliferativa discreta. Nestas condições a porcentagem de células que proliferou variou de 11,84 a 14,87 %, contra uma proliferação de 8,84 a 10,43% induzida por monócitos não transfectados. Com a dose de 10 µg foi obtida a melhor resposta proliferativa, também independente do tempo de transfecção, com as porcentagens variando de 17,50 a 30,78% de proliferação.

O tempo de transfecção também foi importante para a resposta, porque apesar do fenômeno ser o mesmo, a intensidade da resposta foi aumentando com o tempo. Com 12h de transfecção tivemos um máximo de 17,5% de proliferação linfocitária com a dose de 10 µg de RNA transfectado (Fig. 4), enquanto que com 24h foi visto um máximo de 20,72% (Fig. 5) e com 48h 30,78% (Fig. 6). Assim sendo, foi possível correlacionar uma melhor resposta proliferativa com uma maior dose e um maior tempo de transfecção dos monócitos.

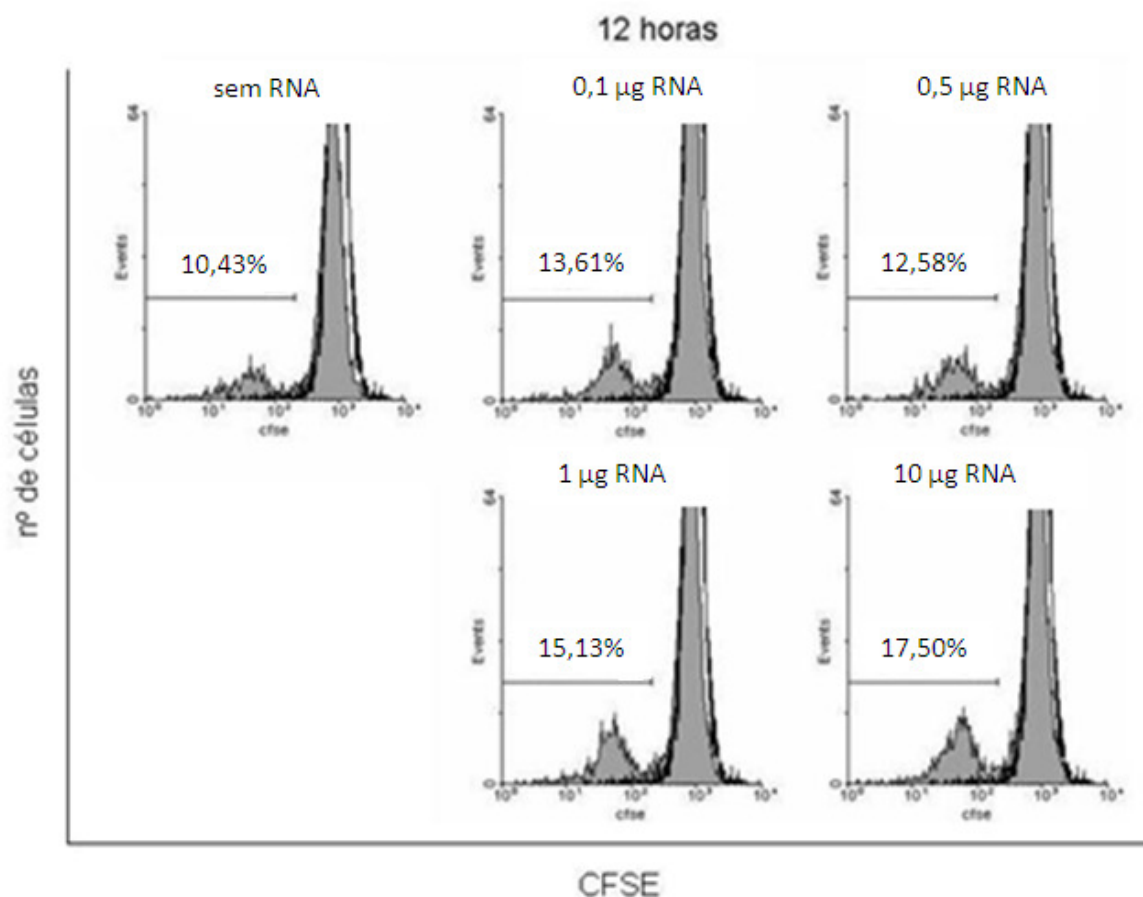


Figura 4. Potencial linfo-estimulador de monócitos transfectados por 12h com RNA tumoral total, nas doses de 0 µg, 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg e 10 µg. Foram usados 10⁴ monócitos não transfectados ou 10⁴ monócitos transfectados com de RNA total de SK-BR-3 como estimuladoras para 10⁵ linfócitos autólogos. Como controle de proliferação espontânea usou-se monócitos não transfectados em co-cultura com linfócitos autólogos. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisados os linfócitos viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) característicos de linfócitos. O histograma vazio representa o controle negativo de linfócitos que não receberam estímulos e o histograma cheio (em cinza) representa a população de linfócitos experimental. Representativo de 2 experimentos independentes.

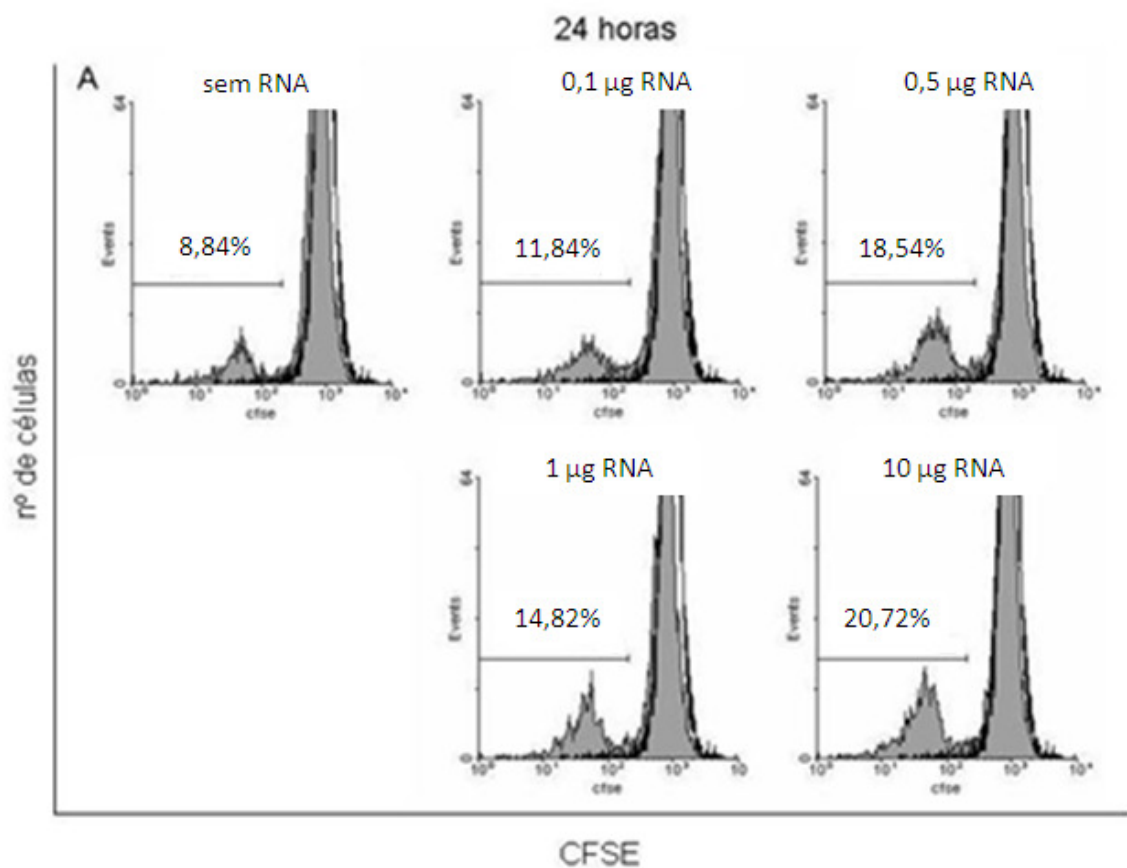


Figura 5. Potencial linfo-estimulador de monócitos transfectados por 24h com RNA tumoral total, nas doses de 0 µg, 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg e 10 µg. Foram usados 10^4 monócitos não transfectados ou 10^4 monócitos transfectados com de RNA total de SK-BR-3 como estimuladoras para 10^5 linfócitos autólogos. Como controle de proliferação espontânea usou-se monócitos não transfectados em co-cultura com linfócitos autólogos. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisados os linfócitos viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) característicos de linfócitos. O histograma vazio representa o controle negativo de linfócitos que não receberam estímulos e o histograma cheio (em cinza) representa a população de linfócitos experimental. Representativo de 2 experimentos independentes.

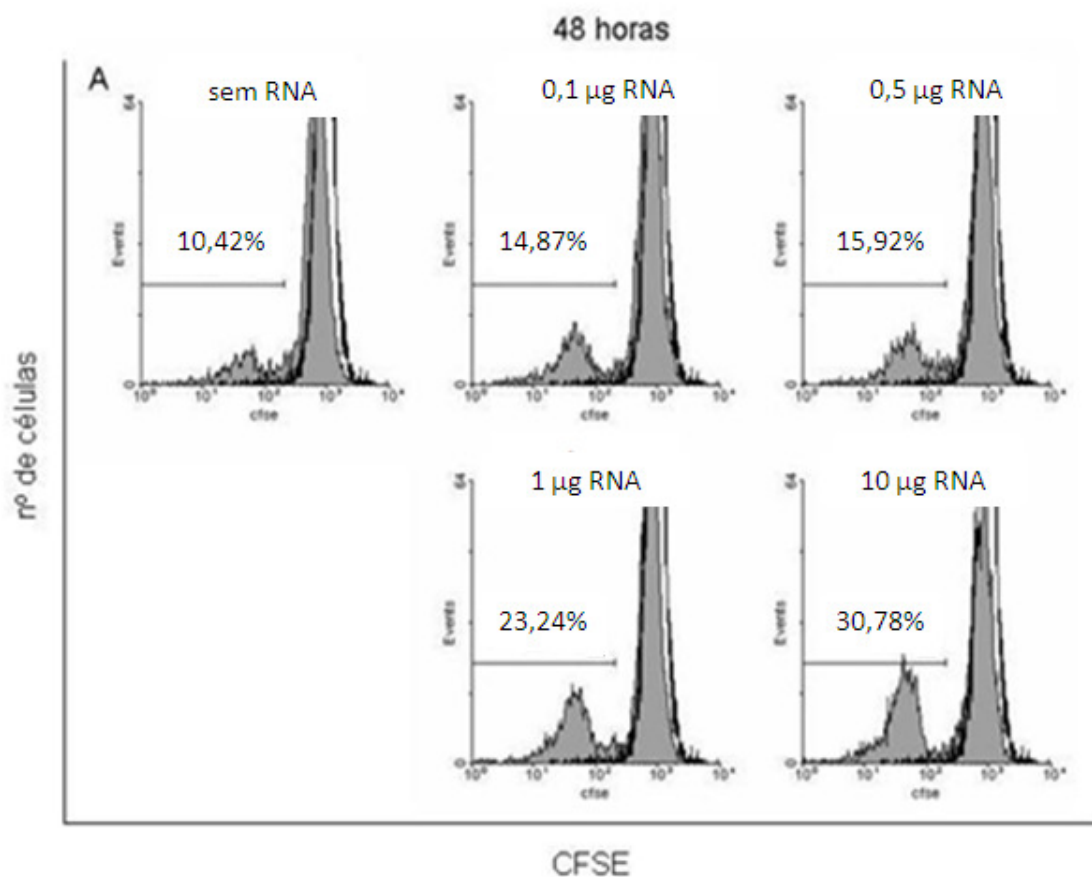


Figura 6. Potencial linfo-estimulador de monócitos transfectados por 48h com RNA tumoral total, nas doses de 0 µg, 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg e 10 µg. Foram usados 10^4 monócitos não transfectados ou 10^4 monócitos transfectados com de RNA total de SK-BR-3 como estimuladoras para 10^5 linfócitos autólogos. Como controle de proliferação espontânea usou-se monócitos não transfectados em co-cultura com linfócitos autólogos. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisados os linfócitos viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) característicos de linfócitos. O histograma vazio representa o controle negativo de linfócitos que não receberam estímulos e o histograma cheio (em cinza) representa a população de linfócitos experimental. Representativo de 2 experimentos independentes.

4.4 Citocinas liberadas

Havendo a resposta proliferativa passamos a investigar quais eram as citocinas produzidas durante a co-cultura. Os sobrenadantes da co-cultura dos monócitos não transfectados ou transfectados com linfócitos autólogos foram analisados, por ELISA, para as citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10, que representavam três padrões possíveis de resposta. As citocinas IL-4 e IL-10 não foram detectadas em nenhuma das condições estudadas. Já o IFN- γ foi detectado em todos os sobrenadantes de co-cultura.

A citocina IFN- γ foi detectada na co-cultura onde os monócitos não haviam sido transfectados, com queda nessa produção quando era aumentado o tempo de transfecção e/ou cultura desses monócitos. A detecção nesse grupo variou de 200 a 75 pg/mL.

Quando os monócitos eram transfectados com as doses de 0,1 μ g e 0,5 μ g e co-cultivados com os linfócitos autólogos havia uma queda na produção de IFN- γ , com a detecção caindo também com o aumento do tempo de transfecção, a variação detectada foi de 100 a 50 pg/mL.

A dose de 1 μ g de RNA usado na transfecção, fez com que a produção da citocina IFN- γ se mantivesse igual ao controle. E a dose de 10 μ g de RNA é a única capaz de fazer com que os monócitos transfectados induzam liberação de IFN- γ na co-cultura. A detecção dessa citocina nesse grupo variou e torno de 200 pg/mL.

A figura 7 mostra a média de produção de IFN- γ durante as co-culturas. Quando se analisa somente os grupos transfectados pode-se perceber um efeito crescente da citocina de acordo com aumento da dose de RNA usada na transfecção dos monócitos, independentemente do tempo de transfecção.

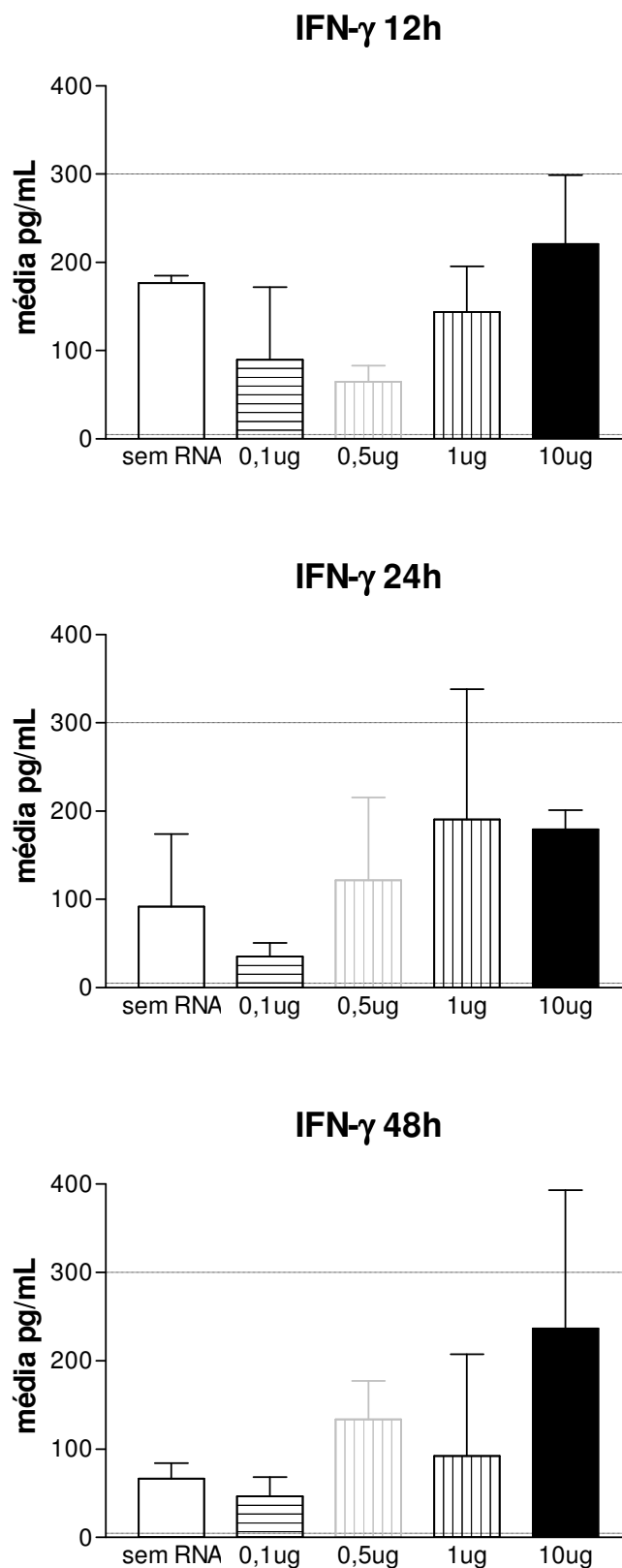


Figura 7. Detecção de IFN- γ nos sobrenadantes das co-culturas de 7 dias entre linfócitos e monócitos não-transfectados ou transfectados com 0,1 μ g, 0,5 μ g, 1 μ g e 10 μ g com RNA tumoral total por 12h, 24h e 48h. As linhas pontilhadas representam o mínimo e o máximo de detecção da curva padrão do kit e as barras mostram o desvio padrão. Dados de 2 experimentos independentes.

Assim, os resultados preliminares nos mostraram que a transfecção era capaz de induzir resposta proliferativa, sendo essa dependente da dose e do tempo usado na transfecção dos monócitos com RNA tumoral total. Foi também observada durante essa cocultura a produção de IFN- γ , também dependente da dose e do tempo usado na transfecção dos monócitos com RNA tumoral total.

Com o intuito de confirmar os resultados, mudamos a maneira de extrair o RNA, passamos de Trizol para um kit que isola o RNA total com colunas, que foi escolhido por sua maior agilidade na extração e também pela garantia de pureza do material isolado. Para garantir que não houvesse qualquer tipo de contaminação das culturas foi adicionado antibiótico ao meio de cultura, já que o RNA não era extraído de maneira estéril.

4.5 Comparação entre as diferentes técnicas de isolar o RNA total de SK-BR-3

Após o isolamento de RNA total com kit de extração foi percebida uma grande diferença no padrão de migração das bandas por eletroforese em gel de agarose. Na comparação entre os dois géis que serviram para confirmar a integridade do material, foi observado que na extração feita com Trizol havia 2 bandas que foram confundidas com as bandas 28S e 18S do RNA ribossomal (Fig. 8A – poços 1 e 2). Uma das amostras apresentava 4 bandas - poço nº 3 (Fig. 8A), 2 delas possuíam um material de grande tamanho, visto que sua migração no gel era bem menor, e as outras 2 bandas eram o RNA ribossomal.

O material isolado com o kit apresentava as três únicas bandas esperadas. As duas bandas referentes ao RNA ribossomal e outra banda onde parou a migração da amostra de RNA total (Fig. 8B).

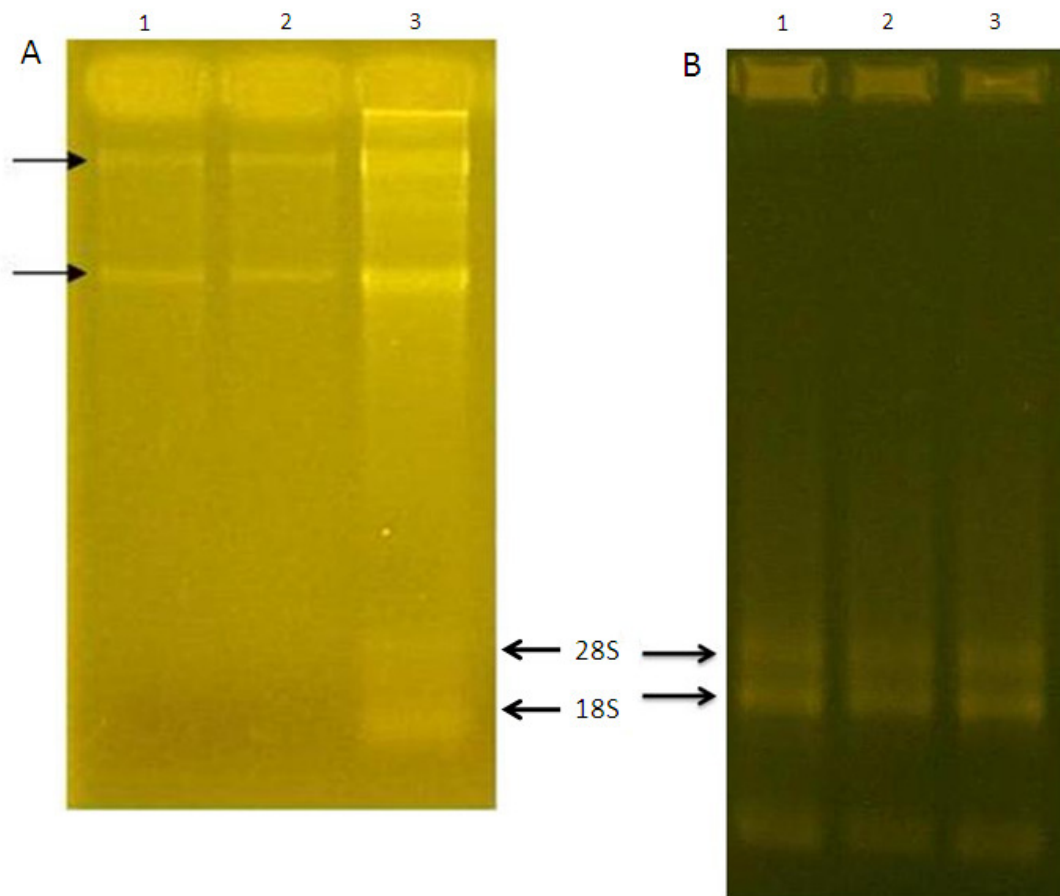


Figura 8. Perfil de migração por eletroforese em gel de agarose das amostras de RNA total, comparando dois métodos diferentes de isolar o RNA total de SK-BR-3. (A) Extração do RNA feita com Trizol, mostrando nos poços 1 e 2 as duas bandas de contaminação, e no poço 3 as duas bandas de RNA ribossomal 28S e 18S, assim como a contaminação. (B) Extração com kit de coluna, mostrando uma extração pura onde só há bandas de RNA, com as bandas 28S e 18S do RNA ribossomal e a banda de parada de migração do material. Representativo de todas as extrações realizadas com cada um dos métodos.

