Priscilla Carvalho Cabral

**Desenvolvimento de modelo
experimental murino para o estudo da
imunobiologia do melanoma**

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

São Paulo
2016

Priscilla Carvalho Cabral

**Desenvolvimento de modelo experimental
murino para o estudo da imunobiologia do
melanoma**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante-Mendes

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2016

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

© reprodução parcial

Cabral, Priscilla Carvalho.

Desenvolvimento de modelo experimental murino para o estudo da imunobiologia do melanoma / Priscilla Carvalho Cabral. -- São Paulo, 2016.

Orientador: João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

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

Versão do título para o inglês: Development of an experimental murine model for the study of melanoma's immunobiology.

1. Melanoma 2. Ovalbumina 3. Luciferasa 4. Resposta imune 5. Linhagens recombinantes 6. Modelo animal I. Mendes, João Gustavo Pessini Amarante II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB072/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Priscilla Carvalho Cabral.

Título da Desenvolvimento de modelo experimental murino para o
estudo da imunobiologia do melanoma .

Orientador(a): João Gustavo Pessini Amarante Mendes.

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

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 001 nas fls. 15 do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **João Gustavo P. Amarante-Mendes**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Desenvolvimento de modelo experimental in vivo para estudo da resposta imune ao melanoma a partir de modificações linhagens tumorais in vitro*" do qual participam o(s) aluno(s) **Priscilla Carvalho Cabral**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **13.03.2014, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 17 de março de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, por toda proteção diária e por todas as portas que foram abertas ao longo de minha vida.

Agradeço à minha família, por sempre terem cuidado de mim, por terem me mostrado a importância dos estudos. Pelo incentivo contínuo para que eu corresse atrás de meus sonhos e fizesse aquilo que eu amava. Agradeço também pelo apoio financeiro, porque muitas vezes, sem ele, somos obrigados a deixar nossos sonhos e objetivos de lado. Obrigada por tudo!

Obrigada ao meu orientador, Dr. Gustavo Amarante-Mendes, por ter me recebido gentilmente e aceito como sua orientanda. Estes 2 anos e meio me fizeram crescer não só intelectualmente, mas também como pessoa. No decorrer deste período, eu sinto como se tivesse vivido décadas de aprendizado.

Agradeço a todos os membros do laboratório 244: Eliza, Melanie, Nath, Lú, Marcela, Juninho, Henry, Isa, Felipe, Aamir, Emília, Sandy, Aamir, Priscila, Thiago, Talita, Carol, Cris, Jennifer, Esther, Paola e Giulia. Sou grata por estas pessoas maravilhosas que se tornaram muito mais do que "colegas de laboratório", mas sim grandes amigos. Agradeço por toda a ajuda durante a execução dos experimentos, mas principalmente, por providenciar momentos únicos com muitas risadas, desabafos, angústia e fofocas. Agradeço por todos estes momentos terem sido repletos de companheirismo. Vou carregar comigo todos eles!

Agradeço à Prof. Jacqueline Jacysyn por toda a ajuda nos experimentos *in vivo* e pela amizade. Agradeço também aos demais membros de outros labs que me ajudaram muito e se tornaram pessoas muito especiais para mim. Em especial, o Rogério e o Cristiano.

Obrigada ao meu recente noivo, Mike, por todo apoio, incentivo, paciência, amor e companheirismo sempre.

Obrigada a todos os meus amigos fora do lab pelos ótimos finais de semana, por todo apoio e carinho que são tão essenciais. Muito obrigada!

Obrigada a todos os brilhantes professores deste departamento que contribuíram para o meu desenvolvimento científico, seja ministrando disciplinas, avaliando pôsteres, realizando seminários ou durante a monitoria. Obrigada também a todos demais os funcionários do ICB, aos funcionários da pós-graduação, por toda instrução fornecida, pela atenção e carisma. Agradeço também às agências de fomento por todo suporte financeiro nestes anos.

Em resumo, sou extremamente grata à todas as pessoas que participaram de maneira tão única e decisiva em minha vida ao longo destes 2 anos e meio. Eu só tenho a agradecer à cada um de vocês e carregar comigo cada uma das lembranças!

Por último, mas não menos importante, agradeço a todos os animais que foram essencialmente utilizados para que este trabalho fosse executado em prol da ciência.

“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho” – Abraham Lincoln

RESUMO

Cabral PC. Desenvolvimento de modelo experimental murino para o estudo da imunobiologia do melanoma. [Dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

