Flavia Hebeler Barbosa

Terapia gênica contra o melanoma murino B16F10-Nex2 utilizando a quimera IL-13RQ2-Fc e interleucina 12 em associação com o composto 7A ciclopaladado

> São Paulo 2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Flavia Hebeler Barbosa

Terapia gênica contra o melanoma murino B16F10-Nex2 utilizando a quimera IL-13Rα2-Fc e interleucina 12 em associação com o composto 7A ciclopaladado

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luiz R. Travassos

São Paulo 2008

Hebeler-Barbosa, Flavia

Terapia gênica contra o melanoma murino B16F10-Nex2 utilizando a quimera IL-13Rα2-Fc e interleucina IL-12 em associação com o composto 7A ciclopaladado. / Flavia Hebeler-Barbosa -- São Paulo, 2008. xv, 142f.

Tese (Doutorado) Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.

Título em inglês: Gene therapy against murine melanoma B16F10-Nex2 using IL-13R α 2-Fc chimera and interleukin 12 in association with a cyclopalladated drug.

1. Melanoma Experimental 2. Interleucina-12 3. Interleucina-13 4. Vacinas de DNA 5. Vacinas Anti-Câncer

A toda minha família querida:

Aos meus pais Márcia e Fernando, pois tudo o que sou eu devo a vocês! Às minhas irmãs Marcela e Fernanda, minhas amigas, confidentes e parceiras, À minha sobrinha, Isabella Sanches, aquela que traz alegria à nossa vida, E ao meu amor Sidnei Trovão, pois com você aprendi o que é o amor verdadeiro. Por toda paciência, confiança, estímulo e companheirismo. Esta conquista não é só minha, mas também de todos vocês!

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram de alguma maneira para a execução deste trabalho, meus agradecimentos, em especial para:

 $\sqrt{}$ Deus, em Quem coloco sempre nas mãos a minha vida e a minha direção. A fé em Ti sempre me deu forças para nunca desistir!

√ Meus pais, por todo apoio incondicional e esforço para que eu pudesse estudar e lutar pelos meus sonhos. Vocês são tudo para mim.

√ Minhas irmãs por estarem sempre ao meu lado com uma palavra de incentivo e alegria. Marcela, a caçulinha veio até Sampa cuidar de mim quando eu machuquei meu joelho.

 $\sqrt{}$ Meu marido Sidnei Trovão, pelo seu amor e carinho, pela cumplicidade, paciência, pelos momentos de ausência, compreensão e principalmente por entender e valorizar os meus sonhos. Foram cinco anos morando em cidades diferentes e apesar da distância você sempre me motivou a continuar lutando e é por você também que consegui seguir firme e fazer doutorado aonde eu tanto queria. Te amo demais!

√ Meus sogros José Trovão (em nossos corações) e Ana Lúcia por me acolherem sempre como uma filha em seu lar. Todos esses anos vocês foram minha família e meu apoio. Obrigada Tó, Cris, Lu e minha princesa Rayssa por serem minha segunda família.

 $\sqrt{}$ Meu orientador Prof. Dr. Luiz Rodolpho Travassos, tenho muito orgulho por ter sido sua aluna e me sinto realmente privilegiada por ter convivido com o senhor nestes anos. Pelo exemplo de dedicação à pesquisa, pela confiança depositada em mim e por todos aqueles momentos de transmissão de conhecimentos (que com certeza vão muito além do conhecimento científico) e que o senhor proporciona aos seus alunos. Ah! Claro, pelas exigências também, que me fez amadurecer cientificamente. ("Eu acredito demais na sorte. E tenho constatado que, quanto mais duro eu trabalho, mais sorte eu tenho." Thomas Jefferson).

√ Todos os meus amigos da UNONEX: Andrey, Thaysa, Carla, Fabiana, Bianca, Ellen, Luis, Felipe, Filipe (Fizão), Manu, Eliana, Alisson, Ana Beatriz e Seu "Tunico" (Antônio), aos que passaram por lá: Clarissa, Rafa (Toddy), Cambina, Tiemi e Cíntia e aos recém-chegados: Luana, Jorge e Natasha. Pelo companheirismo, discussões científicas, troca de idéias, conversas um pouco mais descontraídas, aquelas mais calorosas (rs), ombro amigo nas horas difíceis e é claro ajuda valiosa em muitos experimentos (quem vai me ajudar a injetar hoje?).

√ Todos os amigos da Disciplina de Biologia Celular, em especial, Rafael Miyazawa, Carlos, Wagner Batista, Kátia, Sílvia, Teresa, Sheila, Ludmila, Júlia, Agenor (Júnior), Cristiane, Rodrigo, Geisa e Milene. Pela ajuda em experimentos, discussões de protocolos, empréstimo de reagentes e é claro não esquecendo as risadas, os momentos descontraídos e os momentos de desabafo.

√ Todos os professores da Disciplina de Biologia Celular: Profa. Dra. Elaine G. Rodrigues, que contribuiu diretamente na idealização e execução deste trabalho, Profa. Dra. Rosana Puccia, pelo auxílio na parte de biologia molecular e pelas conversas, Profa. Dra. Olga Fishman, Prof. Dr. Sérgio Schenkman e Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo. √ Todos os funcionários da Disciplina de Biologia Celular: Luis, Maria, Dona Sebá, Seu Américo e Claudeci. O trabalho de vocês foi fundamental pra que este trabalho fosse possível. Mas do que tudo vocês se tornaram grandes amigos.

 $\sqrt{}$ As secretárias e amigas Márcia e Mércia. Obrigada por toda ajuda e atenção nos assuntos burocráticos e pelas orientações na execução deste trabalho.

 $\sqrt{}$ Todos os amigos do departamento de Imunologia: Érika, Paty, Ronny, André, Bia, Fabiana, Juliana e Carla pela amizade e ajuda em experimentos e protocolos de citometria de fluxo, e à Profa. Dra. Ieda M. L. Maugéri pelo auxílio e utilização do citômetro.

√ Todas as amigas com quem dividi apartamento durante esses anos: Kátia, Sílvia, Carla, Patrícia, Érika, Lisie, Fran, Roberta, Milene e Emília. Foram muitos momentos vividos, muitas alegrias, muitas conversas, algumas briguinhas (rs), risadas, choros, confidências, chegamos a ser a casa das sete mulheres. Vocês foram muito importantes para mim e tenho todas vocês guardadas no meu coração. Vocês sabem a importância de tudo isso e contribuíram para esta vitória.

 $\sqrt{}$ Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa de doutorado (Capes).

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	
I – RESUMO/ABSTRACT	1
II – INTRODUÇÃO	
O CÂNCER DE PELE	4
O MELANOMA	6
TERAPIAS ATUAIS	11
RESPOSTA IMUNE ANTI-TUMORAL	13
CÉLULAS NKT	19
ESTRATÉGIAS PARA IMUNOTERAPIA	20
IL-12	24
IL-13	26
III – OBJETIVOS	
IV – MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 – Cultivo de células	32
4.2 – Construção da vacina de DNA IL-13Rα2-Fc	32
4.2.1 – Extração de RNA de macrófagos e esplenócitos	
4.2.2 – <i>RT</i> - <i>PCR</i>	
4.2.3 – Purificação dos produtos amplificados e clonagem	
4.2.4 – Estudo de Restrição	
4.2.5 – Extração de RNA do hibridoma 17 C, RT-PCR e ELISA	
4.2.6 – Sequenciamento	
4.2.7 – Fusão dos fragmentos e construção da quimera IL-13R α 2-Fc	41
4.2.8 – Subclonagem em vetor eucarótico, expansão e purificação em gradiente de césio	
4.3 – Produção e avaliação da vacina de dna (quimera IL-13Rα2-FC recombinante)	45
4.3.1 – Transfecção de células de mamífero	
4.3.2 – Purificação da proteína e visualização por SDS-PAGE	47
4.3.3 – Immunoblotting	
4.3.4 – Avaliação da produção e atividade biológica da quimera por ELISA-Q	
4.4 – EXPANSÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO PLASMÍDEO EXPRESSANDO IL-12 MURINA	50
4.4.1 – Avaliação da produção de IL-12 por ELISA	
4.4.2 – Avaliação da atividade biológica da IL-12 recombinante	
4.5 – Experimentos <i>in vivo</i>	53
4.5.1 – Animais	

4.5.2 – Desafio tumoral	
4.5.3 – Esquemas de tratamento	
4.6 – Eficácia Terapêutica	54
4.6.1 – Desenvolvimento Tumoral	
4.6.2 – Sobrevida dos animais	
4.6.3 – Citometria de fluxo (FACS) ex vivo	
4.7 – Análise Estatística	
V – RESULTADOS	
5.1 – Preparação de RNA	
5.2 – RT-PCR, clonagem, restrição e sequenciamento do receptor IL-13R α 2	59
5.3 – RT-PCR, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA PORÇÃO FC	60
5.4 – ELISA para detecção da produção de anticorpos pelo hibridoma 17C	69
5.5 – Proteína recombinante IL-13Rα2-Fc	69
5.5.1 – Construção e análise em SDS-PAGE	
5.5.2 – Immunoblotting	
5.5.3 – ELISA Quimioluminescente	
5.6 – Expansão, purificação e análise do plasmídeo pIL-12	
5.6.1 – Análise do pIL-12 antes e após purificação por césio	
5.6.2 – Avaliação da produção da citocina IL-12 após transfecção in vitro	
5.6.3 – Avaliação da função biológica da citocina IL-12 recombinante	
5.7 – Experimentos <i>in vivo</i>	
5.7.1 – Desenvolvimento Tumoral	
5.7.2 – Sobrevida dos animais	
5.7.3 – Citometria de fluxo (FACS)ex vivo	
VI – DISCUSSÃO	
VII – CONCLUSÕES	
VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

ANEXOS		131
1- Aprovação do projeto pelo comitê de	ÞE ÉTICA EM PESQUISA	131
2- Artigo		132

LISTA FIGURAS

- Figura 5 Análise de restrição com a enzima BamHI em gel de agarose 1%. A banda de aproximadamente 4 Kb corresponde ao pGEM-T + o inserto de 1.002 pb clonado. 1- Marcador molecular λDNA/Hind III (Gibco BRL) + marcador molecular ΦX174RF DNA/Hae III (Invitrogen)......pág. 65
- Figura 6 Análise de restrição com a enzima *Hind* III em gel de agarose 1%. A banda de aproximadamente 4 Kb corresponde ao pGEM-T + o inserto clonado de 1.002 pb. 1- Marcador molecular λDNA/*Hind*III (Gibco BRL).......pág. 65
- Figura 7 Sequência completa que codifica a porção extracelular do receptor IL-13Rα-2. O peptídeo sinal corresponde a sequência destacada e os sítios possíveis para N-glicosilação estão marcados com #......pág. 66

- Figura 8 Eletroforese em gel de agarose 1% com a amplificação por RT-PCR do fragmento completo que codifica a porção CH2-CH3 do anticorpo murino IgG2a (654 pb). RNA era procedente do hibridoma 17C. 1- Marcador Molecular ΦX174RF DNA/*Hae* III (Invitrogen)......**pág. 67**
- Figura 9 Sequência completa que codifica a porção Fc do anticorpo murino IgG2a, clonada em pGEM-T......pág. 68
- Figura 11 Eletroforese em gel de agarose 1% com a amplificação por PCR overlap da cadeia IL-13Ra2 e da porção Fc do anticorpo murino IgG2a com os primers P1 a P4 (1 e 2) e re-amplificação com os primers externos com diferentes quantidades de template (3-6). Coluna 7 é o controle negativo da reação. A- Marcador molecular de 1 kb (Invitrogen). A realização do PCR-overlap está esquematizada abaixo.......pág. 72
- Figura 13 Restrição do plasmídeo pIL-13R com a enzima BamHI. Eletroforese foi realizada em gel de agarose 1%. 3 e 4- Inserto clonado na direção incorreta e correta, respectivamente. 1- Marcador molecular λDNA/Hind III (Gibco BRL). 2- Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen)......pág. 74
- Figura 14 Análise por SDS-PAGE da proteina recombinante IL-13Rα2-Fc, que migrou no tamanho esperado de aproximadamente 85 kDa. O gel foi realizado em condições redutoras e corado pela prata. A proteína foi analisada após purificação em coluna G do sobrenadante obtido de células B16F10-Nex2 transfectadas com o vetor pIL-13R, após 48 horas de expressão gênica. Marcador de peso molecular: Invitrogen.......pág. 75

- Figura 15 Immunoblotting mostrando a proteina recombinante quimera IL-13Rα2-Fc, após revelação com DABI (1). 2- Controle negativo, ou seja, sobrenadante de células transfectadas com o vetor vazio......pág. 76
- Figura 17 Eletroforese em gel de agarose 1% do plasmídeo pIL-12 digerido com a enzima de restrição Sma I e Spe I, respectivamente (1 e 2) e com a enzima Sma I após purificação em gradiente de césio (3). A- Marcador molecular λDNA/Hind III (Gibco BRL)......pág. 80
- Figura 18 Concentração de IL-12, mensurada através de ELISA, no sobrenadante de células B16F10-Nex2 transfectadas com o plasmídeo pIL-12, após 48 horas de expressão gênica. Cada barra é representativa de um experimento realizado em triplicata......pág. 81

- Figura 23 Desenvolvimento tumoral de animais tratados com ambos os plasmídeos (pIL-12 e pIL-13R) e com os vetores vazios. Animais C57Bl/6 foram injetados com 5 X 10⁴ células tumorais B16F10-NEX2 e tratados com pIL-12, um dia após o desafio em dose única e com pIL-13R, 5 dias após o desafio e por mais 5 vezes, de 5 em 5 dias......pág. 87
- Figura 24 Desenvolvimento tumoral de animais tratados com ambos os plasmídeos (pIL-12 e pIL-13R) em associação com a droga 7A e com os respectivos controles com os vetores vazios. Animais C57Bl/6 foram injetados com 5 X 10⁴ células tumorais B16F10-NEX2 e tratados com pIL-12, um dia após o desafio em dose única e com pIL-13R, 5 dias após o desafio e por mais 5 vezes, de 5 em 5 dias. Os animais foram tratados com 10 μM da droga, 3 vezes por semana, pela via intraperitoneal......pág. 88

Resumo/Abstract

I - RESUMO

É freqüente em determinadas doenças, e inclusive no câncer, uma resposta imune que leva a formação de interleucinas imunossupressoras cujo efeito principal é a paralisação de macrófagos e inversão do perfil em geral protetor (Th-1) para outro não protetor ou predominantemente Th-2. A resposta imune polarizada tipo 2 tem sido associada à progressão tumoral e metástase. A interleucina 13 atualmente é considerada um mediador de resposta imune tipo 2, pois apresenta inúmeras atividades imunoregulatórias em muitas doenças, incluindo no câncer. Do ponto de vista celular, o papel protetor ou supressor das células NKT restritas a CD1d na imunidade tumoral tem sido bastante explorado. Enquanto IL-12 pode ativar células NKT tipo I produtoras de IFN- γ , as células NKT tipo 2 têm sido descritas como principal fonte de IL-13 e esse mecanismo foi o responsável pela inibição da imunovigilância em alguns modelos tumorais. Uma das cadeias do receptor, IL-13R α 2, possui alta afinidade pela IL-13 e pode atuar como um inibidor dominante negativo ou "receptor decoy", suprimindo a ação da IL-13 e assim contribuindo para a manutenção da imunovigilância tumoral. No presente trabalho, construímos uma quimera IL-13Rα2-Fc no vetor de expressão eucariótica VR1012 e confirmamos a identidade da proteína recombinante por immunoblotting. Através do ensaio de ELISA quimioluminescente, observamos que a atividade biológica da quimera produzida, ou seja, a sua alta afinidade pela IL-13, estava preservada. Esta vacina de DNA foi então testada no modelo singênico de melanoma murino B16F10-Nex2, isoladamente ou em associações com um plasmídeo contendo o gene da IL-12. Um protocolo de bioquimioterapia foi então construido com o composto ciclopaladado 7A. Experimentos in vivo mostraram um efeito protetor mediado pela alta produção de IFN-y e

"down-regulation" de interleucinas antiinflamatórias. A bioquimioterapia *in vivo* com ambos os plasmídeos em associação com a droga 7A foi o melhor protocolo terapêutico o qual levou a uma redução significativa na evolução tumoral, protegendo 30% dos animais, que permaneceram livres de tumor. Demonstramos que a primeira administração do plasmídeo expressando IL-12, seguida de contínuas doses do plasmídeo expressando IL-13R α 2-Fc juntamente com a droga 7A resultou em uma atividade anti-tumoral mediada pela alta produção de citocinas pró-inflamatórias e inibição ou controle de mecanismos imunossupressores, principalmente recrutamento de células T NK1.1⁺ produzindo IL-10 e IL-13.

ABSTRACT

Interleukin 13 has emerged as a central mediator of a Th 2-dominant immune response and it has immunoregulatory activities in many diseases, including cancer. The protective or suppressive role of CD1d-restricted NKT cells in tumor immunity has been well documented. Whereas IL-12 can activate type I IFN- γ -producing NKT cells, type II NKT cells have been reported to produce IL-13 and this mechanism was responsible for immunosurveillance suppression in some tumor models. The high affinity chain of the receptor, IL-13R α 2, may act as a dominant negative inhibitor or "decoy receptor" suppressing the action of interleukin 13 then helping the maintenance of tumor immunosurveillance. Here, we constructed an IL-13R α 2-Fc chimera in an expression vector VR1012 and confirmed the identity of our recombinant protein by immunoblotting analysis and its bioactivity (binding to IL-13) in an ELISA chemiluminescent assay. Such DNA vaccine was tested against syngeneic B16F10-NEX2 murine melanoma. Experiments in vivo were carried out and the results showed a protective effect mediated by high production of IFN- γ and down-regulation of the antiinflammatory interleukins. Biochemotherapy in vivo with plasmid containing the gene for IL-13R α 2-Fc in association with plasmid that encodes the gene for IL-12 combined with treatment with the 7A cyclopalladated compound led to a significant reduction of tumor evolution and complete protection of 30% of mice that remained tumor free. We conclude that IL-12 gene therapy, followed by continuous doses of IL-13R α 2-Fc gene associated with 7A chemotherapy resulted in anti-tumor activity owing to the high production of pro-inflammatory cytokines and down regulation of immune suppression mechanisms, specifically involving the recruitment of NK1.1⁺ T cells producing IL-10 and IL-13.

Introdução

II - INTRODUÇÃO

O CÂNCER DE PELE

Câncer é o crescimento descontrolado de um conjunto de células resultante de alterações genéticas (acúmulo de mutações) que levam a expressão de proteínas alteradas, em particular aquelas que regulam o ciclo celular, defeitos em genes supressores de tumor, expressão de oncogenes; ou mesmo outras alterações que podem levar à produção excessiva de hormônios, fatores de crescimento, fatores hematopoiéticos, enzimas, citocinas, expressão de neo-antígenos, antígenos de diferenciação, entre outros. Um dos aspectos mais importantes e preocupantes das neoplasias malignas é a capacidade de invadir os tecidos e órgãos vizinhos normais, metastatizando para órgãos distantes.

De todas as neoplasias existentes, o câncer da pele é muito freqüente. Refere-se ao crescimento anormal e descontrolado das células que compõem a pele. Estas células se dispõem formando camadas e, dependendo da camada afetada, teremos os diferentes tipos de câncer. Os mais comuns são o carcinoma basocelular (CBC), o carcinoma espinocelular (CEC) e o melanoma maligno (MM). O câncer de pele é mais comum em indivíduos com mais de 40 anos de pele clara, sendo relativamente raro em crianças e negros, com exceção daqueles que apresentam doenças cutâneas prévias ou alterações genéticas. Indivíduos de pele clara, sensíveis à ação dos raios solares, ou com doenças cutâneas prévias são as principais vítimas do câncer de pele. Os indivíduos de cor negra normalmente têm câncer de pele nas regiões palmares e plantares.

O CBC e CEC são as neoplasias mais freqüentes da pele e podem estar relacionadas a exposições solares freqüentes ao longo de anos em pessoas de pele clara. As lesões ocorrem principalmente nas áreas mais fotoexpostas como face, pescoço, dorso, antebraços e mãos. Já o melanoma maligno tem sido relacionado a exposições solares intensas, com queimaduras solares dolorosas e com bolhas, durante a infância.

O carcinoma basocelular é o câncer de pele mais comum, responsável por 70% dos diagnósticos de câncer de pele. Detectado precocemente a possibilidade de cura é grande, pois é um câncer que praticamente não metastatiza. Pode se manifestar sob a forma de uma pápula com superfície perlácea (aspecto perolado) ou de uma ferida que não cicatriza. A gravidade do CBC se manifesta dependendo do tipo histológico e da localização do tumor, sendo mais agressivo em locais como pálpebra, nariz, orelha entre outros, onde a cirurgia tende a ser mais difícil. O carcinoma espinocelular é o segundo tipo mais comum de câncer da pele, responsável por aproximadamente 25% dos casos. Também é grande a possibilidade de cura, porém neste caso o risco de metástases aumenta, podendo levar à morte. Pode apresentar-se como uma placa endurecida, área descamativa ou crostosa, ferida. Este tipo de câncer pode aparecer sobre áreas de cicatriz de queimadura antigas. O número de casos novos de câncer de pele não melanoma estimados para o Brasil em 2006 foi de 55.480 casos em homens e de 61.160 em mulheres, de acordo com as últimas estimativas de incidência de câncer publicadas pelo INCA. Estes valores correspondem a um risco estimado de 62 casos novos a cada 100 mil homens e 60 para cada 100 mil mulheres (www.inca.gov.br; Kufe et al., 2003).

O melanoma, embora seja o câncer de pele menos comum, é o mais perigoso. Alguns indivíduos com história familiar podem apresentar este tipo de câncer mesmo sem exposição ao sol. Pode apresentar-se como uma lesão enegrecida, com bordas mal delimitadas, com cores e diâmetros que podem se alterar com o tempo. A doença é predominante em adultos brancos e embora só represente 4% dos tipos de câncer de pele, o melanoma é o mais grave devido à alta capacidade de produzir metástases.

O MELANOMA

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer que tem origem nos melanócitos, células originárias da crista neural que migraram para a pele e outras localidades como os olhos e orelha interna. A principal função dos melanócitos é a síntese, estocagem e transferência de pigmentos de melanina, armazenados em organelas denominadas melanossomos, para células epiteliais vizinhas.

O melanoma pode surgir a partir da pele normal íntegra ou de uma lesão pigmentada préexistente. A manifestação da doença na pele normal se dá a partir do aparecimento de uma pinta escura de bordas irregulares acompanhada de coceira e descamação. Em casos de uma lesão pigmentada pré-existente, ocorre um aumento no tamanho, alteração na coloração e na forma da lesão que passa a apresentar bordas irregulares (www.inca.gov.br). O diagnóstico inicial é baseado em características clínicas típicas, o chamado ABCD do melanoma, ou seja, assimetria da lesão, presença de bordas irregulares, cor variada e diâmetro maior que 6 mm². Entretanto, o diagnóstico definitivo é obtido após biópsia e avaliação histológica da lesão onde se observa a presença de melanócitos atípicos proliferantes ao longo da junção derme-epiderme ou que se infiltram na epiderme (melanoma *in situ*). O fator mais importante no prognóstico da doença é o tipo de crescimento, horizontal ou vertical. Se a doença é detectada no seu estágio inicial, ou seja, na fase de crescimento radial (RGP-radial growth phase) e ainda está restrita à pele, a possibilidade de cura é grande, pois os tumores iniciais, em sua maioria, são tratados com uma simples excisão cirúrgica. Entretanto, quando as células são capazes de se desenvolver em nódulos infiltrando a derme, ou seja, a fase de crescimento vertical do melanoma (VGP), o prognóstico é ruim e as estimativas de sobrevivência do paciente diminuem. Melanomas no estágio VGP possuem alta capacidade de metástase e uma vez iniciado o processo metastático o tumor torna-se resistente aos métodos atuais de terapia e quanto maior o estadiamento da doença, menor é o índice de sobrevida dos pacientes (Slominski *et al.*, 2001; Houghton *et al.*, 2002; Balch *et al.*, 2004).

Quanto à epidemiologia do melanoma, a doença atinge praticamente todos os continentes do mundo sendo predominante no hemisfério norte nas regiões economicamente mais desenvolvidas. Nas regiões mais desenvolvidas do globo concentram-se aproximadamente 82% de todos os casos registrados, de acordo com a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC - International Agency for Research on Cancer - http://www.iarc.fr). A América do Norte está entre os continentes com números mais expressivos: entre os homens apresenta uma taxa de incidência de aproximadamente 41% e entre as mulheres uma taxa de 31% de todos os casos registrados no mundo. Nos Estados Unidos, o melanoma foi o câncer de aumento mais expressivo, tendo sua incidência quase triplicada nas últimas cinco décadas (Houghton et al., 2002). Na Europa, ocorre uma inversão e as mulheres são mais atingidas que os homens. Os homens representam 34% em relação à estatística mundial enquanto as mulheres representam aproximadamente 44% de todos os casos registrados. A América do Sul é responsável por aproximadamente 4,5% e 4,9% de todos os casos de melanoma registrados no mundo em homens e mulheres, respectivamente, sendo o Brasil o país de maior incidência (IARC). Segundo a última estimativa de incidência de câncer no Brasil realizada pelo INCA,

eram previstos para 2006, 2.710 casos novos em homens e 3.050 casos novos em mulheres. As maiores taxas do país verificam-se na região Sul.

O melanoma é um dos melhores exemplos de como a genética e o meio ambiente interagem na patogênese do câncer e sua incidência é fortemente afetada pela raça e localização geográfica (Houghton et al., 2002). Apesar da etiologia do melanoma ser complexa e multifatorial, as queimaduras e a exposição cumulativa aos raios solares têm sido consideradas elementos chave para o desenvolvimento do tumor, juntamente com fatores do hospedeiro como componentes hereditários (história de melanoma familiar), presença de grande número de nevus melanocíticos ou atípicos, além de cor da pele, dos olhos e dos cabelos (Briollais et al., 1996; Elwood et al., 1997; Chaudru et al., 2004). Ainda em relação ao hospedeiro, as reações de pele que cada indivíduo apresenta quando exposto ao sol é um fator importante, como por exemplo, a propensão a queimaduras. Estudos indicam que a exposição cumulativa e excessiva ao sol durante os primeiros 10 a 20 anos de vida aumenta muito o risco de câncer de pele (Chaudru et al., 2004). Recentemente, Ivry et al., 2006 investigaram o papel da exposição solar na etiologia do melanoma através de uma extensa revisão bibliográfica tanto da área de pesquisa básica como clínica, e concluíram que a exposição solar em conjunto com alguns fatores genéticos contribui significativamente para o desenvolvimento do melanoma sendo, portanto, umas das causas primárias do desenvolvimento da doença. Uma outra evidência para a associação entre o melanoma e a radiação UV é o fato de que pessoas com xeroderma pigmentosum; uma doença hereditária onde os indivíduos apresentam um defeito no sistema de enzimas necessárias para reparar o dano causado pelas radiações UV no DNA; possuem um risco mil vezes maior do que pessoas normais para desenvolver câncer de pele do tipo melanoma. Além dos seus efeitos diretos a radiação UV também induz supressão imune,

provavelmente interferindo com os mecanismos de imunovigilância contra o câncer (Houghton *et al.*, 2002, Ivry *et al.*, 2006).

Quanto ao espectro de radiação solar, não está claro na literatura quais os tipos de radiação, UVA ou UVB ou mesmo ambas, são responsáveis pelo desenvolvimento do melanoma. A literatura é muitas vezes controversa e freqüentemente os dados não podem ser devidamente comparados devido a diferenças na casuística da pesquisa e nos métodos utilizados para avaliação da influência de cada tipo de radiação sobre a incidência do melanoma. Em um trabalho recente baseado em modelos de experimentação animal, autores defendem que somente a radiação UVB possui um papel na indução do melanoma (Fabo et al., 2004), ao contrário de outros que sugerem que ambas podem ser igualmente responsáveis pela transformação maligna dos melanócitos (Husain et al., 1991; Ley, 1997). Indivíduos tratados com radiação UVA em decorrência de outras doenças cutâneas apresentaram um risco maior de desenvolver melanoma, 15 anos depois da primeira exposição, sugerindo um papel relevante da radiação UVA na transformação maligna e incidência do melanoma (Stern, 2001). A radiação UVA penetra mais profundamente na derme, provavelmente induzindo radicais livres que por sua vez causam dano ao DNA. Os raios UV-A (320 nm a 400 nm) independem da camada de ozônio, pois são menos absorvidos por ela, e podem causar câncer de pele em quem se expõe a eles em horários de alta incidência, continuamente e ao longo de muitos anos. A radiação UVB é um mutagênico conhecido que induz a formação de dímeros de pirimidina ciclobutano (CPDs) e 6-4 fotoprodutos (6-4 PPs), que podem levar a mutações genéticas específicas, tais como, trocas de bases de cisteína (C) para timina (T) ou trocas do tipo CC para TT. UVB está associada com queimaduras com bolhas, fator diretamente relacionado ao risco de apresentar melanoma e em decorrência da destruição da camada de ozônio, os raios UV-B

(280 nm a 320 nm) têm aumentado progressivamente sua incidência sobre a terra. A prevenção então é muito importante e a exposição à radiação ultravioleta pode ser minimizada por campanhas e medidas educativas adequadas, visando diminuir a incidência deste tipo de câncer de pele.

Os danos causados pela radiação UV ou por outros carcinógenos químicos levam ao acúmulo de mutações em regiões importantes do genoma do hospedeiro. Aberrações cromossômicas e mutações gênicas são encontradas tanto em melanomas familiares como nos casos espontâneos. Entre os mais importantes citados na literatura, está o gene CDKN2A localizado no cromossomo 9p21. CDKN2A codifica duas proteínas distintas, p16/INK4a e p14ARF, através de splicing alternativo. Ambas as proteínas atuam como supressores de tumor: p16 inibe a atividade do complexo ciclina D1-CDK4, prevenindo progressão do ciclo celular e p14ARF diretamente estabiliza p53, induzindo parada no ciclo celular ou apoptose ou ainda através da via de Rb, provavelmente inibindo ambas as vias. Portanto, compreende uma região crítica envolvida na progressão do ciclo celular em células normais (Chaudru et al., 2004, Slominski et al., 2001). Expressão aberrante de p16 está associada com um comportamento mais agressivo do melanoma (Slominski et al., 2001), e atualmente é o melhor candidato para gene supressor de tumor em melanoma. Mutações que inativam o gene p16/INK4a, regulador negativo do "checkpoint" G1-S ou que ativam CDK4, um regulador positivo da via, são encontradas em aproximadamente 25% dos melanomas familiares (Kamb et al., 1994). Em melanomas esporádicos, a região INK4a está deletada em 50-80% dos casos (Flores *et al.*, 1996) e mutações em CDK4 também têm sido descritas (Wolfel *et al.*, 1995).

Mutações no gene p53 estão entre as mais comuns que contribuem na etiologia das neoplasias, mas seu papel na patogênese do melanoma não está bem estabelecido. Não existem

correlações comprovadas entre rearranjos gênicos ou expressão alterada da proteína p53 com progressão de lesões melanóticas. Entretanto, alguns autores sugerem que p53 pode ter um papel mais complexo na patogênese do melanoma atuando em genes efetores "downstream" na via, tais como MDM2, GADD45 e CIP1/WAF1. Outra possibilidade sugerida é que o nível de expressão de p53 pode modificar a resposta das células tumorais aos agentes quimioterápicos. Diante das várias teorias propostas, muitos estudos ainda são necessários para a compreensão do papel do gene p53 na biologia do melanoma (Slominski *et al.*, 2001).

Mutações na família dos proto-oncogenes ras têm sido detectadas em aproximadamente 5 a 6% das amostras de melanoma humano, e inclusive mutações afetando N-ras são mais freqüentes nas áreas expostas ao sol. Mutações nos oncogenes Ha-ras, Ki-ras e N-ras também já foram detectadas em células de melanoma mantidas em cultura e em linhagens de melanoma metastáticos humanos. As mutações de N- e Ki-ras estão associadas com superexpressão do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF) e fenótipos desdiferenciados. No entanto, mutações em Ki-ras também são encontradas em nevus melanocíticos benignos e, portanto mesmo que as proteínas ras tenham um papel na proliferação maligna, sua contribuição para o desenvolvimento do melanoma permanece pouco esclarecida. Outros oncogenes com expressão alterada em células de melanoma em cultura, descritos na literatura, porém com papéis questionáveis no desenvolvimento do melanoma humano icluem c-myb, c-myc, c-fos, e c-jun. Mutações em genes envolvidos na sinalização celular também têm sido bem documentadas, como a via de MAPK (Slominski *et al.*, 2001).

TERAPIAS ATUAIS

O Melanoma é a forma mais grave causadora do maior número de mortes entre todos os tipos de câncer de pele. Apesar dos estudos intensivos em pesquisa laboratorial e clínica, a única cura efetiva é a rescisão cirúrgica do tumor primário antes que o mesmo atinja uma profundidade de um pouco mais que 1 mm. Assim, o tratamento inclui a remoção cirúrgica eventualmente acompanhada de quimioterapia, imunoterapia ou radioterapia. Quando o tumor é diagnosticado precocemente é grande a probabilidade de cura, porém uma vez metastatizado, não há tratamentos disponíveis que realmente sejam efetivos e eliminem a doença. Neste contexto, estudos buscando terapias adjuvantes, como novos agentes e novas estratégias de tratamento são importantes (Danson *et al.*, 2005).

