LUIS HENRIQUE LARCHER MARCHI

TERAPIA GÊNICA VISANDO A NEUTRALIZAÇÃO DA INTERLEUCINA-10 *in vivo* COMO UMA NOVA ALTERNATIVA IMUNOTERAPÊUTICA PARA O MELANOMA MURINO B16F10-Nex2

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2009

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

LUIS HENRIQUE LARCHER MARCHI

TERAPIA GÊNICA VISANDO A NEUTRALIZAÇÃO DA INTERLEUCINA-10 *in vivo* COMO UMA NOVA ALTERNATIVA IMUNOTERAPÊUTICA PARA O MELANOMA MURINO B16F10-Nex2

Orientador: Profª. Drª. Elaine Guadelupe Rodrigues

Co-orientador: Drª. Thaysa Paschoalin

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2009

Marchi, Luis Henrique Larcher
Terapia gênica visando a neutralização da IL-10 *in vivo* como uma nova alternativa imunoterapêutica para o melanoma murino B16F10-Nex2./ Luis Henrique Larcher Marchi – São Paulo, 2009.
117 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia.
Título em inglês: Interleukin-10 *in vivo* neutralization by gene therapy as a new therapeutic approach in B16F10-Nex2 melanoma model.

1. melanoma murino B16F10-Nex2 2. IL-10
3. terapia gênica 4. células dendríticas 5. câncer

Trabalho realizado na Unidade de Oncologia Experimental (UNONEX), no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina – com auxílio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.

São Francisco de Assis, frade católico (1181-1226)

É impossível para um homem aprender

aquilo que ele acha que já sabe.

Epíteto, filósofo grego (115ac-50ac)

Aquilo que guia e arrasta o mundo não

são as máquinas, mas as idéias.

Victor Hugo, escritor francês (1802- 1885)

Aos meus pais, Luis e Suely, por todo o amor, confiança e por mais esta oportunidade.

À minha irmã, Mariana, pela presença constante em minha vida.

À minha família e amigos pelo suporte de diferentes naturezas.

A vocês, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo à minha família como um todo, que sempre me passou como base o respeito às oportunidades da vida.

À minha irmã Mariana, digo obrigado por mostrar o mundo do estudo e da dedicação, estimulando minha curiosidade embasada em fatos e em problemas. À minha mãe Suely, agradeço pela contínua motivação dos meus interesses, ressaltando novas perspectivas. Ao meu pai Luis, digo muito obrigado por me proporcionar um caminho no qual eu pude trilhar meu próprio destino, porém sempre contando com seu auxílio.

Aos diversos tios e tias mando um enorme abraço e sinto por não falar para cada um o que lhes caberia. Às primas e primos também mando um obrigado geral, mas não esquecendo do que cada um significou durante a construção da minha educação e deste trabalho. Aos meus avôs um carinhoso beijo passando conforto e tranqüilidade.

Diretamente ligada não só à realização da presente dissertação, mas também ao meu desenvolvimento científico crítico, agradeço enormemente à minha orientadora e mãe científica, Elaine. Sempre com calma, respeito e ouvidos você me proporcionou um trajeto muito rico, onde consegui resolver questões que me dão bagagem hoje em dia.

Ao professor Travassos, digo obrigado por ter me cedido um lugar em seu grupo de pesquisa e por ter dividido sua experiência e excelência.

A todo o pessoal do laboratório: Thaysa, minha amiga-mestre; Andrey, sempre pronto a ajudar muito; Carla, uma figurinha única; Fabi, com sua sabedoria prática e eficiente; Eliana, conversadora de biotério; Fizão, amigo e companheiro; Flávia, abrindo caminhos para meus experimentos; Ellen, se quebrando comigo na biomol; Bianca, sempre com uma história e uma fração; Felipe, o profeta da quebrada; Ju Piovezan, valeu, Alor; Alisson, japonês sabidinho e sempre pronto para ajudar; Ana, trazendo as novidades do mundo; Jorge, parando o laboratório e Ribeirão; Natasha, companheira de Lost; Mari, que parecia ser quieta, mas foi longe disso; Karina, pelo último gás nos Blottings; Manu, pelas risadas e sorte que trazia. E obrigado a quem mais passou por lá rapidamente e esteve ao meu lado, assim como pesquisadores de outros laboratórios.

Às pessoas que trabalharam na Disciplina de Biologia Celular, ajudando sempre, sendo a realizar meu trabalho, jogando conversa fora ou organizando festas, muito obrigado Maria, Luizão, Márcia, Marcelo, Seu Américo, Claudeci, Cláudio e Rose.

Agradeço muito também à Escola Paulista de Medicina, hoje UNIFESP, pelos anos inesquecíveis que me proporcionou, propiciando que eu conhecesse pessoas muito importantes da minha vida.

Índice

Abreviaturas..... I
Resumo..... III
Abstract..... V
Introdução..... 1
1. Melanoma, incidência e tratamento..... 1
2. Mecanismos de escape tumoral..... 2
3. Resposta imune antitumoral..... 3
4. Interleucinas e o ambiente tumoral imunossupressor..... 7
5. A Interleucina 10 (IL-10) e seu papel na resposta antitumoral.. 10
Objetivos..... 19
Materiais e Métodos..... 20
1. Cultura de células..... 20
1.1.B16F10Nex2..... 20
1.2. Macrófagos peritoniais..... 21
1.3. Macrófagos derivados de progenitores de medula óssea..... 21
1.4. Células dendríticas derivadas de progenitores de medula óssea..... 22
1.5. Esplenócitos..... 22
2. Análise de proliferação celular..... 22
3. Preparação de lisado total de B16F10-Nex2..... 23
4. Análise de moléculas de superfície e interleucinas intracelulares por citometria de fluxo (FACS)..... 23
5. Quantificação de citocinas e óxido nítrico secretados no sobrenadante de cultura..... 25
6. Animais..... 26
7. Desenvolvimento tumoral..... 27
8. Terapia Gênica..... 28
9. Transferência adotiva de células dendríticas..... 28
9.1. Transferência adotiva de células dendríticas

transfectadas *ex-vivo* com os plasmídeos pcDNA3-IL10RPe.. 29
10. Padrões moleculares de DNA..... 29
11. Construção e purificação do vetor codificante da porção extracelular do receptor de IL-10 murino (IL-10RPe)..... 30
11.1. Padronização do tempo de ativação dos macrófagos para produção de IL-10..... 30
11.2. Extração do RNA total dos macrófagos ativados..... 31
11.3. Síntese de cDNA..... 31
11.4. Amplificação da porção extracelular do receptor de IL-10 murino(IL-10RPe) por RT-PCR..... 32
11.5. Plasmídeos..... 36
11.6. Clonagem do inserto IL-10RPe no vetor pGEM-T easy 38
11.7. Subclonagem do inserto IL-10RPe no vetor pcDNA3.... 39
11.8. Métodos utilizados para purificação de plasmídeos..... 39
11.8.1. Mini-preparação por lise alcalina..... 39
11.8.2. Maxi-preparação por lise alcalina..... 40
11.8.3. Gradiente de Cloreto de Césio (CsCl)..... 41
11.9. Caracterização dos plasmídeos recombinantes..... 42
12. Transfecção de células com o plasmídeo pcDNA3-IL-10RPe e pcDNA3 controle..... 43
12.1. B16F10-Nex2..... 43
12.2. Células Dendríticas derivadas de medula óssea..... 44
13. Análise da produção de mRNA e expressão da proteína recombinante pelas células transfectadas..... 44
12.1. Imunoprecipitação..... 45
12.2. *Immunoblotting*..... 46
14. Estatística..... 47
Resultados e Discussão..... 48
1. Determinação do padrão de citocinas e sobrevida em camundongos C57Bl/6 selvagens e IL-10KO naturalmente resistentes e susceptíveis a um desafio com células de melanoma murino B16F10-Nex2..... 48

1.1. Camundongos C57BL/6 selvagens..... 48
1.2. Desenvolvimento do melanoma murino B16F10-Nex2 em camundongos geneticamente deficientes em IL-10 (IL-10KO): comparação com animais C57BL/6 selvagens..... 55
1.3. Caracterização de células apresentadoras de antígenos (CAAs) de animais selvagens e IL-10KO, envolvidas na resposta protetora natural contra o melanoma murino B16F10-Nex2..... 65
1.4. Papel das células dendríticas na maior proteção observada em animais geneticamente deficientes em IL-10..... 71
2. Clonagem da porção extracelular do receptor de IL-10 (IL-10RPe)..... 78
2.1. Padronização do ensaio para obtenção de mRNA a partir de macrófagos ativados com LPS para clonagem do mini-gene da porção extracelular do receptor da IL-10..... 78
2.2. Obtenção do cDNA e amplificação do gene do receptor da IL-10 murina..... 81
2.3. Clonagem do inserto IL-10Pe em vetor de expressão procariótico, para obtenção da proteína recombinante.. 90
2.4. Clonagem do inserto IL-10RPe em vetor de expressão eucariótico, para tratamento de animais in vivo..... 97
3. Expressão da proteína recombinante IL-10RPe pelo vetor eucariótico pcDNA3..... 101
4. Terapia Gênica *in vivo* com plasmídeo pcDNA3-IL10RPe..... 107
5. Papel das células dendríticas na neutralização sistêmica da IL-10 com o plasmídeo pcDNA3-IL10RPe..... 117
Conclusões..... 122
Bibliografia..... 124

ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
CAA	Células apresentadoras de antígeno
CD	*Cluster Definition*
cDNA	DNA complementar
CTL	Linfócitos T Citotóxicos
CTLA-4	Antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos
DC	Célula Dendrítica
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
FACS	Citometria de fluxo
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Monócitos
HLA	Antígenos dos leucócitos humanos
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-10KO	Camundongos geneticamente deficientes (*knockout)* na expressão de interleucina 10
IL-10Pe	Região gênica referente à porção extracelular do receptor de interleucina 10 (sem o peptídeo sinal)
IL-10R	Receptor de interleucina 10
IL-10RHo	Região gênica referente à porção 3' do receptor de interleucina 10
IL-10RPe	Porção extracelular do receptor de interleucina 10, contendo peptídeo sinal
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
mRNA	RNA mensageiro
NK	*Natural killer*
NO	Óxido nítrico
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salina
pcDNA3-IL10RPe	Plasmídeo pcDNA3 para expressão porção extracelular do receptor de interleucina 10

PCR	Reação em cadeia da polimerase
pIL-12	Plasmídeo de expressão de interleucina 12
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetato
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa em cadeia
siRNA	Pequenos RNAs de interferência
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TGF	Fator de transformação de crescimento
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
WT	Selvagem (*wild type)*

Resumo

Citocinas do tipo 2 estão presentes em fases mais avançadas do desenvolvimento de diversos tumores humanos, funcionando em alguns casos como fatores prognósticos de neoplasias. O desenvolvimento do melanoma murino B16F10 está relacionado a um aumento na produção de IL-10 por células NK e linfócitos T $CD4^+$ e uma diminuição acentuada na produção de IFN-γ por essas células, nas fases mais avançadas da progressão tumoral.

Embora o modelo singeneico do melanoma murino B16F10-Nex2 apresente baixa imunogenicidade *in vivo*, uma pequena porcentagem de camundongos C57Bl/6 são naturalmente resistentes ao desenvolvimento subcutâneo desse tumor, mesmo após mais de uma inoculação das células tumorais. Animais naturalmente resistentes produziram maiores concentrações de IFN-γ e animais susceptíveis ao tumor produziram maiores concentrações de interleucinas anti-inflamatórias, IL-10 e IL-6.

Confirmando o papel imunoregulador negativo da IL-10 na resposta imune protetora natural desse modelo, camundongos geneticamente deficientes em IL-10 (IL-10KO) foram mais resistentes à implantação subcutânea de células B16F10-Nex2. Animais que resistiram à progressão tumoral produziram uma resposta protetora com perfil de citocinas do tipo 1 (IFN-γ e IL-12), e a proteção foi dependente de IFN-γ.

Macrófagos e células dendríticas de animais IL-10KO após estímulo *in vitro* com antígenos do melanoma B16F10-Nex2 apresentaram maior produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN-γ, TNF-α e IL-12) e uma maior expressão de marcadores de ativação celular (MHCII, CD40, CD80 e CD86). Com a transferência adotiva de células dendríticas IL-10KO, mas não IL-10

competentes, associadas a um lisado de células B16F10-Nex2, animais C57Bl/6 foram protegidos contra o desenvolvimento tumoral, sugerindo que células dendríticas que não expressam IL-10 sejam responsáveis pela indução da resposta protetora natural mais eficiente observada em animais IL-10KO.

Tendo em vista o papel imunossupressor da IL-10 na resposta protetora induzida pelo melanoma B16F10-Nex2, foi construído um vetor plasmidial eucariótico contendo o mini-gene referente à porção extracelular do receptor da IL-10 murina, a ser utilizado em protocolos de terapia gênica para neutralização da IL-10 *in vivo* pela expressão de um receptor *decoy* da interleucina.

Animais tratados com o plasmídeo recombinante apresentaram aumento na sobrevida, em um efeito dependente de IFN-γ e potencializado pela associação de uma terapia gênica adjuvante para produção de IL-12.

Células dendríticas de animais C57Bl/6 foram transfectadas com esse plasmídeo recombinante, associadas a antígenos tumorais e transferidas adotivamente à animais C57Bl/6, que foram subsequentemente desafiados com células tumorais subcutaneamente. Essas células, que tiveram o IL-10 neutralizado pelo receptor *decoy*, induziram resposta protetora significativamente mais eficiente que as células controle transfectadas com o plasmídeo vazio, sugerindo que essas células estejam envolvidas *in vivo* na indução da resposta protetora observada após a imunização com o plasmídeo recombinante e neutralização da IL-10 sistêmica.

Concluímos que a terapia gênica desenvolvida foi eficaz na neutralização da IL-10 sistêmica, podendo ser aplicada como uma nova alternativa imunoterapêutica antitumoral.

Abstract

Type 2 cytokines are increased in late phases of several human tumors, and in some cases are considered prognostic factors for these neoplasias. Late development phases of murine melanoma B16F10 correlate with an increased production of IL-10 by NK cells and CD4+ T lymphocytes, and also with a decreased production of IFN-γ by these cells.

Syngeneic murine melanoma B16F10-Nex2 shows low immunogenicity *in vivo*, however, a small percentage of C57Bl/6 mice are naturally resistant to subcutaneous tumor development, even after several tumor cell inoculations. Naturally resistant animals produced higher concentrations of IFN-γ and tumor susceptible animals produced higher concentrations of anti-inflammatory cytokines, IL-10 and IL-6.

The immunoregulatory role of IL-10 on the natural protective immune response induced in this model was confirmed by the increased resistance to tumor development observed in IL-10 genetically-deficient mice (IL-10KO) subcutaneously inoculated with B16F10-Nex2 cells. A type 1 immune reponse (IFN-γ and IL-12) was induced in resistant IL-10KO animals, and the protection was IFN-γ-dependent.

IL-10KO macrophages and dendritic cells stimulated *in vitro* with B16F10-Nex2 melanoma antigens secreted higher concentrations of pro-inflammatory cytokines (IFN-γ, TNF-α e IL-12), and expressed an increased amount of surface activation markers (MHCII, CD40, CD80 e CD86). Adoptive transfer of IL-10KO dendritic cells, but not IL-10-competent cells, in association with tumor antigens, induced a protective response in C57Bl/6 mice, suggesting that IL-10-negative dendritic cells induce the efficient protective response observed in IL-10KO animals.

As IL-10 showed a clear immunosuppressive role on the natural protective response induced by B16F10-Nex2 cells, we constructed an eukaryotic plasmidial vector carrying the murine IL-10 receptor extracellular portion gene, to be used in gene therapy protocols for IL-10 neutralization *in vivo* by the expression of a decoy receptor.

Recombinant plasmid-treated animals showed an IFN-γ-dependent increased survival, and this protective effect was augmented by the association with an adjuvant IL-12 gene therapy

Dendritic cells from C57Bl/6 animals were transfected with recombinant plasmid, adoptively transferred to C57Bl/6 mice, and treated animals were challenged subcutaneously with B16F10-Nex2 tumor cells. Interleukin-10-neutralized dendritic cells induced a significantly increased survival, as compared to IL-10-containing dendritic cells, suggesting that dendritic cells induce the protective response observed *in vivo* after recombinant plasmid immunization and systemic IL-10 neutralization.

We concluded that gene therapy using a plasmid expressing the IL-10 receptor extracellular region was effective on systemic IL-10 neutralization, and this tool could be used as a novel antitumor immunotherapeutic alternative.

Introdução

1. Melanoma, incidência e tratamento

Atualmente, uma das grandes preocupações das agências mundiais de saúde é a alta incidência de casos de câncer na população. Os esforços estão centrados no diagnóstico precoce, possibilitando controle, tratamento e/ou retirada da neoplasia com melhores chances de sobrevida para o paciente.

Um de cada três cânceres diagnosticados no mundo está localizado na pele, resultando em aproximadamente 3 milhões de novos casos relatados a cada ano (Organização Mundial da Saúde, 2009a). Dentre os vários tipos de câncer de pele, o melanoma é responsável por cerca de 130 mil novos casos anuais. Apesar de ser o tipo de câncer de pele menos incidente, é o mais agressivo, com as maiores taxas de mortalidade (Organização Mundial da Saúde, 2009b).

O principal fator de risco relacionado com o aparecimento da lesão primária cutânea do melanoma é a exposição prolongada à radiação ultravioleta solar. A exposição recreativa e o histórico de queimaduras provocadas pelo sol são geralmente relatados nos casos de melanoma (Organização Mundial da Saúde, 2009b). Mas, apesar da relativa facilidade de controle de exposição a esse fator de risco, a incidência mundial continua a crescer.

Nas fases iniciais do melanoma, nas quais a neoplasia se apresenta em lesões primárias cutâneas superficiais, a retirada cirúrgica é realizada com sucesso. Porém, em fases mais avançadas, com o aparecimento de lesões cutâneas mais profundas, distantes e metástases, as abordagens

terapêuticas disponíveis não são efetivas. Nesse estágio, raros casos são tratados com sucesso, resultando em morte dos portadores da neoplasia.

Geralmente, os tratamentos baseiam-se na utilização de quimio e/ou radioterapia. Mais recentemente, alguns componentes imunológicos como o interferon gama (IFN-α) e a interleucina 2 (IL-2) tem sido administrados como adjuvantes no tratamento bioquimioterápico do melanoma (Puré et al., 2005). Esse tratamento adjuvante visa reverter o balanço pró-tumoral da resposta imune induzida, ativando células imunes protetoras em alguns pacientes, diminuindo as doses, e consequentemente, a alta toxicidade dos quimioterápicos. O melanoma é um dos tumores que melhor responde a tratamentos imunoterápicos.

2. Mecanismos de escape tumoral

Diversos fatores podem explicar uma resposta ineficaz dos tratamentos aplicados aos tumores. Dentre eles, podem ser destacados os mecanismos de resistência de células tumorais às drogas citotóxicas e aos componentes efetores do sistema imune.

As células neoplásicas podem expressar em sua superfície antígenos tumorais (neo-antígenos, superexpressão de moléculas presentes em células normais, glicoproteínas com glicosilação aberrante, entre outros), que são capazes de gerar uma resposta imune específica antitumoral (Boon et al., 1996; Rosenberg 2001). No entanto, as células tumorais utilizam recursos que visam neutralizar as ações efetoras do sistema imune, mecanismo conhecido como Escape Imunológico.

O reconhecimento de antígenos tumorais por células do sistema imune é evitado pela expressão diminuída ou até abolida de moléculas de

processamento TAP1 e de apresentação MHC de classe I pelas células tumorais (Maeurer et al., 1996) ou ainda por perda da expressão de antígenos imunodominantes, tornando-as pouco imunogênicas (Chapman, 2007). As células neoplásicas podem ainda produzir citocinas e moléculas de superfície que desregulam diversos mecanismos, favorecendo o desenvolvimento tumoral. Alguns exemplos de mecanismos que podem ser alterados são: crescimento e proliferação das células tumorais, interações célula-célula, angiogênese e resposta imune efetora antitumoral (Redondo et al., 2003; Chapman, 2007; Polak et al., 2007).

Um das estratégias que as células tumorais utilizam para modular o sistema imune é a secreção de interleucinas imunossupressoras, principalmente IL-10, IL-13 e TGF-β (Dunn et al., 2004). A ação destes mediadores pode, por exemplo, gerar células apresentadoras de antígenos com baixa capacidade de indução de resposta antitumoral, resultando em baixa proliferação, baixa citotoxicidade, maturação de células T reguladoras ou até em anergia clonal (Baumgartner et al., 2007; Ilkovitch & Lopez, 2008).

3. Resposta imune antitumoral

A resposta imune antitumoral envolve diversos fatores da resposta imune inata e da resposta adaptativa. Entretanto, a resposta induzida contra um tumor em desenvolvimento está longe de ser efetiva, muitas vezes selecionando variantes celulares tumorais não mais susceptíveis aos fatores imunes antitumorais produzidos, efeito conhecido como Imunoedição (Dunn et al., 2004).

A resposta inata antitumoral é dependente de macrófagos, células NKT e NK.

Em modelos experimentais, as células NK ativadas por IFN-γ e IL-2, são importantes para a prevenção da disseminação e do aparecimento de metástases tumorais (Whiteside & Herberman, 1995). Estas células eliminam células tumorais opsonizadas por IgG específicas antitumorais devido à expressão de receptores para a porção Fc das imunoglobulinas (receptor Fc-III ou CD16). Por outro lado, células NK também podem favorecer o desenvolvimento tumoral, sendo que as células NK2, secretoras de interleucinas do tipo 2 (IL-10 e IL-4), foram fortemente associadas ao desenvolvimento tumoral (Wei et al., 2005).

Células NKT, um linfócito CD1-restrito, são também implicadas em uma resposta antitumoral. Células NKT do tipo I (iNKT, que apresentam o receptor Vα14 invariante), quando ativadas, influenciam funções de várias células, incluindo células dendríticas, células NK, células T $CD4^+$ T_H1 e células T $CD8^+$ combatendo o tumor. De forma contrária, os linfócitos NKT do tipo II (que apresentam receptor não-Vα14 heterogêneo) tem potencial capacidade de suprimir a resposta imune por variadas vias (Seino et al., 2006). Foi demonstrado recentemente pelo nosso grupo que os glicoesfingolipídeos iGb3 (Galα1-3Galβ1–4Glcβ1–1Cer) e iGb4 (GalNAcβ1-3Galα1-3Galβ1–4Glcβ1–1Cer) presentes no tumor podem ativar *in vitro* células iNKT, quando apresentados por células dendríticas. A transferência passiva de células dendríticas ativadas *in vitro* com os glicoesfingolipideos eliminou o crescimento tumoral *in vivo* (Dias et al, 2009).

Macrófagos também podem regular positiva ou negativamente a resposta antitumoral. Macrófagos adotivos podem facilitar a formação de

metástases (Gorelik et al., 1982, 1985), assim como macrófagos tumor-associados (TAMs), podem induzir angiogênese, produzindo também estroma e fatores estimulantes ao crescimento do tumor (Hussein, 2006). Por outro lado, alguns modelos mostram que essas células, quando devidamente ativadas, produzem fatores como IFN-γ, TNF-α, óxido nítrico (NO) e intermediários reativos de oxigênio (ROI), os quais possuem alta atividade antitumoral (Tendler et al., 2001). Um mecanismo pró-tumoral de fusão entre células tumorais e TAMs foi proposto e já observado em diversos modelos tumorais experimentais, além de dois casos em humanos (Pawelek et al., 2006).

O desenvolvimento da imunologia tem revelado o papel crucial das células dendríticas na geração da resposta imune protetora contra doenças infecciosas e tumores (Steinman & Banchereau, 2007), dada a sua capacidade de fazer o elo entre a resposta imune inata e a adaptativa, podendo ativar células T e B *naïves* (Banchereau & Steinman, 1998).

Por meio de moléculas coestimuladoras e da produção de mediadores solúveis, as células dendríticas são capazes de gerar células efetoras em uma resposta antitumoral. Porém, por si só, a presença destas células no microambiente ou na periferia tumoral não é indicadora de resposta efetiva, pois geralmente nesse microambiente elas são funcionalmente deficientes (Gottfrieda et al., 2008).

A resposta imune adaptativa efetiva contra tumores sólidos é geralmente relacionada ao desenvolvimento de uma reposta do tipo 1, com produção de IFN-γ e IL-12, enquanto a progressão tumoral é acompanhada por resposta do tipo 2, com produção de IL-4, IL-10 e IL-13 (Kawakami et al., 1994; Zitvogel et al., 1996; Mosmann & Sad, 1996; Tsung et al., 1997;

Aruga et al., 1997; Lowes et al., 1997; Winter et al., 2003; Wei et al., 2005).

Os linfócitos B podem ser ativados e produzir anticorpos tumor-específicos, responsáveis por mecanismos de lise complemento-dependentes ou mediadores de reações de ADCC (dependente de células NK e macrófagos). No entanto, a participação dos linfócitos B na resposta antitumoral ainda não está totalmente esclarecida. Inoue et al (2006) demonstraram que a ausência dessas células *in vitro* ou *in vivo* pode aumentar a atividade citotóxica contra alguns tumores, pelo decréscimo da produção de IL-10 resultante da presença de antígenos tumorais. E ainda, a presença da subpopulação B-1, que secreta IL-10, é correlacionada com a ocorrência de metástases em melanoma experimental e humano (Staquicini et al., 2008).

Em geral, células T $CD4^+$ helper não apresentam citotoxicidade direta para os tumores, mas quando as células do tipo T_H1 são ativadas podem liberar TNF-α e IFN-γ, aumentando a expressão de moléculas de MHC classe I e a sensibilidade à lise por CTLs das células tumorais (Abbas et al., 2000). Além disso, o IFN-γ produzido pode apresentar uma ação direta sobre as células tumorais (Rodrigues e Travassos, 2003). Por outro lado, as células T $CD4^+$ podem, por exemplo, secretar citocinas imunossupressoras e inibir proliferação de linfócitos T, comprometendo a efetividade da resposta antitumoral (Vence et al., 2007).

As células T $CD8^+$ citotóxicas (CTLs) são as mais frequentemente citadas como principais efetoras da resposta imune específica antitumoral (Leitch et al., 2004; Zhang & Huang, 2008), embora, dependendo do modelo estudado, as outras populações celulares do sistema imune tenham

participação importante na eliminação das células tumorais. Os protocolos de vacinação antitumoral utilizados até o momento tem como objetivo a indução desta subpopulação celular, mas, tanto a possibilidade de indução como a capacidade efetora é muito variada entre os pacientes.

As CTLs derivadas de linfócitos infiltrantes tumorais, expandidas *in vitro* e transferidas adotivamente, conseguem melhorar a resposta antitumoral em humanos após linfo-depleção quimioterápica (Rosenberg & Dudley, 2004). Foi mostrado também que, após transferência autóloga de linfócitos T periféricos geneticamente modificados com vetor retroviral contendo genes de TCRs reativos com 4 antígenos associados ao tumor (TAA), altos níveis destes linfócitos circulantes foram detectados 1 ano após o procedimento, com alguns pacientes demonstrando regressão objetiva de lesões metastáticas de melanoma (Morgan et el, 2006).

Vários estudos demonstraram que a presença linfócitos tumor-infiltrantes pode ser relacionada a um melhor prognóstico, porém nem sempre isso é verdadeiro, e a qualidade mais do que a quantidade dessas células parece ser determinante de respostas mais efetivas (Yu & Fu, 2006).

4. Interleucinas e o ambiente tumoral imunossupressor

Enquanto pacientes normais e responsivos a terapias apresentam uma produção de citocinas do tipo 1 (Winter et al., 2003 e Shultz et al., 2004), portadores de melanoma avançado mostram um claro perfil de citocinas do tipo 2 (Lauerova et al., 2002), com altos títulos de IL-10 (Redondo et al., 2003).

Embora seja possível induzir uma resposta específica ao tumor por meio de vacinações com antígenos tumor-específicos, principalmente

constituída por linfócitos B, T $CD8^+$ e T $CD4^+$, processos reguladores fisiológicos que protegem o organismo contra a autoimunidade e a hiperinflamação podem agir no microambiente tumoral e serem responsáveis por facilitar o escape e a progressão tumoral.

A rejeição de células tumorais *in vitro* já foi associada à presença de IL-1α (Saito et al., 1995), IL-2 (Wojtowicz Praga et al., 1996), IL-4 (Blaya et al., 1996), IL-10 (Gerard et al., 1996), IL-12 (Teicher et al., 1996), GM-CSF (Sampson et al., 1996), TNF-α (Saito et al., 1995), e IFN-γ (Rodrigues & Travassos, 2003). A administração de algumas destas citocinas em protocolos clínicos é uma estratégia que vem sendo explorada (Kim-Schulze et al., 2007), porém nem sempre essa estratégia é bem sucedida, gerando em alguns casos efeitos não desejados e até respostas deletérias (Pawelec, 2004; Ascierto et al., 2006). Estas evidências mostram uma complexidade na geração de uma resposta efetora, possivelmente pela interferência de outros fatores que favorecem a progressão tumoral.

É importante ressaltar que fatores classicamente antitumorais, em diferentes condições, podem se mostrar ineficazes ou até mesmo pró-tumorigênicos. Alguns desses fatores se destacam, como por exemplo, IL-2 (também pró-apoptótico para células T ativadas), IFN-γ (pela indução de ligantes inibitórios para células T e NK), inibição da angiogênese (pela indução de fatores de crescimento promotores de metástase mediada por hipóxia) e citotoxicidade mediada por radicais livres liberados por macrófagos (inibitórios para células T) (Pawelec, 2003).

O tumor é capaz de induzir, direta ou indiretamente, células T reguladoras (principalmente com o fenótipo $CD4^+CD25^+$), que bloqueiam a ativação de uma resposta imune efetora (Yu & Fu, 2006). Essas células

induzem anergia via contato (através da ligação do CTLA-4) ou secreção de fatores solúveis (IL-10 e TGF-β) (Knutson et al., 2007), afetando principalmente os linfócitos citotóxicos específicos contra as células tumorais (Schuster et al., 2006).

As interleucinas imunossupressoras foram implicadas como responsáveis pelo desenvolvimento tumoral em vários modelos animais e em tumores humanos, agindo tanto como fatores de crescimento autócrino como moduladores negativos na resposta imune antitumoral induzida no hospedeiro. Dentre as interleucinas imunossupressoras destacam-se a IL-10, o TGF-β e a IL-13 (Terabe et al., 2000; Monti et al., 2004; Hussein, 2005; Park et al., 2005), geralmente presentes durante uma resposta imunológica do tipo 2.

Utilizando-se plasmídeo de expressão eucariótica ou mesmo a proteína recombinante referente à porção de ligação de receptores de interleucinas foram geradas respostas funcionais, como as de redução da concentração do ligante livre. Foram descritos receptores *decoys* para quimiocinas, para a IL-1, no sistema IL-1/IL-1RI, para a família dos receptores de TNF e para a IL-22 no sistema IL-22/IL-10Rβ-IL-22Rα (Mantovani et al., 2001).

Nosso grupo demonstrou recentemente que a neutralização *in vivo* da IL-13 por terapia gênica, utilizando uma quimera formada pela cadeia α2 de alta afinidade do receptor de IL-13 e pela porção Fc de uma IgG murina expressa em um plasmideo eucariótico, que funcionou como um receptor *decoy in vivo*, foi capaz de retardar o desenvolvimento do melanoma murino B16F10-Nex2, proteção potencializada por concomitante terapia

gênica com IL-12 e quimioterapia com um composto ciclopaladado (Hebeler-Barbosa et al., 2008).

A ligação de interleucinas com receptores *decoy* também já foi utilizada para neutralizar outras citocinas imunossupressoras. Em terapia gênica utilizando quimera constituída do domínio extrcelular do receptor tipo II do TGF-β associado à porção Fc de IgG humana no modelo de tumor E.G7 (células de linfoma murino EL-4 transfectadas com ovalbumina) foi possível alcançar 70% de proteção nos camundongos tratados (Kontani et al., 2006). Utilizando-se a porção extracelular recombinante solúvel da cadeia α do receptor de IL-10 em culturas *in vitro* de células dendríticas ativadas com IFN-α, observou-se um aumento nos níveis de IL-12 produzida por essas células (Svane et al., 2006). Esses resultados mostram que este tipo de abordagem pode levar à neutralização de citocinas imuossupressoras e à modulação eficaz de respostas protetoras antitumorais.

5. A Interleucina 10 (IL-10) e seu papel na resposta antitumoral

Fiorentino et al (1989) foram os primeiros a descrever uma citocina que era produzida por clones de células T helper 2 (T_H2) e que inibiu a síntese de IFN-γ produzida por clones T_H1. Essa citocina, a IL-10, é principalmente produzida por macrófagos, mas também pode ser produzida por uma grande variedade de tipos celulares, incluindo células T, células B, monócitos, queratinócitos, células tumorais e também por células dendríticas, sendo sua principal ação a regulação negativa da resposta imune pró-inflamatória (Wolk et al., 2002).

Estudos demonstraram que os efeitos imunossupressores da IL-10 são frequentemente relacionados com sua ação sobre CAAs e células T, regulando negativamente a produção de IFN-γ e IL-2. IL-10 também inibe a expressão de algumas citocinas por monócitos e macrófagos, por exemplo, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-12, TNF-α, GM-CSF, G-CSF, reativos intermediários de oxigênio (de Waal Malefyt et al., 1991; Bogdan et al., 1991; Fiorentino et al., 1991; D'Andrea et al., 1993), moléculas de MHC classe I, moléculas B7, e ICAM-1 (Matsuda et al., 1994).