Esse dado de possível contaminação reforçou nossa intenção em refazer os experimentos com o novo método, e com o antibiótico no meio de cultura, a fim de garantir que o resultado que estávamos tendo seria por apresentação de antígenos tumorais contidos na linhagem usada para extração do RNA total, e não por uma possível contaminação do material utilizado.

4.6 Análise fenotípica dos monócitos transfectados com RNA tumoral total isolado (com kit) das células SK-BR-3

Com o intuito de verificar se a transfecção com RNA tumoral causava alguma modificação na expressão de moléculas de superfície associadas à apresentação de antígenos e ativação dos monócitos, foram analisadas as mesmas moléculas vistas anteriormente com adição das moléculas: CD206, HLA-A,B,C e CD83. HLA-A,B,C é uma molécula de apresentação antigênica contida em todas as células. CD206 é receptor para manose, responsável pela endocitose de microorganismos que expressam esse carboidrato, esse receptor é expresso por macrófagos e DCs geradas em cultura a partir de monócitos, mas não em monócitos. CD83 é um marcador de ativação de DCs. Adicionalmente, foi avaliada a expressão de Her-2/neu, um antígeno superexpresso por SK-BR-3, cuja expressão foi avaliada como possível indicador do sucesso da transfecção.

Da mesma forma que no experimento anterior, a porcentagem de células positivas para cada marcador não mudou, com uma única exceção, quando os monócitos eram transfectados com as diferentes doses de RNA, comparando-se as células de um mesmo doador. Embora entre os diferentes doadores houvesse diferenças no percentual de células positivas para os marcadores. Apenas o percentual de células positivas para CD14 mostrou um aumento significativo nos grupos transfectados por 48h, independente da dose de RNA usada na transfecção.

Assim, as figuras de 9 a 12 ilustram o percentual de células positivas para os marcadores quando os monócitos não foram transfectados, ou foram transfectados com 1 µg e 10 µg de RNA tumoral total.

A porcentagem de células positivas para HLA-DR se manteve constante nos diferentes tempos usados para transfecção, independente da dose de RNA usada na transfecção, com tendência a queda no número de células positivas apenas com 10 µg de RNA transfectado por 24h (Fig. 9). A porcentagem de células positivas para HLA-A,B,C tendeu a cair com o tempo de transfecção usado, mas independentemente da dose de RNA usada nessas transfecções (Fig. 9), com o mínimo em 75% de células positivas.

A porcentagem de células positivas para CD14 tendeu a cair com o tempo de transfecção usado, com um mínimo de 50% de células positivas, mas de maneira independente da dose de RNA usada nessas transfecções, com exceção da transfecção por

48h com 1 e 10 μg de RNA que teve um maior número de células positivas, significativo em relação ao controle (Fig. 10). Um efeito oposto foi visto no percentual de células positivas para CD206. O número de células positivas para esse marcador tendeu a subir com 24h de transfecção, com seu máximo em 50%, independente da dose de RNA, e voltou a cair com 48h, mas se manteve um pouco acima do percentual de 12h (Fig. 10).

CD80 teve uma leve queda no percentual de células positivas em 24h e 48h em relação a 12h de transfecção, mas com 48h com tendência a um percentual maior que o de 24h, também independente da dose de RNA usada, com exceção da transfecção com 10 μg por 48h que teve seu percentual de células positivas acima do grupo transfectado com 10 μg por 12h (Fig. 11). A porcentagem máxima de positividade para CD80 não atingiu 50%.

CD86 tendeu a cair com 24h de transfecção, e voltou a subir com 48h, mas sem atingir o mesmo percentual de 12h, independente da dose de RNA transfectada. Com seu percentual mínimo em 75% (Fig. 11).

CD83 teve uma queda no percentual de células positivas nas transfecções de 24h e 48h em relação a 12h de transfecção, sendo que o percentual de 24h e 48h se manteve semelhante. O percentual mínimo ficou em torno de 50% de células positivas (Fig. 12).

O percentual de células positivas para Her-2/neu se manteve constante em 30% das células positivas quando os monócitos não eram transfectados ou eram transfectados com 1 μg de RNA, independente do tempo usado na transfecção. Na dose de transfecção de 10 μg , houve um aumento no percentual de células positivas com o aumento do tempo usado para transfecção, entretanto, sem significância e com o percentual máximo em torno de 30% das células, como mostrado na figura 12.

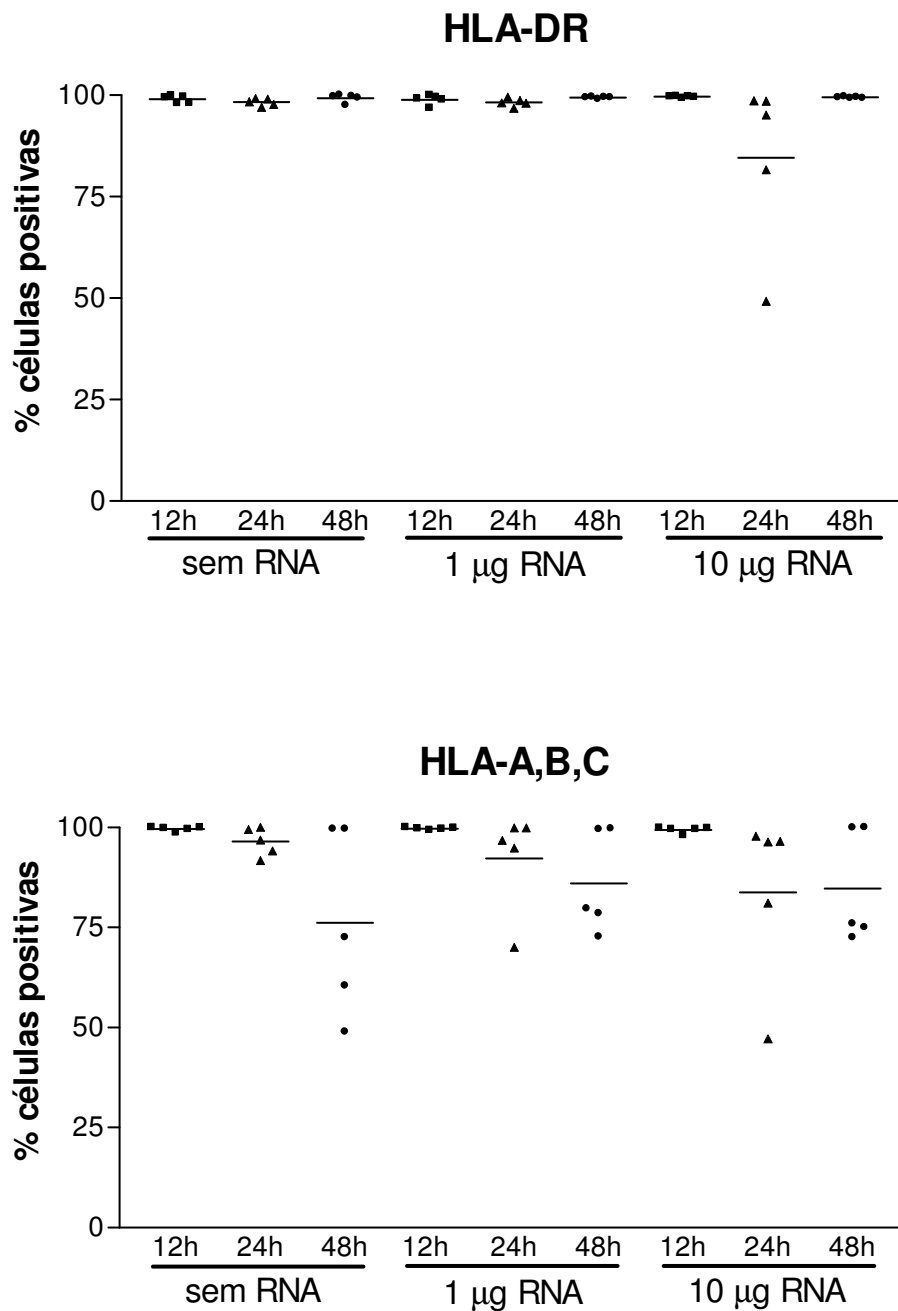


Figura 9. Percentual de células positivas para as moléculas de superfície HLA-DR e HLA-A,B,C nos monócitos não transfectados ou transfectados, 10^6 células, por 12h, 24h e 48h com RNA tumoral total de SK-BR-3, nas doses de 1 µg e 10 µg. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisadas as células viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) característicos de monócitos/macrófagos. Dados de 5 experimentos independentes. Quando as amostras estavam dentro da distribuição Gaussiana, foi feita análise de variância (ANOVA) com o pós-teste de Tukey.

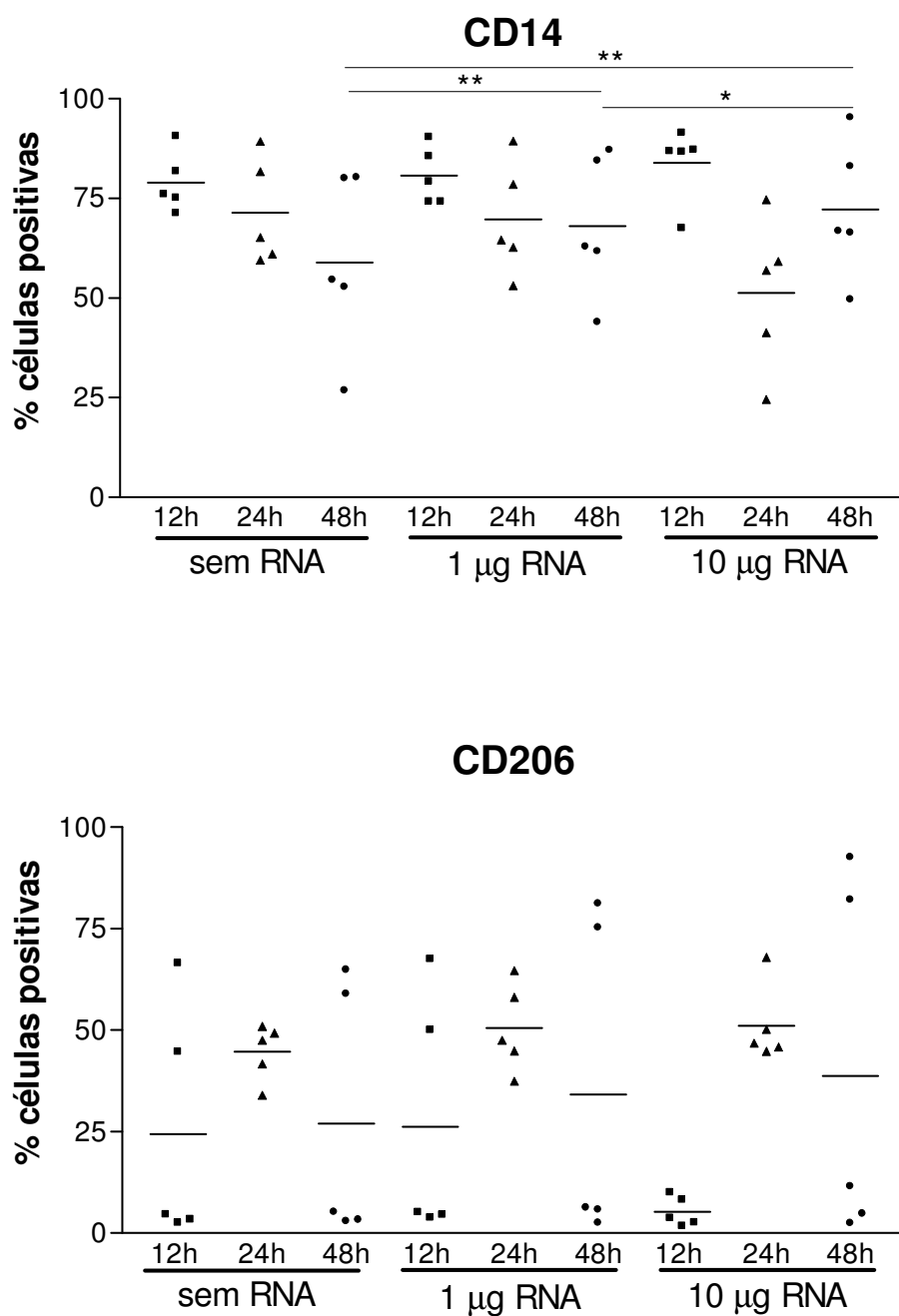


Figura 10. Percentual de células positivas para as moléculas de superfície CD14 e CD206 nos monócitos não transfectados ou transfectados, 10^6 células, por 12h, 24h e 48h com RNA tumoral total de SK-BR-3, nas doses de 1 µg e 10 µg. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisadas as células viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) característicos de monócitos/macrófagos. Dados de 5 experimentos independentes. Quando as amostras estavam dentro da distribuição Gaussiana, foi feita análise de variância (ANOVA) com o pós-teste de Tukey.

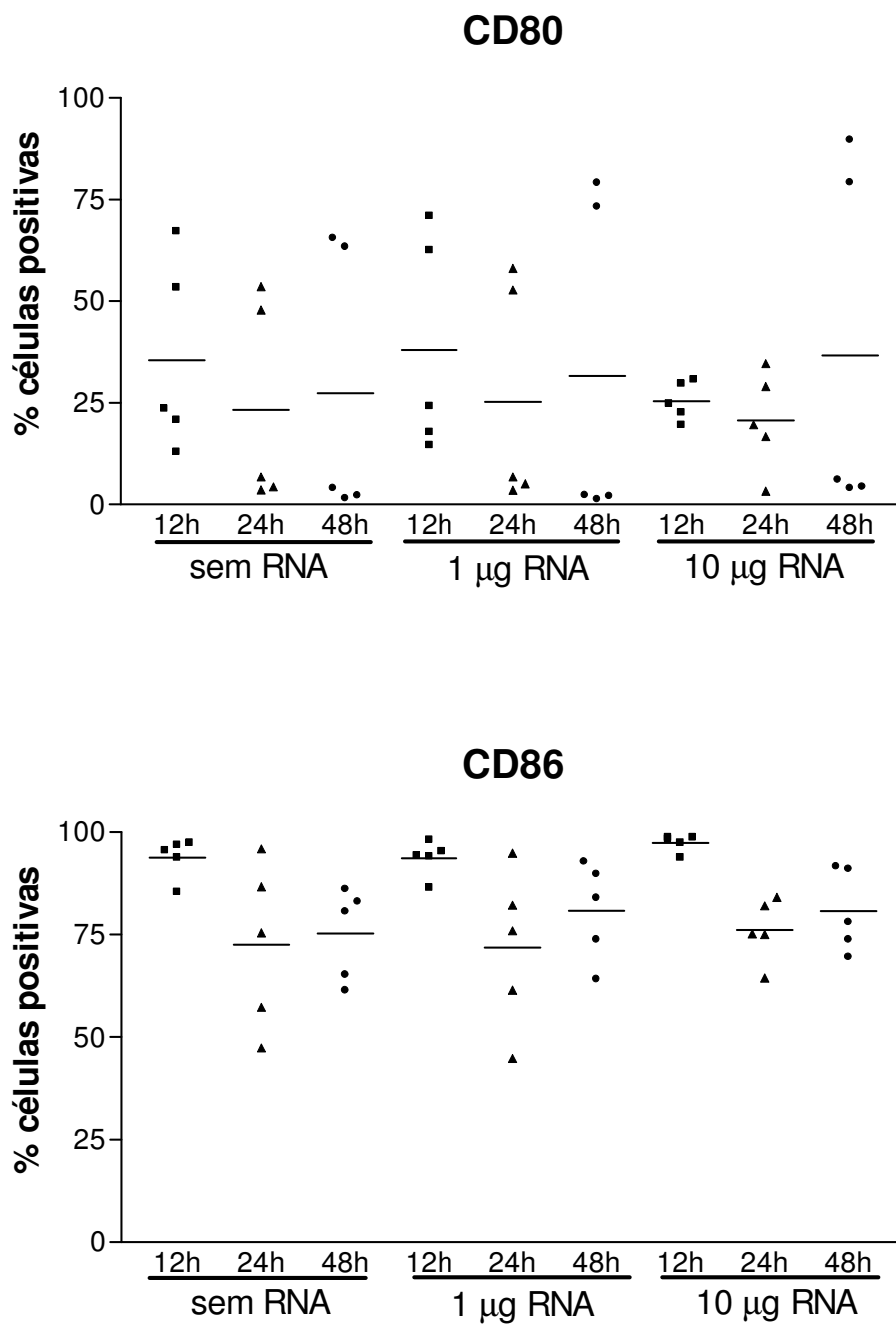


Figura 11. Percentual de células positivas para as moléculas de superfície CD80 e CD86 nos monócitos não transfectados ou transfectados, 10^6 células, por 12h, 24h e 48h com RNA tumoral total de SK-BR-3, nas doses de 1 µg e 10 µg. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisadas as células viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) característicos de monócitos/macrófagos. Dados de 5 experimentos independentes. Quando as amostras estavam dentro da distribuição Gaussiana, foi feita análise de variância (ANOVA) com o pós-teste de Tukey.

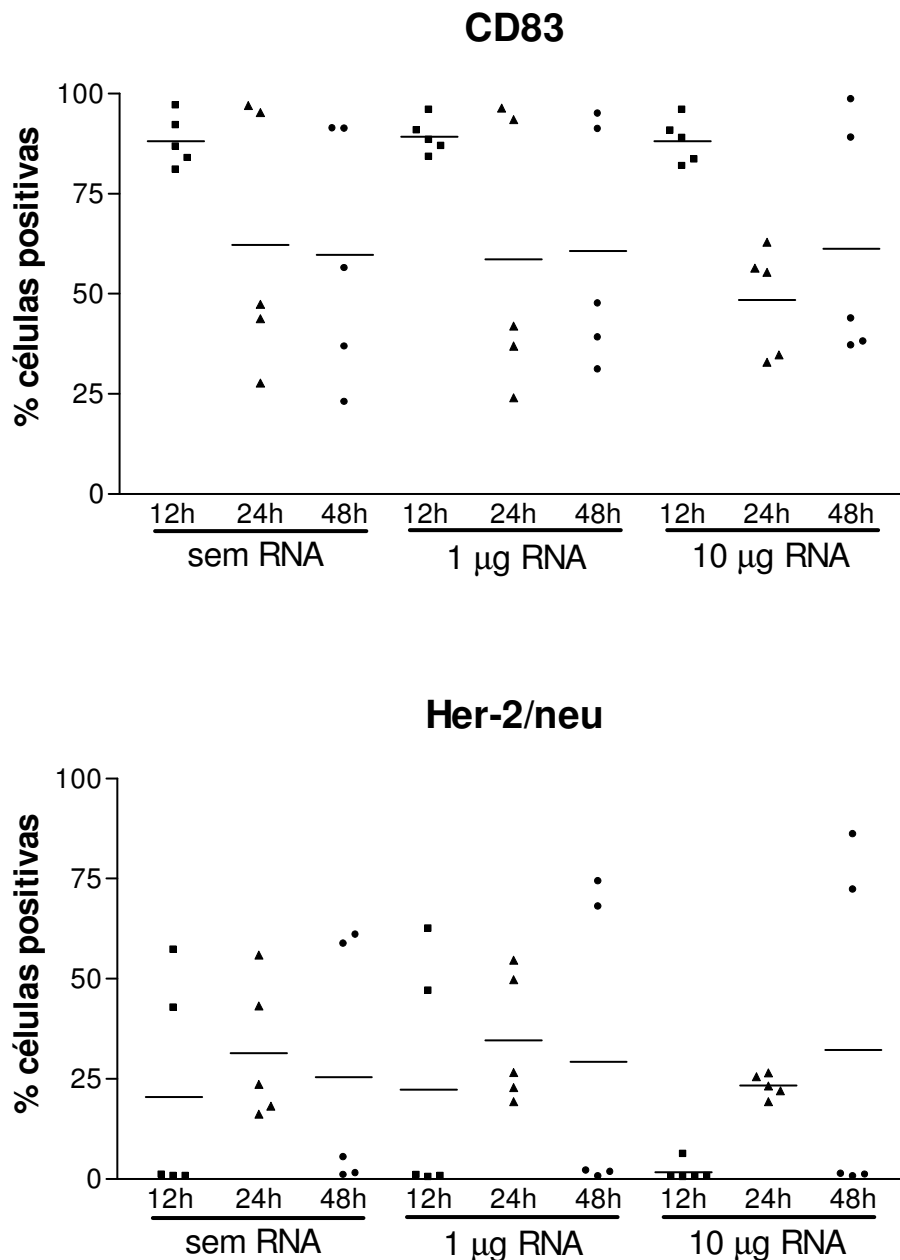


Figura 12. Percentual de células positivas para as moléculas de superfície CD83 e Her-2/neu nos monócitos não transfectados ou transfectados, 10^6 células, por 12h, 24h e 48h com RNA tumoral total de SK-BR-3, nas doses de 1 µg e 10 µg. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisadas as células viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) característicos de monócitos/macrófagos. Dados de 5 experimentos independentes. Quando as amostras estavam dentro da distribuição Gaussiana, foi feita análise de variância (ANOVA) com o pós-teste de Tukey.