Bioquimioterapia é a combinação de agentes biológicos com drogas quimioterápicas no tratamento do câncer. Citocinas, células dendríticas pulsadas com determinados antígenos e linfócitos são exemplos de agentes biológicos utilizados atualmente. Três agentes biológicos principais são utilizados no tratamento de melanoma maligno: IL-2, IFN- α e linfócitos estimulados com IL-2. IL-2 (Proleukin®) foi a primeira nova terapia aprovada para o tratamento do melanoma metastático em 20 anos, baseado nos bons resultados obtidos neste tumor. Alguns estudos já demonstraram que administração de IL-2 pode levar a uma completa e duradoura remissão do tumor, embora tais resultados sejam ocasionais e beneficiem apenas uma porcentagem pequena de pacientes (Dutcher *et al.*, 1991, Buzaid *et al.*, 2004). As drogas quimioterápicas mais comumente utilizadas no tratamento do melanoma são dacarbazina (DTIC), carmustina, análogos da platina (cisplatina e carboplatina), alcalóides isolados de *Vinca rosea* (viscristina e vimblastina) e taxanos (paclitaxel), sendo que essas drogas atuam como inibidores inespecíficos do ciclo celular. Estes agentes (biológicos ou quimioterápicos)

possuem efeitos anti-tumorais reproduzíveis e ocasionalmente mostram algum sucesso, porém a eficácia destes protocolos clínicos em melanoma é parcial e limitada (Bajetta *et al.*, 2002).

RESPOSTA IMUNE ANTI-TUMORAL

A evolução do melanoma maligno humano compreende diferentes estágios: indução, tumor primário, metástases regionais, invasão da corrente sanguínea, metástases disseminadas principalmente para pulmão, fígado e cérebro, levando a morte. Na grande maioria dos casos, a resposta imune protetora somente ocorre entre a indução e o tumor primário (janela profilática) e pode ser estimulada entre o tumor primário e o estágio de metástases regionais (janela terapêutica).

O conceito de imunovigilânica, ou seja, de que o sistema imune pode reconhecer e atacar células tumorais, levando a destruição do tumor tem sido revisto e evidências atuais claramente demonstram sua existência (Dunn *et al.*, 2002). Camundongos imunodeficientes apresentam uma susceptibilidade aumentada para o desenvolvimento de tumores espontâneos e tumores quimicamente induzidos. Destruição do tumor resulta de quatro mecanismos principais: (1) células da imunidade inata reconhecem células transformadas e são estimuladas a produzir IFN- γ , (2) indução de quimiocinas e bloqueio da angiogênese, efeitos diretos do IFN- γ sobre as células tumorais, ativação citotóxica de macrófagos e células NK (natural killer) e ativação de células dendríticas (DCs) que migram para linfonodos periféricos (3) desenvolvimento de linfócitos específicos para antígenos tumorais nos linfonodos e (4) migração de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ para o local e lise de células tumorais. Evidentemente que alguns desses processos podem acontecer simultaneamente.

Assim, na resposta imune anti-tumoral observamos a presença de elementos da resposta imune inata, assim como elementos da resposta imune adaptativa. Os tipos celulares da resposta inata são células NK, células NKT, macrófagos, neutrófilos e linfócitos T γδ. As células NK foram as primeiras células identificadas capazes de matar tumores de diferentes origens, e quando ativadas por IFN- α e IL-2 *in vitro* aumentam muito sua citotoxicidade (Herberman, 2002). Células NK são capazes de destruir células tumorais deficientes em MHC classe I (Whiteside et al., 1995). Citotoxidade de células NK é mediada via perforina e pela produção de várias citocinas, principalmente IFN-γ. Além disso, as células NK são responsivas a várias citocinas (IFNs, IL-2, IL-12 e IL-15) e rapidamente proliferam e aumentam suas funções efetoras. Receptores para moléculas de estresse celular têm sido identificados na superfície de células NK, bem como em macrófagos e linfócitos T $\gamma\delta$ e este é um dos mecanismos de reconhecimento de células transformadas pelo sistema imune inato (Smyth et al., 2001). As células NKT (discutidas mais detalhadamente em seguida), podem regular a atividade anti-tumoral tanto de CTLs quanto de células NK (Smyth et al., 2000a). Os macrófagos podem lisar ou inibir o crescimento in vitro de células transformadas, e quando estimulados têm sido associados a um menor crescimento tumoral ou mesmo a menor incidência de tumores. Citotoxicidade mediada por macrófagos é mais eficiente quando há um contato célula-célula, mas a liberação de fatores solúveis é um dos principais mecanismos de citotoxicidade dessas células. Os principais produtos produzidos pelos macrófagos são óxido nítrico (NO), TNF- α , peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e FasL (Mitra *et al.*, 2003). Atualmente, o conceito de que macrófagos M1 são tumoricidas e macrófagos M2 são imunossupressores vem sendo bem caracterizado e a geração de cada fenótipo vai depender do microambiente tumoral.

TAMs (tumor-associated macrophages) têm sido associados ao fenótipo M2 (Mantovani *et al.*, 2002; 2006).

Células dendríticas (DCs) são consideradas um elo importante entre a resposta imune inata e o desenvolvimento da imunidade adaptativa. São as mais potentes APCs e consequentemente iniciam uma resposta imune antígeno específica, ativando linfócitos T através da expressão abundante de moléculas de MHC, moléculas de adesão celular e moléculas coestimulatórias em sua superfície. Antígenos expressos nas células de melanoma, secretados ou resultantes de lise celular (devido à necrose do tecido) são processados por células de Langerhans presentes na pele que se tornam ativadas, aumentam a expressão de moléculas coestimulatórias e migram para os linfonodos para ativar linfócitos T "naive". Linfócitos T CD8⁺ ativados migram para o tecido, se diferenciam em linfócitos T citotóxicos e exercem seus efeitos através da lise direta das células tumorais. Outro mecanismo importante pelo qual as DCs podem ativar linfócitos é o cross-priming. Cross-priming, também chamado cross-presentation, ou apresentação cruzada, é a capacidade das DCs de apresentar antígenos de outra célula (oriundos geralmente de células tumorais apoptóticas) através de moléculas de MHC classe I, maximizando a resposta anti-tumoral. Além disso, células dendríticas também produzem moléculas importantes como IL-12, TNF-α e NO (Abbas, 2003).

As citocinas podem regular o crescimento das células tumorais de distintas maneiras: regulação da angiogênese, ativação de uma resposta imune específica contra as células tumorais do hospedeiro e até mesmo proliferação das células tumorais através de um efeito autócrino. Em modelos de melanoma murino experimental, o papel de várias citocinas no controle do crescimento tumoral tem sido investigado (Arca *et al.*, 1996). Dentre as principais, estão a IL-2, TGF-β (Wojtowicz *et al.*, 1996), IFN-γ (Rodrigues *et al.*, 2002), IL-4 (Blaya *et al.*, 1996), IL-12 (Teicher *et al.*, 1996), GM-CSF (Dranoff *et al.*, 1993; Arca *et al.*, 1996b; Sampson *et al.*, 1996;) e IL-10 (Gerard *et al.*, 1996).

As principais células efetoras da reposta imune adaptativa, envolvidas na rejeição tumoral, são as células T CD8⁺ citotóxicas (CTLs, "cytolytic T lymphocytes"). Tais células interagem através do seu complexo CD3/TCR com antígenos associados com moléculas de MHC classe I presentes na superfície de células tumorais. A interação também envolve moléculas de adesão, tais como ICAM-1 (molécula 1 de adesão intercelular) com seu ligante nos linfócitos LFA-1 (antígeno associado à função leucocitária), e Fas (CD95) com FasL (CD95L). As células tumorais são destruídas através da liberação de perforinas (proteínas formadoras de poros), serino esterases, IFN- γ , granzima B e/ou TNF- α pelos CTLs (Dunn *et al.*, 2002). No câncer, as moléculas coestimulatórias podem estar "down" reguladas, induzindo anergia de células T e geração de linfócitos T tolerizados. Um mecanismo de escape tumoral bem conhecido é a disponibilidade de moléculas MHC classe I em alguns tipos de tumores e principalmente em metástases, onde apresentam uma densidade consideravelmente menor que a observada em tecidos normais, provavelmente diminuindo a apresentação de antígenos para uma resposta efetora mediada por linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (Kageshita *et al*, 1999).

Embora os linfócitos T CD4⁺ helper não sejam em geral citotóxicos para os tumores, eles podem desempenhar um papel importante nas respostas anti-tumorais secretando citocinas que ativam uma grande variedade de células, dentre as quais macrófagos, células NK, DCs e linfócitos CD8⁺. Assim, para uma resposta anti-tumoral eficiente é necessária indução de linfócitos T CD4⁺ Th1, capazes de reconhecer antígenos tumor específicos em associação com moléculas MHC classe II e receber sinais de moléculas co-estimulatórias. As citocinas liberadas após essa interação, IL-2, IFN- γ e TNF- α , ativam CTLs, responsáveis pela lise das células tumorais. Além disso, TNF- α e IFN- γ aumentam a expressão de moléculas MHC classe I e a sensibilidade à lise pelos CTLs (Abbas *et al.*, 2000). Portanto, uma resposta ótima requer a cooperação entre linfócitos T CD4⁺ e CTLs CD8⁺. Outra evidência da importância destas células é que elas reconhecem a mesma categoria de antígenos que os linfócitos T CD8⁺, incluindo antígenos produzidos por mutações, antígenos testiculares e antígenos de diferenciação. De fato, atualmente existe uma distinção cada vez menor entre antígenos reconhecidos por linfócitos T CD4⁺, linfócitos TCD8⁺ e anticorpos. Em muitos casos, os estudos de antígenos reconhecidos por anticorpos levaram a descoberta de que esses mesmos antígenos eram reconhecidos também por linfócitos T citotóxicos. Modelos experimentais têm mostrado que a resposta imune contra o melanoma, e inclusive contra antígenos de diferenciação, pode envolver distintos mecanismos, seja via ativação de linfócitos T citotóxicos ou via ação de anticorpos através de mecanismos dependentes de receptores Fc (Houghton *et al.*, 2001).

Atualmente, sabe-se que a evolução tumoral também é capaz de gerar uma resposta imune humoral específica. Linfócitos B são ativados para secretar anticorpos tumor-específicos que possam mediar reações de citotoxidade dependente de complemento (CDC) ou reações de citotoxidade dependente de anticorpo (ADCC). As subclasses de anticorpo IgG são os principais ativadores do sistema complemento e mediadores da ADCC e portanto são as mais importantes na imunoterapia tumoral (Mitra *et al.*, 2003). As células capazes de mediar reações de ADCC são macrófagos e células NK devido à expressão de receptores (receptor Fc-III ou CD16) para a porção Fc de IgG. Além disso, a ativação do sistema complemento pode induzir forte resposta inflamatória, potencializando outros mecanismos anti-tumorais. Foi demonstrado que anticorpos contra antígenos de membrana da célula tumoral tinham seus títulos máximos
no período entre a formação do melanoma primário e as metástases regionais, caindo significativamente nas fases seguintes da doença, simultaneamente a uma elevação dos anticorpos contra antígenos citoplasmáticos do tumor, não protetores. Desta maneira, a substituição da imunidade celular ativa na fase de indução do melanoma maligno e do tumor primário pela resposta humoral proeminente, não protetora, nos estágios finais de evolução, coincide com a formação de metástases regionais, disseminação de células tumorais pela corrente sanguínea e conseqüente metastatização para órgãos distantes e morte (Lewis *et al*, 1979).

Apesar da variedade de mecanismos descritos aqui, através dos quais o sistema imune pode combater os tumores, existem mecanismos de escape tumoral importantes que devem ser considerados. Estes mecanismos podem ser divididos em: células supressoras, produtos secretados pelos tumores, expressão de moléculas inibitórias e "down" regulação de moléculas importantes. Algumas células supressoras incluem linfócitos T reguladores CD4⁺CD25⁺ (T reg), células Th2 convencionais, células NKT restritas a CD1d (tipo II), células supressoras mielóides e macrófagos M2. Células tumorais podem produzir citocinas anti-inflamatórias, diminuindo a eficiência de CTLs e enzimas proteolíticas produzidas por células de melanoma degradam componentes do complemento diminuindo a eficiência de reacões de CDC (lise dependente de complemento). Já foi demonstrado, por exemplo, que células de melanoma podem expressar FAS-L e dessa forma induzir a morte por apoptose de linfócitos infiltrantes do tumor representando um poderoso mecanismo de escape (Hahne et al., 1996; Terheyden et al., 1999). Outro exemplo é a ausência da molécula B7 na superfície das células tumorais, provavelmente um dos mecanismos mais importantes de escape tumoral. E finalmente, como já citado, "down regulation" de moléculas MHC classe I é outro mecanismo freqüente de escape

tumoral, inclusive em melanoma (Kageshita *et al*, 1999). Uma melhor compreensão dos mecanismos de regulação negativa da imunidade tumoral será importante no desenvolvimento de vacinas e de estratégias imunoterapêuticas.

CÉLULAS NKT

Células NKT restritas a CD1d têm um papel ambíguo na imunidade tumoral. Elas têm sido consideradas células imunoreguladoras do sistema imune, pois produzem grandes quantidades de citocinas tanto tipo 1 quanto tipo 2 após um estímulo. Estas células têm sido implicadas como imunossupressoras em alguns modelos tumorais (Terabe et al., 2000, 2003; Park et al., 2005), mas também são importantes na proteção contra tumores (Crowe et al., 2002; Stewart et al., 2003; Zhou, 2007). Este aparente paradoxo pode ser explicado pelas diferentes subpopulações produtoras de diferentes perfis de citocinas, que atualmente estão sendo melhor estudadas e identificadas e que eventualmente podem regular uma a função da outra (Terabe & Berzofsky, 2007). Assim, as células NKT restritas a CD1d podem ser divididas em dois fenótipos: NKT tipo I e NKT tipo II. Estas células provavelmente são responsivas a diferentes sinais de acordo com o microambiente tumoral e apropriados estímulos são necessários para induzir a proliferação de um ou outro fenótipo, como já foi demonstrado experimentalmente (Ambrosino et al., 2007). Células NKT destroem células tumorais por citotoxidade direta em um mecanismo semelhante à citotoxicidade de células NK. ou seja, através de perforina (Smyth et al., 2000a). Além disso, as células NKT também auxiliam CTLs e células NK, através da produção de citocinas. Em contrapartida, células NKT tipo II regulam negativamente a resposta imune anti-tumoral provavelmente através da produção de IL-13. Terabe *et al.* (2005) demonstraram que na ausência de células NKT tipo I e células Treg, células NKT tipo II (não-V α 14J α 18+) foram as responsáveis pela supressão da imunovigilância tumoral. Em outro trabalho, os autores observaram que as células NKT foram responsáveis, pelo menos em parte, pela diminuição da eficácia de uma vacina viral. A eficácia da vacina era aumentada após administração de um inibidor solúvel de IL-13 ou quando foram utilizados animais deficientes para CD1, que perdem células NKT (Ahlers *et al.*, 2002). Em outros modelos, camundongos knockout para CD1 (deficientes tanto em células NKT tipo I quanto tipo II) apresentaram maior imunidade ao tumor primário e grande resistência a metástases (Ostrand-Rosenberg *et al.*, 2002; Terabe *et al.*, 2000, 2005; Park *et al.*, 2005). Assim, as células NKT podem regular positivamente ou negativamente a resposta imune e uma estratégia que envolva a estimulação da subpopulação NKT tipo I (por exemplo, administração de IL-12) e supressão ou controle da NKT tipo II pode ser interessante para uma resposta imune anti-tumoral mais eficiente.

ESTRATÉGIAS PARA IMUNOTERAPIA

A noção de que o sistema imune deve reconhecer e rejeitar os tumores não é nova. Tratamentos de tumores com materiais purulentos ou com bactérias datam do século 19, com respostas anti-tumorais esporádicas (Coley, 1893). É relativamente fácil entender como o sistema imune deve combater organismos estranhos, mas difícil quando o sistema imune deve agir contra tumores. Os tumores são originários do próprio indivíduo e sendo assim expressam muitos genes que também são expressos pelo tecido normal. Desta maneira, a resposta imune deve ser capaz de discriminar antígenos próprios produzidos pelas células normais e antígenos expressos particularmente nas células tumorais.

A identificação e caracterização molecular de novos antígenos tumorais e o estudo das funções pleiotrópicas das citocinas trazem novas possibilidades para o desenvolvimento de imunoterapias efetivas contra o câncer e para a construção de novas vacinas (Rosenberg et al., 2001). Vacinação com construções contendo antígenos tumorais em conjunto com citocinas recombinantes pode ser mais eficiente contra o crescimento tumoral (Song et al., 2000). Apesar de não haver um consenso, basicamente podemos dividir os antígenos tumorais em 3 categorias: (1) antígenos codificados após alterações genéticas e provenientes de transcritos atípicos; antígenos testiculares denominados "cancer-testes" e antígenos de diferenciação (Houghton et al., 2001). Três grupos de antígenos alvos têm sido cogitados para o desenvolvimento de uma vacina contra o melanoma. São eles: gangliosídeos, cuja expressão é regulada positivamente durante a transformação maligna; glicoproteínas melanocíticas, TRP-1 e TRP-2 e gp 100, e também, os antígenos conhecidos como "cancer-testes antigens", expressos em células da linhagem germinativa e que estão silenciados nas células somáticas, sendo "re-expressos" em muitos tumores. Como as células germinativas não expressam moléculas MHC clássicas, estes antígenos são descritos como tumor-específicos. O exemplo mais conhecido é a proteína MAGE-1, primeiro produto gênico humano descrito em tumores, mais especificamente em melanoma. Porém, estes antígenos podem realmente estimular o sistema imune de maneira suficiente de tal forma que o organismo possa rejeitar o tumor? E quanto à problemática da autoimunidade? E aos mecanismos de escape tumoral, como perda de expressão antigênica e "down-regulation" de moléculas MHC e moléculas co-estimulatórias? Neste contexto, os adjuvantes imunes são cruciais no desenvolvimento de vacinas contra tais

antígenos. Células dentríticas, interleucinas, anticorpos ou células modificadas geneticamente são alguns dos exemplos de adjuvantes imunológicos importantes no combate e controle dos tumores. Vale ressaltar que muito do conhecimento adquirido nesta área provém de estudos com o melanoma, inclusive em terapias utilizando anticorpos monoclonais e citocinas como IFN e IL-2, com ou sem linfócitos ativados. Isto se deve a razões de ordem prática, como a facilidade de manutenção de linhagens de melanoma em cultura de tecidos e em grande parte devido ao número de protocolos clínicos já realizados utilizando terapias imunes alternativas aos tratamentos convencionais. Estes novos protocolos por sua vez são aplicados primeiramente em pacientes com melanoma em razão da resistência deste tipo de câncer aos tratamentos com quimioterápicos usuais (Houghton *et al.*, 2001).

Desta maneira, a imunoterapia visa estimular mecanismos protetores que normalmente estariam reprimidos ou que simplesmente não foram mobilizados para o combate do crescimento tumoral primário e metastático. Deve ocorrer em paralelo com outros meios de tratamento, complementando-os, evitando recidivas pós-cirúrgicas, regredindo focos metastáticos, aumentando a sobrevida do paciente, porém não substitui a excisão cirúrgica dos tumores como medida prioritária.

O desafio em desenvolver vacinas contra o câncer é estimular uma resposta imune celular suficiente para controlar efetivamente a doença, apesar dos inúmeros mecanismos de escape tumoral existentes e mecanismos supressores que inibem a resposta de células T citotóxicas. Um dos alvos mais comuns nas estratégias de imunoterapia é a modulação da função das células apresentadoras de antígenos (APCs). Esta estratégia é baseada no conceito de que a característica quantitativa e qualitativa da resposta de células T a antígenos depende dos sinais que estas células receberam das APCs. De todos os subtipos de APCs derivadas da medula óssea (células B, macrófagos e DCs), a DC é a mais potente APC, e é responsável pela iniciação das respostas imunes (Pardoll *et al.*, 2002). Células dendríticas pulsadas com α-GalCer inibiram a formação de metástases em um modelo de melanoma experimental (Toura *et al.*, 1999) e tratamento de pacientes com melanoma avançado com células dendríticas resultou em benefícios clínicos e estabilização da doença e abre novas perspectivas para o tratamento do câncer (Barbuto *et al.*, 2004). O uso conjunto de moléculas coestimulatórias na imunoterapia também parece ser uma área promissora, pois tais moléculas agem sinergicamente na amplificação da resposta imune via linfócitos T citotóxicos ou mesmo direcionando a resposta para produção de células Th1 ou Th2, agindo como poderosos coadjuvantes na vacinação (Townsend *et al.*, 1993, Restifo *et al.*, 2000). A perda de moléculas co-estimulatórias em células tumorais resulta em apresentação dos antígenos tumorais via MHC classe II, e ausência de co-estimulação pode levar a quadros de anergia.

A adminstração de citocinas é uma das estratégias mais utilizadas na imunoterapia. Uma das limitações para o uso direto das citocinas é a provável toxicidade. Deste modo, a expressão restrita da citocina no micro-ambiente tumoral é imprescindível para prevenir a ocorrência de altos níveis sistêmicos. Na maioria dos casos, células tumorais autólogas transfectadas com algum vetor expressando o gene da citocina são utilizadas na vacinação de pacientes (Palmer *et al.*, 1999; Salgia *et al.*, 2003). Mas a administração direta de genes (*in vivo*) em tumores já vem sendo realizada a algum tempo, através de técnicas moleculares (Sun *et al.*, 1995). IL-2, IL-12, IFN- γ e GM-CFS estão associadas à imunidade mediada por célula e regressão tumoral enquanto IL-4, IL-5 e IL-10 estão associadas à progressão do tumor (Pellegrini *et al.*, 1996; Clerici *et al.*, 1998).

Em melanoma, a administração de interleucina 2 (IL-2) está associada com regressão tumoral (Vuoristo et al., 1994; Phan et al., 2001; Chang et al., 2001). Em estudo de fase I, publicado por King et al. (2004), os autores utilizaram anticorpos monoclonais humanizados anti-GD2 ligados à IL-2 em pacientes com melanoma metastático. O tratamento dos pacientes com a terapia combinada resultou em uma ativação da resposta imune observada por influxo de linfócitos e aumento do número e atividade de células NK no sangue periférico. Injeções de plasmídeos contendo o gene para IFN-y diretamente nos tumores resultaram em alta produção de IFN- γ e inibição do crescimento tumoral no modelo de carcinoma de colon (Nomura *et al.*, 1999). IFN-γ pode ativar células T, NK e macrófagos além de induzir a expressão de MHC classe I e II. As citocinas também podem ser introduzidas na massa tumoral através de vetores virais. GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) têm sido aplicado diretamente em lesões tumorais através do virus Vaccinia recombinante (Mastrangelo et al., 1999). A administração de IL-12, seja a proteína ou na maioria das vezes em vacinas de DNA, têm sido amplamente utilizada em modelos experimentais de terapias anti-tumorais sempre com ótimos resultados, descritos mais detalhadamente a seguir.

Outra estratégia que vem sendo sugerida é a inibição no micro-ambiente tumoral da ação de citocinas inibitórias, que prejudicam o desenvolvimento de uma resposta imune anti-tumoral eficiente e, consequentemente favorecem a progressão do tumor. Neste sentido, o uso de receptores solúveis de citocinas mostrou-se eficaz na redução dos seus níveis séricos e pode ser usado como método imunoterápico (Donaldson *et al.*, 1998; Terabe *et al.*, 2000).

INTERLEUCINA 12

A interleucina 12 foi considerada durante muito tempo a única citocina heterodimérica conhecida, porém na atualidade ela faz parte de uma família de 5 citocinas e compartilha funções importantes na regulação tanto da imunidade inata como adaptativa com outras duas da mesma família, IL-23 e IL-27 (Trinchieri *et al.*,2003b; Langrish *et al.*, 2004).

A interleucina 12, uma molécula de 70 kDa composta por duas subunidades p40 e p35 ligadas covalentemente, é produzida principalmente por células fagocíticas hematopoiéticas ativadas (monócitos, macrófagos, neutrófilos) e células dendríticas, sendo que seu efeito principal é o estímulo para proliferação e diferenciação dos linfócitos T naive para Th1 e produção de IFN- γ por estas células efetoras o que resulta por sua vez na ativação de macrófagos. A IL-12 é importante na proliferação de células NK (natural killer) e também induz a secreção de IFN- γ por estas células. Devido à indução de quimiocinas, IL-12 também exerce efeitos antiangiogênicos, diminuindo o suprimento sanguíneo para o tumor (Voest *et al.*, 1995). Assim, quando secretada localmente, esta citocina estimula a proliferação e citotoxidade das células NK e linfócitos T, promove a geração de células efetoras Th1 e produção de IFN- γ , contribuindo para eliminação das células tumorais tanto em modelos experimentais murinos como em ensaios clínicos (Lesinski *et al.*, 2004; Colombo *et al.*, 2002; Golab *et al.*, 1999).

Em experimentos de terapia gênica, a interleucina IL-12 tem sido a mais efetiva na atividade antitumoral quando comparada com outras citocinas (Rakhmilevich *et al.*, 1997). Além disso, uma das vantagens da terapia gênica é a secreção local contínua no sítio do tumor evitando a toxicidade relatada devido à administração sistêmica de IL-12 recombinante (Gollob *et al.*, 2001, Colombo *et al.*, 2002). Terapia utilizando "gene gun" (biobalística) com um plasmídeo que contém o gene da IL-12 resultou em completa regressão do tumor ou supressão do crescimento tumoral em seis modelos tumorais, incluindo em melanoma B16

(Rakhmilevich et al., 1996). Após depleção in vivo de linfócitos CD8⁺, os autores confirmaram que estas eram as principais células responsáveis pela atividade anti-tumoral. Além disso, a terapia levou à geração de memória imunológica tumor-específica em três modelos tumorais avaliados. Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por Brunda et al. 1993, onde a regressão tumoral após administração de IL-12 é mediada por linfócitos T CD8⁺ enquanto células NK não foram importantes neste modelo. Outro estudo mostrou que "delivery" do plasmídeo expressando IL-12 por eletroporação in vivo foi uma estratégia eficiente no tratamento de melanoma murino B16F10. Tratamento intratumoral, mas não intramuscular, resultou na cura de 47% dos camundongos e o mecanismo de proteção tumoral foi mediado por IFN-γ, influxo de linfócitos para o tumor e mecanismos anti-angiogênicos (Lucas *et al.*, 2002). Pré-tratamento com IL-12 recombinante aumenta a eficácia da imunoterapia com baixas doses de IFN- α , sendo este efeito dependente da produção endógena de IFN- γ (Lesinski *et al.*, 2004). Assim, administração do gene ou da proteína em doses controladas pode ativar mecanismos distintos da resposta imune e têm sido empregados em vários modelos experimentais. Em geral, células NK, NKT, macrófagos e linfócitos T CD8 são as principais células envolvidas na rejeição tumoral mediada por IL-12.

Ativação de células NKT após administração de IL-12 é um dos mecanismos que promovem proteção contra tumores (Cui *et al.*, 1997; Smyth *et al.*, 2000b). Estas células foram as primeiras ativadas após administração de IL-12, sendo citotóxicas *in vitro* contra células tumorais B16 e protetoras *in vivo* tanto no modelo subcutâneo quanto no modelo de metástase pulmonar de melanoma B16 (Cui *et al.*, 1997).

INTERLEUCINA 13

A interleucina-13 (IL-13) é uma citocina imunoregulatória secretada preferencialmente por linfócitos Th2 ativados e células NKT, mas macrófagos, DCs, células NK, mastócitos e basófilos também podem produzi-la (Wynn *et al.*, 2003). A IL-13 foi descoberta na última década (Minty *et al.*, 1993), sendo uma potente proteína moduladora *in vitro* da atividade funcional de monócitos humanos, células B, células dendríticas e fibroblastos. O gene da IL-13 está localizado no cromossomo 5q31 (Zurawski *et al.*, 1994), um dos principais *loci* ligados à susceptibilidade à asma. A interleucina 13 é reconhecida atualmente como um importante mediador da resposta imune Th2 com atividades imunoregulatótias em alguns modelos experimentais tais como, rinite alérgica (Pawankar *et al.*, 1995), asma (Wills-Karp *et al.*, 1998; Grunig *et al.*, 1998; Foster *et al.*, 2002), esquistossomose (Chiaramonte *et al.*, 1999a; Mentink-Kane *et al.*, 2003), leishmaniose (Matthews *et al.*, 2000), parasitismo por nematóides (Urban *et al.*, 1998), fibrose (Chiaramonte *et al.*, 1999b; Fichtner-Feigl *et al.*, 2006) e câncer (Terabe *et al.*, 2000, 2003, Park *et al.*, 2005, Sinha *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007).

Esta citocina compartilha algumas das propriedades biológicas da IL-4, dentre elas capacidade de inibir a produção de citocinas do padrão Th1 e quimiocinas por monócitos e regular a expressão de MHC classe II e CD23 nestas células (Minty *et al.*, 1993; Zurawski *et al.*, 1994), aumentar a expressão de VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular 1) em células endoteliais (Bochner *et al.*, 1995) e induzir proliferação de linfócitos B humanos, produção de anticorpos e mudança de isotipo de IgG para IgE (Punnonen *et al.*, 1994; Lai *et al.*, 1999). Há evidências de que estas citocinas compartilham alguns componentes do receptor, ou seja, alguma subunidade comum que é importante na transdução de sinal (Callard *et al.*, 1996; Zurawski *et al.*, 1994). No entanto, a incapacidade da IL-13 em regular a diferenciação

de linfócitos T devido à perda de receptores para IL-13 nestas células, é uma das principais diferenças funcionais entre essas duas citocinas (Zurawski *et al.*, 1994). Os papéis da IL-4 e IL-13 na regulação da resposta imune têm sido investigados através de estudos com modelos experimentais de camundongos knock-out para umas das citocinas ou para alguma das subunidades do receptor (Kuhn *et al.*, 1991; Barner *et al.*, 1998; McKenzie *et al.*, 1998, 1999). Camundongos knock-out para o receptor IL-4R α apresentam um prejuízo da resposta imune celular tipo Th2 (Barner *et al.*, 1998), enquanto macrófagos de camundongos knock-out para o receptor IL-13R α 2 liberam menos óxido nítrico (NO) e IL-12 em resposta ao LPS do que aqueles provenientes de camundongos selvagens (IL-13R α 2^{+/+}) (Wood *et al.*, 2003).

A estrutura do receptor da IL-13 é similar à de receptores tipo I, sendo composto por duas cadeias, IL-13R α 1 e IL13R α 2. A cadeia IL-13R α 1 forma em associação com a cadeia IL-4R α um complexo sinalizador eficiente, que uma vez ativado induz a fosforilação da tirosina pelas JAK quinases e assim transdução de sinal e ativação de fatores de transcrição STAT 6 (Aman *et al.* 1996; Caput *et al.*, 1996; Hilton *et al.*, 1996; Kawakami *et al.*, 2001a; Roy *et al.*, 2002). A IL-13 liga-se com alta afinidade à cadeia IL-13R α 2 que pode atuar como um receptor "decoy", modulando a quantidade de IL-13 disponível e consequentemente a resposta imune local. Foi observado que a fusão do domínio extracelular solúvel da cadeia IL-13R α 2 à porção Fc de imunoglobulina humana (IL-13R α 2/Fc) bloqueia os efeitos da citocina *in vitro* (Donaldson *et al.*, 1998). Até bem pouco tempo, acreditava-se que esta cadeia α 2 do receptor não transmitia sinal devido ao seu curto domínio citoplasmático e ao fato de não possuir nenhuma sequência de ligação de proteínas da via JAK/STAT. Entretanto, Fichtner-Feigl *et al.* (2006) demonstraram que a IL-13 sinaliza através da cadeia IL-13R α 2, ativando o fator de transcrição AP-1 que induz a secreção de TGF- β .

Curiosamente, células tumorais também podem sintetizar moléculas imunossupressoras (Wojtowicz *et al.*, 1997), sendo as principais investigadas: TGF- β , IL-10 e prostaglandina E2 (PGE2). A IL-13 pode ser produzida por vários tipos de células tumorais, incluindo células de carcinoma renal (Obiri *et al.*, 1996) e células de linfoma de Hodgkin (Skinnider *et al.*, 2001), apresentando um papel importante no desenvolvimento de algumas neoplasias. No entanto, o papel da IL-13 na imunidade tumoral parece ser complexo e depende do tipo de tumor e do "background" genético do hospedeiro. Estudos prévios demonstraram que a IL-13 pode favorecer a resposta anti-tumoral em melanoma B16F1 (Ma *et al.*, 2004) ou simplesmente não afeta o crescimento tumoral (Ostrand-Rosenberg *et al.*, 2002), enquanto a utilização do inibidor solúvel IL-13R α 2Fc contribui para resposta imune anti-tumoral (Terabe *et al.*, 2000; 2005). Em outro trabalho, foi observado um aumento da atividade anti-tumoral quando células tumorais eram transfectadas para superexpressar a cadeia α 2 do receptor para IL-13 (Kawakami *et al.*, 2001b).

Em um modelo de fibrossarcoma 15-12RM (modelo de fibroblastos 3T3 transfectados com gp 160 de HIV-1, Ras e Myc para torná-los tumorigênicos), os autores observaram que camundongos knockout para IL-4 α R e para STAT6, mas não para IL-4, foram resistentes à recorrência tumoral. Quando estes animais IL-4 KO eram tratados com inibidor solúvel da IL-13, eles tornavam-se resistentes à recorrência tumoral, demonstrando que a IL-13 estava envolvida no processo (Terabe *et al.*, 2000). Assim, os autores demonstraram que a IL-13 e células NKT CD4+ eram as responsáveis pela inibição da imunovigilância que controlava a recorrência tumoral neste modelo. Em um modelo de metástase pulmonar de carcinoma de colon, o mesmo resultado foi observado, ou seja, tratamento com a proteína solúvel IL-13R α 2-Fc diminuiu o número de metástases (Park *et al.*, 2005). Um mecanismo para esta

imunossupressão foi proposto por Terabe *et al.*, 2003, onde os autores demonstraram que células mielóides CD11b+ Gr-1+ produziam TGF- β e que esta produção era dependente da presença *in vivo* tanto de IL-13 como de células NKT restritas a CD1d. Com a descoberta da função da cadeia IL-13R α 2-Fc (Fichtner-Feigl *et al.*, 2006; MacDonald, 2006), este mecanismo pode ser elucidado da seguinte maneira: IL-13, através da sinalização via cadeia α 2 presente em macrófagos, leva à produção de TGF- β , uma potente citocina imunossupressora, responsável pela inibição da atividade de CTLs e conseqüente imunossupressão.