A ação autócrina da IL-10 pode induzir anergia antígeno-específica em células T em várias situações, como em exposição natural a antígenos, em imunoterapia específica e em diversos estados patológicos humanos e murinos (Akdis et al., 1996; Akdis & Blaser, 1999; Enk et al., 1994; Bacetta et al., 1994; Becker et al., 1994).

Um importante papel da IL-10 é sua ação inibitória na maturação e na função de DCs (células dendríticas), podendo diminuir a expressão de moléculas CD1 (a, b, c e d) (Gerlini et al., 2004), de moléculas apresentadoras de antígenos MHC classe II, de moléculas de ativação CD40 e de moléculas coestimuladoras CD80 e CD86 (McBride et al., 2002; He et al., 2005). Além disso, na presença de IL-10, também foi mostrada uma menor produção de IL-12 e IFN-γ, diminuindo a capacidade de geração de reposta protetora do tipo 1 (He et al., 2005; Corinti et al., 2001; Igietseme et al., 2000; Chhabra et al., 2008).

Células dendríticas sob influência de IL-10 podem induzir imunossupressão em células $CD8^+$ (Munn et al., 2002; Taylor et al., 1991) e processos de tolerância periférica, originando células T anérgicas (Steinbrink et al., 2002; Steinman et al., 2003), além de diminuir a rejeição

de enxertos (Li et al., 2006). As células T reguladoras geradas nesse processo diminuem a atividade antitumoral de CTLs e de células NK por meio de interações célula-célula ou pela secreção de IL-10 e TGF-β, podendo ser utilizadas como ferramenta imunoterápica em processos alérgicos ou auto-imunes (Seo et al.,1999, Fickenscher et al.,2002, Levings et al.,2002).

Apesar do potencial de utilização de células dendríticas para a indução de uma reposta antitumoral (Fields et al., 1998; Zhang & Huang, 2008), estas células podem facilitar o desenvolvimento de uma resposta não-protetora do tipo 2 (McCarter et al. 2005). O ambiente supressor existente durante o desenvolvimento tumoral pode explicar falhas no combate ao tumor, inclusive em protocolos terapêuticos utilizando células dendríticas pulsadas com diversas preparações de antígenos e administradas em diferentes vias, tanto em modelos animais quanto em protocolos clínicos (Nestle et al., 2005; Lesterhuis et al., 2008)

Alguns grupos mostraram que a presença ou ausência da IL-10 pode ser explorada para a modulação de células dendríticas usadas em diversos tipos de vacinação.

Em um modelo experimental de miocardite autoimune, a vacinação com células dendríticas transfectadas com o gene da IL-10 e antígenos específicos propiciou função cardíaca melhorada e menor infiltrado inflamatório no miocárdio, caracterizados por maior presença de citocinas do tipo 2 em relação a citocinas do tipo 1 (Yang et al., 2006).

Células dendríticas geneticamente deficientes para IL-10 foram utilizadas em protocolos de vacinação *in vivo* contra infecções bacterianas (Igietseme et al., 2000) e células tumorais (Chen et al., 2007). Células

dendríticas que tiveram a produção de IL-10 silenciada por oligonucleotídeo *antisense* produziram mais IL-12 e geraram *in vitro* CTLs contra o epítopo associado ao melanoma humano (MART-1) que apresentaram uma melhor resposta citotóxica antígeno-específica (Chhabra et al., 2008).

No final de 2006, antes da publicação do artigo de Chen et al (2007), esse grupo depositou uma patente abordando a utilização de células dendríticas modificadas geneticamente (com siRNA, RNA antisense, DNA antisense, microRNA ou ainda com ácidos nucleicos com atividade enzimática que tem como alvo o mRNA codificante do gene de interesse) visando o bloqueio ou menor expressão de citocinas imunossupressoras que incluem, mas não se limitam a, IL-10, TGF-β, IL-27, IL-35 e suas combinações, e também de agentes tolerogênicos incluindo, mas não se restringindo, à enzima indoleamine-2, 3-dioxigenase (IDO). Métodos imunoterápicos baseados em células dendríticas abordando bloqueio da atividade da IL-10 também foram incluídos (Huang et al., 2006, Patente USPTO).

A IL-10 pode também apresentar um efeito pró-tumoral direto, atuando como fator de crescimento para células tumorais e também diminuindo a expressão de moléculas de HLA na superfície das células tumorais, eliminando a atividade dos linfócitos T citotóxicos $CD8^+$ (Yue et al., 1997).

Foi demonstrado que em pacientes com melanoma metastático, o nível de IL-10 sérico está aumentado, assim como os níveis de β-FGF, TGF-β e VEGF (Redondo et al., 2003), com menores quantidades sendo detectadas em pacientes com lesões primárias e localizadas (Gerlini et al.,

2004). Os altos níveis de IL-10 sérico demonstraram forte correlação com a sobrevida reduzida dos pacientes (Nemunaitis et al., 2001).

Por outro lado, embora a atividade imunossupressora da IL-10 tenha sido observada na maioria dos estudos experimentais e clínicos, foi demonstrado que a produção de IL-10 por linfócitos T reguladores ($CD4^+CD25^+$) foi capaz de reduzir a carcinogênese mediada por reação inflamatória em cólon intestinal murino (Erdman et al., 2003), corroborando a complexa relação entre o desenvolvimento tumoral e resposta imune do indivíduo.

No modelo experimental de melanoma murino B16, células tumorais foram transfectadas com o gene da IL-10 murina e foi observado um aumento no crescimento tumoral por estímulo da proliferação de células tumorais, aumento da angiogênese e imunossupressão (Garcia-Hernandez et al., 2002).

Em tumores no início do crescimento do melanoma B16, a IL-10 produzida por células T reguladoras infiltrantes de fenótipo T_H3 ou Tr1 autocrinamente induz a produção de TGF-β, o que reduz o número de CTLs, levando ao crescimento tumoral acentuado (Seo et al., 2001).

Contrariamente, ainda no melanoma murino B16, a IL-10 pode apresentar efeitos inibitórios do crescimento tumoral.

Células B16F10 transfectadas com o gene da IL-10 murina apresentaram menor crescimento *in vivo* que células não transfectadas, efeito dependente da quantidade de interleucina secretada pelas células tumorais. O mecanismo envolvido nesse efeito não foi investigado (Walos et al., 1999). Foi também demonstrado que células B16F1 transfectadas com vetor viral contendo o gene da IL-10 perdem a tumorigenicidade, efeito

dependente de linfócitos T $CD8^+$ e células NK. Animais inoculados com essas células se tornam protegidos contra um desafio com células parentais não transfectadas, sugerindo a indução de uma resposta vacinal protetora (Gerard et al., 1996). O tratamento de animais com a proteína IL-10 pode induzir uma resposta protetora anti-metastática dependente de células NK (Zheng et al., 1996).

À medida que o melanoma murino B16 se desenvolve no tecido subcutâneo, há um acréscimo na expressão de IL-10 e um decréscimo na produção de IFN-γ por esplenócitos. A produção de IL-10, produzida por células NK e linfócitos T $CD4^+$, foi inversamente proporcional ao desenvolvimento tumoral (Wei et al., 2005). Estes resultados sugerem uma polarização para um perfil de citocinas do tipo 2 durante a evolução tumoral, na qual a resposta protetora (do tipo 1) estaria comprometida.

O efeito imunossupressor da IL-10 foi demonstrado em outros modelos tumorais. A secreção de IL-10 por $CD4^+$ infiltrantes do tumor estimula a expressão da molécula inibitória CTLA-4, causando a inibição da secreção de IFN-γ e promovendo o desenvolvimento do tumor em um modelo de mieloma murino. O bloqueio de CTLA-4 reverteu esse efeito (Jovasevic et al., 2004). Da mesma forma, o bloqueio de IL-10 produzido pelas células tumorais com anticorpos monoclonais específicos, utilizado como adjuvante no tratamento com OK-432 (Picibanil®, uma mistura da cepa Su de baixa virulência do *Streptococcus pyogenes* grupo A que perdeu a capacidade de produzir estreptolisina S, e de Penicilina G potássica) aumentou a sobrevida de camundongos inoculados com células de câncer de mama, pelo aumento na população de células T_H1 (Hihara et al., 1999).

A função fisiológica da IL-10 está relacionada, sobretudo, com a regulação e o término de respostas inflamatórias, juntamente com o controle de diferenciação e proliferação de células T, B, apresentadoras de antígenos, mastócitos e granulócitos. Ela pode inibir a produção e ação de uma variedade de citocinas pro-inflamatórias, como IL-2, IFN-γ, TNF-α, IL-1, IL-6, e IL-12 (Moore et al., 1993, de Waal Malefyt et al., 1991), inibindo a reposta imune mediada por células e concomitantemente fortalecendo a resposta imune humoral não protetora dependente das interleucinas anti-inflamatórias IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Jones et al., 2002).

O receptor de IL-10 (IL-10R) é um componente da classe II (receptor de interferon (IFNR)-like) da família dos receptores de citocinas compreendendo uma região extracelular de 215 aminoácidos organizados em dois domínios de ligação, uma região transmembrana de 25 aminoácidos, e uma região intracelular de 317 aminoácidos (Ward et al., 2001).

O complexo sinalizador IL-10R é constituído de 2 cadeias, IL-10R1 e IL-10R2. A formação do complexo ternário ocorre em dois passos: inicialmente, IL-10 dimérica se liga com alta afinidade às duas cadeias IL-10R1 e subseqüentemente, duas cadeias IL-10R2 são ligadas com baixa afinidade ao complexo binário formado. Em seguida, há a fosforilação da tirosina pelas JAK quinases (JAK1 e TYK2) e ativação de fatores de transcrição Stat 1 e Stat 3 (Krause et al., 2006). A ligação do receptor com a molécula de interleucina se dá através da cadeia IL-10R1, e a cadeia IL10R2 não possui afinidade de ligação à IL-10 (Logsdon et al., 2002). As citocinas da família da IL-10 utilizam a cadeia IL-10R2 em seus receptores (Donnely et al., 2004).

A expressão da IL-10R1 na membrana celular modula a ação da interleucina circulante sobre a célula (Ward et al., 2001; Corinti et al., 2001) e a expressão da porção extracelular do IL-10R1 recombinante é capaz se complexar a IL-10 (Pletnev et al., 2005), deslocar a citocina do receptor celular e consequentemente diminuir suas ações sobre a célula, agindo como um receptor *decoy* (Tan et al., 1995; Svane et al., 2006).

Recombinantes humanos dessa interleucina estão sendo usados clinicamente para minimizar os danos de várias doenças inflamatórias, como psoríase, artrite reumatóide e hepatite C crônica (Asadullah et al., 2003; O'Garra et al., 2008).

Mas também metodologias que visam o bloqueio da interação da IL-10 com seu receptor celular para diminuir a imunossupressão causada por esse mediador, estimulando assim respostas imunes efetoras em modelos experimentais, vem sendo estudadas. Essa interação interleucina-receptor já foi bloqueada com sucesso utilizando-se anticorpos monoclonais anti-IL-10 em alguns sistemas: na prevenção e reversão da desativação de monócitos humanos causada por células tumorais *in vitro* (Baj-Krzyworzeka et al., 2004), na utilização *in vivo* em camundongos para terapia contra infecções de *Salmonella* (Arai et al., 1995), na indução de imunidade estéril na infecção por *Leishmania major* (Belkaid et al., 2001).

Alternativamente, foram utilizados anticorpos monoclonais dirigidos contra o receptor da IL-10 na neutralização do efeito da interleucina em outros sistemas: como adjuvante na vacinação ou tratamento de *Mycobacterium avium* (Silva et al., 2001), como elemento fundamental juntamente com LPS na geração de resposta T_H1 específica após vacinação com OVA (Castro et al., 2000), como terapia indispensável para induzir

memória imune antitumoral em modelos de melanoma, carcinoma de cólon, mastocitoma, carcinoma de pulmão e carcinoma mamário (Vicari et al., 2002), em terapia combinada com oligonucleotídeos contendo ilhas CpG (Brignole et al., 2009).

Apesar da utilização de anticorpos monoclonais em modelos experimentais ser relativamente simples, a utilização clínica de anticorpos apresenta alguns obstáculos. O primeiro e mais importante deles é a necessidade da "humanização" dos anticorpos, onde a porção constante Fc das imunoglobulinas murinas são substituídas por porções Fc humanas, para a retirada de possíveis antígenos da molécula produzida em sistemas murinos. Esses procedimentos são complexos, gerando altíssimos custos de produção e consequentemente dos tratamentos baseados na administração desses anticorpos humanizados. Por estas razões, existe a necessidade de desenvolvimento de terapias alternativas.

Com o objetivo de neutralizar a IL-10 com métodos alternativos, recentemente Terai e colaboradores (2009) construíram um vetor plasmidial contendo uma proteína quimérica formada pela porção Fc de IgG1 humana associada ao domínio extracelular do receptor 1 de IL-10 humano (denominada imunoadesina). Células de melanoma humano transfectadas com esse vetor expressam a imunoadesina *in vitro*, que eficientemente capturou e neutralizou a atividade biológica da IL-10 endógena produzida por células tumorais e também da IL-10 adicionada exógenamente ao sistema.

Objetivos

Proposição de uma ferramenta terapêutica para o melanoma murino B16F10-Nex2, baseado na neutralização da interleucina 10 circulante em animais desenvolvendo tumores subcutâneos, utilizando-se a região extracelular da cadeia 1 de seu receptor codificada por um plasmídeo de expressão eucariótica.

Objetivos Específicos

1. Identificar interleucinas pró- e anti-inflamatórias produzidas por animais C57Bl/6 selvagens e animais geneticamente deficientes em IL-10 (IL-10KO) que naturalmente rejeitam ou permitem o desenvolvimento do melanoma murino B16F10-Nex2.

2. Identificar mediadores de proteção contra o melanoma murino B16F10-Nex2 em animais IL-10KO.

3. Clonagem da porção extracelular da cadeia R1 do receptor murino da IL-10 em vetor de expressão eucariótica para expressão da proteína recombinante *in vivo*, que deve funcionar como um receptor *decoy* para a IL-10 sistemicamente.

4. Estabelecer protocolo de terapia gênica no modelo de melanoma murino B16F10Nex2 com o vetor construído para verificar o efeito desta nova ferramenta de neutralização da IL-10 na resposta antitumoral em animais C57Bl/6.

Materiais e Métodos

1- Cultura de células

1.1- B16F10-Nex2

A linhagem celular de melanoma murino B16F10 é singeneica a camundongos C57Bl/6 (Fidler, 1975) e foi originalmente obtida no Instituto Ludwig de Pesquisas contra o Câncer - São Paulo. Na Unidade de Oncologia Experimental (UNONEX), a partir dessa linhagem foram isoladas por diluição limitante sublinhagens com diferentes fenótipos. A sublinhagem melanótica Nex2 (B16F10-Nex2) caracteriza-se por apresentar baixa imunogenicidade e moderada virulência, e é a que mais se assemelha à linhagem original B16F10. Forma tumores subcutâneos letais, sem metástases naturais para o pulmão, a não ser que seja injetada por via endovenosa.

As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10 mM de N-2-hydroxyethylpiperazine-N2 ethanesulphonic acid (HEPES), 24 mM de bicarbonato de sódio, 40 mg/mL de gentamicina e 10% de soro fetal bovino (SFB, Invitrogen, USA), pH 7,4 (RPMI completo). Para repique das células, estas foram previamente lavadas com PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 1,8 mM KH_2PO_4, pH 7,4), e foi utilizado PBS/EDTA (PBS com 0,02% de EDTA), para desaderir as células dos frascos de cultura. As culturas foram mantidas em estufa a 37ºC e 5% de CO_2. Os reagentes foram adquiridos da Sigma, USA.

Para determinação do número de células viáveis, foi utilizado o corante de exclusão Tripan Blue (GIBCO BRL) e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer.

1.2- Macrófagos peritoneais

Para recrutamento de macrófagos na cavidade peritoneal, 2 mL de Tioglicolato de Sódio 2% (Oxoid, USA) foram injetados intraperitonealmente em camundongos C57Bl/6. Após cinco dias, os animais foram sacrificados e a cavidade peritoneal lavada delicadamente com 3 mL de PBS gelado. A suspensão celular recuperada do peritônio foi submetida à centrifugação por 5 minutos a 1.500 rpm, ressuspendida em meio RPMI completo e colocada em placa de Petri própria para cultivo celular (Corning, USA). Após 18h em estufa a 37ºC, as células aderentes foram utilizadas nos experimentos subsequentes. Os macrófagos foram coletados após incubação da placa de Petri a 4°C em PBS por cerca de 30 minutos.

1.3- Macrófagos derivados de progenitores da medula óssea

Para obtenção de macrófagos maturados a partir de precursores de medula óssea, camundongos C57Bl/6 foram sacrificados, seus fêmures foram retirados e lavados em álcool 70%, álcool iodado e PBS. As epífises foram cortadas assepticamente e as células de medula obtidas por lavagem da peça óssea com 10 mL de Meio de Diferenciação de Macrófagos (RPMI suplementado com 30% de sobrenadante de fibroblastos L929, 20% de SFB, 100 U/ml de penicilina e 100 μg/ml de estreptomicina), segundo protocolo previamente descrito (Boltz-Nitulescu et al., 1987). A suspensão celular foi colocada em placa de Petri própria para culturas de células (Corning, USA) e incubada em estufa a 37ºC. Após quatro dias foram acrescentados 10 mL de Meio de Diferenciação de Macrófagos e no sétimo dia, as células aderentes foram utilizadas.

1.4- Células dendríticas derivadas de progenitores da medula óssea

As células dendríticas maturadas a partir de precursores da medula óssea foram obtidas conforme protocolo descrito no **item 1.3** para obtenção de macrófagos, porém o meio para diferenciação utilizado foi RPMI suplementado com 10% SFB, 10ng/mL de IL-4 murina e 30ng/mL de GM-CSF murina (modificado de Inaba et al., 1992). Ambas as citocinas foram adquiridas da Peprotech (México). Após 7 dias, as células não aderentes foram coletadas e uilizadas em experimentos.

1.5- Esplenócitos

Para obtenção de esplenócitos, camundongos foram sacrificados e seus baços foram removidos. O baço foi delicadamente macerado e após separação da cápsula, a suspensão celular foi homogeneizada em meio RPMI completo. As hemácias foram lisadas em tampão de lise (150 mM de NH_4Cl, 10 mM de $NaHCO_3$ e 57 μM de EDTA) e os esplenócitos lavados 3 vezes com meio de cultura. Na última lavagem, as células foram ressuspendidas para cultivo em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, vitaminas (Mem vitamin), 200 μM de L-glutamina, 100 μM de aminoácidos essenciais e não-essenciais, 1 mM de piruvato de sódio, 100 μg/mL de estreptomicina, 100 unidades/mL de penicilina e 50 μM de β-mercaptoetanol. Todos os reagentes são da marca GIBCO, USA.

2- Análise de proliferação celular

Para quantificar a proliferação de células B16F10-Nex2 frente a IL-10 ou na presença de anticorpo neutralizante da IL-10 (clone 2A5), foi utilizando o reagente MTT *(3-(4,5- dimethyl 2- thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-*

tetrazolium bromide) (Sigma). Em placa de 96 poços, $5x10^3$ células foram cultivadas em 200 μL de meio de cultura. Após aderência das células, foram adicionados IL-10 murina recombinante (mrIL-10, Peprotech) e/ou anticorpo monoclonal anti-IL-10 murina purificado do clone 2A5 (Banco de Células do Rio de Janeiro, BCRJ, ambos nas concentrações de 100, 10, 1 ou 0,1 μg/mL.

Após 48 horas, foram adicionados 20 μL de reagente MTT (5 mg/mL em PBS) e a placa foi incubada por 3h em estufa a 37ºC e 5% de CO_2. A solubilização dos cristais foi feita com 100 μL de solução 10% de SDS em 0,01 M HCl e após 16h, a reação colorimétrica foi quantificada em leitor de microplacas com filtro de 570 nm.

3- Preparação de lisado de células B16F10-Nex2

Células B16F10-Nex2 cultivadas *in vitro* foram coletadas, centrifugadas e ressuspendidas em meio RPMI completo na concentração de $5x10^6$ células/mL. Em seguida, foram submetidas à sonicação a 40Hz (5 ciclos de 12s), com a amostra sendo mantida em gelo. A eficiência da lise foi determinada por observação em microscópio. Para esterilização do lisado, as amostras receberam 600 Gy de radiação gama e foram estocadas a -80 ºC.

4- Análise de moléculas de superfície e interleucinas intracelulares por citometria de fluxo (FACS)

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para identificação de proteínas de superfície (CD40, CD80, CD86, MHCII e MHCI) e citocinas

intracelulares (IFN-γ e IL-10), e foram utilizados anticorpos conjugados a fluoróforos (FITC ou PE) ou biotinilados (PharMingen).

Células dendríticas derivadas de medula óssea ($5x10^5$) foram cultivadas em placa de 24 poços em 500 μL de RPMI completo e estimuladas por 24 ou 48h com 100 U/mL de IFN-γ murino recombinante (mrIFNγ, Peprotech) e lisado equivalente a 10^4 células B16F10-Nex2.

Esplenócitos ($2x10^7$ células) foram cultivados em placas de 6 poços na presença de 10 ng/mL de PMA, 3 μM de ionomicina e 2 μg/ml de brefeldina (Sigma) por 4h.

Para identificação dos marcadores de superfície, $1x10^6$ células ativadas foram coletadas em tubos cônicos de 1,5 mL, lavadas com PBS contendo 1% de BSA (PBS-BSA), centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspendidas em 20 μL de anticorpo específico conjugado a fluoróforo diluído 1:100 em PBS-BSA. Após 1 hora de incubação protegidas da luz, as células foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. As amostras foram lavadas 2 vezes com PBS e em seguida ressuspendidas em solução de PBS/2% de paraformaldeído (Sigma). As amostras foram mantidas a 4ºC e protegidas da luz até a leitura.

Para análise das interleucinas intracelulares, $1x10^6$ células foram ressuspendidas em 100 μL de solução *cytofix* [0,5% de saponina (Fluka) e 1% de paraformaldeído em PBS], e incubadas por 20 minutos. Foram adicionados 300 μL de tampão de permeabilização (0,5% de saponina em PBS) seguido de nova incubação por 10 minutos. Para bloquear ligações inespecíficas, foi adicionado soro de camundongo C57BL/6 normal para a

concentração final de 3% seguindo-se incubação por 30 minutos. As células foram centrifugadas, lavadas com tampão de permeabilização e o anticorpo específico biotinilado ou conjugado ao fluoróforo, diluído 1:100 em 20 μL de tampão de permeabilização, foi adicionado. Após 1h, as células foram centrifugadas e lavadas com tampão de permeabilização. As amostras incubadas com os anticorpos conjugados aos fluoróforos foram lavadas em PBS e ressuspendidas em PBS-paraformaldeído. Às amostras incubadas com os anticorpos biotinilados, foram adicionados 20 μL de solução de estreptavidina conjugada ao fluoróforo diluída 1:200 em tampão de permeabilização, seguindo-se incubação protegida da luz por 1 hora. As células foram centrifugadas, lavadas duas vezes com tampão de permeabilização e uma vez com PBS. Para fixação e leitura as células foram ressuspendidas em PBS-paraformaldeído.

Todas as incubações e lavagens acima foram feitas a 4ºC. Os controles negativos da reação constituiram-se de células na ausência de anticorpo e incubação com anticorpos secundários, na ausência dos anticorpos primários.

A leitura das amostras foi realizada no aparelho FACSCalibur utilizando o *software* CellQuest Pro (BD Biosciences).

5- Quantificação de citocinas e óxido nítrico secretados no sobrenadante de cultura

Macrófagos ou células dendríticas derivados de medula óssea ($5x10^5$ por poço) foram cultivados em triplicatas em placas de 24 poços em 500 μL de RPMI completo, em preseça de 100 U/mL de IFNγ murino recombinante (mrIFN-γ, Peprotech) e lisado equivalente a 10^4 células B16F10-Nex2. Após

72 horas, o meio de cultura condicionado foi coletado e mantido a -80 ºC até a quantificação das citocinas.

Esplenócitos, 10^6 células por poço, foram cultivados em triplicatas em placas de 96 poços, em 200 μL de meio para esplenócitos (descrito no item 1.5) e foram estimulados com 10 ng/ml de PMA (Sigma) e 3 μM de ionomicina (Sigma) ou lisado equivalente a 10^5 células B16F10-Nex2 por 48h. O meio de cultura condicionado foi coletado e mantido a -80ºC.

Para quantificação de citocinas, foram utilizados *kits* de detecção de interleucinas (IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF-α) da Peprotech, segundo instruções do fabricante.

Macrófagos derivados de medula óssea ou coletados do peritôneo ($5x10^5$ por poço) foram estimulados por vários tempos com 400U/mL de LPS (Sigma), em placas de 24 poços. A ativação celular foi verificada pela produção de óxido nítrico (NO) quantificado como nitrito no sobrenadante de cultura. Para a quantificação do nitrito, 100 μL de sobrenadante de cultura foram adicionados ao mesmo volume de Reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de naftiletilenodiamida e 2,5% de ácido fosfórico, todos Sigma). Após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, a absorbância foi quantificada em leitor de microplacas com filtro de 550 nm.

6- Animais

Camundongos C57BL/6 foram adquiridos do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME), da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Matrizes de animais C57BL/6 geneticamente deficientes para IL-10 (IL-10 *Knockouts* ou IL-10KO) foram doadas pelo Prof. Ricardo Ribeiro dos Santos, Centro de Pesquisa Gonçalo

Moniz-FIOCRUZ, Bahia e são mantidas no biotério da Disciplina de Biologia Celular da UNIFESP. Animais C57BL/6 geneticamente deficientes para IFN-γ, CD4 e CD8 (IFN-γKO, CD4KO e CD8KO) foram adquiridos do Biotério do Departamento de Imunologia, da Universidade de São Paulo (USP). Todos os animais foram mantidos em microisoladores, com água e comida estéreis, em estantes ventiladas (ALESCO). Os animais IL-10KO foram tratados com benzoilmetronidazol a 0,04% adicionado à água uma semana antes dos experimentos e durante os mesmos, para evitar o desenvolvimento de colite (Kuhn et al., 1993).

Nos experimentos, camundongos de 6 a 10 semanas foram pareados por sexo e idade e foram sacrificados por deslocamento cervical. Os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNIFESP (nº 1133/08 do CEP).

7- Desenvolvimento tumoral

Células de melanoma murino B16F10-Nex2 foram lavadas 3 vezes com PBS e uma suspensão de 10^3, 10^4, $5x10^4$ ou 10^5 células viáveis em RPMI sem SFB foi inoculada subcutaneamente em 200 μL no flanco direito de camundongos C57BL/6 selvagens, IL-10KO, IFN-γKO, CD4KO e/ou CD8KO. A evolução tumoral foi seguida pela medida do volume tumoral a cada 2 dias com paquímetro, e pela sobrevida dos animas. O volume tumoral foi calculado pela fórmula: $V= (0,52 \times D_A^2 \times D_B)$, onde D_A e D_B representam o menor e maior diâmetro tumoral em mm, respectivamente. O volume tumoral máximo permitido foi de 3.000 mm^3. Os animais foram considerados resistentes se não apresentavam nódulo tumoral após 30 dias da inoculação de células.

8- Terapia gênica

Camundongos foram desafiados no dia 0 como descrito no item 7. Nos dias 1, 8 e 15 os animais receberam injeções subcutâneas na base da cauda do plasmídeo pcDNA3-IL-10RPe ou do controle pcDNA3 vazio, purificados por gradiente de césio, obtidos como descrito no item 11.8.3.

Alguns grupos também receberam o plasmídeo pIL-12 ou seu controle vazio pCMV em uma única injeção no dia 1. Esses plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Alexander Rakhmilevich, University of Wisconsin, USA (Rakhmilevich et al, 1996) e uma descrição mais detalhada se encontra no item 11.5.

Cada plasmídeo foi injetado na concentração de 100 μg por dose.

9- Transferência adotiva de células dendríticas

Células dendríticas derivadas de progenitores da medula óssea de animais *naïve* C57BL/6 selvagens ou IL-10KO foram obtidas como descrito no item 1.4. As células foram lavadas 3 vezes com PBS, ressuspendidas em PBS e injetadas subcutaneamente nos animais ($2x10^5$ células dendríticas misturadas ou não com lisado equivalente a $5x10^3$ células B16F10-Nex2). Foram feitas duas transferências adotivas por animal nos dias -14 e -7 e o desafio com 10^4 ou $5x10^4$ células de melanoma B16F10-Nex2 foi realizado no dia 0, como descrito no item 7. As injeções de células dendríticas e células tumorais foram feitas no flanco direito dos animais.

9.1- Transferência adotiva de células dendríticas transfectadas *ex-vivo* com os plasmídeos pcDNA3-IL10RPe

Células dendríticas derivadas de progenitores da medula óssea de animais *naïve* C57BL/6 selvagens foram obtidas como descrito no item 1.4. Essas células foram transfectadas no 7º dia de cultura com o plasmídeo pcDNA3-IL10RPe ou seu controle pcDNA, e posteriormente transferidas adotivamente para animais C57BL/6. Para a transfecção, 10^7 células foram incubadas com os plasmídeos e o reagente DOTAP (Roche Applied Science) por 12 horas. Após a seleção com antibiótico durante 3 dias (G418, 300 ng/ml, Gibco BRL), as células foram associadas com o lisado de células B16F10-Nex2 como descrito no item 9 e inoculadas por via subcutânea nos dias -4 e 3. Os camundongos foram inoculados por via subcutânea no dia 0 com $5x10^4$ células B16F10-Nex2. As inoculações de células dendríticas e tumorais foram realizadas na mesma região do flanco dos animais.

10- Padrão molecular de DNA

Para a orientação do tamanho dos fragmentos observados após eletroforese em gel de agarose foram utilizados dois tipos de padrão molecular, mostrados na Figura 1.

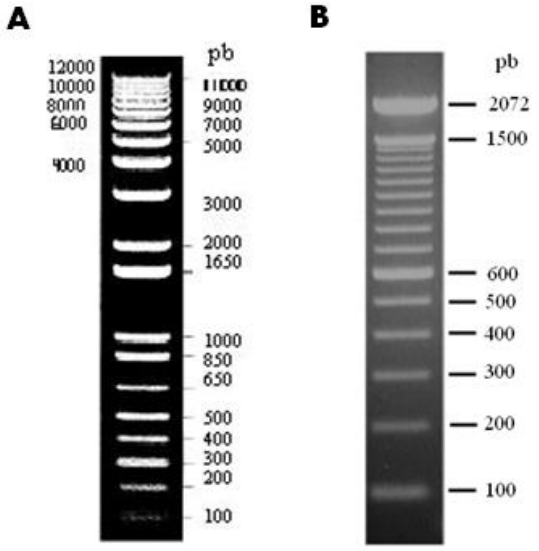

Figura 1. Padrões de tamanho molecular de DNA. (A) Padrão 1Kbp DNA Ladder (Amersham Bioscience). (B) Padrão 100bp DNA Ladder (Invitrogen). Ao lado de cada fragmento, estão indicados os tamanhos moleculares em pares de base (pb).

11- Construção e purificação do vetor codificante da porção extracelular do receptor de IL-10 murino (IL-10RPe)

11.1- Padronização do tempo de ativação dos macrófagos para produção de IL-10.

Macrófagos peritoneais ($4x10^5$ por poço) foram cultivados em placas de cultura de 24 poços em um volume de 750 μL de RPMI completo e foram ativados com 400 ng/mL de LPS. A produção de óxido nítrico, IL-10 e IL-12 foi quantificada após 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72h de estimulação, com o objetivo de determinar o tempo de ativação que propicia a maior expressão da IL-10, o que leva a um aumento na expressão do seu receptor. O

mesmo foi realizado com macrófagos derivados de progenitores da medula óssea, mas somente foi quantificado o óxido nítrico.

11.2- Extração do RNA total dos macrófagos ativados

Macrófagos provenientes de medula óssea ($1x10^6$) foram estimulados com 400ng/mL de LPS e após 30 horas, o RNA foi extraído utilizando reagente TRIZOL (Invitrogen) como descrito pelo fabricante. A quantidade de RNA e a razão RNA-proteína foram estimadas por análise das leituras espectrofotométricas a 260nm e 280nm. Todas as amostras utilizadas nos ensaios subsquentes apresentaram razão $A_{260/280}$ maior do que 1,5.

Para observar a integridade do RNA extraído, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% contendo 0,5 μg/mL de brometo de etídio utilizando 3 μg de RNA em tampão de amostra contendo 0,25% bromofenol blue, 0,25% xylene cyanol, 15% Ficoll-400 e 7M de uréia, aquecido durante 10 minutos a 65 °C e acrescidos de 0,2 μl de brometo de etídio 10 mg/mL.

11.3- Síntese de cDNA

A síntese de cDNA a partir do mRNA extraído foi feita utilizando o *kit* ThermoScriptTM RT-PCR System (Gibco BRL), segundo protocolo do fabricante e utilizando como amostra 20 μg de RNA total. Uma reação feita na ausência de transcriptase reversa foi utilizada como controle negativo da reação. Para verificar a integridade do cDNA gerado foi utilizado um par de *primers* para amplificação do gene da β-actina:

β-actina (900pb)

sense 5' CAG AGC AAG AGA GGG ATC CTG A 3'

antisense 5' TGA TCC ACA TCT GCT GGA AGG T 3'

Alternativamente, substituiu-se o *primer* oligo DT por um *primer* gene específico na produção do cDNA, visando o aumento de especificidade dos cDNAs produzidos, correspondentes ao gene do receptor da IL-10. Foi utilizado o *primer antisense* descrito para detecção de clones produtores de IL-10R em uma biblioteca construída a partir de mastócitos murinos e linhagens murinas de macrófagos (IL-10RHo, Ho et al, 1993). Este oligonucleotídeo anela em região *downstream* à porção extracelular do receptor de IL-10, e por isso pôde ser usado para produzir cópias mais específicas do cDNA alvo.