Além da análise do percentual de células positivas para as moléculas de superfície, foi feita também análise da intensidade média de fluorescência (MFI) das mesmas. Como exemplo geral da expressão das moléculas é mostrado nas figuras 13 e 14 o nível de expressão dos marcadores quando os monócitos não foram transfectados ou foram transfectados por 24h, com as diferentes doses de RNA tumoral total. Havia alta expressão de HLA-DR, expressão intermediária de HLA-A,B,C, CD14, CD86 e CD83, baixa expressão de CD206, e baixíssima expressão de CD80 e Her-2/neu.

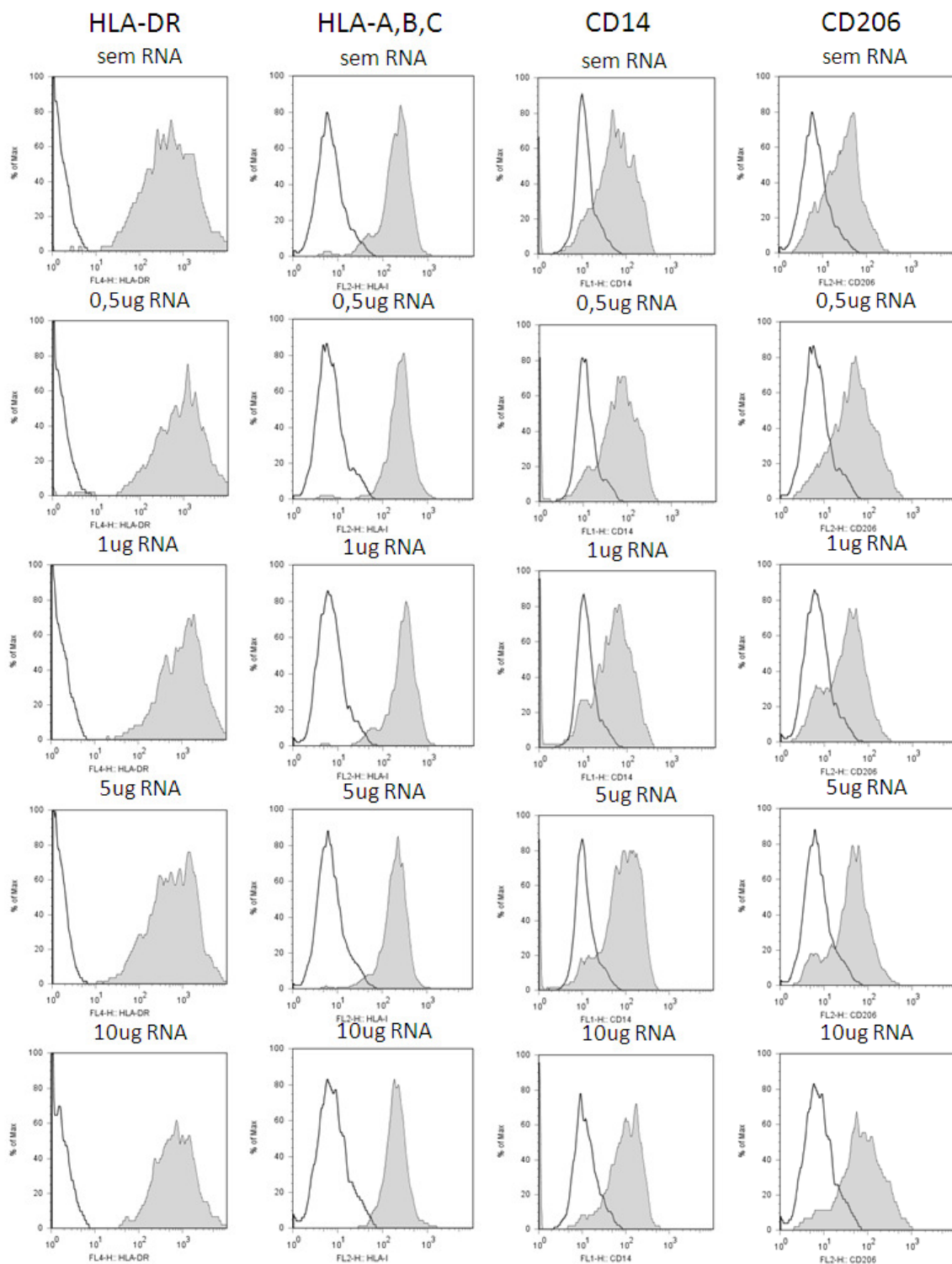


Figura 13. Histogramas representativos da expressão das moléculas de superfície HLA-DR, HLA-A,B,C, CD14 e CD206 na superfície de monócitos não transfectados ou transfectados, 10^6 células, por 24h com RNA tumoral total de SK-BR-3, nas doses de 0,1 μ g, 0,5 μ g, 1 μ g e 10 μ g. O histograma vazio representa o controle de células não-marcadas e o histograma cheio (em cinza) a população marcada com os anticorpos específicos. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisadas as células viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) característicos de monócitos/macrófagos. Dado representativo de 5 experimentos independentes.

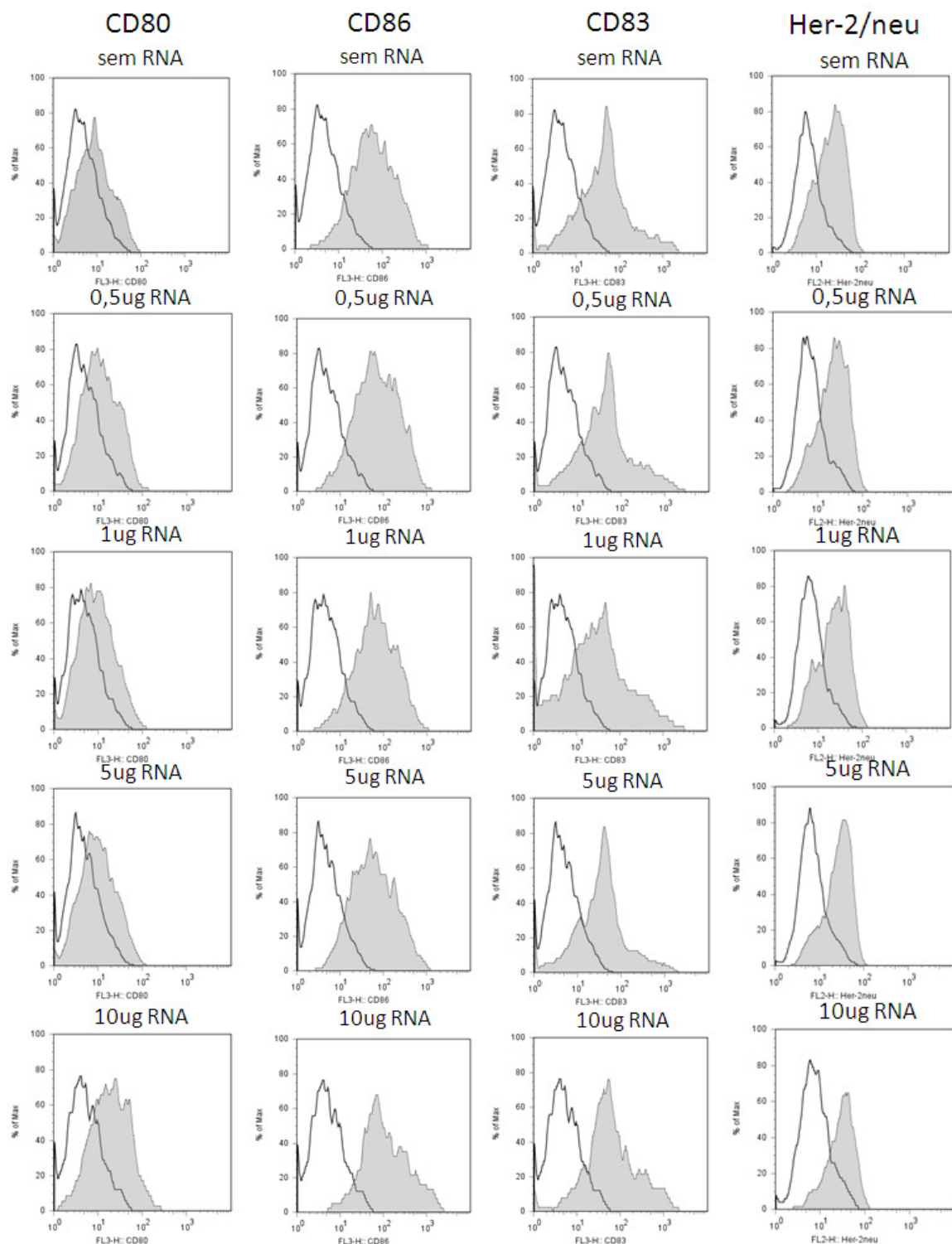


Figura 14. Histogramas representativos da expressão das moléculas de superfície CD80, CD86, CD83 e do antígeno Her-2/neu na superfície de monócitos não transfectados ou transfectados, 10^5 células, por 24h com RNA tumoral total de SK-BR-3, nas doses de 0,1 μ g, 0,5 μ g, 1 μ g e 10 μ g. O histograma vazio representa o controle de células não-marcadas e o histograma cheio (em cinza) a população marcada com os anticorpos específicos. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisadas as células viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) característicos de monócitos/macrófagos. Dado representativo de 5 experimentos independentes.

Numa análise mais detalhada comparou-se a média do MFI nas diferentes condições experimentais usadas, monócitos sem transfectar ou transfectados por 12h, 24h e 48h com 0,5 µg, 1 µg, 5 µg e 10 µg de RNA tumoral total.

A quantidade de moléculas de HLA-DR expressas na superfície dos monócitos aumentou de 12h para 24h de cultura, voltando a cair em 48h para o nível de expressão de 12h, e a transfecção com RNA tumoral total não interferiu na expressão dessas moléculas. A variação foi de um MFI de 200 em 12h para um MFI de 1000 em 24h, voltando a um MFI de 200 em 48h (Fig. 15).

A quantidade de moléculas de HLA-A,B,C na superfície dos monócitos caiu com o tempo, a queda foi independente da transfecção dessas células com RNA tumoral total. O MFI dessa molécula em 12h era 500, caindo para 250 em 24h e 100 em 48h (Fig. 15).

A expressão da molécula CD14 na superfície dos monócitos não variou conforme o tempo de manutenção dessas células em cultura, mas sim com a dose de RNA tumoral total usada na transfecção desses monócitos. Com a transfecção de 5 e 10 µg de RNA tumoral total por 12h, a quantidade de moléculas expressas na superfície dos monócitos subiu, já na transfecção com 10 µg por 24h a quantidade de moléculas expressas na superfície dos monócitos caiu. A transfecção por 48h não causou nenhuma alteração na expressão de CD14 na superfície dos monócitos (Fig. 15).

Com a molécula C206 houve um aumento no número de moléculas de 12h para 24h de cultura, com os níveis se mantendo de 24h para 48h, independente da transfecção com RNA. Houve um aumento de um MFI de 20 em 12h para um MFI de 50 em 24h e 48h. Com a transfecção, só foi possível ver um aumento na expressão das moléculas com 10 µg de RNA tumoral total transfectado por 24h, que fez com que o MFI chegasse perto de 100 (Fig. 15).

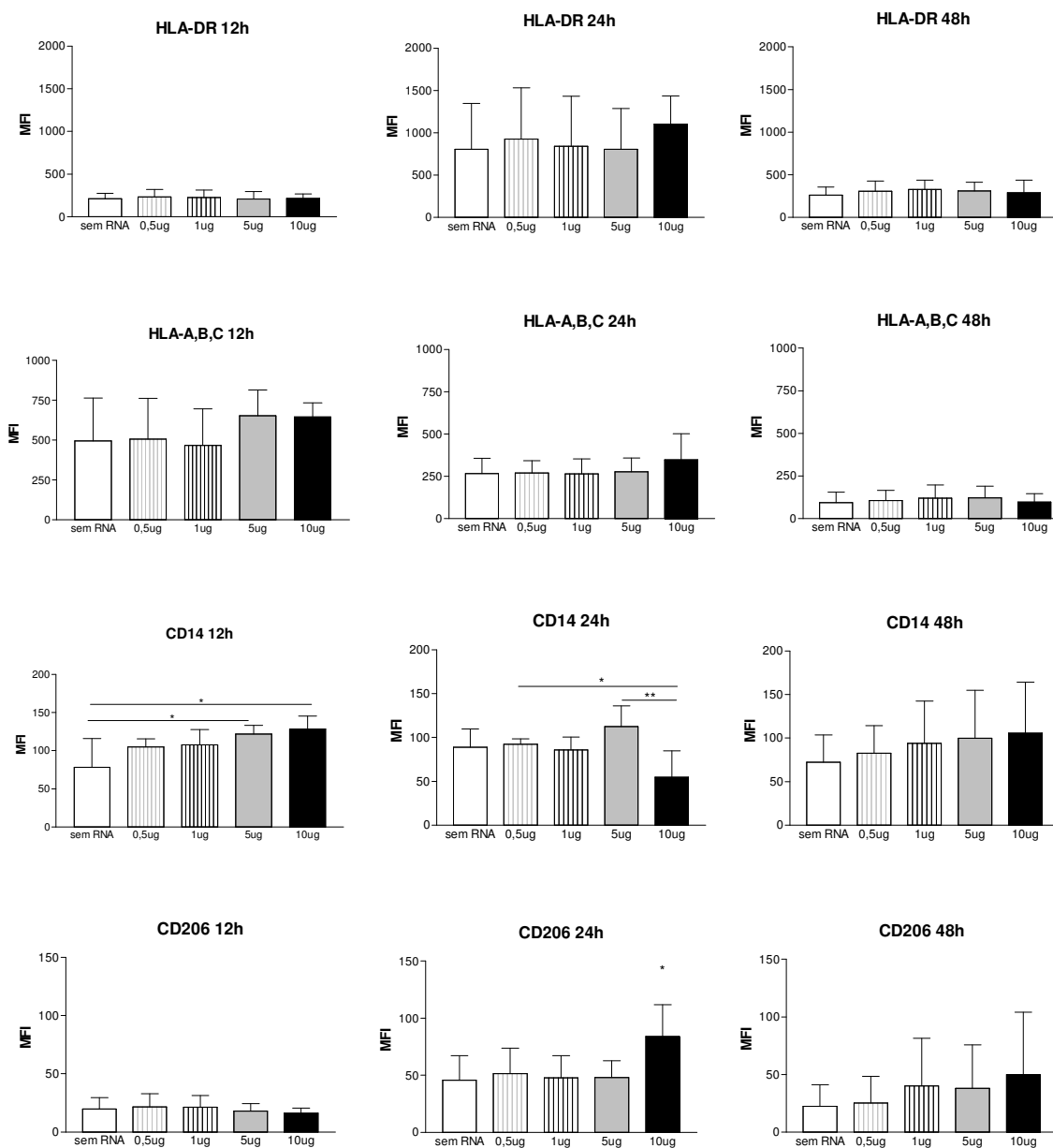


Figura 15. Média da intensidade média de fluorescência (MFI) das moléculas de superfície HLA-DR, HLA-A,B,C, CD14 e CD206 em monócitos não transfectados ou transfectados, 10^6 células, com 0,5 μ g, 1 μ g, 5 μ g e 10 μ g de RNA tumoral total de SK-BR-3 por 12h, 24h e 48h. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisadas as células viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) característicos de monócitos/macrófagos. Dados de 5 experimentos independentes. As barras mostram o desvio padrão. Quando as amostras estavam dentro da distribuição Gaussiana, era feita análise de variâncias (ANOVA) com o pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

A quantidade de CD80 expresso na superfície das células foi baixo, e se manteve assim nos três tempos de transfecção observados, cerca de 25. Entretanto, a transfecção dos monócitos com 10 µg de RNA tumoral total por 24h e também por 48h fez com que a quantidade dessa molécula expressa aumentasse (Fig. 16).

A molécula CD86 teve uma diminuição na quantidade de moléculas expressas ao longo do tempo usado nas transfecções, caindo de um MFI de 200 em 12h para 100 em 24h e 50 em 48h. Somente a transfecção por 24h com 10 µg de RNA tumoral total foi capaz de fazer com que a quantidade de moléculas expressas volta-se a subir para 250 (Fig. 16).

A molécula CD83 também teve uma queda na quantidade de moléculas ao longo do tempo de transfecções, caindo de um MFI de 200 em 12h, para 100 em 24h e cerca de 50 em 48h. A transfecção com RNA tumoral total não causou nenhuma alteração na quantidade de moléculas expressas (Fig. 16).

O antígeno Her-2/neu teve uma pequena quantidade de moléculas expressas na superfície dos monócitos. Um MFI de 10 em 12h, que teve um aumento para 20 em 24h, mas caiu e voltou a 10 em 48h. A transfecção com 10 µg de RNA tumoral total por 24h fez com que houvesse um aumento no nível de expressão das moléculas expressas nesse grupo, mas apesar do MFI ter chegado a 30, é uma quantidade muito pequena de moléculas expressas (Fig. 16).

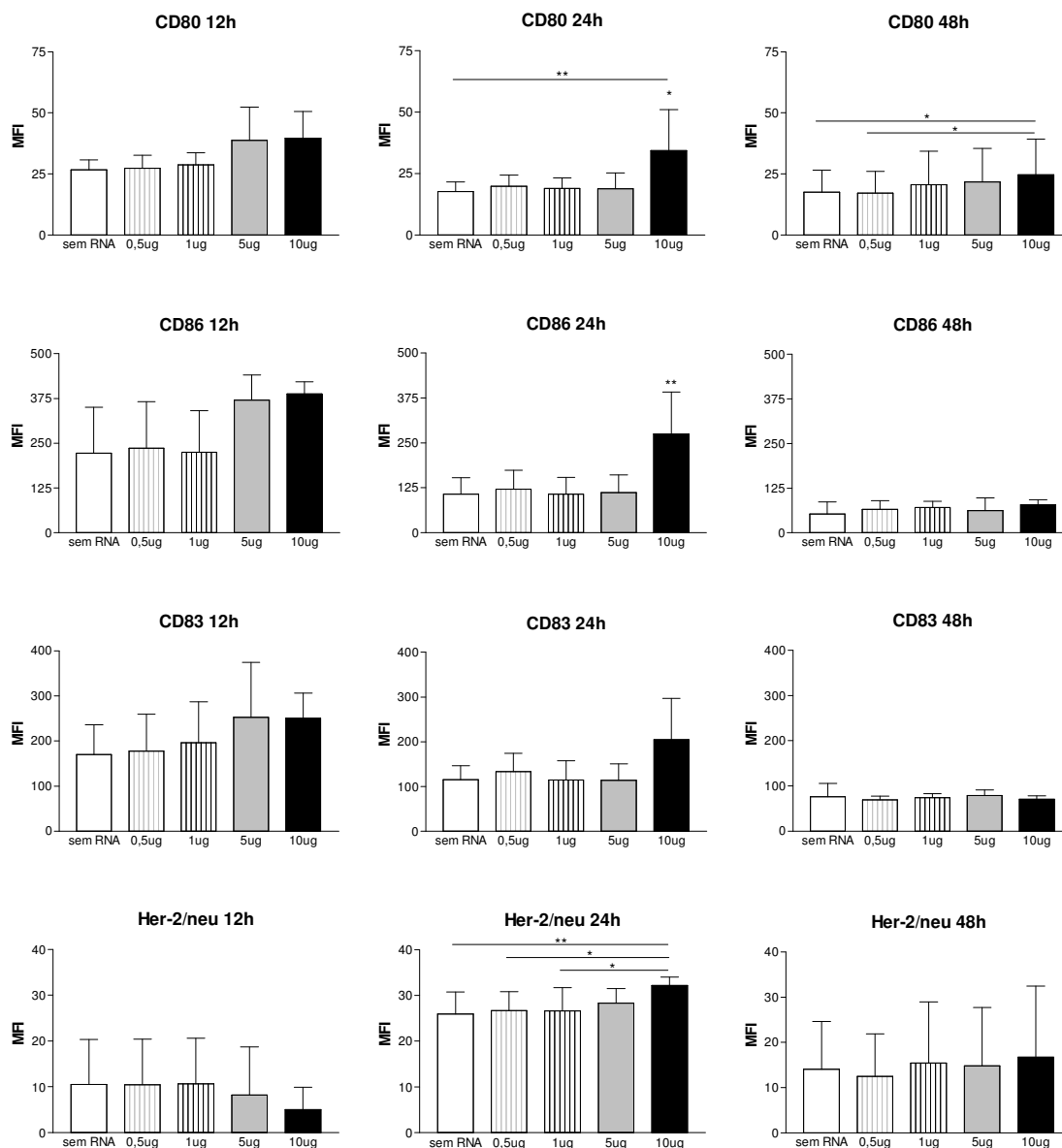


Figura 16. Média da intensidade média de fluorescência (MFI) das moléculas de superfície CD80, CD86, CD83 e Her-2/neu em monócitos não transfectados ou transfectados, 10^6 células, com 0,5 μ g, 1 μ g, 5 μ g e 10 μ g de RNA tumoral total de SK-BR-3 por 12h, 24h e 48h. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisadas as células viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) característicos de monócitos/macrófagos. Dados de 5 experimentos independentes. As barras mostram o desvio padrão. Quando as amostras estavam dentro da distribuição Gaussiana, era feita análise de variâncias (ANOVA) com o pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Como as diferenças significativas foram observadas na maior parte dos casos com a transfecção de 10 µg de RNA tumoral total, para facilitar a visualização dessas diferenças, foram comparadas as expressões dos marcadores nos três tempos dessa transfecção com o controle de monócitos não transfectados em outro gráfico, como mostrado na figura 17.