Deste modo, terapia com IL-13R α 2-Fc estimula a resposta anti-tumoral, em modelos onde as células NKT tipo II inibem a imunovigilância tumoral natural através de um mecanismo envolvendo IL-13, enquanto IL-12 estimula a resposta anti-tumoral através de vários mecanismos efetores, incluindo ativação de células NKT tipo I. Neste contexto, nós combinamos ambas as estratégias através de terapia gênica utilizando um plasmídeo expressando IL-12 e outro expressando IL-13R α 2-Fc. Além disso, nós associamos as vacinas gênicas com quimioterapia (bioquimioterapia), visando melhorar a resposta anti-tumoral. O composto ciclopaladado 7A tem sido estudado em nosso laboratório e tratamento contínuo com esta droga foi capaz de prolongar a sobrevida no modelo de melanoma murino experimental B16F10-Nex2 (Rodrigues *et al.*, 2003).



III - OBJETIVOS

O objetivo principal desse trabalho foi associar reagentes que antagonizam citocinas imunosupressoras com citocinas pro-inflamatórias, no sentido de reforçar a resposta imune antitumoral, ensaiada em modelo de melanoma murino, por si só ou associada a quimioterapia com composto ciclopaladado. Mais especificamente os procedimentos experimentais consistiram de:

1- Construção da quimera recombinante IL-13R α 2-Fc através de técnicas de biologia molecular.

2- Avaliação do papel da interleucina 13 na regressão do desenvolvimento tumoral de melanoma murino B16F10-Nex2, em sistema singênico, através de terapia gênica com a construção IL-13Rα2-Fc.

3- Bioquimioterapia com a construção IL13Rα2-Fc, associada ao plasmídeo contendo o gene da IL-12 e um composto ciclopaladado (droga 7A).

4- Avaliação da resposta imune dos animais após vacinação gênica e tratamento quimioterápico em função da regressão do crescimento tumoral.

Material e Métodos

IV – MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cultivo de células

Células da linhagem tumoral murina B16F10-Nex2 (Fidler *et al.*, 1975) foram sempre mantidas em meio RPMI 1640 pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10mM de Hepes (N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulphonic acid), 24mM de NaHCO₃, todos da GIBCO (Minneapolis, MN, USA) e 40 mg/mL de gentamicina (Hipolabor Farmacêutica, Sabará, MG, Brazil). Repiques foram realizados utilizando as seguintes soluções: PBS (0.01M phosphate- buffered saline) pH 7,4 e PBS-EDTA (0.02% EDTA) e congelamento com 10% de soro fetal bovino. Para os diversos ensaios a viabilidade celular foi comprovada com o uso do corante de exclusão Trypan Blue 0.4% (Gibco).

4.2. Construção da vacina de DNA IL-13Ra2-Fc

4.2.1. Extração de RNA de Macrófagos e Esplenócitos

Macrófagos residentes e da linhagem J774 estimulados ou não com 10ng/ml de IL-4 ou IL-13 (Zheng *et al.*, 2003), foram cultivados em placas de 24 poços por 48 horas. Para os esplenócitos o estímulo foi de 50ng/ml de IL-4 ou IL-13 em placas de 24 poços por apenas 24 horas. Vale ressaltar que os macrófagos e esplenócitos foram obtidos de animais C57BL/6. Após o período de estímulo, foi feita a extração de RNA de todas as linhagens. A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente TRIZOLTM (Life Technologies), constituído de uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato. Aproximadamente 5-10 x 10⁶

células foram lisadas com 1ml de Trizol. O Trizol mantém a integridade do RNA inibindo a ação de RNAses, ao mesmo tempo em que lisa a célula e dissolve componentes celulares. As amostras homogeneizadas foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Foram adicionados 200µL de clorofórmio para cada ml de Trizol, sendo as amostras homogeneizadas em vortex, incubadas por 3 minutos no gelo e centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, visualizou-se uma separação de fases, sendo a de fenol-clorofórmio vermelha e mais densa, uma interface contendo DNA e uma fase superior aquosa incolor, menos densa, contendo o RNA. A fase aquosa foi transferida para novo tubo, homogeneizada com 500µL de isopropanol e 100µL de uma solução de citrato de sódio 1,2N e cloreto de sódio 0,8N, incubada por 10 minutos no mínimo a - 20°C e centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos a 4° C. O precipitado de RNA foi lavado com 1 ml de etanol 75% gelado e centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após centrifugação, o precipitado foi parcialmente seco e em seguida dissolvido em água Milli Q autoclavada. O RNA foi mantido a –80°C.

A quantificação do RNA (diluído 1:200) foi feita em espectrofotômetro U-2000 (Hitachi) com leitura em 260nm e 280nm, sendo que $OD_{260} = 1$ equivale a 40µg/mL de fita simples de RNA. Assim, a concentração de RNA de cada amostra (µg/mL) foi obtida pela fórmula:

$[RNA] (\mu g/mL) = A260 \times 40 \times 200$

A visualização do RNA foi feita em gel de agarose 1% contendo 25µg de brometo de etídio. Antes da aplicação no gel, as amostras foram incubadas a 65°C por 10 minutos na presença de tampão de amostra 6X para RNA (0,25% bromofenol blue Sigma, 0,25% xylenecyanol Sigma, 15% Ficoll 400 e 7M uréia), seguido de 1 minuto no gelo e adição de 3µg

de brometo de etídio para cada amostra. A corrida foi realizada por 1h a 100V e as bandas de RNA ribosomal 28S e 18S visualizadas em transiluminador UV (Pharmacia).

Devido à existência de RNAases e consequente risco de degradação, toda a vidraria utilizada para RNA foi tratada com solução sulfocrômica, lavada várias vezes com água corrente, em seguida com água destilada e por fim com água desionizada, sendo os frascos aquecidos a 180°C por 2 horas. Os materiais plásticos utilizados foram novos e estéreis e todas as soluções feitas com água desionizada autoclavada.

4.2.2. RT-PCR

O fragmento do gene que codifica uma das cadeias do receptor de IL-13 murino (mIL-13Rα2) foi amplificado por RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) a partir de RNA total, extraído de macrófagos residentes de camundongos C57BL/6 pelo método do TRIZOLTM (Life Technologies), já descrito anteriormente. A primeira fita de cDNA foi sintetizada com o "ThermoScript RT-PCR System" (GIBCO) utilizando-se RNA (5 µg aproximadamente) total livre de DNA e um iniciador senso (oligo dT), de acordo com as instruções do fabricante. DNA contaminante foi eliminado pelo tratamento com DNase I (RNAase free, Amersham Pharmacia). Vale ressaltar que em todas as reações de RT-PCR, foram incluídos controles sem a enzima transcriptase reversa. Primeiramente, o cDNA das várias linhagens celulares foi amplificado utilizando primers específicos para α-actina (componente do citoesqueleto de todas as células de mamíferos) afim de garantir um controle positivo das reações de RT-PCR, bem como um controle adicional da qualidade do RNA extraído. Os primers da α-actina foram os mesmos já descritos por Donaldson *et al.* (1998), sendo o sense: 5' - CAG AGC AAG AGA GGG ATC CTG A - 3' e o antisense: 5' - TGA TCC ACA TCT GCT GGA AGG T - 3'. Sendo positivo para α-actina, o cDNA foi amplificado em reações de PCR padronizadas, utilizando-se os seguintes primers específicos para o gene da cadeia mIL-13Ra2: 5' -d GTC GAC ATG GCT TTT GTG CAT ATC AGA TGC T- 3' (forward, P1) e 5' -dGAC TCC TGC TGG CTG GCT- 3' (reverse) e também para o domínio extracelular do receptor, sendo o mesmo oligo sense e o seguinte anti-sense 5' -d TCC GGA GCC CTT TGA GTC TGG CCC TGT GTA- 3' (reverse, P2). Reações de 25µL foram realizadas em tampão de reação 1X (20mM de Tris-HCl pH 8.4, 50mM de KCl), contendo 1,5mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 1µM de cada primer e 2.5U de *Tag* DNA polimerase (Invitrogen). As amplificações foram feitas em termociclador (MJ Research, Inc. USA), com um ciclo inicial de 94°C por 5 min, seguido de 33 ciclos a 94°C por 1 min, 59°C por 2 min e 72°C por 2 min e extensão final por 10 min a 72°C. Controles negativos (água ao invés do cDNA) foram incluídos em todas reações, além dos controles com oligonucleotídeos individuais. Alíquotas de $10\mu L$ do material amplificado homogeneizadas com $2\mu L$ de tampão de corrida (0,25% bromofenol blue Sigma, 0,25% xylenecyanol sigma, 15% Ficoll 400) foram submetidas à corrida eletroforética em gel de Agarose 1,2% com tampão Tris-borato-EDTA (89mM Tris-HCl, 89mM ácido bórico e 20mM EDTA) e visualizados através de coloração com brometo de etídio.

4.2.3. Purificação dos produtos amplificados e clonagem

A purificação dos fragmentos do gel foi realizada utilizando-se o kit Bioclean for Purification of DNA Bands (Biotools do Brasil LTDA). Resumidamente, os fragmentos no gel (50uL de reação) foram dissolvidos em 1mL de Agar Melt Solution a 65°C, sendo adicionado em seguida 2,5μL da sílica com vagarosa agitação e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. Após centrifugação a 12.000 rpm por 1 minuto, o pellet resultante foi lavado com 300μL deWash Solution (gelado), sendo essa lavagem repetida uma vez. O pellet seco foi ressuspendido em 10μL de tampão TE pré-aquecido a 65°C e mantido nesta temperatura por 3 minutos. Após nova centrifugação, o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novo tubo e estocado a -20°C até o momento da clonagem.

Os amplicons foram primeiramente clonados em um vetor procariótico pGEM-T (PROMEGA). A ligação do fragmento clonado com o vetor pGEM-T foi realizada overnight a 4°C, contendo 50ng do vetor, 1µL da T4 ligase com seu tampão apropriado, todos fornecidos com o kit, e mantendo a proporção molar vetor-inserto de 1:3. A bactéria *Escherichia coli* DH5α competente foi utilizada para transformação e clonagem do fragmento.

Protocolo para Bactéria competente

Batérias *E. coli* DH5α utilizadas para as transformações foram expandidas da seguinte maneira: inicialmente a bactéria foi semeada em placa bacteriológica contendo meio LB, mantida 'overnight' a 37°C. Após este período, uma colônia isolada foi crescida em 3 ml de meio LB líquido em shaker a 37°C 'overnight'. Este crescimento bacteriano (3 ml) foi colocado por sua vez em 250mL de meio LB líquido e mantido em shaker a 37 °C até DO (densidade óptica) 550 nm entre 0,35 e 0,60. Em seguida, as bactérias foram mantidas em gelo por 30 minutos e recuperadas por centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após breve secagem, as células foram ressuspendidas em 1/3 do volume original com meio FB (100mM KCl, 50mM CaCL₂ · 2 H₂O, 10% glicerol (w/v) e 10mM acetato de potássio), incubadas em gelo por 1 hora e recuperadas por nova centrifugação, após a qual as células foram ressuspendidas em 1/12,5 do volume original de crescimento bacteriano com o meio FB. As bactérias foram então aliquotadas em eppendorfs e congeladas a - 80°C, até o momento do uso.

Transformação bacteriana e Miniprep por lise alcalina

Para transformação, a bactéria competente DH5a (100µL) foi adicionada à todo o produto da ligação (vetor + inserto + T4 ligase), descrita anteriormente, e mantida no gelo por 30 minutos no mínimo, seguido de choque térmico a 42°C por 1,5 minutos e em gelo por 2 minutos. Após o choque, 400µL de meio LB (1%Triptona, 0,5%Yeast Extract, 1% NaCl e 0,1% NaOH 1M) foi fornecido à bactéria para crescimento durante 1 hora sob agitação constante em shaker a 37°C. A bactéria crescida foi plaqueada em placas bacteriológicas estéreis contendo LB com 0,1mg/ml de ampicilina (LB amp), 50mg/ml de X-Gal e 100mM de IPTG, sendo mantidas overnight a 37°C. No dia seguinte, colônias brancas isoladas, ou seja, aquelas que receberam corretamente o plasmídeo contendo o inserto, foram crescidas separadamente em 3ml de meio LB amp e incubadas overnight em shaker a 37°C. No dia seguinte, procedeu-se a mini-preparação de DNA propriamente dita, ou seja, a cultura bacteriana (3mL) foi centrifugada por 2 minutos a 12.000 rpm. Após descarte do sobrenadante o pellet, foi vortexado e após adição de 200µL da solução 1 (50mM de glucose, 25mM de Tris-HCl pH 8,0 e 10mM de EDTA pH 8,0) as bactérias foram lisadas no vortex. Adicionamos em seguida 400µL da solução 2 (NaOH 0,2N e SDS 1%) e 300µL da solução 3 (3M acetato de potásssio e 5M de ácido acético), homogeneizando por inversão do tubo, o que garante lise completa da bactéria. Após centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi precipitado com 1 volume de isopropanol por pelo menos 2 horas a - 20°C. Após este período, nova centrifugação por 10 minutos a 12.000 rpm a 4°C foi feita e o pellet resultante lavado com 500µL de etanol 70% e seco a temperatura ambiente. O pellet foi ressuspendido em 30uL de RNAase A (50µg/mL) e incubado por 20 minutos a 37°C. As minipreparações de DNA (plasmídeo contendo o inserto) foram então estocadas a - 20°C.

4.2.4. Estudo de Restrição

Os fragmentos clonados foram analisados utilizando enzimas de restrição. O estudo de restrição foi feito com as seguintes enzimas: *Eco* RI, *Bam* HI e *Hind* III. A enzima *Eco* RI é rotineiramente usada para retirar o inserto do vetor pGEM-T. As enzimas *Bam* HI e *Hind* III foram escolhidas pela capacidade de cortar o inserto somente uma vez, abrindo portanto o plasmídeo. As restrições foram feitas em tampão apropriado para cada uma delas a 37°C 'overnight'. Os produtos foram visualizados em gel agarose 1% corado com brometo de etídio. Este estudo foi realizado com o intuito de selecionar os clones antes do sequenciamento, sendo essa última uma técnica mais dispendiosa.

4.2.5. Extração de RNA do hibridoma 17C, RT-PCR e ELISA

O hibridoma foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Rosana Puccia, co-orientadora da tese. Este hibridoma denominado 17C secreta um anticorpo monoclonal murino do tipo IgG2a contra a gp43, principal determinante antigênico do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*

(Gesztesi et al., 1996). A extração do RNA do hibridoma foi realizada pelo método de Trizol, já descrito detalhadamente. Este RNA foi utilizado para amplificar a região que codifica a porção Fc do anticorpo com intuito de cloná-la "in frame" com o fragmento codificante do domínio extracelular do receptor IL-13Ra2 (Donaldson et al., 1998). Para tanto, 1 x 10⁵ células foram cultivadas em placas de 24 poços em 2mL de meio RPMI completo suplementado com 10% de SFB, por 2 dias e após extração do RNA, o fragmento do gene que codifica as porções constantes da cadeia pesada, mais especificamente a região CH2-CH3, foi amplificado por RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) e a seguir o cDNA foi amplificado em reações de PCR padronizadas, utilizando os seguintes primers: 5' -d GGC TCC GGA GCA CCT AAC CTC TTG GGT G- 3' (forward, P3) e 5' –d TCT AGA TCA TTT ACC CGG AGT CCG GGA- 3' (reverse, P4). Reações de 25µL foram realizadas em tampão de reação 1X (20mM de Tris-HCl pH 8,4, 50mM de KCl), contendo 1,5mM de MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 1µM de cada primer e 2,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). As amplificações foram feitas em termociclador (MJ Research, Inc. USA), com um ciclo inicial de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 2 min e 72°C por 2 min e extensão final por 10 min a 72°C. Controles negativos (água ao invés do cDNA) foram incluídos em todas reações, além dos controles com oligonucleotídeos individuais. Alíquotas de 10 μ L do material amplificado homogeneizadas com 2 μ L de tampão de corrida (0,25%) bromofenol blue Sigma, 0,25% xylenecyanol Sigma, 15% Ficoll 400) foram submetidas à corrida eletroforética em gel de Agarose 1,2% com tampão Tris-Borato-EDTA (89mM Tris-HCl, 89mM ácido bórico e 20mM EDTA) e visualizados através de coloração com brometo de etídio. A purificação dos produtos amplificados e clonagem do fragmento foi realizada da mesma maneira descrita anteriormente para clonagem da cadeia IL-13Ra2, sendo usado o vetor de expressão procariótica pGEM-T (PROMEGA) e o método de lise alcalina para minipreparação do plasmídeo.

Adicionalmente, quando da extração do RNA, para confirmar se estas células estavam realmente secretando IgG murina, o sobrenadante da cultura foi recolhido e avaliado por ELISA. Placas de 96 orifícios, com fundo plano, foram sensibilizadas com 100µl de gp 43 purificada de P. brasiliensis na concentração de 500ng/well, diluída em tampão carbonatobicarbonato 0,05M pH 9,6 e incubação das mesmas a 37°C durante 18 horas. Após esse período, as placas foram lavadas 4 vezes com SST (Solução Salina Tamponada) pH 7,4 contendo Tween 20 a 0,05% (SST-T), os orifícios preenchidos com 100 μ l de SST-T contendo 5% de leite desnatado (Molico-Nestlé) (SST-TM) para bloqueio dos sítios livres e as placas incubadas a 37°C por 60 minutos. Após nova lavagem da placa (5 vezes) com SST-T foram adicionados 100µl do sobrenadante da cultura, seguindo-se incubação a 37°C por 60 minutos. A seguir, as placas foram lavadas com SST-T (5 vezes), sendo adicionado a cada orifício 100µl de IgG de cabra anti-imunoglobulina de camundongo conjugada com peroxidase (Sigma). Após incubação a 37°C por 60 minutos e nova lavagem com SST-T, foram adicionados 100ul de substrato contendo 1µl/ml de peróxido de hidrogênio, 0,5mg/ml de ortofenilenodiamina em tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,0. As placas foram colocadas à temperatura ambiente, no escuro, durante 10 minutos e a reação bloqueada pela adição de 50µl de ácido sulfúrico 4N, sendo a leitura da reação feita em leitor automático de ELISA (Dynatech MR500), por densidade óptica (DO), em comprimento de onda de 492nm.

4.2.6. Sequenciamento

Foi realizado o sequenciamento do plasmídeo contendo o gene que codifíca para o domínio extracelular da cadeia IL-13Rα2 e do plasmídeo contendo o fragmento que codifíca as porções CH2-CH3 de IGg2a murina, utilizando o MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences). O sequenciamento automático foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP). Os primers utilizados foram aqueles que flanqueiam a região T7 (5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3') e SP6 (5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG AA -3') promoter, presentes no pGEM-T. As concentrações de DNA plasmidial foram acertadas para a concentração de 200ng/µL, estimadas em gel de Agarose após restrição dos plasmídeos com a enzima *Hind* III. O sequenciamento, de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizou o DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase), 5µM do primer sense T7 ou do primer antisense SP6 e 1µg de DNA. Vale ressaltar, portanto, que o sequenciamento foi feito em ambas as direções, a fim de obtermos melhor qualidade das sequências.

As sequências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12, sendo alinhadas no programa BioEdit e confirmadas visualmente. O resultado obtido foi comparado com as sequências depositadas no banco de dados Gene Bank. (IL-13 R α 2 gi=6680404 e CH2-CH3 IgG2a gi= 51767065 e gi= 406252).

4.2.7. Fusão dos fragmentos e construção da quimera IL-13Rα2-Fc

A fusão do gene que codifica o domínio extracelular do receptor (aa 1 a 332) à porção Fc de IgG (porção "hinge-CH2-CH3") foi realizada através de uma técnica denominada "PCR overlap" modificada (Davidson et al., 2002). Esta técnica também tem sido utilizada para ensaios de "gene-disruption" e deve efetivamente eliminar o tempo e os esforços necessários para encontrar sítios de restrição apropriados para subclonagem. Uma vez ambos os fragmentos clonados no vetor pGEM-T, eles foram unidos por PCR gerando a construção final. Para isso, este PCR overlap (1º PCR) foi realizado utilizando-se ambos plasmídeos como template e os seus respectivos primers, sendo realizada em seguida re-amplificação (2º PCR) com os primers externos gerando um fragmento de 1.665 pb, correspondente a quimera completa. Desta maneira, num volume total de reação de 25µL, foram adicionados 10ng de cada plasmídeo (ambas as amostras clonadas: IL-13Ra2 e CH2-CH3), Taq Buffer 1X, 1,5mM MgCl₂, 200µM de cada dNTP, 0,4µM de cada primer interno, 1µM de cada primer externo e 2,5U de Taq polymerase (Invitrogen). O 1º PCR foi realizado em termociclador com os seguintes ciclos: 95°C por 2 min, seguido de 30 ciclos a 95°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min e extensão final por 5 min a 72°C. A re-amplificação foi realizada nas mesmas condições que o primeiro PCR, com exceção da temperatura de anelamento que foi de 58°C. O produto de PCR gerado foi purificado utilizando o kit "Bioclean for Purification of DNA Bands" (Biotools do Brasil LTDA), cujo protocolo já foi descrito detalhadamente no item 4.2.3. O fragmento de 1.665 pb foi então clonado em pGEM-T. Desta maneira, os dois genes estão ligados por um espaçador de Gly-Ser-Gly.

4.2.8. Subclonagem em vetor eucariótico, expansão e purificação em gradiente de césio

O vetor eucariótico utilizado para expressão da quimera recombinante foi o VR1012 (Vical Co., San Diego, CA, USA). Este vetor possui o gene que confere resistência a kanamicina e a expressão do gene no mesmo está sob o controle do promotor do citomegalovírus (CMV).

A subclonagem foi realizada da seguinte maneira: Inicialmente, tanto o vetor VR1012 vazio quanto o pGEM-T contendo o produto de fusão (quimera denominada IL-13R α 2-Fc) foram digeridos com a enzima *Sal* I e os fragmentos obtidos purificados do gel (Biotools do Brasil LTDA). Desfosforilação do vetor VR1012 foi feita de acordo com protocolo comercial (SAP-Shrimp Alkaline Phosphatase, USB Corporation). A ligação desse vetor VR1012 desfosforilado com o fragmento IL-13R α 2-Fc foi realizada com a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen) em volume total de 20µL, sendo que todo volume da reação de ligação foi utilizado para transformação de bactérias DH5 α competentes. Após miniprep de 20 colônias, o vetor eucariótico VR1012 contendo o inserto (quimera) foi selecionado e recebeu a denominação de pIL-13R, sendo então utilizado para expressão em células de mamífero, conforme é descrito a seguir.

Maxiprep para imunização

Seguindo os protocolos de ligação e transformação já descritos, a massa de plasmídeos foi produzida da seguinte maneira: As colônias bacterianas crescidas em meio LB sólido contendo o antibiótico kanamicina (gene de resistência do vetor VR1012) foram "préinoculadas" em 5 ml de meio LB kanamicina líquido e mantidas em shaker 37°C por pelo menos 5 horas. Ao fim do dia, este inóculo foi transferido para frasco Erlenmeyer de 2L contendo 0,5L de LB kanamicina líquido e mantido 'overnight' em shaker a 37°C. No dia seguinte, o crescimento bacteriano (0,5L) foi centrifugado por 5 min a 5.000 rpm em garrafa para rotor GSA (Sorvall) e o pellet resultante foi ressuspendido e vortexado em 42mL de solução 1 (50mM glucose, 25mM Tris pH 8.0 e 10mM EDTA). Foram adicionados 39mL da solução 2 (0,2M NaOH, 1% SDS) e 30mL da solução 3 (3M acetato de potássio, 5M ácido acético) homogeneizando devagar, sendo as garrafas mantidas no gelo por 30 minutos. Após esse período e centrifugação por 30 min a 8.000 rpm, o sobrenadante foi filtrado com gaze e precipitado com 1 volume de isopropanol. Para total precipitação as garrafas foram mantidas por 2 horas no mínimo a - 20°C. Em seguida, em tubos de rosca rosa (rotor SS – 34), a solução foi centrifugada por 25 min a 12.000 rpm e o pellet ressuspendido em 1mL de TE (10mM Tris-Cl, pH 7,4, 0,1mM EDTA), sendo acrescentado posteriormente 1v de LiCl 5M gelado. Após nova centrifugação por 15 min a 5000rpm, ao sobrenadante foi adicionado 1 volume de isopropanol e mantido a 4°C overnight. No dia seguinte, após centrifugação por 15 min a 12.000 rpm, o pellet foi seco à temperatura ambiente por aproximadamente 10 min, ressuspendido em 980µL de TE e mantido a 56°C por 30 min. Foi realizado tratamento com 100µg/ml de RNAse A por 30 min a 37°C, após o qual foi adicionado 1 vol de solução gelada de PEG 6000 13% em 1,6M de NaCl. Após centrifugação por 30 min a 14.000 rpm, o pellet foi seco e ressuspendido em 1mL de TE. A concentração de DNA foi estimada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260nm, de acordo com a fórmula abaixo:

Purificação em gradiente de césio

Todo plasmídeo foi purificado por este método para os ensaios de transfecção "in vitro" bem como para os ensaios "in vivo". Para concentrações de até 5mg de plasmídeo, tubos de 5,5 mL (Beckman nº 342412 $1/2 \ge 2$ in) para ultracentrífuga devem ser utilizados. Primeiramente,

em tubos Falcon 50 novos foi adicionado o volume total do plasmídeo e água q.s.p. 4,2mL, 4,3g de cloreto de césio (Gibco, BRL) e 2mg de brometo de etídio. A mistura foi homogeneizada em vortex e com auxílio de uma seringa e agulha 40x12, esta solução foi colocada nos tubos de ultracentrífuga referidos acima, com o máximo cuidado para não formar bolhas. Os tubos foram pesados, balanceados e fechados, sendo a ultracentrifugação realizada com rotor VTI 90 a 75.000 rpm, overnight. Após ultracentrifugação, com o auxílio de uma seringa retirou-se a banda que contém o plasmídeo, inserindo a agulha na parte inferior da banda e aspirando com cuidado para não retirar nada das bandas claras adjacentes, conforme é mostrado no esquema abaixo:



O plasmídeo foi transferido para um tubo Falcon de 15mL (anotando-se o volume recuperado) e lavado 3 vezes com 2 volumes de 1-butanol saturado, para remoção do brometo, até obtenção de duas fases transparentes. Em seguida, adicionamos um volume de etanol calculado a partir do volume inicial de plasmídeo x 4 e dividido pelo volume final após as lavagens. O plasmídeo foi precipitado durante no mínimo 3 dias a 4°C, lavado 3 vezes com etanol 70% e o pellet ressuspendido em 500µL de PBS estéril. Sua quantificação foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260nm.

4.3. Produção e avaliação da vacina de DNA (quimera IL-13Rα2-Fc recombinante)

4.3.1. Transfecção de células de mamífero

A transfecção foi realizada em células da linhagem tumoral B16F10-Nex2, cujo protocolo foi padronizado em nosso laboratório, utilizando lipofectina (Life Technologies), de acordo com instruções do fabricante. Este reagente é uma formulação lipossômica que interage espontaneamente com o DNA para formar um complexo lipídeo-DNA, que adere à cultura de células, resultando na expressão eficiente do DNA. Comparado com outros métodos, este é 5 a 100 vezes mais eficiente, dependendo do tipo celular.

No ensaio, realizado em triplicata, placas de 6 poços foram plaqueadas com 2 x 10^5 células/poço em meio RPMI completo suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C até atingirem 40-60% de confluência, o que leva geralmente 18 a 24 h dependendo do tipo celular. No dia seguinte, para cada transfecção, 10µl da lipofectina foi diluída em 100µl de meio RPMI livre de soro seguida de incubação por 45 minutos à temperatura ambiente. Quanto ao plasmídeo, para cada transfecção foram utilizados 5µg de DNA diluído em 100µl de meio RPMI livre de soro. A seguir, as duas soluções foram combinadas, agitadas gentilmente e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente, sendo em seguida completado o volume final de meio sem soro. Os complexos DNA-lipofectina foram agitados gentilmente e colocados nas células pré-lavadas 1x com 2mL de meio livre de soro. Em estufa CO₂ a 37°C, as células foram incubadas com o complexo por 24 horas, período após o qual o meio contendo DNA foi substituído por meio RPMI completo com 10% de SFB. Vale ressaltar que na expressão da proteína IL-13Ra2-Fc, o meio contendo DNA foi substituído por meio RPMI completo sem soro fetal bovino, pois em experimento anterior o meio contendo anticorpos do soro fetal interferiu na posterior purificação da proteína. Após 48

horas, o sobrenadante das células transfectadas foi recolhido, purificado e a atividade gênica foi avaliada por ELISA.

4.3.2. Purificação da proteína por SDS-PAGE

Para purificação da proteína recombinante (quimera IL-13Rα2-Fc) utilisamos uma coluna de Sepharose-proteína G (Pharmacia, Uppsala, Sweden), devido à porção Fc de anticorpo presente na quimera. O sobrenadante de 48 horas (total de 36mL) da cultura das células B16F10-Nex2 transfectadas foi adequadamente filtrado (Millipore Millidisk 0,22µm) e purificado da maneira descrita a seguir.

De início, lavou-se a coluna com aproximadamente 50mL de PBS 1X estéril em fluxo de 1mL/min. Em seguida, passamos o sobrenadante pela coluna em circuito fechado por no mínimo 1 hora a 0,5mL/min, sendo que ao final deste tempo abrimos o circuito e passamos toda a amostra pela coluna em fluxo de 1mL/min. A coluna foi então lavada com 10mL de PBS (10X o volume da coluna) a 1mL/min e finalmente eluída com 10mL de glicina 0,1M pH 2,8 a 0,5mL/min. O eluato foi coletado em frações de 0,5mL em tubos Eppendorf contendo 100µL de Tris-HCl 1M pH 9,0 para imediata neutralização, sendo que a fração 8 foi a amostra que mais continha a proteína purificada. Para visualização da proteína, o eluato foi submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida 8% em tampão Tris-HCL 1,5M pH 8,8, contendo 0,4% (p/v) de SDS (dodecil sulfato de sódio). O gel de empilhamento contém 3% de acrilamida em tampão Tris-HCL 0,5M pH 6,8 e 0,4% (p/v) de SDS. As amostras (20µL) contendo 5µL de tampão de amostra 4X (50% glicerol, 10% SDS, 300mM Tris-HCl pH 6,8, 0,5% de azul de bromofenol e 1% de 2-mercaptoetanol como agente redutor) foram fervidas por 5 minutos a

100°C para desnaturação da proteína e a solução final resfriada no gelo antes da aplicação no gel. A corrida eletroforética foi realizada em tampão de corrida (Tris 0,025M, glicina 0,152M e 1 % de SDS; pH 8,8) a 100 V por aproximadamente 1 hora. Após este período lavado com água destilada e corado pela prata utilizando-se o protocolo abaixo.

Para fixação da proteína, o gel foi incubado sob agitação constante em solução de 50% metanol, 12% ácido acético e 0,5% de formaldeído a 37%. Após 2 lavagens por 10 minutos com 50% de etanol, o gel foi tratado com uma solução de 0,2g/L de tiossulfato de sódio por 10 minutos sob agitação. Após lavagem com água destilada, o gel foi tratado com 2g/L de nitrato de prata e 0,07% de formaldeído a 37%. A prata é então incorporada à proteína e a revelação é feita após incubação do gel em uma solução de 60g/L de carbonato de sódio, 0,5% de formaldeído a 37% e 4mg/L de tiossulfato de sódio sob agitação por alguns segundos, sendo imediatamente bloqueada pela adição de uma solução contendo 50% de metanol e 12% de ácido acético. Após coloração, o gel foi armazenado em solução de 50% de metanol.

4.3.3. Immunoblotting

Com o objetivo de confirmar a identidade da quimera recombinante (IL-13Rα2•Fc) realisamos um immunoblotting, conforme é descrito a seguir. Após realização da corrida eletroforética, o gel foi lavado com água bidestilada e submergido em tampão de transferência pH 8,3 contendo 0,025M de Tris-base (Gibco), 0,19M de glicina (Pharmacia) e 20% de metanol (Merck) por 20 minutos. Os outros componentes do aparato (membrana de nitrocelulose, papel 3M e esponjas) também foram submergidos em tampão de transferência por pelo menos 5 minutos.

A transferência foi realizada durante pelo menos 1h a 100V em cuba contendo o tampão de transferência, sempre em isopor com gelo. Após transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau (0,1% de Ponceau em ácido acético 10%) por aproximadamente 5 minutos, sendo anotados o início, o fim do gel e o padrão de peso molecular. Em seguida, a membrana foi bloqueada com PBS pH 7,2 contendo leite Molico 5% (Nestlé) por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. Após lavagens com PBS-T 0,05% a membrana foi incubada com o anticorpo biotinilado anti-IL-13Ra2-Fc (R&D Systems) diluído em PBS-BSA 1% 'overnight' a 4° C, sob agitação. Após este período e novas lavagens com PBS-T 0,05% (3 vezes) e PBS (1 vez), a membrana foi incubada a 37 °C com streptavidina-peroxidase (Sigma) diluída em PBS, sob agitação constante por 1 hora. A reação foi revelada com 50mL PBS, 5mg de DAB (Sigma) e 100 μ L de H₂O₂ e interrompida por diluição com água destilada.

4.3.4. Avaliação da produção e atividade biológica da quimera por ELISA-Q

Para avaliarmos se a atividade biológica da quimera recombinante ("binding" a IL-13) estava preservada, utilizamos ELISA-Q (ELISA Quimioluminescente). O ensaio de ELISA-Q, cuja revelação é com luminol (ECL reagente, Amersham), amplifica bastante o sinal e foi altamente sensível, permitindo detectarem-se pequenas quantidades de proteína presentes na amostra. O melhor resultado foi obtido com a padronização descrita a seguir.