11.4- Amplificação da porção extracelular do receptor de IL-10 murino (IL-10RPe) por RT-PCR

Foram realizadas reações em cadeia de síntese de DNA com polimerase (PCR) para amplificar o gene do receptor de IL-10 (IL-10R) ou apenas a parte que corresponde à porção extracelular do mesmo (IL-10RPe). A localização da porção extracelular e do peptídeo sinal na sequência da cadeia α do receptor de IL-10 murina (NCBI *data bank*, número de acesso **NM_008348**) foi deduzida de acordo com o gráfico de hidrofilicidade de Kyte-Doolittle do programa DNAStar/Protean® (Figura 2).

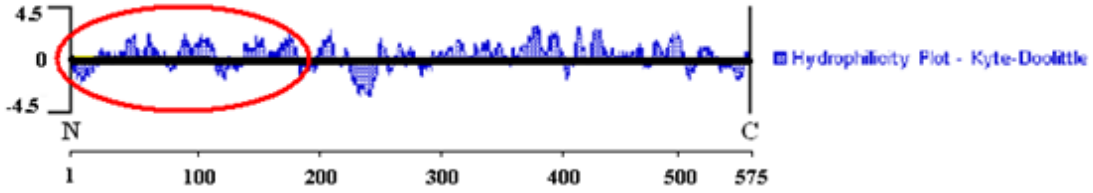

Figura 2. Hidrofilicidade do transcrito de IL-10R. Valores positivos ou negativos representam as regiões hidrofílicas e hidrofóbicas da proteína, respectivamente. O círculo indica a região selecionada para clonagem do fragmento IL-10RPe. Abaixo do diagrama está representado o número de resíduos de aminoácidos, além da região N-terminal (N) e C-terminal (C).

A seqüencia de aminoácidos da cadeia polipeptídica correspondente ao mRNA do receptor de IL-10 murino está mostrada a seguir. A região da seqüencia referente à porção extracelular está em negrito/itálico e o peptídeo sinal está sublinhado.

```
1   mlsrllpflv tisslslefi aygtelpsps yvwfearffq hilhwkpipn qsestyyeva
61  lkqygnstwn dihicrkaqa lscdlttftl dlyhrsygyr arvravdnsq ysnwtttetr
121 ftvdeviltv dsvtlkamdg iiygtihppr ptitpagdey eqvfkdlrvy kisirkfsel
181 knatkrvkqe tftltvpigv rkfcvkvlpr lesrinkaew seeqcllitt eqyftvtnls
241 ilvismllfc gilvclvlqw yirhpgklpt vlvfkkphdf fpanplcpet pdaihivdle
301 vfpkvslelr dsvlhgstds gfgsgkpslq teesqfllpg shpqiqgtlg keespglqat
361 cgdntdsgic lqepglhssm gpawkqqlgy thqdqddsdv nlvqnspgqp kytqdasalg
421 hvcllepkap eekdqvmvtf qgyqkqtrwk aeaagpaecl deeipltdaf dpelgvhlqd
481 dlawpppala agylkqesqg masappgtps rqwnqlteew sllgvvsced lsieswrfah
541 kldpldcgaa pgglldslgs nlvtlpliss lqvee
```

Utilizando aproximadamente 10 μg de cDNA, na presença de 2 mM de cloreto de magnésio, 200 μM de dNTPs, 5 pmol de cada oligonucleotídeo (*sense* e *antisese*) e 2 U de enzima taq DNA polimerase (Gibco) em tampão contendo 20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl, as reações foram realizadas nas seguintes condições : 94ºC por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94ºC por 1 minuto; X ºC por 1 minuto e 72ºC por 2 minutos

finalizados por 7 minutos a 72ºC, onde X é a temperatura de anelamento específica para cada par de primers utilizado.

O par de *primers* IL-10RHo foi usado apenas para detecção do cDNA do gene de IL-10, já que anela em porção terminal da fase aberta de leitura do receptor e na região 3´ não traduzida. Oligonucleotídeos flanqueadores da seqüência completa do cDNA (IL-10R) e da parte extracelular do receptor de IL-10 (IL-10Pe) estão descritos na Figura 3.

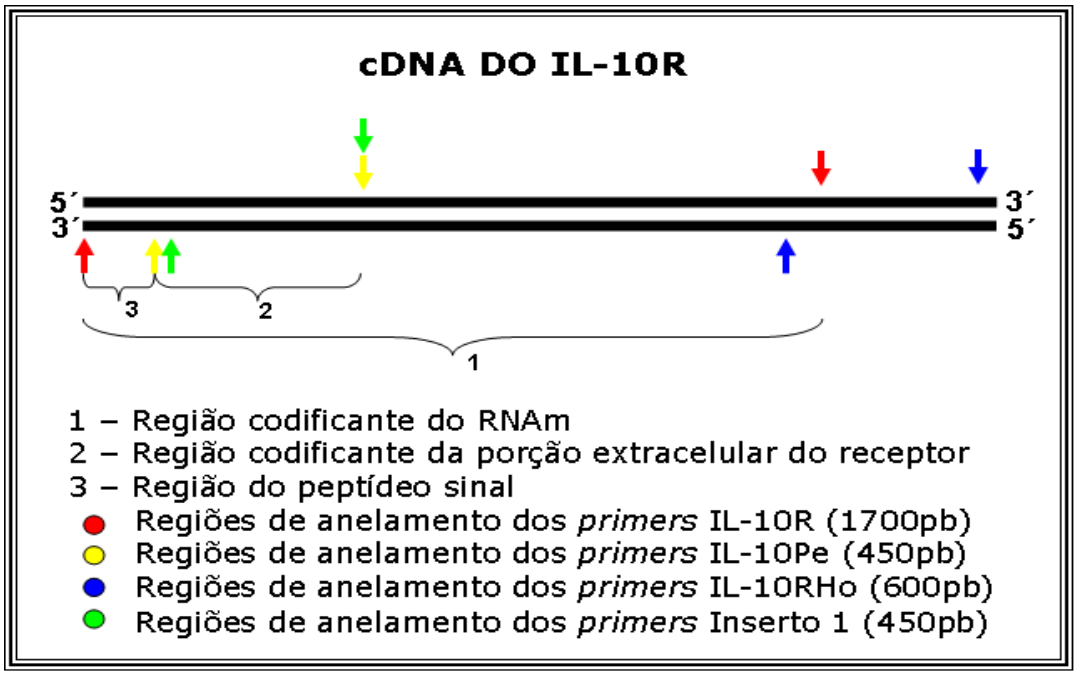

Figura 3. Localização dos *primers* utilizados para clonagem e detecção do gene do IL-10R e da porção extracelular do mesmo (IL-10RPe). O cDNA (dupla fita negra) está subdividido em: região codificante do mRNA (1); região codificante da porção extracelular do receptor (2); região do peptídeo sinal (3). Os locais de anelamento dos *primers* na dupla fita são mostrados com setas e as cores indicam as diferentes regiões flanqueadas. Os tamanhos aproximados dos fragmentos esperados estão descritos entre parênteses. O par IL10RHo foi descrito por Ho et al, 1993.

As seqüências nucleotídicas dos *primers* citados, e as combinações utilizadas, estão descritas a seguir com o respectivo tamanho aproximado da seqüência de cDNA flanqueada.

IL-10R (1700pb)

sense 5´ ATG TTG TCG CGT TTG CTC CC 3`

antisense 5´ TCA TTC TTC TAC CTG CAG GCT 3´

IL-10Pe (450pb)

sense 5´ GAT TTT TCC AGC ACA TCC TC 3´

antisense 5´ CCT GTT TCA CTC TCT TGG TTG 3´

IL-10R *sense* e IL-10Pe *antisense* (560pb)

sense 5´ ATG TTG TCG CGT TTG CTC CC 3`

antisense 5´ CCT GTT TCA CTC TCT TGG TTG 3´

IL-10RHo (600pb)

sense 5´ AGG CAG AGG CAG CAG GCC CAG CAG AAT GCT 3´

antisense 5´ TGG AGC CTG GCT AGC TGG TCA CAG TAG GTC T 3´

Inserto 1 (450pb)

sense 5´ CTC GAG CCT GTT TCA CTC TCT TGG TTG 3´

antisense 5´ GGA TCC ATG CAC TGG AAA CCT ATC CCA AA 3´

Para otimização das reações de PCR, foi utilizado o *Optimizer PCR®* *kit* (Invitrogen) que contém diferentes tampões (Tabela 1), e diferentes concentrações de DMSO (0,1% a 10%).

	1,5 mM Mg^{2+}	2,0 mM Mg^{2+}	2,5 mM Mg^{2+}	3,5 mM Mg^{2+}
pH 8,5	A	B	C	D
pH 9,0	E	F	G	H
pH 9,5	I	J	K	L
pH 10,0	M	N	O	P

Tabela 1. Tampões de PCR que compõem o *PCR Optimizer kit.* Cada letra refere-se a um tampão que combina valores de pH e concentrações de $Mg2^{+}$ diferentes.

Para análise das reações foram realizadas eletroforeses em gel de agarose 1% contendo 0,5 μg/mL de brometo de etídio submetido à voltagem constante de 100 V.

11.5- Plasmídeos

Foi utilizado o plasmídeo de clonagem pGEM-T Easy Vector (Promega) que contém um gene de resistência à ampicilina e tamanho total de 3.015 pares de base.

Para subclonagem em vetor de expressão foi utilizado o plasmídeo pcDNA3 (Invitrogen), que contém sítio de clonagem sob controle do forte promotor CMV (citomegalovírus). Este plasmídeo possui genes de resistência à ampicilina, neomicina, kanamicina e geneticina (G418), totalizando 5.400 pares de base.

Os 2 plasmídeos utilizados tem sítios de clonagem flanqueados por promotores T7 e SP6. Os mapas dos plasmídeos são mostrados na Figura 4.

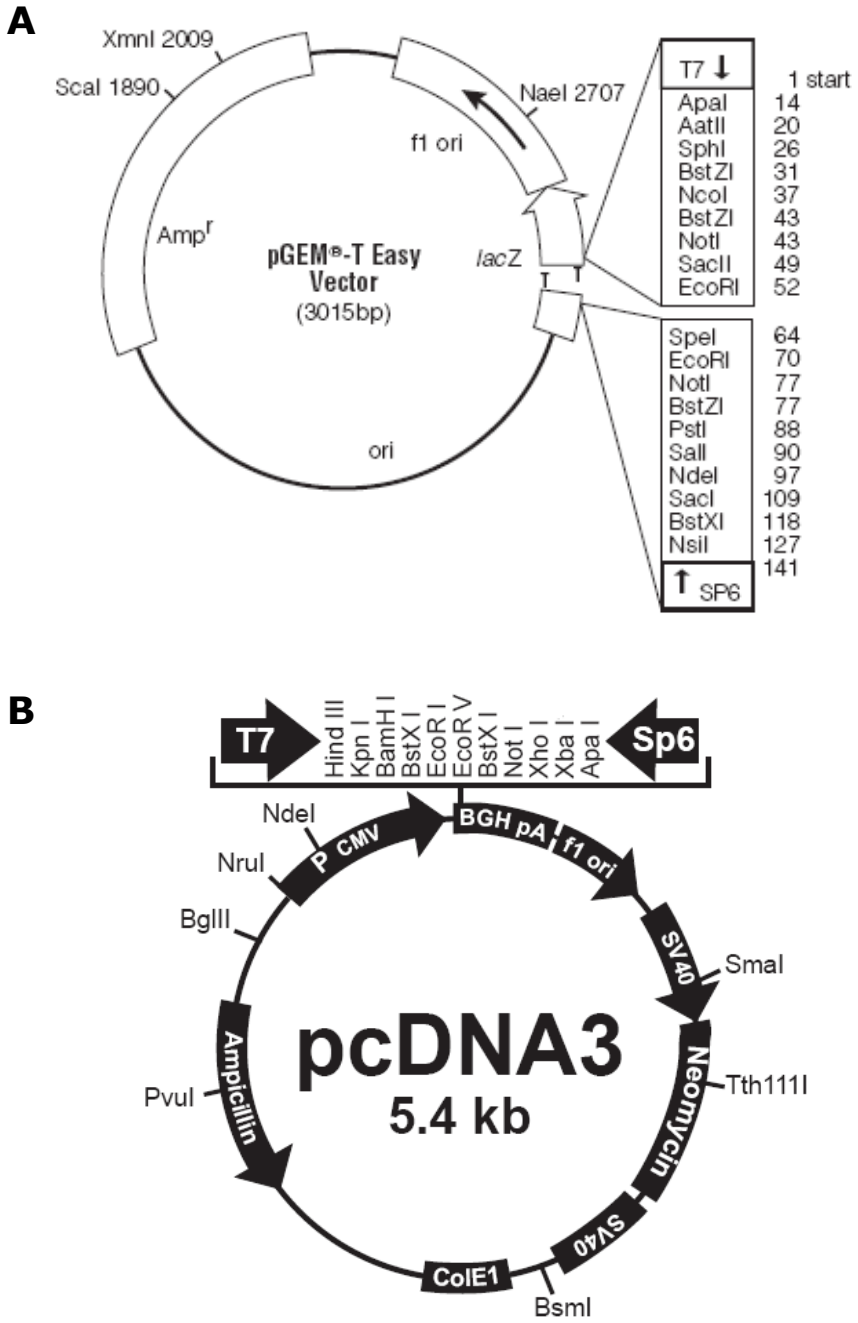

Figura 4. **Mapas do plasmídeo de clonagem (A) pGEM-T Easy Vector e do plasmídeo de expressão eucariótica pcDNA3(B).** São mostrados os sítios de restrição e os genes de resistência à antibióticos. **(A)** Está representada em pares de base a localização de cada sítio de restrição. **(B)** O promotor CMV (P CMV) é mostrado logo antes do sítio de liga

Um plasmídeo codificante das subunidades p35 e p40 da IL-12 murina (chamado aqui de pIL-12) foi cedido pelo Prof. Dr. Alexander Rakhmilevich (Rakhmilevich et al., 1996). Esse plasmídeo (pWRG3169) contém sequências que codificam as subunidades p35 e p40 da IL-12 murina, localizadas em direções opostas e cada uma contém seu próprio promotor de CMV. O plasmídeo controle contém a sequência da luciferase controlada pelo promotor de CMV, denominado pCMV, e foi construído como descrito em Cheng et al (1993). Os plasmídeos possuem gene de resistência à ampicilina, e a produção de IL-12 pelo plasmídeo pIL-12 foi testada como descrito anteriormente (Hebeler-Barbosa et al, 2008)

11.6- Clonagem do inserto IL-10RPe no vetor pGEM-T easy

Os fragmentos de cDNA obtidos após amplificação com o par de primers *IL-10R sense e IL-10Pe antisense* geraram o fragmento denominado **IL-10RPe**. Esses fragmentos, com 560 pb, foram recuperados do gel de agarose após eletroforese com auxílio do *kit* AgarMelt (Biotools) e clonado no vetor pGEM-T easy (Promega), de acordo com instruções do fabricante.

Os plasmídeos resultantes foram utilizados para transformar bactérias *E. coli* DH5α competentes por choque térmico por 40 segundos a 42 ºC, após incubação por 30 minutos no gelo. Após adição de 400 μl de meio de cultura LB (*Luria-Bertani*) composto de 1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura e 1% de NaCl, pH 7,3, as bactérias foram incubadas durante 1 hora sob agitação a 37 ºC e em seguida plaqueadas em meio LB sólido (meio LB acrescido de 1,5% de ágar bacteriológico) com 100 μg/mL de ampicilina para a seleção dos transformantes.

Os plasmídeos selecionados foram purificados por mini-preparação por lise alcalina (item 11.8.1) e analisados quanto ao padrão de restrição por endonucleases e também pela sequência nucleotídica (item 11.9).

11.7- Subclonagem do inserto IL-10RPe no vetor pcDNA3

O plasmídeo de clonagem recombinante pGEM-T contendo o fragmento IL-10RPe e o plasmídeo pcDNA3 foram digeridos com 2 U da enzima NotI durante 3 horas. As reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose e o fragmento correspondente ao inserto IL-10RPe e o fragmento correspondente ao pcDNA3 foram excisados e purificados do gel com auxílio do *kit* AgarMelt (Biotools). Cerca de 50 ng de pcDNA3 foi defosforilada a 37 ºC com 0,5 U de *shrimp alkaline phosphatase* (USB) durante 1 hora, seguido de inativação a 65 ºC por 15 minutos. Para a ligação entre o plasmídeo pcDNA3 e o inserto foram adicionados 50 ng de inserto purificado e 1U de T4 ligase (Invitrogen) em tampão apropriado à reação de defosforilação fornecido pelo fabricante. Após 16 horas a 4ºC, o produto total da ligação foi utilizado para transformar bactérias *E. coli* DH5α competentes como descrito no item 11.6. Os clones transformantes foram selecionados por resistência à ampicilina (100 μg/mL), como descrito no item 11.6.

Após análise de restrição por endonucleases, os plasmídeos pcDNA3-IL10RPe com padrão esperado de fragmentação foram sequenciados, como descrito no item 11.9.

11.8- Métodos utilizados para purificação de plasmídeos

11.8.1- Mini-preparação por lise alcalina

Uma colônia isolada de bactérias *E. coli* DH5-α contendo o plasmídeo de interesse, selecionada pela resitência aos antibióticos utilizados, foi inoculada em 3 mL de meio LB (Luria Bertani) com antibiótico e incubada por 16h a 200 rpm e 37ºC. As bactérias foram recolhidas por centrifugação a 12.000 rpm por 2 minutos e ressuspendidas em 200 μL de tampão "1" contendo 50 mM de glucose, 25 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM de EDTA pH 8,0. Adicionaram-se 400 μL de solução "2" contendo hidróxido de sódio 0,2 M e SDS 0,1% e misturou-se por inversão. Foram adicionados 300 μL de solução "3" contendo 3 M de acetato de potássio e 5 M de ácido acético, misturando por inversão. Ao sobrenadante recuperado por centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos foi adicionado 1 volume de isopropanol. O precipitado recuperado por centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos foi lavado com etanol 70% e então ressuspendido em 50 μL de água contendo RNAse (50 mg/mL).

11.8.2- Maxi-preparação por lise alcalina

Para produção de grande quantidade de plasmídeos foi utilizado o protocolo de maxi-preparação por lise alcalina. Uma colônia de bactérias selecionada como descrito no item 11.8.1 foi pré-incubada a 37 ºC sob agitação durante 5 horas em 5 mL de meio LB com antibiótico. Este pré-inóculo foi adicionado a 500 mL de meio LB com antibiótico e incubado por 16 horas a 37 ºC sob agitação. As células foram coletadas por centrifugação durante 5 minutos a 5.000 rpm. As bactérias foram ressuspendidas em 42 mL de solução "1", seguido pela adição de 39 mL de solução "2" e finalmente 30 mL de solução "3" (descritas no item 11.8.1). Após incubação de 30 minutos em gelo, o sobrenadante foi coletado após centrifugação

durante 30 minutos a 8.000 rpm. O mesmo volume de isopropanol foi adicionado ao sobrenadante e incubado durante 16 horas a -20 ºC. Após centrifugação por 30 minutos a 12.000 rpm, o material precipitado foi ressuspendido em 3 mL de água seguido de adição de 3 mL de 5M de cloreto de lítio. O sobrenadante coletado após centrifugação durante 25 minutos a 8.000 rpm foi transferido para um novo tubo e acrescido do mesmo volume de isopropanol, sendo incubado a -20 ºC durante 16 horas. O material foi centrifugado durante 30 minutos a 12.000 rpm e o material precipitado ressuspendido em 980 μl de água. Após incubação de 30 minutos a 65 ºC, 20μl de RNase A (50 mg/mL) foram adicionados ao material para uma incubação de 30 minutos a 37 ºC. Para purificação final do plasmídeo, igual volume de solução 13% de PEG 6000 em 1,6 M de NaCl foi adicionado e após centrifugação por 30 minutos a 14.000 rpm o material precipitado foi diluído em 1 mL de água e estocado a -20 ºC.

11.8.3- Gradiente de Cloreto de Césio (CsCl)

Os plasmídeos a serem utilizados na transfecção de células ou nos protocolos de terapia gênica foram purificados em gradiente de CsCl.

Cloreto de césio (4,3 g, Sigma Aldrich) foi adicionado a 4,2 mL de uma solução aquosa contendo até 5 mg de plasmídeo. Foram também adicionados 200 μL de brometo de etídio (10 ng/mL). O gradiente de cloreto de césio foi estabelecido por centrifugação durante 15 horas a 60.000 rpm a 4ºC, com parâmetros ajustados para aceleração máxima e parada lenta ao final. A região do gradiente contendo o plasmídeo íntegro (região intermediária do gradiente com coloração avermelhada) foi coletada com

agulha acoplada a uma seringa descartável, fazendo-se um orifício na parte externa do tubo de polipropileno na altura da região contendo o plasmídeo.

Ao material isolado foram adicionados dois volumes de butanol saturado em água, com vigorosa agitação da mistura. Após centrifugação por 2 minutos a 1.500 rpm, a fase butanólica superior foi descartada e o processo repetido até a fase inferior estar transparente. Etanol puro foi adicionado à fase inferior em volume necessário para completar 10 mL. A solução foi incubada por 16 horas a -20 ºC.

Após centrifugação a 3.000 rpm por 3 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 5 mL de solução de etanol a 70%, sendo submetido a mais uma centrifugação. O precipitado foi lavado mais duas vezes e o álcool foi evaporado em ambiente estéril (fluxo laminar) à temperatura ambiente. Para a obtenção da solução de plasmídeo purificado, 1 mL de PBS foi adicionado.

11.9- Caracterização dos plasmídeos recombinantes

As concentrações em μg/mL dos plasmídeos purificados foram estimadas por leitura da absorbância em 260 nm. Amostras foram utilizadas somente quando a razão das absorbâncias em 260 / 280 nm apresentou valor entre 1,6 e 1,9.

Para analisar o padrão de fragmentação após digestão com endonucleases, 1 unidade de enzima (Invitrogen) específica para cada caso foi incubada em tampão correspondente com aproximadamente 100 ng de plasmídeo durante 3 horas. O produto da reação foi analisado após eletroforese em gel de agarose 1%.

O seqüenciamento nucleotídico dos fragmentos clonados foi realizado pelo Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (CEGH – USP) utilizando o "MegaBACE 1000" (Amersham Biosciences). A análise do sequenciamento foi feita pelo software "Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12", e as seqüências nucleotídicas encontradas foram comparadas ao banco de dados Gene Bank.

As sequências dos oligonucleotídeos utilizados para seqüenciamento do fragmento nos plasmídeos foram:

T7 - 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'

SP6 - 5´ATT TAG GTG ACA CTA TA 3´

12- Transfecção de células com o plasmídeo pcDNA3-IL-10RPe e pcDNA3 controle

12.1- B16F10-Nex2

Células de melanoma murino B16F10-Nex2 foram transfectadas transientemente ou estavelmente com os plasmídeos.

Para a transfecção transiente, células ($2x10^5$ por poço) foram cultivadas em placas de 6 poços em um volume de 2 mL de meio RPMI completo. Após 4 horas, o sobrenadante foi retirado e meio RPMI sem SFB foi adicionado, seguido de incubação por 1h. Uma solução de 100 μL de RPMI sem soro e 15 μL de reagente de transfecção DOTAP (Roche Applied Science) foi misturada a uma solução de 100 μL de RPMI sem soro e 5 μg dos plasmídeos pcDNA3-IL-10RPe ou pcDNA3 controle purificados por gradiente de CsCl. Após repouso da solução por 15 minutos à temperatura ambiente, essa mistura foi adicionada ao poço de cultura. Após 24 horas, o

meio de cultura foi trocado por meio RPMI completo e após 48 horas, as células foram recolhidas para análise.

Para transfecção estável foi utilizado um protocolo similar ao citado acima, reduzindo-se o número de células iniciais ($5x10^4$ células por poço) e acrescentando-se SFB 5% ao meio RPMI. Após a transfecção, as células foram mantidas em 600 ng/mL de G418 (Gibco BRL). Após a morte das células não transfectadas, o meio de cultura foi substituído por meio RPMI completo.

12.2- Células Dendríticas derivadas de medula óssea

Em placa de 6 poços, $1x10^6$ células dendríticas foram mantidas em 2 mL de meio RPMI completo por 2 horas. Em seguida foram adicionados os plasmídeos pcDNA3-IL10RPe ou pcDNA3 controle e o reagente de transfecção em RPMI completo, preparados como descrito no item 12.1. O sobrenadante foi recolhido após 16 horas e as células em suspensão foram centrifugadas por 3 minutos a 900 rpm e replaqueadas em meio de cultura contendo 300 ng/mL de G418. Após 48 horas as células foram utilizadas.

13- Análise da produção de mRNA e expressão da proteína recombinante pelas células transfectadas

Células B16F10-Nex2 transfectadas foram analisadas quanto a produção do mRNA, e da proteína recombinante intracelular e solúvel no sobrenandante de cultura.

A produção do mRNA recombinante pela célula transfectada foi verificada através de ensaio de RT-PCR, como descrito nos itens 11.3 e

11.4, utilizando primers para amplificação de β-actina como controle positivo.

A expressão da proteína recombinante intracelularmente foi avaliada por ensaio de citometria de fluxo, como descrito no item 4, utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-IL-10R murino conjugado à ficoeritrina (CD210, clone 1B1.3a, BD Biosciences).

E a expressão da proteína recombinante no sobrenadante de cultura foi realizada por ensaio de Imunoprecipitação e *Immunoblotting*, como descrito a seguir.

13.1- Imunoprecipitação

A proteína recombinante presente no sobrenadante de cultura de células transfectadas foi imunoprecipitada com anticorpo monoclonal purificado anti-IL-10R murino (CD210, clone 1B1.3a, BD Biosciences). Em tampão RIPA (150 mM de NaCl, 50mM de Tris-base e 1% de NP40, pH 7,5) contendo 10 mM de EGTA, 1 mM de PMSF, 10 μM de Leupeptina e 1 μg do anticorpo especificado, 500 μL de sobrenadante de cultura (contendo 500 μg de proteína, quantificadas pelo micrométodo de Bradford) foram incubados durante 16 horas sob agitação a 4 ºC. Foram então adicionados 5 μg de proteína A-Sepharose (Sigma) para incubação durante 4 horas nas mesmas condições. Após centrifugação durante 5 minutos a 12.000 rpm, o material precipitado foi ressuspendido em tampão RIPA e lavado mais 2 vezes desta forma. O material foi finalmente ressuspendido em tampão de amostra para separação eletroforética (12,5% de glicerol, 2,5% de SDS, 1% de β-mercaptoetanol e bromofenol blue) e estocado a -20ºC.

13.2- *Immunoblotting*

As amostras resultantes da imunoprecipitação, e estocadas a -20 °C, foram fervidas durante 5 minutos, colocadas em gelo por 1 minuto e posteriormente submetidas à separação eletroforética em gel de poliacrilamida 12,5% em tampão de corrida (0,025 M de Tris-base, 0,1% de SDS e 0,19 M de glicina, pH 8,3). As proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em tampão de transferência (0,025 M de Tris-base, 0,19 M de glicina e 20% de metanol, pH 8,3) por 1h a 100 V. Após a transferência, a membrana foi corada com solução Ponceau-S (0,1% de Ponceau em ácido acético 10%), descorada com água bidestilada e os padrões de peso molecular identificados.

Foi então realizado o bloqueio da membrana com solução de PBS contendo 5% de leite em pó desnatado (PBS-Leite 5%) por 2h à temperatura ambiente. O anticorpo monoclonal anti-IL-10R murino (CD210, clone 1B1.3a, BD Biosciences) foi diluído 1:500 em PBS-Leite 1% e adicionado à membrana, e esta foi incubada por 16h a 4°C, sob agitação. Após três lavagens de 10 minutos cada com PBS contendo 0,1% de Tween 20 (PBS T 0,1%), as membranas foram incubadas com anti-IgG de rato conjugado à estreptavidina-peroxidase (Sigma) diluído 1:1.000 em PBS-Leite 1% por 1h a 37ºC, sob agitação. As membranas foram lavadas 3X com PBS-T 0,1% após a incubação. A revelação foi realizada com substrato Immobilon Western (Millipore) diluído 1:5 em PBS e as membranas expostas à filme de raio-X (Kodak) por 15 minutos.

14- Estatística

Foram utilizados os testes *t de Student* do programa Excel para comparação entre duas amostras, e *Log Rank Kaplan Mayer* do programa SPSS para comparação das curvas de sobrevida e tempo livre de tumor dos experimentos *in vivo*. As amostras foram consideradas estatisticamente diferentes entre si quando valores de *p* menores que 0,05 foram encontrados.

Resultados e Discussão

1. Determinação do padrão de citocinas e sobrevida em camundongos C57Bl/6 selvagens e IL-10KO naturalmente resistentes e susceptíveis a um desafio com células de melanoma murino B16F10-Nex2

1.1. Camundongos C57BL/6 selvagens

Embora o melanoma murino B16F10-Nex2 apresente baixa imunogenicidade, quando um pequeno número de células (10^3 ou $5x10^3$) são inoculadas subcutaneamente em camundongos singeneicos C57Bl/6, observamos com freqüência um pequeno número de animais que naturalmente rejeitam essas células tumorais implantadas. Se os animais que rejeitaram um primeiro desafio com células tumorais forem novamente desafiados observamos que uma porcentagem destes é capaz de rejeitar a um segundo desafio. Nossos resultados mostram que cerca de 2 a 3% dos camundongos C57Bl/6 naturalmente rejeitam mais de uma tentativa de implantação de células de melanoma B16F10-Nex2 (E.G. Rodrigues, observação pessoal).

A fim de caracterizar o perfil de citocinas dos animais naturalmente resistentes e susceptíveis ao melanoma B16F10-Nex2, camundongos C57BL/6 naturalmente resistentes a um desafio com $5x10^3$ células viáveis, foram novamente desafiados com $5x10^4$ células tumorais depois de 60 dias. Animais naturalmente resistentes e susceptíveis a esse segundo desafio com células B16F10-Nex2 tiveram o perfil de produção de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN-γ caracterizado após estimulação dos seus esplenócitos *in vitro* com antígenos tumorais, 30 dias após o segundo desafio (**Figura 1**).

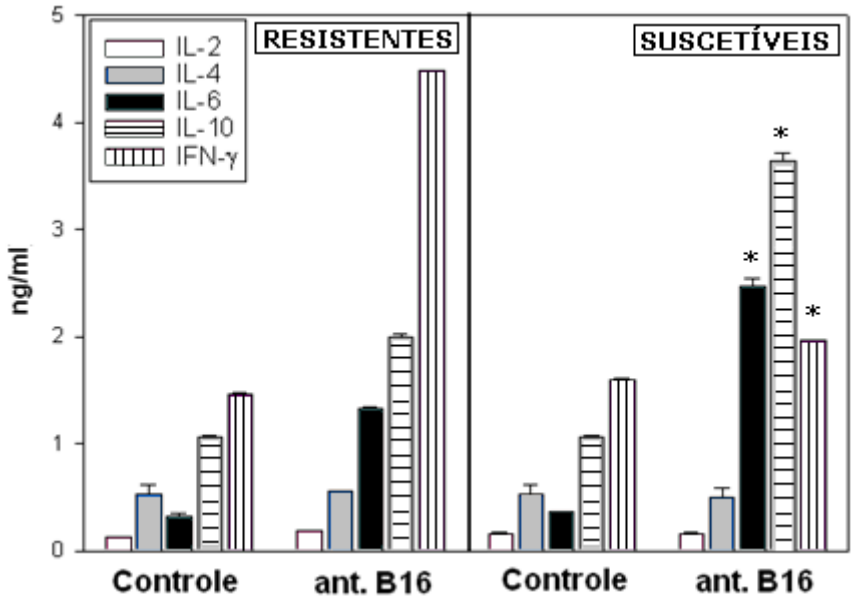

Figura 1. Caracterização do perfil de citocinas produzidas por esplenócitos de camundongos C57Bl/6 naturalmente resistentes ou susceptíveis a um segundo desafio com células B16F10-Nex2. Animais C57BL/6, machos de 4 a 6 semanas, foram desafiados com $5x10^3$ células B16F10-Nex2 subcutaneamente e os animais resistentes ao desenvolvimento tumoral foram desafiados novamente com $5x10^4$ células, no flanco oposto, 60 dias após ao primeiro desafio. Esplenócitos de animais resistentes (painel esquerdo) ou suscetíveis (painel direito) ao segundo desafio foram coletados 30 dias após o segundo desafio e foram estimulados *in vitro* com antígenos tumorais (células B16F10-Nex2 lisadas, **ant. B16**) ou não receberam estímulo (**controle**). As citocinas foram quantificadas por ELISA nos sobrenadantes de cultura. * $p<0,01$ citocinas significativamente diferentes em relação aos animais resistentes.

Os níveis de IL-2 e IL-4 produzidos foram os mesmos nos animais resistentes e susceptíveis, tanto em presença como em ausência de antígenos tumorais específicos.

Níveis elevados de IFN-γ, e superiores aos níveis detectados de IL-10 e IL-6, foram observados em esplenócitos de animais naturalmente resistentes estimulados *in vitro* com antígenos tumorais. Esses resultados sugerem que nos animais resistentes ocorra uma resposta imune antitumoral com um perfil de citocinas do tipo 1, corroborando resultados publicados que mostram que a resposta antitumoral está associada à produção de IFN-γ.