O câncer compreende uma doença multifatorial fruto de um acúmulo de mutações pontuais que impactam no descontrole do crescimento celular normal. Atualmente, um tipo de câncer bastante prevalente é o câncer de pele. O subtipo mais agressivo e fatal compreende o melanoma, o qual demonstrou, nas últimas 2 décadas, um aumento na incidência dos casos em 3 vezes. Embora muitas estratégias terapêuticas tenham sido desenvolvidas ao longo dos anos, principalmente na área de imunoterapia do câncer, o aumento no número de casos associado à dificuldade de tratamento do melanoma em estádios avançados, resultam em uma necessidade real de que mais pesquisas e tratamentos sejam desenvolvidos. Sendo assim foi desenvolvido um modelo experimental de melanoma a fim de elucidar o papel do sistema imunológico no combate a tumores. Para isso, linhagens tumorais geneticamente modificadas foram desenvolvidas a partir da construção de partículas retrovirais recombinantes no intuito de promover a expressão dos genes: Luciferase para emissão de bioluminescência e ovalbumina (forma membranar e citosólica) para verificação da resposta imune específica à um neo-antígeno, com adicional avaliação de um possível papel imunogênico. Ensaios *in vitro* demonstraram que a cinética de crescimento celular juntamente com o perfil de expressão das proteínas nas linhagens é bastante similar entre elas. A administração das linhagens *in vivo* em animais selvagens demonstrou uma alteração no perfil de crescimento tumoral na linhagem expressante de ovalbumina na forma citosólica (Tm1.Luc.cOVA), enquanto a administração em animais imunodeficientes demonstrou uma resistência ao crescimento tumoral nos primeiros dias com posterior perda do controle tumoral. Para avaliar o papel do sistema imune adaptativo, inoculamos os tumores em animais previamente imunizados com ovalbumina e, foi observado uma alteração significativa no padrão do crescimento tumoral nas 2 linhagens expressantes de OVA. Avaliamos também a resposta de linfócitos TCD8+ citotóxicos anti-OVA. Os resultados demonstraram que no 7º dia pós-inoculação existe uma resposta citotóxica específica apenas na linhagem Tm1.Luc.cOVA. Observamos também que inoculação de uma quantidade alta de células tumorais dificulta a ativação das células do sistema imune no 7º dia. No entanto, a inoculação *in vivo* destas em estado necrótico promove a ativação linfócitos TCD8+ citotóxicos anti-ovalbumina. Em conjunto, nossos resultados demonstraram que o emprego de estratégias de vacinação anti-tumoral associada a presença de um neo-antígeno extra (ovalbumina) contribui para a otimização do perfil de resposta imunológica anti-tumoral.

Palavras-chave: Melanoma. Ovalbumina. Luciferase. Resposta imune. Linhagens recombinantes. Modelo animal

ABSTRACT

Cabral PC. Development of an experimental murine model for the study of melanoma's immunobiology. [Dissertação (Masters thesis in Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Cancer is a multifactorial disease caused by some punctual mutations which lead to loss of control in cellular normal growth. Nowadays, one cancer that is very prevalent is skin cancer. The most aggressive and deadly subtype of skin cancer is melanoma which has shown, in the last two decades, a three-times raise in melanoma's incident. Although many therapeutical approaches have emerged all over the years, specially in the field of cancer immunotherapy, the increasing number of cases associated with the challenge of treating patients with advanced melanoma, point out the need of developing more researches and treatments. Considering all the informations described, we constructed some genetically modified tumoral lineages using retroviral particles to induce the expression of 2 genes: Luciferase in order to produce bioluminescence and ovalbumin (membranary and cytosolic form) so we could verify the immune response against a specific neoantigen, and also, analyze if the model could display any immunogenic activity induced by ovalbumin. *In vitro* assays demonstrated similarity among the lineages regarding gene expression and kinetics. *In vivo* results showed a difference in tumoral growth pattern in the cytosolic ovalbumin-expressing lineage (Tm1.Luc.cOVA) while tumoral inoculation in immunodeficient mice demonstrated tumoral growth resistance on the first weeks post-inoculation followed by loss of tumoral control. In order to evaluate the participation of adaptative immune system, we performed a tumoral inoculation in wild-type mice previously immunized with ovalbumin. We observed then a significant change in tumoral growth in animals that received OVA-expressing tumoral lineages. We also evaluated T CD8+ lymphocytes anti-OVA and, the results showed cytotoxic response on day 7th post-inoculation only with Tm1.Luc.cOVA. When we performed inoculations using a high quantity of cells, we noticed an impairment of recognition and activation by the immune system on day 7th. On the other hand, the inoculation of the same quantity of cells but those on necrosis, helped the activation of TCD8+ lymphocytes anti-ovalbumin. In summary, our results indicated that the application of anti-tumoral vaccination strategies associated with the presence of an extra neoantigen enhanced anti-tumoral immune response.

Keywords: Melanoma. Ovalbumin. Luciferase. Immune response. Recombinant lineages. Animal model.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig 1 – Critério de diagnóstico das lesões de melanoma (ABCDE do Melanoma).....	19
Fig 2 – Plasmídeo pMSCV IRES Luciferase.....	30
Fig 3 – Plasmídeo pCI-neo-cOVA.....	30
Fig 4 – Plasmídeo pCI-neo-mOVA.....	31
Fig 5 – Sequências gênicas dos fragmentos de ovalbumina.....	31
Fig 6 – Cálculos para a ligação do plasmídeo recombinante.....	37
Fig 7 – Esquematização do plasmídeo pMSCV IRES Luc.mOVA sob ação da enzima NcoI.....	39
Fig 8 - Esquematização do plasmídeo pMSCV IRES Luc.mOVA sob ação da enzima EcoRV.....	39
Fig 9 – Esquematização do protocolo de isolamento de clones.....	43
Fig 10 – Cálculo e estratégia de gate do ensaio de citotoxicidade <i>in vivo</i>	55
Fig 11 – Digestão dos vetores para isolamento de fragmentos	59
Fig 12 – Digestão do vetor.....	59
Fig 13 – Mapa plasmidial pMSCV IRES Luc.mOVA.....	60
Fig 14 – Mapa plasmidial pMSCV IRES Luc.cOVA.....	61
Fig 15 – Digestão dos clones com a enzima NcoI.....	62
Fig 16 - Digestão dos clones com a enzima EcoRV.....	63
Fig 17 – Sequenciamento pMSCV IRES Luc.cOVA.....	65
Fig 18 - Sequenciamento pMSCV IRES Luc.mOVA.....	66
Fig 19 – Gel de agarose com os plasmídeos recombinados.....	67
Fig 20 – Detecção de bioluminescência dos clones Tm1.Luc.mOVA.....	68
Fig 21 - Detecção de bioluminescência dos clones Tm1.Luc.cOVA.....	69
Fig 22 - Detecção de bioluminescência dos clones Tm1.Luc.....	69
Fig 23 - Detecção de bioluminescência nos pools celulares.....	71
Fig 24 – Expressão de RNAm para luciferase.....	72
Fig 25 – Expressão de RNAm para ovalbumina.....	72
Fig 26 – Cinética <i>in vitro</i> dos pools celulares.....	73
Fig 27 – Curva de cinética de bioluminescência <i>in vivo</i>	75
Fig 28 – Bioluminescência <i>in vivo</i> em camundongos selvagens.....	77