Placas de 96 orificios com fundo plano, brancas (Nunc, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com 50µL de IL-13 recombinante murina (Peprotech) a 2µg/mL (ou seja, 100ng/poço) diluída em PBS e incubadas 'overnight' a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween 20 0,05% e os orifícios preenchidos com 200µL de

PBS-leite Molico 1% para bloqueio dos sítios livres, sendo a incubação feita por 3 h a 37°C. Após nova lavagem por 3 vezes com PBS-Tween 20 0,05% foi adicionado 100ng/poço da quimera recombinante comercial (R&D Systems) como primeiro ponto da curva, seguindo diluição seriada de 1:2. Além da curva padrão, foi adicionado 100µL/poço da amostra purificada (quimera IL-13Rα2-Fc produzida em nosso laboratório) seguindo-se incubação por 3 h a 37°C. A curva e as amostras foram analisadas em duplicata. Após este período e 3 lavagens da placa com PBS-Tween 20 0,05%, foi adicionado 50µL/poço do anticorpo anti- IL-13Rα2-Fc biotinilado (R&D Systems) a 1µg/mL, seguindo-se incubação 'overnight' a 4°C. No dia seguinte, foi adicionado 50µL/poço de streptoavidina-peroxidase na concentração de 1:1000, e incubação por 1 h a 37°C. As placas foram então lavadas 3 vezes com PBS-Tween 20 0,05% e mais 3 vezes com PBS 1X. A revelação foi realizada com ECL (Amersham) diluído 1:50 em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 (0,5M Na₂CO₃, 0,5M NaHCO₃). A leitura foi obtida em luminômetro (Cambridge Technology, 7710 Microplate Luminometer), sendo o resultado expresso em URL (Unidade Relativa de Luminescência).

4.4. Expansão, purificação e avaliação do plasmídeo expressando IL-12 murina

O vetor de expressão codificando a IL-12 foi gentilmente cedido pelo Dr. Alexander Rakhmilevich (Rakhmilevich *et al.*, 1996) da Universidade de Wisconsin e testado quanto a sua atividade *in vitro*, antes da terapia gênica. Este vetor contém as seqüências que codificam as subunidades p35 e p40 da IL-12 murina dispostas em direção contrária cada qual com seu próprio promotor CMV (citomegalovirus) e enhancer (SV40), alguns sítios de restrição e uma sequência que contém os sinais de término de transcrição e poliadenilação, além do gene que

confere resistência a penicilina. O vetor controle contendo o gene da luciferase (Luc) foi construído de acordo com Cheng *et al.* (1993). Para expansão do plasmídeo utilizamos o protocolo de maxipreparação de DNA (maxiprep) para imunização que permite obtenção de grande quantidade de plasmídeo para posterior purificação em gradiente de césio, métodos já descritos anteriormente. O mesmo protocolo de transfecção foi utilizado tanto para o plasmídeo pIL-12 quanto para o plasmídeo pIL-13R, sempre após purificação dos mesmos por gradiente de césio. Após transfecção em células de mamífero, o sobrenadante de 48 horas foi recolhido e a atividade gênica foi avaliada por ELISA.

4.4.1. Avaliação da produção de IL-12 por ELISA

Resumidamente, placas de 96 orifícios (Corning 3590) foram sensibilizadas, 'overnight' à temperatura ambiente, com o anticorpo murino específico para IL-12, na concentração de 4 µg/ml, diluído em PBS. Após esse período, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS pH 7,4 contendo Tween 20 a 0,05% (PBST), os orifícios preenchidos com 200µl de PBS/BSA 1% e incubação à temperatura ambiente por 1 hora. Após nova lavagem da placa (3 vezes) com PBST, foram adicionados 100µl do sobrenadante da cultura ou 50µl da citocina recombinante em diluição seriada 1:2 em PBS/BSA 1% (5ng/ml para primeiro ponto da curva), seguindo-se incubação a temperatura ambiente por 2 horas. A seguir, as placas foram lavadas com PBST (3 vezes), sendo adicionado a cada orifício 50µl de anticorpo murino anti-citocina biotinilado (200ng/ml, Pharmingen). Após incubação à temperatura ambiente por 2 h e nova lavagem com PBST, foram adicionados 50µl do conjugado estreptavidina-peroxidase diluído a 1:1000 em PBS. A incubação foi feita por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi
novamente lavada e revelada com 10µl de peróxido de hidrogênio, 2 mg de ortofenilenodiamina (Sigma) em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0. A reação a 37°C durou 15 minutos, sendo bloqueada pela adição de 50µl/poço de ácido sulfúrico 4N. A leitura da reação (densidade ótica, DO) foi feita em leitor automático de ELISA (Dynatech MR500), em comprimento de onda de 492 nm.

4.4.2. Avaliação da atividade biológica da IL-12 recombinante

Após transfecção e dosagem por ELISA, foram realizados testes biológicos para avaliarse a atividade funcional da citocina recombinante produzida, através da sua capacidade de estimular macrófagos in vitro. O parâmetro avaliado para tal foi a produção de NO em macrófagos ativados. Células precursoras oriundas da medula óssea foram obtidas a partir do fêmur de animais C57BL/6. O tecido muscular que recobre o osso foi retirado por raspagem com bisturi estéril. Em seguida, os ossos foram lavados em álcool 70% e deixados por cinco minutos em álcool iodado, sendo depois lavados externamente em meio RPMI simples. As epífises foram cortadas e a medula foi lavada por pressão positiva, com auxílio de seringa de 10 ml e agulha 30G (BD), com meio de diferenciação para macrófagos. Este meio consiste de RPMI 1640 contendo 20% de SFB suplementado com 30% de meio L (sobrenadante obtido após três dias de cultivo de fibroblastos L929, NCTC clone 929, células que secretam constitutivamente CSF e G-CSF). Uma placa de Petri microbiológica (que diminui o grau de aderência dos macrófagos diferenciados) foi utilizada para cada medula (de cada fêmur). As células foram incubadas por 4 dias a 37°C e 5% CO2, sendo então adicionados mais 10 ml de meio de diferenciação. No sétimo dia, as células diferenciadas foram coletadas, após lavagem exaustiva das células não aderentes. Para que os macrófagos diferenciados soltem-se do plástico, a placa foi incubada a 4°C por meia hora, possibilitando assim sua coleta por aspiração com pipeta, não havendo necessidade de uso de enzimas e/ou raspagem mecânica das células. Os macrófagos (2×10^5 células/poço/mL) foram plaqueados em placa de 24 poços (Corning) e após 6 h foram adicionados os seguintes estímulos controles: 100ng/mL de LPS isoladamente ou em combinação com 1ng/mL de IFN- γ . O sobrenadante de 48 horas das células transfectadas com o pIL-12 foi utilizado como estímulo na concentração de 2,5ng/mL de acordo com quantificação obtida no ELISA. Macrófagos sem estímulo algum e macrófagos estimulados com sobrenadante de células transfectadas com vetor vazio também foram avaliados e os experimentos foram realizados em triplicata. Em todos os experimentos, a produção de NO foi avaliada 24, 48 e 72 horas após adição dos estímulos.

4.5. Experimentos in vivo

4.5.1. Animais

Camundongos com "background" genético de C57BL/6 (H-2b) e a linhagem singeneica de melanoma murino B16F10-Nex2 foram utilizados para os ensaios de imunoterapia aplicada ao câncer. Em todos os experimentos, os camundongos utilizados eram machos com idade entre 6 e 8 semanas e provenientes do CEDEME (Centro para o Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia, UNIFESP). Vale ressaltar que todos os ensaios *in vivo* foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIFESP, sob número de protocolo 1340/2003.

4.5.2. Desafio tumoral

Em todos os experimentos realizados no modelo subcutâneo, os camundongos foram desafiados com 5 x 10^4 células tumorais B16F10-Nex2 injetadas subcutâneamente no flanco direito dos animais. Todos os experimentos incluíram 10 animais por grupo.

4.5.3. Esquemas de tratamento

Os animais foram vacinados com os plasmídeos para expressão de IL-12 e da fração solúvel do receptor de IL-13 ligada à porção Fc de IgG2a. O plasmídeo da IL-12 foi administrado 1 dia após o desafio com as células tumorais, em uma dose única de 100 µg/animal, através de injeção intradérmica na base da cauda. O plasmídeo da IL-13 foi administrado 5 dias após o desafio e a cada 5 dias por mais 5 vezes. Todas as injeções também foram intradérmicas na base da cauda com 100µg de plasmídeo/animal. Tratamentos intraperitoneais com 10µM da droga 7A começaram 4 dias após o desafio e 3 vezes por semana até que o tumor atingisse 2.000 mm³. Grupos experimentais individuais tratados apenas com um dos plasmídeos ou apenas com a droga 7 A também foram incluídos, além do grupo principal tratado com ambos os plasmídeos e com a droga nas doses já descritas. Grupos tratados com vetor vazio (sem inserto) também foram estudados.

4.6. Eficácia terapêutica

A eficácia da imunoterapia foi observada pela avaliação de:

1) desenvolvimento tumoral individual

2) sobrevida dos animais em relação aos controles tratados com o vetor vazio

 imunidade celular individual *ex vivo* através de citometria de fluxo de esplenócitos (populações celulares produtoras de citocinas)

4.6.1. Desenvolvimento tumoral

O volume tumoral subcutâneo foi medido com o auxílio de um paquímetro a cada 2 dias, a partir da formação do nódulo, que ocorreu entre o 14° e o 18° dia. Para o cálculo do volume tumoral utilisamos a seguinte formula:

V= 4π (R1 X R2 X R3)/3 (sendo R1=R2), ou V= 0.52 X D1² X D3, onde D1 e D3 são o menor e o maior diâmetro, respectivamente.

4.6.2. Sobrevida dos animais

Todos os experimentos foram realizados com 10 animais por grupo experimental e para análise de sobrevida, os animais eram sacrificados assim que atingiam 3.000 mm³ de diâmetro tumoral. Esse critério também foi aprovado pelo comitê de ética da UNIFESP.

4.6.3. Citometria de fluxo (FACS) ex vivo

A análise do FACS foi feita a partir de esplenócitos obtidos tanto de animais não tratados como de animais tratados (protegidos ou não ao final do experimento). Todos os camundongos

(controles ou vacinados) foram avaliados individualmente e após atingir 3.000 mm³ de diâmetro tumoral. Os esplenócitos foram coletados 15 a 70 dias após a última terapia gênica, dependendo da evolução tumoral de cada animal. Nós avaliamos as populações celulares produtoras de interleucinas, através de dupla ou tripla marcação com anticorpos específicos (Pharmigen, San Diego, CA, USA). Células T CD4⁺, T CD8⁺, F4/80⁺ e células T NK1.1⁺ (CD3⁺NK1.1⁺, CD4⁺NK1.1⁺ e CD8⁺NK1.1⁺) foram avaliadas, seguido da detecção intracelular das seguintes citocinas: IFN-γ, IL-12, IL-10, IL-6, IL-4, IL-13, IL-2, TNF-α e TGF-β. As células, neste caso, foram sempre permeamilizadas de maneira a dosar as citocinas intracelulares. Anticorpos contra CD3, CD4 e CD8 eram conjugados com PE (ficoeritrina) e anticorpos contra NK1.1 e F4/80 eram conjugados com FITC (isotiocianato de fluoresceína). Todos os anticorpos contra as citocinas eram biotinilados e estreptavidina-FITC ou estreptavidina-APC (aloficocianina) foi utilizada para revelação, de acordo com as marcações celulares de superfície.

Resumidamente, os animais foram anestesiados e sacrificados por punção cardíaca, sendo a pele rebatida e o baço retirado e macerado, com auxílio de lâmina de extremidade fosca, em PBS 1X estéril. Eritrócitos foram lisados pela adição de 5mL/baço de tampão de Lise (0,1M NH₄Cl pH 7,5), seguido de neutralização com igual volume de meio RPMI completo, centrifugação e lavagem com PBS 1 X. Para a realização do FACS propriamente dito, os esplenócitos foram contados e 10⁶ esplenócitos/tubo de FACS foram lavados mais uma vez com PBS 1X e uma vez com tampão de bloqueio PBS-BSA 1%. Todas as centrifugações foram realizadas a 2.000 rpm por três minutos a 4°C. Após lavagens, as células foram incubadas com soro de camundongo normal 1:30 por 1 hora a 4°C. Após nova lavagem com monoclonais conjugados com fluorocromo foram diluídos 1:100, em volume final de 20µL por tubo, e incubados por 1 hora no gelo. Posteriormente as células foram lavadas mais duas vezes com PBS 1X pH 7,2 e fixadas com PBS-paraformaldeido 2% (Merck) em volume final de 500µL por tubo de FACS.

Para as marcações intracelulares das citocinas, após a marcação de superfície e apropriadas lavagens com PBS 1X, as células foram incubadas com 100µL de solução Cytofix (0,5% saponina e 1% de paraformaldeído em PBS 1X) por 20 minutos a 4°C. Após nova lavagem com PBS 1X, as células foram então permeabilizadas com 300µL de solução de permeabilização (0,5% saponina em PBS 1X) seguindo-se incubação por 10 minutos a 4°C. Após lavagem, as células foram incubadas com soro de camundongo normal 1:30 por 1 hora a 4° C, lavadas novamente após este período e ressuspendidas em 60μ L de tampão de permeabilização. Os anticorpos monoclonais biotinilados, específicos para cada citocina, foram diluídos 1:100, em volume final de 20µL por tubo, e incubados por 1 hora no gelo. Para revelação, foi adicionado estreptavidina-fluorocromo (Pharmigen) diluída 120 vezes (20µL por tubo Eppendorf) em tampão de permeablização, seguido de incubação por 1 hora no gelo, protegida da luz. Posteriormente as células foram lavadas mais duas vezes com tampão de permeablização e uma vez com PBS 1X pH 7,2, fixadas com PBS-paraformaldeido 2% (Merck) em volume final de 500µL por tubo de FACS e a reação foi analisada em citômetro de fluxo Becton-Dickinson, com análise dos resultados pelo software CellQuestPRO®.

4.7. Análise estatística

Análise estatística foi realizada através do teste t de Student's. Todos os experimentos foram conduzidos duas ou mais vezes. Resultados reprodutíveis foram obtidos e os mais representativos estão mostrados. A sobrevida foi avaliada pelo teste de Kaplan-Meyer. Em ambos os testes estatísticos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de *p* era menor do que 0,05. A produção de citocinas em animais controle e tratados foi expressa na forma de relações mostrando aumentos (n vezes) utilizando 11 pares de animais, com médias e intervalos de confiança (95%). A significância foi calculada por ANOVA, seguido de teste de Dunn não paramétrico.

Resultados

V – RESULTADOS

5.1. Preparação de RNA

As preparações de RNA obtidas das linhagens celulares (macrófagos murinos residentes, macrófagos da linhagem J774, esplenócitos murinos e hibridoma 17C) foram avaliadas quanto à integridade e pureza em gel de Agarose. A boa qualidade das preparações pode ser observada na Figura 1, onde aparecem duas bandas intensas que representam os RNAs ribossômicos 18S e 28S. O rendimento das extrações de RNA foi bom na maioria das vezes, variando de 1,5 a 10 µg/µL de RNA. Os rendimentos mais baixos foram devidos a um menor número inicial de células utilizado para a extração.

5.2. RT-PCR, clonagem, restrição e sequenciamento do receptor IL-13Rα2

Todas as linhagens apresentaram amplificação positiva para o gene da α -actina (Figura 2), gerando um fragmento de aproximadamente 900pb, sendo nosso controle positivo para as reações de RT-PCR. Os controles negativos, ou seja, sem a adição da enzima transcriptase reversa também são mostrados nesta figura. Este tipo de controle garante a amplificação a partir do RNA e não de DNA contaminante. A porção gênica completa que codifica para o domínio extracelular do receptor IL-13R α 2 foi amplificada e corresponde a um fragmento de 1.002 pb, como pode ser observado na Figura 3. Ela foi isolada, purificada e clonada. Entre todas as linhagens celulares utilizadas, o melhor resultado (banda mais intensa e isolada) foi obtido a partir de RNA extraído de macrófagos residentes ativados com IL-4 ou com IL-13.

Este fragmento de 1.002 pb foi analisado utilizando-se enzimas de restrição antes de sequenciá-lo. O estudo de restrição foi feito com as enzimas *Eco* RI, *Bam* HI e *Hind* III. O vetor pGEM-T possui dois sítios para Eco RI que possibilita retirar o inserto. Porém esta enzima também corta o fragmento clonado de 1.002pb em dois sítios (706 e 726), gerando um fragmento de aproximadamente 700pb, outro de aproximadamente 276pb e ainda outro de 20pb, imperceptível no gel (Figura 4). Este vetor não possui sítios para as enzimas *Bam* HI e *Hind* III, que cortam o inserto uma única vez, "abrindo" o plasmídeo, como pode ser observado nas Figuras 5 e 6.

O próximo passo foi sequenciar esses clones para confirmar a sequência e assegurar que não há erros internos (substituições, deleções ou inserções). O sequenciamento do plasmídeo contendo o gene que codifica o domínio extracelular da cadeia IL-13R α 2 foi realizado com sucesso. Toda a sequência de 1.002 pb foi confirmada com base na sequência consenso (Figura 7), gerada a partir de ambas as fitas de DNA, apresentando 100% de homologia com a sequência do Gene Bank gi=6680404 (Donaldson *et al.*, 1998).

5.3. RT-PCR, clonagem e sequenciamento da porção Fc

Foi realizada a clonagem e sequenciamento do fragmento codificante da porção Fc de IgG2a murina, que foi utilizado na construção da quimera IL13R α 2-Fc. Essa por sua vez foi inserida em vetor de expressão eucariótica e utilizada como vacina gênica.

Após confirmação da presença do gene da α -actina por RT-PCR (Figura 2), o fragmento que codifica as porções CH2-CH3 do anticorpo foi amplificado, seguido de eletroforese em gel de Agarose 1% (Figura 8). Após purificação e clonagem deste fragmento em pGEM-T, o

plasmídeo contendo o inserto foi sequenciado no Centro de Estudos do Genoma Humano (USP) e a sequência completa de 654pb (Figura 9), apresentou 100% de homologia com a sequência depositada no Gene Bank gi =51767065.



Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 1% com as amostras de RNA extraídas pelo método de Trizol. (a) esplenócito (1,2) e macrófago residente (3); (b) macrófago residente estimulado; (c) hibridoma 17C em duplicata; (d) esplenócito estimulado (1), macrófago J774 estimulado ou não (2 e 3 respectivamente).



Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 1% com as amplificações do gene da α-actina por RT-PCR, representando algumas amostras. 1-Marcador Molecular 1 kb (Invitrogen). (a) Esplenócito: 2-Controle sem RT, 3-gene α-actina e 4-Controle com água; (b) macrófago residente estimulado e não estimulado, respectivamente: 2,4-Controle sem RT e 3,5- gene α-actina.



Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1% com a amplificação por RT-PCR do fragmento completo que codifica o domínio extracelular do receptor IL-13Rα2. RNA foi obtido de macrófagos murinos residentes estimulados por 48 horas com IL-13 recombinante. 1-Marcador Molecular 1 Kb (Invitrogen).



Figura 4 – Análise de restrição com a enzima *Eco*RI em gel de agarose 1%. Vetor + inserto de 1.002 pb clonado (fragmento completo que codifica o domínio extracelular do receptor IL-13Rα2). 1- Marcador molecular ΦX174RF DNA/Hae III (Invitrogen).



Figura 5 – Análise de restrição com a enzima *Bam*HI em gel de agarose 1%. A banda de aproximadamente 4 Kb corresponde ao vetor pGEM-T + o inserto de 1.002 pb clonado. 1- Marcador molecular λ DNA/Hind III (Gibco BRL) + marcador molecular Φ X174RF DNA/*Hae* III (Invitrogen).



Figura 6 – Análise de restrição com a enzima *Hind* III em gel de agarose 1%. A banda de aproximadamente 4 Kb corresponde ao pGEM-T + o inserto clonado de 1.002 pb. 1- Marcador molecular λ DNA/*Hind* III (Gibco BRL).

AT GG CTTTT GTG CATATCA GAT GCTTG TG TTTCATTCTT CTTTG TACAA TAA CT GG CTATTC 	86
TCAGGATTTTGAAATATTGGATCCTGGATTACTTGGTTATCTCTATTTGCAATGGAAACCTCCTGTGGTTATAGAAAAATTTAAGG Q D F E I L D P G L L G Y L Y L Q W K P P V V I E K F K	172
GCTGTACACTAGAATATGAGTTAAAATACCGAAATGTTGATAGCGACAGCTGGAAGACTATAATTACTAGGAATCTAATTACAAG	258
GA TG GGTTT GAT CTTAA TA AAG GC ATT GA AGG AA AGA TA CGT AC GC ATT TGT CA GA GC A TTG TAC AA ATG GA TCA GA AGT AC AA AG + + + + + + + + + + + + + + + + + + +	344
# TC CA TGG AT AGA AG CTT CTT AT GG GAT AT CAG AT GAA GG AAG TT TGG AA ACT AA AAT TC AGG ACA TG AAG TG TAT AT AT TAT AAC T ++++++++++++++++++++++++++++++++++++	43C
GG CA GTA TT TGG TC TGC TC TTG GA AAC CT GGC AA GAC AG TA TA TTCT GA TAC CA ACT AT ACC ATG TT TTT TGG TA T GAG GG CT TG	516
# GATCATGCCTTACAGTGTGCTGATTACCTCCAGCATGATGAAAAAATGTTGGATGCAAACTGTCCAACTTGGACTCATCAGACTA ++++++++++++++++++++++++++++++++++++	602
	688
$\begin{array}{c} \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\ \\$	774
V K P L F L H I S V K N S I P G P G P G P G F I I R M K N S I P G G P G I R M K N S I P G G P G I R M K N S I D I R M K N S I D I R M K N S I D I R M K N S I P G G P G I	86C
I P P R C Y T Y E I V I R E D D I S W E S A T D K N D M K	946
L K R R A N E S E D L C F F V R C K V N I Y C A D D G I GG AG CGA AT GG A G G G G A A T G T T G G G A A G G T T A C A C A G G G C C A G A C T C A A G G G C A G A T G T G G A A G G G C A G A T G T G G A A G G G C A G A T G T G G A A G G G C A G A T G T G G A G G G C A G A T G T G G A G G G C A G G G C A G A T G T G G G A G G G C A G G G C A G A T G T G G G A G G G C A G G G C A G A T G T G G G A G G G C A G G G C A G G G C A G G G C A G G G C A G G G C A G G G C A G G G C A G G G G	
W S E W S E E C W E G Y T G P D S K	

Figura 7 - Sequência completa que codifica a porção extracelular do receptor IL-13Rα-2. O peptídeo sinal corresponde a sequência destacada e os sítios possíveis para Nglicosilação estão marcados com #.



Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose 1% com a amplificação por RT-PCR do fragmento completo que codifica a porção CH2-CH3 do anticorpo murino IgG2a (654 pb). RNA foi obtido do hibridoma 17C. 1- Marcador Molecular ΦX174RF DNA/*Hae* III (Invitrogen).

GCTCCAGACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATGGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAG														11																												
А	.	5	D	L	L	G	G	: I	2	S	V	F	Ι	F	F	P F	5	K	Ι	K	D	V	L	1	1	Ι	S	L	S	P	М	V		Г	С	V	V	V	D	V	S	
CG	AG	GAT	GAC	200	AGA	CG		AGA	ATC.	AGC	CTG	GTT	TGI	GAA	CA	ACG	TGO	GAA	GTA	CAC	CAC	AGC	TCA	GAC	CACA	4 A A		AT.	AGA	GAG	GA1	ΤA	CAA	CAG	GΤΑ	стс	TCO	CGGC	GTG	GTC/	A	22
•••	E	D	D	P	C)	V	Q	Ι	S	W	/ F		V	N	N	V	E	V	+	1	Γ	A	Q	Т	Q	T	Н	R	E)	Y	N	S	T	L	R	V	′ V	г /	
GT	GCI	ст		CCA	тсс	AGO	CAC	CAG	GA	СТС	GGA.	TGA	GTO	GCA	AG	GAG	TT(CAA	ATG	C A A	AGG.	TCA	ACA	ACA	AGAG	GCC	стс	:cc.	ATC	ссс	CAT	ĊĠ	٩GA	AAA	4CC	ATC	TCA	AAA		CAG	A F	33
S	A	L	F	р Р	Ι	Q	Н	Q	D	۰. ۱	W	Μ	S	G	K	E	F		<	С	K	V	N	N	R	A	L	-	P	S	P	Ι	E	K	1	-	I	S	K	P	R	
GG	GCI	CAG	TAA	AGA	GCT	CCA	AC A	GGI	AT.	ATG	GTC'	TTG	CC1	ICCA	.CC.	AGC	AG/	4 A G	AGA	TGA	ЧСТИ	AAG	A A A	GAC	GTTO	CAG	ТСТ	GA	сст	GCA	TGA	TC	ACA	GGC	стт	стт	ACO	CTGC	CG	4 A A ⁻	T	44
G		>	V	R	A	P	Q	1	V	Y	V	L	P	P	F	, , ,	4	E	Е	M	Т	K	K	E	Ξ. F	-	S	L	T	С	M	I	-	Γ	G	F	L	P	А	E	I	
ΤG	СТ	GTG	GAC	CTG	GAC	САС	GC A	ATG	GGG	CGT	TAC/	AGA	GC /		СТЛ	ACA	AG/	AAC	ACC	GCA	AC/	AGT	ССТ	GG/	АСТО	CTG	ATG	GT	тст	ТАС	TTC	ATO	GTA	CAG	GCA	AGC	TCA	AGAC	GT AI	CAA	A F	55
	A	V	D	W	T	-	S	N	G	R	Т	E	Ξ	Q	N	Y	К	N	Т	A	1	Γ	V	L	D	S	D	G	S)	′ I		M	Y	S	К	L	R	V	′ C)	
AG	AG	CAC	TTG	GGG	AAA	GAC	GGA	A G 1	СТ	TTT	TC G(сст	GC 1	TCAG	TG	GTC	CAC	CGA	GGG	TCT	rgc,	ACA	ATC	ACC	стти	AÇG	ACT	AA	GAC	CAT	СТС	:CC(GGT	СТС	CTG	GGT	AAA	ATGA	<u>\</u>	654		
K	S	Т	V	N	E	R	G	S	L	.	F	A	С	S	V	V		[Ξ	G	L	Н	N	Н	L	Т	T	 Г	K	Т	Ι	S	R	S	L	. (3	K				

Figura 9 - Sequência completa que codifica a porção Fc do anticorpo murino IgG2a, clonada em pGEM-T.

5.4. ELISA para detecção da produção de anticorpos pelo hibridoma 17C

Para nos certificarmos que o hibridoma 17C estava realmente secretando IgG murina, no momento da extração do RNA, o sobrenadante da cultura destas células foi recolhido e avaliado por ELISA. O teste foi realizado em quadruplicata a partir de sobrenadantes obtidos de células cultivadas independentemente e confirmou a secreção de anticorpo murino IgG antigp43, como pode ser observado na Figura 10.

5.5. Proteína recombinante IL-13Rα2-Fc

5.5.1. Construção e análise em SDS-PAGE

Para construção da quimera, a fusão do gene que codifica o domínio extracelular do receptor (aa 1 a 332) à porção Fc de IgG (porção "hinge-CH2-CH3") foi realizada através de uma técnica denominada "PCR overlap" modificada (Davidson *et al.*, 2002). No primeiro PCR não obtivemos amplificação do fragmento completo, porém com a re-amplificação utilizando os primers externos foi possível gerar um fragmento de 1.665 pb, visível no gel de agarose (Figura 11). Após clonagem em pGEM-T, o inserto foi transferido (subclonagem) para um vetor de expressão eucariótica, o VR1012. Para garantir melhor rendimento, o vetor foi desfosforilado e em seguida utilizado na ligação com o fragmento IL-13R α 2-Fc. Após transformação e miniprep de 20 colônias selecionadas ao acaso, obtivemos 2 amostras plasmidiais que continham o inserto, visualizadas após restrição com a enzima *Sal* I (Figura 12), sendo que em apenas uma o inserto estava clonado na direção correta (Figura 13). O vetor eucariótico VR1012 contendo o inserto (quimera) recebeu a denominação de pIL-13R e foi

utilizado para expressão em células de mamífero. A proteína recombinante produzida após 48 horas de expressão gênica foi purificada em coluna de Sepharose proteína G, sendo que os eluídos 8 e 9 continham a maior parte da proteína purificada, em um total de 1 mL de solução. A proteína recombinante foi submetida à eletroforese em SDS-PAGE e migrou no tamanho esperado de aproximadamente 85-90 kDa, como pode ser observado na Figura 14, após coloração pela prata.

5.5.2. Immunoblotting

A identidade da proteína recombinante foi confirmada por immunoblotting conforme é mostrado na Figura 15. Uma banda única entre 80 e 90 KDa foi detectada após revelação com DAB.

5.5.3. ELISA Quimioluminescente

Para avaliar a produção e a atividade biológica da proteína recombinante, realizamos um ELISA-Q (ELISA Quimioluminescente). A produção da quimera IL-13Rα2-Fc pelas células B16F10Nex2 transfectadas com nosso plasmídeo pIL-13R e após purificação em coluna G, pode ser observada na Figura 16. A concentração da quimera no sobrenadante foi determinada através de uma curva padrão realizada com a quimera comercial IL-13Rα2/Fc IgG1 (R&D Systems). A técnica foi bastante sensível e nos permitiu detectar até 0,25 µg/mL, ou seja, 12,5 ng/poço da quimera comercial, sendo que nossa amostra contém aproximadamente 0,92 µg/mL de proteína recombinante purificada. Para calcular a quantidade de proteína produzida pelas

células transfectadas, dividimos esta quantidade (0,92µg) por 36 mL (total de sobrenadante antes da purificação pela coluna) e obtivemos então uma produção de 25 ng/mL de proteína, o que pode ser considerado muito bom em um sistema de expressão eucariótica.



Figura 10 – ELISA realizado com o sobrenadante obtido do hibridoma 17C após 2 dias de cultivo em placas de 24 wells (1 x 10⁵células/2mL/poço). As placas foram sensibilizadas com 500ng/poço de gp43 purificada. O controle é o branco do experimento. Os resultados estão expressos como absorbância em comprimento de onda de 492nm.



Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose 1% com a amplificação por PCR overlap da cadeia IL-13Rα2 e da porção Fc do anticorpo murino IGg2a com os primers P1 a P4 (1 e 2) e re-amplificação com os primers externos com diferentes quantidades de template (3-6). Coluna 7 é o controle negativo da reação. A- Marcador molecular de 1 kb (Invitrogen). A realização do PCR-overlap está esquematizada abaixo.



Figura 12 – Restrição do plasmídeo pIL-13R com a enzima Sal I após minipreparações de DNA de 20 colônias bacterianas. Apenas 2 minipreparações continham o inserto. Eletroforese foi realizada em gel de agarose 1%. 1- Marcador molecular λ DNA/Hind III (Gibco BRL) e 1 Kb (Invitrogen). Colunas 2 e 3: controles positivo e negativo da restrição, respectivamente.



Figura 13 – Restrição do plasmídeo pIL-13R com a enzima *BamH*I. Eletroforese foi realizada em gel de agarose 1%. 3 e 4- Inserto clonado na direção incorreta e correta, respectivamente. 1-Marcador molecular λ DNA/*Hind* III (Gibco BRL). 2- Marcador molecular 1 Kb (Invitrogen).



Figura 14 – Análise por SDS-PAGE da proteina recombinante IL-13Rα2-Fc, que migrou no tamanho esperado de aproximadamente 85 kDa. O gel foi realizado em condições redutoras e corado pela prata. A proteína foi analisada após purificação em coluna G do sobrenadante obtido de células B16F10-Nex2 transfectadas com o vetor pIL-13R, após 48 horas de expressão gênica. Marcador de peso molecular: Invitrogen.



Figura 15 – Immunoblotting mostrando a proteina recombinante quimera IL-13Rα2-Fc, após revelação com DABI (1). 2- Controle negativo, ou seja, sobrenadante de células transfectadas com o vetor vazio.



Figura 16 – ELISA-Q mostrando a atividade biológica preservada e produção da quimera IL-13Rα2-Fc. Concentração da proteína foi mensurada a partir do sobrenadante das células B16F10-Nex2 transfectadas com o plasmídeo pIL-13R após 48 horas de expressão proteica e após purificação em coluna G (amostra). O controle refere-se à análise do sobrenadante obtido após transfecção com vetor vazio e o background é o branco do experimento. Os resultados estão expressos em µg/mL de proteína. *P< 0,001 (amostra x controle).</p>

5.6. Expansão, purificação e análise do plasmídeo pIL-12

5.6.1. Análise do pIL-12 antes e após purificação em gradiente de césio

As primeiras maxi-preparações de DNA plasmidial foram analisadas por restrição com as duas enzimas possíveis, *Sma*I e *Spe* I. O plasmídeo pWRG possui um único sitio para cada uma destas enzimas, sendo linearizado após restrição (Figura 17). Os rendimentos das maxi-preparações variaram de de 5,8 a 10,36 mg de plasmídeo para cada litro de cultivo bacteriano. Após purificação em gradiente de césio foi realizada uma restrição para nos certificarmos da pureza e integridade do plasmídeo (Figura 17). O rendimento da purificação em césio foi de 50% ou mais dependendo da purificação. Esse plasmídeo purificado foi utilizado para os ensaios de transfecção *in vitro* e para os ensaios *in vivo*.

5.6.2. Avaliação da produção da citocina IL-12 após transfecção in vitro

Transfecção transiente foi realizada em células da linhagem tumoral B16F10-Nex2 e resultou em uma boa produção de IL-12, variando de 5 a 8 ng/mL dependendo das condições experimentais. A produção de IL-12 pelas células B16F10-Nex2 transfectadas com nosso plasmídeo pWRG-IL-12 pode ser observada na Figura 18. Neste gráfico, a produção média após um período de 48 horas de expressão gênica foi de 7 ng/mL de IL-12. Assim, obtivemos um total de 14ng de IL-12 (2 mL/poço). Em alguns experimentos, as células foram transferidas para garrafa de acordo com protocolo pré-estabelecido, na tentativa de selecioná-las para transfecção permanente. No entanto, não foi possível obter-se células B16F10-Nex2 transfectadas de maneira permanente, o que não impediu o seu uso na terapia gênica.