O papel fundamental da resposta T_H1 e do IFN-γ foi demonstrado em estudo onde animais infectados com microorganismos que induzem uma resposta imune T_H1, como por exemplo *Toxoplasma gondii,* ou alternativamente infectados com microorganismos indutores de resposta imune T_H2, como por exemplo *Schistosoma mansoni*, foram co-inoculados com células de melanoma B16F10. Observou-se redução significativa do crescimento do melanoma B16F10 quando uma resposta T_H1 foi induzida e este fenômeno foi dependente de IFN-γ (Rankin et al., 2003). O aumento endógeno de citocinas T_H1 nesse sistema, especialmente IFN-γ, gerou diminuição da angiogênese (Hunter et al., 2001), o que pode ter sido provocado pela inibição direta da proliferação de células endoteliais (Friesel et al., 1987; Norioka et al., 1992).

Além dos efeitos sobre a resposta imune (Tannenbaum & Hamilton, 2000), o IFN-γ possui diversas atividades citotóxicas antitumorais diretas (Yu & Thomas-Tikhonenko, 2001), podendo afetar a proliferação celular (Rodrigues e Travassos, 2002), a regulação do ciclo celular (Harvat et al.,

1996; Harvat et al., 1997; Bromberg et al., 1996; Mandal et al., 1998; Ikeda et al., 2002), induzir apoptose (Chin et al., 1997; Boehm et al., 1997, Detjen et al., 2001; Xu et al., 1998), induzir a produção de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) afetando a disponibilidade de triptofano (Konan & Taylor et al., 1996; Ozaki et al., 1998), e também induzir a expressão de iNOS e a consequente produção aumentada de NO (Gerecitano et al., 1999; Dong et al., 1994; Xie et al., 1996). O IFN-γ pode ainda aumentar a expressão de MHC classe I (Rodrigues e Travassos, 2002; Boehm et al., 1997) e MHC classe II (Böhm et al., 1998) em células tumorais, incluindo o melanoma B16F10.

Em contrapartida, em animais susceptíveis que desenvolveram tumor após o segundo desafio foram detectados níveis de IL-10 e IL-6 maiores do que os níveis de IFN-γ após estimulação *in vitro* dos esplenócitos com antígenos tumorais, sugerindo que nos animais susceptíveis o desenvolvimento tumoral se relaciona com a presença de uma resposta imune com perfil T_H2. Resposta T_H2 foi também observada durante a progressão do melanoma B16 em animais *in vivo* (Wei et al., 2005) e no cultivo da linhagem de melanoma humano WM793 com células dendríticas (McCarter et al., 2005). Altos níveis séricos de IL-10 e também de outras citocinas T_H2 podem servir de prognóstico ou controle da evolução de neoplasias em humanos (Lauerova eit al., 2002; Redondo et al., 2003; Botella-Estrada et al., 2005; Martínez-Escribano et al., 2005; Nevala et al., 2009).

Um padrão T_H1 nos animais resistentes e T_H2 nos animais susceptíveis ao tumor também foi observado quando citocinas intracelulares foram analisadas. Esplenócitos de animais desenvolvendo tumores com

volumes entre 1.500 e 2.000 mm^3 e de um animal naturalmente resistente ao tumor foram coletados e imediatamente marcados intracelularmente com anticorpos monoclonais específicos para IFN-γ ou IL-10 (**Figura 2**). Os resultados mostram que camundongos com tumor em desenvolvimento apresentaram razões do número absoluto de ***células produtoras de IFN-γ / células produtoras de IL-10*** menores (0,05 a 0,4) do que a razão observada no animal resistente (0,9). No animal resistente ao desenvolvimento tumoral, a quantidade de células produtoras de IFN-γ foi muito semelhante à de IL-10, resultando em uma razão próxima de 1, o que sugere que as células produtoras de IFN-γ secretem quantidades maiores de citocinas do que as células produtoras de IL-10.

Nossos resultados demonstram que camundongos C57Bl/6 naturalmente resistentes ao desenvolvimento do melanoma murino B16F10-Nex2 apresentaram uma resposta imune protetora de perfil T_H1. Encontramos nestes casos produção aumentada de IFN-γ com simultânea produção de IL-10, sendo a presença desta última citocina relacionada à imunorregulação do sistema (Revisado em Moore et al, 1993 e 2001).

Ao contrário, nos animais naturalmente susceptíveis, a inoculação de células B16F10-Nex2 gerou desenvolvimento tumoral e induziu uma resposta imune com perfil não-protetor, na qual a produção de IL-10 é maior do que a produção de IFN-γ, situação na qual existe inibição de diversos mecanismos antitumorais (Corinti et al., 2001; Akdis et al., 2001; Seo et al., 2001; de Waal Malefyt et al., 1991; Nestlé et al., 2004).

Nos animais susceptíveis, observou-se também uma produção aumentada de IL-6 que pode inibir respostas imunológicas de padrão T_H1 (Dodge et al., 2003). A IL-6 é considerada como um fator preditivo de um

pior prognóstico de vários tipos de câncer incluindo o melanoma (Łukaszewicz et al., 2007; Mouawad et al., 2002)

A alteração de um padrão de resposta T_H1 para T_H2 também foi observado por Wei e colaboradores (2005) durante o desenvolvimento tumoral. Esses autores mostraram uma polarização T_H2 da resposta imunológica com aumento de IL-10 e diminuição de IFN-γ em animais em fases mais tardias do desenvolvimento tumoral (20 dias após desafio).

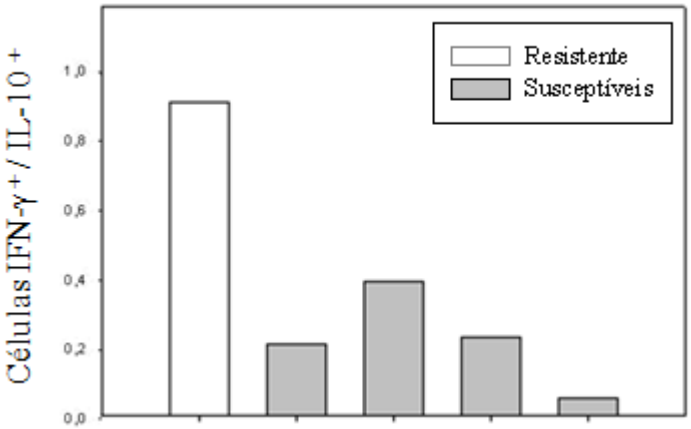

Figura 2. Relação entre o número de células produtoras de IFN-γ e IL-10 no baço de animais C57BL/6 naturalmente resistentes ou susceptíveis a um desafio tumoral subcutâneo. Esplenócitos de um animal resistente ou de 4 animais com desenvolvimento tumoral avançado (volumes tumorais de 1.500 a 2.000 mm^3) foram isolados e imediatamente marcados intracelularmente com anticorpos contra IFN-γ e IL-10 conjugados a fluoróforo. A marcação intracelular foi analisada em citômetro de fluxo utilizando o programa Cell Quest®. O gráfico demonstra a razão entre o número absoluto de células positivas para IFN-γ e células positivas para IL-10. Cada barra representa um animal.

1.2. Desenvolvimento do melanoma murino B16F10-Nex2 em camundongos geneticamente deficientes em IL-10 (IL-10KO): comparação com animais C57BL/6 selvagens

Resultados já publicados demonstram que o desenvolvimento do melanoma murino B16F10 está relacionado ao aumento na produção de IL-10, e consequente redução na produção de IFN-γ (Wei et al., 2007). Nossos resultados mostraram um aumento da produção de IL-10 em animais naturalmente susceptíveis ao melanoma murino, e que o IFN-γ está presente em maiores concentrações em animais C57Bl/6 naturalmente protegidos contra o desenvolvimento tumoral. Para avaliar se a ausência da IL-10 poderia ser benéfica aos animais inoculados com as células tumorais, animais geneticamente deficientes nessa interleucina (IL-10KO) foram inoculados subcutaneamente com diferentes doses de células tumorais e a sobrevida foi comparada à sobrevida dos animais C57Bl/6 selvagens (WT) (**Figura 3**).

Observou-se neste experimento que 100% dos animais WT desenvolveram o tumor nas 3 doses utilizadas. No grupo dos animais IL-10KO, observou-se um aumento significativo na sobrevida em todos os ensaios, e esse aumento foi inversamente correlacionado à quantidade de células inoculadas. Alguns animais foram totalmente protegidos nas doses mais baixas: 65% na dose de $5x10^3$ e 15% na dose de $5x10^4$.

Em diversos tipos de terapias que visam à indução de resposta antitumoral potente, com ativação de mecanismos T_H1-dependentes, a deficiência genética de IL-10 é benéfica, melhorando respostas efetoras que geram proteção (Riemensberger et al., 2002; Litton et al., 1999; Wang et al., 2001; Halak et al., 1999).

Os resultados apresentados demonstram que a ausência sistêmica de IL-10, mesmo sem o emprego de um fator estimulador de resposta T_H1, provoca retardo ou até mesmo proteção contra o estabelecimento e proliferação de células tumorais no modelo subcutâneo de melanoma murino B16F10-Nex2.

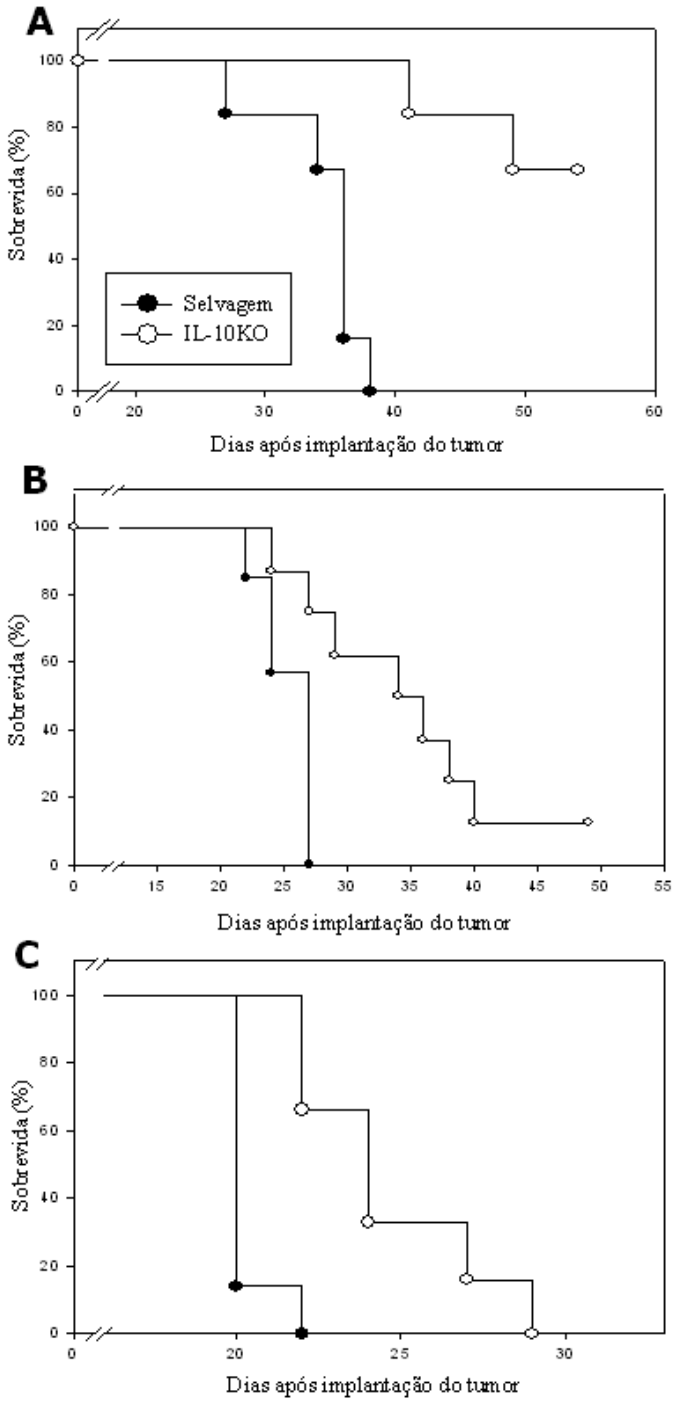

Figura 3. Sobrevida de animais C57Bl/6 selvagens (WT) e IL10KO desafiados subcutaneamente com células B16F10-Nex2. Animais IL-10KO e WT foram desafiados subcutaneamente com **(A)** $5x10^3$, **(B)** $5x10^4$ e **(C)** $5x10^5$ células B16F10-Nex2. O volume tumoral foi medido a cada 2-3 dias e os animais foram sacrificados com um volume máximo de 3 cm^3. (A) Seis animais por grupo; $p<0.001$ (B) Sete animais no grupo WT e oito no IL-10KO; $p<0.01$; (C) Sete animais no grupo WT e seis no IL-10KO; $p<0.003$.

Em seguida, avaliamos o perfil de citocinas envolvidas na resposta protetora induzida no camundongo geneticamente deficiente em IL-10.

Animais IL-10KO e WT foram inoculados subcutaneamente com $5x10^3$ células tumorais e depois de 11 dias, o soro foi coletado. Cinco amostras foram associadas por grupo, e a quantidade de IFN-γ presente nos soros foi quantificada por ELISA. Observou-se concentração de IFN-γ cerca de 10 vezes mais elevada em animais IL-10KO em comparação com os animais WT (**Figura 4**).

Animais WT ou IL-10KO receberam uma dose sub-ótima de células B16F10-Nex2 (10^3 células viáveis) e após 7 dias foram desafiados subcutaneamente com 10^4 células tumorais. Vinte dias depois do segundo desafio, os esplenócitos dos animais foram coletados, e após estimulação *in vitro* com antígenos tumorais, a produção de IL-12 foi avaliada. Observou-se que os níveis de IL-12 nos animais IL-10KO eram superiores aos níveis detectados nos animais WT (**Figura 5**). Foi também observado que nas condições do experimento, 20 dias após o segundo desafio cerca de 40% dos animais WT apresentavam pequenos nódulos subcutâneos, sugestivos de tumor. Os animais IL-10KO se encontravam 100% livres de tumor nas mesmas condições (resultados não mostrados).

Nesse mesmo experimento foi avaliada a produção de IFN-γ por esplenócitos, e observou-se que os grupos de animais (IL-10KO e WT) apresentavam concentrações semelhantes (resultados não mostrados). Esse resultado pode ser explicado pelo estágio de desenvolvimento tumoral que os animais WT se encontravam. Como demonstrado por Wei et al (2007), a produção de IFN-γ no início do desenvolvimento do melanoma B16F10 é elevada, caindo no decorrer da progressão tumoral.

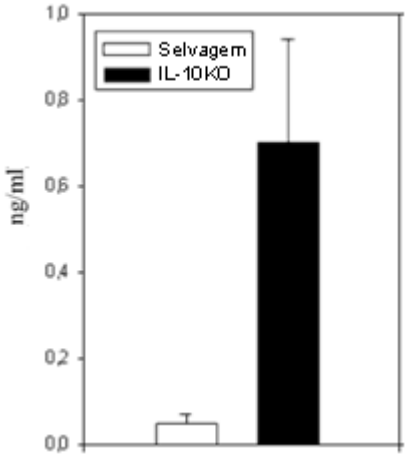

Figura 4. Níveis séricos de IFN-γ em animais C57BL/6 selvagens ou IL-10KO após desafio com células B16F10-Nex2. Animais selvagens e IL-10KO foram desafiados com $5x10^3$ células subcutaneamente e após 11 dias o soro foi coletado. *Pool* de 5 amostras diluídas 1:10 foram quantificadas por ELISA. $p<0,01$.

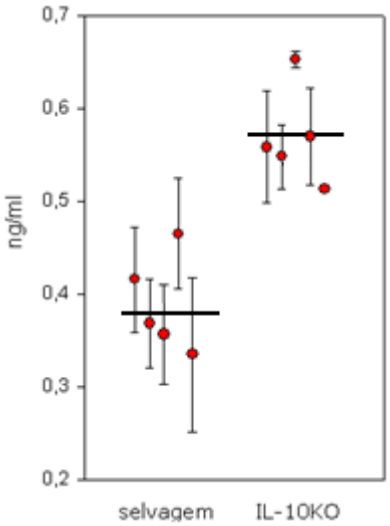

Figura 5. Produção *ex vivo* de IL-12 por esplenócitos de animais C57BL/6 selvagens ou IL-10KO após segundo desafio com células B16F10-Nex2. Animais selvagens e IL-10KO foram desafiados com 10^3 células subcutaneamente e após 7 dias desafiados novamente com 10^4 células, no flanco oposto. Após 20 dias, esplenócitos foram estimulados *ex vivo* com lisado de células B16F10-Nex2, e a citocina quantificada por ELISA. Os dados representam valores da média das triplicatas e desvio padrão de animais individuais. A linha horizontal representa o valor médio de cada grupo. $p<0,01$ comparando-se as médias dos valores dos dois grupos.

Embora uma maior porcentagem de animais geneticamente deficientes em IL-10 rejeite um implante de células de melanoma murino B16F10-Nex2, alguns indivíduos permitem a progressão tumoral, e esse efeito é mais evidente quando doses maiores de células são utilizadas, como demonstrado anteriormente (**Figura 3**).

Avaliamos então se os níveis de citocinas T_H1 protetoras estariam alterados nos animais IL-10KO resistentes ou susceptíveis ao melanoma.

Camundongos IL-10KO foram inoculados subcutaneamente com 10^4 células B16F10-Nex2, e após 35 dias, foram coletados os esplenócitos de animais resistentes ao desenvolvimento tumoral e de animais sensíveis ao desenvolvimento tumoral, apresentando tumores com volumes ao redor de 400 mm^3. Esses esplenócitos foram estimulados *in vitro* com antígenos tumorais e a produção de IL-12 e IFN-γ foi quantificada. Observou-se que nessas condições esplenócitos de animais IL-10KO resistentes produziram mais IFN-γ e IL-12 do que as células de animais IL-10KO susceptíveis ao desenvolvimento do tumor (**Figura 6**). A produção de IFN-γ e de IL-12 em níveis semelhantes pelos esplenócitos dos animais IL-10KO resistentes e susceptíveis ativados com um estímulo inespecífico (PMA e ionomicina) sugerem que as células respondem adequadamente a outros estímulos e que a diminuição observada nas células dos animais susceptíveis é antígeno-específica.

Como observado nos camundongos C57Bl/6 selvagens, os animais IL-10KO que permitiram o desenvolvimento do melanoma subcutâneo B16F10-Nex2 apresentaram uma redução na produção de citocinas T_H1 protetoras.

Para determinar se a proteção observada nos camundongos IL-10KO era dependente dessa maior concentração de IFN-γ produzida, essa citocina

foi neutralizada com anticorpos específicos *in vivo* e o desenvolvimento tumoral foi observado nesses animais.

Na **Figura 7** observa-se que a neutralização de IFN-γ nos camundongos IL-10KO desafiados com células de melanoma B16F10-Nex2 reduziu a sobrevida desses animais, que ficou então muito similar à sobrevida dos animais C57Bl/6 selvagens. Esse resultado mostra que a resposta protetora induzida pela inoculação de células tumorais nos animais IL-10KO é IFN-γ-dependente.

Esses dados demonstram que a deficiência sistêmica de IL-10 pode levar a uma maior resistência contra o melanoma murino B16F10-Nex2, propiciando resposta protetora com perfil T_H1 nesse modelo, com produção de altas concentrações de IFN-γ e IL-12, e que essa resposta protetora é IFN-γ-dependente.

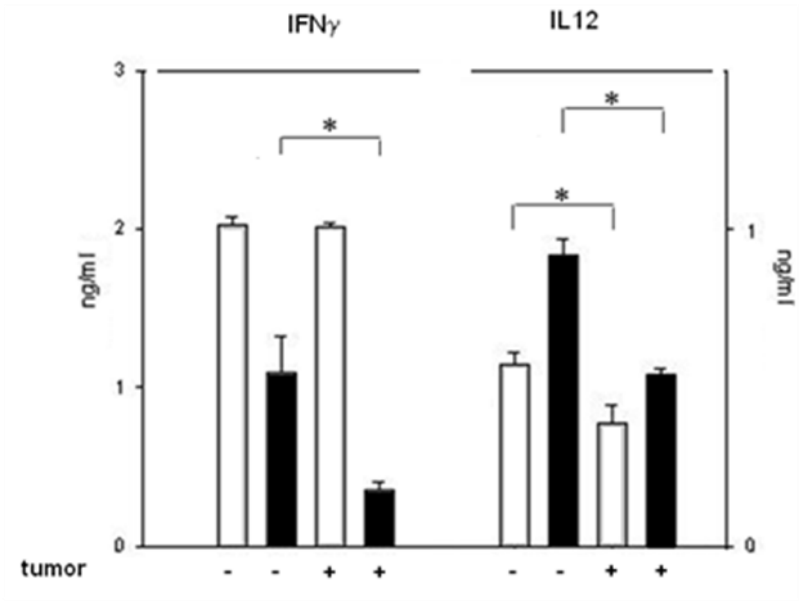

Figura 6. Produção de citocinas por esplenócitos de animais IL-10KO desafiados com células B16F10-Nex2. Esplenócitos de animais IL-10KO sensíveis **(+)** ou resistentes **(-)** ao desenvolvimento tumoral foram estimulados com PMA/ionomicina **(barras vazias)** ou com lisado de células B16F10-Nex2 **(barras cheias)**, como descrito em Matérias e Métodos. As concentrações de IFN-γ e IL-12 no sobrenadante de cultura foram determinadas por ELISA. * $p<0,03$.

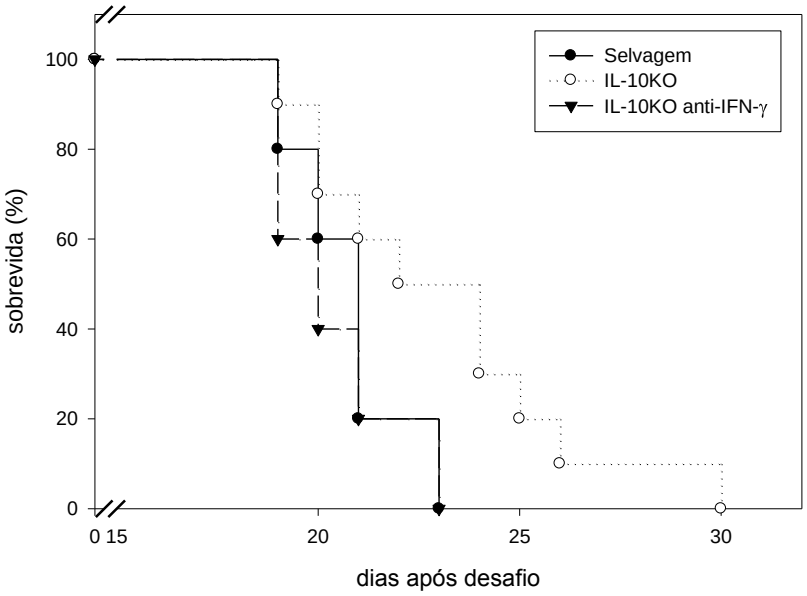

Figura 7. Sobrevida de animais IL-10KO depletados de IFN-γ e desafiados com células B16F10-Nex2. Animais IL-10KO receberam intraperitonealmente 250 μg de anticorpo anti-IFN-γ no dia -1 e 125 μg nos dias 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13. Animais IL-10KO controle e animais selvagem (C57Bl/6) receberam somente PBS nos mesmos dias. Todos os animais foram desafiados subcutaneamente com 10^4 células B16F10-Nex2 no dia 0 (zero). Dez animais por grupo. $p<0.02$ entre os grupos de animais IL-10KO.

1.3. Caracterização de células apresentadoras de antígenos (CAAs) de animais selvagens e IL-10KO, envolvidas na resposta protetora natural contra o melanoma murino B16F10-Nex2.

Processos imunológicos eficientes no combate contra tumores envolvem a captura e apresentação de antígenos com posterior ativação de respostas efetoras específicas. As principais células que estão envolvidas nesse processo são os macrófagos e as células dendríticas, por isso também chamadas de células apresentadoras de antígenos (CAA).

Células dendríticas (DCs) são utilizadas como adjuvantes de vacinas antitumorais (Kochman & Bernard, 1999; Di Pucchio et al., 2006), mas também podem induzir a tolerância tumor-específica observada durante a progressão do melanoma, devido principalmente ao IL-10 presente no microambiente tumoral, que reduz a expressão de moléculas CD86 e leva a uma produção de citocinas T_H2 em pacientes com doença progressiva (Enk et al., 1997).

A resposta antitumoral, protetora ou não, como mostrada em nossos resultados é iniciada por células apresentadoras de antígenos, e avaliamos se a ausência de IL-10 poderia alterar o papel dessas células ativadas com antígenos do melanoma murino B16F10-Nex2.

Células progenitoras de medula óssea de camundongos C57Bl/6 selvagens ou IL-10KO foram maturadas *in vitro* para macrófagos ou células dendríticas. Em seguida, essas células foram estimuladas com antígenos tumorais *in vitro* e foi realizada uma caracterização fenotípica e funcional de CAAs nos modelos de maior resistência (animais IL-10KO) ou susceptibilidade (animais C57BL/6) à progressão de células B16F10-Nex2.

A produção de mediadores solúveis pró-inflamatórios (**Figura 8**) e a expressão de marcadores de ativação na superfície celular (**Figura 9**) foram comparadas nessas duas linhagens de animais.

Células dendríticas e macrófagos obtidos de camundongos IL-10KO ativadas com antígenos tumorais, na presença de IFN-γ, produziram níveis significativamente maiores de IFN-γ, IL-12 e TNF-α, com exceção do TNF-α produzido por DCs, que em ambas as linhagens foi muito semelhante (**Figura 8**). Essas citocinas são pró-inflamatórias e associadas à indução de uma resposta imune protetora contra tumores. Estes dados sugerem que a ausência da regulação negativa exercida pela IL-10 nessas células apresentadoras de antígenos causou um aumento dos níveis de citocinas T_H1, IFN-γ, IL-12 e TNF-α, o que pode levar a uma maior estimulação de células efetoras antitumorais, como células NK e à indução de linfócitos T tumor-específicos (Yu & Fu, 2001; Seino et al., 2006).

Já foi demonstrado que um dos principais mecanismos de imunossupressão da IL-10 está ligado à atenuação de funções dos macrófagos e monócitos, incluindo a diminuição de expressão de citocinas pró-inflamatórias (Couper et al., 2008; García-Hernández et al., 2002; de Waal-Maleyfit et al., 1991; Fiorentino et al., 1991; Bogdan et al.;1991).

Células dendríticas de animais IL-10KO e C57Bl/6 foram estimuladas da mesma forma, e a expressão de marcadores de ativação celular foi analisada por citometria de fluxo (**Figura 9**). Os resultados mostram que células dendríticas de animais IL-10KO apresentaram um aumento na expressão principalmente de CD40 e CD80, e um aumento discreto na expressão de CD86 e MHC classe II. Estes dados indicam que na ausência de IL-10 as células dendríticas após estimulação com antígenos tumorais

apresentaram-se mais ativadas, sendo, portanto mais aptas a apresentar antígenos e ativar células efetoras, podendo induzindo respostas mais eficientes e com menor grau de regulação negativa ou anergia.

Esse mesmo resultado já havia sido observado por Yang e colaboradores (2006), quando células dendríticas modificadas geneticamente para expressar IL-10 produziram menores níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IFN-γ e TNF-α), e expressaram uma menor quantidade de moléculas marcadoras de ativação na superfície celular (MHCII, CD40, CD80 e CD86) e assim, quando transferidas *in vivo* em modelo de miocardite autoimune experimental, induziram respostas efetoras de menor intensidade e consequentemente, um menor grau de auto-imunidade cardíaca.

A alta expressão da molécula coestimuladora CD40 em células dendríticas gera, entre outros efeitos, a produção de altos níveis de IL-12 e IFN-γ, estimulando linfócitos citotóxicos e polarizando a resposta imunológica para um padrão T_H1, situações descritas como antitumorais em vários casos (Cella et al., 1996; Murugaiyan et al., 2007). Já as moléculas CD80 e CD86, coestimuladoras de células T, são essenciais para a ativação de linfócitos, estimulando a proliferação celular e a produção de IL-2 e IFN-γ (Lenschow et al., 1996; Harding et al., 1992). A presença de grande número de proteínas da classe II do complexo de histocompatibilidade (MHC) na superfície celular mostra a elevada capacidade de apresentação de antígenos internalizados e reflete a alta ativação de uma célula apresentadora de antígeno estimulada por mediadores pró-inflamatórios (Cella et al., 1997).

Diversos trabalhos mostram a regulação negativa da maturação e/ou ativação de células apresentadoras de antígenos como um dos principais mecanismos pró-tumorais da IL-10, principalmente pela geração de linfócitos reguladores e até mesmo anergia clonal durante a resposta antitumoral (Chen et al., 2007; Steinman et al., 2003).

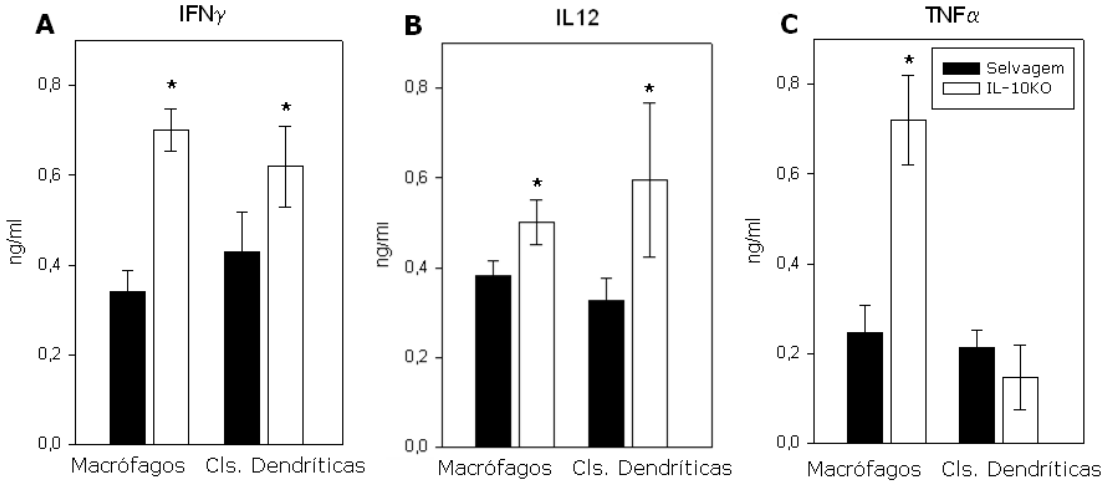

Figura 8. Produção de citocinas por células dendríticas e macrófagos de animais C57Bl/6 selvagens ou IL-10KO estimuladas *ex vivo* por IFN-γ e antígenos tumorais. Células dendríticas e macrófagos derivados de medula óssea de animais selvagens (barras cheias) ou IL-10KO (barras vazias) foram estimuladas com lisado de células B16F10-Nex2 e IFN-γ. As concentrações de **(A)** IFN-γ, **(B)** IL-12 e **(C)** TNF-α foram quantificadas por ELISA nos sobrenadantes de cultura. Resultados representativos de pelo menos três ensaios independentes. * $p<0,05$.

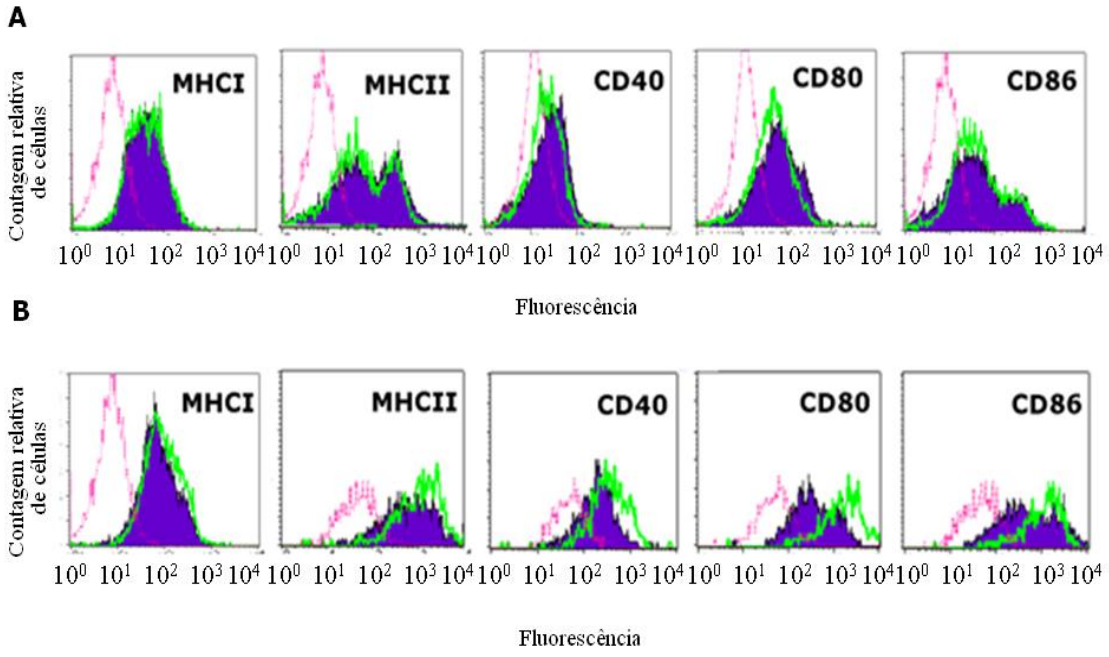

Figura 9. Expressão de moléculas de superfície por células dendríticas de animais C57Bl/6 selvagens ou IL-10KO estimuladas *ex vivo* por IFN-γ e antígenos tumorais. Células dendríticas derivadas de medula óssea de animais selvagens ou IL-10KO estimuladas **(B)** ou não **(A)** com lisado de células B16F10-Nex2 e IFN-γ. As células foram marcadas com anticorpos conjugados a fluoróforos e as amostras analisadas em citômetro de fluxo. Histogramas representativos das leituras de células expressando MHCI, MHCII, CD40, CD80 e CD86. Como controle foi utilizado uma associação das células provenientes dos animais C57Bl/6 e IL-10KO incubadas na ausência dos anticorpos fluorescentes (linha rosa). Células de animais C57Bl/6 e IL-10KO são representadas pelo histograma preenchido em azul e pela linha verde, respectivamente.