Fig 29 – Crescimento tumoral <i>in vivo</i> em camundongos selvagens.....	78
Fig 30 – Crescimento tumoral <i>in vivo</i> selvagens x imunodeficientes (Tm1.Luc)..	79
Fig 31 – Crescimento tumoral <i>in vivo</i> selvagens x imunodeficientes (Tm1.Luc.mOVA)	79
Fig 32 - Crescimento tumoral <i>in vivo</i> selvagens x imunodeficientes (Tm1.Luc.cOVA)	80
Fig 33 – Crescimento tumoral da linhagem Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA em animais imunizados e não-imunizados.....	82
Fig 34 – Imageamento <i>in vivo</i> de animais imunizados e não-imunizados.....	83
Fig 35 - Quantificação da bioluminescência <i>in vivo</i> de animais imunizados e não-imunizados.....	84
Fig 36 – Estratégia de gate e resultados das avaliações citotóxicas nos dias 7,14 e 18 pós-inoculação tumoral	86
Fig 37 – Ensaio de citotoxicidade <i>in vivo</i> nos dias 7,14 e 18 pós-inoculação tumoral	87
Fig 38 – Avaliação citotóxica em linhagens tumorais viáveis inoculadas em altas quantidades.....	88
Fig 39 – Avaliação fenotípica e ensaio de citotoxicidade <i>in vivo</i> de animais inoculados com linhagens tumorais não-viáveis em altas quantidades.....	89
Fig 40 – Estratégia de gate e resultados das avaliações citotóxicas nos dias 7, 14 e 18 pós-inoculação tumoral de células viáveis e não-viáveis.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TIL – *Tumor-infiltrating lymphocyte*
TAM – *Tumor-associated macrophage*
MCA – Metilcolantreno
CTL – *Citotoxic T lymphocyte*
IL – Interleucina
TCR – *T cell receptor*
CFA – *Complete Freud adjuvant*
IFA – *Incomplete freud adjuvant*
OVA – Ovalbumina
LUC – Luciferase
mOVA – *Membranary ovalbumin*
cOVA – *Citoplasmic ovalbumin*
APC – *Antigen-presenting cell*
CIC – *Cancer-Immunity Cycle*
FasL – *Fas Ligand*
VEFG – *Vascular endothelial growth factor*
DAMPS – *Damage-associated molecular pattern*
PEI – *Polyethylemine*
GEMM – *Genetically engineered mouse models*
IFN α – Interferor alfa
IFN γ – Inferferon gama
TRAIL – *TNF-related apoptosis-inducing ligand*
RLU – *Relative light units*
DMSO – Dimetilsulfóxido
ROI – *Region of Interest*
M2 – Macrófagos do tipo M2
M1 – Macrófagos do tipo M1
ATP – *Adenosine triphosphate*
IFN γ R – *Interferon gamma receptor*
DC – *Dendritic cells*
ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

qPCR – *Quantitative PCR*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Estimativas e distribuição global do câncer.....	16
1.2 Melanoma.....	17
1.3 Resposta imune e terapia anti-tumoral.....	20
1.4 Modelos animais para estudo do câncer.....	24
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivos gerais.....	27
2.2 Metas específicas.....	27
3 METODOLOGIA.....	28
3.1 Aspectos Gerais.....	28
3.2 Construção das linhagens recombinantes.....	28
3.2.1 <i>Aquisição dos plasmídeos pCI-neo-mOVA, pCI-neo-cOVA, pMSCV IRES</i> <i>Luciferase.....</i>	<i>28</i>
3.2.2 <i>Mini-preparação Plasmidial.....</i>	<i>32</i>
3.2.3 <i>Confirmação da integridade e concentração do DNA extraído.....</i>	<i>33</i>
3.2.4 <i>Midi-preparação plasmidial.....</i>	<i>34</i>
3.2.5 <i>Análise de mapas e sequências.....</i>	<i>34</i>
3.2.6 <i>Reação de digestão dos fragmentos de Ovalbumina membranária mOVA)/</i> <i>Ovalbumina citoplasmática (cOVA) e do vetor pMSCV IRES Luciferase</i>	<i>35</i>
3.2.7 <i>Extração e purificação dos fragmentos e do vetor linearizado.....</i>	<i>35</i>
3.2.8 <i>Reação de ligação inserto + vetor</i>	<i>36</i>
3.2.9 <i>Transformação bacteriana dos plasmídeos recombinantes: Heat-shock</i> <i>Method.....</i>	<i>37</i>
3.2.10 <i>Isolamento dos clones e ensaio de restrição.....</i>	<i>38</i>
3.2.11 <i>Sequenciamento das amostras.....</i>	<i>40</i>
3.2.12 <i>Transfecção e produção das partículas retrovirais.....</i>	<i>40</i>
3.2.13 <i>Transdução das células de melanoma murino.....</i>	<i>42</i>
3.2.14 <i>Obtenção dos clones, avaliação de bioluminescência e confecção dos</i> <i>pools celulares.....</i>	<i>42</i>
3.3 Caracterização in vitro das linhagens recombinantes.....	45
3.3.1 <i>Avaliação de bioluminescência dos pools celulares</i>	<i>45</i>