5.6.3. Avaliação da função biológica da citocina IL-12 recobinante

Foram realizados testes biológicos para avaliar a atividade funcional da citocina recombinante produzida, através da sua capacidade de estimular macrófagos *in vitro*. O parâmetro avaliado foi a quantificação de NO (óxido nítrico) produzido por macrófagos ativados. Após vários experimentos de padronização, seja com macrófagos peritoneais ou macrófagos provenientes da medula óssea, obtivemos resultados bons e reprodutíveis utilizando os macrófagos de medula. Os experimentos iniciais utilizando macrófagos peritoneais não foram satisfatórios devido à falta de reprodutibilidade dos testes, provavelmente devida à população heterogênea presente no peritôneo dos animais.

A representação do melhor experimento realizado está na Figura 19, onde a produção de NO está na ordem de μM, comparativamente à curva padrão de Nitrito de Sódio (NaNO₂), representada na Figura 20. Observamos um background na produção de NO quando macrófagos sem estímulo foram avaliados, o que pode ser considerado normal. O melhor estímulo para a produção de NO foi sempre a adição de LPS + IFN-γ, atingindo picos de aproximadamente 80 a 95µM no período de 72 horas, em experimentos diferentes. A concentração ótima para estímulo dos macrófagos foi quando utilizamos 300µL de sobrenadante de células transfectadas com pIL-12, ou seja, 2,5 ng/mL de IL-12 e isto se repetiu em todos os tempos avaliados (24, 48 e 72 horas após estímulo). Esta quantidade é equivalente a 30% do meio adicionado aos macrófagos e foi suficiente para estimular a produção de até 60µM de NO, no período de 72 horas. Vale ressaltar que as concentrações de IL-12 nos sobrenadantes foram estimadas pelo ELISA, assim podem não representar necessariamente a concentração real da citocina. Sobrenadantes obtidos de células transfectadas com o vetor

vazio também foram avaliados e em todos os períodos houve apenas uma produção basal de NO, comparável ao controle. Deste modo, foi-nos possível dar início aos testes *in vivo* de proteção utilizando a vacina gênica contendo o gene da IL-12.



Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose 1% do plasmídeo pIL-12 digerido com a enzima de restrição Sma I e Spe I, respectivamente (1 e 2) e com a enzima Sma I após purificação em gradiente de césio (3). A-Marcador molecular λ DNA/Hind III (Gibco BRL).



Figura 18 – Concentração de IL-12, mensurada através de ELISA, no sobrenadante de células B16F10-Nex2 transfectadas com o plasmídeo pIL-12, após 48 horas de expressão gênica. Cada barra é representativa de um experimento realizado em triplicata.



Figura 19 – Concentração de NO (óxido nítrico), dosado por Griess, no sobrenadante de macrófagos após 24, 48 e 72 horas de cultivo com os estímulos descritos. Cada barra é representativa de um experimento realizado em triplicata. Sobrenadante obtido de células transfectadas com pIL-12 estimulou significativamente a produção de NO em comparação com o sobrenadante controle (células transfectadas com o vetor vazio). P< 0,05 pelo teste t.</p>



Figura 20 – Curva padrão de nitrito de sódio com concentrações na ordem de μM, dosado por Griess. Cada ponto da curva foi realizado em duplicata. O resultado é expresso como a medida de absorbância em comprimento de onda de 550 nm.

5.7. Experimentos in vivo

5.7.1. Desenvolvimento tumoral

As figuras de 21 a 24 apresentam os gráficos obtidos após medida do volume tumoral. Nos grupos tratados com apenas um plasmídeo há um modesto retardo no crescimento tumoral, que foi mais pronunciado quando estes plasmídeos foram associados individualmente com a droga. Um resultado somatório foi observado quando do tratamento com ambos os plasmídeos mais a droga 7A, pois estes animais desenvolveram o tumor mais tardiamente em relação a todos os outros grupos avaliados (Figura 24).

5.7.2. Sobrevida dos animais

A análise de sobrevida corroborou os resultados de desenvolvimento tumoral como pode ser observado nas figuras de 25 a 28. Grupos experimentais individuais tratados apenas com um dos plasmídeos ou apenas com a droga 7A mostraram uma proteção parcial em relação aos controles (Figuras 25, 26 e 28). Animais tratados com uma única dose do plasmídeo da IL-12 apresentaram um aumento na sobrevida significativo em relação ao grupo controle tratado com o plasmídeo vazio (p=0,02), diferença significativa que foi ainda mais pronunciada quando o tratamento foi complementado pela quimioterapia com a droga 7A; p=0,009 (Figura 25). O mesmo pode ser considerado para o tratamento com o pIL-13R. Neste grupo um total de 6 doses do plasmídeo foram necessárias para prolongar significativamente a sobrevida, e a diferença significativa em relação ao grupo controle (p=0,02) foi maior quando da administração do plasmídeo em associação com a droga (p=0,0005), como pode ser observado

na figura 26. O grupo tratado com ambos os plasmídeos mostrou uma proteção significativa em relação aos demais, porém o melhor resultado foi obtido quando os animais foram tratados com ambos os plasmídeos em associação com a droga 7A, onde 30% dos animais permaneceram livres de tumor (Figura 27 e 28). Estes animais que não desenvolveram o tumor foram posteriormente sacrificados para análises *ex vivo* do perfil imune através de citometria de fluxo. Conjuntamente estes resultados demonstraram que o melhor protocolo terapêutico foi a bioquimioterapia, na qual associamos os tratamentos quimioterápicos com as vacinas gênicas. Vale ressaltar que em todos os experimentos realizados, pelo menos 4 grupos controle foram avaliados: aqueles vacinados com ambos os plasmídeos vazios, aqueles vacinados com apenas um plasmídeo vazio (pCMV ou VR1012) e aqueles tratados apenas com PBS. Não houve diferença significativa entre estes grupos controle.



Figura 21 – Desenvolvimento tumoral de animais tratados com pIL-12 (A) e de animais tratados com pIL-12 + droga 7A (B). Animais C57Bl/6 foram injetados com 5 X 10⁴ células tumorais B16F10-NEX2 e tratados com pIL-12, em uma única dose, 1 dia após o desafio. Droga foi administrada 3 vezes por semana, a partir do 4° dia após o desafio até o tumor atingir 2.000 mm³.



Figura 22 – Desenvolvimento tumoral de animais tratados com pIL-13R (A) e com pIL-13R + droga 7A (B). Animais C57Bl/6 foram injetados com 5 X 10⁴ células tumorais B16F10-NEX2 e tratados com pIL-13R, 5 dias após o desafio e por mais 5 vezes, de 5 em 5 dias. A droga foi administrada 3 vezes por semana, a partir do 4° dia após o desafio até o tumor atingir 2.000 mm³.


Figura 23 – Desenvolvimento tumoral de animais tratados com ambos os plasmídeos (pIL-12 e pIL-13R) e com os vetores vazios. Animais C57Bl/6 foram injetados com 5 X 10⁴ células tumorais B16F10-NEX2 e tratados com pIL-12, um dia após o desafio em dose única e com pIL-13R, 5 dias após o desafio e por mais 5 vezes, de 5 em 5 dias.



Figura 24 – Desenvolvimento tumoral de animais tratados com ambos os plasmídeos (pIL-12 e pIL-13R) em associação com a droga 7A e com os respectivos controles com os vetores vazios. Animais C57Bl/6 foram injetados com 5 X 10⁴ células tumorais B16F10-NEX2 e tratados com pIL-12, um dia após o desafio em dose única e com pIL-13R, 5 dias após o desafio e por mais 5 vezes, de 5 em 5 dias. Os animais foram tratados com 10 μM da droga, 3 vezes por semana, pela via intraperitoneal.



Figura 25 – Curva de sobrevida mostrando o efeito terapêutico do pIL-12 contra melanoma murino subcutâneo. Animais C57Bl/6 foram injetados com 5 X 10⁴ células tumorais B16F10-Nex2 e tratados com pIL-12 um dia após o desafio. Em outro grupo, os animais foram vacinados com o pIL-12 em associação com a droga 7A. A droga 7A foi administrada por via intraperitoneal, três vezes por semana, com 10µM/ animal. Grupo controle foi vacinado com o plasmídeo vazio. Cada grupo continha 10 animais. P=0,02 para grupo controle x grupo vacinado com pIL-12 e p= 0,009 para grupo controle x grupo vacinado com pIL-12 e p= 0,009 para grupo controle x grupo vacinado com pIL-12 e p= 0,009 para grupo controle x grupo vacinado com



Figura 26 – Curva de sobrevida mostrando o efeito terapêutico do pIL-13R contra melanoma murino subcutâneo. Animais C57Bl/6 foram injetados com 5 X 10⁴ células tumorais B16F10-Nex2 e tratados com pIL-13R cinco dias após o desafio, e por mais 5 vezes de 5 em 5 dias. Em outro grupo, os animais foram vacinados com pIL-13R em associação com a droga 7A. A droga 7A foi administrada por via intraperitoneal, três vezes por semana, com 10µM/ animal. Grupo controle foi vacinado com o plasmídeo vazio. Cada grupo continha 10 animais. P=0,02 para grupo controle x grupo vacinado com pIL-13R e p= 0,0005 para grupo controle x grupo vacinado com pIL-13R + droga 7A (Kaplan-Meyer).



Figura 27 – Curva de sobrevida mostrando o efeito terapêutico de ambos os plasmídeos contra melanoma murino subcutâneo. Animais C57Bl/6 foram injetados com 5 X 10⁴ células tumorais B16F10-Nex2 e tratados com pIL-12 um dia após o desafio. Tratamento com pIL-13R foi administrado nos dias 5, 10, 15, 20, 25 e 30. Em outro grupo, os animais foram vacinados com ambos os plasmídeos, seguindo o mesmo protocolo e com a droga 7A. Este último esquema de tratamento protegeu 30% dos animais, que foram avaliados posteriormente quanto à resposta imune. Grupo controle foi vacinado com ambos os plasmídeos vazios. Cada grupo controle foi animais. P=0,0005 para grupo controle x grupo vacinado com p-IL-12 + pIL-13R e p= 0,0001 para grupo controle x grupo vacinado com p-IL-12 + pIL-13R + droga 7A (Kaplan-Meyer).



Figura 28 – Curvas de sobrevida sobrepostas de alguns grupos experimentais, mostrando o efeito terapêutico de ambos os plasmídeos contra melanoma murino subcutâneo. Animais C57Bl/6 foram injetados com 5 X 10⁴ células tumorais B16F10-Nex2 e tratados com pIL-12 um dia após o desafio. Tratamento com pIL-13R foi administrado nos dias 5, 10, 15, 20, 25 e 30. Em outro grupo, os animais foram vacinados com ambos plasmídeos, seguindo o mesmo protocolo e com a droga 7A. Animais tratados somente com a droga também foram avaliados e estão aqui demonstrados (círculo vazio). Os grupos controles foram aqueles que receberam apenas PBS ou que foram tratados com ambos os plasmídeos vazios.

5.7.3. Citometria de fluxo (FACS) ex vivo

A resposta imune dos animais foi analisada através da imunofenotipagem dos esplenócitos. A expressão dos marcadores de superfície e citocinas intracelulares foi realizada nos esplenócitos obtidos de animais tratados com o nosso melhor protocolo terapêutico e comparativamente nas células obtidas de animais tratados apenas com PBS. Cada animal foi avaliado individualmente e as análises foram feitas de 15 a 70 dias após a última terapia gênica. Os três animais que permaneceram livres de tumor ao final do tratamento também foram avaliados e o perfil imune foi semelhante ao perfil dos animais tratados, porém desenvolvendo tumor. As citometrias referentes à apenas 1 animal de cada grupo (tratado e controle) estão ilustradas nas figuras 29 e 30 e esses resultados foram plotados em gráficos sumarizados nas figuras 31 a 33. As figuras mostram a porcentagem de células T (CD4⁺ e CD8⁺) e células F4/80⁺ produtoras de citocinas. Os dados são representativos de pelo menos três experimentos independentes com resultados similares. Camundongos não tratados apresentaram um desbalanço no perfil de citocinas, onde a porcentagem de células produtoras de IFN-γ, IL-6, IL-2 e IL-12 foi menor do que de células produtoras de IL-10, IL-13, TGF-β, TNF- α e IL-4. Nestes animais, porcentagem de células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN- γ foi de 2,54%, enquanto este número aumenta para 17,63% quando nós avaliamos a porcentagem de células produtoras de IL-10, sugerindo uma condição imunossupressora (Figura 29). Outras citocinas também foram produzidas por um número significante de células, como TNF-a (12,47%), IL-4 (8,98%), TGF-β (8,62%) e IL-13 (7,88%). Os animais tratados apresentaram um perfil mais homogêneo na produção de citocinas, evidenciando um equilíbrio na produção de todas as citocinas. Camundongos desafiados com as células tumorais e vacinados com nosso melhor protocolo (ambos plasmídeos + droga 7A) mostraram um aumento na freqüência de células produtoras de citocinas pro-inflamatórias IFN-γ, IL-6, IL-2, TNF-α e IL-12 (Tabela 1). Nesta tabela, estão reunidos os dados de um total de 7 animais avaliados, sendo 3 animais tratados e 4 animais sem tratamento (controle). Foi observado um aumento relativo de 15 vezes na porcentagem de células produzindo IFN- γ após o tratamento com a bioquimioterapia. Um aumento mais acentuado foi observado na porcentagem de células produtoras de IFN- γ , IL-6, IL-12 e TNF- α . Comparativamente, a porcentagem de células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN-γ foi de 40,96% enquanto este número é de 33,68% para as células produtoras de IL-10 (Figura 30). Outras citocinas também foram produzidas por grande número de células, como TNF- α (42,19%), IL-6 (41,05%) e IL-2 (39,59%). Conforme era esperado, o tratamento também aumentou a porcentagem de células F4/80⁺ produtoras de IL-12 (25,14%), aproximadamente 8 vezes mais do que nos esplenócitos obtidos de camundongos não tratados (3.03%). Células F4/80⁺ também produziram mais IL-6 após a terapia, aproximadamente 7 vezes mais. A percentagem de células CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IL-4, TGF-B e IL-13 foi respectivamente, 12,11%, 29,58% e 31,92%. Assim, esta terapia combinada aumentou o número de células produtoras tanto de citocinas pro-inflamatórias quanto anti-inflamatórias. Nossa hipótese é que a inflamação induzida pelas vacinas de DNA está sendo controlada devido à presença de citocinas imunoregulatórias, em um mecanismo de feedback negativo importante para o controle da resposta imune e proteção tumoral. Muito provavelmente, o fator mais importante para o efeito protetor observado foi a produção de IFN-y. A razão IFN-y/IL-10 foi sempre maior nas células de camundongos vacinados do que nas células de camundongos não tratados.

Além disso, nós também avaliamos por citometria de fluxo a produção de citocinas por células NKT imunoreguladoras. Esplenócitos obtidos de animais vacinados com nosso protocolo completo de bioquimioterapia e de animais tratados apenas com PBS foram utilizados para obtenção de células NKT. Células T NK1.1⁺ (CD3⁺NK1.1⁺, CD4⁺NK1.1⁺ e $CD8^+NK1.1^+$) foram avaliadas quanto a sua habilidade de produzir IFN- γ , IL-10 e IL-13. Células T NK1.1⁺ incluem células NKT clássicas (células tipo I), células NKT não-clássicas (células tipo II) e células NKT-like. Os resultados estão sumarizados na Figura 34. Os dados mostram a porcentagem de células positivas para cada citocina dentro de uma determinada subpopulação, sendo que as células foram simultaneamente marcadas com três conjugados fluorescentes diferentes. Células CD3⁺NK1.1⁺ incluem as células DN (double negative, CD4⁻ CD8 NK1.1⁺). As células NKT podem ser efetivas no controle do crescimento tumoral, dependendo do microambiente e de estímulos apropriados. Nossa terapia combinada levou a produção de IFN-y e "down regulation" da produção de IL-10 e IL-13 por estas células. Células NKT obtidas de animais vacinados foram capazes de produzir muito mais IFN-y do que aquelas obtidas de camundongos desenvolvendo tumor, não tratados (Figura 34). Nestas células, nós pudemos observar claramente uma polarização da resposta imune. É possível que células NKT tipo I estão predominantes em camundongos que receberam o tratamento e são as responsáveis pela produção de IFN- γ , enquanto nos camundongos não tratados, as células NKT tipo II estão em maior número e são as responsáveis pela produção de IL-13 e IL-10. Entre as subpopulações avaliadas, células CD4⁺NK1.1⁺ foram a principal fonte de IL-13 nos animais desenvolvendo tumor e após a terapia esta produção foi abolida (Fig.34 B). Interessantemente, células CD4⁺NK1.1⁺ também produziram muito mais IFN- γ do que as outras subpopulações avaliadas obtidas de animais desenvolvendo tumor e vacinados com nosso melhor protocolo terapêutico.

Tabela	1 –	Aumento	das	células	expressando	citocinas	após a	a bioquimiot	erapia,	definindo
	um	a resposta	pro-	inflama	tória com ba	ixa produç	ão de i	nterleucinas	tipo-2.	

Expressão de citocinas	Aumento (n vezes) da população por 100 células (intervalos de confiança 95%) ^a
1. Células T CD4 ⁺ + CD8 ⁺	
IFN-y ^b	16,67 (2,938-30,408)
IL-2	3,0 (1,468-4,576)
IL-6 ^b	18,85 (2,418-27,297)
TNF-a	2,49 (1,485-3,498)
IL-4 ^c	1,21 (0,938-1,473)
IL-13	3,0 (1,866-4,265)
TGF-β	3,56 (1,086-6,049)
IL-10 ^b	1,64 (1,007-2,276)
2. Células F4/80 ⁺	
IL-12	5,35 (2,898-7,795)
IL-6	6,29 (3,092-9,502)
TNF-α	2,96 (1,764-4,172)

^a Relações entre a produção de citocinas de células de 11 pares de animais, tratados e controle (sem tratamento).

^b Diferenças significativas entre IFN-γ e IL-4, e IL-10 (p<0.001) ou IL-6 e IL-4,

e IL-10 (p<0.001 and p<0.01, respectivamente)

^c somente células T CD4⁺



Figura 29 – Imunofenotipagem dos esplenócitos por citometria de fluxo (FACS). As células foram obtidas de animais desenvolvendo tumor tratados apenas com PBS. As células foram marcadas com anticorpo monoclonal (mAb) anti-CD4 conjugado com PE ou mAb anti-CD8 conjugado com PE ou ainda com mAb anti-F4/80 conjugado com FITC. Após permeabilização das células, detecção intracelular das citocinas foi realizada com anticorpos biotinilados anti-citocina e revelada com estreptavidina-FITC ou estreptavidina-PE, de acordo com as marcações de superfície. O painel mostra a porcentagem de células duplo-positivas e é representativo de três experimentos independentes com resultados similares.



Figura 30 – Imunofenotipagem dos esplenócitos por citometria de fluxo (FACS). As células foram obtidas de animais desenvolvendo tumor vacinados com ambos os plasmídeos em associação com a droga 7A, de acordo com o protocolo de tratamento. As células foram marcadas com anticorpo monoclonal (mAb) anti-CD4 conjugado com PE ou mAb anti-CD8 conjugado com PE ou mAb anti-F4/80 conjugado com FITC. Após permeabilização das células, detecção intracelular das citocinas foi realizada com anticorpos biotinilados anti-citocina e revelada com estreptavidina-FITC ou estreptavidina-PE, de acordo com as marcações de superfície. O painel mostra a porcentagem de células duplo-positivas e é representativo de três experimentos independentes com resultados similares.



Figura 31 – Citometria de fluxo com dupla marcação para linfócitos TCD4⁺ e citocinas intracelulares. As células foram obtidas de baço e processadas diretamente para a análise por FACS.



Figura 32 – Citometria de fluxo com dupla marcação para linfócitos TCD8⁺ e citocinas intracelulares. As células foram obtidas de baço e processadas diretamente para a análise por FACS.



Figura 33 – Citometria de fluxo com dupla marcação para células F4/80+ e citocinas intracelulares. As células foram obtidas de baço e processadas diretamente para a análise por FACS.



Figura 34 – Imunofenotipagem das células T NK1.1⁺ por citometria de fluxo (FACS). Os esplenócitos foram obtidos de animais desenvolvendo tumor vacinados com ambos os plasmídeos em associação com a droga 7A (barras pretas) ou tratados apenas com PBS (barras brancas). As células foram simultaneamente marcadas com anticorpo monoclonal (mAb) anti-NK1.1 conjugado com FITC e mAb anti-CD3 conjugado com PE (A) ou mAb anti-CD4 conjugado com PE (B) ou mAb anti-CD8 conjugado com PE (C). Após permeabilização das células, a detecção intracelular das citocinas foi realizada com anticorpos biotinilados anticitocina e revelada com estreptavidina-APC. Os dados são representativos de três experimentos independentes com resultados similares e mostram a porcentagem de células positivas para cada citocina dentro das subpopulações avaliadas.

Discussão

IV – DISCUSSÃO

No presente trabalho, demonstramos o efeito anti-tumoral *in vivo* da bioquimioterapia no modelo de melanoma murino B16F10-Nex2. Terapia gênica com IL-12 e IL-13R α 2-Fc associada ao tratamento com o composto ciclopaladado 7A prolongou significativamente a sobrevida dos animais desafiados com melanoma B16F10-Nex2, sendo que 30% deles permaneceram livres de tumor.

Atualmente, diversos protocolos clínicos imunoterápicos utilizam agentes adjuvantes para o controle do crescimento tumoral, e dentre eles, ativadores imunológicos associados ou não à quimioterapia melhoram a resposta anti-tumoral. A administração de citocinas próinflamatórias (ou outros ativadores imunes), embora benéficas em vários protocolos, não parece ser suficiente para completa regressão tumoral. Na procura de mecanismos de escape da célula tumoral e de fatores regulatórios da resposta imune, alguns elementos supressores identificados podem ser responsáveis por uma resposta imune ineficaz com baixa atividade CTL in vivo. A produção desses elementos supressores é um dos mecanismos de escape tumoral, dentre os diversos existentes. Assim, a administração de citocinas pro-inflamatórias e o bloqueio de componentes regulatórios ou imunosupressores pode ser essencial para o controle do crescimento tumoral e para a eficácia de vacinas anti-tumorais (Finn, 2003). No presente trabalho, ambas as estratégias foram empregadas através de terapia gênica com plasmídeos expressando IL-12 e IL-13R α 2-Fc associados à quimioterapia. Esse protocolo foi capaz de induzir uma resposta imune eficiente com aumento das populações celulares produtoras de IFN- γ , sendo superior a outros utilizando os componentes vacinais isoladamente.

A interleucina IL-12 promove mecanismos efetores tanto da resposta imune inata quanto adaptativa para mediar a resistência anti-tumoral (Trinchieri *et al.*, 2003a). IL-12 induz a

produção de IFN- γ , além de uma cascata de outras citocinas pro-inflamatórias secundárias que por sua vez têm um efeito citotóxico direto nas células tumorais. Alem disso, IL-12 pode ativar potentes mecanismos anti-angiogênicos, através do estimulo da produção de quimiocinas (Colombo *et al.*, 2002, Trinchieri, 2003). Os mecanismos responsáveis pela rejeição tumoral mediada pela IL-12 têm sido investigados em vários modelos experimentais com uma variedade de vias efetoras podendo estar envolvidas na proteção contra tumores (Cui *et al.*, 1997; Cavallo *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2003; Smyth *et al.*, 2000b). Em nosso trabalho, uma única dose do plasmídeo contendo o gene da IL-12, administrado subcutâneamente na base da cauda, foi suficiente para prolongar significativamente a sobrevida de animais desenvolvendo tumores em comparação com animais controle tratados apenas com o plasmídeo vazio (sem inserto de citocina). Outros trabalhos utilizando vacinas gênicas carregando o gene da IL-12, associados ou não a outras terapias, mostraram resultados positivos contra câncer de colo CT26 e melanoma B16 murinos (Rahkmilevich *et al.*, 1996; Lucas *et al.*, 2002; Goto *et al.*, 2004; Nagai *et al.*, 2004; Okada *et al.*, 2004).

Além das clássicas células NK e linfócitos T, células NKT têm na última década sido implicadas no mecanismo de rejeição tumoral mediado por IL-12 (Takeda *et al.*, 1996, Cui *et al.*, 1997). Células NKT foram aparentemente essenciais para a rejeição tumoral, sendo o alvo primário após administração *in vivo* de IL-12, em pelo menos três modelos tumorais: melanoma B16, carcinoma de pulmão LLC e eritroleucemia FBL3 (Cui *et al.*, 1997). Entretanto, Park *et al.* (2003) revelaram outros mecanismos responsáveis pela rejeição do tumor após tratamento com IL-12, no qual células NK foram responsáveis pela inibição da formação de metástases no figado e possivelmente células dendríticas linfóides foram responsáveis pela proteção no modelo subcutâneo. Ainda nesse trabalho, doses terapêuticas de

IL-12 foram efetivas tanto em camundongos normais como em camundongos deficientes para células NKT (CD1d-knockout) em um protocolo utilizando o mesmo tipo de tumor e o mesmo regime de tratamento daquele descrito por Cui et al. (1997). Embora estes resultados não confirmem a exclusividade das células NKT na proteção induzida por IL-12 no modelo de melanoma B16, os autores concluem que a citocina pode estimular diversos mecanismos envolvidos na resistência a tumores, dependendo do tipo de tumor, microambiente tumoral e cepas de camundongos utilizadas no estudo. Em contrapartida, muitos estudos já demonstraram claramente a importância e o papel crítico das células NKT na resposta imune anti-tumoral, onde estas células promovem potente rejeição do tumor em resposta a fatores exógenos, tais como IL-12 (Smyth et al., 2000b) e α-GalCer (Toura et al., 1999, Kitamura et al., 1999, Smyth et al., 2002) e também na ausência de qualquer estímulo exógeno (Smyth et al., 2000c, Crowe et al., 2002). Smyth et al. (2000b) demonstraram que nos modelos tumorais de melanoma B16F10 e carcinoma de próstata RM-1, em tratamentos com baixas doses ou administração tardia de IL-12, as células NKT possuem um importante papel na proteção destes tumores. Vale ressaltar que este tratamento com baixas doses de IL-12 não foi efetivo em animais deficientes em células NKT (TCR J α 18–/–), demonstrando a importância das células NKT nestes protocolos terapêuticos. Por outro lado, em tratamentos com altas doses, a IL-12 induziu imunidade tumoral mediada preferencialmente por células NK em um mecanismo dependente de perforina. Os autores concluem que ambas as células, NK e NKT, podem contribuir para imunidade anti-tumoral natural ou induzida por IL-12 e que o papel relativo de cada população celular é tumor e terapia dependentes.

Nem todas as células T NK1.1⁺ são células NKT clássicas (Godfrey *et al.*, 2004). Células T NK1.1⁺ incluem células NKT tipo I e tipo II (CD1d dependentes) e outras células CD1d-

independentes (chamadas células NKT-like). Camundongos knockout (KO) para CD1 perdem tanto células NKT tipo I quanto tipo II, enquanto camundongos deficientes para a cadeia Ja18 do complexo TCR perdem apenas células NKT tipo I, e esta é uma das explicações para alguns resultados contraditórios observados na literatura. Assim, a deleção completa e específica de células NKT clássicas é obtida somente em camundongos homozigotos para a mutação em CD1d. Estudos adicionais com camundongos TCRJa18-deficientes e CD1d-deficientes são necessários para o melhor entendimento sobre quais subpopulações são responsáveis pela rejeição ou progressão de determinado tumor. Possivelmente, camundongos CD1d KO podem ser resistentes em um modelo tumoral e camundongos Ja18 KO podem ser sensíveis ao mesmo tipo de tumor. Em um modelo de metástase pulmonar de carcinoma de colon CT26, animais CD1 KO, animais depletados de células T CD4⁺ ou animais tratados com inibidor de IL-13 (proteína IL-13R α 2-Fc solúvel) apresentaram menor número de nódulos pulmonares em comparação aos animais controle (Park et al., 2005). Depleção de células T CD8⁺ em animais CD1 KO aumentou o número de nódulos pulmonares, sugerindo que a proteção tumoral foi mediada por linfócitos T CD8⁺ e deve ser suprimida por células NKT CD4⁺. O primeiro estudo comparando os dois tipos de camundongos deficientes em células NKT, ou seja, Cd1d KO e Ja18 KO, mostrou que animais CD1d KO foram resistentes ao crescimento tumoral enquanto animais Ja18 KO comportaram-se como os animais controle. Os autores concluíram que células NKT tipo II presentes nos animais Ja18 KO foram suficientes para supressão da imunovigilância tumoral (Terabe et al., 2005). Recentemente, supressão da imunovigilância tumoral em animais J α 18 KO foi abolida após o tratamento com anticorpo anti-CD4, confirmando prévias observações de que células NKT tipo II CD4⁺ são células supressoras (Ambrosino et al., 2007). Neste trabalho, estimulação direta das células tipo II com um sulfatideo aumentou significativamente o crescimento tumoral no modelo de metástase pulmonar de carcinoma CT26 tanto em animais selvagens quanto em animais J α 18 KO. Por outro lado, estimulação com OCH, um análogo de α -GalCer que estimula especificamente células NKT tipo I, induziu forte resposta anti-tumoral, mesmo sendo esta resposta relativamente direcionada para um perfil Th2. Quando ambas subpopulações foram estimuladas simultaneamente, células NKT tipo II parecem suprimir a ativação *in vitro* bem como o efeito protetor *in vivo* das células NKT tipo I. Além disso, quando células tipo I estão ausentes, o efeito supressor das células tipo II aumenta, sugerindo que as células tipo I podem controlar pelo menos parcialmente os efeitos supressores da subpopulação de células NKT tipo II, em um novo eixo imunoregulatório recentemente proposto (Ambrosino *et al.*, 2007, Terabe & Berzofsky *et al.*, 2007).

Nossa estratégia no presente trabalho foi estimular a produção de IFN- γ pelas células NKT tipo I bem como por outros tipos de células através da administração de IL-12, e ao mesmo tempo suprimir a função imunoregulatória das células NKT tipo II. Como já foi mencionado, é bem documentado que células NKT tipo II (restritas a CD1 mas não a V α J18) são responsáveis pela inibição da imunovigilância tumoral e esse mecanismo foi dependente de IL-13 (Terabe *et al.*, 2005). IL-13 produzida por células T CD4⁺ inibe a imunovigilância tumoral mediada por linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (Terabe *et al.*, 2000). Este mecanismo supressor foi melhor esclarecido após estudos onde foi demonstrado que a IL-13 induziu a produção de TGF- β por células mielóides CD11b+Gr-1+, que são responsáveis pela supressão da atividade CTL (Terabe *et al.*, 2003). Outro mecanismo proposto para imunossupressão mediada por IL-13 é que esta citocina polariza macrófagos para o fenótipo M2, inibindo a geração de macrófagos tumoricidas M1. Assim, a rejeição tumoral neste modelo requer a indução de macrófagos M1 e linfócitos conjuntamente com a redução de células supressoras mielóides induzidas pelo tumor (Sinha *et. al.*, 2005). No presente trabalho, construímos uma quimera contendo o gene da cadeia α 2 do receptor de IL-13 unido a uma porção Fc de IgG2a murina utilizando técnicas moleculares e obtivemos uma vacina de DNA expressando IL-13R α 2-Fc. A expressão de IL-13R α 2 é regulada por seu próprio ligante, IL-13. Macrófagos estimulados com IL-13 apresentaram um aumento na expressão da cadeia IL-13R α 2 enquanto macrófagos sem estímulo não expressam esta cadeia, pelo menos em nossas condições experimentais (dados não mostrados). Zheng *et al.* (2003) demonstraram um aumento na expressão de IL-13R α 2 quando macrófagos da linhagem RAW ou células epiteliais humanas (NHBEs) eram estimuladas *in vitro* com IL-4, IL-13 ou mesmo com IFN- γ .

Estudos recentes mostraram que a terapia com a proteína solúvel IL-13R α 2-Fc efetivamente estimula a resposta anti-tumoral, aumenta a eficácia de vacinas e previne algumas doenças crônicas (Ahlers *et al.*, 2002, Chiaramonte *et al.*, 1999; Terabe *et al.*, 2000). Em nosso trabalho, o tratamento com IL-13R α 2-Fc igualmente estimulou uma resposta anti-tumoral *in vivo*. Terapia gênica utilizando a quimera aumentou significativamente a sobrevida dos animais desafiados com melanoma B16F10-Nex2 no modelo subcutâneo. A hipótese é a de que IL-13R α 2 atua como um inibidor dominante negativo, suprimindo a ação da interleucina 13 no microambiente tumoral e assim ajudando na manutenção da imunovigilância em tumores (Terabe *et al.*, 2000). Entretanto, o papel da IL-13 na imunidade tumoral também é contraditório. Tumores humanos superexpressando a cadeia IL-13R α 2 na superfície perdem sua tumorigenicidade em camundongos imunodeficientes (Kawakami *et al.*, 2001b). Ma *et. al.* (2004) observaram que nem células tumorais B16F1 expressando IL-13R α 2Fc nem o tratamento *in vivo* com a proteína solúvel IL-13R α 2Fc tiveram um efeito estatisticamente

significante no crescimento tumoral de células B16F1. Esses autores observaram proteção tumoral quando as células tumorais foram transfectadas para expressar IL-13, em oposição ao que foi observado em nosso trabalho.