1.4. Papel das células dendríticas na maior proteção observada em animais geneticamente deficientes em IL-10

Nossos resultados demonstraram que nos animais IL-10KO existe um controle mais evidente do crescimento tumoral e que as suas células dendríticas, além dos macrófagos, quando estimulados *in vitro* com antígenos tumorais apresentavam um maior grau de ativação, com maior produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas coestimuladoras.

Para comprovar que células apresentadoras de antígenos estão envolvidas na resposta protetora antitumoral observada nesses animais, células dendríticas isoladas de animais IL-10KO e C57Bl/6 selvagens foram obtidas, associadas com antígenos tumorais e adotivamente transferidas para animais C57Bl/6 que foram posteriormente desafiados com células de melanoma murino B16F10-Nex2. Foi utilizado tentativamente um protocolo vacinal, onde as células dendríticas foram transferidas 1 e 2 semanas antes do desafio com as células tumorais.

Quando a vacinação foi realizada com células dendríticas deficientes em IL-10, 70% dos animais tratados apresentaram proteção após o desafio tumoral, ao contrário da terapia com células dendríticas isoladas de animais C57Bl/6 selvagens, na qual todos os animais desenvolveram tumor (**Figura 10A**). A proteção observada no tratamento foi dependente da associação das células dendríticas aos antígenos tumorais (**Figura 10B**), sugerindo que a proteção é gerada a partir de resposta específica antitumoral.

Embora algumas tentativas de vacinação com células dendríticas selvagens tenham sido bem sucedidas em outros modelos (revisado em Zhang et al., 2002; Hegmans et al., 2005; Zhang & Huang, 2008; Fields et al., 1998), o melanoma murino B16 é um modelo pouco imunogênico, que

responde pouco à diversas imunoterapias já analisadas, e que por isso pode necessitar de abordagens mais agressivas para terapia por vacinação com células dendríticas (Cao et al., 1998; Melcher et al., 1999). Estes fatos podem explicar porque animais que receberam células dendríticas isoladas de animais C57Bl/6 selvagens, mesmo na presença de antígenos tumorais, tenham desenvolvido tumores após vacinação.

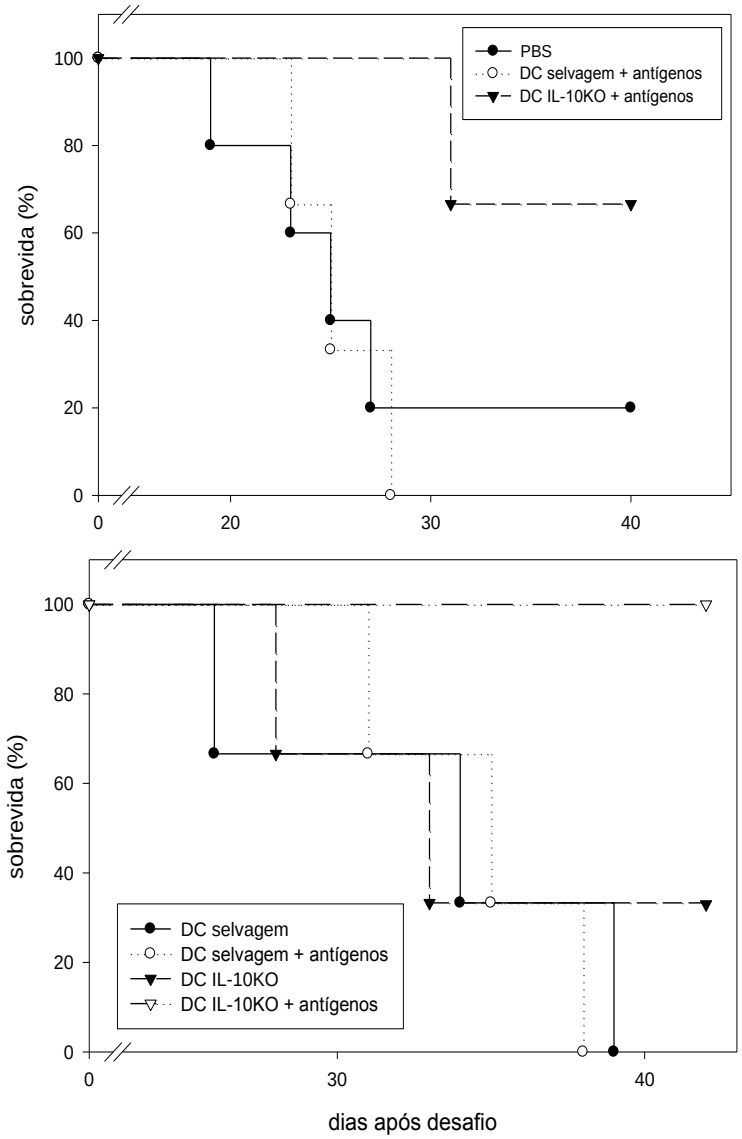

Figura 10. Sobrevida de animais C57BL/6 desafiados com células B16F10-Nex2 após transferência adotiva de células dendríticas selvagens ou IL-10KO associadas a antígenos tumorais. Células dendríticas (DC) maturadas a partir de progenitores de medula óssea de animais IL-10KO ou C57Bl/6 selvagens foram adotivamente transferidas nos dias -14 e -7, na presença ou ausência de antígenos tumorais (lisado de células B16F10-Nex2). **(A)** DCs transferidas com antígenos tumorais e **(B)** DCs transferidas com ou sem antígenos tumorais. No dia 0 (zero), os animais foram desafiados subcutaneamente com **(A)** $5x10^4$ ou **(B)** 10^4 células B16F10-Nex2. Os tratamentos e o desafio foram feitos na mesma região do flanco direito dos animais. Três animais em cada grupo experimental e cinco animais no grupo PBS. **(A)** $p<0,02$ entre grupos DC; **(B)** $p<0,03$ entre grupo DC IL-10KO + antígenos tumorais e grupos DC selvagens.

Esse resultado sugere que antígenos tumorais são capazes de ativar as células dendríticas, e que na ausência de produção de IL-10 por essas células, essa ativação leva à indução de uma efetiva resposta protetora *in vivo*, quando essas células são adotivamente transferidas para animais C57Bl/6.

Os antígenos do melanoma murino B16F10-Nex2 responsáveis pela ativação das DCs observada ainda não são conhecidos. Resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório, mostram a existência nessas células tumorais de um antígeno de natureza proteica, que quando presente em uma fração tumoral semi-purificada foi capaz de ativar macrófagos a secretarem IFN-γ, IL-12, TNF-α e a produzirem óxido nítrico (Batista et al., 2002). Mais recentemente, nosso grupo demonstrou também que glicoesfingolipídeos tumorais apresentados por células dendríticas ativam células NKT, mas que também gangliosídeos tumorais são capazes de inibir essa resposta protetora (Dias et al, 2009). Esses resultados sugerem que existam componentes tumorais capazes de ativar uma resposta imune protetora, mas que são regulados no microambiente tumoral por componentes tumorais imunossupressores, tendo em vista que somente uma pequena porcentagem de animais rejeita naturalmente o melanoma murino B16F10-Nex2.

Na presença de IL-10 as DCs não maturam corretamente (Gerlini et al, 1994), diminuindo a expressão de moléculas estimuladoras (Corinti et al., 2001, McBride et al., 2002; He et al., 2005; de Wall-Malefyt et al., 1991) e citocinas inflamatórias (He et al., 2005; Corinti et al., 2001; Igietseme et al., 2000; Chhabra et al., 2008). Esses efeitos da IL-10 nas DCs podem fazer com que essas células estimulem incompletamente

linfócitos T $CD8^+$ (Mehrotra et al., 2004), e também levar à geração de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ anérgicos, pela mediação da molécula reguladora CTLA4 (Steinbrink et al., 1999; Steinbrink et al., 2002).

Quando DCs são estimuladas com CD40L (Cella et al., 1996), IL-12, IFN-γ, TNF-α ou ligantes de TLRs (Grauer et al., 2006), estas células adquirem um fenótipo mais ativado, com maior produção de citocinas pró-inflamatórias e marcadores de ativação, podendo induzir uma resposta protetora antitumoral.

No entanto, essas células dendríticas altamente ativadas podem causar danos por exacerbação de mecanismos pró-inflamatórios. Os resultados satisfatórios obtidos após transferência adotiva de células dendríticas IL-10KO, foram obtidos após duas injeções de células previamente ao desafio com células tumorais. Em protocolos prévios, realizados com 3 transferências de células dendríticas, observamos que embora 100% dos animais tratados com células IL-10KO tenham sido protegidos contra o desenvolvimento tumoral, 60% deles desenvolveram lesões cutâneas inflamatórias graves próximas ao local da vacinação celular (resultados não mostrados).

Sabe-se que respostas de proteção parcial contra tumores podem ser geradas por protocolos de vacinação com células dendríticas (Zhang e Huang, 2008; Morisaki et al., 2003, Zhang et al., 2002, Fields et al., 1998). Todavia, também está claro que esses protocolos devem ser melhorados em diferentes aspectos para que respostas mais eficazes sejam obtidas. Importantes pontos a serem revisados nos protocolos já descritos são, por exemplo: tipo e doses de peptídeos tumorais utilizados para pulsar as DCs, métodos para pulsar DCs, vias e intervalos para administração das DCs,

estado de maturação das DCs e suas subpopulações (Zhang et al., 2002). Outras estratégias já utilizadas para induzir respostas antitumorais eficazes utilizando a vacinação com células dendríticas incluem a transfecção das mesmas com elementos imuno-modulatórios, como por exemplo, CD40 (Kikuchi et al., 2000), CD40L (Tomihara et al., 2007), GM-CSF (Curiel-Lewandrowski et al., 1999; Ozawa et al., 1999), TNF-α (Klein et al., 2000), IL-12 (Nishioka et al., 1999; Akiyama et al., 2000) e IL-2 (Akiyama et al., 2000).

Como mencionado anteriormente, em alguns modelos tumorais é possível observar uma proteção significativa quando são utilizados protocolos de vacinação com DCs não manipuladas geneticamente pulsadas com antígenos. No entanto, em modelos de baixa imunogenicidade, como o do melanoma murino B16, as tentativas de vacinação em geral, e também aquelas baseadas na utilização de DCs, apresentam menor sucesso na geração de respostas efetoras (Melcher et al., 1999). Nos modelos de baixa imunogenicidade, modificações genéticas das DCs podem ser tentativamente utilizadas para aumentar a eficácia dos protocolos, e no modelo de melanoma murino B16 algumas modificações já foram estudadas: DCs fusionadas com células tumorais B16 (Wang et al., 1998), DCs transfectadas com homólogo de glypican-3 (Motomura et al., 2006), DCs modificadas para expressar IL-12 (Miller et al., 2003), DCs transduzidas com vetor lentiviral expressando TRP-2 murino (Metharom et al., 2001), DCs transduzidas com adenovírus recombinante contendo a sequência de TRP2 humano (Steitz et al., 2001), ou com adenovírus recombinante codificando gp100 humano (Wan et al., 1999) ou ainda DCs

fusionadas com células tumorais B16 juntamente com transfecção do gene de GM-CSF (Cao et al., 1999).

DCs geneticamente deficientes em IL-10 pulsadas com antígenos tumorais já foram utilizadas com sucesso na geração de uma resposta imune protetora em modelo de carcinoma hepatocelular (Chen et al., 2007). Nossos resultados demonstram que no melanoma B16F10-Nex2, modelo de baixa imunogenicidade, a terapia celular adotiva com DCs deficientes em IL-10 pulsadas com antígenos tumorais induz uma resposta imune protetora mais eficaz do que a resposta gerada com DCs selvagens, expressando essa citocina.

2. Clonagem da porção extracelular do receptor de IL-10 (IL-10RPe)

2.1. Padronização do ensaio para obtenção de RNAm a partir de macrófagos ativados com LPS para clonagem do mini-gene da porção extracelular do receptor da IL-10

Nossos resultados sugeriram que a ausência da IL-10 poderia retardar o desenvolvimento do melanoma murino B16F10-Nex2 *in vivo*, mesmo quando uma resposta T_H1 não fosse ativamente induzida por uma vacinação específica e/ou tratamento. Desta forma, buscamos protocolos para a neutralização dessa interleucina *in vivo*.

Modelos pré-clínicos de atenuação da função da IL-10 com anticorpos monoclonais anti-IL-10 (Jovasevic et al., 2004) ou anti-receptor de IL-10 (IL-10R, Vicari et al., 2002), associada a um protocolo de vacinação, foram efetivos ao induzir respostas antitumorais com alguma porcentagem de inibição do crescimento do tumor. Porém, terapias que utilizam anticorpos monoclonais apresentam dificuldades na humanização do anticorpo, com o consequente alto custo do tratamento. Por isso, neste trabalho avaliamos uma estratégia de terapia gênica, utilizando um vetor plasmidial que codifica a porção extracelular solúvel da cadeia 1 do receptor de IL-10, porção que tem afinidade suficiente pra interagir com a IL-10 (Tan et al., 1995) e competir com o receptor funcional na superfície celular, funcionando como um receptor "decoy".

Com o objetivo de determinarmos o melhor momento para a extração do RNA total para amplificação do cDNA do receptor de IL-10 ou parte dele, observamos a cinética de produção de IL-12, IL-10 e óxido

nítrico (NO) por macrófagos peritoneais ativados com LPS de 6 a 72 horas (**Figura 11 A, B e C**).

A produção de IL-12 e NO detectada no sobrenadante de cultura de macrófagos foi tempo-dependente, atingindo seu máximo em 72h (**Figura 11 B e C**). Foi também observado que macrófagos peritoneais não ativados apresentaram uma produção basal de IL-10 elevada, e a estimulação com LPS aumentou esses níveis atingindo um pico máximo após 6 horas. O nível basal foi recuperado após 24 horas e 36 horas após a estimulação os níveis de IL-10 encontraram-se abaixo do basal, permanecendo assim até 72 horas.

A produção de NO por macrófagos maturados a partir de precursores de medula óssea foi quantitativamente menor (**Figura 11 D**), no entanto, seguiu o mesmo padrão da produção de NO por macrófagos peritoneais.

Como observado, a concentração de IL-10 no sobrenadante de cultura dos macrófagos diminui a níveis abaixo do basal 24 horas após a estimulação com LPS. Uma explicação possível para esse achado é que as altas concentrações de IL-10 observadas regulam positivamente a expressão do receptor da interleucina, podendo gerar um *feedback* negativo com diminuição dos níveis de IL-10, garantindo o desenvolvimento de uma resposta pró-inflamatória, observada pela produção de IL-12 e NO.

Desta forma, estimando o tempo de produção máxima do IL-10R, e consequentemente de seu RNA mensageiro, foi escolhido o ponto de 30 horas de estimulação com LPS para o isolamento do RNA total dos macrófagos para realização do RT-PCR e amplificação do cDNA referente à porção extracelular ou do cDNA completo do receptor de IL-10 murino.

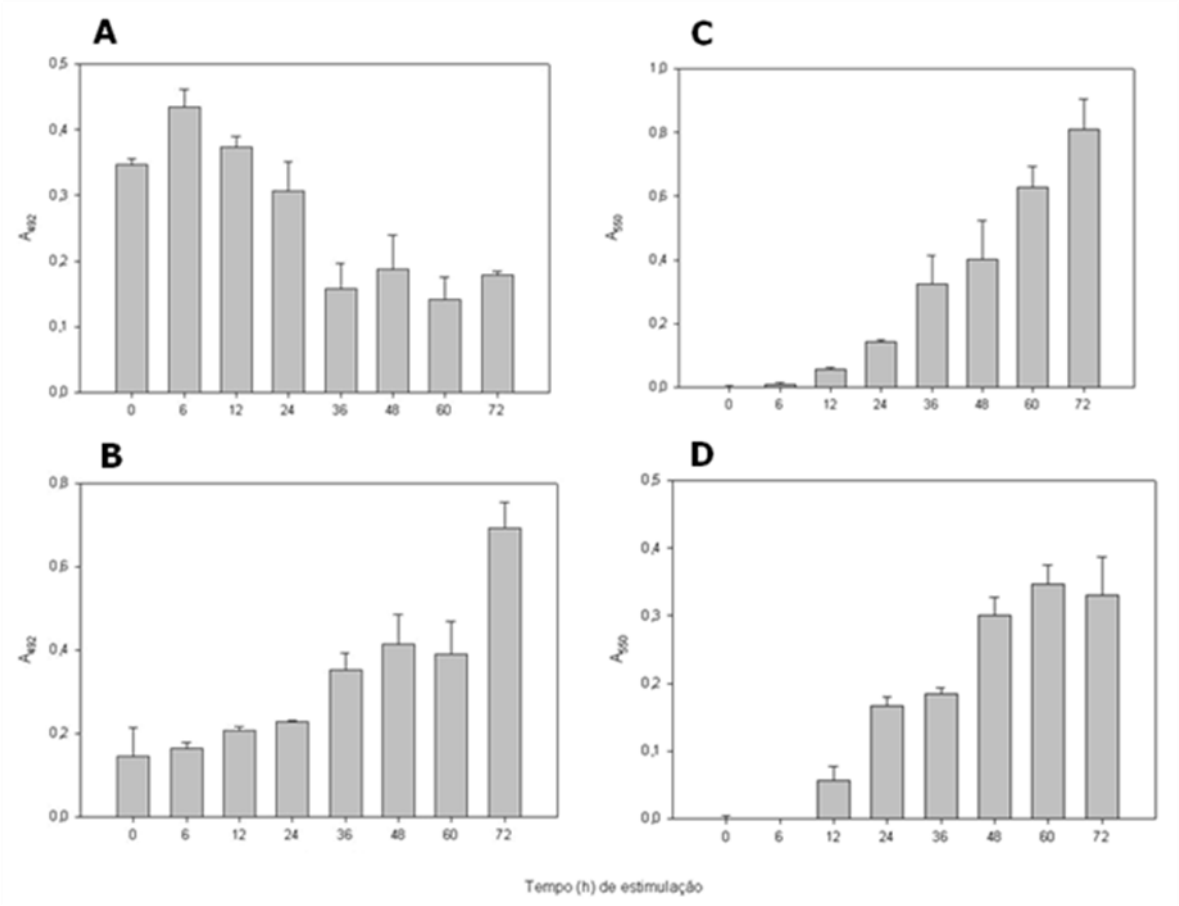

Figura 11. Perfil de produção de IL-10, IL-12 e NO por macrófagos estimulados com LPS. Macrófagos recrutados na cavidade peritoneal **(A, B e C)** ou derivados de progenitores de medula óssea **(D)** foram estimulados *in vitro* por diversos tempos com 400 ng/ml de LPS. IL-10 (**A**) e IL-12 (**B**) foram quantificadas no sobrenadante de cultura por ELISA e o NO (**C** e **D**) por reação com reagente de Griess, como descrito em Materiais e Métodos.

2.2. Obtenção do cDNA e amplificação do gene do receptor da IL-10 murina

RNA total de macrófagos derivados de medula óssea foi extraído como descrito em Materiais e Métodos e a integridade do RNA pode ser observada na **Figura 12A**. Os RNAs extraídos foram utilizados para obtenção de cDNA, e este foi submetido a reações de PCR com *primers* para o gene de β-actina como controle e *primers* para amplificação do receptor completo (IL-10R) ou da porção extracelular do receptor de IL-10 (IL-10Pe) **(Figura 12B)**. A ausência de contaminação do RNA extraído por DNA foi demonstrada na negatividade da reação de amplificação da β-actina quando o cDNA foi preparado na ausência da enzima transcriptase reversa (**Figura 12B**)

Para determinar as melhores condições de amplificação do receptor de IL-10, foi utilizado um *kit* de padronização (PCR Optimizer kit – Invitrogen) que permite o uso de 16 diferentes tampões, que variam tanto na concentração de $MgCl_2$ quanto no pH, além de sugerir a utilização facultativa de DMSO em diversas concentrações (10% - 0,1%).

Em reações utilizando o par de *primers* IL-10R, para amplificação do gene completo do receptor da interleucina com cerca de 1700 pb, não foi possível observar nenhuma amplificação utilizando o *kit* descrito acima, na temperatura de anelamento de 50°C prevista como ideal para o par de primers utilizado (**Figura 13A**). Com o par de *primers* IL-10Pe, para amplificação da porção extracelular do receptor de IL-10 sem o peptídeo sinal com cerca de 450 pb, foi possível obter, com alguns tampões, um rastro de amplificações abrangendo um tamanho de 800 pares de bases (pb) até algumas centenas de pares de base (**Figura 13B**).

Para aumentar a especificidade da amplificação com os primers IL-10Pe, eliminando o rastro e favorecendo o aparecimento de uma banda única, reações foram realizadas utilizando os mesmos primers e tampões, mas em temperaturas mais elevadas de anelamento, na presença de DMSO na concentração de 2% na temperatura mais elevada de 65°C (**Figura 14**). Porém, não foi amplificado nenhum produto específico nessas condições.

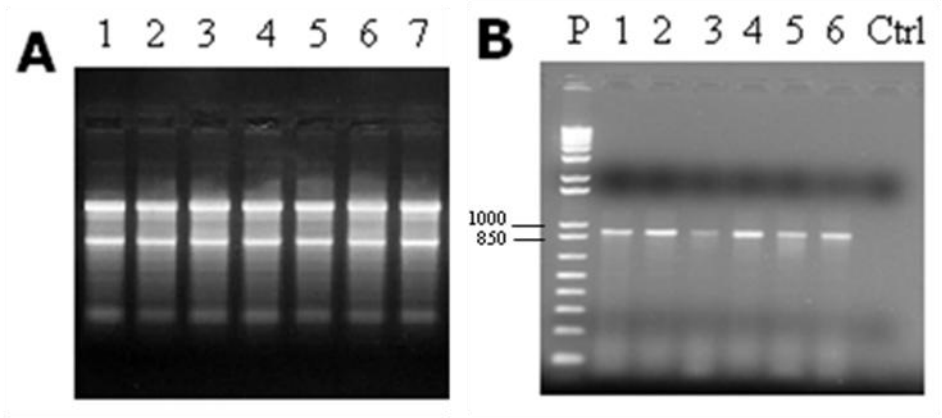

Figura 12. Extração de RNA e síntese de cDNA de macrófagos estimulados com LPS. Macrófagos maturados a partir de progenitores da medula óssea foram estimulados por 30 h com 400 ng/ml de LPS. **(A)** Integridade das subunidades 18S e 28S do RNAr de sete extrações (1-7) visualizada em gel de agarose 1%. **(B)** O cDNA de cada amostra foi sintetizado e uma PCR controle foi realizada para amplificação de β-actina (900 pb). **P**, padrão de peso molecular 1Kbp DNA Ladder. **Crtl,** PCR realizado com produto da síntese de cDNA sem transcriptase reversa, utilizando RNA da extração 7.

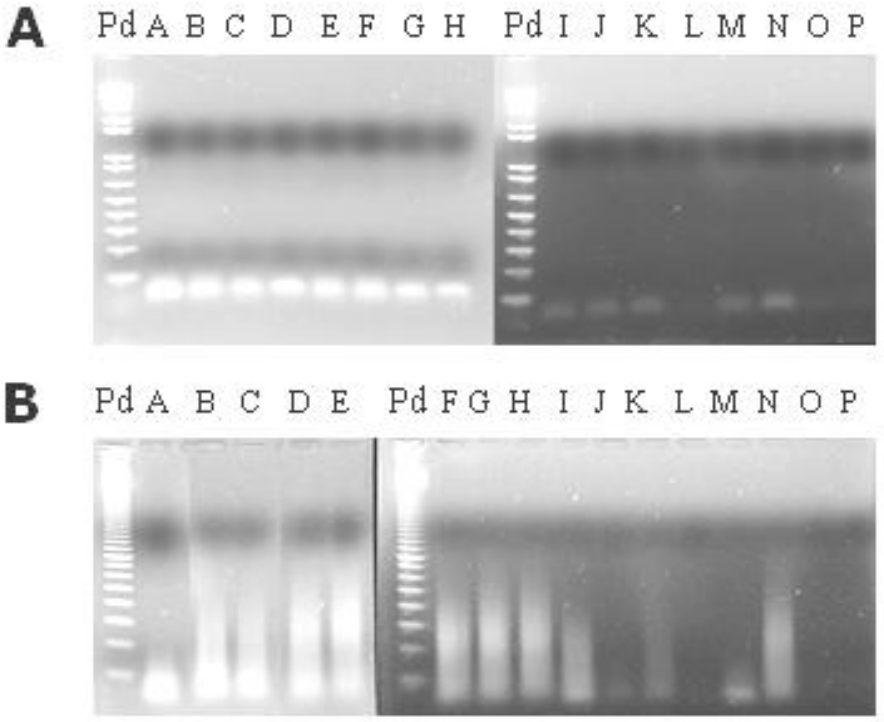

Figura 13. Tentativas de amplificação de cDNA referente ao receptor de IL-10 ou à sua porção extracelular. Eletroforese em gel de agarose 1% com produtos de PCR utilizando par de *primers* IL-10R (**A**) ou IL-10Pe (**B**). Cada amostra representa reação feita com um tampão diferente (representados por letras, como descritos em Materiais e Métodos) do *kit* PCR Optimizer, Invitrogen. Temperatura de anelamento: 50ºC. **Pd**, padrão de peso molecular, em **(A)** 1Kbp DNA Ladder e **(B)** 100pb DNA Ladder.

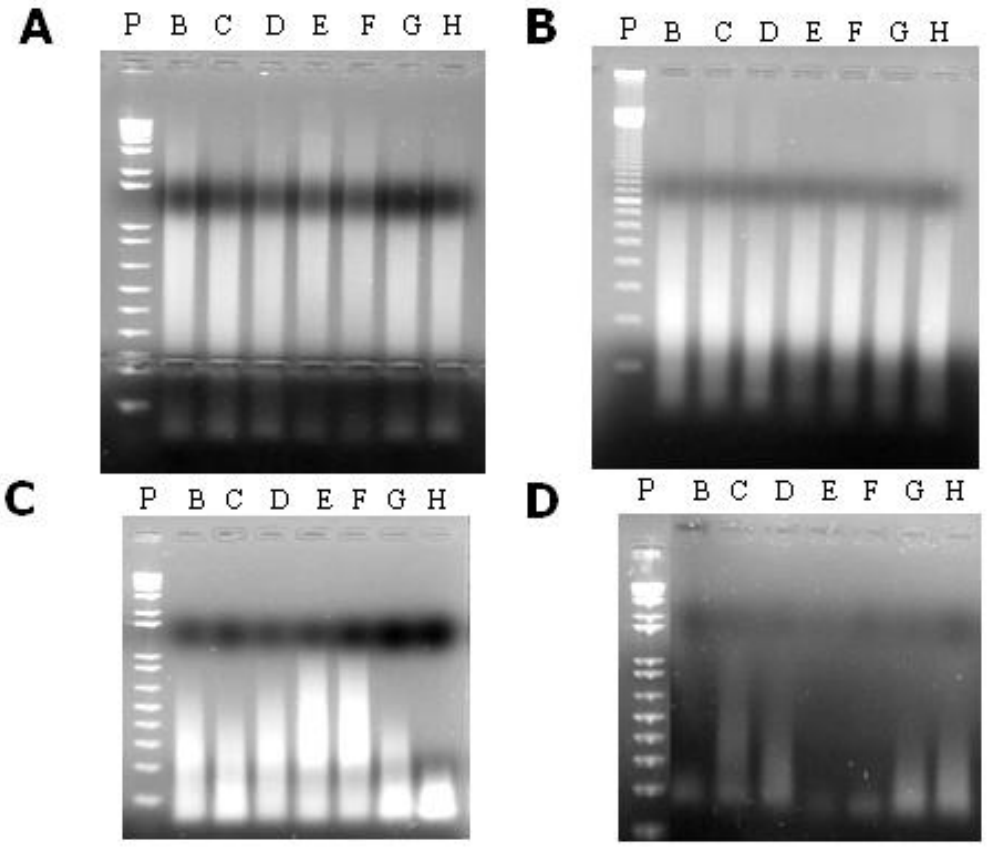

Figura 14. Tentativas de amplificação de cDNA referente a porção extracelular do receptor de IL-10, utilizando par de *primers* IL-10Pe. Eletroforese em gel de agarose 1% com produtos de PCR realizada com diferentes temperaturas de anelamento: 53 ºC (**A**), 59 ºC (**B**), 65 ºC (**C**) ou 65 ºC com 2% de DMSO (**D**). As letras representam os diferentes tampões utilizados, do *kit* PCR Optimizer. **P,** padrão de peso molecular, em **(A), (C)** e **(D)** 1Kbp DNA Ladder e **(B)** 100bp DNA Ladder.

Como não obtivemos êxito nas tentativas de amplificação realizadas até então, realizamos um ensaio para confirmação que o cDNA referente ao IL-10R estava presente nas amostras de macrófagos maturados a partir de precursores de medula óssea estimulados com LPS por 30 horas.

Utilizamos um par de *primers* específicos (nomeado aqui IL-10RHo), anteriormente utilizado com sucesso para detecção do cDNA do receptor da IL-10 murina em trabalho publicado por Ho e colaboradores (1993). Em uma das condições de reação, em tampão de reação composto de 1,5mM de $MgCl_2$ e pH 9,5 (Tampão I) e em temperatura de anelamento de 55ºC, foi amplificada uma banda única, intensa e de tamanho molecular esperado de 500pb (**Figura 15**).

Para confirmar a identidade do fragmento amplificado, o inserto IL-10RHo foi preparado para sequenciamento por clonagem em vetor pGEM-T® Easy. A sequência nucleotídica obtida apresentou 98% de identidade com a porção 3´ do gene do receptor de IL-10 murino, confirmando a presença de cópias referentes ao IL-10R nas amostras utilizadas (resultados não mostrados).

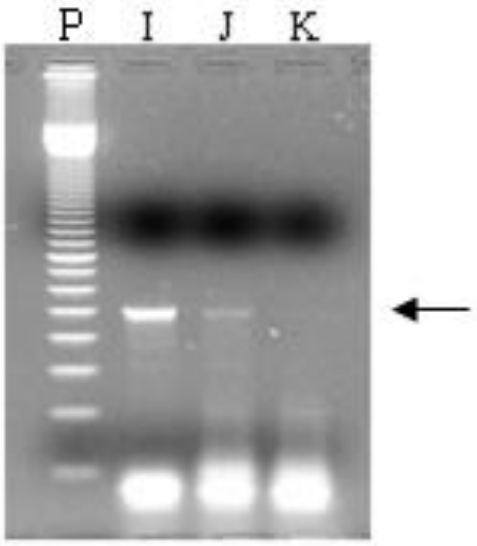

Figura 15. Amplificação de cDNA referente ao receptor da IL-10 utilizando par de *primers* de detecção IL-10RHo. Eletroforese em gel de agarose 1% com produtos de PCR com diferentes tampões (representados pelas letras) do kit PCR Optimizer®, Invitrogen. Fragmento com tamanho molecular esperado de 500 pb **(seta)** em reação utilizando tampão I. Temperatura de anelamento: 55 ºC. **P**, padrão de peso molecular 100bp DNA Ladder.

Com objetivo de aumentar a eficiência das amplificações utilizando os *primers* IL-10R ou IL-10Pe, foi realizado uma síntese de cDNA (RT-PCR) gene-específica utilizando o *primer* IL-10RHo *antisense* (oligonucleotídeo que anela em porção *downstream* 3´ ao gene de IL-10R) como iniciador da síntese pela transcriptase reversa ao invés de oligo-DT fornecido no kit utilizado (oligonucleotídeo que anela em cauda poli-A de todos RNAm).

Utilizando-se esse cDNA gene-específico foi realizada uma reação de amplificação com diversas combinações de *primers sense* e *antisense* referentes à sequência do receptor da IL-10 murina (**Figura 16**). Apenas as combinações IL-10Pe *sense* e *antisense* (**Figura 16, amostra 5**) e IL-10R *sense* e IL-10Pe *antisense* (**Figura 16, amostra 6**) apresentaram fragmentos amplificados com tamanhos esperados, 450 pb e 550 pb respectivamente.

O fragmento de 450 pb foi denominado IL-10Pe, sequência referente à codificação da cadeia polipeptídica da porção extracelular do IL-10R sem o peptídeo sinal. O fragmento de 550pb foi denominado IL-10RPe, e é referente à mesma porção, mas contendo o peptídeo sinal de endereçamento da síntese para o retículo endoplasmático rugoso.

Os fragmentos obtidos foram eluídos do gel de agarose e posteriormente inseridos em plasmídeo de clonagem pGEM-T® Easy.