Corroborando os dados anteriormente mostrados, vimos que a maior quantidade de moléculas de HLA-DR expressas na superfície dos monócitos se dá com 24h, independente da transfecção com RNA tumoral total. A quantidade de moléculas expressas de HLA-A,B,C cai com o passar do tempo, sendo que a expressão e a queda são independentes da transfecção com RNA tumoral total.

A quantidade de moléculas de CD14 expressas cai com 10 µg de RNA tumoral total transfectado por 24h, e a molécula CD206 tem o comportamento oposto, a quantidade de moléculas expressas subiu após transfecção com 10 µg de RNA tumoral total transfectado por 24h.

CD80 tem um número de moléculas maior na superfície dos monócitos transfectados com 10 µg de RNA tumoral total por 24h. A quantidade de moléculas de CD86 e CD83 diminui com o tempo de transfecção. Entretanto, a quantidade de moléculas de CD86 é maior nas células transfectadas com 10 µg de RNA tumoral total por 12h e 24h em relação ao controle de células não transfectadas nesses tempos.

A expressão do antígeno Her-2/neu tem seu máximo após 24h de transfecção dos monócitos com 10 µg de RNA tumoral total. Nesse ponto, a quantidade de moléculas expressas é maior que o controle de células não transfectadas por 24h, e também que as células transfectadas por 12h com a mesma dose de RNA.

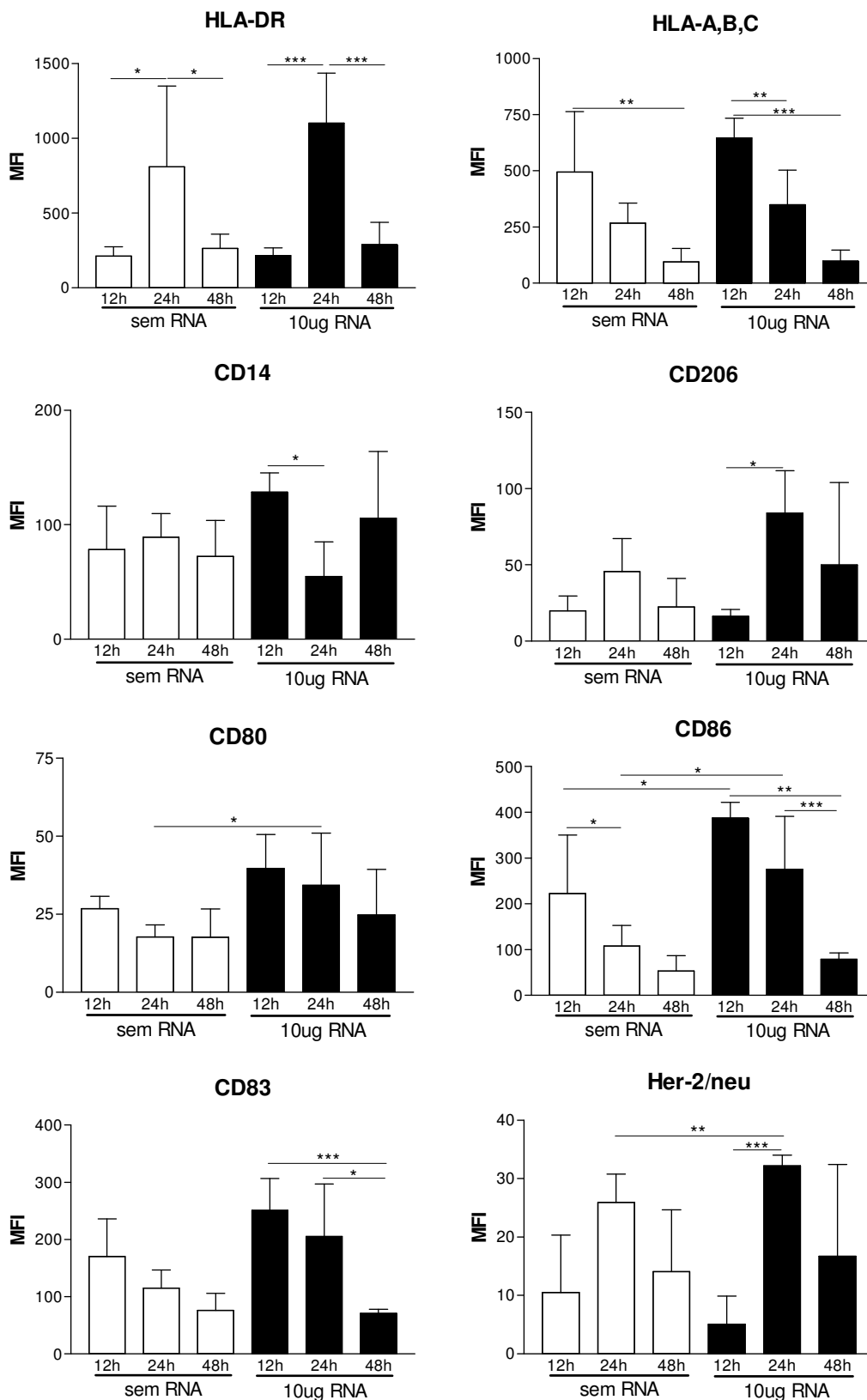


Figura 17. Média do MFI das moléculas de superfície HLA-DR, HLA-A,B,C, CD14, CD206, C80, CD86, CD83 e Her-2/neu em monócitos não transfectados ou transfectados, 10^6 células, com 10 µg de RNA tumoral total por 12h, 24h e 48h. Dados de 5 experimentos independentes para cada tempo de transfecção. As barras mostram o desvio padrão. Quando as amostras estavam dentro da distribuição Gaussiana, era feita análise de variâncias (ANOVA) com o pós-teste de Tukey.* p<0,05; ** p<0,01 e *** p<0,001.

A maior expressão de moléculas apresentadoras e co-estimuladoras nas células que foram transfectadas por 24h indicou que possivelmente essa seria a melhor célula estimuladora de linfócitos, e então passamos a co-cultivar os monócitos, não transfectados e transfectados, com linfócitos autólogos.

4.7 Potencial linfo-estimulador de monócitos transfectados com RNA isolado (com kit) das células SK-BR-3

A fim de confirmar os resultados anteriormente mostrados, monócitos transfectados nas diferentes concentrações de RNA e nos diferentes tempos foram usados como células estimuladoras para linfócitos autólogos em co-cultura. Apesar do aumento no nível de expressão de HLA-DR, CD80 e CD86 nos monócitos após 24h de transfecção, não foi induzida proliferação linfocitária durante os 5 dias de co-cultura, quando as células estimuladoras eram os monócitos transfectados com as diferentes doses de RNA tumoral total extraído com o kit. Quando usamos PHA para estimular os linfócitos, entretanto, conseguimos uma grande porcentagem de células proliferativas. Esse mesmo resultado se repetiu em 5 experimentos independentes para cada um dos tempos usado na transfecção dos monócitos. Como representativo de todos os experimentos realizados, a figura 18 mostra um ensaio de proliferação de 5 dias, onde os linfócitos foram estimulados por monócitos transfectados por 24h com as diferentes doses de RNA usadas.

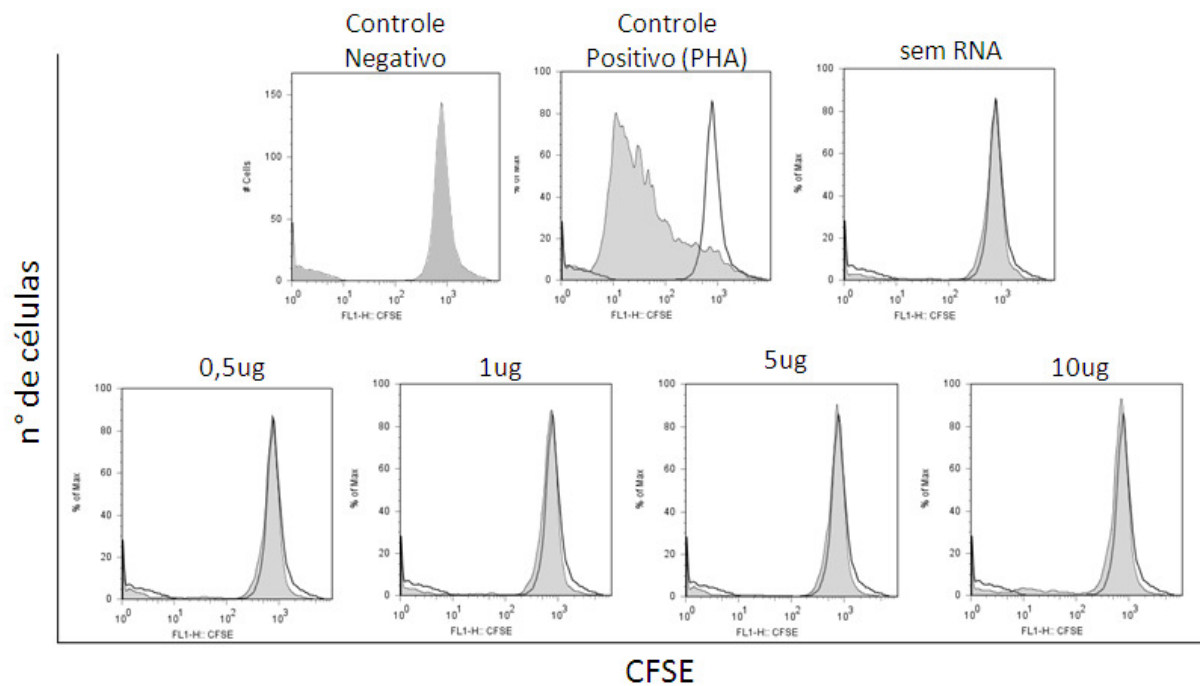


Figura 18. Potencial linfo-estimulador de monócitos transfectados com RNA tumoral total em co-cultura por 5 dias com linfócitos autólogos. Foram usados 10^4 monócitos não transfectados ou transfectados por 24h com 0,5 μ g, 1 μ g, 5 μ g e 10 μ g de RNA total de SK-BR-3, para 10^5 linfócitos autólogos. No controle negativo foram mantidos linfócitos sem estímulo. Como controle positivo foi estimulada proliferação linfocitária com o mitógeno PHA. Como controle de proliferação espontânea usou-se monócitos não transfectados em co-cultura com linfócitos autólogos. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisados os linfócitos viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) característicos de linfócitos. O histograma vazio representa o controle negativo de linfócitos que não receberam estímulos e o histograma cheio (em cinza) representa a população de linfócitos experimental. Representativo de 5 experimentos independentes.

A figura 19 mostra a porcentagem de células que proliferaram sob os diferentes estímulos em 5 experimentos independentes. Pode-se observar que não houve proliferação. Já 60% dos linfócitos que receberam a estimulação de PHA proliferaram.

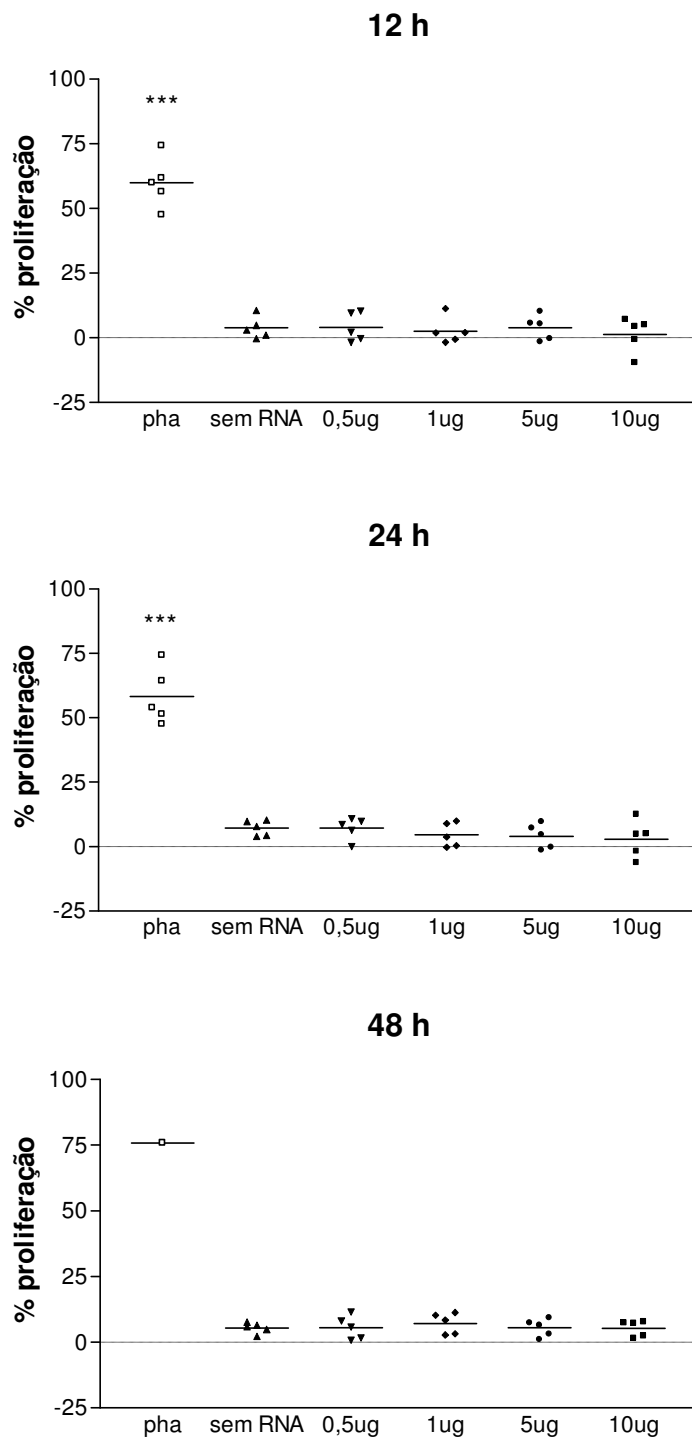


Figura 19. Média da porcentagem de proliferação linfocitária. Os linfócitos, 10^5 células, foram estimulados por 5 dias em co-cultura com PHA, e com 10^4 células de monócitos não-transfectados ou transfectados com 0,5 μ g, 1 μ g, 5 μ g e 10 μ g de RNA tumoral total por 12h, 24h e 48h. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisados os linfócitos viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) característicos de linfócitos. Dados de 5 experimentos independentes. Quando as amostras estavam dentro da distribuição Gaussiana, era feita análise de variâncias (ANOVA) com o pós-teste de Tukey. *** $p < 0,001$.

4.8 Citocinas liberadas

Os sobrenadantes da co-cultura dos monócitos não transfectados ou transfectados com linfócitos autólogos foram analisados por ELISA acrescentando-se nessa análise as citocinas TNF- α e IL-2. Assim foram analisadas as citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10, representando padrões descritos de resposta.

De maneira geral, a quantidade de citocinas liberadas durante os 5 dias de co-cultura foi baixa quando era analisada a co-cultura onde as células estimuladoras eram monócitos não transfectados, e essa quantidade de citocinas detectadas caía quando as células estimuladoras usadas eram monócitos transfectados com RNA tumoral total.

Na co-cultura onde as células estimuladoras eram os monócitos transfectados por 12h era possível detectar a produção de todas as citocinas no sobrenadante das co-culturas onde as células estimuladoras eram os monócitos não transfectados, com tendência a queda quando eram os monócitos transfectados com 0,5 μg de RNA tumoral total. Entretanto, quando essas células eram transfectadas a partir de 1 μg de RNA tumoral total, a produção das citocinas caiu a níveis abaixo do limite de detecção da curva (Fig. 20).

As citocinas liberadas durante a co-cultura onde as células estimuladoras eram os monócitos transfectados por 24h com RNA tumoral total é mostrado na figura 21. Não foi possível detectar a citocina IL-4, ela ficou abaixo do limite de detecção da curva em todos os experimentos realizados. As citocinas TNF- α e IFN- γ tiveram sua maior detecção nos sobrenadantes das co-culturas onde as células estimuladoras eram os monócitos não transfectados, com tendência de queda ao mínimo de detecção da curva quando os monócitos eram transfectados com as diferentes doses de RNA tumoral total. A citocina IL-2 foi detectada nos sobrenadantes onde monócitos não transfectados foram usados como células estimuladoras, com tendência a queda abaixo do limite de detecção da curva quando as células estimuladoras eram os monócitos transfectados com 0,5 e 1 μg de RNA tumoral total, voltando aos níveis do controle quando as células estimuladoras eram os monócitos transfectados com 5 e 10 μg de RNA tumoral total. A citocina IL-10 foi detectada em pequena quantidade na co-cultura onde os monócitos sem transfectar eram as células estimuladoras, e a quantidade de citocina expressa caiu onde as células estimuladoras eram os monócitos transfectados por 24h com 0,5 μg de RNA tumoral total. Com o aumento da dose de RNA transfectado nos monócitos a quantidade de citocina detectada voltou a subir,

sendo que houve aumento na quantidade de citocina da dose de 0,5 para 1 µg de RNA transfectado, da dose de 1 para 5 µg, e também da dose de 5 para 10 µg de RNA transfectado, sendo que na dose de 10 µg de RNA transfectado a quantidade de citocina detectada no sobrenadante da co-cultura foi maior que a detectada no controle.

Com a transfecção de 48h dos monócitos com RNA tumoral total, a detecção da maioria das citocinas no sobrenadante das co-culturas ficou abaixo do limite de detecção da curva do kit, como mostrado na figura 22. A quantidade de TNF-α detectado foi baixa e não houve variação quanto aos diferentes grupos analisados. IFN-γ só foi detectado no sobrenadante da co-cultura onde os monócitos transfectados por 48h com 1 µg de RNA tumoral total eram as células estimuladoras, e IL-4 só foi detectada nas co-culturas onde os monócitos tinham sido mantidos em co-cultura sem transfecção.

IL-2 foi detectada em quase todos os grupos analisados, tendo uma quantidade razoável de citocina detectada onde os monócitos não tinham sido transfectados ou tinham sido transfectados com 0,5 e 10 µg de RNA, e com uma produção máxima na co-cultura onde os monócitos haviam sido transfectados por 48h com 5 µg de RNA tumoral total, mas não foi detectada onde os monócitos haviam sido transfectados com 1 µg de RNA.

IL-10 teve uma pequena detecção no sobrenadante das co-culturas onde os monócitos não foram transfectados ou foram transfectados com 0,5 µg de RNA tumoral total, com as outras doses de RNA transfectado, a detecção ficou abaixo do limite da curva.