3.3.2 Avaliação da expressão relativa de RNA mensageiro (RNAm) nos pools	45
3.3.2.1 Plaqueamento das células.....	45
3.3.2.2 Extração de RNA com trizol.....	46
3.3.2.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)	47
3.3.2.4 Quantificação da expressão gênica - Reação de PCR em Tempo Real (qPCR).....	47
3.3.3 Cinética in vitro dos pools Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA....	48
3.4 Caracterização in vivo das linhagens recombinantes em animais selvagens	49
3.4.1 Padronização e avaliação de bioluminescência in vivo.....	49
3.4.2 Avaliação manual do crescimento tumoral.....	50
3.5 Caracterização in vivo das linhagens recombinantes em animais imunodeficientes	51
3.5.1 Avaliação do crescimento tumoral e emissão de bioluminescência.....	51
3.6 Caracterização in vivo das linhagens recombinantes em animais previamente imunizados com ovalbumina.....	51
3.6.1 Preparo da imunização, inoculação e avaliação in vivo.....	51
3.7 Avaliação da resposta imune citotóxica anti-ovalbumina.....	52
3.7.1 Obtenção de esplenócitos.....	53
3.7.2 Marcação, pulsação e inoculação de esplenócitos.....	53
3.7.3 Análise da lise específica por citometria de fluxo.....	55
3.8 Avaliação da resposta imune citotóxica anti-ovalbumina mediante a administração de grandes quantidades celulares viáveis.....	56
3.8.1 Ensaio de citotoxicidade in vivo	56
3.9 Avaliação da resposta imune citotóxica anti-ovalbumina mediante a administração de grandes quantidades celulares não-viáveis.....	56
3.9.1 Indução de necrose nas células tumorais e avaliação da citotoxicidade in vivo.....	56
3.10 Análises estatísticas.....	57
4 RESULTADOS.....	58
4.1 Construção dos plasmídeos recombinantes.....	58

4.2 Clones recém-transduzidos apresentaram alta variabilidade na emissão de bioluminescência.....	68
4.3 Confecção dos pools. resultou em maior similiaridade entre as amostras.....	70
4.4 Emissão máxima de bioluminescência in vivo é detectada em t=8 minutos	74
4.5 Linhagens tumorais inoculadas in vivo não apresentaram diferenças na emissão de bioluminescência mas sim no perfil de crescimento tumoral.....	76
4.6 Inoculação das linhagens em animais imunodeficientes altera o crescimento tumoral nas linhagens Tm1.Luc e Tm1.Luc.mOVA.....	78
4.7 Imunização prévia com OVA altera o perfil de crescimento tumoral nas linhagens expressantes de ovalbumina.....	80
4.8 Animais inoculados com Tm1.Luc.cOVA demonstraram lise específica de células-alvo pulsadas, apenas no 7º dia pós-inoculação tumoral.....	85
4.9 A administração de altas quantidades de células tumorais viáveis não resulta em lise específica	88
4.10 Inoculação de altas quantidades de células tumorais em necrose é capaz de promover lise específica em animais que receberam Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA.....	89
5 DISCUSSÃO.....	91
6 CONCLUSÃO.....	108
REFERÊNCIAS*	109

1 INTRODUÇÃO

1.1 Estimativas e distribuição global do câncer

De acordo com o American Cancer Society (2016), o câncer é categorizado no grupo de doenças crônicas juntamente com as doenças cardiovasculares, doenças respiratórias e o diabetes, os quais compreendem cerca de 70% das mortes anuais globais. Nesta parcela, o câncer representa 15%, o que em termos quantitativos representa aproximadamente 8.2 milhões de óbitos anuais globalmente (American Cancer Society, 2016).

Associado à este dado, estima-se ainda que no ano de 2030, serão observados aproximadamente 13 milhões de óbitos mundialmente em decorrência do câncer (American Cancer Society, 2016). Valor que representa quase o dobro do número atual de óbitos em decorrência desta doença. É necessário ressaltar que para a execução de previsões, são considerados os índices de crescimento populacional associados ao aumento da expectativa de vida. Em 1880, aproximadamente metade da população do Reino Unido, faleciam antes dos 45 anos de idade. Ou seja, somente 25% desta população atingiam os 70 anos de idade. No ano de 1990, observou-se que esta parcela populacional sofreu uma drástica alteração representado nesta época em torno de 70% (IARC, 2008).