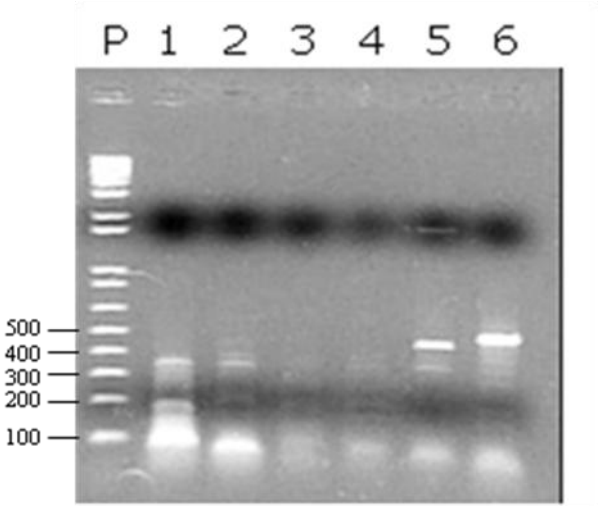

Figura 16. Tentativas de amplificação de cDNA referente a diferentes regiões do receptor de IL-10 utilizando como amostra produto de síntese de cDNA gene-específico. Eletroforese em gel de agarose 1% com produtos de PCR utilizando diversas combinações de *primers*: IL-10R *sense* e IL-10RHo *antisense* (**1**, produto esperado com 1800 pb), IL-10Pe *sense* e IL-10RHo *antisense* (**2**, produto esperado com 1700 pb), IL-10R *sense* e *antisense* (**3**, produto esperado com 1700 pb), IL-10Pe *sense* e IL-10R *antisense* (**4**, produto esperado com 1600 pb), IL-10Pe *sense* e *antisense* (**5 – fragmento IL-10Pe,** produto esperado com 450 pb) e IL-10R *sense* e IL-10Pe *antisense* (**6** – **fragmento IL-10RPe**, produto esperado com 560 pb). Reações feitas com tampão D (kit PCR Opitimizer) e temperatura de anelamento de 68ºC. **P**, padrão de peso molecular 1Kbp DNA Ladder, representado em pb à esquerda.

2.3. Clonagem do inserto IL-10Pe em vetor de expressão procariótico, para obtenção da proteína recombinante

Vários clones do plasmídeo recombinante pGEM-T/IL-10Pe foram analisados por digestão (**Figura 17**). Pode-se verificar que apenas as amostras 7 e 8 das restrições realizadas com as enzimas NotI e EcoRI liberaram o inserto com o tamanho esperado de 500pb, e essas amostras foram encaminhadas para seqüenciamento.

Na análise do resultado, o alinhamento feito com o evento de maior similaridade apresentou 99% de identidade com a sequência da porção extracelular do receptor de IL-10 murino. Não foram detectadas ausências ou inserções de nucleotídeos, sendo observadas apenas duas trocas de pares de base (resultados não mostrados).

Porém, em análise mais detalhada da seqüência (**Figura 18**), foi constatado que o inserto ligado ao plasmídeo estava na orientação invertida, criando um códon de terminação (TAA) no início da região 5′ da fita codante do inserto. Uma subclonagem desse inserto em um plasmídeo para expressão não era possível, visto que não existia nenhum sítio de restrição que poderia ser usado para sua retirada sem o códon de terminação. Uma reamplificação do fragmento com os *primers* IL-10Pe para posterior reclonagem também não poderia ser realizada, pois devido a amplificações sucessivas durante a clonagem, a terminação 5′ da fita molde do inserto continha uma seqüência referente ao *primer* IL-10Pe *sense*, o que poderia gerar um fragmento indesejado.

Portanto, para reamplificar e reclonar o inserto na orientação correta foi desenhado o par de *primers* nomeados "Inserto 1", que flanqueia o inserto sem o códon de terminação e contém os sítios BamHI e XhoI nas

extremidades do inserto a ser subclonado em vetores de expressão (**Figura 18**).

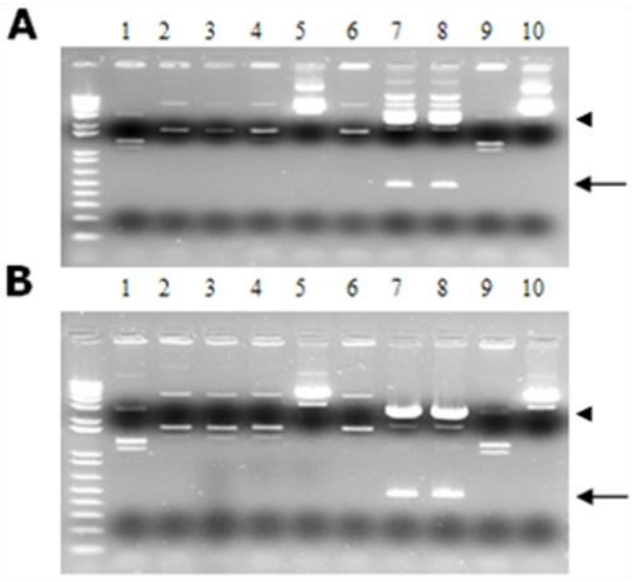

Figura 17. Análise da clonagem do fragmento IL-10Pe em plasmídeo pGEM-T. Eletroforese em gel de agarose com produtos de digestão de vários clones de plasmídeos para liberação do inserto com enzimas NotI **(A)** e EcoRI **(B).** Amostras **(1-10)** de plasmídeos isolados de colônias diferentes. Amostras 7 e 8 apresentam liberação de inserto **(seta)** e plasmídeo **(cabeça de seta)** nos tamanhos moleculares esperados (500 e 3000 pb, respectivamente). **P**, padrão de peso molecular 1Kbp DNA Ladder.

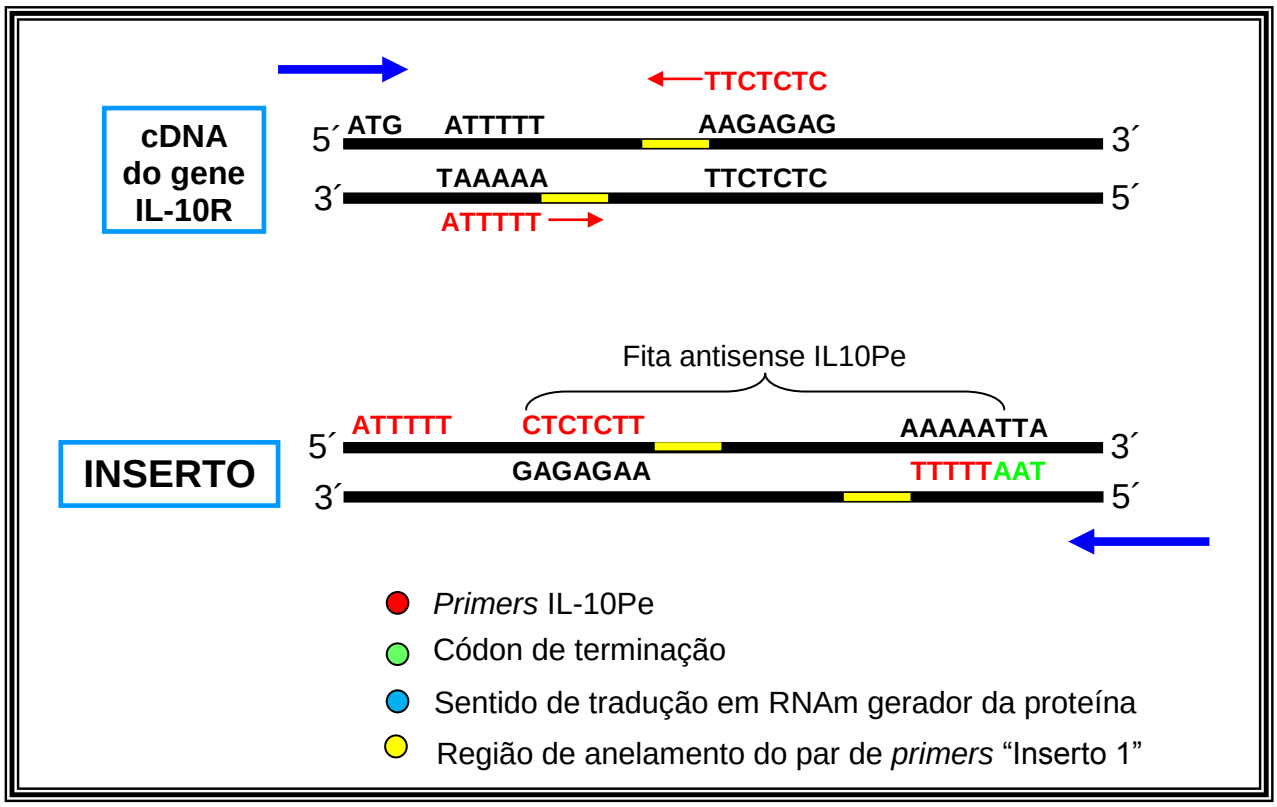

Figura 18. Disposição dos elementos encontrados no seqüenciamento do inserto IL-10Pe em relação ao gene do IL-10R. O primeiro diagrama (cDNA do gene IL-10R) mostra o gene IL-10R com seu códon de iniciação **(ATG),** a parte codificante da porção extracelular do receptor (IL-10Pe) em negro e os *primers* desenhados para amplificar esta porção em vermelho. O segundo diagrama (inserto) apresenta o plasmídeo pGEM-T Easy ligado ao inserto IL-10Pe, mostrando que o inserto foi inserido invertido, com as fitas *sense* e *antisense* referentes ao gene invertidas, além de apresentar um códon de terminação (TAA) inesperado formado na terminação 5´ da fita *antisense*. As setas indicam o sentido da transcrição da fita codante. Os tamanhos das duplas fitas não estão dispostas proporcionalmente, sendo que o cDNA do gene IL-10R possui cerca de 1700 pb e o inserto, 500 pb.

Utilizando o par de *primers* **Inserto 1**, a seqüência foi amplificada a partir do plasmídeo recombinante pGEM-T/IL-10Pe contendo a sequência invertida (amostras 7 e 8 da Figura 17), gerando um fragmento de tamanho esperado de 450 pb (**Figura 19**). Esse novo fragmento foi ligado a pGEM-T Easy. Quando submetidas à análise por restrição com NotI a quase totalidade das amostras apresentou o resultado esperado, com o aparecimento de dois fragmentos em gel de agarose, um correspondente ao plasmídeo e outro com tamanho molecular de 500 pb correspondente ao inserto (**Figura 20**).

O plasmídeo foi sequenciado e contatou-se que o inserto estava de acordo com o esperado, agora na orientação correta (resultados não mostrados).

Esse novo inserto, referente à cadeia polipeptídica extracelular do receptor de IL-10 sem o peptídeo sinal, foi subclonado em vetores de expressão procariótica **pHis1** e **pGEX4T1** para expressão e purificação da proteína recombinante, para caracterização das suas propriedades neutralizantes da IL-10, *in vitro* e *in vivo*. No entanto, apesar das inúmeras tentativas de expressão em diferentes cepas de *E. coli*, como BL21 pLysS, DH3 e Roseta, diferentes temperaturas e concentrações de IPTG para indução da expressão, não obtivemos sucesso na expressão da proteína recombinante em vetor procariótico, como verificado por análise eletroforética em gel de poliacrilamida e *immunoblotting* (resultados não mostrados).

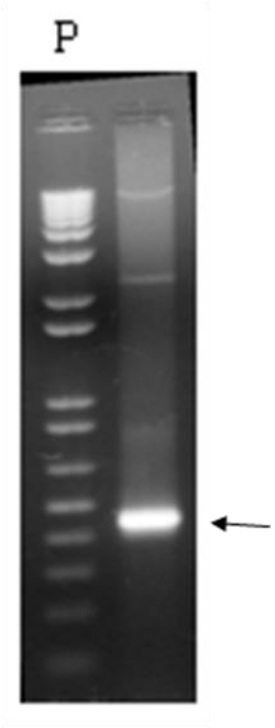

Figura 19. Amplificação do fragmento flanqueado pelo par de primers "Inserto 1" a partir do plasmídeo recombinante contendo a sequência invertida. Eletroforese em gel de agarose 1% com produtos de PCR utilizando par de *primers* Inserto 1. Foi utilizado como *template* cerca de 100 ng do plasmídeo pGEM-T/IL-10Pe (Figura 17). Um fragmento de 450 pb foi obtido **(seta)**. Temperatura de anelamento 56ºC. **P,** padrão de peso molecular 1Kbp DNA Ladder.

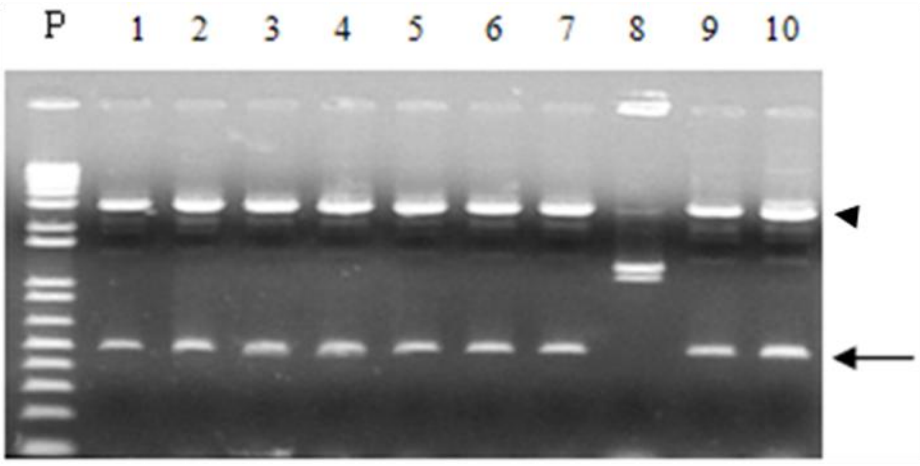

Figura 20. Análise de clonagem do fragmento "Inserto 1" em plasmídeo pGEM-T. Eletroforese em gel de agarose com produtos de digestão de plasmídeos para liberação do inserto com enzima NotI. Cada amostra **(1-10)** representa reação realizada com plasmídeos isolados de colônias diferentes. Nove amostras apresentaram insertos **(seta)** e plasmídeos **(cabeça de seta)** nos tamanhos moleculares esperados (500 e 3.000 pb, respectivamente). **P,** padrão de peso molecular 1Kbp DNA Ladder.

2.4. Clonagem do inserto IL-10RPe em vetor de expressão eucariótico, para tratamento de animais *in vivo*

Para esse propósito, foi utilizado o fragmento IL-10RPe, que continha no início de sua sequência o peptídeo sinal de endereçamento da síntese para o retículo endoplasmático rugoso, assim promovendo tráfego e modificações pós-traducionais similares aos da proteína nativa (Emanuelson et al., 2007).

O inserto IL-10RPe, de 560 pb, originado a partir do RNA extraído dos macrófagos estimulados com LPS (Figura 16, fragmento 6, com os *primers* IL-10R *sense* e IL-10Pe *antisense*) foi inicialmente clonado em plasmídeos pGEM-T® easy.

Em análise de restrição enzimática (**Figura 21**), a maioria dos clones apresentou padrão de digestão esperado e o plasmídeo de clonagem contendo o inserto foi encaminhado para sequenciamento. O inserto apresentou 100% de identidade na sequência de nucleotídeos alinhada com o cDNA do receptor de IL-10 murino, não ocorrendo nenhuma falta ou inserção nucleotídica (resultados não mostrados).

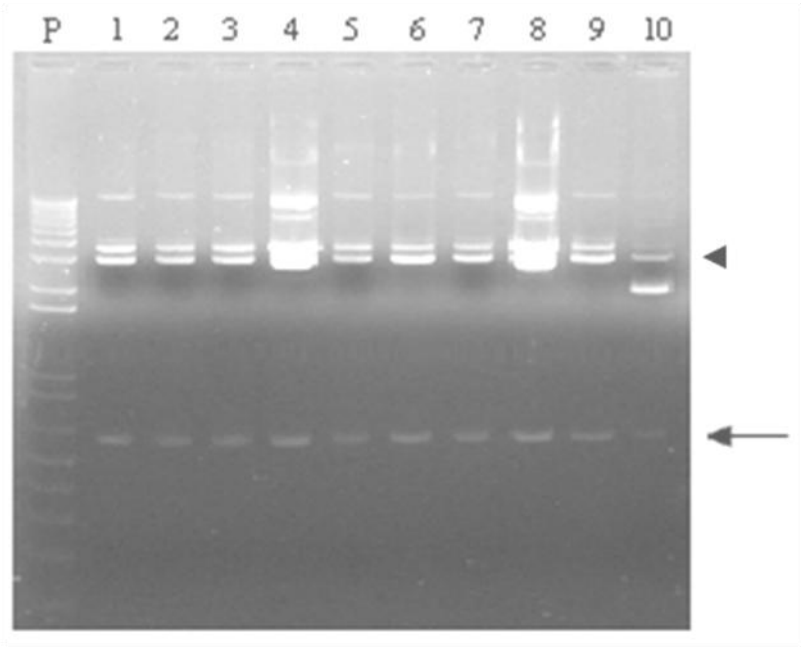

Figura 21. Análise por restrição enzimática da clonagem do fragmento IL-10RPe em plasmídeo pGEM-T. Eletroforese em gel de agarose com produtos de digestão de plasmídeos com enzima NotI. Cada amostra **(1-10)** representa reação feita com plasmídeos isolados de colônias diferentes. Nove amostras apresentam liberação de inserto **(seta)** e plasmídeo nos tamanhos moleculares esperados (560 e 3.000 pb, respectivamente). **P,** padrão de peso molecular 1Kbp DNA Ladder.

Posteriormente, o fragmento IL-10RPe foi liberado do vetor pGEM-T easy por digestão e o plasmídeo pcDNA3 também foi digerido com a mesma endonuclease (NotI). Ambos foram purificados após separação eletroforética em gel de agarose, e o vetor foi defosforilado para evitar recircularização, sendo subsequentemente ligado ao inserto, transformado em bactéria competente e amplificado clonalmente para análise da eficiência da ligação.

Em análise por restrição com enzima NotI, quatro de dez clones (amostras 1, 2, 3 e 6) apresentaram liberação do inserto, porém só em dois deles (amostras 1 e 2) o plasmídeo estava com tamanho correto quando comparado ao plasmídeo vazio (amostra 11) (**Figura 22A**).

Como esta subclonagem foi realizada a partir de um fragmento digerido em suas duas extremidades com a mesma endonuclease, foi necessária a análise da orientação da ligação do inserto no vetor. Na restrição com a enzima PstI, pudemos verificar que só um dos clones (amostra 1) apresentou o cDNA da parte extracelular do IL-10R em orientação correta (**Figura 22B**), necessário para que ocorra a expressão através do promotor contido no vetor plasmidial.

O clone (1) foi quantificado e enviado para sequenciamento. Não foi observada nenhuma perda, inserção ou substituição de nucleotídeos na fase aberta de leitura da porção codificante da IL-10RPe (resultados não mostrados).

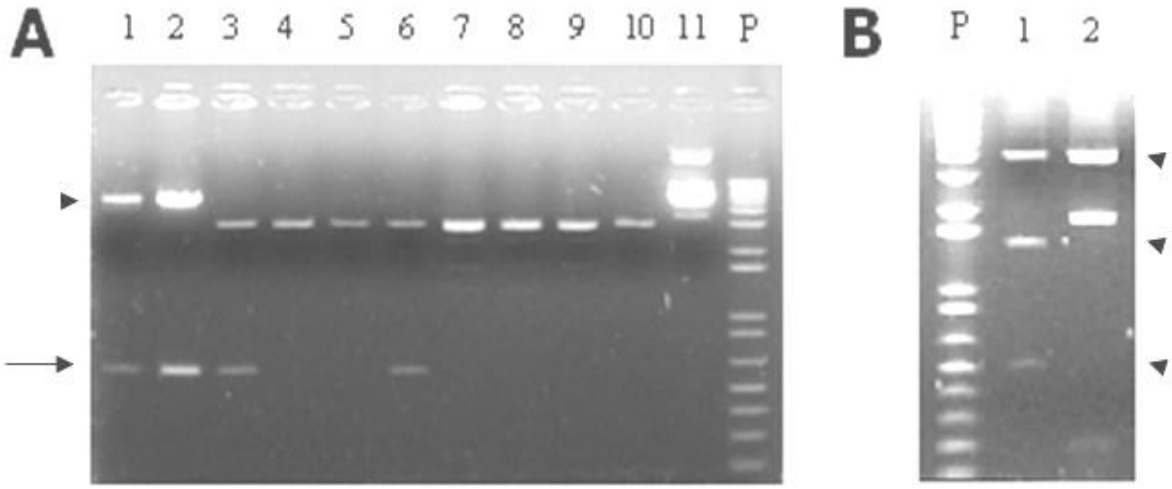

Figura 22. Análise por restrição enzimática da clonagem do fragmento IL-10RPe em plasmídeo pcDNA3. Eletroforese em gel de agarose com produtos de digestão dos clones com enzima NotI **(A)** ou PstI **(B). (A)** As amostras **(1-10)** representam reações realizadas com plasmídeos isolados de colônias diferentes. Duas amostras (1 e 2) apresentaram liberação de inserto (seta) e plasmídeo (cabeça de seta) nos tamanhos moleculares esperados (560 e 5400 pb, respectivamente). Amostra 11, reação feita com plasmídeo vazio. **(B)** Apenas a **amostra 1** apresentou padrão de fragmentação de acordo com o previsto para um inserto inserido no plasmídeo em orientação correta (500, 1.500 e 4.000 pb, cabeças de seta). **P**, padrão de peso molecular 1Kbp DNA Ladder.

3. Expressão da proteína recombinante IL-10RPe pelo vetor eucariótico pcDNA3.

Com o plasmídeo pcDNA3-IL10RPe sequenciado e purificado em gradiente de cloreto de césio como descrito em Materiais e Métodos, foram realizados experimentos para avaliar a expressão da proteína recombinante através de transfecção de células de mamífero *in vitro*.

Células B16F10-Nex2 foram transfectadas com pcDNA3-IL10RPe ou com o plasmídeo controle pcDNA3 como descrito em Materiais e Métodos. Essas células foram escolhidas para o ensaio porque determinamos anteriormente que elas não secretam IL-10, tampouco utilizam essa citocina como fator de crescimento (resultados não mostrados). Após 48 horas de transfecção, as células foram avaliadas quanto à transcrição do inserto contido no plasmídeo por meio de RT-PCR (**Figura 23**), verificou-se a tradução intracelular da proteína recombinante por FACS (**Figura 24**) e se a mesma era secretada para o sobrenadante celular (**Figura 25**).

Utilizando o par de *primers* IL-10R *sense* e IL-10Pe *antisense*, os mesmos utilizados para a clonagem da porção extracelular do receptor de IL-10, observamos amplificação do cDNA referente a esse mini-gene em células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3-IL-10RPe e ausência de amplificação em células transfectadas com o plasmídeo pcDNA3 vazio controle (**Figura 23**). Esses dados revelam que o RNA mensageiro referente ao segmento IL-10RPe foi eficientemente transcrito em células eucarióticas.

A marcação intracelular com anticorpo monoclonal específico para o receptor de IL-10 murino demonstrou que as células transfectadas com o

vetor recombinante expressaram de forma eficiente a proteína IL-10RPe (**Figura 24**).

O mini-gene IL10-RPe clonado contém o peptídeo sinal da própria proteína, que direcionará o mesmo para o retículo endoplasmático. No entanto, o fragmento não contém a porção codificante da região hidrofóbica transmembrânica da proteína completa (receptor de IL-10), sugerindo que a proteína recombinante ao ser expressa intracelularmente seja transportada no interior de cisternas e vesículas, sem que haja o seu ancoramento em membranas. Nessas condições, quando enviada à membrana plasmática, essa proteína pode ser secretada para o exterior celular, ficando livre no microambiente.

Para verificar se a proteína recombinante IL-10RPe seria produzida na forma solúvel e secretada para o exterior celular, sobrenadante de cultura de células B16F10-Nex2 transfectadas com o plasmídeo pcDNA3-IL10RPe (ou com o plasmídeo pcDNA3 vazio, controle) foi imunoprecipitado com anticorpo monoclonal anti-IL-10R murino (BD Biosciences), como descrito em Materiais e Métodos. Na amostra referente ao sobrenadante da célula transfectada com o plasmídeo recombinante foi observado um grupo de três bandas que migraram entre 30 e 45 kDa (**Figura 25**). O peso molecular esperado segundo a sequência de aminoácidos era de 22 kDa.

Resultados similares aos apresentados na Figura 25 foram obtidos na avaliação da porção extracelular do receptor da IL-10 humana. O fragmento da proteína humana possui 5 potenciais sítios de N-glicosilação e após N-deglicosilação da amostra, a proteína recombinante migrou no peso molecular previsto, provando que a adição de açúcares na cadeia polipeptídica durante a rota de síntese era responsável pelo aparecimento

de 3 espécies reativas com anticorpo específico, com pesos diferentes (Tan et al., 1995).

Nossos resultados sugerem então que houve expressão da proteína recombinante e que possivelmente tenham ocorrido diferentes glicosilações do fragmento durante a expressão, como observado para o fragmento humano, gerando 3 espécies reativas com o anticorpo anti-IL-10R murino, com pesos moleculares entre 30 e 45 kDa. Utilizando o programa de predição de sítios de glicosilação em proteínas do *Center for Biological Sequence Analysis* (CBA, disponível no site http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc), a sequência do receptor de IL-10 murino contém 5 sítios putativos de glicosilação, 4 deles contidos na região clonada da porção extracelular do receptor, assinalados na sequência a seguir:

```
1   mlsrllpflv tisslslefi aygtelpsps yvwfearffq hilhwkpipn qsestyyeva
61  lkqygnstwn dihicrkaqa lscdlttftl dlyhrsygyr arvravdnsq ysnwtttetr
121 ftvdeviltv dsvtlkamdg iiygtihppr ptitpagdey eqvfkdlrvy kisirkfsel
181 knatkrvkqe tftltvpigv rkfcvkvlpr lesrinkaew seeqcllitt eqyftvtnls
241 ilvismllfc gilvclvlqw yirhpgklpt vlvfkkphdf fpanplcpet pdaihivdle
301 vfpkvslelr dsvlhgstds gfgsgkpslq teesqfllpg shpqiqgtlg keespglqat
361 cgdntdsgic lqepglhssm gpawkqqlgy thqdqddsdv nlvqnspgqp kytqdasalg
421 hvcllepkap eekdqvmvtf qgyqkqtrwk aeaagpaecl deeipltdaf dpelgvhlqd
481 dlawpppala agylkqesqg masappgtps rqwnqlteew sllgvvsced lsieswrfah
541 kldpldcgaa pgglldslgs nlvtlpliss lqvee
```

Concluímos, então, que a transfecção com pcDNA3-IL10RPe possibilitou a produção do RNAm, expressão intracelular e secreção da proteína recombinante por células eucarióticas.

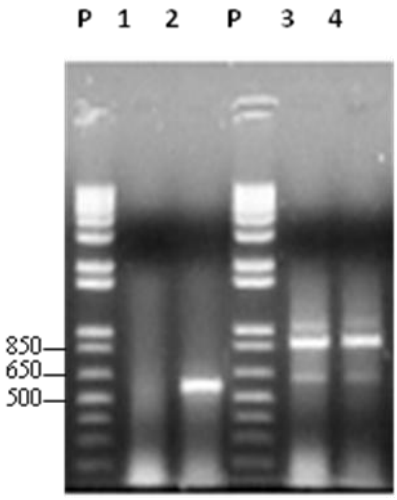

Figura 23. Detecção do RNAm referente à porção extracelular do receptor da IL-10 por células B16F10-Nex2 transfectadas com o plasmídeo pcDNA3 - IL10RPe. Células B16F10-Nex2 foram transfectadas com o plasmídeos pcDNA3 – IL10RPe **(canaletas 2 e 4)** ou com o plasmídeo controle pcDNA3 **(canaletas 1 e 3). (1 e 2)** RT-PCR realizada com os *primers* IL-10R *sense* e IL-10Pe *antisense*. **(3 e 4)** RT-PCR realizada com *primers* para amplificar cDNA da β-actina. Nas reações 2, 3 e 4 foram amplificados fragmentos de DNA com tamanho molecular esperado, 560 pb (2) e 900 pb (3 e 4). **P,** padrão de peso molecular 1Kbp DNA Ladder.

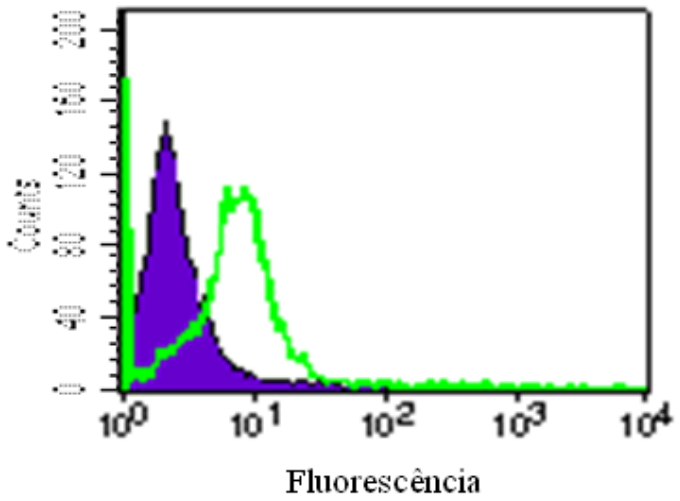

Figura 24. Expressão intracelular da porção extracelular do receptor de IL-10 em células B16F10-Nex2 transfectadas com pcDNA3 – IL10RPe. As células foram transfectadas com plasmídeo controle pcDNA3 (histograma preenchido) ou com pcDNA3-IL10RPe (histograma vazado) e após 48 horas marcadas intracelularmente com anticorpo monoclonal anti-IL-10R conjugado à ficoeritrina (PE). As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo e com software CellQuest® Pro.

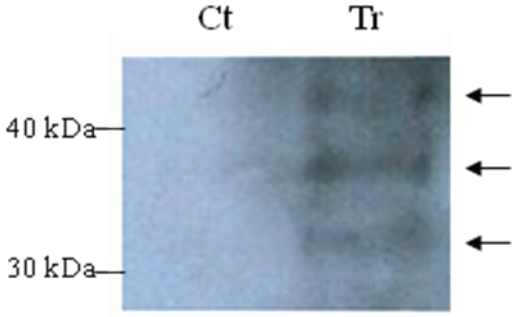

Figura 25. Detecção da proteína IL-10RPe recombinante solúvel. Sobrenadantes de cultura de células B16F10-Nex2 transfectadas com o plasmídeo pcDNA3-IL10RPe (Tr) ou pcDNA3 controle (Ct) foram submetidos à imunoprecipitação e revelação com *immunoblotting* utilizando anticorpo monoclonal anti-IL-10R murino (BD Biosciences®). As setas indicam as três espécies reativas com o anticorpo, com peso molecular entre 30 e 45 kDa.

4. Terapia Gênica *in vivo* com plasmídeo pcDNA3-IL10RPe

Após verificação da funcionalidade do vetor recombinante *in vitro*, realizamos protocolos terapêuticos em camundongos C57BL/6 inoculados subcutaneamente com células de melanoma murino B16F10-Nex2.

Em um primeiro protocolo, animais foram desafiados com 10^4 células B16F10-Nex2 subcutaneamente no flanco direito no dia 0 e nos dias 1, 8 e 15 receberam 100 μg de plasmídeo ou somente PBS, subcutaneamente na base da cauda. Simultaneamente, animais IL-10KO foram desafiados nas mesmas condições para comparação (**Figura 26**).

A sobrevida dos animais IL-10KO mais uma vez se mostrou maior que dos C57Bl/6 selvagens, com um animal (de 14 no grupo) permanecendo livre de tumor até 60 dias após a inoculação tumoral. O tratamento com o plasmídeo pcDNA3-IL10RPe resultou em aumento significativo da sobrevida dos animais C57Bl/6. Interessante observar que os grupos de animais IL10KO e C57Bl/6 tratados com o plasmídeo pcDNA3-IL10RPe apresentaram curvas de sobrevidas semelhantes (**Figura 26A**).

Quando o aparecimento do tumor em animais C57Bl/6 é analisado, verificou-se que o tratamento com o plasmídeo pcDNA3-IL10RPe retardou significativamente o início do desenvolvimento tumoral quando comparado ao tratamento com o plasmídeo pcDNA3 controle. Enquanto todos os animais tratados com pcDNA3 apresentavam crescimento tumoral 18 dias após a inoculação das células B16F10-Nex2, nódulos subcutâneos foram detectados em apenas 40% dos animais tratados com o plasmídeo pcDNA3-IL10RPe (**Figura 26B**).

Assim como observado anteriormente no prolongamento da sobrevida do grupo IL-10KO (Figura 7), o efeito protetor observado após a

neutralização da IL-10 pela terapia gênica em animais C57Bl/6 foi comprovadamente dependente de IFN-γ, pois a inibição dessa citocina por tratamento *in vivo* com anticorpo monoclonal neutralizante reverteu quase completamente o efeito protetor (**Figura 27**).