Em nosso modelo, tratamento de animais C57Bl/6 com o plasmídeo expressando a quimera IL-13Rα2-Fc ou plasmídeo contendo o gene da IL-12 prolongaram significativamente a sobrevida em ambos os protocolos individuais e quando associamos as duas terapias gênicas com tratamento quimioterápico uma proteção ainda maior foi observada, acompanhada pelo aumento de células produzindo IFN-y. Esta terapia combinada levou a um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, sugerindo a indução de uma resposta Th-1 in vivo. A porcentagem de células produzindo citocinas anti-inflamatórias também aumentou após o tratamento, possivelmente indicando um necessário balanço na resposta imune responsável pela proteção tumoral. Entretanto, a análise das células T NK1.1⁺ mostrou uma inversão nas respostas Th-1/Th-2 quando comparamos animais tratados e não tratados, provavelmente porque essas células são consideradas imunoregulatórias (Terabe & Bersozfsky, 2007) e são capazes de produzir tanto citocinas Th1 quanto Th2, dependendo do estímulo. Alguns estudos já demonstraram que as células NKT podem produzir IFN-γ, IL-4, IL-10 e IL-13 (Akbari et al., 2003, Lee et al., 2002, Zlotnik et al., 1992). Em nosso trabalho, células T CD4⁺NK1.1⁺ provenientes de animais vacinados produziram três vezes mais IFN-γ do que células provenientes de animais não vacinados, provavelmente através de um mecanismo mediado pela administração de IL-12, confirmando estudos prévios (Cui et al., 1997). Além disso, células T CD4⁺NK1.1⁺ provenientes de animais desenvolvendo tumor não vacinados e sem qualquer estímulo exógeno produziram predominantemente IL-13 mas não produziram níveis detectáveis de IFN-γ, sendo que esta produção de IL-13 foi abolida após a terapia combinada. Terabe et al. (2000) mostraram uma produção de IL-13 e IL-4 por células T CD4⁺NK1.1⁺ provenientes de animais selvagens após estímulo com anti-CD3 e anti-CD28 e este mecanismo era potencializado em animais desenvolvendo tumor, ou seja, células T CD4⁺ provenientes de animais desenvolvendo tumor e estimuladas in vitro com fibroblastos transfectados para expressar CD1 produziram mais IL-13 e IL-4 do que células provenientes de animais sem tumor, submetidas ao mesmo estímulo. Porém quando estas células eram provenientes de animais com tumor, porém deficientes para CD1, a produção de IL-13 e IL-4 foi desprezível. Embora não avaliemos somente as células NKT clássicas e estas subpopulações estão em baixa porcentagem no baço, a importância deste trabalho foi a mudança no perfil de citocinas quando avaliamos células T NK1.1⁺. Essas sub-populações de células NKT produziram mais IL-10 e IL-13 em camundongos com tumor, não vacinados, do que aquelas provenientes de animais vacinados. Após terapia gênica com IL-12 e IL-13R α 2-Fc associada com a droga 7A, essas sub-populações passaram a produzir mais IFN- γ do que IL-10 e IL-13. Recentemente, foi descrita a existência de sub-populações de células NKT funcionalmente distintas (Crowe et al., 2005). Os autores demonstraram que células NKT tipo I que apresentaram atividade anti-tumoral mediada por α -GalCer estavam presentes apenas na sub-população T CD4⁻CD8⁻ (duplo negativa) derivada do figado, mas não na sub-população T CD4⁺. Além disso, células NKT derivadas do timo e do baço não eram protetoras. Desta maneira, alguns resultados indicam que células NKT CD4⁺ podem ser exclusivamente produtoras de IL-4 e IL-13 após estimulação primária, enquanto células NKT DN (duplo negativas) possuem um perfil Th1 (Lee *et al.*, 2002). Em contraste, células NKT CD4⁺ restritas a CD1d potencialmente produzem tanto citocinas do perfil Th1 quanto Th2 enquanto a subpopulação NKT CD4⁻ seletivamente produz IFN- γ e TNF- α (Gumperz *et al.*, 2002). Nossos resultados estão em maior concordância com esse último estudo. Maiores estudos são necessários para elucidar esta questão e esclarecer se células NKT tipo I são predominantemente DN (CD4⁻CD8⁻) e células NKT tipo II são predominantemente CD4⁺, como já foi sugerido pelo menos para as células tipo II em um modelo tumoral onde linfócitos Treg CD4⁺CD25⁺ não são importantes para imunossupressão tumoral (Ambrosino *et al.*, 2007).

Em conclusão, observamos um retardo na evolução tumoral que resultou em um aumento significativo na sobrevida dos animais após terapia gênica com uma única dose de pIL-12 seguida de cinco tratamentos com pIL-13R e contínuos tratamentos com a droga 7A, sendo que 30% dos animais foram completamente protegidos ao final do experimento. Para entender os mecanismos envolvidos na resposta anti-tumoral, avaliamos subpopulações de linfócitos T produzindo citocinas em animais desenvolvendo tumor e que foram vacinados com o protocolo completo. Indução in vivo de citocinas pro-inflamatórias foi detectada em camundongos tratados com terapia gênica e quimioterapia, demonstrando que esse esquema de tratamento foi suficiente para estimular uma forte resposta imune mediada por IFN- γ . Nossa hipótese é que o aumento na porcentagem de células produzindo IFN-y foi mediado pela administração de IL-12 e a regulação da produção de IL-13, TGF-β e indiretamente IL-10, foi mediada pelo menos em parte pela administração da vacina IL-13Rα2-Fc enquanto a droga 7A mata diretamente as células tumorais B16F10-Nex2. Além disso, os resultados presentes podem ser explicados baseando-se na nova via imunoegulatória envolvendo células NKT, onde células tipo I e tipo II podem modular cruzadamente suas funções após administração de apropriados estímulos e inibidores. O presente trabalho reforça ainda a possibilidade de utilização de bioquimioterapia constituída de terapia gênica e um quimioterápico no tratamento de uma neoplasia invasiva.

Conclusões

VII – CONCLUSÕES

 \sqrt{O} tratamento com plasmídeo contendo o gene da interleucina 12 ou com plasmídeo contendo a quimera IL-13R α 2-Fc protegeu parcialmente os animais, prolongando a sobrevida no modelo de melanoma murino B16F10-Nex2.

 \sqrt{O} tratamento com ambos plasmídeos em associação com a droga 7A (bioquimioterapia) foi o melhor protocolo terapêutico, protegendo completamente 30% dos animais.

 \sqrt{O} tratamento aumentou a porcentagem de células produtoras de interleucinas próinflamatórias, linfócitos T e células monocíticas, bem como em menor proporção as antiinflamatórias em um mecanismo de feeback para controle da resposta imune.

 \sqrt{A} relação IFN- γ /IL-10 foi sempre maior que 1 nos animais tratados enquanto nos animais desenvolvendo tumor e que não receberam nenhum tratamento o inverso ocorreu, ou seja, a relação IFN- γ /IL-10 foi menor que 1.

 \sqrt{O} tratamento aumentou a proporção de linfócitos T NK1.1⁺ produzindo IFN- γ ao mesmo tempo que diminuiu a de células NKT tipo II produzindo IL-10 e IL-13.

 \sqrt{O} trabalho traz uma evidência experimental de que a terapia gênica associada a quimioterapia pode se constituir em protocolo de sucesso no tratamento do câncer.

Referências Bibliográficas

VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K. & LICHTMAN, A.H., Cellular and Molecular Immunology. W.B. Saunders Company, fifth edition, 2003.
- AHLERS, J.D., BELYAKOV, I.M., TERABE, M., KOKA, R., DONALDSON, D.D., THOMAS, E.K., and BERZOFSKY, J.A., A push-pull approach to maximize vaccine efficacy: abrogating suppression with an IL-13 inhibitor while augmenting help with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and CD40L. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **99**, 13020-13025, (2002).
- AKBARI, O., STOCK, P., MEYER, E., KRONENBERG, M., SIDOBRE, S., NAKAYAMA, T., TANIGUCHI, M., GRUSBY, M.J., DEKRUYFF, R.H., and UMETSU, D.T., Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat.Med.*, 9, 582-588, (2003).
- AMAN, M.J., TAYEBI, N., OBIRI, N.I., PURI, R.K., MODI, W.S., and LEONARD, W.J., cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain. *J.Biol.Chem.*, **271**, 29265-29270, (1996).
- AMBROSINO, E., TERABE, M., HALDER, R.C., PENG, J., TAKAKU, S., MIYAKE, S., YAMAMURA, T., KUMAR, V., and BERZOFSKY, J.A., Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *J.Immunol.*, **179**, 5126-5136, (2007).
- ARCA, M.J., KRAUSS, J.C., STROME, S.E., CAMERON, M.J., and CHANG, A.E., Diverse manifestations of tumorigenicity and immunogenicity displayed by the poorly immunogenic B16-BL6 melanoma transduced with cytokine genes. *Cancer Immunol.Immunother.*, **42**, 237-245, (1996).
- ARCA, M.J., KRAUSS, J.C., ARUGA, A., CAMERON, M.J., SHU, S., and CHANG, A.E., Therapeutic efficacy of T cells derived from lymph nodes draining a poorly immunogenic tumor transduced to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Cancer Gene Ther.*, **3**, 39-47, (1996).
- BAJETTA, E., DEL VECCHIO, M., BERNARD-MARTY, C., VITALI, M., BUZZONI, R., RIXE, O., NOVA, P., AGLIONE, S., TAILLIBERT, S., and KHAYAT, D., Metastatic melanoma: Chemotherapy. *Seminars in Oncology*, 29, 427-445, (2002).

- BALCH, C.M., SOONG, S.J., ATKINS, M.B., BUZAID, A.C., CASCINELLI, N., COIT, D.G., FLEMING, I.D.,
 GERSHENWALD, J.E., HOUGHTON, A., JR., KIRKWOOD, J.M., MCMASTERS, K.M., MIHM, M.F.,
 MORTON, D.L., REINTGEN, D.S., ROSS, M.I., SOBER, A., THOMPSON, J.A., and THOMPSON, J.F.,
 An evidence-based staging system for cutaneous melanoma. *CA Cancer J.Clin.*, 54, 131-149, (2004).
- BARBUTO, J.A., ENSINA, L.F., NEVES, A.R., BERGAMI-SANTOS, P., LEITE, K.R., MARQUES, R., COSTA, F., MARTINS, S.C., CAMARA-LOPES, L.H., and BUZAID, A.C., Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunol.Immunother.*, 53, 1111-1118, (2004).
- BARNER, M., MOHRS, M., BROMBACHER, F., and KOPF, M., Differences between IL-4R alpha-deficient and IL-4-deficient mice reveal a role for IL-13 in the regulation of Th2 responses. *Curr.Biol.*, **8**, 669-672, (1998).
- BLAYA, C., CRESPO, J., CRESPO, A., and ALINO, S.F., Anti-interleukin 4 antibody and indomethacin synergistic effect on B16 melanoma tumor progression. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **279**, 472-477, (1996).
- BOCHNER, B.S., KLUNK, D.A., STERBINSKY, S.A., COFFMAN, R.L., and SCHLEIMER, R.P., IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *J.Immunol.*, **154**, 799-803, (1995).
- BRIOLLAIS, L., CHOMPRET, A., GUILLOUD-BATAILLE, M., FEINGOLD, N., AVRIL, M.F., and DEMENAIS, F., Genetic and epidemiological risk factors for a malignant melanoma-predisposing phenotype: the great number of nevi. *Genet.Epidemiol.*, **13**, 385-402, (1996).
- BRUNDA, M.J., LUISTRO, L., WARRIER, R.R., WRIGHT, R.B., HUBBARD, B.R., MURPHY, M., WOLF, S.F., and GATELY, M.K., Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J.Exp.Med.*, **178**, 1223-1230, (1993).
- BUZAID, A.C., Management of metastatic cutaneous melanoma. *Oncology (Williston.Park)*, **18**, 1443-1450, (2004).

- CALLARD, R.E., MATTHEWS, D.J., and HIBBERT, L., IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same? *Immunol.Today*, **17**, 108-110, (1996).
- CAPUT, D., LAURENT, P., KAGHAD, M., LELIAS, J.M., LEFORT, S., VITA, N., and FERRARA, P., Cloning and characterization of a specific interleukin (IL)-13 binding protein structurally related to the IL-5 receptor alpha chain. *J.Biol.Chem.*, **271**, 16921-16926, (1996).
- CAVALLO, F., DI CARLO, E., BUTERA, M., VERRUA, R., COLOMBO, M.P., MUSIANI, P., and FORNI, G., Immune events associated with the cure of established tumors and spontaneous metastases by local and systemic interleukin 12. *Cancer Research*, **59**, 414-421, (1999).
- CHANG, E. and ROSENBERG, S.A., Patients with melanoma metastases at cutaneous and subcutaneous sites are highly susceptible to interleukin-2-based therapy. *J.Immunother.*(1997.), **24**, 88-90, (2001).
- CHAUDRU, V., CHOMPRET, A., BRESSAC-DE PAILLERETS, B., SPATZ, A., AVRIL, M.F., and DEMENAIS, F., Influence of genes, nevi, and sun sensitivity on melanoma risk in a family sample unselected by family history and in melanoma-prone families. *J.Natl.Cancer Inst.*, **96**, 785-795, (2004).
- CHENG, L., ZIEGELHOFFER, P.R., and YANG, N.S., In vivo promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **90**, 4455-4459, (1993).
- CHIARAMONTE, M.G., DONALDSON, D.D., CHEEVER, A.W., and WYNN, T.A., An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J.Clin.Invest*, **104**, 777-785, (1999).
- CHIARAMONTE, M.G., SCHOPF, L.R., NEBEN, T.Y., CHEEVER, A.W., DONALDSON, D.D., and WYNN, T.A., IL-13 is a key regulatory cytokine for Th2 cell-mediated pulmonary granuloma formation and IgE responses induced by Schistosoma mansoni eggs. *J.Immunol.*, **162**, 920-930, (1999).

- CLERICI, M., SHEARER, G.M., and CLERICI, E., Cytokine dysregulation in invasive cervical carcinoma and other human neoplasias: time to consider the TH1/TH2 paradigm. *J.Natl.Cancer Inst.*, **90**, 261-263, (1998).
- COLEY, W.B. The Treatment of Malignant-Tumors by Repeated Inoculations of Erysipelas: with a report of 10 original cases. *Am.J.Med.Sci.*, **105**, 487-511, (1893).
- COLOMBO, M.P. and TRINCHIERI, G., Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.*, **13**, 155-168, (2002).
- CROWE, N.Y., SMYTH, M.J., and GODFREY, D.I., A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *J.Exp.Med.*, **196**, 119-127, (2002).
- CROWE, N.Y., COQUET, J.M., BERZINS, S.P., KYPARISSOUDIS, K., KEATING, R., PELLICCI, D.G., HAYAKAWA, Y., GODFREY, D.I., and SMYTH, M.J., Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J.Exp.Med.*, **202**, 1279-1288, (2005).
- CUI, J., SHIN, T., KAWANO, T., SATO, H., KONDO, E., TOURA, I., KANEKO, Y., KOSEKI, H., KANNO, M., and TANIGUCHI, M., Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science*, 278, 1623-1626, (1997).
- DANSON, S. and LORIGAN, P., Improving outcomes in advanced malignant melanoma Update on systemic therapy. *Drugs*, **65**, 733-743, (2005).
- DAVIDSON, R.C., BLANKENSHIP, J.R., KRAUS, P.R., DE JESUS, B.M., HULL, C.M., D'SOUZA, C., WANG, P., and HEITMAN, J., A PCR-based strategy to generate integrative targeting alleles with large regions of homology. *Microbiology*, **148**, 2607-2615, (2002).
- DE FABO, E.C., NOONAN, F.P., FEARS, T., and MERLINO, G., Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma. *Cancer Res.*, **64**, 6372-6376, (2004).
- DONALDSON, D.D., WHITTERS, M.J., FITZ, L.J., NEBEN, T.Y., FINNERTY, H., HENDERSON, S.L., O'HARA, R.M., JR., BEIER, D.R., TURNER, K.J., WOOD, C.R., and COLLINS, M., The murine IL-13

receptor alpha 2: molecular cloning, characterization, and comparison with murine IL-13 receptor alpha 1. *J.Immunol.*, **161**, 2317-2324, (1998).

- DRANOFF, G., JAFFEE, E., LAZENBY, A., GOLUMBEK, P., LEVITSKY, H., BROSE, K., JACKSON, V., HAMADA, H., PARDOLL, D., and MULLIGAN, R.C., Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and longlasting anti-tumor immunity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **90**, 3539-3543, (1993).
- DUNN, G.P., BRUCE, A.T., IKEDA, H., OLD, L.J., and SCHREIBER, R.D., Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat.Immunol.*, **3**, 991-998, (2002).
- DUTCHER, J.P., GAYNOR, E.R., BOLDT, D.H., DOROSHOW, J.H., BAR, M.H., SZNOL, M., MIER, J., SPARANO, J., FISHER, R.I., WEISS, G., MARGOLIN, K., ARONSON, F.R., HAWKINS, M., and ATKINS, M., A Phase-Ii Study of High-Dose Continuous Infusion Interleukin-2 with Lymphokine-Activated Killer-Cells in Patients with Metastatic Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, **9**, 641-648, (1991).
- ELWOOD, J.M. and JOPSON, J., Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int.J.Cancer*, **73**, 198-203, (1997).
- FICHTNER-FEIGL, S., STROBER, W., KAWAKAMI, K., PURI, R.K., and KITANI, A., IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat.Med.*, 12, 99-106, (2006).
- FIDLER, I.J., Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res.*, 35, 218-224, (1975).

FINN, O.J., Cancer vaccines: between the idea and the reality. Nat.Rev.Immunol., 3, 630-641, (2003).

FLORES, J.F., WALKER, G.J., GLENDENING, J.M., HALUSKA, F.G., CASTRESANA, J.S., RUBIO, M.P., PASTORFIDE, G.C., BOYER, L.A., KAO, W.H., BULYK, M.L., BARNHILL, R.L., HAYWARD, N.K., HOUSMAN, D.E., and FOUNTAIN, J.W., Loss of the p16INK4a and p15INK4b genes, as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma. *Cancer Res.*, **56**, 5023-5032, (1996).

- FOSTER, P.S., MARTINEZ-MOCZYGEMBA, M., HUSTON, D.P., and CORRY, D.B., Interleukins-4, -5, and -13: emerging therapeutic targets in allergic disease. *Pharmacol.Ther.*, **94**, 253-264, (2002).
- GERARD, C.M., BRUYNS, C., DELVAUX, A., BAUDSON, N., DARGENT, J.L., GOLDMAN, M., and VELU, T., Loss of tumorigenicity and increased immunogenicity induced by interleukin-10 gene transfer in B16 melanoma cells. *Hum.Gene Ther.*, 7, 23-31, (1996).
- GESZTESI, J.L., PUCCIA, R., TRAVASSOS, L.R., VICENTINI, A.P., FRANCO, M.F., and LOPES, J.D. Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. *Hybridoma*, **15**, 415-422, (1996).
- GODFREY, D.I., MACDONALD, H.R., KRONENBERG, M., SMYTH, M.J., and VAN KAER, L., NKT cells: what's in a name? *Nat.Rev.Immunol.*, **4**, 231-237, (2004).
- GOLAB, J. and ZAGOZDZON, R., Antitumor effects of interleukin-12 in pre-clinical and early clinical studies (Review). *Int.J.Mol.Med.*, **3**, 537-544, (1999).
- GOLLOB, J.A., VEENSTRA, K.G., MIER, J.W., and ATKINS, M.B., Agranulocytosis and hemolytic anemia in patients with renal cell cancer treated with interleukin-12. *J.Immunother.*, **24**, 91-98, (2001).
- GOTO, T., NISHI, T., KOBAYASHI, O., TAMURA, T., DEV, S.B., TAKESHIMA, H., KOCHI, M., KURATSU, J., SAKATA, T., and USHIO, Y., Combination electro-gene therapy using herpes virus thymidine kinase and interleukin-12 expression plasmids is highly efficient against murine carcinomas in vivo. *Mol.Ther.*, **10**, 929-937, (2004).
- GRUNIG, G., WARNOCK, M., WAKIL, A.E., VENKAYYA, R., BROMBACHER, F., RENNICK, D.M., SHEPPARD, D., MOHRS, M., DONALDSON, D.D., LOCKSLEY, R.M., and CORRY, D.B., Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science*, 282, 2261-2263, (1998).

- GUMPERZ, J.E., MIYAKE, S., YAMAMURA, T., and BRENNER, M.B., Functionally distinct subsets of CD1drestricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J.Exp.Med.*, **195**, 625-636, (2002).
- HAHNE, M., RIMOLDI, D., SCHROTER, M., ROMERO, P., SCHREIER, M., FRENCH, L.E., SCHNEIDER,
 P., BORNAND, T., FONTANA, A., LIENARD, D., CEROTTINI, J., and TSCHOPP, J., Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science*, 274, 1363-1366, (1996).
- HERBERMAN, R.B., Cancer immunotherapy with natural killer cells. Semin. Oncol., 29, 27-30, (2002).
- HILTON, D.J., ZHANG, J.G., METCALF, D., ALEXANDER, W.S., NICOLA, N.A., and WILLSON, T.A., Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **93**, 497-501, (1996).
- HOUGHTON, A.N., GOLD, J.S., and BLACHERE, N.E., Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr.Opin.Immunol.*, **13**, 134-140, (2001).
- HOUGHTON, A.N. and POLSKY, D., Focus on melanoma. Cancer Cell, 2, 275-278, (2002).
- HUSAIN, Z., PATHAK, M.A., FLOTTE, T., and WICK, M.M., Role of ultraviolet radiation in the induction of melanocytic tumors in hairless mice following 7,12-dimethylbenz(a)anthracene application and ultraviolet irradiation. *Cancer Res.*, **51**, 4964-4970, (1991).
- IVRY, G.B., OGLE, C.A., and SHIM, E.K., Role of sun exposure in melanoma. *Dermatol.Surg.*, **32**, 481-492, (2006).
- KAGESHITA, T., HIRAI, S., ONO, T., HICKLIN, D.J., and FERRONE, S., Down-regulation of HLA class I antigen-processing molecules in malignant melanoma: association with disease progression. *Am.J.Pathol.*, 154, 745-754, (1999).
- KAMB, A., SHATTUCK-EIDENS, D., EELES, R., LIU, Q., GRUIS, N.A., DING, W., HUSSEY, C., TRAN, T., MIKI, Y., WEAVER-FELDHAUS, J., and ., Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat.Genet.*, 8, 23-26, (1994).
- KAWAKAMI, K., KAWAKAMI, M., SNOY, P.J., HUSAIN, S.R., and PURI, R.K., In vivo overexpression of IL-13 receptor alpha2 chain inhibits tumorigenicity of human breast and pancreatic tumors in immunodeficient mice. *J.Exp.Med.*, **194**, 1743-1754, (2001).
- KAWAKAMI, K., TAGUCHI, J., MURATA, T., and PURI, R.K., The interleukin-13 receptor alpha2 chain: an essential component for binding and internalization but not for interleukin-13-induced signal transduction through the STAT6 pathway. *Blood*, **97**, 2673-2679, (2001).
- KELLY-WELCH, A., HANSON, E.M., and KEEGAN, A.D., Interleukin-13 (IL-13) pathway. *Sci.STKE.*, 2005, cm8, (2005).
- KING, D.M., ALBERTINI, M.R., SCHALCH, H., HANK, J.A., GAN, J., SURFUS, J., MAHVI, D., SCHILLER, J.H., WARNER, T., KIM, K., EICKHOFF, J., KENDRA, K., REISFELD, R., GILLIES, S.D., and SONDEL, P., Phase I clinical trial of the immunocytokine EMD 273063 in melanoma patients. *J.Clin.Oncol.*, 22, 4463-4473, (2004).
- KITAMURA, H., IWAKABE, K., YAHATA, T., NISHIMURA, S., OHTA, A., OHMI, Y., SATO, M., TAKEDA, K., OKUMURA, K., VAN KAER, L., KAWANO, T., TANIGUCHI, M., and NISHIMURA, T., The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J.Exp.Med.*, **189**, 1121-1128, (1999).
- KUFE, D.W., POLLOCK, R.E., WEICHSELBAUM, R.R., *et al.* Cancer Medicine, B.C. Decker Inc., Sixth Edition, 2003.
- KUHN, R., RAJEWSKY, K., and MULLER, W., Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science*, **254**, 707-710, (1991).

- LAI, Y.H. and MOSMANN, T.R., Mouse IL-13 enhances antibody production in vivo and acts directly on B cells in vitro to increase survival and hence antibody production. *J.Immunol.*, **162**, 78-87, (1999).
- LANGRISH, C.L., MCKENZIE, B.S., WILSON, N.J., DE WAAL, M.R., KASTELEIN, R.A., and CUA, D.J., IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunol.Rev.*, **202**, 96-105, (2004).
- LEE, P.T., BENLAGHA, K., TEYTON, L., and BENDELAC, A., Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J.Exp.Med.*, **195**, 637-641, (2002).
- LESINSKI, G.B., BADGWELL, B., ZIMMERER, J., CRESPIN, T., HU, Y., ABOOD, G., and CARSON, W.E., III, IL-12 pretreatments enhance IFN-alpha-induced Janus kinase-STAT signaling and potentiate the antitumor effects of IFN-alpha in a murine model of malignant melanoma. *J.Immunol.*, **172**, 7368-7376, (2004).
- LEY, R.D., Ultraviolet radiation A-induced precursors of cutaneous melanoma in Monodelphis domestica. *Cancer Res.*, **57**, 3682-3684, (1997).
- LEWIS, M.G., PHILLIPS, T.M., NOBLE, P.B., and HARTMANN, D.P., Immune derangement in patients with malignant melanoma. *J Cutan.Pathol.*, 6, 201-207, (1979).
- LUCAS, M.L., HELLER, L., COPPOLA, D., and HELLER, R., IL-12 plasmid delivery by in vivo electroporation for the successful treatment of established subcutaneous B16.F10 melanoma. *Mol.Ther.*, **5**, 668-675, (2002).
- MA, H.L., WHITTERS, M.J., JACOBSON, B.A., DONALDSON, D.D., COLLINS, M., and DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K., Tumor cells secreting IL-13 but not IL-13Ralpha2 fusion protein have reduced tumorigenicity in vivo. *Int.Immunol.*, 16, 1009-1017, (2004).

MACDONALD, T.T., Decoy receptor springs to life and eases fibrosis. Nat.Med., 12, 13-14, (2006).

MANTOVANI, A., SOZZANI, S., LOCATI, M., ALLAVENA, P., and SICA, A., Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.*, 23, 549-555, (2002).

- MANTOVANI, A., SCHIOPPA, T., PORTA, C., ALLAVENA, P., and SICA, A., Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.*, **25**, 315-322, (2006).
- MASTRANGELO, M.J., MAGUIRE, H.C., JR., EISENLOHR, L.C., LAUGHLIN, C.E., MONKEN, C.E., MCCUE, P.A., KOVATICH, A.J., and LATTIME, E.C., Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther.*, **6**, 409-422, (1999).
- MATTHEWS, D.J., EMSON, C.L., MCKENZIE, G.J., JOLIN, H.E., BLACKWELL, J.M., and MCKENZIE, A.N., IL-13 is a susceptibility factor for Leishmania major infection. *J.Immunol.*, **164**, 1458-1462, (2000).
- MCKENZIE, G.J., EMSON, C.L., BELL, S.E., ANDERSON, S., FALLON, P., ZURAWSKI, G., MURRAY, R., GRENCIS, R., and MCKENZIE, A.N., Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. *Immunity.*, **9**, 423-432, (1998).
- MCKENZIE, G.J., FALLON, P.G., EMSON, C.L., GRENCIS, R.K., and MCKENZIE, A.N., Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type 2-mediated responses. *J.Exp.Med.*, **189**, 1565-1572, (1999).
- MENTINK-KANE, M.M., CHEEVER, A.W., THOMPSON, R.W., HARI, D.M., KABATEREINE, N.B., VENNERVALD, B.J., OUMA, J.H., MWATHA, J.K., JONES, F.M., DONALDSON, D.D., GRUSBY, M.J., DUNNE, D.W., and WYNN, T.A., IL-13 receptor alpha 2 down-modulates granulomatous inflammation and prolongs host survival in schistosomiasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **101**, 586-590, (2004).
- MINTY, A., CHALON, P., DEROCQ, J.M., DUMONT, X., GUILLEMOT, J.C., KAGHAD, M., LABIT, C., LEPLATOIS, P., LIAUZUN, P., MILOUX, B., and ., Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*, **362**, 248-250, (1993).

MITRA, R., SINGH, S., and KHAR, A., Antitumour immune responses. *Expert Rev.Mol.Med.*, 5, 1-19, (2003).

- NAGAI, H., HORIKAWA, T., HARA, I., FUKUNAGA, A., ONIKI, S., OKA, M., NISHIGORI, C., and ICHIHASHI, M., In vivo elimination of CD25+ regulatory T cells leads to tumor rejection of B16F10 melanoma, when combined with interleukin-12 gene transfer. *Exp.Dermatol.*, **13**, 613-620, (2004).
- NOMURA, T., YASUDA, K., YAMADA, T., OKAMOTO, S., MAHATO, R.I., WATANABE, Y., TAKAKURA, Y., and HASHIDA, M., Gene expression and antitumor effects following direct interferon (IFN)-gamma gene transfer with naked plasmid DNA and DC-chol liposome complexes in mice. *Gene Ther.*, 6, 121-129, (1999).
- OBIRI, N.I., HUSAIN, S.R., DEBINSKI, W., and PURI, R.K., Interleukin 13 inhibits growth of human renal cell carcinoma cells independently of the p140 interleukin 4 receptor chain. *Clin.Cancer Res.*, **2**, 1743-1749, (1996).
- OKADA, Y., OKADA, N., MIZUGUCHI, H., TAKAHASHI, K., HAYAKAWA, T., MAYUMI, T., and MIZUNO, N., Optimization of antitumor efficacy and safety of in vivo cytokine gene therapy using RGD fiber-mutant adenovirus vector for preexisting murine melanoma. *Biochim.Biophys.Acta*, **1670**, 172-180, (2004).
- OSHIMA, Y. and PURI, R.K., A novel interleukin 13 (IL-13) antagonist that blocks the biological activity of human IL-13 in immune and nonimmune cells. *FASEB J.*, **15**, 1469-1471, (2001).
- OSTRAND-ROSENBERG, S., CLEMENTS, V.K., TERABE, M., PARK, J.M., BERZOFSKY, J.A., and DISSANAYAKE, S.K., Resistance to metastatic disease in STAT6-deficient mice requires hemopoietic and nonhemopoietic cells and is IFN-gamma dependent. *J.Immunol.*, **169**, 5796-5804, (2002).
- PALMER, K., MOORE, J., EVERARD, M., HARRIS, J.D., RODGERS, S., REES, R.C., MURRAY, A.K., MASCARI, R., KIRKWOOD, J., RICHES, P.G., FISHER, C., THOMAS, J.M., HARRIES, M., JOHNSTON, S.R., COLLINS, M.K., and GORE, M.E., Gene therapy with autologous, interleukin 2secreting tumor cells in patients with malignant melanoma. *Hum.Gene Ther.*, **10**, 1261-1268, (1999).

- PARDOLL, D.M., Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat.Rev.Immunol.*, **2**, 227-238, (2002).
- PARK, J.M., TERABE, M., VAN DEN BROEKE, L.T., DONALDSON, D.D., and BERZOFSKY, J.A., Unmasking immunosurveillance against a syngeneic colon cancer by elimination of CD4+ NKT regulatory cells and IL-13. *Int.J.Cancer*, **114**, 80-87, (2005).
- PARK, J.M., TERABE, M., DONALDSON, D.D., FORNI, G., and BERZOFSKY, J.A., Natural immunosurveillance against spontaneous, autochthonous breast cancers revealed and enhanced by blockade of IL-13-mediated negative regulation. *Cancer Immunol.Immunother.*, (2007).
- PARK, S.H., KYIN, T., BENDELAC, A., and CARNAUD, C., The contribution of NKT cells, NK cells, and other gamma-chain-dependent non-T non-B cells to IL-12-mediated rejection of tumors. *J.Immunol.*, **170**, 1197-1201, (2003).
- PAWANKAR, R.U., OKUDA, M., HASEGAWA, S., SUZUKI, K., YSSEL, H., OKUBO, K., OKUMURA, K., and RA, C., Interleukin-13 expression in the nasal mucosa of perennial allergic rhinitis. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, **152**, 2059-2067, (1995).
- PELLEGRINI, P., BERGHELLA, A.M., DEL BEATO, T., CICIA, S., ADORNO, D., and CASCIANI, C.U., Disregulation in TH1 and TH2 subsets of CD4+ T cells in peripheral blood of colorectal cancer patients and involvement in cancer establishment and progression. *Cancer Immunol.Immunother.*, **42**, 1-8, (1996).
- PHAN, G.Q., ATTIA, P., STEINBERG, S.M., WHITE, D.E., and ROSENBERG, S.A., Factors associated with response to high-dose interleukin-2 in patients with metastatic melanoma. *J.Clin.Oncol.*, **19**, 3477-3482, (2001).
- PUNNONEN, J. and DE VRIES, J.E., IL-13 induces proliferation, Ig isotype switching, and Ig synthesis by immature human fetal B cells. *J.Immunol.*, **152**, 1094-1102, (1994).