De acordo com o World Cancer Report 2014, os cânceres que atingem a população mundial com uma frequência maior são: Na população masculina, o câncer de pulmão (34.2/100.000 habitantes) seguido pelo câncer de próstata (31.1/100.000 habitantes). Na população feminina, o câncer de mama (43.3/100.000 habitantes) e o câncer colorretal (14.3/100.000 habitantes) (WHO, 2014).

Outro tipo de câncer bastante prevalente na população mundial e também alarmante, é o câncer de pele. Ele pode ser subdividido em dois grupos, de acordo com o tipo de célula do qual teve origem: O melanoma, originário de alterações em melanócitos, e os cânceres classificados em não-melanoma, provenientes de outros tipos celulares residentes do tecido epitelial e conjuntivo que formam a pele. Estes cânceres possuem um comportamento bastante distinto do melanoma, inclusive no que se diz respeito ao tratamento do indivíduo acometido (American Cancer Society, 2013).

O câncer de pele não-melanoma pode ser exemplificado através do carcinoma basocelular originado das células basais da epiderme, e implica no tipo de câncer de pele não-melanoma mais frequente, seguido do carcinoma de células escamosas. Outros tipos envolvem o carcinoma de células Merkel e linfomas cutâneos (Bulman, 2013).

Em específico no Brasil, são estimados para este ano cerca de 200 mil novos casos de câncer do tipo pele não-melanoma e aproximadamente 6 mil novos casos para o câncer subtipo pele melanoma (INCA, 2016).

1.2 Melanoma

O melanoma é um câncer derivado de melanócitos, células produtoras de um pigmento denominado melanina, responsável por conferir proteção a pele frente à ação de agentes nocivos, como radiação ultravioleta. O melanoma também pode receber a denominação de melanoma cutâneo ou melanoma maligno e pode surgir em qualquer região do corpo. No entanto observa-se uma prevalência maior no aparecimento deste tumor maligno em regiões como: peito e costas em homens, e na região das pernas em mulheres. A região do pescoço e na face também são sítios comuns (American Cancer Society, 2013).

O melanoma compreende a forma mais agressiva de câncer de pele e possui uma alta capacidade de metástase (propagação para além do local de origem), e quando isso ocorre, culmina em um trágico prognóstico para o paciente, com uma média de sobrevida de 6-9 meses (Tentori et al., 2013).

O melanoma acomete principalmente adultos e 50% deles aparecerem em áreas aparentemente normais da pele. Estágios precoces em névus podem ser indicativos de malignidade tais como: escurecimento, variável descoloração, coceira no local, aumento do tamanho e alteração da forma/contorno. Ulceração e sangramento indicam estadios mais tardios (National cancer institute, 2013).

Os melanomas são classificados em alguns subtipos: Melanoma de extensão superficial (60-70% de prevalência), nodular (15-30%), lentigo maligno (5-15%), acrolentiginoso (5-10%), entre outros de menor frequência (Goldstein et al., 2001).

O melanoma extensivo superficial é o tipo encontrado mais frequentemente e está relacionado à exposição solar aguda, contínua ou intermitente (Molgó et al., 2006). É

o subtipo mais comum em indivíduos de pele clara e a localização anatômica varia em função da idade. O crescimento deste tumor é lento e inicialmente se desenvolve na horizontal; em casos mais avançados, atinge o crescimento vertical (Brehmer, 2012).

O melanoma nodular é caracterizado pela presença de nódulos e por ser mais agressivo do que o melanoma extensivo superficial. Possui um crescimento vertical e quase sempre é detectado tardiamente em um estágio de tumor avançado. Também pode se desenvolver secundariamente à um melanoma extensivo superficial. Os nódulos geralmente apresentam um crescimento rápido com tendência à ulceração e sangramento e algumas vezes, podem se encontrar com ausência de pigmentação (Brehmer, 2012).

O melanoma lentigo maligno costuma ocorrer em indivíduos da terceira idade e estão presentes em áreas de crônica exposição solar à pele, como a face e/ou o dorso das mãos. O aspecto morfológico é semelhante ao melanoma extensivo superficial (Brehmer, 2012).

O melanoma acral-lentiginoso é um raro tipo de melanoma cutâneo encontrado na pele da região palmo-plantar, mas também pode estar presente no leito ungueal. É mais frequente em indivíduos de etnia negra (Brehmer, 2012).

O estágio mais grave que um melanoma pode atingir é o estado de metástase. A metástase pode ocorrer por via hematogênica, linfática ou invasão direta (Barnhill et al., 2008). As metástases são mais frequentes nos órgãos linfáticos, pele e tecido subcutâneo; menos frequentemente elas atingem órgãos viscerais. Os órgãos viscerais atingidos compreendem: Pulmões (14-20%), fígado (14-20%), cérebro (12-20%), osso (11-17%) e intestino (1-7%) (Barnhill et al., 2008).