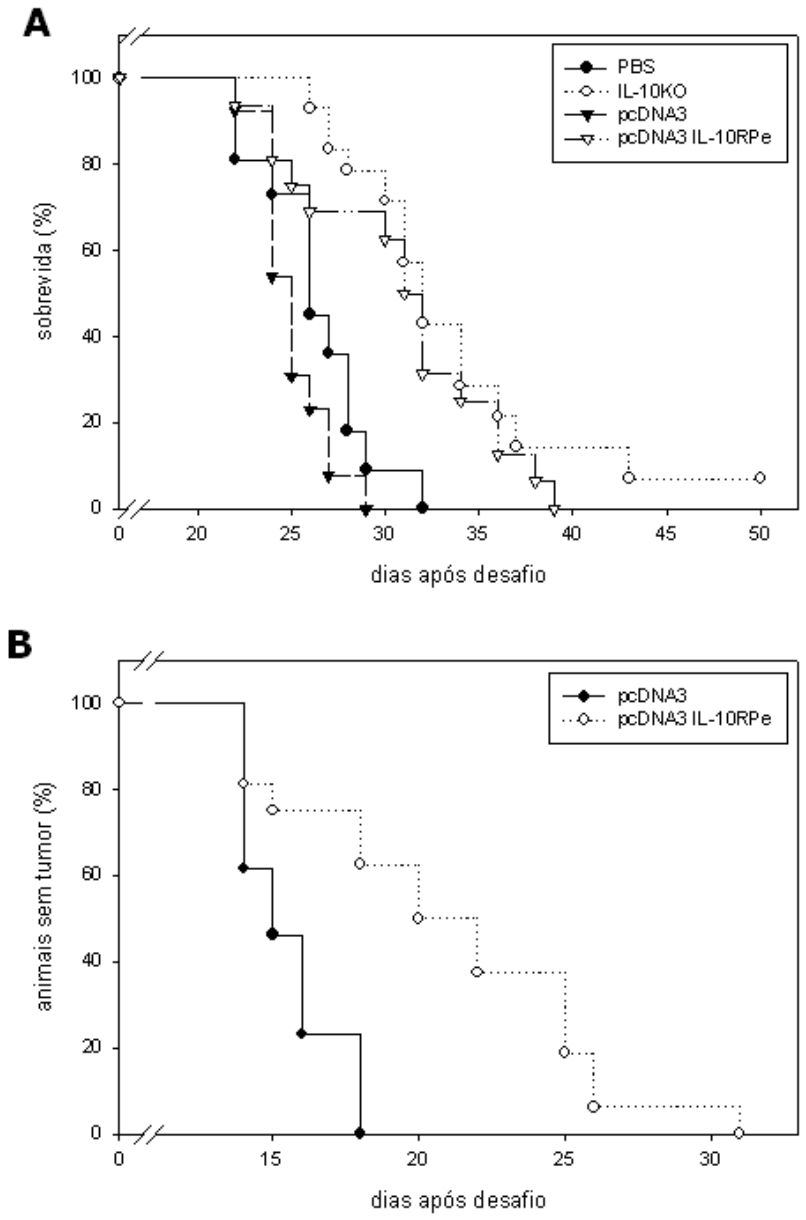

Figura 26. Terapia gênica com o plasmídeo pcDNA3-IL10RPe em animais C57BL/6 desafiados com células B16F10-Nex2. Os animais foram desafiados subcutaneamente no dia 0 com 10^4 células B16F10-Nex2 e tratados subcutaneamente na base da cauda nos dias 1, 8 e 15 com 100 μg de plasmídeo pcDNA3-IL10RPe, pcDNA3 controle ou com PBS. **(A)** Gráfico de sobrevida, incluindo animais IL-10KO não tratados**. (B)** Porcentagem de animais livres de tumor dos grupos tratados com os plasmídeos. Treze animais no grupo pcDNA3, dezesseis no grupo pcDNA3-IL10RPe, onze no grupo PBS e quatorze no grupo IL-10KO. **(A)** $p<0,002$ entre o grupo tratado com o plasmídeo pcDNA3–IL10RPe e os grupos pcDNA3 e PBS e **(B)** $p<0,001$. Resultado representativo de dois experimentos independentes.

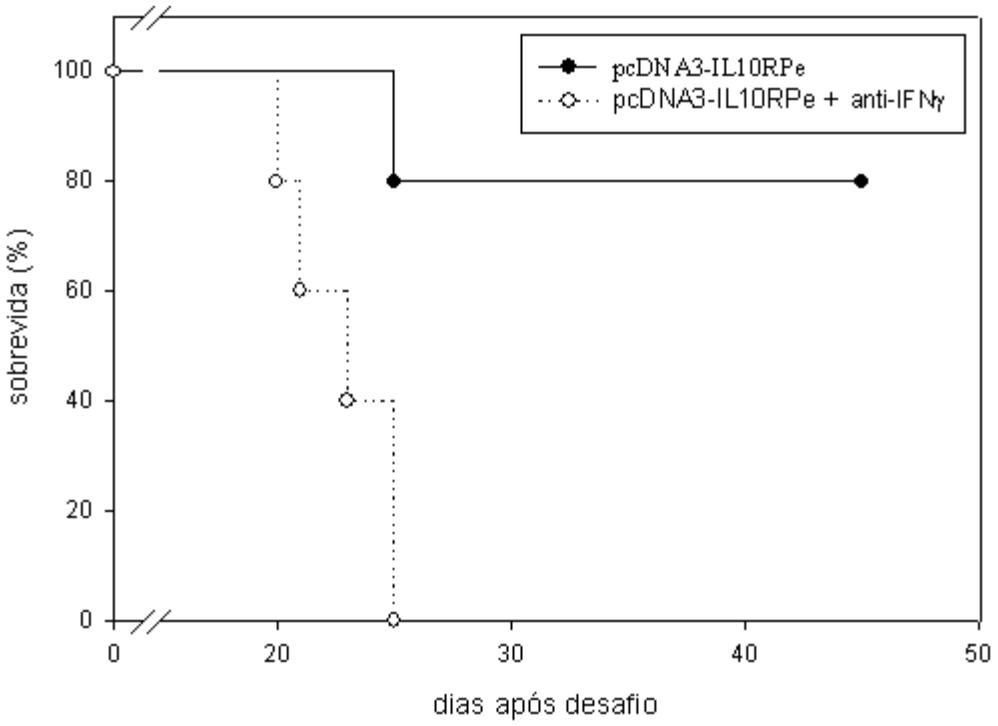

Figura 27. Sobrevida de animais C57Bl/6 selvagens desafiados com células B16F10-Nex2 e que foram submetidos à terapia gênica com o plasmídeo pcDNA3-IL10RPe e tratamento para neutralização de IFN-γ. Os animais foram desafiados s.c. com 10^4 células B16F10-Nex2 e tratados nos dias 1, 8 e 15 com 100 μg de plasmídeo pcDNA3-IL10RPe. Um grupo recebeu intraperitonealmente 250 μg de anticorpo anti-IFN-γ no dia -1 e 125 μg nos dias 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13. O grupo controle recebeu injeções de PBS nos mesmos dias. Cinco animais por grupo. $p<0,01$.

Esses resultados demonstram que a terapia sistêmica com um vetor que codifica um receptor *decoy* para a IL-10 leva a uma maior eficiência de uma resposta antitumoral naturalmente induzida no modelo de baixa imunogenicidade do melanoma murino B16F10-Nex2. Animais C57Bl/6 tratados com o plasmídeo neutralizante da IL-10 apresentaram taxas de sobrevivência semelhantes àquelas obtidas com a deficiência genética de IL-10, e em ambas as linhagens de camundongos a proteção gerada pela ausência de IL-10 contra o melanoma murino B16F10-Nex2 foi dependente de IFN-γ.

Em contraste com o trabalho de Kontani e colaboradores (2006) que utilizaram um modelo de tumor modificado expressando a proteína altamente imunogênica Ovalbumina e uma abordagem semelhante para neutralizar a citocina supressora TGF-β, nosso trabalho mostrou que é possível obter respostas antitumorais eficazes em um modelo pouco imunogênico, sem modificação das células tumorais ou vacinação com antígenos do tumor, sugerindo que terapias de neutralização de citocinas supressoras, como TGF-β e IL-10, podem ser aplicadas com sucesso no tratamento antitumoral de humanos.

Projetando um potencial uso clínico-terapêutico, um grupo de pesquisadores construiu e avaliou um vetor plasmidial que expressou uma proteína quimérica contendo o domínio extracelular do receptor humano da IL-10 em fusão com IgG1, obtendo resultados satisfatórios de neutralização *in vitro* da IL-10 (Terai et al., 2009).

Recentemente, Brignole e colaboradores (2009) mostraram que a utilização de anticorpos contra o receptor da IL-10 juntamente com oligonucleotídeos contendo sequências CpG encapsulados em lipossomas

dirigidos às células de neuroblastoma via disialogangliosídeo GD_2 aumentou a resposta protetora contra modelo murino de neuroblastoma, comparativamente à utilização do lipossoma sozinho. Porém, nesse trabalho não foi utilizado tratamento somente com os anticorpos anti-IL10R, não revelando uma possível proteção pela neutralização da ação da IL-10 por si só.

Em contraste com outros sistemas, como em infecções bacterianas (Arai et al., 1995), infecções virais (Tanner et al., 1997), infecções parasitárias (Belkaid et al., 2001), autoimunidade (Ishida et al., 1994) ou pleurite inflamatória (Fröde et al., 2001), a utilização terapêutica *in vivo* com anticorpos monoclonais neutralizantes de IL-10 contra o câncer ainda não foi muito explorada.

Ainda, deve-se ressaltar que o resultado aqui obtido foi através de uma terapia pós-implantação de células tumorais, não restrita ao microambiente tumoral e sem nenhum tipo de vacinação ou uso de adjuvante, ao contrário de protocolo de neutralização *in vivo* de IL-10 com anticorpos monoclonais juntamente com droga quimioterápica Melphalan (Jovasevic et al. 2004).

A neutralização da IL-10, através da terapia gênica desenvolvida, foi capaz *per se* de acentuar os mecanismos imunes antitumorais naturais contra o melanoma murino B16F10-Nex2 (como aumento de expressão de citocinas Th1, processamento/apresentação de antígenos e respostas celulares citotóxicas), levando a um aumento da sobrevida dos animais nesse modelo de baixa imunogenicidade.

Terapias com IL-12 vem sendo utilizadas e mostram resultados promissores no tratamento de modelos experimentais de tumores. IFN-γ e

muitas outras citocinas pró-inflamatórias secundárias induzidas por IL-12 apresentam um efeito tóxico direto sobre as células tumorais e podem funcionar como elementos antiangiogênicos (Colombo e Trinchieri, 2002; Trinchieri, 2003). Utilizando pré-tratamento com IL-12 respostas aumentadas foram obtidas com uso de imunoterapia com baixas doses de IFN-γ (Lesinski et al., 2004). Metodologia de *gene gun* com plasmídeo codificando IL-12 resultou em regressão completa do tumor, quando este era imunogênico como Renca carcinoma ou MethA sarcoma, ou ainda retardo significativo no crescimento de tumores de baixa imunogenicidade, como o melanoma murino B16 e o mastocitoma P815 (Rakhmilevich et al., 1996).

Uma das alternativas para maximizar respostas geradas pela utilização de um único fator terapêutico é a associação do fator protetor com IL-12. Diversos protocolos de associação já foram testados (Melero et al., 2001), como a associação com quimioterapia (Mitrus et al., 2006) e a associação com terapias gênicas com outras citocinas (Chang et al., 2007; Nastala et al., 1994).

Como a neutralização da IL-10 *in vivo* gerou uma resposta protetora significativa, porém parcial, em nosso sistema, foi realizada uma terapia gênica com IL-12 concomitante à terapia gênica para neutralização de IL-10. Animais foram tratados com o plasmídeo pcDNA3-IL10RPe e também com um plasmídeo de expressão eucariótica contendo o gene da interleucina 12 murina (pIL-12), descrito em Materiais e Métodos (**Figura 28**). Animais foram imunizados também com os plasmídeos vazios pcDNA3 e pCMV, controles para os plasmídeos pcDNA3-IL10RPe e pIL-12, respectivamente. Animais recebendo tratamento único (somente IL-12 ou

somente neutralização da IL-10) receberam juntamente ao plasmídeo terapêutico uma dose do outro plasmídeo controle utilizado no experimento (pcDNA3 e pCMV, respectivamente). Essas combinações foram utilizadas para analisarmos o possível papel estimulatório dos plasmídeos utilizados.

Observou-se que os animais tratados somente com os plasmídeos controle (vazios) não apresentaram resposta protetora anti-melanoma (**Figura 28**, grupo pcDNA3+ pCMV). Tanto a presença de IL-12 como a neutralização da IL-10, ambas isoladamente, geraram respostas protetoras semelhantes ao desenvolvimento tumoral, com cerca de 50 a 60% dos animais ficando livres de tumor até o 50º dia pós-desafio (**Figura 28**, grupos pcDNA3-IL10RPe + pCMV e pIL-12 + pcDNA3).

A co-administração dos plasmídeos produtores de IL-12 e do receptor solúvel neutralizante para a IL-10 induziu uma resposta protetora mais eficiente, e observou-se um maior número de animais protegidos do que em cada terapia isoladamente. Cerca de 80% dos animais tratados não desenvolveram tumor até o 50º dia pós-desafio (**Figura 28**, grupo pIL-12+ pcDNA3-IL10RPe).

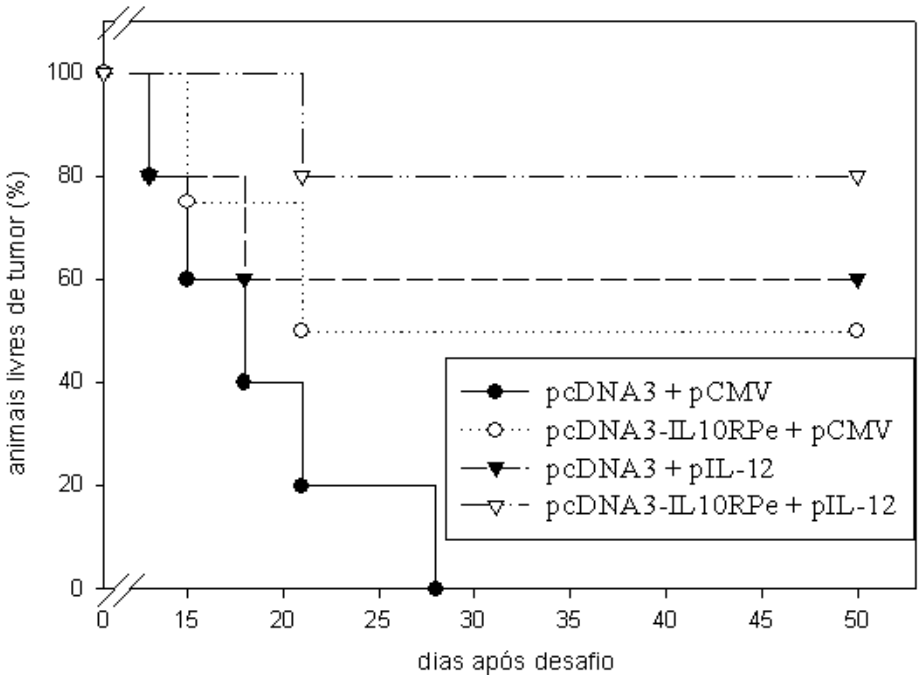

Figura 28. Terapia gênica com o plasmídeo pcDNA3-IL10RPe e/ou pIL-12 em animais C57BL/6 desafiados com células B16F10-Nex2. Os animais foram desafiados subcutaneamente no dia 0 com 10^4 células B16F10-Nex2 e tratados subcutaneamente na base da cauda com 3 doses de 100 μg do plasmídeo pcDNA3-IL10RPe ou seu controle (pcDNA3), ou com 1 dose de 100μg do pIL-12 ou seu controle (pCMV), como descrito em Materiais e Métodos. Cinco animais por grupo e quatro no grupo pcDNA3-IL10RPe + pIL-12. $p<0,01$ entre grupo pcDNA3-IL10RPe + pIL12 e plasmídeos controles.

Demonstramos que além da proteção obtida com o plasmídeo expressando IL-10RPe, uma terapia gênica adjuvante com o gene da IL-12, uma citocina já utilizado em ensaios clínicos (Mahvi et al., 2007), foi capaz de gerar robusta proteção contra o desenvolvimento do tumor subcutaneo.

Propomos então, que a neutralização de componentes imunossupressores será uma importante ferramenta a ser explorada em abordagens terapêuticas contra o câncer, potencializando imunoterapias que utilizam agentes imunoestimulantes que já apresentaram resultados promissores, como IL-2, IL-4, IL-12, IL-24, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, GM-CSF e TNF-α (Revisado em Chada et al., 2003).

5. Papel das células dendríticas na neutralização sistêmica da IL-10 com o plasmídeo pcDNA3-IL10RPe

Nossos resultados demonstraram que a ausência de IL-10 foi capaz de aumentar a proteção contra o estabelecimento e desenvolvimento do melanoma murino B16F10-Nex2. Esse efeito foi observado em diversas situações: 1. Animais naturalmente deficientes em IL-10; 2. Animais que receberam terapia com células dendríticas IL-10KO; e 3. Animais que receberam terapia gênica para neutralização sistêmica de IL-10.

Resultados anteriormente obtidos em nosso laboratório determinaram que as células B16F10-Nex2 não secretam a IL-10 quando cultivadas in vitro, e também não utilizam essa interleucina como um fator autócrino de crescimento (resultados não mostrados). Esses resultados sugerem que a IL-10 produzida pelo desenvolvimento do melanoma murino B16F10-Nex2 seja produzida por células da resposta imune ativadas pelo crescimento tumoral, e que essas células não utilizam a IL-10 como um mecanismo de escape à resposta imune anti-tumoral.

Com o objetivo de verificar o papel das células dendríticas no protocolo de terapia gênica sistêmica com o plasmídeo pcDNA3-IL10RPe, células dendríticas de animais C57Bl/6 selvagens foram maturadas a partir de progenitores de medula óssea e transfectadas *in vitro* com o plasmídeo. Em seguida, essas células foram adotivamente transferidas para animais C57Bl/6, em 2 doses antes da implantação subcutânea de células de melanoma.

Após o desafio dos animais submetidos a este protocolo, foi possível observar claramente que as DCs transfectadas anteriormente com o

plasmídeo para expressão da porção extracelular do IL-10R, e não com o plasmídeo controle, foram capazes de aumentar significativamente a sobrevida dos animais (**Figura 29**), funcionando eficientemente no controle do crescimento tumoral, da mesma forma como observado com a vacina celular baseada na utilização de DCs IL-10KO. Este resultado sugere que na terapia gênica sistêmica com o plasmídeo pcDNA3-IL10RPe células dendríticas captam o plasmídeo, expressam a proteína recombinante, e a neutralização da IL-10 *in vivo* nas DCs pode induzir uma resposta protetora antitumoral mais eficaz.

Já foi demonstrado que a porção solúvel do IL-10R, expressa através de DCs transfectadas com plasmídeos, é capaz de neutralizar a ação da IL-10 no microambiente (Svane et al., 2006), gerando efeitos similares aos encontrados com DCs IL-10KO, as quais expressam mais moléculas de ativação celular e são mais potentes na ativação de resposta antitumoral efetora (McBride et al., 2002; He et al., 2005; Chen et al., 2007).

Experimentos preliminares foram realizados, onde camundongos geneticamente deficientes em IFN-γ, ou alternativamente em linfócitos T $CD4^+$ ou $CD8^+$ foram imunizados com o plasmídeo pcDNA3-IL10RPe e desafiados com células B16F10-Nex2. Infelizmente, devido ao pequeno número disponível de animais, os resultados não foram conclusivos, e não pudemos ainda determinar o papel desses efetores da resposta imune anti-tumoral em nosso protocolo terapêutico.

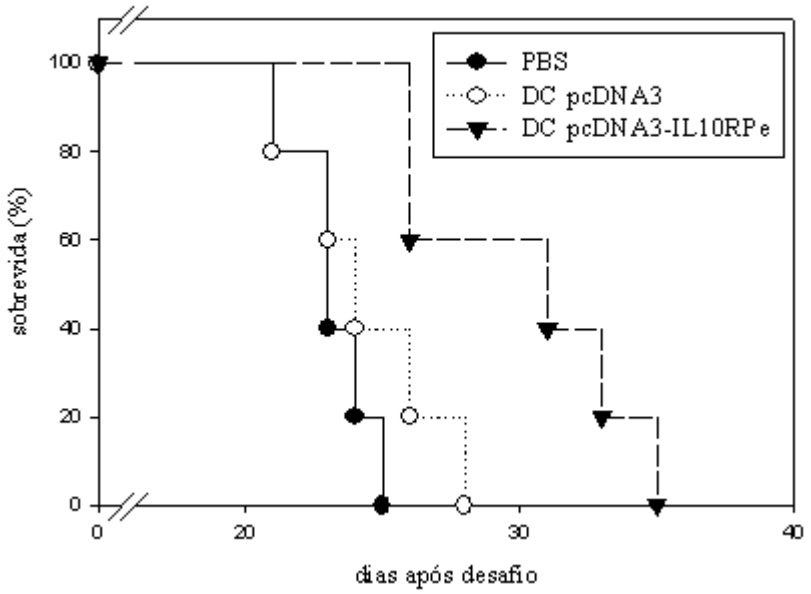

Figura 29. Transferência adotiva de células dendríticas transfectadas com pcDNA3 ou pcDNA3-IL10RPe em animais C57BL/6 desafiados com células B16F10-Nex2. Células dendríticas (DC) derivadas de medula óssea de animais C57BL/6 foram transfectadas *in vitro* com plasmídeo pcDNA3-IL10RPe ou seu controle pcDNA3. Posteriormente as células selecionadas foram adotivamente transferidas nos dias -4 e +3, na presença de antígenos tumorais (lisado de células B16F10-Nex2). No dia 0 (zero), os animais foram desafiados com $5x10^4$ células B16F10-Nex2. Os tratamentos e o desafio foram feitos subcutaneamente na mesma região do flanco direito dos animais. Cinco animais por grupo. $p<0,025$.

Durante a execução deste trabalho, em 2007, foi publicado um trabalho que explorou a capacidade terapêutica de células dendríticas IL-10KO em vacinação para obtenção de resposta protetora contra um modelo de hepatocarcinoma murino (Chen et al., 2007), utilizando experimentos de transferência adotiva de DCs IL-10KO pulsadas com antígenos tumorais. Como foi demonstrado o potencial das DCs como geradoras de respostas antitumorais protetoras na ausência de IL-10 nestas células, o grupo depositou uma patente, na qual foi abordada a utilização de DCs modificadas geneticamente para suprimir ou atenuar a expressão gênica ou ação biológica de qualquer citocina imunossupressora, incluindo a IL-10 (Huang et al., 2006, Patente USPTO).

Recentemente, foi comprovado que o silenciamento da IL-10 em DCs humanas, através da oligonucleotídeos *antisense*, aumenta a eficiência dessas células na geração de resposta de linfócitos citotóxicos específicos *in vitro* (Chhabra et al., 2008), sugerindo que a supressão da produção de IL-10 é eficaz para estimular respostas efetoras durante uma vacinação com células dendríticas também em humanos.

Demonstramos que a terapia sistêmica com um plasmídeo contendo o mini-gene da porção extracelular do receptor da IL-10 murina aumentou a eficiência de uma resposta imune protetora natural desenvolvida contra células de melanoma murino B16F10-Nex2, que apresentam baixa imunogenicidade *in vivo*. A associação com IL-12 aumentou ainda mais a indução de uma resposta protetora nesse modelo. Embora o mecanismo de ação da neutralização sistêmica da IL-10 nas condições utilizadas ainda não tenha sido completamente elucidado, nossos resultados sugerem a participação de células dendríticas na captação do plasmídeo recombinante

e expressão do mini-gene, levando a uma neutralização da citocina nessas células e amplificando a resposta protetora dependente de IFN-γ.

Conclusões

Neste trabalho foi possível demonstrar a ação imunorreguladora deletéria da IL-10 sobre o sistema imune durante uma resposta antitumoral natural no modelo B16F10-Nex2 e também desenvolver uma terapia gênica eficaz para a neutralização sistêmica de IL-10.

Camundongos C57Bl/6 naturalmente resistentes ao desenvolvimento do melanoma murino B16F10-Nex2 produziram citocinas do tipo 1 (IFN-γ) que regulam essa resposta protetora, enquanto animais susceptíveis apresentam citocinas do tipo 2 (IL-10 e IL-6) durante o desenvolvimento tumoral, sugerindo que essas citocinas regulem negativamente a resposta protetora natural desse sistema, sem a adição de vacinas ou adjuvantes da resposta imune.

Camundongos geneticamente deficientes na expressão da IL-10 foram mais resistentes ao desenvolvimento do melanoma murino B16F10-Nex2. Como observado nos animais C57Bl/6, animais IL-10KO resistentes ao tumor apresentavam uma resposta imune do tipo 1, e a proteção foi dependente de IFN-γ. As células dendríticas dos animais IL-10KO quando estimuladas por antígenos do melanoma murino B16F10-Nex2 *in vitro* apresentaram um fenótipo mais ativado, tanto na expressão de marcadores de superfície como na produção de citocinas pró-inflamatórias, podendo estar envolvidas na indução de uma resposta protetora mais eficiente nesses animais.

Como a IL-10 no melanoma murino B16F10-Nex2 mostrou-se importante na regulação negativa da resposta imune protetora, um vetor plasmidial contendo a porção extracelular do receptor da IL-10 murina foi

construído, visando à expressão *in vivo* de um receptor *decoy* capaz de neutralizar essa interleucina.

A neutralização sistêmica da IL-10 em animais C57Bl/6 por terapia gênica com o plasmídeo construído mimetizou a proteção observada em animais IL-10KO e foi potencializada por terapia gênica adjuvante com IL-12.

Verificamos também que a transferência adotiva de células dendríticas de animais C57Bl/6 transfectadas *in vitro* com o plasmídeo neutralizante da IL-10 induziu uma resposta protetora antitumoral contra o melanoma murino B16F10-Nex2, sugerindo que essas células estejam também envolvidas na resposta imune protetora induzida pelo tratamento com o plasmídeo *in vivo*.

Foi possível concluir que embora o melanoma murino B16F10-Nex2 apresente baixa imunogenicidade, uma resposta protetora natural com padrão T_H1 de citocinas é desenvolvida contra ele em alguns indivíduos, e que a terapia gênica para a neutralização da IL-10 sistêmica desenvolvida neste trabalho foi capaz de potencializar essa resposta natural antitumoral, caracterizando-se como uma nova alternativa terapêutica ao melanoma murino B16F10, a ser avaliada em outros tumores.

Bibliografia

Abbas, K. A., Lichtman, A.H., Pober, J.S. (2000) Imunologia celular e molecular. 3ª edição. Editora Revinter.

Akdis CA, Akdis M, Blesken T, Wymann D, Alkan SS, Müller U, Blaser K. (1996) Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. J Clin Invest 98(7):1676-83.

Akdis CA, Blaser K. (1999) IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. FASEB J 13(6):603-9.

Akiyama Y, Watanabe M, Maruyama K, Ruscetti FW, Wiltrout RH, Yamaguchi K. (2000) Enhancement of antitumor immunity against B16 melanoma tumor using genetically modified dendritic cells to produce cytokines. Gene Ther 7:2113–2121.

Arai T, Hiromatsu K, Nishimura H, Kimura Y, Kobayashi N, Ishida H, Nimura Y, Yoshikai Y. (1995) Effects of in vivo administration of anti-IL-10 monoclonal antibody on the host defence mechanism against murine Salmonella infection. Immunology. 85(3):381-8.

Aruga, A; Aruga, E; Tanigawa, K; Bishop, DK; Sondak, VK; Chang, AE. (1997) Type 1 vs Type 2 cytokine release by Vb T cell subpopulations determines in vivo antitumor reactivity: IL-10 mediates a suppressive role. J Immunol 159:664–73.

Ascierto, PA; Scala, S; Ottaiano, A; Simeone, E; de Michele, I; Palmieri, G; Castello, G. (2006) Adjuvant treatment of malignant melanoma: where are we? Crit Rev Oncol Hematol 57:45–52.

Asadullah K, Sterry W, Volk HD. (2003) Interleukin-10 therapy--review of a new approach. Pharmacol Rev 55(2):241-69.

Bacchetta R, Bigler M, Touraine JL, Parkman R, Tovo PA, Abrams J, de Waal Malefyt R, de Vries JE, Roncarolo MG. (1994) High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. J Exp Med 179(2):493-502.

Baj-Krzyworzeka M, Baran J, Szatanek R, Stankiewicz D, Siedlar M, Zembala M. (2004) Prevention and reversal of tumor cell-induced monocyte deactivation by cytokines, purified protein derivative (PPD), and anti-IL-10 antibody. Cancer Immun 25;4:8.

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

Batista, LF. (2002). Resposta imune celular no melanoma murino: identificação de components tumorais envolvidos na resposta

functional de macrófagos. Tese de Mestrado, Programa de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UNIFESP-EPM.

Baumgartner J, Wilson C, Palmer B, Richter D, Banerjee A, and McCarter M, (2007) Melanoma Induces Immunosuppression by Upregulating FOXP3^{+} Regulatory T Cells. J Surg Res, 141(1): 72–77.

Becker JC, Czerny C, Bröcker EB. (1994) Maintenance of clonal anergy by endogenously produced IL-10. Int Immunol 6(10):1605-12.

Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, Sacks DL. (2001) The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of Leishmania major in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. J Exp Med., 194(10):1497-506.

Blaya, C., Crespo, J., Crespo, A. and Alino, S.F. (1996) Anti-interleukin-4 antibody and indomethacin synergistic effect on B16 melanoma tumor progression. J. Pharmacol. Exp. Ther 279: 472.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. (1997) Cellular responses to interferon-gamma. Annu Rev Immunol 15:749-95.

Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. (1991) Macrophage deactivation by interleukin 10. J Exp Med 1;174(6):1549-55.

Böhm W, Thoma S, Leithäuser F, Möller P, Schirmbeck R, Reimann J. (1998) T cell-mediated, IFN-gamma-facilitated rejection of murine B16 melanomas. J Immunol. 15;161(2):897-908.

Boltz-Nitulescu G, Wiltschke C, Holzinger C, Fellinger A, Scheiner O, Gessl A, Förster O. (1987) Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant. J Leukoc Biol 41(1):83-91.

Boon T, van der Bruggen P. (1996) Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. J Exp Med 183(3):725-9.

Botella-Estrada R, Escudero M, O'Connor JE, Nagore E, Fenollosa B, Sanmartín O, Requena C, Guillén C. (2005) Cytokine production by peripheral lymphocytes in melanoma. Eur Cytokine Netw. 16(1):47-55.

Brignole C, Marimpietri D, Pastorino F, Di Paolo D, Pagnan G, Loi M, Piccardi F, Cilli M, Tradori-Cappai A, Arrigoni G, Pistoia V, Ponzoni M. (2009) Anti-IL-10R antibody improves the therapeutic efficacy of targeted liposomal oligonucleotides. J Control Release, 138(2):122-7.

Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE Jr.(1996) Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. Proc Natl Acad Sci U S A93(15):7673-8.

Castro AG, Neighbors M, Hurst SD, Zonin F, Silva RA, Murphy E, Liu YJ, O'Garra A. (2000) Anti-interleukin 10 receptor monoclonal antibody is an adjuvant for T helper cell type 1 responses to soluble antigen only in the presence of lipopolysaccharide. J Exp Med 192(10):1529-34.

Cao X, Zhang W, He L, Xie Z, Ma S, Tao Q, Yu Y, Hamada H, Wang J. (1998) Lymphotactin gene-modified bone marrow dendritic cells act as more potent adjuvants for peptide delivery to induce specific antitumor immunity. J Immunol 161:6238–6244.

Cao X, Zhang W, Wang J, Zhang M, Huang X, Hamada H, Chen W. (1999) Therapy of established tumour with a hybrid cellular vaccine generated by using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor genetically modified dendritic cells. Immunology 97(4):616-25.

Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. (1996) Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. J Exp Med 184(2):747-52.

Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A (1997) Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. Nature 388(6644):782-7.

Chang CJ, Chen YH, Huang KW, Cheng HW, Chan SF, Tai KF, Hwang LH (2007) Combined GM-CSF and IL-12 gene therapy synergistically suppresses the growth of orthotopic liver tumors. Hepatology 45(3):746-54.

Chada S, Ramesh R, Mhashilkar AM. (2003) Cytokine- and chemokine-based gene therapy for cancer. Curr Opin Mol Ther. 5(5):463-74.

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

Chapman PB (2007) Melanoma Vaccines. Semin Oncol 34:516-523.

Chen YX, Man K, Ling GS, Chen Y, Sun BS, Cheng Q, Wong OH, Lo CK, Ng IO, Chan LC, Lau GK, Lin CL, Huang F, Huang FP. (2007) A crucial role for dendritic cell (DC) IL-10 in inhibiting successful DC-based immunotherapy: superior antitumor immunity against hepatocellular carcinoma evoked by DC devoid of IL-10. J Immunol 179(9):6009-15.

Chin YE, Kitagawa M, Kuida K, Flavell RA, Fu XY. (1997) Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. Mol Cell Biol. 17(9):5328-37.

Chhabra A, Chakraborty NG, Mukherji B. (2008) Silencing of endogenous IL-10 in human dendritic cells leads to the generation of an improved CTL response against human melanoma associated antigenic epitope, MART-1 27-35. Clin Immunol 126(3):251-9.

Colombo MP, Trinchieri G. (2002) Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. Cytokine Growth Factor Rev. 13:155–168.

Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G. (2001) Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. J Immunol 166(7):4312-8.

Couper KN, Blount DG, Riley EM. (2008) IL-10: the master regulator of immunity to infection. J Immunol 180(9):5771-7.

Curiel-Lewandrowski C, Mahnke K, Labeur M, Roters B, Schmidt W, Granstein RD, Luger TA, Schwarz T, Grabbe S. (1999) Transfection of immature bone marrow-derived dendritic cells with the granulocyte-macrophage colonystimulating factor gene potently enhances their in vivo antigen-presenting capacity. J Immunol 163:174–183.

D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. (1993) Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon g-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. J Exp Med 178(3):1041-8.

Detjen K, Farwig K, Welzel M, Wiedenmann B, and Rosewicz S (2001) Interferon γ inhibits growth of human pancreatic carcinoma cells via caspase-1 dependent induction of apoptosis Gut. 49(2): 251–262.