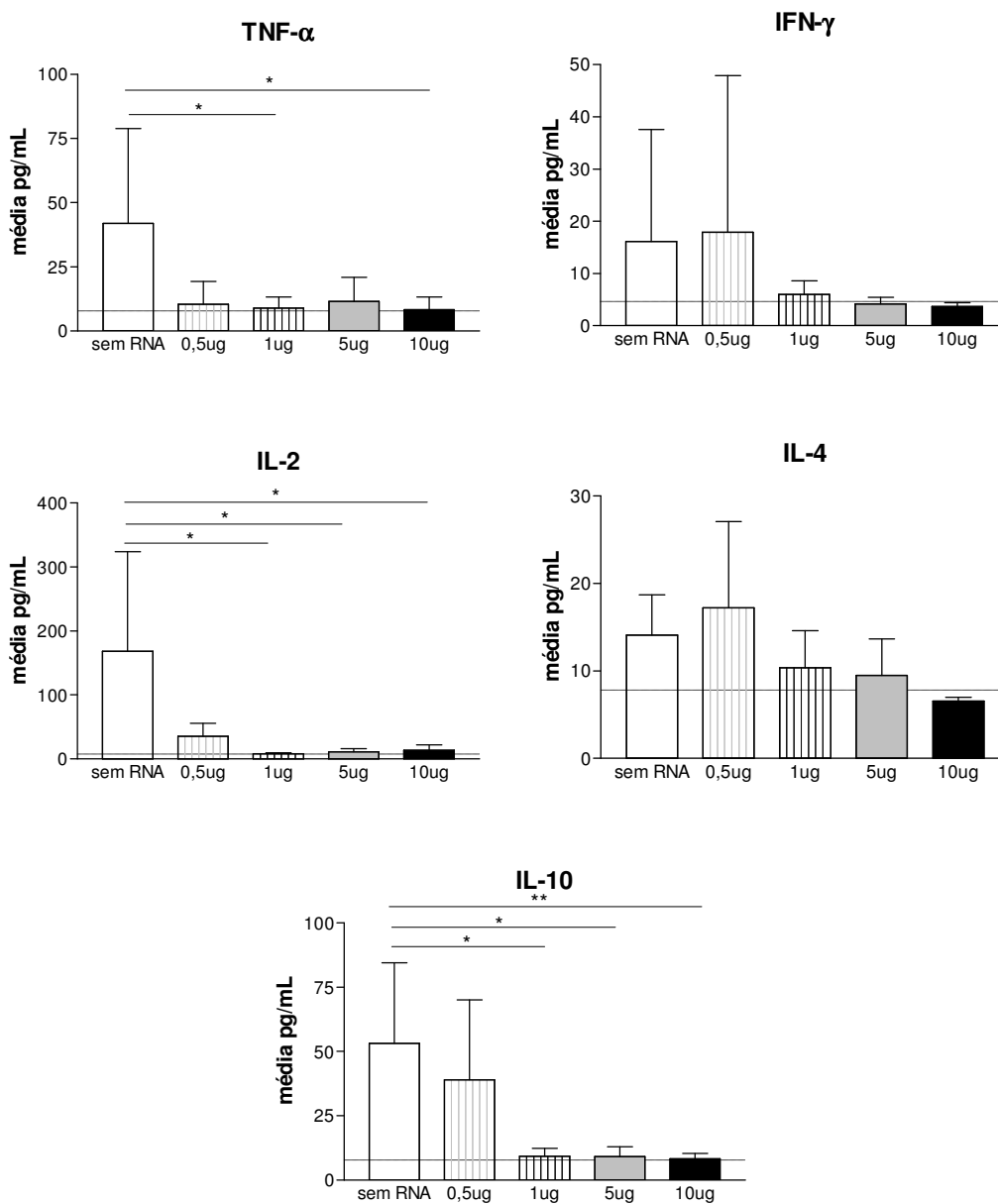


Figura 20. Média da produção das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 durante 5 dias de co-cultura entre os monócitos, 10^4 células, não transfectados e transfectados por 12 horas com as doses de 0,5 μ g, 1 μ g, 5 μ g e 10 μ g de RNA tumoral total e linfócitos, 10^5 células. A linha pontilhada representa o mínimo de detecção da curva padrão do kit. Dados de 5 experimentos independentes. As barras mostram o desvio padrão. Quando as amostras estavam dentro da distribuição Gaussiana, era feita análise de variâncias (ANOVA) com o pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

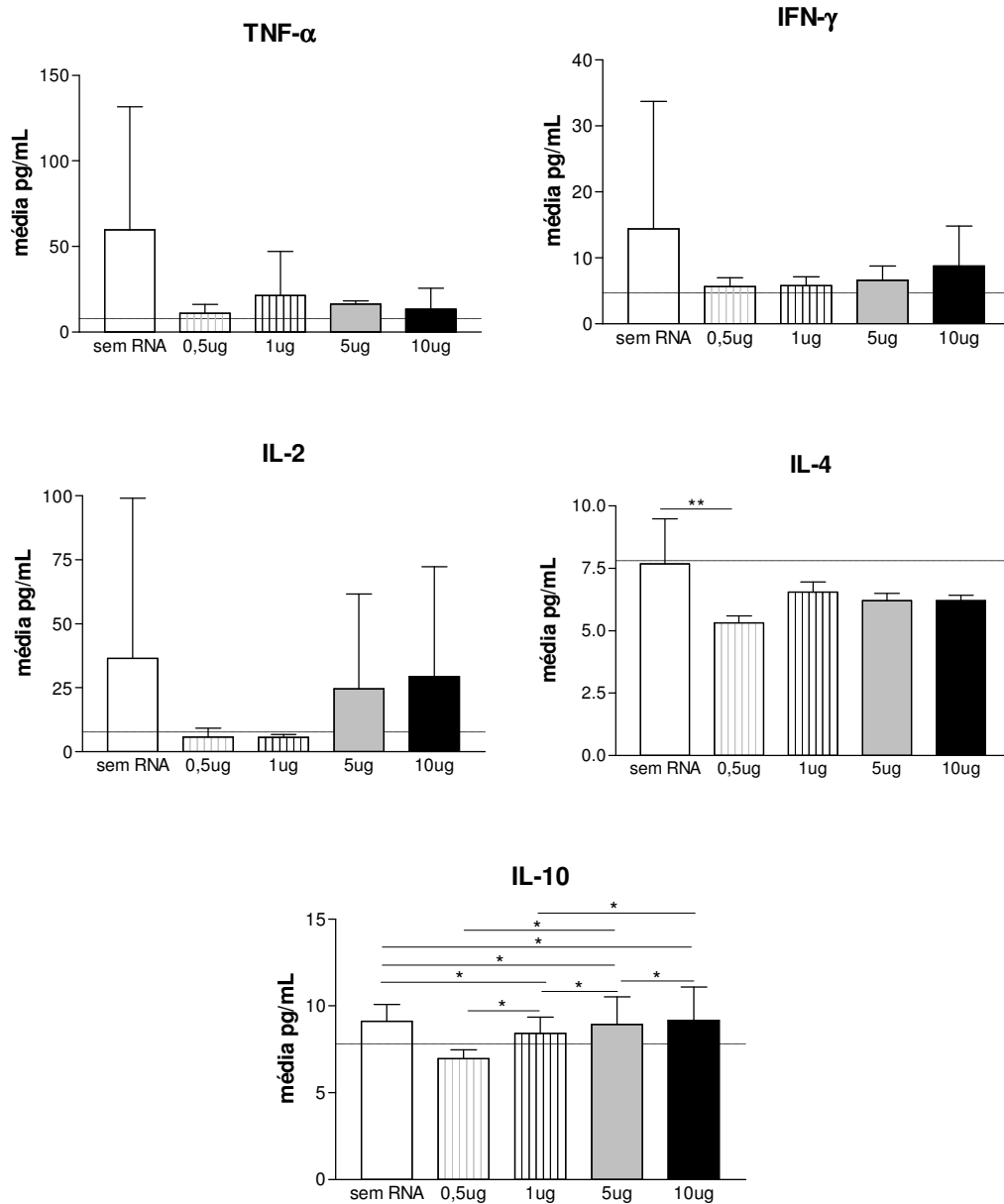


Figura 21. Média da produção das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 durante 5 dias de co-cultura entre os monócitos, 10^4 células, não transfectados e transfectados por 24 horas com as doses de 0,5 μ g, 1 μ g, 5 μ g e 10 μ g de RNA tumoral total e linfócitos, 10^5 células. A linha pontilhada representa o mínimo de detecção da curva padrão do kit. Dados de 5 experimentos independentes. As barras mostram o desvio padrão. Quando as amostras estavam dentro da distribuição Gaussiana, era feita análise de variâncias (ANOVA) com o pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

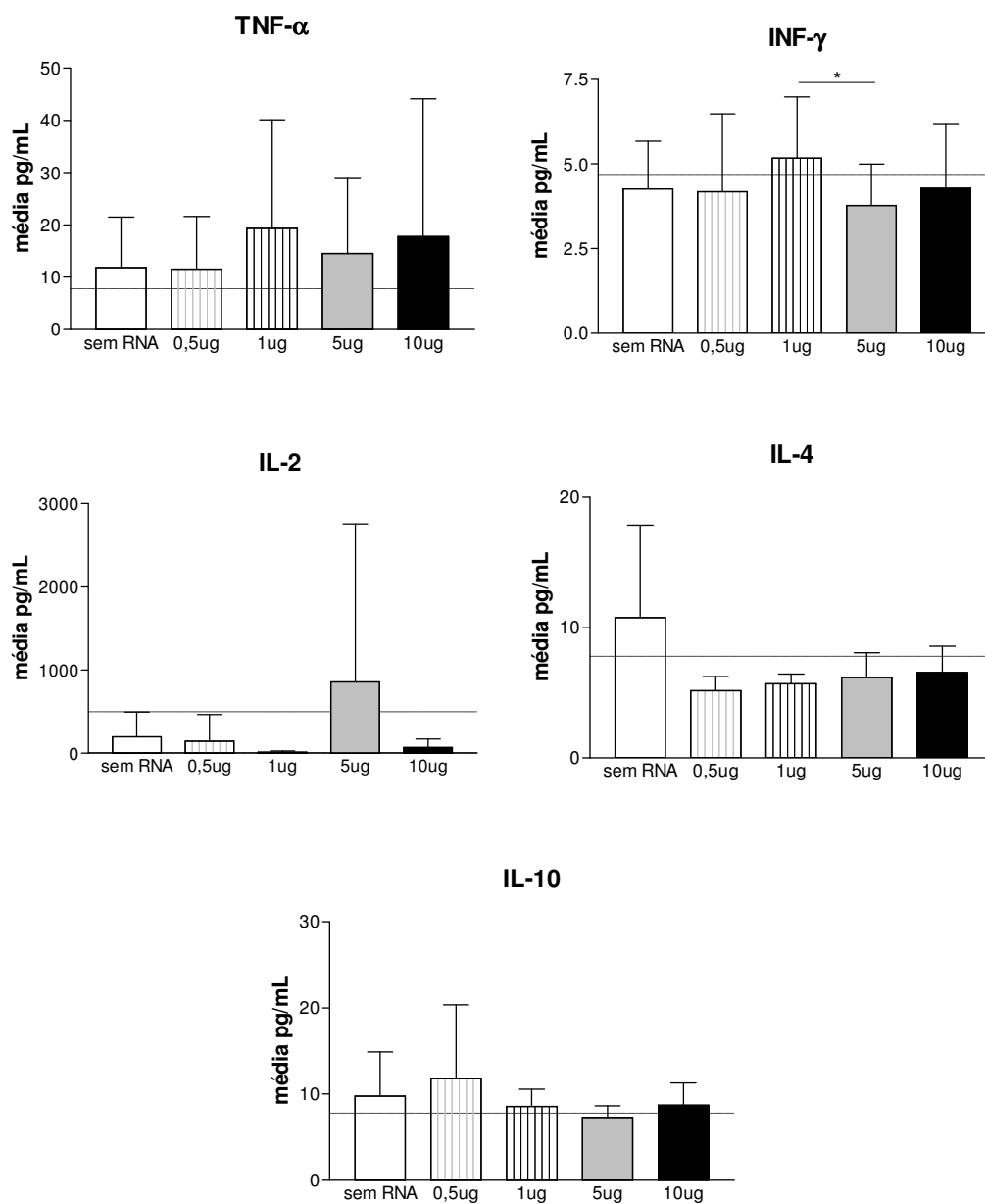


Figura 22. Média da produção das citocinas TNF- α , INF- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 durante 5 dias de co-cultura entre os monócitos, 10^4 células, não transfectados e transfectados por 48 horas com as doses de 0,5 μ g, 1 μ g, 5 μ g e 10 μ g de RNA tumoral total e linfócitos, 10^5 células. A linha pontilhada representa o mínimo de detecção da curva padrão do kit, com exceção da citocina IL-2, onde a linha representa o máximo de detecção da curva padrão. Dados de 5 experimentos independentes. As barras mostram o desvio padrão. Quando as amostras estavam dentro da distribuição Gaussiana, era feita análise de variâncias (ANOVA) com o pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Para buscar um padrão de resposta e considerando que as diferenças estatisticamente significativas estavam entre o controle e a maior dose usada na transfecção dos monócitos, 10 µg RNA tumoral total, foi comparada a liberação das citocinas entre esses grupos nos três diferentes tempos usados para transfecção dos monócitos em uma figura à parte (Fig. 23).

Pode-se notar dentre os grupos controle que a citocina TNF- α teve uma tendência a aumentar a quantidade de citocina produzida de 12h para 24h, mas caiu em 48h e atingiu o mínimo de detecção da curva. IFN- γ manteve uma quantidade de citocina detectada constante de 12h para 24h, mas caiu em 48h abaixo do mínimo de detecção da curva. IL-2 e IL-4 seguiram o mesmo comportamento, uma queda na quantidade de citocina detectada de 12h para 24h, mas aumentou em 48h e atingiu a quantidade detectada em 12h. Já a citocina IL-10 só foi detectada no controle de 12h, com queda da produção dessa citocina ao mínimo da curva de detecção com 24 e 48h.

Dentre os grupos transfectados com 10 µg de RNA tumoral total, o padrão de produção das citocinas foi diferente do controle. As citocinas TNF- α e IL-2 tiveram uma tendência ao aumento da quantidade de sua produção proporcional ao aumento do tempo de transfecção. IFN- γ só foi detectado em 24h, nos outros dois tempos sua produção ficou abaixo do limite de detecção da curva, e as citocinas IL-4 e IL-10 ficaram abaixo do limite de detecção da curva.

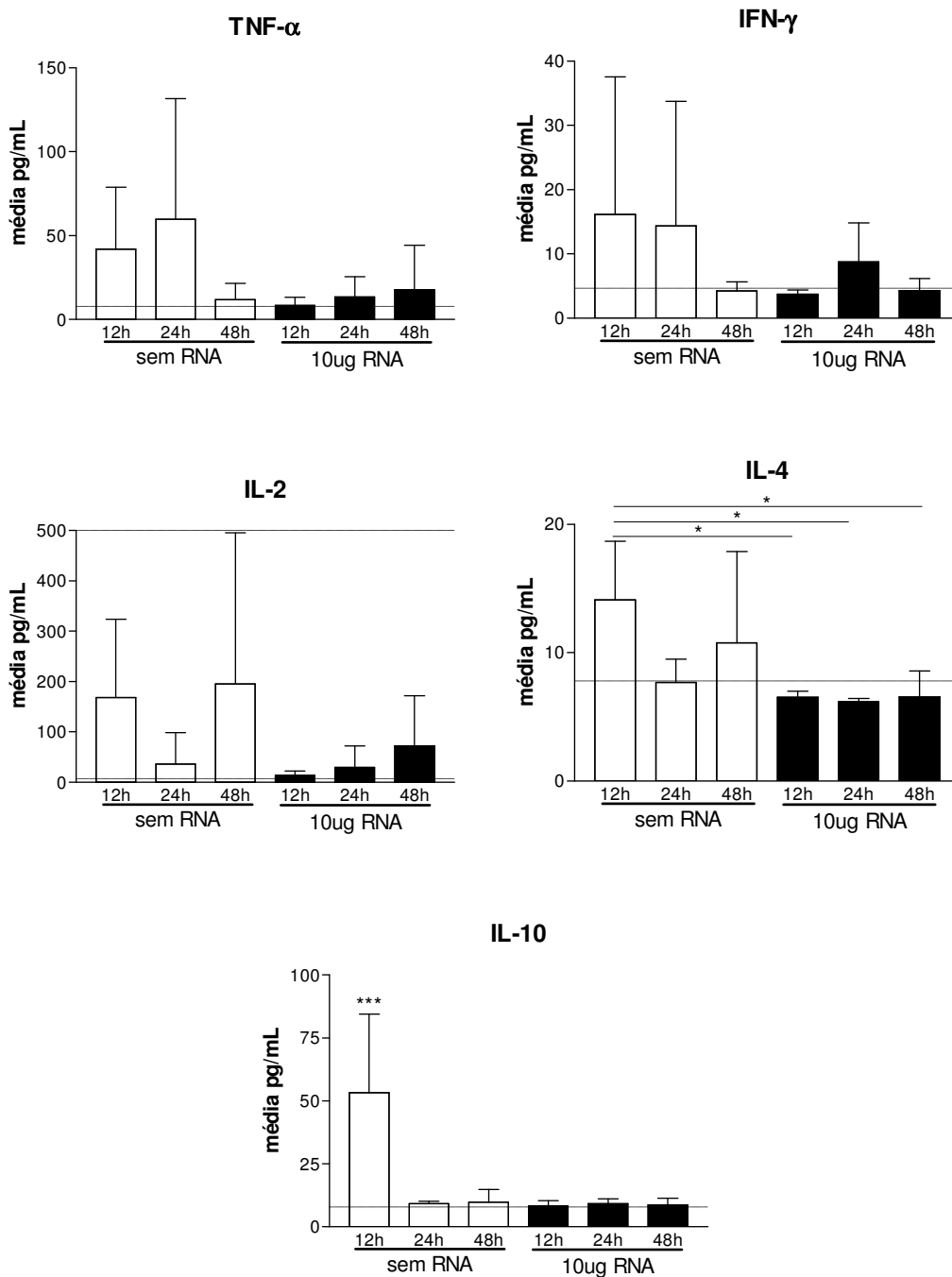


Figura 23. Média da produção das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 durante 5 dias de co-cultura entre os monócitos, 10^4 células, não transfectados e transfectados por 48 horas com $10 \mu\text{g}$ de RNA tumoral total e linfócitos, 10^5 células. A linha pontilhada representa o mínimo de detecção da curva padrão do kit, com exceção da citocina IL-2, onde as linhas representam o mínimo e o máximo de detecção da curva padrão. Dados de 5 experimentos independentes. As barras mostram o desvio padrão. Quando as amostras estavam dentro da distribuição Gaussiana, era feita análise de variâncias (ANOVA) com o pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$.

4.9 Análise fenotípica da linhagem de adenocarcinoma mamário humano SK-BR-3

Na análise dos monócitos transfectados, pode-se notar no grupo de 24h um aumento estatisticamente significativo na expressão do antígeno, entretanto, mesmo com este aumento não houve a intensidade de fluorescência a nível comparável com os outros marcadores analisados. Como essa molécula é um antígeno superexpresso em SK-BR-3, analisou-se sua expressão nessas células. Como complemento a essa análise, verificou-se a presença das moléculas HLA-DR, HLA-A,B,C, CD14, CD206, CD80, CD86 e CD83 na superfície dessas células tumorais.

As células SK-BR-3 não eram positivas para os marcadores CD14, HLA-A,B,C, CD80, CD86, CD206, como esperado. Houve uma pequena porcentagem de células para as moléculas HLA-DR, e metade das células foi positiva para a expressão da molécula CD83, o que não foi surpreendente pois já havia sido descrito pelo grupo. Entretanto, essas células não foram positivas para o antígeno Her-2/neu (Fig. 24).

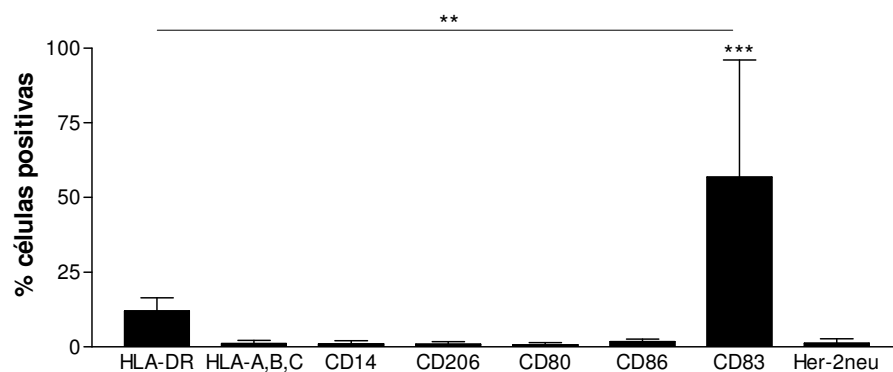


Figura 24. Média da porcentagem de células positivas para os dos marcadores de superfície HLA-DR, HLA-A,B,C, CD14, CD206, CD80, CD86, CD83 e Her-2neu nas células SKBR-3. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisadas as células viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulocidade (SSC) de SK-BR-3. Dados de 4 experimentos independentes. As barras mostram o desvio padrão. Quando as amostras estavam dentro da distribuição Gaussiana, era feita análise de variâncias (ANOVA) com o pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

A porcentagem de células positivas para cada marcador também se reflete na intensidade de expressão desses marcadores na superfície das células SK-BR-3 (Fig. 25).

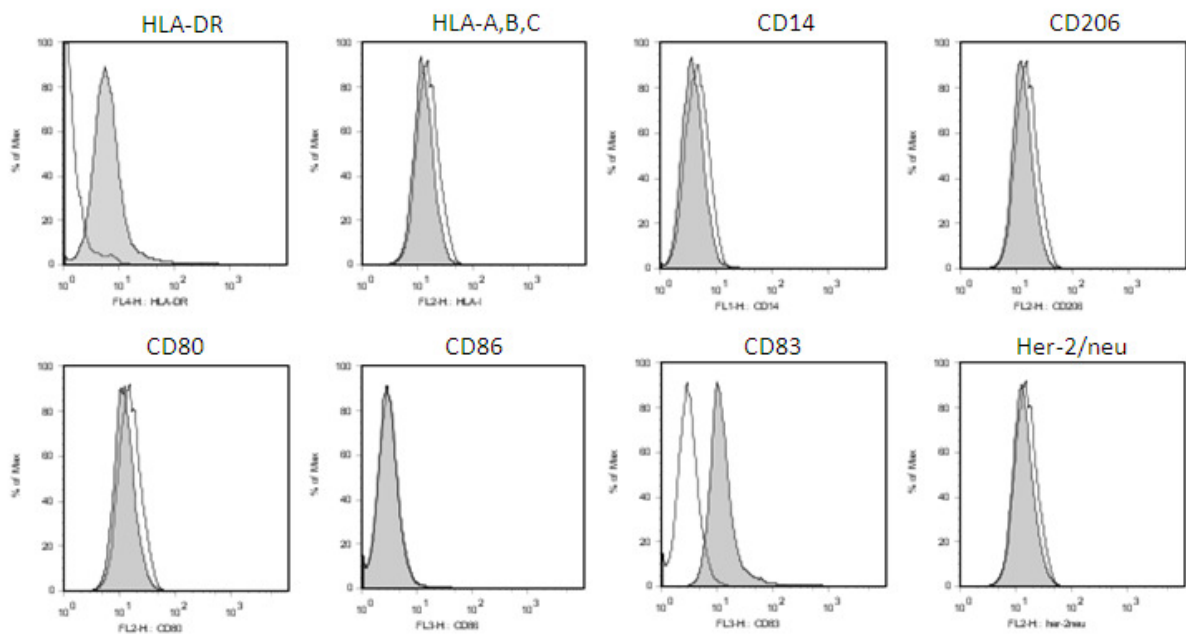


Figura 25. Histogramas representativos da expressão das moléculas de superfície HLA-DR, HLA-A,B,C, CD14, CD206, CD80, CD86, CD83 e Her-2/neu na superfície de SK-BR-3. O histograma vazio representa o controle de células não-marcadas e o histograma cheio (em cinza) a população marcada com os anticorpos específicos. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisadas as células viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulocidade (SSC) de SK-BR-3. Dado representativo de 4 experimentos independentes.