- RAKHMILEVICH, A.L., TURNER, J., FORD, M.J., MCCABE, D., SUN, W.H., SONDEL, P.M., GROTA, K., and YANG, N.S., Gene gun-mediated skin transfection with interleukin 12 gene results in regression of established primary and metastatic murine tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **93**, 6291-6296, (1996).
- RAKHMILEVICH, A.L., JANSSEN, K., TURNER, J., CULP, J., and YANG, N.S., Cytokine gene therapy of cancer using gene gun technology: superior antitumor activity of interleukin-12. *Hum.Gene Ther.*, **8**, 1303-1311, (1997).
- RESTIFO, N.P., YING, H., HWANG, L., and LEITNER, W.W., The promise of nucleic acid vaccines. *Gene Ther.*, **7**, 89-92, (2000).
- RODRIGUES, E.G., GAROFALO, A.S., and TRAVASSOS, L.R., Endogenous accumulation of IFN-gamma in IFN-gamma-R(-/-) mice increases resistance to B16F10-Nex2 murine melanoma: a model for direct IFN-gamma anti-tumor cytotoxicity in vitro and in vivo. *Cytokines Cell Mol.Ther.*, **7**, 107-116, (2002).
- RODRIGUES, E.G., SILVA, L.S., FAUSTO, D.M., HAYASHI, M.S., DREHER, S., SANTOS, E.L., PESQUERO, J.B., TRAVASSOS, L.R., and CAIRES, A.C., Cyclopalladated compounds as chemotherapeutic agents: antitumor activity against a murine melanoma cell line. *Int.J.Cancer*, **107**, 498-504, (2003).
- ROSENBERG, S.A., Progress in human tumour immunology and immunotherapy. Nature, 411, 380-384, (2001).
- ROY, B., BHATTACHARJEE, A., XU, B., FORD, D., MAIZEL, A.L., and CATHCART, M.K., IL-13 signal transduction in human monocytes: phosphorylation of receptor components, association with Jaks, and phosphorylation/activation of Stats. *J.Leukoc.Biol.*, **72**, 580-589, (2002).
- SALGIA, R., LYNCH, T., SKARIN, A., LUCCA, J., LYNCH, C., JUNG, K., HODI, F.S., JAKLITSCH, M., MENTZER, S., SWANSON, S., LUKANICH, J., BUENO, R., WAIN, J., MATHISEN, D., WRIGHT, C., FIDIAS, P., DONAHUE, D., CLIFT, S., HARDY, S., NEUBERG, D., MULLIGAN, R., WEBB, I., SUGARBAKER, D., MIHM, M., and DRANOFF, G., Vaccination with irradiated autologous tumor cells

engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma. *J.Clin.Oncol.*, **21**, 624-630, (2003).

- SAMPSON, J.H., ARCHER, G.E., ASHLEY, D.M., FUCHS, H.E., HALE, L.P., DRANOFF, G., and BIGNER, D.D., Subcutaneous vaccination with irradiated, cytokine-producing tumor cells stimulates CD8+ cellmediated immunity against tumors located in the "immunologically privileged" central nervous system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93, 10399-10404, (1996).
- SINHA, P., CLEMENTS, V.K., and OSTRAND-ROSENBERG, S., Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis. *Cancer Res.*, 65, 11743-11751, (2005).
- SKINNIDER, B.F., ELIA, A.J., GASCOYNE, R.D., TRUMPER, L.H., VON BONIN, F., KAPP, U., PATTERSON, B., SNOW, B.E., and MAK, T.W., Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, **97**, 250-255, (2001).
- SLOMINSKI, A., WORTSMAN, J., CARLSON, A.J., MATSUOKA, L.Y., BALCH, C.M., and MIHM, M.C., Malignant melanoma. *Arch.Pathol.Lab Med.*, **125**, 1295-1306, (2001).
- SMYTH, M.J., TANIGUCHI, M., and STREET, S.E., The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *J.Immunol.*, **165**, 2665-2670, (2000).
- SMYTH, M.J., THIA, K.Y., STREET, S.E., CRETNEY, E., TRAPANI, J.A., TANIGUCHI, M., KAWANO, T., PELIKAN, S.B., CROWE, N.Y., and GODFREY, D.I., Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J.Exp.Med.*, **191**, 661-668, (2000).
- SMYTH, M.J. and GODFREY, D.I., NKT cells and tumor immunity a double-edged sword. *Nature Immunology*, **1**, 459-460, (2000).
- SMYTH, M.J., GODFREY, D.I., and TRAPANI, J.A., A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunology*, **2**, 293-299, (2001).

- SMYTH, M.J., CROWE, N.Y., PELLICCI, D.G., KYPARISSOUDIS, K., KELLY, J.M., TAKEDA, K., YAGITA, H., and GODFREY, D.I., Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Blood*, **99**, 1259-1266, (2002).
- SONG, K., CHANG, Y., and PRUD'HOMME, G.J., Regulation of T-helper-1 versus T-helper-2 activity and enhancement of tumor immunity by combined DNA-based vaccination and nonviral cytokine gene transfer. *Gene Ther.*, **7**, 481-492, (2000).
- STERN, R.S., The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA. *J.Am.Acad.Dermatol.*, **44**, 755-761, (2001).
- STEWART, T.J., SMYTH, M.J., FERNANDO, G.J., FRAZER, I.H., and LEGGATT, G.R., Inhibition of early tumor growth requires J alpha 18-positive (natural killer T) cells. *Cancer Res.*, **63**, 3058-3060, (2003).
- SUN, W.H., BURKHOLDER, J.K., SUN, J., CULP, J., TURNER, J., LU, X.G., PUGH, T.D., ERSHLER, W.B., and YANG, N.S., In vivo cytokine gene transfer by gene gun reduces tumor growth in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 92, 2889-2893, (1995).
- TAKEDA, K., SEKI, S., OGASAWARA, K., ANZAI, R., HASHIMOTO, W., SUGIURA, K., TAKAHASHI, M., SATOH, M., and KUMAGAI, K., Liver NK1.1+ CD4+ alpha beta T cells activated by IL-12 as a major effector in inhibition of experimental tumor metastasis. *J.Immunol.*, **156**, 3366-3373, (1996).
- TEICHER, B.A., ARA, G., MENON, K., and SCHAUB, R.G., In vivo studies with interleukin-12 alone and in combination with monocyte colony-stimulating factor and/or fractionated radiation treatment. *Int.J.Cancer*, 65, 80-84, (1996).
- TERABE, M., MATSUI, S., NOBEN-TRAUTH, N., CHEN, H., WATSON, C., DONALDSON, D.D., CARBONE, D.P., PAUL, W.E., and BERZOFSKY, J.A., NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat.Immunol.*, 1, 515-520, (2000).

- TERABE, M., MATSUI, S., PARK, J.M., MAMURA, M., NOBEN-TRAUTH, N., DONALDSON, D.D., CHEN, W., WAHL, S.M., LEDBETTER, S., PRATT, B., LETTERIO, J.J., PAUL, W.E., and BERZOFSKY, J.A., Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J.Exp.Med.*, **198**, 1741-1752, (2003).
- TERABE, M., SWANN, J., AMBROSINO, E., SINHA, P., TAKAKU, S., HAYAKAWA, Y., GODFREY, D.I., OSTRAND-ROSENBERG, S., SMYTH, M.J., and BERZOFSKY, J.A., A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. J.Exp.Med., 202, 1627-1633, (2005).
- TERABE, M. and BERZOFSKY, J.A., NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *Trends Immunol.*, **28**, 491-496, (2007).
- TERHEYDEN, P., SIEDEL, C., MERKEL, A., KAMPGEN, E., BROCKER, E.B., and BECKER, J.C., Predominant expression of Fas (CD95) ligand in metastatic melanoma revealed by longitudinal analysis. *J.Invest Dermatol.*, **112**, 899-902, (1999).
- TOURA, I., KAWANO, T., AKUTSU, Y., NAKAYAMA, T., OCHIAI, T., and TANIGUCHI, M., Cutting edge: inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide. *J.Immunol.*, 163, 2387-2391, (1999).
- TOWNSEND, S.E. and ALLISON, J.P., Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7transfected melanoma cells. *Science*, **259**, 368-370, (1993).
- TRINCHIERI, G., Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat.Rev.Immunol.*, **3**, 133-146, (2003)a.
- TRINCHIERI, G., PFLANZ, S., and KASTELEIN, R.A., The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity.*, **19**, 641-644, (2003)b.

- URBAN, J.F., JR., NOBEN-TRAUTH, N., DONALDSON, D.D., MADDEN, K.B., MORRIS, S.C., COLLINS, M., and FINKELMAN, F.D., IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite Nippostrongylus brasiliensis. *Immunity.*, 8, 255-264, (1998).
- VOEST, E.E., KENYON, B.M., O'REILLY, M.S., TRUITT, G., D'AMATO, R.J., and FOLKMAN, J., Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *J.Natl.Cancer Inst.*, **87**, 581-586, (1995).
- VUORISTO, M., JANTUNEN, I., PYRHONEN, S., MUHONEN, T., and KELLOKUMPU-LEHTINEN, P., A combination of subcutaneous recombinant interleukin-2 and recombinant interferon-alpha in the treatment of advanced renal cell carcinoma or melanoma. *Eur.J.Cancer*, **30A**, 530-532, (1994).
- WHITESIDE, T.L. and HERBERMAN, R.B., The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. *Curr.Opin.Immunol.*, **7**, 704-710, (1995).
- WILLS-KARP, M., LUYIMBAZI, J., XU, X., SCHOFIELD, B., NEBEN, T.Y., KARP, C.L., and DONALDSON, D.D., Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*, **282**, 2258-2261, (1998).
- WOJTOWICZ-PRAGA, S., VERMA, U.N., WAKEFIELD, L., ESTEBAN, J.M., HARTMANN, D., and MAZUMDER, A., Modulation of B16 melanoma growth and metastasis by anti-transforming growth factor beta antibody and interleukin-2. *J.Immunother.Emphasis.Tumor Immunol.*, **19**, 169-175, (1996).
- WOLFEL, T., HAUER, M., SCHNEIDER, J., SERRANO, M., WOLFEL, C., KLEHMANN-HIEB, E., DE PLAEN, E., HANKELN, T., MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K.H., and BEACH, D., A p16INK4ainsensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science*, **269**, 1281-1284, (1995).
- WOOD, N., WHITTERS, M.J., JACOBSON, B.A., WITEK, J., SYPEK, J.P., KASAIAN, M., EPPIHIMER, M.J., UNGER, M., TANAKA, T., GOLDMAN, S.J., COLLINS, M., DONALDSON, D.D., and GRUSBY, M.J., Enhanced interleukin (IL)-13 responses in mice lacking IL-13 receptor alpha 2. *J.Exp.Med.*, **197**, 703-709, (2003).

WYNN, T.A., IL-13 effector functions. Annu. Rev. Immunol., 21, 425-456, (2003).

- ZHENG, T., ZHU, Z., LIU, W., LEE, C.G., CHEN, Q., HOMER, R.J., and ELIAS, J.A., Cytokine regulation of IL-13Ralpha2 and IL-13Ralpha1 in vivo and in vitro. *J.Allergy Clin.Immunol.*, **111**, 720-728, (2003).
- ZHOU, D., OX40 signaling directly triggers the antitumor effects of NKT cells. *J.Clin.Invest*, **117**, 3169-3172, (2007).
- ZLOTNIK, A., GODFREY, D.I., FISCHER, M., and SUDA, T., Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- T cells. Alpha beta-T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4. *J.Immunol.*, **149**, 1211-1215, (1992).
- ZURAWSKI, G. and DE VRIES, J.E., Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol.Today*, **15**, 19-26, (1994).

Anexos



Universidade Federal de São Paulo Escola Paulista de Medicina

Comité de Ética em Pesquisa Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

São Paulo, 14 de novembro de 2003 CEP Nº 1340/03

limo(a) Sr.(a)

Pesquisador(a): FLÁVIA HEBELER BARBOSA Disciplina/Departamento: Biologia Celular/Micro, Imuno e Parasitologia

Ref.: Projeto de Pesquisa:

Papel das citocinas imunossupressoras na evolução de quadros anérgicos da paracoccidioidomicose e evolução tumoral no modelo de melanoma murino

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo em reunião, ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa acima.

O relatório parcial está previsto para 12/05/04

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

"Ressaltamos que é de essencial importância que seja verificado, antes da divulgação dos processos e/ou resultados obtidos nesta pesquisa, se os mesmos são potencialmente patenteáveis ou passíveis de outras formas de proteção intelectual/industrial. A proteção por meio do depósito de patente, ou de outras formas de proteção da propriedade intelectual, evita a ação indevida de terceiros e confere maior segurança quando da publicação dos resultados da pesquisa."

> Rua Botucatu, 572 - 1o andar - CEP 04023-062 - São Paulo/Brasil Tel.: (11) 5571.1062 Tel/Fax 5539.7162

Gene Therapy against Murine Melanoma B16F10-Nex2 Using IL-13Rα2-Fc Chimera and Interleukin 12 in Association with a Cyclopalladated Drug¹ Flavia Hebeler-Barbosa^{*,†}, Elaine G. Rodrigues^{*,†}, Rosana Puccia[†], Antonio C.F. Caires[‡] and Luiz R. Travassos^{*,†}

*Unidade de Oncologia Experimental (UNONEX), Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil; [†]Disciplina de Biologia Celular, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil; [†]Universidade de Mogi das Cruzes, São Paulo, Brazil

Abstract

Interleukin 13 (IL-13) is immunoregulatory in many diseases, including cancer. The protective or suppressive role of CD1-restricted natural killer T cells (NKT cells) in tumor immunosurveillance and immunity is well documented. Interleukin 12 (IL-12) can activate type I NKT cells to produce interferon-gamma (IFN- γ), whereas type II NKT cells may produce IL-13. The high-affinity chain of IL-13Ra2 may act as negative inhibitor, suppressing the action of IL-13 and helping to maintain tumor immunosurveillance. We constructed an mIL-13Ra2-Fc chimera in a eukaryotic expression vector and confirmed the identity of the recombinant protein by immunoblot analysis and binding to IL-13 in chemiluminescent ELISA. Such DNA vaccine was tested against syngeneic B16F10-Nex2 murine melanoma. *In vivo* experiments showed a protective effect mediated by high production of IFN- γ and down-regulation of anti-inflammatory interleukins mainly by NKT 1.1⁺ T cells. Biochemoterapy *in vivo* with plasmid encoding mIL-13Ra2-Fc in association with plasmid encoding IL-12 and the 7A cyclopalladated drug led to a significant reduction in the tumor evolution with 30% tumor-free mice. We conclude that IL-12 gene therapy, followed by continuous administration of *IL-13Ra2-Fc* gene along with 7A-drug has antitumor activity involving the high production of proinflammatory cytokines and low immune suppression, specifically by NK1.1⁺T cells producing IL-13 and IL-10.

Translational Oncology (2008) 1, 110–120

Introduction

The challenge in the development of anticancer vaccines has been to elicit cellular immune responses that may effectively control tumor growth despite the negative regulatory mechanisms that are simultaneously induced. To increase the antitumor response, diverse modalities of gene therapy have been used, such as administration of genes encoding proinflammatory cytokines or inhibitors of immune suppressor components. Cells inducing immunosuppressive responses include CD4⁺CD25⁺ T-regulatory (T-reg) cells, conventional T_{H2} cells, CD1d-restricted natural killer T cells (NKT cells), myeloid suppressor cells, and M2 macrophages [1–5].

CD1d-restricted NKT cells have a dual role in tumor immunity, depending on different cell subsets [6]. They have been implicated in the down-regulation of immunosurveillance in tumor models [3,4,7] and in the promotion of antitumor immunity [8–10]. These opposing activities are explained by the recruitment of selected NKT subpopulations producing different cytokine profiles, depending on

the stimulus or microenvironment. Dendritic cells (DCs) pulsed with α -galactosylceramide (α -Gal-Cer) inhibited metastasis in experimental melanoma [11]. The V α 14-J α 18 NKT cells were the first to be activated after administration of IL-12, displaying *in vitro* cytotoxicity in B16 tumor cells and *in vivo* protection against the subcutaneous growth and pulmonary colonization by B16 murine melanoma [12].

www.transonc.com

Address all correspondence to: Luiz R. Travassos, Unidade de Oncologia Experimental (UNONEX), Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Botucatu 862, 8 andar, São Paulo, SP 04023-062, Brazil. E-mail: travassos@unifesp.br

¹This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil. E.G.R., R.P., and L.R.T. are recipients of research fellowships from the Brazilian National Research Council.

Received 6 May 2008; Revised 20 June 2008; Accepted 23 June 2008

Copyright © 2008 Neoplasia Press, Inc. All rights reserved 1944-7124/08/\$25.00 DOI 10.1593/tlo.08115

In contrast, Ahlers et al. [13] found that the suppression of a cytotoxic T lymphocytes-inducing vaccine apparently was due at least in part to NKT cells, because they were able to enhance vaccine efficacy by blockade of IL-13 or by using CD1-deficient mice that lack NKT cells. Terabe et al. [14] showed that, in the absence of both type I NKT cells and T-reg cells, type II (non-V α 14J α 18+) NKT cells were responsible for suppression of immunosurveillance. Therefore, NKT cells can regulate positively or negatively the immune response, and a strategy that would involve stimulation of NKT type I subpopulation (e.g., by administering IL-12) and suppression or control of NKT type II cells might render a more efficient antitumor immune response.

NKT type II cells regulate negatively the immune response probably through the production of IL-13. First described in 1993 [15], IL-13 is secreted preferentially by activated T_H2 lymphocytes and NKT cells, but macrophages, DCs, NK cells, mast cells, and basophils can also produce it. This interleukin inhibits inflammatory cytokine and chemokine production, up-regulates MHC class II expression and CD23 on monocytes [15,16], increases the expression of VCAM-1 on endothelial cells [17], and promotes B-cell proliferation and IgE class switching [18,19]. It plays crucial roles in the pathophysiology of allergic asthma, helminthiasis, autoimmune disorders, and chronic diseases [20]. IL-13 signaling requires binding to the IL-13R α 1 receptor, which then forms heterodimers with the IL-4 receptor (IL-4Ra) [21-23]. IL-13, however, shows higher affinity binding to the $\alpha 2$ chain of the IL-13 receptor (IL-13R $\alpha 2$), which may function as a decoy receptor and is important to downregulate a T_H2-mediated immune response [24]. This chain is unable of signaling because it has a short cytoplasmic tail and does not activate the STAT6 pathway [25]. However, Fichtner-Feigl et al. [26] found that IL-13 binding to IL-13Ra2 may activate AP-1 transcriptional factor to induce secretion of transforming growth factor beta $(TGF-\beta).$

The role of IL-13 on tumor immunity seems to be complex and may depend on both the tumor type and the genetic background of the host. Previous studies have shown that IL-13 enhanced antitumor responses in some model systems [27] or did not affect tumor growth [28,29]. Conversely, mIL-13Ra2-Fc prevented IL-13-mediated suppression of tumor immunosurveillance [3,14]. In a 15-12RM fibrosarcoma model of tumor recurrence, the authors showed that CD8⁺ CTL-mediated tumor elimination was suppressed by IL-13 produced by CD1d-restricted T cells and activated IL-4Rα-STAT6 signaling pathway. IL-4 α R knockout (KO) and STAT6 KO mice but not IL-4 KO mice were resistant to tumor recurrence. When these IL-4 KO mice were treated with soluble inhibitor of IL-13, they became resistant to tumor recurrence indicating that IL-13 was responsible for the suppression of tumor immunosurveillance in this model. Moreover, CD1d-KO mice were also resistant to tumor growth because they lack NKT cells hence did not produce IL-13. In a metastasis model of colon carcinoma, the same mechanism was observed where treatment with soluble protein IL-13Ra2-Fc diminished the number of metastasis [7]. An effector mechanism in this suppressive pathway was proposed by Terabe et al. [4], who showed that CD11b⁺ Gr-1⁺ myeloid cells produced TGF- β by a mechanism dependent on the presence in vivo of both IL-13 and CD1d-restricted T cells. Because T cells do not respond to IL-13 [16], other cells are stimulated to produce TGF-B that can be the cytokine responsible for the inhibition of CTL activity. Now, this hypothesis can be examined by studying IL-13Rα2 chain function in macrophages responding to IL-13 [26,30].

Therapy with soluble mIL-13R α 2-Fc leads to antitumor response in models where type II NKT cells inhibit natural tumor immunosurveillance by a mechanism involving IL-13, whereas IL-12 stimulates several antitumor pathways, including type I NKT activation. Here, we associated gene therapy with chemotherapy by using a cyclopalladated drug (7A) that has been shown to be protective in mice challenged subcutaneously with B16F10-NEX2 melanoma cells [31]. The combination of gene therapy and chemotherapy conferred increased protection against melanoma with 30% mice free of tumor at the end of experiment.

Materials and Methods

Cell Lines and Reagents

B16F10-Nex2 is a subline from B16F10 murine melanoma [32], isolated at the Experimental Oncology Unit (UNONEX). It is characterized by low immunogenicity and moderate virulence. The melanoma cells were maintained in culture in RPMI 1640 medium pH 7.2, supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 10 mM HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-2-ethanesulphonic acid), 24 mM NaHCO₃, all from GIBCO (Minneapolis, MN), and 40 mg/ml gentamycin sulfate (Hipolabor Farmacêutica, Sabará, MG, Brazil). Monoclonal antibodies (mAbs) conjugated with phycoery-thrin (PE) against mouse CD3, CD4, and CD8, mAbs conjugated with flourescein isothiocyanate (FITC) against mouse NK1.1 and F4/80, and mAbs biotinylated against cytokines were all purchased from PharMingen (San Diego, CA).

Mice

Inbred male 6- to 8-week-old C57BL/6 mice were purchased from Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais at Federal University of São Paulo (UNIFESP). All animal experiments were approved by the Animal Experimental Ethics Committee of UNIFESP, protocol number 1340/2003. In all experiments, 10 mice were used per group.

Construction of the mIL-13Ra2-Fc DNA Vaccine

To construct the mIL-13Rα2-Fc (murine IL-13 receptor alpha-2/ IgG2a Fc fusion protein) chimera, the sequence corresponding to the extracellular domain of the receptor (amino acids 1-332) was obtained from macrophage total RNA, whereas those from Fc regions (CH2-CH3) were amplified from hybridoma 17C [33], both using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). RNA extractions from mouse peritoneal macrophages pretreated with IL-13 and from hybridoma 17C were carried out using Trizol reagent (Invitrogen Brasil, São Paulo, Brazil), following the manufacturer's instructions with minor modifications. Reverse transcription-polymerase chain reaction was performed using "Thermo Script RT-PCR System" (Invitrogen) and oligo dT, according to the manufacturer's instructions. DNA was eliminated after treatment with DNase I (Rnase-free; Amersham GE Healthcare, Piscataway, NJ), and controls without reverse transcription were included in all reactions. The PCR mixture consisted of 1/10 of the RT reaction, Taq buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 200 µM deoxynucleoside triphosphates (dNTP), 1.5 mM MgCl₂, 2.5 U Taq DNA polymerase (Invitrogen), and 1 µM of each primer. The oligonucleotide primers used to amplify mIL-13Ra2 and Fc region were as follows: 5' -d GTC GAC ATG GCT TTT GTG CAT ATC AGA TGC- 3' (forward, P1); 5' -d TCC GGA GCC CTT

TGA GTC TGG CCC TGT GTA- 3' (reverse, P2) and 5' -d GGC TCC GGAM GCA CCT AAC CTC TTG GGT G- 3' (forward, P3); 5' -d TCT AGA TCA TTT ACC CGG AGT CCG GGA- 3' (reverse, P4). The mIL-13R α 2 and Fc coding sequences were amplified after 35 cycles at 94°C for 1 minute, 59°C (or 60°C for Fc) for 2 minutes, and 72°C for 1 minute. Each fragments was cloned into a pGEM-Teasy vector (Promega, Madison, WI), the inserts were automatically sequenced, and the sequences compared with those available in the GenBank (IL-13Ra2, gi = 6680404; CH2-CH3 IgG2a, gi = 51767065 and gi = 406252). Nucleotide sequencing was carried out in the facilities of the Center of Human Genome at São Paulo University (USP). To generate the final construct (1656 bp) encoding IL-13R α 2 fused in frame with the Fc region through the spacer Gly-Ser-Gly, we followed a modified PCR overlap technique [34] using both plasmids as template (10 ng in 25 μ l of reaction mixture). The first round of PCR (35 cycles at 95°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 2 minutes) was run in the presence of 0.4 µM of each internal primer (P2, P3), 1 µM of each external primer (P1, P4), Taq buffer, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, and 2.5 U of platinum Taq polymerase (Invitrogen). Reamplification of the product, used as template at 1:100, took only external primers, at an annealing temperature of 58°C. Polymerase chain reaction products were purified using "Bioclean for Purification of DNA Bands" (Biotools, Brazil) and cloned into a pGEM-T vector. The sequence of the final construct was confirmed by automatically sequencing the insert in both directions using sense T7 and antisense SP6 vector primers. The insert was then subcloned into a Sal I restriction site of a VR1012 vector (Vical Co., San Diego, CA), which was used to transform DH5a bacteria by heat shock. Plasmids from a selected clone were purified in CsCl gradient with ethidium bromide after ultracentrifugation at 500,000g for 16 hours (VTi 90 rotor; Beckman, Fullerton, CA), followed by washing with saturated butanol (to remove bromide). Plasmids were precipitated with ethanol 100% for 3 days, washed twice with ethanol 70%, and then resuspended in sterile phosphate-buffered saline (PBS).

Production and Analysis of the Recombinant Protein IL-13R α 2-Fc

B16F10-Nex2 tumor cells were transiently transfected with 5 µg of the expression plasmid with lipofectin (Invitrogen). Culture supernatants that contained secreted mIL-13R α 2-Fc were filtered through Millipore Millidisk (0.22 µm) and purified through protein G Sepharose affinity chromatography (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The solid phase was equilibrated with PBS pH 7.4, washed with PBS, and eluted with 0.1 M glycine, pH 2.8. The eluate was neutralized by 1:5 volume of Tris-HCl 1 M, pH 9.0. The final product was examined by reducing SDS-PAGE stained with silver nitrate and its identity confirmed by immunoblot analysis. Briefly, the sample was reduced with DTT, separated in 8% SDS-PAGE, and then transferred onto a nitrocellulose membrane (0.2 µm; Amersham Bioscience, England) by electroblot analysis. The blot was blocked with PBS containing 5% dry skim milk and then incubated overnight at 4°C with biotinylated polyclonal goat antibody to murine IL-13Ra2 (0.2 µg/ml; R&D Systems, São Paulo, Brazil) diluted in PBS-1% BSA (bovine serum albumin). After three washes with 0.05% Tween 20 in PBS (PBST) and once with PBS, horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (1:1000; Jackson Immuno-Research Laboratories, West Grove, PA) was added (1 hour at 37°C). The blot was developed with 5 mg of DAB (Sigma, São Paulo, Brazil) and 100 µl of H₂O₂ in PBS and blocked with distilled water. The biologic activity (high and specific interaction with IL-13) was assessed in a chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Briefly, white immulon-2 plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with recombinant murine IL-13 (2 µg/ml; Peprotech, Ribeirão, Brazil) in PBS overnight. Plates were washed with PBST and blocked with PBS-1% BSA (3 hours at 37°C). Purified supernatant from transfected cells diluted in PBS-1% BSA was added and incubated for 3 hours at 37°C. Biotinylated goat antimouse IL-13Ra2 (1 µg/ml; R&D Systems) was added and incubated overnight at 4°C. Peroxidase-labeled streptavidin (1:1000; 1 hour at 37°C) was used to detect biotinylated Ab. Finally, 1:50 ECL (Enhanced Chemiluminescent detection kit; Amersham Pharmacia Biotech) was added, diluted in 0.5 M carbonatebicarbonate buffer pH 9.6. Readings (relative luminescent units) were recorded in a luminometer (Cambridge Technology, Auburn, CA). The concentration of mIL-13R α 2-Fc in the sample was determined from a serial-fold diluted standard mIL-13Ra2-hIgG1 (R&D Systems). Controls with empty vector were used in all experiments.

IL-12 Plasmid

The expression vector encoding IL-12 was provided by Alexander Rakhmilevich [35] from the University of Wisconsin and tested for *in vitro* activity before gene therapy. The plasmid (pWRG3169) contains sequences encoding the p35 and p40 subunits of murine IL-12, localized in opposite direction and each driven by its own cytomegalovirus (CMV) i/e promoter/enhancer, simian virus 40 sd/sa intron sequence, bovine growth hormone polyadenylation sequence, and ampicillin-resistant gene. A control vector containing luciferase cDNA under the CMV promoter was constructed as described by Cheng et al. [36].

To confirm the production of IL-12, this plasmid was used to transfect B16F10-Nex2 tumor cells as described above, followed by ELISA of the supernatant. The biologic activity of the recombinant IL-12 was tested by production of nitric oxide (NO) in a macrophage activation assay. Nitric oxide was quantified as nitrite by Griess reagent.

Cyclopalladated Drug

The cyclopalladated drug 7A was synthesized from N,N-dimethyl-1-phenethylamine, complexed to 1,2 ethanebis(diphenylphosphine) ligand, and was active *in vitro* and *in vivo* against B16F10-Nex2 murine melanoma cells as previously described [31].

In Vivo Experiments

C57Bl/6 male mice were injected subcutaneously in the right flank with 5×10^4 B16F10-Nex2 viable tumor cells, and on day 2, the animals were vaccinated with pIL-12 (100 µg per animal) or with the empty plasmid, intradermally at the tail base. The treatment with 10 µM of the 7A drug started 4 days later, three times a week by intraperitoneal route, until the tumor volume reached 2 cm³. On day 5 and subsequently at 5-day intervals, the animals received the pIL-13R vaccine (VR1012 vector + mIL-13R α 2-Fc) or the respective empty plasmid (100 µg/animal), i.d. at the tail base, until day 30. The therapeutic efficacy was evaluated by tumor growth and survival index. The tumor volume was measured every 3 days using a caliper according to the formula: $V = 0.52 \times D_1^2 \times D_3$, where D_1 and D_3 are the short and long diameters, respectively. All experiments included 10 mice per group, and the animals with maximum



Figure 1. Scheme of DNA construction to produce the mIL-13Ra2-Fc chimera using overlap PCR. The complete sequences that encode the extracellular domain of the IL-13Ra2 receptor (1002 bp) and the Fc region (654 bp) were joined by a fragment encoding Gly-Ser-Gly. PCR overlap was done with primers P1 to P4, followed by a final PCR with external primers to increase the amount of the 1665-bp chimera.

3 cm³ tumor size were killed. Survivals of mice were scored and statistically compared (Kaplan-Meier log rank test).

Flow Cytometry

A possible correlation between the immune protection of treated animals and the leukocyte populations producing cytokines (IFN- γ , IL-12, IL-10, IL-6, IL-4, IL-13, IL-2, TNF- α , and TGF- β) was assessed by using fluorescence-activated cell sorting (FACS). All mice (control or vaccinated) were evaluated individually, and when the tumor diameter reached a maximum of 3 cm³, splenocytes were collected. T CD4⁺, T CD8⁺, F4/80⁺, and NK1.1⁺T cells (CD3⁺NK1.1⁺, CD4⁺NK1.1⁺ or CD8⁺NK1.1⁺) and their intracellular cytokine production were immediately analyzed ex vivo without restimulation. Briefly, splenocytes were harvested and erythrocytes were lysed by osmotic shock (0.1 M NH₄Cl, pH 7.2). Cells were incubated with PBS-1% BSA for 10 minutes on ice, washed twice in 1% PBS, and the Fc receptors were blocked with inactivated mouse serum for 1 hour on ice. Monoclonal antibodies anti-CD3, CD4, CD8, F4/80 and NK1.1 were added, and the samples were incubated for 1 hour on ice in the dark. Cells were then washed and permeabilized with saponin buffer (0.5% saponin, 1% paraformaldehyde in PBS). After incubation with inactivated mouse serum for 1 hour on ice, the cells were incubated with biotinylated antibodies against cytokines, followed by incubation with FITC-conjugated streptavidin, PE-conjugated streptavidin or allophycocyanin (APC)-conjugated streptavidin (all from PharMingen). Controls with these reagents alone were run in all assays. Cells were then fixed with 2% paraformaldehyde in PBS (wt/vol) and surface and intracellular fluorescence was measured using a FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, São Paulo, Brazil). Data were collected for 10,000 viable cells and analyzed using CellQuestPro software (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Statistical Analysis

Significant differences were assessed using Student's *t* test. All experiments were conducted two or more times. Reproducible results were obtained, and representative data are shown. The survival plots were analyzed by Kaplan-Meier log rank test. In both tests, the differences were considered statistically significant when P < .05. Cytokine production relating treated and untreated animals was evaluated by ANOVA, nonparametric Dunn test.

Results

Construction of the mIL-13Ra2-Fc DNA Vaccine

The coding sequence to the extracellular domain of the IL-13 receptor was cloned from total RNA of macrophages pretreated with IL-13 for 48 hours [37] and RT-PCR generated a fragment of 1002 bp, whereas the coding sequences to the Fc regions (CH2-CH3) were cloned from total RNA of hybridoma 17C [33]. Our PCR conditions could not detect the expression of the IL-13R α 2 chain in nonstimulated macrophages. A modified PCR overlap technique was used to generate the final construct, IL-13R α 2 fused in frame with Fc region and with a Gly-Ser-Gly spacer, as shown in Figure 1. The final construct was confirmed by sequencing, subcloned into the *Sal* I restriction site of a VR1012 expression vector, and was called pIL-13R. *BamH* I restriction showed the correct direction of the insert (not shown). Plasmids were purified through CsCl gradient with ethidium bromide and used for *in vitro* transfection and *in vivo* experiments.

Recombinant Protein IL-13R α 2-Fc Is Efficiently Secreted and Preserves Its Biologic Function After Transfection of Tumor Cells

B16F10-Nex2 tumor cells were transiently transfected with pIL-13R, and culture supernatants that contained secreted mIL-13R α 2-Fc were filtered and purified through protein G Sepharose chromatography.



Figure 2. Production and analysis of recombinant mIL-13Ra2-Fc chimera. (A) SDS-PAGE in reducing conditions of recombinant protein of approximately 85 kDa (arrow). The protein was analyzed after purification in protein G Sepharose of the supernatant obtained from transfected B16F10-Nex2 tumor cells after 48 hours of gene expression. M, protein ladder from Invitrogen; the 80- and 90-kDa bands are indicated. (B) Immunoblot analysis showing recombinant protein (chimera IL-13Rq2-Fc) in Jane 1 reacting with anti-IL-13Rq2 after staining with DAB reagent. Negative control in lane 2 (supernatant from transfected cells with empty plasmid). (C) Bioactivity (binding to IL-13) of the chimera obtained as described in (A) in chemiluminescent ELISA. The sample (black bar) had 0.92 µg/ml, according to standardization with commercial chimera (R&D Systems). The control is the supernatant obtained from transfected B16F10-Nex2 tumor cells with empty plasmid. *P < .0005, Student's t test.