Alguns fatores de risco para o desenvolvimento deste câncer incluem fatores intrínsecos e ambientais. O primeiro se refere ao grau de pigmentação da pele do indivíduo (tipo I-IV), mutações em genes supressores de tumores (ex: CDKN2A) e outros, que contribuem para uma predisposição genética familiar. O fator ambiental de maior relevância é a exposição à radiação ultravioleta (Brehmer, 2012). Para que seja calculado o risco de um indivíduo desenvolver esta doença é necessário que sejam levados em consideração, durante uma consulta de rotina, os fatores: Casos de melanoma na família, número de névus comuns e atípicos, presença de sardas em alta densidade, cor dos olhos, cor dos cabelos, presença de lesões de câncer de pele do tipo não-melanoma e exposição solar intermitente (Holger et al., 2010). A

exposição à radiação ultravioleta é extremamente importante no desenvolvimento da maioria dos casos de melanoma, no entanto para os melanomas do tipo nodular e acro-lentiginoso, este fator parece ter pouca correlação com o surgimento desta doença (Rastrelli et al., 2013).

Durante uma consulta médica também é possível realizar o diagnóstico clínico das lesões de melanoma baseando-se nos critérios denominados ‘ABCDE do Melanoma’ estabelecidos pela American Academy of Dermatologists, onde o primeiro critério leva em consideração a assimetria das lesões (critério A), seguido da irregularidade das bordas das mesmas (critério B), a alteração de coloração das lesões (critério C) que podem variar de tons castanhos ao preto, o diâmetro (critério D) usualmente superior à 5 milímetros e por fim, o último critério (critério E) considera a evolução das lesões ao decorrer do tempo baseando-se nas características fenotípicas descritas anteriormente (AAD, 2016). Os critérios discutidos encontram-se abaixo na figura 1.

Fig 1 – Critério de diagnóstico das lesões de melanoma (ABCDE do Melanoma). Critério clínico que considera a assimetria das lesões, a irregularidade das bordas, a alteração de coloração, o diâmetro superior à 5 milímetros e por fim, a evolução fenotípica em comparação a um névus benigno. Fonte: Adaptado de Skin Dermatologists, 2016.

Sabe-se que 10% dos melanomas tem um fator hereditário envolvido, e assim como em outros cânceres, a biologia associada a estes tumores possibilitou a compreensão da genética molecular envolvida no melanoma. Algumas mutações foram descritas, incluindo: CDKN2A, CDK4, RB1, p14ARFF, NRAS e em particular, o gene BRAF (Gore, 2013).

BRAF é uma serina-treonina quinase que se encontra frequentemente mutada em aproximadamente 60% de pacientes caucasianos portadores de melanoma, principalmente em indivíduos jovens, indicando que possivelmente não é fruto de uma exposição solar crônica (Maldonado, 2003). Confirmando o caráter multifatorial e não dependente apenas da exposição à radiação ultravioleta.

1.3 Resposta imune e terapia anti-tumoral

Em 1909 Paul Ehrlich propôs a idéia de que o sistema imune teria capacidade de controlar cânceres. Devido ao pouco conhecimento do sistema imune na época, não era possível a comprovação. 50 anos depois, Macfarlane Burnet desenvolveu a teoria da “vigilância imunológica”. O conceito da vigilância imunológica propunha que o sistema imunológico possui uma função fisiológica de reconhecer e destruir clones de células transformadas antes que as mesmas se desenvolvam em tumores, além da atuação na destruição também de tumores já se instalados. A existência deste fenômeno foi demonstrada através de estudos *in vivo* e observação de tumores em humanos, o qual apresentavam maior incidência em organismos imunodeficientes.

A resposta imune contra tumores pode ser exemplificada da seguinte forma: Quando um organismo entra em contato com uma célula tumoral (antígeno desconhecido), vários mecanismos e células operam de forma a constituir uma resposta imune. Este processo envolve 2 mecanismos, a imunidade não-específica e a imunidade específica, as quais estão estritamente relacionadas e interagem entre si. A primeira consiste na primeira linha de defesa frente às células neoplásicas, e a segunda é mediada por linfócitos T e B (Hussein, 2006).

As células efectoras da imunidade inata incluem granulócitos, macrófagos, e células NK. Destas células, os macrófagos têm uma importância crucial na imunidade inata contra tumores. Macrófagos associados a tumores (TAMs) são importantes células apresentadoras de antígenos, e a compreensão destas interações com as

células neoplásicas, possibilita o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Os macrófagos, juntamente com as células dendríticas, constituem um elo entre a imunidade inata e a adaptativa (Hussein, 2006).

As células “assassinas naturais” (NK) também exercem papéis cruciais na imunidade anti-tumoral. São células que foram descobertas há mais de 30 anos e se caracterizam por células grandes e granulares; pertencem à imunidade inata. Estas células influenciam na resposta do hospedeiro através da secreção de citocinas (ex: IFN- γ), também executam a morte de certas células infectadas ou transformadas (como uma célula neoplásica) via liberação de perforina/granzima ou morte induzida por receptores de morte (“*death receptors*”) como por exemplo: TRAIL, Fas (Caligiuri, 2013).

A imunidade inata não reconhece antígenos tumorais, mas reconhece modificações nas células causadas pela transformação, como por exemplo a falta de expressão de moléculas ou a indução de moléculas próprias indicativas de stress. As células NK são capazes de matar células transformadas devido à ausência de MHC de classe 1. O acúmulo de alterações genéticas nas células cancerígenas pode bloquear a expressão de moléculas de MHC classe 1 na superfície da célula, como um mecanismo de evasão contra o ataque por linfócitos CD8+ citotóxicos. No entanto, as células NK utilizam receptores inibitórios para diferenciar células normais próprias de células próprias com ausência de MHC. Quando reconhecem esta última, elas eliminam essas células transformadas MHC negativas (Gonzalez, 2011).