Para mostrar a intensidade de fluorescência analisada nos 4 experimentos independentes, foi feita a média do MFI, que confirmou a baixa expressão das moléculas HLA-DR e CD83, com MFI de pouco menos de 10 e pouco mais de 40, respectivamente (Fig. 26).

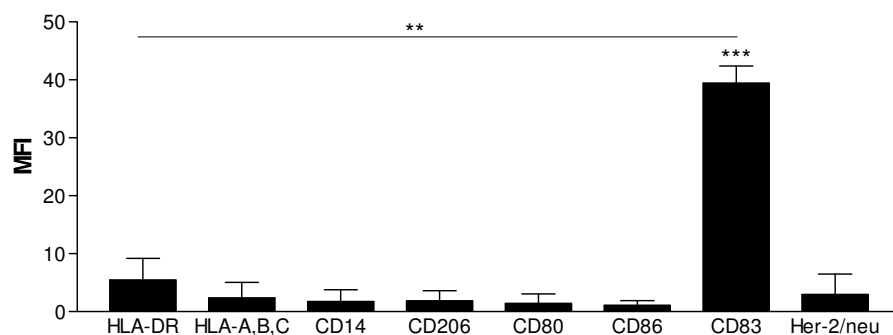


Figura 26. Média do MFI das moléculas HLA-DR, HLA-A,B,C, CD14, CD206, CD80, CD86, CD83 e Her-2/neu na superfície das células SK-BR-3. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisadas as células viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulocidade (SSC) de SK-BR-3. Dados de 4 experimentos independentes. As barras mostram o desvio padrão. Quando as amostras estavam dentro da distribuição Gaussiana, era feita análise de variâncias (ANOVA) com o pós-teste de Tukey. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.10 Imunohistoquímica

Para verificar a expressão do antígeno Her-2/neu nas células tumorais SK-BR-3, essas células foram submetidas à imunohistoquímica. Foi confirmada a ausência de expressão desse marcador na linhagem tumoral usada como célula estimuladora e também para extração de RNA total dos experimentos acima (Fig. 27).

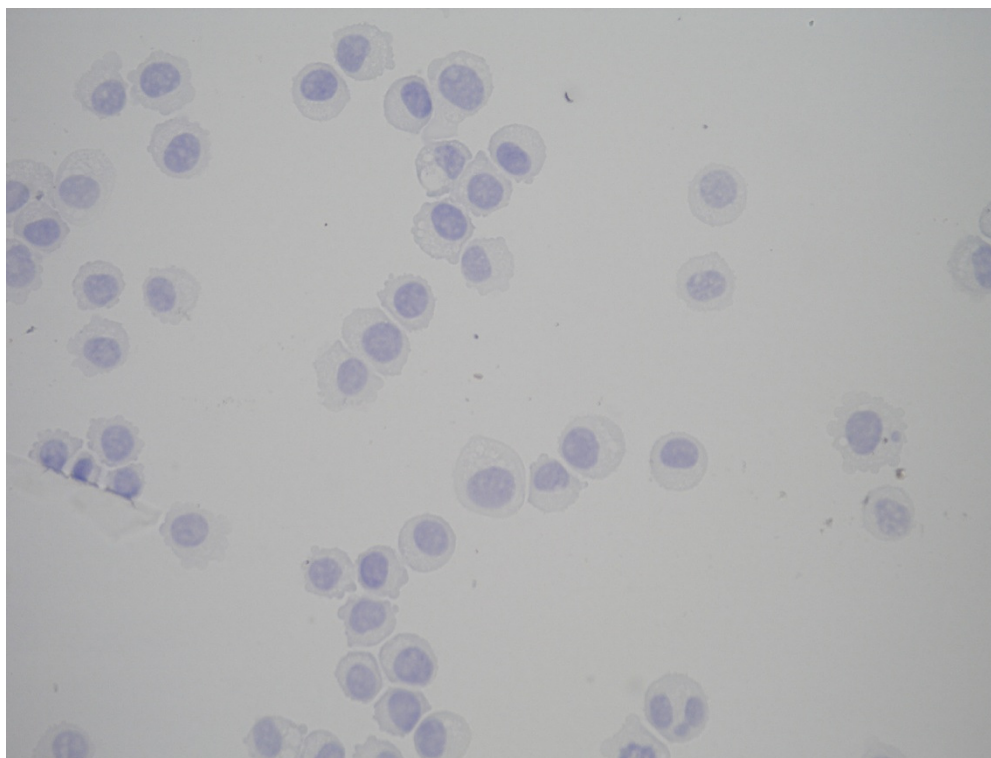


Figura 27. Imunohistoquímica para detecção de Her-2/neu nas amostras das células SK-BR-3.

Uma nova amostra da linhagem tumoral SK-BR-3 foi também submetida à imunohistoquímica. Nessa nova linhagem foi confirmada a superexpressão do antígeno Her-2/neu (Fig. 28). Essas células passaram a ser usadas para extração do RNA total e um novo teste de linfoproliferação foi feito.

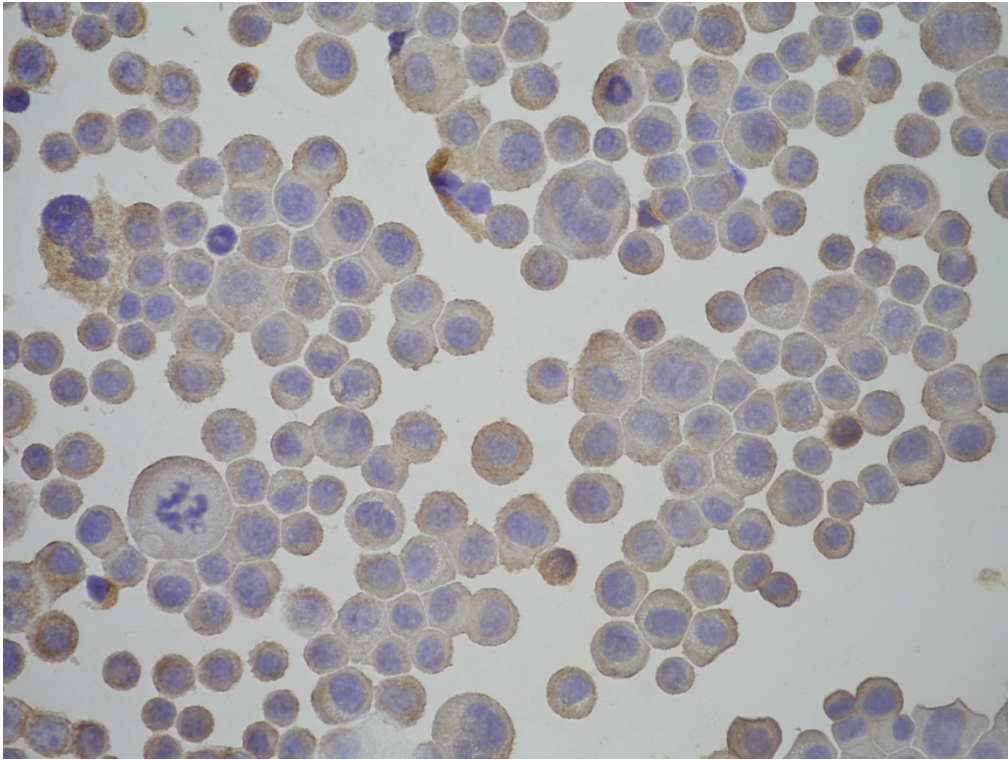


Figura 28. Imunohistoquímica para detecção de Her-2/neu na nova amostra das células SK-BR-3.

4.11 Potencial linfo-estimulador de monócitos transfectados com RNA isolado (com kit) das células SK-BR-3 (Her-2/neu positiva)

Para verificar se o método de extração do RNA total também podia interferir na mudança do fenótipo de monócitos foram usados os 2 métodos já descritos de extração de RNA total, o Trizol e o kit. Pode ser verificado na figura 29 que o padrão de migração por eletroforese em gel de agarose das três amostras são iguais, apesar de terem sido isoladas de maneira diferentes, e também não há presença de qualquer contaminante nas amostras.

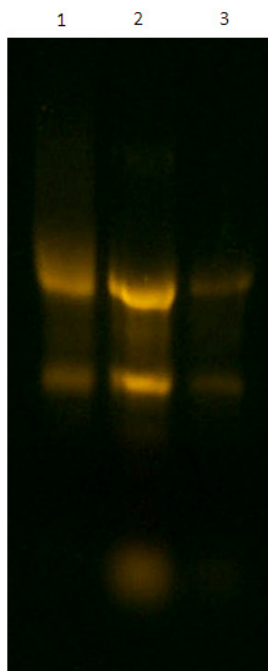


Figura 29. Perfil de migração por eletroforese em gel de agarose das amostras de RNA total, comparando dois métodos diferentes de isolar o RNA total de SK-BR-3. No poço 1 é mostrado o produto da extração com kit de RNA total de SK-BR-3, no poço 2 é mostrado o produto da extração com Trizol de RNA total de SK-BR-3, e no poço 3 é mostrado o produto da extração com Trizol de PBMC. As três bandas mostradas representam as bandas 28S e 18S do RNA ribossomal e a banda de parada de migração do material.

O RNA tumoral total extraído das células SK-BR-3, confirmadamente Her-2/neu positivas, foi usado para transfecção nos monócitos e um novo teste de proliferação foi realizado. Como não foi possível fazer a separação dos linfócitos T, foram usadas as células não-aderentes totais, que podiam conter as seguintes células: linfócitos T e B, e células NK.

Como mostrado na figura 30, os linfócitos mantidos sem estímulo não proliferaram, como esperado, já as células que receberam o estímulo do mitógeno PHA tiveram 72% de proliferação. O controle de proliferação espontânea, onde os monócitos sem transfectar foram co-cultivados com linfócitos autólogos, apresentou uma pequena porcentagem de proliferação de 12%. Os monócitos que foram transfectados com 10 μ g de RNA total de PBMC autóloga também induziram uma proliferação intermediária de 28% das células. Quando os monócitos foram transfectados com 10 μ g de RNA tumoral total que foi induzida a maior porcentagem de proliferação, independente do método de extração do RNA, essas células induziram quase 40% de proliferação. Quando foi usada a própria célula SK-BR-3, como estimuladora, houve uma resposta proliferativa também intermediária de 25%, índice semelhante ao induzido por monócitos transfectados com RNA autólogo.

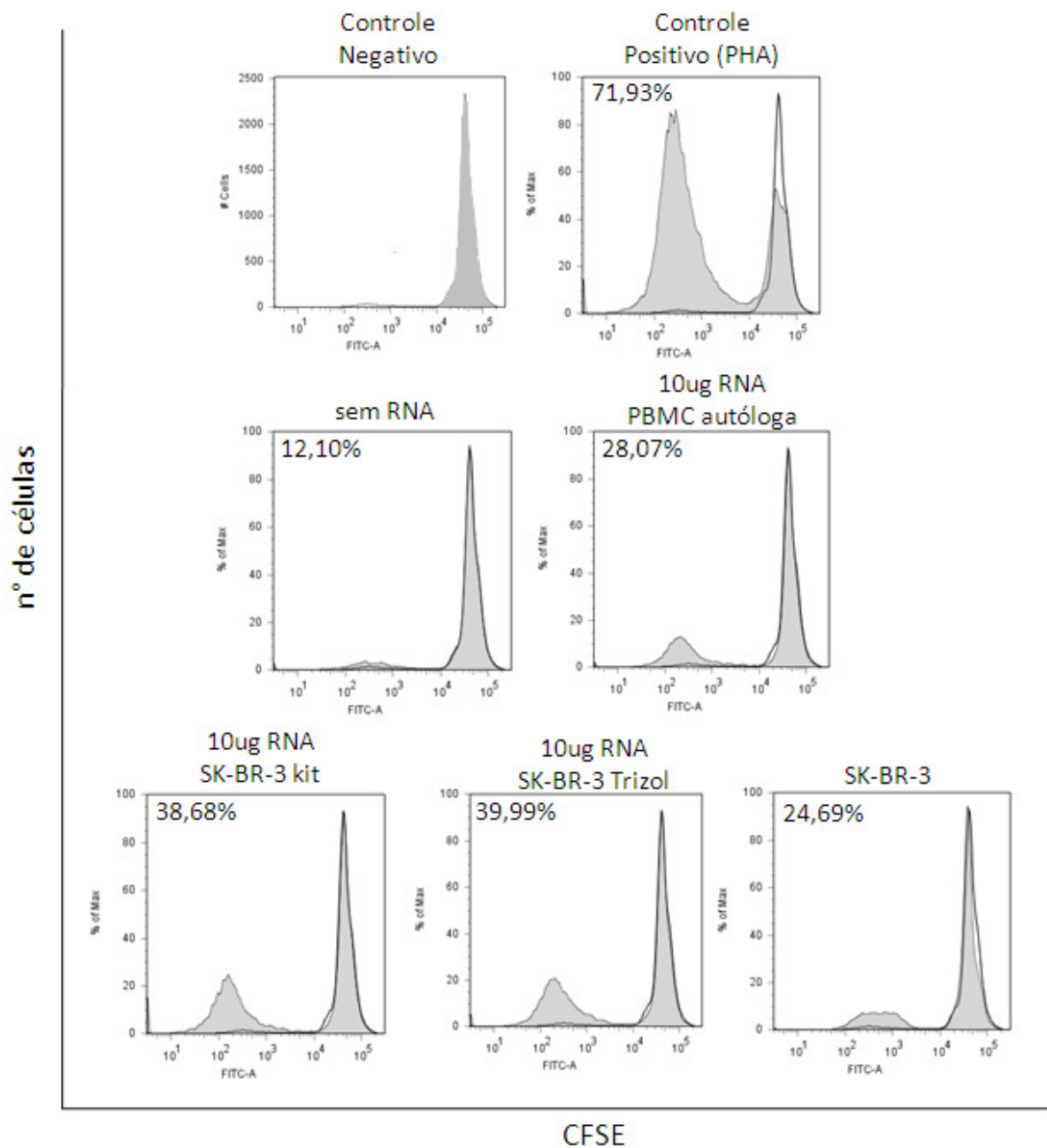


Figura 30. Potencial info-estimulador de monócitos transfectados com RNA tumoral total, extraído com diferentes técnicas, em co-cultura por 5 dias com linfócitos autólogos. Foram usados 10^4 monócitos não transfectados ou transfectados por 24h com 10 μ g de RNA total de SK-BR-3 e 10 μ g de RNA total de PBMC autóloga, e 10^4 células SK-BR-3 (Her-2/neu positivas) como estimuladoras para 10^5 linfócitos autólogos. No controle negativo foram mantidos linfócitos sem estímulo. Como controle positivo foi induzida proliferação linfocitária com o mitógeno PHA. Como controle de proliferação espontânea usou-se monócitos não transfectados em co-cultura com linfócitos autólogos. Foram adquiridos 10000 eventos totais e analisados os linfócitos viáveis no gate de tamanho (FSC) e granulocidade (SSC) característicos de linfócitos. O histograma vazio representa o controle negativo de linfócitos que não receberam estímulos e o histograma cheio (em cinza) representa a população de linfócitos experimental. A porcentagem representa a quantidade de células proliferativas. Dado de 1 experimento.

4.12 Transcrição reversa e amplificação do mRNA de SK-BR-3

A amplificação de todo o mRNA contido nas células tumorais gera a possibilidade de se ter material antigênico replicável dessas células. O RNA tumoral total foi extraído a partir de um pequeno número de células iniciais (5×10^6) SK-BR-3 (Her-2/neu negativas). Para obtenção do cDNA foi usado um primer oligodT modificado que se anelava na cauda poliA do mRNA e uma enzima transcriptase reversa que, com os reagentes adicionais, fez a síntese da primeira fita de cDNA tendo como molde o mRNA. Assim, foi feita a transcrição reversa de todo o mRNA contido dentro da amostra de RNA total. Após o término da primeira fita, foi adicionado um segundo primer que anelava numa repetição de nucleotídeos acrescentado na primeira fita pela enzima, sendo que esse primer continha a sequência do sítio promotor de T7, que gerou ao final um cDNA dupla fita (Fig. 31A). Esse cDNA dupla fita foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1%. O perfil de migração do cDNA revelou três bandas bem determinadas: 700 pb, 1000 pb, e outra maior, que não pode ser determinada pelo marcador molecular de tamanho, mas aparenta ter cerca de 1500 pb (Fig. 32A).

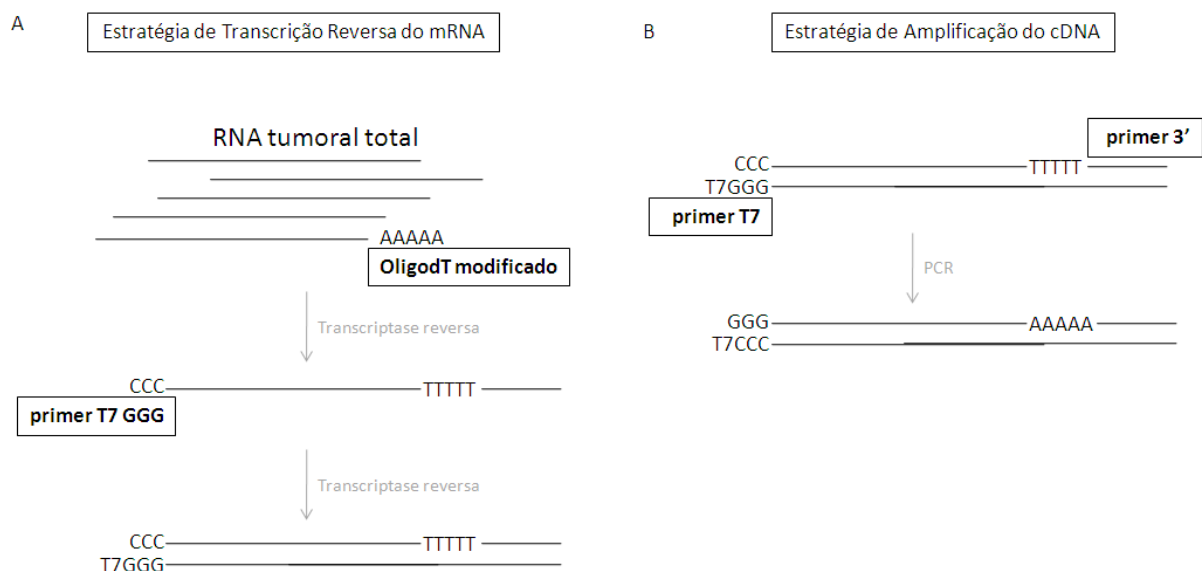


Figura 31. Esquema da estratégia usada para amplificação do mRNA tumoral extraído das células SK-BR-3. (A) Estratégia usada para transcrição reversa do mRNA contido na amostra de RNA tumoral total. (B) Estratégia usada para amplificação do cDNA, conseguido com a transcrição reversa do mRNA contido no RNA tumoral total.

Este cDNA dupla fita foi amplificado por PCR com ajuda de dois primers, um se anelava à porção modificada inserida com o oligodT e o outro ao sítio do promotor T7, que com ajuda dos reagentes adicionais da técnica, gerou todo o material de mRNA do momento da extração (Fig. 31B). Com o término da PCR, seu produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose para verificação de integridade e tamanho. A amplificação do cDNA gerou uma banda bem marcante por volta de 900 pb, mas há material de 200 a 1000 pb que pode ser visto como uma sombra de material no gel (Fig. 32B). Não eram esperadas bandas bem definidas porque a quantidade de material expresso em cada tamanho não é suficiente para sua formação. Como controle usou-se a amplificação de β -actina, um gene constitutivo, sempre expresso por fazer parte da estrutura celular. A amplificação do controle confirmou a integridade do cDNA, tendo-se um fragmento de β -actina de cerca de 200 pb (Fig. 32B). Após a amplificação, o produto da PCR foi purificado e manteve o mesmo perfil de eletroforese em gel de agarose, mostrando que a sombra de material é DNA dupla fita, e com a maior quantidade de material utilizada podem ser visualizadas mais duas bandas definidas, uma em torno de 650 pb e outra um pouco acima de 300 pb (Fig. 32C). Como marcador molecular de tamanho (MM) foi usado o 100 bp DNA ladder (Promega).