The eluate was examined by reduced SDS-PAGE developed with silver nitrate, showing a recombinant protein of approximately 85 kDa (Figure 2*A*). Immunoblot analysis was carried out to confirm its identity (Figure 2*B*). The biologic activity (binding to IL-13) was evaluated by chemiluminescent ELISA test. The sensitivity of this assay was 250 ng/ml, and the concentration of IL-13R α 2-Fc in the sample was determined from serial dilution of a standard commercial mIL-13R α 2-hIgG1 (R&D Systems). The sample had 0.92 µg/ml of mIL-13R α 2-Fc (Figure 2*C*). Controls with supernatants obtained after transfection with the empty vector were used in all experiments.

IL-12 Plasmid

The expression vector encoding IL-12 (pIL-12) was initially tested in vitro in transfected B16F10-Nex2 tumor cells, followed by ELISA of the supernatant to evaluate IL-12 production. A high production of IL-12, ca. 7 ng/ml protein, was obtained. The secreted IL-12 was biologically active, as judged by its ability to induce NO production in macrophages from C57Bl/6 mice. Positive controls with lipopolysaccharide and IFN- γ were used in all experiments, and negative controls consisted of macrophages stimulated with supernatant from cells transfected with the empty vector or untreated. Macrophages stimulated with 30% of the supernatant obtained after transfection with pIL-12 showed a production of 57 μ M NO, after 72 hours in culture (data not shown).

Gene Therapy and Association with Drug 7A Effectively Protected Mice Challenged with B16F10-Nex2 Cells Resulting in Delayed Tumor Growth and 30% Tumor-Free Animals

C57Bl/6 male mice were injected subcutaneously with 5×10^4 B16F10-Nex2 tumor cells and were vaccinated with pIL-12 alone, pIL-13R alone, together, and in association with the cyclopalladated drug 7A. Treatment *in vivo* with pIL-13R or pIL-12 alone protected mice significantly prolonging their survival (Figures 3 and 4). DNA vaccine with pIL-12 prolonged survival to day 39, and the association with drug 7A to day 43. DNA vaccine with pIL-13R was also protective, resulting in increased survival compared to the untreated control animals until day 41 when administered alone or associated with drug 7A. The combined therapy with pIL-12 or pIL-13R and drug 7A significantly delayed tumor growth and was more efficacious (P < .05) than the therapy with plasmid alone, controlled by vaccination with the empty plasmid. Mice injected with drug 7A alone were also partially protected and survived until day 42. By administering both DNA vaccines associated with drug 7A, the best results



Figure 3. Therapeutic effect of plL-12 against subcutaneous murine melanoma. (A) Tumor development in animals vaccinated with plL-12. (B) Combined treatment with plL-12 and drug 7A. (C) Increased survival of IL-12 and IL-12 + drug 7A-treated mice. C57Bl/6 mice were injected with 5×10^4 B16F10-Nex2 tumor cells, and on day 2, the animals were vaccinated with plL-12 or plasmid with drug 7A. Drug 7A was administered i.p. three times a week, 10 μ M per animal. Control groups were vaccinated with empty plasmid. For each group, n = 10; Kaplan-Meier test for the control and vaccinated groups with plL-12 (P = .023) or plL-12 + drug 7A (P = .009).



Figure 4. Therapeutic effect of plL-13R against subcutaneous murine melanoma. (A) Tumor development in animals vaccinated with plL-13R. (B) Combined treatment with plL-13R and drug 7A. (C) Increased survival of plL-13R and plL-13R plus drug 7A–treated mice. C57Bl/ 6 mice were injected with 5×10^4 B16F10-Nex2 tumor cells, and on days 5, 10, 15, 20, 25 and 30, the animals were vaccinated with plL-13R (plasmid VR1012 containing the insert IL-13Ra2-Fc; (A). The same protocol was used in association with drug 7A (B). Drug 7A was administered i.p. three times a week, $10 \,\mu$ M per animal. Control groups were vaccinated with empty plasmid. For each group, n = 10. Kaplan-Meier test for the control and the vaccinated groups with plL-13R (P = .0298) or with plL-13R + drug 7A (P = .0005).

were obtained with protection of 30% of mice that remained tumorfree until the end of the experiment (Figure 5). In the group vaccinated with both plasmids, animals survived until the 47th day. In all experiments, mice of the control groups died before day 34. Four control groups were always used, which were vaccinated with both empty plasmids, with only one empty plasmid (pCMV or VR1012) and PBS. No significant differences were observed among these control groups.

Gene Therapy Associated with Drug 7A Induced CD4⁺ and CD8⁺ T Cells as well as F4/80⁺ Cells Producing Mainly Type I Proinflammatory Cytokines

The immune response of mice to gene therapy was assessed by FACS of splenocytes to measure the expression of surface markers and intracellular interleukins. The results for T lymphocytes are shown in Figure 6. Untreated, tumor-bearing animals had 2.5% CD4⁺ and CD8⁺ T cells producing IFN- γ compared to 17.6% cells

producing IL-10. Data are representative of three independent experiments with similar results.

Nonvaccinated tumor-bearing mice showed a mixed cytokine profile, with cells producing IFN- γ , IL-6, IL-2, and TNF- α fewer than cells producing IL-10, IL-13, TGF- β , and IL-4 showing a tendency toward immunosuppression. Mice challenged with tumor cells and submitted to biochemotherapy (gene therapy + drug 7A) showed an increased frequency of cells producing proinflammatory IFN- γ , IL-6, IL-2, TNF- α , and IL-12 (Table 1). Cells producing IFN- γ had a relative increase per 100 cells by 15.8-fold. Comparatively, the CD4⁺ and CD8⁺ T cells producing IFN- γ represented 40.9% compared to 33.6% of IL-10–producing cells (Figure 6). Other cytokines were also produced such as TNF- α (42.1%), IL-6 (41.0%), and IL-2 (39.5%) with a balance toward a proinflammatory type I response. As expected, treatment also increased the number of F4/80⁺ cells producing IL-12 (25.1%), more than eightfold compared to cells from untreated mice (3.0%) and sevenfold more IL-6 as well. Cells producing IL-4, TGF- β , and IL-13 were also represented with 12.1%, 29.5%, and 31.9%, respectively. Therefore, the combined gene therapy and drug treatment, although showing a marked proinflammatory immune response, also produced type II cytokines. The inflammation induced by DNA vaccines is then controlled by immunoregulatory cytokines. It seems that IFN- γ production is the most important cytokine for a protective effect against melanoma cells [38] and that the IFN- γ /IL-10 ratio must be >1 as in the vaccinated mice.

NK1.1⁺ T Cells Increase IFN- γ Production in Mice Given the Combined Therapy

Among splenocytes, populations of NK1.1⁺ T cells (CD3⁺NK1.1⁺, CD4⁺NK1.1⁺, and CD8⁺NK1.1⁺ cells) were also evaluated for their ability to produce IFN- γ , IL-10, and IL-13. NK1.1⁺ T cells include classic NKT cells (type I cells), nonclassic NKT cells (type II cells), and NKT-like cells. CD3⁺NK1.1⁺ cells included CD4/CD8 double-negative cells (CD4⁻CD8⁻NK1.1⁺). Cells were labeled simultaneously

with three fluorescent conjugates, and the results are summarized in Figure 7. The combined therapy used in the present work induced IFN- γ production and down-regulated IL-10 and IL-13. Accordingly, NKT cells from vaccinated mice produced much more IFN- γ than those from untreated tumor-bearing mice (Figure 7). Seemingly, a polarized immune response was induced. Type I NKT cells predominated in mice given biochemotherapy and were responsible for IFN- γ production, whereas untreated mice had more type II NKT cells that were responsible for IL-13 and IL-10 production. In these subpopulations, CD4⁺NK1.1⁺ cells were the main source of IL-13 in tumor-bearing mice, and after therapy, this production was abolished (Figure 7*B*). Cells with both markers (CD4⁺NK1.1⁺) also produced more IFN- γ than other subpopulations in vaccinated mice.

Discussion

In the present work, we report on the protective effect *in vivo* of gene therapy with plasmids expressing IL-12 and IL-13R α 2-Fc in a



Figure 5. Therapeutic effects of gene therapy with and without cyclopalladated drug 7A against subcutaneous murine melanoma. (A) Tumor development in animals vaccinated with plL-12 plus plL-13R or (B) both plasmids in association with drug 7A. (C) Survival curves with 30% tumor-free animals in the biochemotherapy protocol. C57Bl/6 mice were injected with 5×10^4 B16F10-Nex2 tumor cells; on day 2, the animals were vaccinated with plL-12; and on days 5, 10, 15, 20, 25, and 30 with plL-13R. Drug 7A was administered i.p., three times a week, 10 μ M per animal. Control groups were vaccinated with the empty plasmid. For each group, n = 10. Kaplan-Meier test for the control group (empty vectors) and the vaccinated group with both plasmids (P = .0005) or the vaccinated group with both plasmids + drug 7A (P = .0001).





Figure 6. Analysis of T lymphocyte population using FACS from tumor-bearing animals untreated (control group) and vaccinated with both plasmids in association with drug 7A. Cells were labeled with PE-conjugated anti-CD4 mAb or PE-conjugated anti-CD8 mAb. After permeabilization, intracellular detection of the cytokines was carried out with anti–cytokine biotinylated antibody and labeling with FITC-conjugated streptavidin. Data are shown as percentages of double-positive cells (CD4/CD8 and IFN- γ /L-10) and are representative of three independent experiments with similar results.

murine melanoma model. A protocol of biochemotherapy was then introduced combining immunization with both plasmids and chemotherapy with a cyclopalladated drug (7A). Biochemotherapy is a term generally used for combined treatment of biologic agents such as cytokines, antigen-pulsed DCs or lymphocytes, and chemotherapeutic drugs.

Clinical trials focusing on malignant melanoma have tested IL-2, IFN- α , and lymphokine-activated killer cells stimulated with IL-2 [39,40]. These agents showed reproducible antitumor effects but with low efficacy. Perhaps, administration of inflammatory cytokines alone (and other immune activators) is not sufficient to cause tumor regression in the presence of suppressor elements that regulate the immune response leading to a poor *in vivo* CTL activity. The administration of proinflammatory cytokines and blockade of immuno-suppressive components could be essential to the control of tumor development thus increasing the efficacy of antitumor vaccines

[41]. Here, we used gene therapy with genes encoding IL-12 and IL-13-receptor associated with chemotherapy. This combined strategy induced a protective immune response and was successful in prolonging animal survival in the B16F10-Nex2 melanoma model.

Cytokine IL-12 included in the gene therapy protocol mediates effector mechanisms of both innate and adaptive immunity to render antitumor resistance. IFN- γ and many other secondary proinflammatory cytokines induced by IL-12 have a direct toxic effect on the tumor cells and may act as antiangiogenic elements [42,43]. Mechanisms responsible for IL-12-mediated tumor rejection in several experimental models have been investigated showing that IL-12 uses a variety of effector pathways involving NK, NKT, CD4⁺, and CD8⁺ T cells. IL-12 pretreatment enhanced immunotherapy with low doses of IFN- α , and this effect was dependent on endogenous IFN- γ production [44]. Gene gun therapy with plasmid encoding IL-12 resulted in complete tumor regression or suppression of tumor growth in six tumor models, including murine B16 melanoma [35]. The involvement of CD8⁺ T cells was confirmed after in vivo depletion of these cells. Moreover, IL-12 therapy led to the generation of tumor-specific immunologic memory in at least three tumor models. These data are in agreement with the findings of Brunda et al. [45] who reported that tumor regression caused by IL-12 is mediated by CD8⁺ T cells, whereas NK cells seemed less important for antitumor effects. Another study showed that plasmid delivery of IL-12 by in vivo electroporation was an efficacious strategy against B16F10 murine melanoma. Intratumor but not intramuscular treatment resulted in the cure of 47% of tumor-bearing mice, and tumor rejection was mediated by IFN- γ , tumor-infiltrating lymphocytes, and antiangiogenic effects [46]. Natural killer T cells have also been implicated in IL-12-mediated tumor rejection [12,47]. After administration of IL-12, NKT cells were a primary functional target in vivo, and they were important for tumor rejection in at least three tumor models: B16 melanoma, Lewis lung carcinoma, and FBL3 erythroleukemia [12]. Park et al. [48] revealed other mechanisms leading to tumor rejection under IL-12 treatment, by which NK cells mediated the rejection of liver metastases, and lymphoid DCs were possibly responsible for rejection of skin tumors. Therapeutic doses of IL-12 were as effective in normal mice as in NKT-deficient mice (CD1-deficient), using one of the tumor types and the same IL-12 treatment regimen

 Table 1. Increase with Biochemotherapy for Cytokine Expressing Cells Defining a Proinflammatory Response with Low Type II Interleukins.

Cytokine Expression	Population Fold-Increase Relative to 100 Cells (95% Confidence Intervals)*
1. CD4 ⁺ plus CD8 ⁺ cells	
IFN-γ [†]	16.67 (2.938-30.408)
IL-2	3.0 (1.468-4.576)
IL-6 [†]	18.85 (2.418-27.297)
TNF-α	2.49 (1.485-3.498)
IL-4 [‡]	1.21 (0.938-1.473)
IL-13	3.0 (1.866-4.265)
TGF-β	3.56 (1.086-6.049)
IL-10	1.64 (1.007-2.276)
2. F4/80 ⁺ cells	
IL-12	5.35 (2.898-7.795)
IL-6	6.29 (3.092-9.502)
TNF-α	2.96 (1.764-4.172)

*Cytokine rates from cells of 11 pairs of treated and control (untreated) animals. [†]Significant differences between IFN- γ and IL-4 and IL-10 (*P* < .001) or IL-6 and IL-4 and IL-10 (*P* < .001 and *P* < .01, respectively).

[‡]Only CD4⁺ cells.



Figure 7. Cytokine expression in NK1.1⁺ T cells by using FACS. The splenocytes were obtained from tumor-bearing animals vaccinated with both plasmids in association with drug 7A (black bars) or injected with PBS (white bars). (A) Cells were labeled with FITC-conjugated anti-NK1.1 monoclonal antibody (mAb) and PE-conjugated anti-CD3 mAb or (B) PE-conjugated anti-CD4 mAb or (C) PE-conjugated anti-CD8 mAb. Intracellular detection of cytokines in permeabilized cells was carried out with anti-cytokine biotinylated antibody and labeled with APC-conjugated streptavidin. Data are representative of three independent experiments with similar results and show the percentage of the positive labeled cells for each cytokine within a defined subpopulation.

as Cui et al. [12]. Although their results failed to confirm an essential role of NKT cells in B16 melanoma, Park et al. [48] agreed that IL-12 can stimulate diverse mechanisms of resistance to tumors, depending on tumor cell type, tumor microenvironment, and mouse strain. In our B16F10-Nex2 system, it is clear that CD1d-dependent NKT cells are critical for antitumor response in untreated tumor-bearing mice (Dias et al., unpublished data). Type I NKT cells predominated in vaccinated mice and were responsible for IFN- γ production which is the key factor in antimelanoma immune response. Some other studies confirmed the critical role of NKT cells in antitumor response, in which NKT cells promote potent tumor rejection in response to exogenous factors such as IL-12 [49] and α -GalCer [11,50,51] as well as in the absence of exogenous stimuli [8,52]. Smyth et al. [49] demonstrated that, at high dose, IL-12 induced tumor immunity mediated preferentially by NK cells in a perforin-dependent mechanism. In B16F10 melanoma and RM-1 prostate carcinoma tumor models, a lower IL-12 dose or delayed administration of IL-12 revealed the role of NKT cells in tumor protection. Both NK and NKT cells thus seem to contribute to natural and IL-12– induced immunity against tumors, and the relative role of each population is tumor- and therapy-dependent.

Not all NK1.1⁺ T cells are classic NKT cells [53]. NK1.1⁺ T cells include type I and type II NKT cells (CD1d-dependent) and other NKT-like cells (CD1d-independent). When type I and type II NKT cells were stimulated simultaneously, type II NKT cells seemed to suppress the activation *in vitro* and the protective effect *in vivo* of type I NKT cells. Furthermore, when type I cells were absent, the suppressive effect of type II cells increased, suggesting that type I cells can control the suppressive effects of type II NKT cells in a new immunoregulatory axis [6,54].

Our strategy for antitumor immune protection through gene therapy aimed at stimulating IFN- γ production by type I NKT cells among other cells stimulated by IL-12 while suppressing the immunoregulatory properties of type II NKT cells. In fact, type II NKT cells were responsible for IL-13-mediated inhibition of tumor immunosurveillance [14]. Interleukin 13 has emerged as an important mediator of T_H2 immune response with immunoregulatory activities in many experimental models such as allergic asthma [55,56], schistosomiasis [57,58], leishmaniasis [59], nematode parasitism [60], fibrosis [26], and cancer [3-5,7,61]. IL-13 produced by CD4⁺ T cells inhibited CD8⁺ CTL [3] by inducing the production of TGF- β by CD11b⁺Gr-1⁺ myeloid-derived cells [4]. Another mechanism proposed for IL-13-mediated immunosuppression is macrophage polarization toward the M2 phenotype, inhibiting the generation of tumoricidal M1 macrophages [5]. We, therefore, engineered a construct containing the cDNA encoding IL-13 receptor chain-2 fused to the Fc region of mIgG2a and obtained the IL-13Rα2-Fc chimera DNA vaccine. As also described by Zheng et al. [37], we observed that IL-13Ra2 is regulated by its own ligand, IL-13. Macrophages stimulated with IL-13 expressed the IL-13 α 2 receptor unlike the unstimulated macrophages. Recent studies showed that therapy with soluble IL-13Ra2-Fc protein effectively stimulated antitumor immunity, enhanced vaccine efficacy, and prevented some chronic diseases [3,13,57,61]. Therefore, IL-13Ra2 may act as a "decoy receptor," suppressing the action of the IL-13, thus helping to maintain tumor immunosurveillance [3]. Presently, we show that treatment of C57Bl/6 mice with plasmid containing IL-13Ra2-Fc vaccine and/ or plasmid encoding IL-12 significantly prolonged survival of mice challenged with tumor cells and that the combined gene therapy and chemotherapy conferred a significant level of protection against B16F10-Nex2. Such therapy led to a high production of proinflammatory cytokines by CD4⁺ and CD8⁺ cells, particularly IFN- γ . Antiinflammatory cytokines were produced in greater amounts in cells from unvaccinated tumor-bearing mice. Analysis of the NKT subsets showed a type I/type II balance, as in an immunoregulatory axis [6] with cytokines being produced depending on the stimulus. It has been shown that NKT cells can produce IFN-y, IL-4, IL-10, and IL-13 [62-64]. Presently, we show that CD4⁺NK1.1⁺ cells from vaccinated mice produced threefold more IFN-y than cells from unvaccinated mice, probably by a mechanism mediated by IL-12 DNA vaccine. In addition, CD4⁺NK1.1⁺ cells from tumor-bearing mice without any vaccine treatment or exogenous stimulus produced predominantly IL-13 but did not produce detectable IFN-y, and this IL-13 production was abolished after combined therapy. After therapy with IL-12 and IL-13 receptor DNA vaccines associated with

drug 7A, cells produced IFN-y instead of IL-10 and IL-13. Recently, the existence of functionally distinct NKT cell subsets has been recognized [65]. The authors demonstrated that murine type I NKT cells that responded to α -GalCer-mediated antitumor activity are found only in the liver-derived CD4⁻CD8⁻ subset but not in the CD4⁺ subset. Spleen- and thymus-derived NKT cells did not confer similar protective responses. CD4⁺ NKT cells could be the exclusive producers of interleukins IL-4 and IL-13 on primary stimulation, whereas double-negative NKT cells had a strict T_H1 profile [63]. According to our results, CD4⁺ NKT cells can produce both T_H1 and T_H2 cytokines as also found by Gumperz et al. [66]. In conclusion, we observed a significant delay in tumor evolution and prolonged survival using a protocol of one dose of pIL-12 followed by six doses of pIL-13R and continuous treatment with cyclopalladated drug 7A, obtaining 30% of tumor-free mice. To elucidate the mechanisms that mediated the antitumor effects, we assessed the T cells producing cytokines in the tumor-bearing mice that had been vaccinated with the complete protocol. In vivo induction of proinflammatory cytokines was detected in mice given gene therapy plus chemotherapy, suggesting that it was sufficient to stimulate a strong immune response mediated by IFN- γ production. Likely IFN- γ increase was IL-12mediated and IL-13 decreased on administration of IL-13Ra2-Fc vaccine, whereas drug 7A directly killed B16F10-Nex2 tumor cells. These results can also be explained by immunoregulatory NKT cells of different subsets producing functionally distinct cytokines.

Acknowledgments

The authors thank Alexander Rakhmilevich for the IL-12 plasmid and Wagner Batista for help with molecular techniques and helpful suggestions.

References

- Thornton AM and Shevach EM (1998). CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188, 287–296.
- [2] Mosmann TR and Coffman RL (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immu*nol 7, 145–173.
- [3] Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C, Donaldson DD, Carbone DP, Paul WE, and Berzofsky JA (2000). NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R–STAT6 pathway. *Nat Immunol* 1, 515–520.
- [4] Terabe M, Matsui S, Park JM, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Chen W, Wahl SM, Ledbetter S, Pratt B, et al. (2003). Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte–mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. J Exp Med 198, 1741–1752.
- [5] Sinha P, Clements VK, and Ostrand-Rosenberg S (2005). Interleukin-13–regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis. *Cancer Res* 65, 11743–11751.
- [6] Terabe M and Berzofsky JA (2007). NKT cells in immunoregulation of tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *Trends Immunol* 28, 491–496.
- [7] Park JM, Terabe M, van den Broeke LT, Donaldson DD, and Berzofsky JA (2005). Unmasking immunosurveillance against a syngeneic colon cancer by elimination of CD4⁺ NKT regulatory cells and IL-13. *Int J Cancer* **114**, 80–87.
- [8] Crowe NY, Smyth MJ, and Godfrey DI (2002). A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. J Exp Med 196, 119–127.
- [9] Stewart TJ, Smyth MJ, Fernando GJ, Frazer IH, and Leggatt GR (2003). Inhibition of early tumor growth requires J alpha 18-positive (natural killer T) cells. *Cancer Res* 63, 3058–3060.
- [10] Zhou D (2007). OX40 signaling directly triggers the antitumor effects of NKT cells. J Clin Invest 117, 3169–3172.

- [11] Toura I, Kawano T, Akutsu Y, Nakayama T, Ochiai T, and Taniguchi M (1999). Cutting edge: inhibition of experimental tumor metastasis by dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide. *J Immunol* 163, 2387–2391.
- [12] Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I, Kaneko Y, Koseki H, Kanno M, and Taniguchi M (1997). Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12–mediated rejection of tumors. *Science* 278, 1623–1626.
- [13] Ahlers JD, Belyakov IM, Terabe M, Koka R, Donaldson DD, Thomas EK, and Berzofsky JA (2002). A push-pull approach to maximize vaccine efficacy: abrogating suppression with an IL-13 inhibitor while augmenting help with granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor and CD40L. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 13020–13025.
- [14] Terabe M, Swann J, Ambrosino E, Sinha P, Takaku S, Hayakawa Y, Godfrey DI, Ostrand-Rosenberg S, Smyth MJ, and Berzofsky JA (2005). A nonclassical non– Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for downregulation of tumor immunosurveillance. J Exp Med 202, 1627–1633.
- [15] Minty A, Chalon P, Derocq JM, Dumont X, Guillemot JC, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liauzun P, Miloux B, et al. (1993). Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature* 362, 248–250.
- [16] Zurawski G and de Vries JE (1994). Interleukin 13, an interleukin 4–like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today* 15, 19–26.
- Bochner BS, Klunk DA, Sterbinsky SA, Coffman RL, and Schleimer RP (1995).
 IL-13 selectively induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *J Immunol* 154, 799–803.
- [18] Punnonen J and de Vries JE (1994). IL-13 induces proliferation, Ig isotype switching, and Ig synthesis by immature human fetal B cells. *J Immunol* 152, 1094–1102.
- [19] Lai YH and Mosmann TR (1999). Mouse IL-13 enhances antibody production in vivo and acts directly on B cells in vitro to increase survival and hence antibody production. J Immunol 162, 78–87.
- [20] Wynn TA (2003). IL-13 effector functions. Annu Rev Immunol 21, 425-456.
- [21] Aman MJ, Tayebi N, Obiri NI, Puri RK, Modi WS, and Leonard WJ (1996). cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain. J Biol Chem 271, 29265–29270.
- [22] Hilton DJ, Zhang JG, Metcalf D, Alexander WS, Nicola NA, and Willson TA (1996). Cloning and characterization of a binding subunit of the interleukin 13 receptor that is also a component of the interleukin 4 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 497–501.
- [23] Callard RE, Matthews DJ, and Hibbert L (1996). IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same? *Immunol Today* 17, 108–110.
- [24] Donaldson DD, Whitters MJ, Fitz LJ, Neben TY, Finnerty H, Henderson SL, O'Hara RM Jr, Beier DR, Turner KJ, Wood CR, et al. (1998). The murine IL-13 receptor alpha 2: molecular cloning, characterization, and comparison with murine IL-13 receptor alpha 1. *J Immunol* 161, 2317–2324.
- [25] Kawakami K, Taguchi J, Murata T, and Puri RK (2001). The interleukin-13 receptor alpha2 chain: an essential component for binding and internalization but not for interleukin-13–induced signal transduction through the STAT6 pathway. *Blood* 97, 2673–2679.
- [26] Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, and Kitani A (2006). IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med* 12, 99–106.
- [27] Ma HL, Whitters MJ, Jacobson BA, Donaldson DD, Collins M, and Dunussi-Joannopoulos K (2004). Tumor cells secreting IL-13 but not IL-13Ralpha2 fusion protein have reduced tumorigenicity *in vivo*. Int Immunol 16, 1009–1017.
- [28] Ostrand-Rosenberg S, Clements VK, Terabe M, Park JM, Berzofsky JA, and Dissanayake SK (2002). Resistance to metastatic disease in STAT6-deficient mice requires hemopoietic and nonhemopoietic cells and is IFN-gamma dependent. *J Immunol* 169, 5796–5804.
- [29] Terabe M, Khanna C, Bose S, Melchionda F, Mendoza A, Mackall CL, Helman LJ, and Berzofsky JA (2006). CD1d-restricted natural killer T cells can down-regulate tumor immunosurveillance independent of interleukin-4 receptor-signal transducer and activator of transcription 6 or transforming growth factor-β. *Cancer Res* **66**, 3869–3875.
- [30] Macdonald TT (2006). Decoy receptor springs to life and eases fibrosis. Nat Med 12, 13–14.
- [31] Rodrigues EG, Silva LS, Fausto DM, Hayashi MS, Dreher S, Santos EL, Pesquero JB, Travassos LR, and Caires AC (2003). Cyclopalladated compounds as chemotherapeutic agents: antitumor activity against a murine melanoma cell line. *Int J Cancer* 107, 498–504.

- [32] Fidler IJ (1975). Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival *in vivo. Cancer Res* **35**, 218–224.
- [33] Gesztesi JL, Puccia R, Travassos LR, Vicentini AP, Franco MF, and Lopes JD (1996). Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis. *Hybridoma* 15, 415–422.
- [34] Davidson RC, Blankenship JR, Kraus PR, de Jesus Berrios M, Hull CM, D'Souza C, Wang P, and Heitman J (2002). A PCR-based strategy to generate integrative targeting alleles with large regions of homology. *Microbiology* 148, 2607–2615.
- [35] Rakhmilevich AL, Turner J, Ford MJ, McCabe D, Sun WH, Sondel PM, Grota K, and Yang NS (1996). Gene gun–mediated skin transfection with interleukin 12 gene results in regression of established primary and metastatic murine tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 6291–6296.
- [36] Cheng L, Ziegelhoffer PR, and Yang NS (1993). *In vivo* promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 4455–4459.
- [37] Zheng T, Zhu Z, Liu W, Lee CG, Chen Q, Homer RJ, and Elias JA (2003). Cytokine regulation of IL-13Ralpha2 and IL-13Ralpha1 in vivo and in vitro. J Allergy Clin Immunol 111, 720–728.
- [38] Rodrigues EG, Garofalo AS, and Travassos LR (2002). Endogenous accumulation of IFN-gamma in IFN-gamma-R(-/-) mice increases resistance to B16F10-Nex2 murine melanoma: a model for direct IFN-gamma anti-tumor cytotoxicity in vitro and in vivo. Cytokines Cell Mol Ther 7, 107–116. Erratum in: Cytokines Cell Mol Ther 2006; 8, 188.
- [39] Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, and Rosenberg SA (1982). Lymphokineactivated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer–resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2–activated autologous human peripheral blood lymphocytes. J Exp Med 155, 1823–1841.
- [40] Morton DL, Essner R, Kirkwood JM, and Wollman RC (2006). The skin. In Malignant Melanoma in Cancer Medicine 7. DW Kufe, RC Bast Jr, WN Hait, WK Hong, RE Pollock, RR Weichselbaum, JF Holland, and E Frei III (Eds.) BC Decker Inc., Hamilton, Ontario, pp. 1644–1662.
- [41] Finn OJ (2003). Cancer vaccines: between the idea and the reality. Nat Rev Immunol 3, 630–641.
- [42] Colombo MP and Trinchieri G (2002). Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 155–168.
- [43] Trinchieri G (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133–146.
- [44] Lesinski GB, Badgwell B, Zimmerer J, Crespin T, Hu Y, Abood G, and Carson WE III (2004). IL-12 pretreatments enhance IFN-alpha–induced Janus kinase– STAT signaling and potentiate the antitumor effects of IFN-alpha in a murine model of malignant melanoma. *J Immunol* **172**, 7368–7376.
- [45] Brunda MJ, Luistro L, Warrier RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, Wolf SF, and Gately MK (1993). Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med* **178**, 1223–1230.
- [46] Lucas ML, Heller L, Coppola D, and Heller R (2002). IL-12 plasmid delivery by *in vivo* electroporation for the successful treatment of established subcutaneous B16.F10 melanoma. *Mol Ther* 5, 668–675.
- [47] Takeda K, Seki S, Ogasawara K, Anzai R, Hashimoto W, Sugiura K, Takahashi M, Satoh M, and Kumagai K (1996). Liver NK1.1* CD4* alpha beta T cells activated by IL-12 as a major effector in inhibition of experimental tumor metastasis. *J Immunol* **156**, 3366–3373.
- [48] Park SH, Kyin T, Bendelac A, and Carnaud C (2003). The contribution of NKT cells, NK cells, and other gamma-chain–dependent non-T non-B cells to IL-12–mediated rejection of tumors. J Immunol 170, 1197–1201.
- [49] Smyth MJ, Taniguchi M, and Street SE (2000). The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *J Immunol* 165, 2665–2670.

- [50] Kitamura H, Iwakabe K, Yahata T, Nishimura S, Ohta A, Ohmi Y, Sato M, Takeda K, Okumura K, Van Kaer L, et al. (1999). The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. J Exp Med 189, 1121–1128.
- [51] Smyth MJ, Crowe NY, Pellicci DG, Kyparissoudis K, Kelly JM, Takeda K, Yagita H, and Godfrey DI (2002). Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Blood* **99**, 1259–1266.
- [52] Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY, and Godfrey DI (2000). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* **191**, 661–668.
- [53] Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, and Van Kaer L (2004). NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 4, 231–237.
- [54] Ambrosino E, Terabe M, Halder RC, Peng J, Takaku S, Miyake S, Yamamura T, Kumar V, and Berzofsky JA (2007). Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis. *J Immunol* **179**, 5126–5136.
- [55] Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, and Donaldson DD (1998). Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* 282, 2258–2261.
- [56] Grunig G, Warnock M, Wakil AE, Venkayya R, Brombacher F, Rennick DM, Sheppard D, Mohrs M, Donaldson DD, Locksley RM, et al. (1998). Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science* 282, 2261–2263.
- [57] Chiaramonte MG, Schopf LR, Neben TY, Cheever AW, Donaldson DD, and Wynn TA (1999). IL-13 is a key regulatory cytokine for T_H2 cell-mediated pulmonary granuloma formation and IgE responses induced by *Schistosoma mansoni* eggs. *J Immunol* 162, 920–930.
- [58] Mentink-Kane MM, Cheever AW, Thompson RW, Hari DM, Kabatereine NB, Vennervald BJ, Ouma JH, Mwatha JK, Jones FM, Donaldson DD, et al. (2004). IL-13 receptor alpha 2 down-modulates granulomatous inflammation and prolongs host survival in schistosomiasis. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 586–590.
- [59] Matthews DJ, Emson CL, McKenzie GJ, Jolin HE, Blackwell JM, and McKenzie AN (2000). IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. *J Immunol* 164, 1458–1462.
- [60] Urban JF Jr, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Madden KB, Morris SC, Collins M, and Finkelman FD (1998). IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity* 8, 255–264.
- [61] Park JM, Terabe M, Donaldson DD, Forni G, and Berzofsky JA (2008). Natural immunosurveillance against spontaneous, autochthonous breast cancers revealed and enhanced by blockade of IL-13–mediated negative regulation. *Cancer Immunol Immunother* 57, 907–912.
- [62] Akbari O, Stock P, Meyer E, Kronenberg M, Sidobre S, Nakayama T, Taniguchi M, Grusby MJ, DeKruyff RH, and Umetsu DT (2003). Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 9, 582–588.
- [63] Lee PT, Benlagha K, Teyton L, and Bendelac A (2002). Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. J Exp Med 195, 637–641.
- [64] Zlotnik A, Godfrey DI, Fischer M, and Suda T (1992). Cytokine production by mature and immature CD4⁻CD8⁻ T cells. Alpha beta⁻T cell receptor⁺ CD4⁻CD8⁻ T cells produce IL-4. *J Immunol* 149, 1211–1215.
- [65] Crowe NY, Coquet JM, Berzins SP, Kyparissoudis K, Keating R, Pellicci DG, Hayakawa Y, Godfrey DI, and Smyth MJ (2005). Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets *in vivo*. J Exp Med 202, 1279–1288.
- [66] Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, and Brenner MB (2002). Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* 195, 625–636.

Livros Grátis

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

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 Servico Social Baixar livros de Sociologia Baixar livros de Teologia Baixar livros de Trabalho Baixar livros de Turismo