A imunidade adaptativa, representada pelos componentes celulares (linfócitos) e humorais (anticorpos), atua de forma significativa na eliminação de células tumorais, tornando-se também alvo interessante na imunoterapia. A transformação tumoral gera um vasto número de alterações genéticas, de forma que estas células neoplásicas passam a apresentar neoantígenos. Estes neoantígenos podem ser reconhecidos por células da imunidade adaptativa como linfócitos CD4+ e linfócitos CD8+, no contexto do MHC classe II e MHC classe I, respectivamente. Estes antígenos podem ser moléculas tumorais derivadas de vírus oncogênicos, oncogenes mutados, genes supressores de tumor ou outros genes mutados (Gonzalez, 2011).

A participação dos linfócitos no combate anti-tumoral já foi amplamente demonstrada ao longo dos anos, principalmente com a demonstração da população de linfócitos T infiltrantes de tumor (TIL) na erradicação de cânceres *in vivo*. Inúmeros

estudos indicam que a alta densidade desta população celular resulta em um melhor prognóstico para os pacientes portadores de câncer de cólon, mama, ovário, melanoma e outros (Kim et al., 2007). No caso do câncer de mama HER2+, a presença destes linfócitos pareceu estar relacionada com uma resposta distinta do hospedeiro ao tratamento medicamentoso de antraciclina-docetaxel, no sentido desta população linfocítica estar atuando como um adjuvante da terapia anti-tumoral (Loi et al., 2013).

Considerando-se ainda a imunidade adaptativa, o reconhecimento de neoantígenos também pode ser realizado por linfócitos B. Os linfócitos B “naive” são potentes células apresentadoras de antígenos (APC) para linfócitos T CD4+ e T CD8+ que, uma vez ativadas pelos antígenos, passam a desempenhar também papéis efetores que envolvem a produção de anticorpos e a liberação de citocinas (Spaner, Bahlo, 2011). Embora o papel destas células na patogênese e tratamento do câncer, ao longo dos anos, não recebeu tanta atenção quanto os linfócitos T, já se foi evidenciado em inúmeros casos, a presença de anticorpos específicos para neoantígenos em pacientes com tumores sólidos. Além, também, das evidências da presença de linfócitos B infiltrantes de tumor, linfócitos B reguladores (Bregs), entre outros subtipos. De acordo com alguns trabalhos, os linfócitos B infiltrantes de tumores (também denominados TIL-B) já foram localizados no micro-ambiente tumoral em fases iniciais da tumorigênese, como por exemplo em 25% dos pacientes portadores de câncer de mama. Em pacientes com câncer de mama do tipo medular, esta população celular encontrava-se em 40% no micro-ambiente tumoral e parecia estar associada com uma melhora na sobrevida do paciente (Coronella-wood, Hersh, 2003). Em um outro trabalho, a depleção de linfócitos B resultou em um aumento da massa tumoral nos pulmões de camundongos inoculados com a linhagem de melanoma B16F10 (Sorrentino et al., 2011). No entanto, alguns estudos apontaram também um papel negativo desta população celular, no sentido de promoção da tumorigênese. Os linfócitos B reguladores, subtipo de linfócitos B produtores de IL-10, já demonstraram uma participação supressora de respostas de linfócitos T CD4+ Helper do tipo 1 e 2. Além disso, a secreção de imunoglobulinas, principalmente da classe IgM, parece contribuir com uma inflamação no sítio tumoral com consequente indução do crescimento tumoral (de Visser et al., 2005). Mais recentemente, o subtipo celular denominado “*Grb-expressing Bregs*”, localizado em diversos tipos de tumores, indicou

um papel modulador das respostas imunes adaptativas celulares de maneira semelhante à células T reguladoras (Lindner et al., 2013).

Tendo em vista a forte comunicação e interação do sistema imunológico com os tumores, a busca por estratégias imunoterapêuticas começou a mostrar-se promissora no sentido do desenvolvimento de terapias a fim de interferir/modular esta relação sistema imune-câncer. A grande maioria das terapias tradicionais para o combate ao câncer quase sempre foram focadas no desenvolvimento de drogas responsáveis pela destruição de células tumorais, entretanto estas também afetavam drasticamente o funcionamento das células normais. Assim, a imunoterapia mostrava-se atraente do ponto de vista de especificidade de resposta (Abbas, 2011).

No caso do melanoma, o primeiro medicamento desenvolvido foi um agente quimioterápico, a partir daí, com a evolução do conhecimento na área de imunologia e a sua aplicação diversa, foi possível observar uma migração dos setores de pesquisa para o desenvolvimento de ferramentas imunológicas, conforme é exemplificado nos próximos parágrafos.

O primeiro agente quimioterápico usado para o tratamento do melanoma foi o composto denominado Dacarbazina, aprovado há mais de 30 anos. Esta droga ainda é considerada como medicamento referência apesar de gerar respostas completas em menos de 5% dos casos e em curta duração (Tentori et al., 2013). Além disso, este medicamento é ineficaz contra metástase cerebral (incapacidade de ultrapassar a barreira hemato-encefálica), desfecho que ocorre em 2/3 dos pacientes acometidos. Esta metástase implica em um prognóstico muito ruim para o paciente, tendo em vista que é estimado uma sobrevida de 4 meses após o diagnóstico (Fonken, 2012).