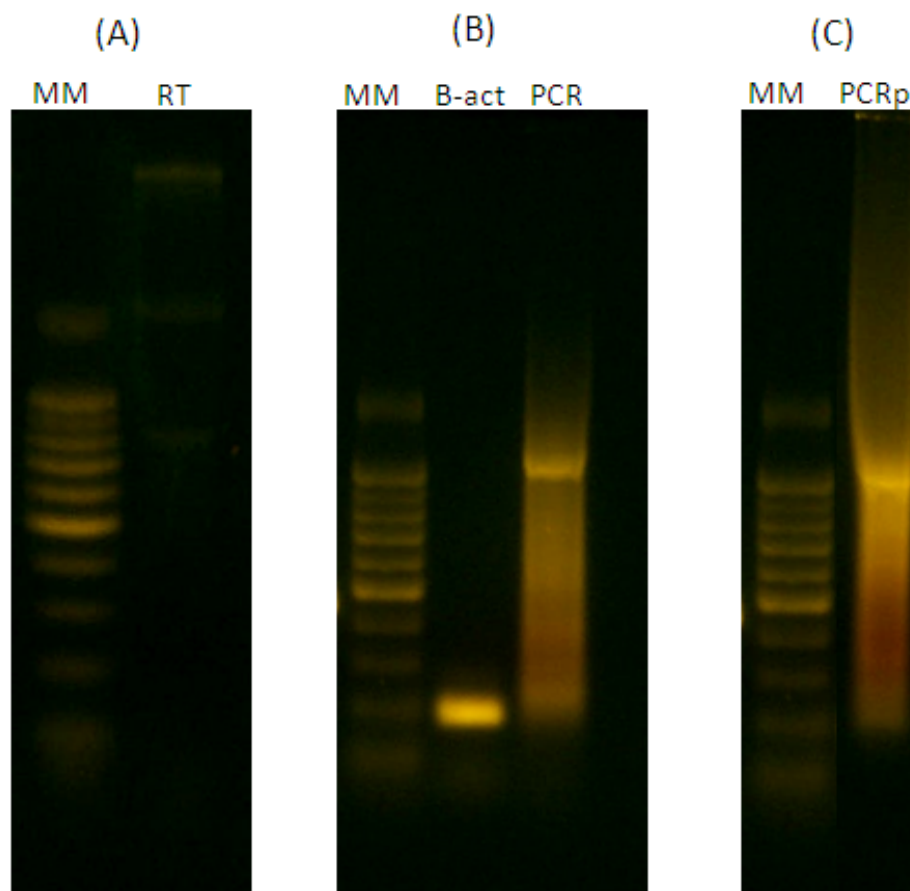


Figura 32. Perfil de migração por eletroforese em gel de agarose dos produtos de transcrição reversa e PCR. (A) Reação de transcrição reversa (RT) do mRNA de SK-BR-3. (B) PCR para amplificação do controle e de todo o produto de mRNA da RT: MM, PCR de fragmento de 200 pb de β -actina, PCR para amplificação do cDNA de mRNA tumoral. (C) Produto de PCR purificado. MM é o 100 bp DNA ladder (Promega). N=5.

4.13 Transcrição *in vitro* do mRNA de SK-BR-3

Partindo da PCR purificada procedeu-se a transcrição *in vitro* do produto de PCR para gerar o mRNA tumoral. Assim podemos gerar uma grande quantidade de material para ser usado na transfecção, o que era impossível de conseguir numa extração direta das células, a não ser que tivéssemos uma enorme quantidade disponível das células.

Com o uso da enzima T7 RNA polimerase, e os reagentes adicionais, foi feita a transcrição *in vitro* do material amplificado. Foi usado o cap 5' na porção inicial do mRNA, para que esse fosse funcional e pudesse ser traduzido em proteína quando no citosol celular (Fig. 33).

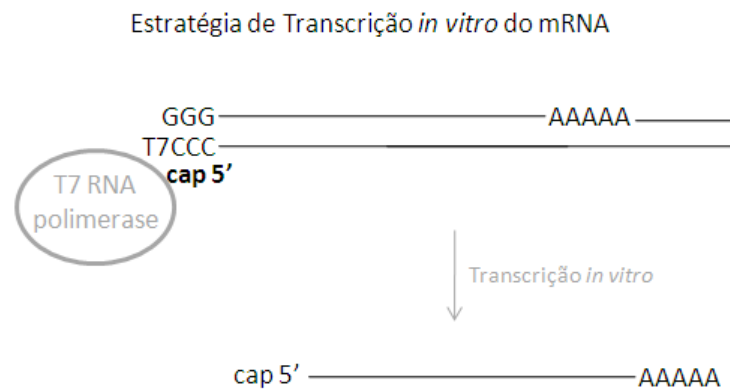


Figura 33. Esquema da estratégia usada para transcrição *in vitro* do material amplificado por PCR.

Como pode ser observado na figura 34, o material transcrito com cap só pode ser visto como uma sombra no gel, enquanto o material sem cap apresenta uma banda consistente de RNA, mas também apresenta a sombra semelhante ao material com cap. Parte do produto da transcrição foi submetida a tratamento com DNase I para que fossem degradados restos de DNA não transcritos. O material que foi tratado com DNase I teve o mesmo perfil de migração, mostrando ser uma amostra pura de mRNA transcrito *in vitro*. O marcador molecular usado é de DNA e, portanto, não pode ser usado para comparar o tamanho das bandas.

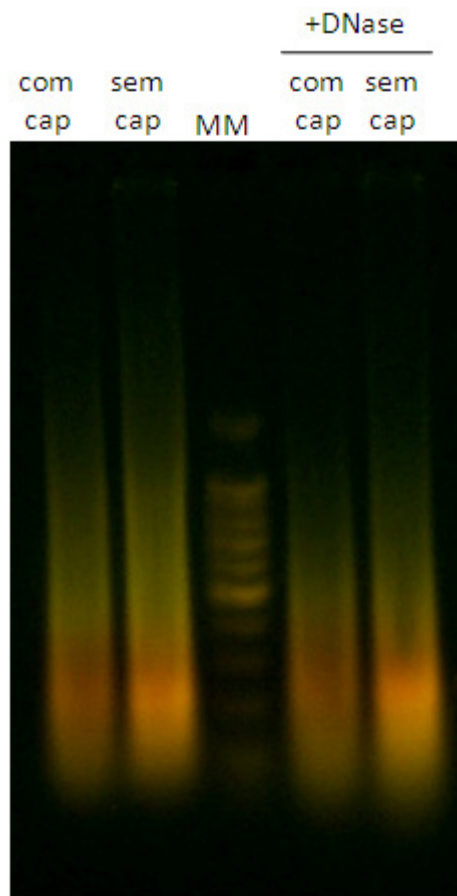


Figura 34. Perfil de migração por eletroforese em gel de agarose dos produtos de transcrição *in vitro*. O material foi transcrito com ou sem 5'cap. Parte do produto de transcrição foi tratado com DNase I e manteve o perfil de migração no gel. MM é o 100 bp DNA ladder (Promega). Dado representativo de 2 experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO

O objetivo do projeto foi desenvolver um método de avaliação da resposta imune celular contra antígenos tumorais através da transfecção de células da linhagem mononuclear com RNA tumoral, e paralelamente, padronizar a técnica de amplificação do mRNA contido nas células tumorais através de técnicas de biologia molecular. O trabalho indicou ser possível a criação do método pretendido, mas não há resultados suficientes para concluir que o método funcione para tal avaliação.

A amplificação do mRNA contido no RNA total extraído da linhagem SK-BR-3 (Her-2/neu negativa) foi feita a partir da transcrição reversa de todo o mRNA que era expresso no momento da extração do RNA total. E a amplificação do produto da RT através de primers específicos gerou materiais de vários tamanhos. Há uma banda bem definida de material, que pode conter tanto um gene muito expresso, quanto diversos genes do mesmo tamanho, e também uma pequena quantidade de DNA de tamanhos diversos, isso gerou uma sombra no gel semelhante à degradação de material, mas após a purificação do produto de PCR esse material continuou tendo o mesmo perfil de migração em gel de agarose, o que demonstrou a integridade do material.

A transcrição *in vitro* desse DNA amplificado ainda precisa ser aprimorada. Embora se tenha conseguido fazer sua transcrição *in vitro* sem o cap 5', é necessário que se faça essa transcrição com o cap 5'. Parte essencial para que o mRNA transcrito *in vitro* seja funcional, e possa ser traduzido em proteína, sem o cap 5' a maquinaria de tradução da célula transfectada nada pode fazer com esse RNA (Kowalska, 2008). O cap 5' compete com o GTP na ligação inicial da fita, assim sendo, basta um ajuste da concentração do cap e dos nucleotídeos colocados na reação para que se faça um transcrito de mRNA com cap (Schenborn e Stecha, 2007).

Os primeiros resultados de avaliação da capacidade estimuladora dos monócitos transfectados foram animadores, com proliferação linfocitária dependente da dose do RNA e do tempo usado na transfecção dos monócitos, e sem resposta proliferativa quando as células estimuladoras eram as células SK-BR-3. Isso mostrou que a célula transfectada passava a apresentar antígenos em contexto de MHC, com capacidade de estimular os linfócitos, e as células da linhagem tumoral por si só não eram capazes de fazer essa apresentação, até mesmo como um mecanismo de evasão da resposta imune.

As doses de RNA tumoral total usadas na transfecção foram de 0,1 µg, 0,5 µg, 1 µg e 10 µg, nos tempos de transfecção de 12h, 24h e 48h. Nesses ensaios, a dose de 10 µg se mostrou a melhor indutora de resposta linfo-estimuladora. Na literatura, a quantidade de RNA usado na transfecção varia bastante, vários trabalhos usam RNA total e RNA mensageiro na transfecção de DCs em quantidades próximas a 10 µg, mas essa quantidade pode variar de 1 a 50 µg. É interessante notar que todas as quantidades relatadas, quando transfectadas nas DCs apresentaram sucesso na indução de respostas linfo-estimuladoras, analisadas por citotoxicidade específica à linhagem da qual foi isolado o RNA (Grünebach, 2003; Gao, 2007; Ueno, 2004; Bonehill, 2004; Nair, 2002; Boczkowski, 2000; Van den Bosch 2005; Kavanagh, 2006; Boczkowski, 1996). Assim, como nos ensaios que foram feitos nesse projeto, uma pequena dose de RNA total transfectada já era suficiente para gerar um efeito linfo-estimulador nos monócitos, mas o aumento na dose transfectada potencializava o efeito.

Nos ensaios desse projeto, um maior tempo de transfecção também gerou uma maior capacidade linfo-estimuladora da célula transfectada. Dados da literatura mostram que a expressão ótima de proteínas conhecidas após transfecção estão dentro de uma janela de tempo entre 12 e 48 horas, tempo que foi escolhido para nossas transfecções. Gao (2007) mostrou que a transfecção de DCs com RNA total extraído de células da linhagem tumoral K-562 atingia o máximo de expressão intracelular de uma proteína específica da leucemia, 8 horas após a transfecção, mas após 40 horas ainda era possível detectar a proteína intracelularmente. Entretanto, o RNA total usado para transfecção era degradado dentro das primeiras 24 horas de transfecção. Outros trabalhos onde há transfecção de RNA em DCs mostram uma ótima expressão do antígeno transfectado em superfície após 24 horas de transfecção, sendo essa expressão mantida até 48 horas, decaindo gradualmente, mas sendo ainda detectada fracamente no quinto dia (Ueno, 2004; Bonehill, 2004).

A produção de IFN-γ foi detectada durante essa co-cultura, mas não IL-4 e IL-10, o que sugeriu uma ativação de resposta linfocitária. Assim como a proliferação, a produção de IFN-γ também foi dependente da dose e do tempo de transfecção. Essa produção de IFN-γ também é confirmada por dados da literatura, que mostram DCs transfectadas com antígenos tumorais induzindo secreção de IFN-γ por linfócitos durante a co-cultura (Bonehill, 2004; Ueno, 2004; Kang, 2006).

Entretanto, quando outra técnica foi usada no isolamento de RNA total, essa linfoproliferação foi perdida. Passou-se a usar um kit de colunas para isolamento do RNA total por sua maior agilidade na extração e garantia de pureza do material. As células que eram transfectadas com o RNA total extraído de SK-BR-3 com o kit, foram incapazes de induzir uma resposta linfo-estimuladora, independentemente da dose (0,5 µg, 1 µg, 5 µg e 10 µg) e do tempo (12h, 24h e 48h) usados na transfecção.

A produção de citocinas durante essas co-culturas também foi diferente. A transfecção com RNA tumoral total, de maneira geral, fez cair a produção de quase todas as citocinas analisadas (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 e IL-10) quando comparado ao controle, que mostrou uma produção de todas as citocinas em pequena quantidade. A única citocina detectada foi IL-10 nos transfectados com 10 µg por 24h, indicando a ativação de resposta regulatória, visto que IL-10 é uma das citocinas já bem descritas por representar o padrão regulatório (Askenasy, 2008).

Como tivemos diferenças na indução de linfoproliferação por monócitos transfectados com RNA tumoral total extraídos com duas técnicas diferentes, fizemos a análise do fenótipo desses monócitos transfectados para ver se havia alguma diferença entre eles. Na avaliação dos monócitos transfectados com RNA tumoral total extraído com Trizol não pareceu haver qualquer diferença entre os monócitos não-transfectados ou transfectados na expressão das moléculas HLA-DR, CD14, CD80 e CD86. Fato corroborado por dados da literatura, onde DCs imaturas transfectadas com antígenos tumorais, além de não modificar seu processo de maturação, também não tiveram alterações no nível de expressão dos marcadores característicos de DCs imaturas e maduras (Bonehill, 2004). A transfecção das DCs após a maturação também não alterou o padrão de expressão das moléculas de superfície nessas células, independentemente do tamanho dos antígenos tumorais (Kang, 2006).

Já quando os monócitos foram transfectados com RNA tumoral total extraído com kit foi possível avaliar que apesar do percentual de células positivas para os marcadores analisados (HLA-DR, HLA-A,B,C, CD14, CD206, CD80, CD86 e CD83) não mudar, o nível de expressão desses marcadores na superfície celular mudava, e foi vista maior expressão de HLA-DR, CD80 e CD86, quando os monócitos eram transfectados com 10 µg de RNA tumoral total por 24h. O aumento na expressão da molécula constitutiva CD86 e a expressão da molécula CD80 sugeriu uma ativação das células transfectadas com RNA tumoral total. Isso

porque a expressão de CD86 é aumentada e CD80 tem uma expressão transiente e rápida nas células apresentadoras de antígeno ativadas (Greenwald, 2005). Assim como a maior expressão de HLA-DR sugere uma maior capacidade apresentadora, é paradoxal que não houvesse proliferação linfocitária induzida pelos monócitos transfectados com RNA tumoral total extraído com o kit.

O efeito do RNA na ativação da célula poderia ser devido a receptores do tipo toll (TLR – sigla do inglês toll like receptor), especificamente o TLR8, presente nas vesículas endossômicas de monócitos e macrófagos, capaz de reconhecer RNA simples fita e cuja ativação leva a célula a responder com padrão de resposta antiviral e produção de IFN tipo I (Liu, 2005). Apesar de não sabermos como se dá a entrada do RNA na célula, se ela acontecer por endocitose, pode ativar uma resposta via TLR fazendo com que seja induzida uma resposta proliferativa a partir dos monócitos transfectados com RNA autólogo de PBMC.

Vários trabalhos mostram que as proteínas antigênicas transfectadas em forma de RNA tumoral total passam a ser expressas na superfície de células transfectadas. Então, caso a entrada do RNA seja por endocitose, seria possível a esse RNA sair da vesícula endocítica por via semelhante ao cross-priming de antígenos existente nas DCs. No cross-priming, os antígenos, geralmente de pequeno tamanho, processados no endossomo/lisossomo de maneira ainda desconhecida ganham o citosol e passam a ser expressos via MHC I (Lin, 2008). Assim, esse RNA pode sair da vesícula endocítica para ganhar o citoplasma da célula, e lá estando, ter seu material traduzido. Sendo que essa proteína pode ser expressa em superfície, ou ficar no citoplasma e ser processada em proteassomo, participando da apresentação via MHC I.

Apesar dos monócitos transfectados por 24h com 10 µg de RNA tumoral total terem um fenótipo de célula ativada, por maior expressão das moléculas HLA-DR e CD86, assim como, por expressão da molécula CD80, esse efeito não dura muito. A janela de tempo onde elas mantêm esses altos níveis de moléculas expressas ficou entre 24h e 48h, já que as células transfectadas com a mesma dose de RNA por 48h não apresentaram esse perfil. Assim, apesar de ser possível que a melhor célula linfo-estimuladora fossem os monócitos transfectados por 24h, durante o ensaio de proliferação de 5 dias essa capacidade já teria se perdido, visto que o fenótipo de célula ativada se perdeu numa janela de tempo entre 24h e 48h. Entretanto, se essa mudança do fenótipo fizesse com que os monócitos transfectados

não fossem suficientes para estimulação linfocitária, não teríamos visto a linfoproliferação nos primeiros experimentos, e nos diferentes tempos usados para transfecção. Ou, talvez mais possivelmente, não seja necessária uma expressão tão alta dessas moléculas para estimular a proliferação linfocitária.

Os dados sugerem também que durante uma janela de tempo de 24h onde os monócitos não recebem nenhum estímulo forte de diferenciação e/ou ativação, somente o RNA tumoral total, elas podem se diferenciar em macrófagos ou DCs. Isso porque de 12h para 24h de cultura os níveis de CD14 caem, enquanto os de CD206 e HLA-DR aumentam, tendendo a um perfil de DC por baixa expressão de CD14 (Zhang, 2006). Entretanto, com 48h, o nível de expressão de CD14 volta a subir, o de CD206 se mantém e o de HLA-DR cai, tendendo a um perfil de macrófago, por presença de CD14 e CD206 juntos (Zhang, 2007).

A presença de um pequeno número de células expressando CD206 era esperada, já que esse é um marcador de macrófagos, apesar de terem sido usados monócitos nos ensaios. Os monócitos são células circulantes no sangue, que se diferenciarem rapidamente quando saem para os tecidos, e apesar de não terem recebido nenhum estímulo para diferenciação na cultura, a aderência ao plástico na separação dessas células já serviria como um sinal de ativação. Já era esperado, portanto, que conforme passasse o tempo de cultura, e com o aumento do tempo de transfecção, houvesse um aumento no número de células que se diferenciam para macrófago.

Nas células mononucleares usadas para transfecção não eram esperados níveis tão altos da molécula CD83, que é uma molécula conhecida como marcador de ativação em DCs. Essa alta expressão de CD83 indicou que as células colhidas por aférese ficavam com um perfil de células ativadas. Entretanto, o modo pelo qual o sangue é colhido no doador interfere nessa expressão. Já foi observado no nosso laboratório que o sangue colhido por venóclise não apresentava a expressão de CD83, a não ser que as DCs, após sua diferenciação a partir de monócitos, fossem ativadas (dados não publicados).

Outra molécula analisada nos monócitos transfectados com RNA total de SK-BR-3 foi o Her-2/neu, que foi escolhido como marcador de transfecção. Essa molécula foi descrita como um antígeno superexpresso, estando presente em cerca de 30% dos adenocarcinomas mamários, e também em outros adenocarcinomas (Stojadinovic, 2007). Além disso, sua expressão já havia sido mostrada por western blot em Li (2004), e nosso grupo também já

havia conseguido detectar sua expressão por imunohistoquímica em DCs transfectadas com RNA total de SK-BR-3.

O Her-2/neu é um receptor humano de fator de crescimento epidérmico, sendo assim um antígeno próprio. Entretanto, ele foi escolhido como antígeno por estar superexpresso na linhagem usada, e quando transfectado em forma de RNA ele poderia ser expresso na membrana ou passar a ser apresentado em contexto de HLA. Seu uso neste projeto foi baseado na possibilidade de, sendo ele um antígeno presente em qualquer pessoa, haver na circulação dos doadores de PBMC, linfócitos específicos contra ele, mesmo que sob regulação. Assim, sua apresentação por monócitos e em maior concentração do que as fisiologicamente encontradas, poderia desencadear uma resposta mensurável. Ao contrário, neo-antígenos tumorais nunca apresentados a linfócitos de doadores saudáveis não gerariam resposta por falta de clones específicos para tal.

Houve um pequeno aumento na expressão do Her-2/neu, com diferença significativa, entre o controle e o transfectado com 10 µg de RNA tumoral total por 24h, sugerindo que a transfecção passiva foi eficiente.

A maior dose usada no trabalho, 10 µg de RNA tumoral total foi a única que gerou resultados significativos com ativação das células transfectadas e maior expressão do antígeno avaliado. Assim, foi possível inferir que as baixas doses de RNA total usadas não levavam ao aumento de detecção do antígeno conhecido possivelmente pela pequena quantidade de RNA específico para o antígeno contido na amostra, visto que a maior parte desse RNA total é composta por RNA ribossomal.

Apesar do aumento na expressão do Her-2/neu, foi visto um nível muito baixo de expressão do mesmo nos monócitos transfectados, e como esse antígeno é descrito por estar superexpresso, resolvemos avaliar sua expressão na linhagem tumoral usada para extração do RNA total. Assim, poderíamos comparar os níveis de expressão na linhagem e nas células transfectadas.

A expressão do Her-2/neu nas células SK-BR-3 usadas não foi detectada por citometria de fluxo. Essas células também foram encaminhadas para imunohistoquímica, e obteve-se resultado negativo para expressão de Her-2/neu, confirmando os dados de citometria. As outras moléculas analisadas por citometria de fluxo, e que não estavam sendo expressas, como esperado, foram CD14, CD206, HLA-A,B,C, CD80 e CD86.

Foi confirmada a expressão de CD83, que já havia sido descrita nessa linhagem em trabalho do nosso grupo (Baleeiro, 2008a). Num outro trabalho também de nosso grupo, ficou demonstrado que a molécula CD83 quando liberada por células tumorais, apresentava possível propriedade imunossupressora, visto que, quando havia o bloqueio do CD83 solúvel com o uso de anticorpos, essa característica imunossupressora do sobrenadante de cultura de células tumorais era perdida (Baleeiro, 2008b).