Di Pucchio T, Pilla L, Capone I, Ferrantini M, Montefiore E, Urbani F, Patuzzo R, Pennacchioli E, Santinami M, Cova A, Sovena G, Arienti F, Lombardo C, Lombardi A, Caporaso P, D'Atri S, Marchetti P, Bonmassar E, Parmiani G, Belardelli F, Rivoltini L. (2006) Immunization of stage IV melanoma patients with Melan-A/MART-1 and gp100 peptides plus IFN-alpha results in the activation of specific CD8(+) T cells and monocyte/dendritic cell precursors. Cancer Res. 66(9):4943-51.

Dias BR, Rodrigues EG, Nimrichter L, Nakayasu ES, Almeida IC, Travassos LR. Identification of iGb3 and iGb4 in melanoma B16F10-Nex2 cells and the iNKT cell-mediated antitumor effect of dendritic cells primed with iGb3. Molecular Cancer, in publication

Dodge IL, Carr MW, Cernadas M, Brenner MB. (2003) IL-6 production by pulmonary dendritic cells impedes Th1 immune responses. J Immunol 170(9):4457-64.

Dong Z, Staroselsky AH, Qi X, Xie K, Fidler IJ. (1994) Inverse correlation between expression of inducible nitric oxide synthase activity and production of metastasis in K-1735 murine melanoma cells. Cancer Res. 1994 Feb 1;54(3):789-93.

Donnelly RP, Sheikh F, Kotenko SV, Dickensheets H. (2004) The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. J Leukoc Biol 76(2):314-21.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD Immunity. (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. Immunity 21(2):137-48.

Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. Nat Protoc. 2(4):953-71.

Enk AH, Saloga J, Becker D, Mohamadzadeh M, Knop J. (1994) Induction of hapten-specific tolerance by interleukin 10 in vivo. J Exp Med 179(4):1397-402.

Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J. (1997) Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. Int J Cancer. 73(3):309-16.

Erdman SE, Rao VP, Poutahidis T, Ihrig MM, Ge Z, Feng Y, Tomczak M, Rogers AB, Horwitz BH, Fox JG. (2003) $CD4^{+}CD25^{+}$ regulatory lymphocytes require interleukin 10 to interrupt colon carcinogenesis in mice. Cancer Res 63(18):6042-50.

Fickenscher, H., Hor, S., Kupers, H., Knappe, A., Wittmann, S, Sticht, H. (2002) The interleukin-10 family of cytokines. Immunology 23: 89-96.

Fidler IJ. (1975) Selection of successive tumour lines for metastasis. Nat New Biol 242(118):148-9.

Fields RC, Shimizu K, Mulé JJ. (1998) Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 95(16):9482-7.

Fiorentino DF, Bond MW, and Mosmann TR. (1989) Two types of mouse T-helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J Exp Med 170: 2081-2095.

Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol 1;147(11):3815-22.

Friesel R, Komoriya A, Maciag T. (1987) Inhibition of endothelial cell proliferation by gammainterferon. J Cell Biol 104:689-696.

Fröde TS, Souza GE, Calixto JB. (2002) The effects of IL-6 and IL-10 and their specific antibodies in the acute inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. Cytokine. 7;17(3):149-56.

García-Hernández, M.L., Hernadez-Pando, R., Gariglio, P., Berumen, J. (2002) Interleukin-10 promotes B16-melanoma growth by inhibition of macrophage functions and induction of tumour and vascular cell proliferation. Immunology 105: 231-243.

Gerlini, G., Tun-Kyi A., Dudli C., Burg G., Pimpinelli N., and Nestle F. O. (1994) Metastatic Melanoma Secreted IL-10 Down-Regulates CD1 Molecules on Dendritic Cells in Metastatic Tumor Lesions. Am J Pathol 165(6):1853-63.

Gerard, C.M., Bruyns, C., Delvaux, A., Baudson, N., Dargent, J.L., Goldman, M. and Velu, T. (1996) Loss of tumorigenicity and increased immunogenicity induced by interleukin-10 gene transfer in B16 melanoma cells. Hum Gene Ther 7:23.

Gerecitano J, Perle MA, Vilcek J. (1999) Transcriptional basis for the differences in inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression between nonmetastatic and metastatic murine melanoma cell lines. J Interferon Cytokine Res. 1999 Apr;19(4):393-405.

Gorelik E, Wiltrout RH, Brunda MJ, Holden HT, Herberman RB. (1982) Augmentation of metastasis formation by thioglycollate-elicited macrophages. Int. J. Cancer 29: 575-581.

Gorelik E, Wiltrout RH, Copeland D, Herberman RB. (1985) Modulation of formation of tumor metastases by peritoneal macrophages elicited by various agents. Cancer Immunol. Immunother 19: 35-42.

Gottfried E, Kreutz M, Mackensen A. (2008) Tumor-induced modulation of dendritic cell function. Cytokine Growth Factor Rev 19(1):65-77.

Grauer O, Pöschl P, Lohmeier A, Adema GJ, Bogdahn U. (2006) Toll-like receptor triggered dendritic cell maturation and IL-12 secretion are necessary to overcome T-cell inhibition by glioma-associated TGF-beta2. J Neurooncol 82(2):151-61.

Halak BK, Maguire HC Jr, Lattime EC (1999) Tumor-induced interleukin-10 inhibits type 1 immune responses directed at a tumor antigen as well as a non-tumor antigen present at the tumor site. Cancer Res 59(4):911-7.

Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP (1992) CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. Nature 356:607–609.

Harvat BL, Jetten AM. (1996) Gamma-interferon induces an irreversible growth arrest in mid-G1 in mammary epithelial cells which correlates with a block in hyperphosphorylation of retinoblastoma. Cell Growth Differ. Mar;7(3):289-300.

Harvat BL, Seth P, Jetten AM. (1997) The role of p27Kip1 in gamma interferon-mediated growth arrest of mammary epithelial cells and related defects in mammary carcinoma cells. Oncogene. 14(17):2111-22.

He Q, Moore TT, Eko FO, Lyn D, Ananaba GA, Martin A, Singh S, James L, Stiles J, Black CM, Igietseme JU. (2005) Molecular basis for the

potency of IL-10-deficient dendritic cells as a highly efficient APC system for activating Th1 response. J Immunol 174(8):4860-9.

Hebeler-Barbosa F, Rodrigues EG, Puccia R, Caires ACF, Travassos LR (2008) Gene Therapy against Murine Melanoma B16F10-Nex2 Using IL-13Rα2-Fc Chimera and Interleukin 12 in Association with a Cyclopalladated Drug1. Transl Oncol 1(3): 110–120.

Hegmans JP, Hemmes A, Aerts JG, Hoogsteden HC, Lambrecht BN (2005) Imunotherapy of murine malignant mesothelioma using tumor lysate-pulsed dendritic cells. Am J Respir Crit Care Med (10):1168-77.

Hihara J, Yamaguchi Y, Minami K, Noma K, Toge T. (1999) Down-regulation of IL-10 enhances the efficacy of locoregional immunotherapy using OK-432 against malignant effusion.Anticancer Res 19(2A):1077-84.

Ho, A. S.-Y., Y. Liu, T. A. Khan, D.-H. Hsu, J. F. Bazan, and K. W. Moore. (1993) A receptor for interleukin-10 is related to interferon receptors. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 90:11267–11271.

Huang FP, Chen YX, Man K (2006) Anti-tumor vaccines delivered by dendritic cells devoid of interleukin-10. Aplicação de Patente USPTO número 20090010948. (http://appft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO1&Sect2=HITOFF&d=PG01&p=1&u=%2Fnetahtml%2FPTO%2Fsrchnum.html&r=1&f=G&l=50&s1=%2220090010948%22.PGNR.&OS=DN/20090010948&RS=DN/20090010948)

Hunter CA, Yu D, Gee M et al. (2001) Systemic inhibition of angiogenesis underlies resistance to tumors during acute toxoplasmosis. J Immunol 166:5878-5881.

Hussein MR. (2005) Transforming growth factor-beta and malignant melanoma: molecular mechanisms. J Cutan Pathol 32(6):389-95.

Hussein MR. (2006) Tumour-associated macrophages and melanoma tumourigenesis: integrating the complexity. Int J Exp Pathol 87(3):163-76.

Igietseme JU, Ananaba GA, Bolier J, Bowers S, Moore T, Belay T, Eko FO, Lyn D, Black CM. (2000) Suppression of endogenous IL-10 gene expression in dendritic cells enhances antigen presentation for specific Th1 induction: potential for cellular vaccine development. J Immunol 164(8):4212-9.

Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. (2002) The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting.Cytokine Growth Factor Rev. 13(2):95-109.

Ilkovitch D, Lopez DM. (2008) Immune modulation by melanoma-derived factors. Exp Dermatol 12:977-85.

Inaba, K; Inaba, M; Romani, N; Aya, H; Deguchi, M; Ikehara, S; Muramatsu, S; Steinman, RM. (1992) Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. J Exp Med 176(6):1693–1702.

Inoue S, Leitner WW, Golding B, Scott D. (2006) Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. Cancer Res 66(15):7741-7.

Ishida H, Muchamuel T, Sakaguchi S, Andrade S, Menon S, Howard M. (1994) Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. J Exp Med. 1;179(1):305-10.

Jones, B.C., Logsdon, N.J., Josephson, K., Cook, J., Barry, P.A., Walter, M.R. (2002) Crystal structure of human cytomegalovirus IL-10 bound to soluble human IL-10R1. PNAS99: 9404-9409.

Jovasevic VM, Gorelik L, Bluestone JA, and Mokyr MB. (2004) Importance of IL-10 for CTLA-4-Mediated Inhibition of Tumor-Eradicating Immunity J. Immunol 172: 1449–1454.

Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, Robbins PF, Sakaguchi K, Appella E, Yannelli JR, Adema GJ, Miki T, Rosenberg SA. (1994) Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection.Proc Natl Acad Sci U S A91(14):6458-62.

Kikuchi T, Moore MA, Crystal RG. (2000) Dendritic cells modified to express CD40 ligand elicit therapeutic immunity against preexisting murine tumors. Blood 96(1):91-9.

Kim-Schulze S, Taback B, Kaufman HL. (2007) Cytokine therapy for cancer. Surg Oncol Clin N Am4:793-818.

Klein C, Bueler H, Mulligan RC. (2000) Comparative analysis of genetically modified dendritic cells and tumor cells as therapeutic cancer vaccines. J Exp Med 191:1699–1708.

Knutson KL, Disis ML and Salazar LG. (2007) CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis. Cancer Immunol Immunother 56(3):271-85.

Kochman S, Bernard J. (1999) Antitumour immune response and cancer vaccination: the critical role of dendritic cells. Curr Med Res Opin. 15(4):321-6.

Konan KV, Taylor MW. (1996) Treatment of ME180 cells with interferon-gamma causes apoptosis as a result of tryptophan starvation. J Interferon Cytokine Res 16(9):751-6.

Kontani K, Kajino K, Huangi CL, Fujino S, Taguchi O, Yamauchi A, Yokomise H, Ogasawara K. Spontaneous elicitation of potent antitumor immunity and eradication of established tumors by administration of DNA encoding soluble transforming growth factor-beta II receptor without active antigen-sensitization. Cancer Immunol Immunother. 2006 May;55(5):579-87.

Kuhn, R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. Muller. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell 75: 263–274.

Krause CD, Mei E, Mirochnitchenko O, Lavnikova N , Xie J, Jia Y, Hochstrasser RM, Pestka S. (2006) Interactions among the components of the interleukin-10 receptor complex Biochemical and Biophysical Research Communications 377–385.

Lauerova L, Dusek L, Simickova M, Kocák I, Vagundová M, Zaloudík J and Kovarík J. (2002) Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response. Neoplasma 49:159-66.

Leitch J, Fraser K, Lane C, Putzu K, Adema GJ, Zhang QJ, Jefferies WA, Bramson JL, Wan Y. (2004) CTL-dependent and -independent antitumor immunity is determined by the tumor not the vaccine. J Immunol 172(9):5200-5.

Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. Annu Rev Immunol 14:233–258.

Lesinski GB, Badgwell B, Zimmerer J, Crespin T, Hu Y, Abood G, 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.

Lesterhuis WJ, Aarntzen EH, De Vries IJ, Schuurhuis DH, Figdor CG, Adema GJ, Punt CJ. (2008) Dendritic cell vaccines in melanoma: from promise to proof? Crit Rev Oncol Hematol 66(2):118-34.

Levings M.K., Bacchetta R., Schulz U., Roncarolo M.G. (2002) The Role of IL-10 and TGF-β in the Differentiation and Effector Function of T Regulatory Cells. International Archives of Allergy and Immunology 129:263-276.

Li WM, Liu W, Gao C, Zhou BG, Yang SS, Wang Z, Zhang RH, Gan RT, Kong YH, Li Y (2006) Antigen-specific tolerance induced by IL-10 gene modified immature dendritic cells in experimental autoimmune myocarditis in rats. Chin Med J (Engl) 119(19):1646-52.

Litton MJ, Dohlsten M, Rosendahl A, Ohlsson L, Søgaard M, Andersson J, Andersson U (1999) The distinct role of CD4+ and CD8+ T-cells during

the anti-tumour effects of targeted superantigens. Br J Cancer 81(2):359-66.

Logsdon NJ, Jones BC, Josephson K, Cook J, Walter MR. (2002) Comparison of interleukin-22 and interleukin-10 soluble receptor complexes. J Interferon Cytokine Res 22:1099-1112.

Lowes MA, Bishop GA, Crotty K, Barnetson RS, Halliday GM. (1997) T helper 1 cytokine mRNA is increased in spontaneously regressing primary melanomas. J Invest Dermatol 108(6):914-9.

Łukaszewicz M, Mroczko B, Szmitkowski M. (2007) Clinical significance of interleukin-6 (IL-6) as a prognostic factor of cancer disease. Pol Arch Med Wewn 117(5-6):247-51.

Maeurer MJ, Gollin SM, Martin D, Swaney W, Bryant J, Castelli C, Robbins P, Parmiani G, Storkus WJ, Lotze MT. (1996) Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. J Clin Invest 98(7):1633-41.

Mandal M, Bandyopadhyay D, Goepfert TM, Kumar R. (1998) Interferon-induces expression of cyclin-dependent kinase-inhibitors p21WAF1 and p27Kip1 that prevent activation of cyclin-dependent kinase by CDK-activating kinase (CAK). Oncogene. 16(2):217-25.

Mantovani A, Locati M, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P. Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. Trends Immunol. 2001 Jun;22(6):328-36.

Martínez-Escribano JA, Campillo JA, Piñero A, Frías JF, Sánchez-Pedreño P, Corbalán R, Minguela A, Rocío Alvarez M. (2005) [Prospective study of the levels of serum cytokines in patients with melanoma: prognostic value] [Article in Spanish] Actas Dermosifiliogr. 96(2):83-91.

Matsuda, M; Salazar, F; Petersson, M; Masucci, G; Hansson, J; Pisa, P; Zhang, QJ; Masucci, MG; Kiessling, R. (1994) Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor- and allo-specific cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. J Exp Med 1;180(6):2371–2376.

McBride JM, Jung T, de Vries JE, Aversa G. (2002) IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. Cell Immunol 215(2):162-72.

McCarter M, Clarke J, Richter D, Wilson C. (2005) Melanoma skews dendritic cells to facilitate a T helper 2 profile. Surgery 138(2):321-8.

Mehrotra S, Chhabra A, Chakraborty A, Chattopadhyay S, Slowik M, Stevens R, Zengou R, Mathias C, Butterfield LH, Dorsky DI, Economou JS, Mukherji B, Chakraborty NG. (2004) Antigen presentation by

MART-1 adenovirus-transduced interleukin-10-polarized human monocyte-derived dendritic cells. Immunology 113(4):472-81.

Melcher A, Todryk S, Bateman A, Chong H, Lemoine NR, Vile RG. (1999) Adoptive transfer of immature dendritic cells with autologous or allogeneic tumor cells generates systemic antitumor immunity. Cancer Res 59(12):2802-5.

Melero I, Mazzolini G, Narvaiza I, Qian C, Chen L, Prieto J (2001) IL-12 gene therapy for cancer: in synergy with other immunotherapies. Trends Immunol22(3):113-5.

Metharom P, Ellem KA, Schmidt C, Wei MQ. (2001) Lentiviral vector-mediated tyrosinase-related protein 2 gene transfer to dendritic cells for the therapy of melanoma. Hum Gene Ther 12(18):2203-13.

Miller G, Lahrs S, Dematteo RP. (2003) Overexpression of interleukin-12 enables dendritic cells to activate NK cells and confer systemic antitumor immunity. FASEB J 17(6):728-30.

Mitrus I, Delić K, Wróbel N, Missol-Kolka E, Szala S (2006) Combination of IL-12 gene therapy and CTX chemotherapy inhibits growth of primary B16(F10) melanoma tumors in mice. Acta Biochim Pol 53(2):357-60.

Monti P, Leone BE, Zerbi A, Balzano G, Cainarca S, Sordi V, Pontillo M, Mercalli A, Di Carlo V, Allavena P, Piemonti L. (2004) Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL-10highIL-12low regulatory dendritic cell. J Immunol 172(12):7341-9.

Moore, KW; O'Garra, A; de Waal Malefyt, R; Vieira, P; Mosmann, TR. (1993) Interleukin-10. Annu Rev Immunol 11:165.

Moore,KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, and O'Garra A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. Annu. Rev. Immunol. 19: 683–765.

Mouawad R, Rixe O, Meric JB, Khayat D, Soubrane C. (2002) Serum interleukin-6 concentrations as predictive factor of time to progression in metastatic malignant melanoma patients treated by biochemotherapy: a retrospective study. Cytokines Cell Mol Ther 7(4):151-6.

Morgan, R.A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Hughes, M.S., Yang, J.C., Sherry, R.M., Royal, R.E., Topalian, S.L., Kammula, U.S., Restifo, N.P., Zheng, Z., Nahvi, A., de Vries, C.R., Rogers-Freezer, L.J.,Mavroukakis, S.A., Rosenberg, S.A. (2006) Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. Science 314(5796):126-9.

Morisaki T, Matsumoto K, Onishi H, Kuroki H, Baba E, Tasaki A, Kubo M, Nakamura M, Inaba S, Yamaguchi K, Tanaka M, Katano M. (2003) Dendritic cell-based combined immunotherapy with autologous tumor-

pulsed dendritic cell vaccine and activated T cells for cancer patients: rationale, current progress, and perspectives. Hum Cell 16(4):175-82.

Mosmann TR, Sad S. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunol Today 17(3):138-46.

Motomura Y, Senju S, Nakatsura T, Matsuyoshi H, Hirata S, Monji M, Komori H, Fukuma D, Baba H, Nishimura Y. (2006) Embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing glypican-3, a recently identified oncofetal antigen, induce protective immunity against highly metastatic mouse melanoma, B16-F10. Cancer Res 66(4):2414-22.

Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, Slingluff CL Jr, Mellor AL. (2002) Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. Science 297:1867–70.

Murugaiyan G, Martin S, Saha B (2007) Levels of CD40 expression on dendritic cells dictate tumour growth or regression. Clin Exp Immunol 149(1):194-202.

Nastala CL, Edington HD, McKinney TG, Tahara H, Nalesnik MA, Brunda MJ, Gately MK, Wolf SF, Schreiber RD, Storkus WJ, et al. (1994) Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. J Immunol 153(4):1697–1706.

Nemunaitis J, Fong T, Shabe P, Martineau D, Ando D. (2001) Comparison of serum interleukin-10 (IL-10) levels between normal volunteers and patients with advanced melanoma. Cancer Invest 19(3):239-47.

Nestle FO, Farkas A, Conrad C. (2005) Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer. Curr Opin Immunol 17(2):163-9.

Nevala WK, Vachon CM, Leontovich AA, Scott CG, Thompson MA, Markovic SN (2009) Evidence of systemic Th2-driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma. Clin Cancer Res. 15;15(6):1931-9.

Nishioka Y, Hirao M, Robbins PD, Lotze MT, Tahara H. (1999) Induction of systemic and therapeutic antitumor using intratumoral injection of dendritic cells genetically modified to express interleukin 12. Cancer Res 59:4035–4041.

Norioka K, Borden EC, Auerbach R. (1992) Inhibitory effects of cytokines on vascular endothelial cells: synergistic interactions among interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1. J Immunotherapy 12:13-18.

O'Garra A, Barrat FJ, Castro AG, Vicari A, Hawrylowicz C. (2008) Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. Immunol Rev 223:114-31.

Organização mundial de saúde (2009a) Health effects of UV radiation. Disponível em: <http://www.who.int/uv/health/uv_health2/en/print.html>. Acesso em: 21 de janeiro de 2009.

Organização mundial de saúde (2009b) Skin cancers. Disponível em: <http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/print.html> Acesso em: 21 de janeiro de 2009.

Ozaki Y, Edelstein MP, Duch DS. (1998) Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma. Proc Natl Acad Sci U S A. 85(4):1242-6.

Ozawa H, Ding W, Torii H, Hosoi J, Seiffert K, Campton K, Hackett NR, Topf N, Crystal RG, Granstein RD. (1999) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer to dendritic cells or epidermal cells augments their antigen-presenting function including induction of anti-tumor immunity. J Invest Dermatol 113: 999–1005.

Park JM, Terabe M, van den Broeke LT, Donaldson DD, Berzofsky JA. (2005) Unmasking immunosurveillance against a syngeneic colon cancer by elimination of $CD4^+$ NKT regulatory cells and IL-13. Int J Cancer 114(1):80-7.

Pawelec G. (2004) Tumour escape: antitumour effectors too much of a good thing? Cancer Immunol Immunother 53(3):262-74.

Pawelek J, Chakraborty A, Lazova R, Yilmaz Y, Cooper D, Brash D, Handerson T. (2006) Co-opting macrophage traits in cancer progression: a consequence of tumor cell fusion? Contrib Microbiol 13:138-55.

Pletnev S, Magracheva E, Wlodawer A, Zdanov A. (2005) A model of the ternary complex of interleukin-10 with its soluble receptors. BMC Struct Biol 5:10.

Polak ME, Borthwick NJ, Gabriel FG, Johnson P, Higgins B, Hurren J, McCormick D, Jager MJ, Cree IA. (2007) Mechanisms of local immunosuppression in cutaneous melanoma. Br J Cancer 96(12):1879-87. Epub 2007 Jun 12.

Puré E, Allison J.P., Schreiber (2005) Breaking down the barriers to cancer immunotherapy. Nat Immunol 6(12):1207-10.

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.

Rankin EB, Yu D, Jiang J, Shen H, Pearce EJ, Goldschmidt MH, Levy DE, Golovkina TV, Hunter CA, Thomas-Tikhonenko A (2003) An essential

role of Th1 responses and interferon gamma in infection-mediated suppression of neoplastic growth. Cancer Biol Ther 2(6):687-93.

Redondo P., Sanchez-Carpintero I, Bauza A, Idoate M, Solano T, Mihm MC Jr. (2003) Immunologic escape and angiogenesis in human malignant melanoma. J Am Acad Dermatol 49(2):255-63.

Riemensberger J, Böhle A, Brandau S (2002) IFN-gamma and IL-12 but not IL-10 are required for local tumour surveillance in a syngeneic model of orthotopic bladder cancer. Clin Exp Immunol 127(1):20-6.

Rodrigues EG, Travassos LR. (2003) 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.

Rosenberg S.A. (2001) Progress in the development of immunotherapy for the treatment of patients with cancer. J Intern Med 250(6):462-75.

Rosenberg SA, Dudley ME. (2004) Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(Suppl.2):14639–45.

Saito, M., Fan, D. and Lachman, L.B. (1995) Antitumor effects of liposomal IL-2 and TNF against the pulmonary metastases of the B16F10 murine melanoma in syngeneic mice. Clin Exp Metastasis 13: 249.

Sampson, J.H., Archer, G.E., Ashley, D.M., Fuchs, H.E., Hale, L.P., Dranoff, G. and Bigner, D.D. (1996) Subcutaneous vaccination with irradiated, cytokine-producing tumor cells stimulates $CD8^+$ cell-mediated immunity against tumors located in the "immunologically priviliged" central nervous systemd. Proc Natl Acad Sci USA 93(19):10399-404.

Schultz ES, Schuler-Thurner B, Stroobant V, Jenne L, Berger TG, Thielemanns K, van der Bruggen P, Schuler G. (2004) Functional analysis of tumor-specific Th cell responses detected in melanoma patients after dendritic cell-based immuno-therapy. J Immunol 172:1304-10.

Schuster M, Nechansky A and Kircheis R. (2006) Cancer immunotherapy. Biotechnol J 1(2):138-47.

Seino K, Motohashi S, Fujisawa T, Nakayama T, Taniguchi M. (2006) Natural killer T cell-mediated antitumor immune responses and their clinical applications. Cancer Sci 97(9):807-12.

Seo N., Tokura Y., Takigawa M., and Egawa K. (1999) Depletion of IL-10- and TGF-β-Producing Regulatoryγδ T Cells by Administering a Daunomycin-Conjugated Specific Monoclonal Antibody in Early Tumor Lesions Augments the Activity of CTLs and NK Cells. The Journal of Immunology 163:242–249.

Seo N, Hayakawa S, Takigawa M, Tokura Y. (2001) Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of $CD4^+$ T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity. Immunology 103(4):449-57.

Silva RA, Pais TF, Appelberg R. (2001) Blocking the receptor for IL-10 improves antimycobacterial chemotherapy and vaccination. J Immunol (3):1535-41.

Staquicini FI, Tandle A, Libutti SK, Sun J, Zigler M, Bar-Eli M, Aliperti F, Pérez EC, Gershenwald JE, Mariano M, Pasqualini R, Arap W, Lopes JD. (2008) A subset of host B lymphocytes controls melanoma metastasis through a melanoma cell adhesion molecule/MUC18-dependent interaction: evidence from mice and humans. Cancer Res 68(20):8419-28.

Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. (2002) $CD4^+$ and $CD8^+$ anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. Blood 99(7):2468-76.

Steinbrink K, Jonuleit H, Müller G, Schuler G, Knop J, Enk AH. (2006) Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. Blood 93(5):1634-42.

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. (2003) Tolerogenic dendritic cells. Annu Rev Immunol 21:685-711.

Steinman RM, Banchereau J. (2007) Taking dendritic cells into medicine. Nature 449 (7161):419-26.

Steitz J, Brück J, Knop J, Tüting T. (2001) Adenovirus-transduced dendritic cells stimulate cellular immunity to melanoma via a CD4(+) T cell-dependent mechanism. Gene Ther 8(16):1255-63.

Svane IM, Nikolajsen K, Walter MR, Buus S, Gad M, Claesson MH, Pedersen AE. Characterization of monocyte-derived dendritic cells maturated with IFN-alpha. Scand J Immunol. 2006 Mar;63(3):217-22.

Tan JC, Braun S, Rong H, DiGiacomo R, Dolphin E, Baldwin S, Narula SK, Zavodny PJ, Chou CC. (1995) Characterization of recombinant extracellular domain of human interleukin-10 receptor. J Biol Chem 270(21):12906-11.

Tanner JE, Diaz-Mitoma F, Rooney CM, Alfieri C. (1997) Anti-interleukin-10 antibodies in patients with chronic active Epstein-Barr virus infection. J Infect Dis. 176(6):1454-61.

Tannenbaum CS, Hamilton TA. (2000) Immune-inflammatory mechanisms in IFNgamma-mediated anti-tumor activity. Semin Cancer Biol. 10(2):113-23.

Taylor MW, Feng GS. (1991) Relationship between interferon-g, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. FASEB J 5:2516– 22.

Teicher, B.A., Ara, G., Menon, K. and Schaub, R.G. (1996) 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.

Tendler, D.S., Bao, C., Wang, T., Huang, E.L., Ratovitski, E.A., Pardoll, D.A. and Lowenstein, C.J. (2001) Intersection of interferon and hypoxia signal transduction pathways in nitric oxide-induced tumor apoptosis. Cancer Res 61: 3682-3688.

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(6):515-20.

Terai M, Tamura Y, Alexeev V, Ohtsuka E, Berd D, Mastrangelo MJ, Sato T. Human interleukin 10 receptor 1/IgG1-Fc fusion proteins: immunoadhesins for human IL-10 with therapeutic potential. Cancer Immunol Immunother. 2009 Aug;58(8):1307-17.

Tomihara K, Kato K, Masuta Y, Nakamura K, Tanaka T, Hiratsuka H, Hamada H. (2007) Gene transfer of the CD40-ligand to human dendritic cells induces NK-mediated antitumor effects against human carcinoma cells. Int J Cancer 120(7):1491-8.

Trinchieri G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. Nat Rev Immunol. 3:133–146.

Tsung K, Meko JB, Peplinski GR, Tsung YL, Norton JA. (1997) IL-12 induces T helper 1-directed antitumor response. J Immunol 158(7):3359-65.

Vence L, Palucka AK, Fay JW, Ito T, Liu YJ, Banchereau J, Ueno H. (2007) Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. Proc Natl Acad Sci USA 104(52):20884-9.

Vicari AP, Chiodoni C, Vaure C, Aït-Yahia S, Dercamp C, Matsos F, Reynard O, Taverne C, Merle P, Colombo MP, O'Garra A, Trinchieri G, Caux C. (2002) Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody. J Exp Med 196(4):541-9.

de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. (1991) Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med 1;174(5):1209-20.

Walos S, Szary J, Szala S. (1999) Inhibition of tumor growth by interleukin 10 gene transfer in B16(F10) melanoma cells. Acta Biochim Pol 46(4):967-70.

Wan Y, Emtage P, Zhu Q, Foley R, Pilon A, Roberts B, Gauldie J. (1999) Enhanced immune response to the melanoma antigen gp100 using recombinant adenovirus-transduced dendritic cells. Cell Immunol 15;198(2):131-8.

Wang J, Saffold S, Cao X, Krauss J, Chen W. (1998) Eliciting T cell immunity against poorly immunogenic tumors by immunization with dendritic cell-tumor fusion vaccines. J Immunol 161(10):5516-24.

Wang Q, Yu H, Ju DW, He L, Pan JP, Xia DJ, Zhang LH, Cao X (2001) Intratumoral IL-18 gene transfer improves therapeutic efficacy of antibody-targeted superantigen in established murine melanoma. Gene Ther 8(7):542-50.

Ward H, Vigues S, Poole S, Bristow AF. (2001) The rat interleukin 10 receptor: cloning and sequencing of cDNA coding for the alpha-chain protein sequence, and demonstration by western blotting of expression in the rat brain. Cytokine (5): 237-40.

Wei H., Zheng H., Lou D., Zhang L., Zhang R., Sun R. and Tian Z. (2005) Tumor-induced suppression of interferon-production and enhancement of interleukin-10 production by natural killer (NK) cells: paralleled to $CD4^+$ T cells. Molecular Immunology 42 1023–1031.

Winter H, Hu HM, Poehlein CH, Huntzicker E, Osterholzer JJ, Bashy J, Lashley D, Lowe B, Yamada J, Alvord G, Urba WJ, Fox BA. (2003) Tumour-induced polarization of tumour vaccine-draining lymph node T cells to a type 1 cytokine profile predicts inherent strong immunogenicity of the tumour and correlates with therapeutic efficacy in adoptive transfer studies. Immunology 108(3): 409–419.

Whiteside TL, Herberman RB. (1995) The role of natural killer cells in immune surveillance of cancer. Curr Opin Immunol 7(5):704-10.

Wojtowicz Praga, S., Verma, U.M., Wakefield, L., Esteban, J.M., Hartmann, D. and Mazumder, A. (1996) Modulation of B16 melanoma growth and metastasis by anti-transforming factorβ antibody and interleukin-2. J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol 19: 169.

Wolk K., Kunz S., Asadullah K. and Sabat R. (2002) Cutting Edge: Immune Cells as Sources and Targets of the IL-10 Family Members? The Journal of Immunology 168(11):5397-402.

Yang S, Li W, Liu W, Gao C, Zhou B, Li S, Li Y, Kong Y (2006) IL-10 gene modified dendritic cells induced antigen-specific tolerance in experimental autoimmune myocarditis. Clin Immunol 121(1):63-73.

Yu D, Thomas-Tikhonenko A. (2001) Intratumoral delivery of an interferon gamma retrovirusproducing cells inhibits growth of a murine melanoma by a non-immune mechanism. Cancer Lett 173:145-154.

Yu P and Fu YX. (2006) Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes? Lab Invest 86(3):231-45.

Yue F. Y., Dummer R., Geertsen R., Hofbauer G., Laine E., Manolio S., and Burg G. (1997) Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. Int. J. Cancer 71: 630–637.

Xie K, Dong Z, Fidler IJ. (1996) Activation of nitric oxide synthase gene for inhibition of cancer metastasis. J Leukoc Biol. 1996 Jun;59(6):797-803.

Xu X, Fu XY, Plate J, Chong AS. (1998) IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. Cancer Res.58(13):2832-7

Zhang X, Gordon JR, Xiang J (2002) Advances in dendritic cell-based vaccine of cancer. Cancer Biother Radiopharm 17(6):601-19.

Zhang S, Huang W. (2008) Dendritic cell based genetic immunization stimulates potent tumor protection dependent on CD8 CTL cells in the absence of autoimmunity. J Cancer Res Clin Oncol 134(9):987-94.

Zheng LM, Ojcius DM, Garaud F, Roth C, Maxwell E, Li Z, Rong H, Chen J, Wang XY, Catino JJ, King I. (1996) Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism. J Exp Med 184(2):579-84.

Zitvogel L, Mayordomo JI, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, Lotze MT, Storkus WJ. (1996) Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. J Exp Med Jan 183(1):87-97.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

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