A presença de HLA-DR nessa linhagem, entretanto, não era esperada. Visto que um dos mecanismos de escape tumoral é justamente a perda de expressão dessas moléculas apresentadoras de antígenos. Assim, diante desses dados e frente aos nossos resultados, podemos inferir que, como próprio resultado de alterações proporcionadas por manipulação *in vitro*, e também à instabilidade genômica própria de células tumorais, a linhagem SK-BR-3 usada perdeu a expressão do antígeno Her-2/neu e começou a expressar HLA-DR.

A expressão do antígeno Her-2/neu pode ter sido perdida durante a transição de um método de extração para outro, o que explicaria a falta de proliferação linfocitária induzida pelos monócitos transfectados com RNA extraído com kit.

Porém, outro fator pode ser associado à incapacidade estimuladora dos monócitos transfectados com o RNA tumoral total extraído com o kit. Além da perda de expressão do antígeno Her-2/neu, as amostras de RNA total extraídas com Trizol, usadas nos primeiros experimentos, que quando transfectadas em monócitos induziram a proliferação linfocitária, apresentavam um padrão de migração diferente por eletroforese em gel de agarose, havia 2 bandas diferentes do RNA total que podiam ser uma contaminação da amostra com DNA ou proteínas. Assim, poderia haver uma resposta proliferativa ao monócito estimulado com esses possíveis contaminantes. Isso poderia ser um dos motivos na diferença de indução de proliferação entre os dois métodos.

Há, ainda, mais um fator a ser associado à falta de proliferação induzida onde as células estimuladoras eram os monócitos transfectados com RNA tumoral total extraído com o kit. Foi discutido acima que a linhagem usada produz uma forma solúvel de CD83. Esse CD83 solúvel é fruto de splicing alternativo do mRNA da molécula completa de CD83, com propriedades imunossupressoras sobre os linfócitos T, enquanto o CD83 transmembrânico é associado à ativação das células apresentadoras e também dos linfócitos T (Dudziak, 2005).

Assim, quando extraímos o RNA total dessa linhagem, estaria contido dentre esse RNA total, essa forma de splicing alternativo do CD83 solúvel. Visto que a molécula CD83,

dentre as analisadas, foi a mais expressa, possivelmente havia uma grande quantidade de mRNA para CD83 solúvel. Quando esse RNA total foi transfectado nos monócitos, eles passariam a secretar o CD83 solúvel, o que geraria a supressão da resposta linfocitária demonstrado pela falta de proliferação, e falta de secreção de citocinas, com exceção de uma pequena quantidade de IL-10, nos sobrenadantes de co-cultura. Assim, poderíamos inferir que essa transfecção gerou uma resposta regulatória ou até mesmo anergia nesses linfócitos.

Como a falta de proliferação nos experimentos onde os monócitos foram transfectados com RNA total extraído de SK-BR-3 (Her-2/neu negativas) com kit, poderia ser atribuído ao CD83 solúvel possivelmente expresso pelos monócitos, faltava descobrir se o efeito de linfoproliferação visto primeiramente, era devido aos antígenos tumorais contidos na amostra de RNA total ou à contaminação da amostra de RNA tumoral total.

O ensaio de proliferação usando como células estimuladoras os monócitos transfectados com RNA tumoral total foi refeito. Foi usada uma linhagem SK-BR-3 comprovadamente positiva para o antígeno Her-2/neu, e a extração do RNA total foi feita pelos dois métodos anteriormente usados: Trizol e kit. O perfil de migração por eletroforese em gel de agarose foi igual para ambas as amostras, que apresentavam somente as 3 bandas esperadas de RNA total, e confirmou a ausência de contaminantes na amostra.

Esse RNA tumoral total foi transfectado em monócitos, assim como RNA extraído de PBMC autóloga, na dose de 10 µg de RNA total por 24h de transfecção. Os monócitos assim transfectados induziram linfoproliferação, tanto os monócitos transfectados com RNA tumoral total quanto os monócitos transfectados com RNA total de PBMC autóloga, apesar da resposta mais discreta com os monócitos transfectados com RNA de PBMC autóloga. Esse dado sugere que somente a transfecção com RNA induz uma capacidade estimuladora, mas a presença de antígenos na amostra de RNA potencializa essa capacidade. Então, deve haver um efeito sinérgico entre o RNA em si, e os antígenos contidos nesse RNA na mudança de fenótipo dos monócitos, que passam a serem indutores de proliferação de células autólogas.

Pode-se ressaltar ao término desse projeto, que o RNA é um adjuvante na estimulação da resposta linfocitária, sua presença por si só causa um efeito linfo-estimulador nas células transfectadas, resposta que é melhorada na presença de antígenos, como foi visto com o Her-2/neu. Entretanto, deve-se ter um conhecimento prévio do tumor do qual será extraído esse RNA, já que nele também estão contidos os fatores imunossupressores.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicaram ser possível a criação do método de avaliar indução de imunidade específica às células neoplásicas pela transfecção de monócitos com RNA tumoral total. Especificamente:

- A transfecção do RNA tumoral total nos monócitos fez com que essas células transfectadas apresentassem um perfil de células ativadas, com maior expressão de CD86 e HLA-DR, e também com a expressão de CD80.
- A transfecção passiva, por 24h, dos monócitos com 10 µg de RNA tumoral total causou um aumento significativo na expressão do antígeno tumoral Her-2/neu.
- A transfecção de monócitos com RNA tumoral total induziu proliferação linfocitária. Entretanto, quando as células usadas para extração do RNA total foram as SK-BR-3-Her-2/neu negativas com propriedades imunossupressoras, essa linfoproliferação foi perdida, e tendeu-se a uma aparente anergia dos linfócitos.
- A transfecção dos monócitos com RNA total de SK-BR-3 (Her-2/neu positivas) induziu proliferação linfocitária, recuperando o efeito visto primeiramente.

Em conclusão, as pesquisas que estão sendo feitas para desenvolvimento de vacinas usando o RNA como fonte de antígenos tumorais devem ser cautelosas, para não se ter o efeito contrário ao esperado, que é a ativação da resposta imune.

REFERÊNCIAS

Abrams SI, Stanziale SF, Lunin SD, Zaremba S, Schlom J. Identification of overlapping epitopes in mutant ras oncogene peptides that activate CD4+ and CD8+ T cell responses. *European Journal of Immunology*. 1996; 26(2): 435-43.

Askenazy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmunity Reviews*. 2008; 7: 370-5. Review.

Baleeiro RB, Bergami-Santos, PC, Tomiyoshi MY, Gross JL, Haddad F, Pinto CAL, Soares FA, Younes RN, Barbuto JAM. Expression of a dendritic cell maturation marker CD83 on tumor cells from lung cancer patients and several human tumor cell lines: is there a biological meaning behind it? *Cancer Immunology and Immunotherapy*. 2008a; 57: 265–70.

Baleeiro RB, Barbuto JAM. Local secretion/shedding of tumor-derived CD83 molecules: a novel tumor escape mechanism? *Molecular Immunology*. 2008b; 45(12): 3502-4.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998; 392(6673): 245-52.

Barbuto JAM. *Imunologia do câncer*. In: Younes RN, Biroolini D, editors. *Bases Fisiopatológicas da Cirurgia Moderna*. São Paulo: LEMAR; 1999. p 481-90.

Barbuto JA, Ensina LF, Neves AR, Bergami-Santos P, Leite KR, Marques R, Costa F, Martins SC, Camara-Lopes LH, Buzaid AC. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunology and Immunotherapy*. 2004; 53(12): 1111-8.

Bellone G, Carbone A, Smirne C, Scirelli T, Buffolino A, Novarino A, Stacchini A, Bertetto O, Palestro G, Sorio C, Scarpa A, Emanuelli G, Rodeck U. Cooperative Induction of a Tolerogenic Dendritic Cell Phenotype by Cytokines Secreted by Pancreatic Carcinoma Cells. *The Journal of Immunology*. 2006; 177: 3448–60.

Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *Journal Experimental Medicine*. 1996; 184: 465-72.

De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to *Biomedical Journal*: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [204 May 06].

Boczkowski D, Nair SK, Nam JH, Lyerly HK, Gilboa E. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer Research*. 2000; 60(4): 1028-34.

Bonehill A, Heirman C, Tuyaerts S, Michiels A, Breckpot K, Brasseur F, Zhang Y, van der Bruggen P, Thielemans K. Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules. *The Journal of Immunology*. 2004; 174: 6649-57.

Boog CJ, Kast WM, Timmers HT, Boes J, de Waal LP, Melief CJ. Abolition of specific immune response defect by immunization with dendritic cells. *Nature*. 1985; 318(6041): 59-62.

Buzaid AC. Strategies for combining chemotherapy and biotherapy in melanoma. *Cancer Control*. 2000; 7(2): 185-97.

Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997; 94(5): 1914-8.

Dall'Oglio M, Srougi M, Barbuto JA. Complete response of metastatic renal cancer with dendritic cell vaccine. *International Brazilian Journal of Urology*. 2003; 29(6): 517-9.

Dudziak D, Nimmerjahn F, Bornkamm GW, Laux G. Alternative splicing generates putative soluble CD83 Proteins that inhibit T cell proliferation. *The Journal of Immunology*. 2005; 174: 6672-6.

Gao L, Fan H, Lu H, Nie X, Liu Y, Yang Y, Qian K, Gao, F. Impact of transfection with total RNA of K562 cells upon antigen presenting, maturation, and function of human dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells. *Transfusion*. 2007; 47: 256-65.

Gilboa E, Nair SK, Lyerly HK. Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunology and Immunotherapy*. 1998; 46(2): 82-7.

Gilboa E. The promise of cancer vaccines. *Nature Reviews Cancer*. 2004a; 4(5): 401-11. Review.

Gilboa E, Vieweg J. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunological Reviews*. 2004b; 199: 251-63. Review.

Gogas H, Bafaloukos D, Aravantinos G, Fountzilas G, Tsoutsos D, Panagiotou P, Frangia K, Kalofonos HP, Briasoulis E, Castana O, Polyzos A, Pectasides D, Ioannovich J. Vinorelbine in combination with interleukin-2 as second-line treatment in patients with metastatic melanoma. A phase II study of the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Cancer Investigation*. 2004; 22(6): 832-9.

Greenwal RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annual Reviews Immunology*. 2005; 23: 515-48. Review.

Gross S, Walden P. Immunosuppressive mechanisms in human tumors: Why we still cannot cure cancer. *Immunology Letters*. 2007; 116(1): 7-14.

Grünebach F, Müller MR, Nencioni A, Brossart P. Delivery of tumor-derived RNA for the induction of cytotoxic T-lymphocytes. *Gene Therapy*. 2003; 10: 367-74.

Hallermalm K, Geer AD, Kiessling R, Levitsky V, Levitskaya J. Autocrine Secretion of Fas Ligand Shields Tumor Cells from Fas-Mediated Killing by Cytotoxic Lymphocytes. *Cancer Research*. 2004; 64: 6775–82.

Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70. Review.

Hamilton DH, Bretscher PA. Different immune correlates associated with tumor progression and regression: implications for prevention and treatment of cancer. *Cancer Immunology and Immunotherapy*. 2008; 57(8): 1125-36.

Heiser A, Dahm P, Yancey DR, Maurice MA, Boczkowski D, Nair SK, Gilboa E, Vieweg J. Human Dendritic Cells Transfected with RNA Encoding Prostate-Specific Antigen Stimulate Prostate-Specific CTL Responses In Vitro. *The Journal of Immunology*. 2000; 164: 5508–14.

Heiser A, Coleman D, Dannull J, Yancey D, Maurice MA, Lallas CD, Dahm P, Niedzwiecki D, Gilboa E, Vieweg J. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *Journal of Clinical Investigation*. 2002; 109(3): 409-17.

Hom SS, Topalian SL, Simonis T, Mancini M, Rosenberg SA. Common expression of melanoma tumor-associated antigens recognized by human tumor infiltrating lymphocytes: analysis by human lymphocyte antigen restriction. *Journal of Immunotherapy*. 1991; 10(3): 153-64.

Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman H, Dubinett SM. Non-Small Cell Lung Cancer Cyclooxygenase-2-dependent Regulation of Cytokine Balance in Lymphocytes and Macrophages: Up-Regulation of Interleukin 10 and Down-Regulation of Interleukin 12 Production. *Cancer Research*. 1998; 58: 1208-16.

Iero M, Valenti R, Huber V, Filipazzi P, Parmiani G, Fais S, Rivoltini L. Tumor-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death and Differentiation*. 2008; 15: 80-8.

Jarnjak-Jankovic S, Pettersen RD, Saeboe-Larssen S, Wesenberg F, Olafsen MR, Gaudernack G. Preclinical evaluation of autologous dendritic cells transfected with mRNA or loaded with apoptotic cells for immunotherapy of high-risk neuroblastoma. *Cancer Gene Therapy*. 2005; 12(8): 699-707.

Jodo S, Kobayashi S, Nakajima Y, Matsunaga T, Nakayama N, Ogura N, Kayagaki N, Okumura K, Koike T. Elevated serum levels of soluble Fas/APO-1 (CD95) in patients with hepatocellular carcinoma. *Clinical Experimentation Immunology*. 1998; 112: 166-71.

Kageshita T, Hirai S, Ono T, Hicklin DJ, Ferrone S. Down-Regulation of HLA Class I Antigen-Processing Molecules in Malignant Melanoma. *American Journal of Pathology*. 1999; 154: 745-54.

Kang TH, Lee JH, Bae HC, Noh KH, Kim JH, Song CK, Shin BC, Hung C, Wu TC, Park J, Kim TW. Enhancement of dendritic cell-based vaccine potency by targeting antigen to endosomal/lysosomal compartments. *Immunology Letters*. 2006; 106: 126-34.

Kavanagh DG, Kaufmann DE, Sunderji S, Frahm N, Le Gall S, Boczkowski D, Rosenberg ES, Stone DR, Johnston MN, Wagner BS, Zaman MT, Brander C, Gilboa E, Walker BD, Bhardwaj N. Expansion of HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells by dendritic cells transfected with mRNA encoding cytoplasm- or lysosome-targeted Nef. *Blood*. 2006; 107: 1963-9.

Kaufmann R, Spieth K, Leiter U, Mauch C, von den Driesch P, Vogt T, Linse R, Tilgen W, Schadendorf D, Becker JC, Sebastian G, Krenkel S, Kretschmer L, Garbe C, Dummer R.

Temozolomide in Combination With Interferon-Alfa Versus Temozolomide Alone in Patients With Advanced Metastatic Melanoma: A Randomized, Phase III, Multicenter Study from the Dermatologic Cooperative Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2005; 23(35): 9001-7.

Koopman LA, Corver WE, van der Slik AR, Giphart MJ, Fleuren GJ. Multiple Genetic Alterations Cause Frequent and Heterogeneous Human Histocompatibility Leukocyte Antigen Class I Loss in Cervical Cancer. *Journal of Experimental Medicine*. 2000; 191(6): 961-75.

Kowalska J, Lewdorowicz M, Zuberek J, Grudzien-Nogalska E, Bojarska E, Stepinski J, Rhoads RE, Darzynkiewicz E, Davis RE, Jemielity J. Synthesis and characterization of mRNA cap analogs containing phosphorothioate substitutions that bind tightly to eIF4E and are resistant to the decapping pyrophosphatase DcpS. *RNA*. 2008; 14: 1119-31.

Labrecque S, Naor N, Thomson D, Matlashewski G. Analysis of the anti-p53 antibody response in cancer patients. *Cancer Research*. 1993; 53(15): 3468-71.

Li H, Sánchez-Torres J, Del Carpio A, Salas V e Villalobo A. The ErbB2/Neu/HER2 receptor is a new calmodulin-binding protein. *Biochemical Journal*. 2004; 381: 257-66.

Lin MG, Zhan Y, Proietto AI, Prato S, Wu L, Heath WR, Villadangos JA, Lew AM. Selective suicide of cross-presenting CD8⁺ dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; 105(8):3029-34.

Liu YJ. IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annual Reviews Immunology*. 2005; 23: 275-306. Review.

Lu B, Finn OJ. T-cell death and cancer immune tolerance. *Cell Death and Differentiation*. 2008; 15: 70-9.

Ministério da Saúde. 2007. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br> [17 de Março de 2008].

Mitchell DA, Nair SK. RNA transfected dendritic cells as cancer vaccines. *Current opinion in molecular therapeutics* 2000; 2(2): 176-81.

Motzer RJ, Bacik J, Mazumdar M. Prognostic factors for survival of patients with stage IV renal cell carcinoma: memorial sloan-kettering cancer center experience. *Clinical Cancer Research*. 2004a; 10: 6302-3.

Motzer RJ, Bacik J, Schwartz LH, Reuter V, Russo P, Marion S, Mazumdar M. Prognostic factors for survival in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2004b; 22(3): 454-63.

Mu LJ, Kyte JA, Kvalheim G, Aamdal S, Dueland S, Hauser M, Hammerstad H, Waehre H, Raabe N, Gaudernack G. Immunotherapy with allotumour mRNA-transfected dendritic cells in androgen-resistant prostate cancer patients. *British Journal of Cancer*. 2005; 93(7): 749-56.

Nair SK, Morse M, Boczkowski D, Cumming RI, Vasovic L, Gilboa E, Lyerly HK. Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumor RNA-transfected dendritic cells. *Annals of Surgery*. 2002; 235(4): 540-9.

Pardoll D. Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annual Reviews Immunology*. 2003; 21: 807-39. Review.

Parmiani G, Castelli C, Dalerba P, Mortarini R, Rivoltini L, Marincola FM, Anichini A. Cancer Immunotherapy With Peptide-Based Vaccines: What Have We Achieved? Where Are We Going? *Journal of National Cancer Institute*. 2002; 94: 805-18. Review.

Pockaj BA, Basu GD, Pathangey LB, Gray RJ, Hernandez JL, Gendler SJ, Mukherjee P. Reduced T-Cell and Dendritic Cell Function Is Related to Cyclooxygenase-2 Overexpression and Prostaglandin E2 Secretion in Patients With Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2004; 11(3): 328-39.

Randolph GJ, Jakubzick C, Qu C. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Current Opinion in Immunology*. 2007; 20: 1-9.

Roth W, Isenmann S, Nakamura M, Platten M, Wick W, Kleihues P, Bähr M, Ohgaki H, Ashkenazi A, Weller M. Soluble Decoy Receptor 3 Is Expressed by Malignant Gliomas and Suppresses CD95 Ligand-induced Apoptosis and Chemotaxis. *Cancer Research*. 2001; 61: 2759-65.

Rosenberg SA. Principles of Cancer Management: Biologic Therapy. In: DeVita HR, editor. Cancer: Principles, Practice of Oncology. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1997. p 349.

Schenborn E, Stecha P. Ribo m⁷G Cap analog: A Reagent for Preparing In Vitro Capped Transcripts. Promega Corporation. Available from: <http://www.promega.com> [2007 August 13]

Sombroek CC, Stam AGM, Masterson AJ, Loughheed SM, Schakel MJAG, Meijer CJLM, Pinedo HM, van den Eertwegh AJM, Scheper RJ, de Gruijl TD. Prostanoids Play a Major Role in the Primary Tumor-Induced Inhibition of Dendritic Cell Differentiation. *The Journal of Immunology*. 2002; 168: 4333–43.

Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1978; 75(10): 5132-6.

Steinman RM. Dendritic cells. *Transplantation*. 1981; 31(3): 151-5.

Steinman RM, Gutchinov B, Witmer MD, Nussenzweig MC. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Journal of Experimental Medicine*. 1983; 157(2): 613-27.

Steinman RM, Inaba K, Turley S, Pierre P, Mellman I. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Human Immunology*. 1999; 60(7): 562-7.

Stojadinovic A, Mittendorf EA, Holmes JP, Amin A, Hueman MT, Ponniah S, Peoples GE. Quantification and Phenotypic Characterization of Circulating Tumor Cells for Monitoring Response to a Preventive HER2/neu Vaccine-Based Immunotherapy for Breast Cancer: A Pilot Study. *Annals of Surgical Oncology*. 2007; 14(12): 3359-68.

Ueno H, Tcherepanova I, Reygrobellet O, Laughner E, Ventura C, Palucka AK, Banchereau J. Dendritic cell subsets generated from CD34+ hematopoietic progenitors can be transfected with mRNA and induce antigen-specific cytotoxic T cell responses. *Journal of Immunological Methods*. 2004; 285(2): 171-80.

Van den Bosch GA, Ponsaerts P, Nijs G, Lenjou M, Vanham G, Van Bockstaele DR, Berneman ZN, Van Tendeloo VFI. Ex vivo induction of viral antigen specific CD8⁺ T cell responses using

mRNA-electroporated CD40-activated B cell. *Clinical and Experimental Immunology*. 2005; 139: 458-67.

van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991; 254(5038): 1643-7.

Yamamoto Y, Toi M, Kondo S, Matsumoto T, Suzuki H, Kitamura M, Tsuruta K, Taniguchi T, Okamoto A, Mori T, Yoshida M, Ikeda T, Tominaga T. Concentrations of Vascular Endothelial Growth Factor in the Sera of Normal Controls and Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*. 1996; 2: 821-6.

Zhang L, Lun Y, Yan D, Yu L, Ma W, Du B, Zhu X. Proteomic analysis of macrophages: A new way to identify novel cell-surface antigens. *Journal of Immunological Methods*. 2007; 321: 80-5.

Zhang R, Becnel L, Li M, Chen C, Yao Q. C-reactive protein impairs human CD14⁺ monocyte-derived dendritic cell differentiation, maturation and function. *European Journal of Immunology*. 2006; 36: 2993-3006.

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](#)