Em relação às ferramentas imunológicas, no caso do melanoma metastático, 2 estratégias são atualmente utilizadas. Uma delas é focada na imunoterapia e a outra baseia-se no uso de “*target drugs*” (Robert, 2013), o último engloba inibidores que atuam diretamente em uma célula ou proteína alvo, como o medicamento Vemurafenib e Selumetinib. O primeiro atua inibindo diretamente a proteína BRAF e o segundo, a proteína MEK (Robert, 2013). Ambas as proteínas estão envolvidas nas vias MAP-quinase e são ativadas frequentemente em pacientes com melanoma em decorrência de mutações nos genes BRAF, MEK, NRAS e KIT, em respectivamente, 50%, 15%, 8% e 3% dos casos (Hodis, 2012).

O uso de anticorpos monoclonais no tratamento do melanoma, incluindo medicamentos cujo alvo são ligantes inibitórios para modulação da resposta imune, se mostra bastante promissor. Citamos como exemplo os medicamentos: Ipilimumab e tremelimumab, os quais são constituídos por anticorpos monoclonais IgG1 e IgG2, respectivamente. Seus mecanismos farmacológicos implicam no bloqueio do ligante CTLA-4 em linfócitos T citotóxicos culminando em uma ativação e proliferação destas células (Inman et al., 2007). Outros anticorpos monoclonais com ação imunoregulatória recentemente desenvolvidos compreendem: Anticorpos anti-PD1, anticorpos anti-CD25, entre outros (Eggermont, 2011).

Outra substância, o Peg Interferon- α 2, têm se mostrado um potente imunomodulador com atividade anti-tumoral em pacientes portadores de melanoma. Em nível molecular, o IFN α apresenta múltiplos efeitos na tumorigênese e no desenvolvimento de malignidade, enfatizando suas ações anti-angiogênicas, imunoregulatórias, antiproliferativas, além de efeitos pró-apoptóticos (Tarhini, 2012).

1.4 Modelos animais para estudo do câncer

Ao longo dos anos, inúmeros modelos animais já foram descritos para auxiliar nos estudos de tumorigênese. De acordo com os pesquisadores Linan HA e cols, um modelo experimental ideal para estudo de tumorigênese consiste em reproduzir de forma mais próxima da realidade possível o que ocorre no humano, particularmente no que diz respeito à etiologia da doença, a base genética molecular e a arquitetura histopatológica (Linan et al., 2005).

Para a compreensão das interações entre o sistema imune e as diversas formas de tumor, o uso de modelos de transplantes de células tumorais, bem como modelos de tumores induzidos por carcinógenos são utilizados com frequência para este propósito. Alguns estudos utilizando modelos de animais geneticamente modificados (GEEMs) os quais desenvolvem tumores espontâneos decorrentes de mutações somáticas ou germinativas, têm emergido nos últimos anos (Coffelt, Visser, 2015). Similarmente, modelos xenográficos de tumor humano também são descritos com frequência na literatura. Neste modelo, as células provenientes de tumores humanos são transplantados abaixo da pele ou no órgão no qual o tumor foi originado,

em animais imunodeprimidos visando evitar reações de rejeição do enxerto tumoral (Richmond, Su, 2008).

No entanto, a escolha de um tipo de modelo experimental específico é realizada de acordo com os mecanismos a serem elucidados e a abordagem que será empregada para que esta finalidade seja atingida, enfatizando que todos os modelos apresentam vantagens e desvantagens (Coffelt, Visser, 2015).

Ou seja, no caso de modelos que envolvem o transplante de linhagens tumorais podemos citar algumas vantagens tais como: Crescimento tumoral rápido (0-4 semanas), alta flexibilidade na manipulação do modelo, controle do tempo de iniciação do tumor, entre outros. No entanto apresentam limitações como: proporção de células que morrem durante o processo de inoculação, os tumores não são formados a partir de células normais, etc. Os modelos de tumor por indução de carcinógenos possuem a grande vantagem de representarem as alterações genéticas que ocorrem no organismo humano no desenvolvimento humano. Entretanto os mesmos apresentam variáveis graus de penetrância do carcinógeno, o controle do início do desenvolvimento dos tumores não é exatamente preciso, entre outras características. No caso dos modelos utilizando GEEMs, estes apresentam vantagens por serem provenientes também de células normais e apresentarem alta similaridade histopatológica dos tumores humanos, mas a tumorigênese promovida nestes modelos em média progride lentamente variando em torno de 2-24 meses. Em relação aos modelos xenográficos de tumor, embora eles constituam a melhor representação de tumores humanos do ponto de vista genético e de resposta à drogas, esses modelos são inviáveis para estudos que envolvam a participação do sistema imune adaptativo na progressão do câncer e resposta anti-tumoral (Coffelt, Visser, 2015).

A maioria dos modelos desenvolvidos em que se deseja estudar a participação do sistema imune na resposta anti-tumoral, utiliza biomarcadores específicos que possibilitam o monitoramento adequado da resposta, de tal forma que estes biomarcadores estariam atuando como neo-antígenos conhecidos. Um biomarcador amplamente utilizado, em diferentes abordagens, compreende a proteína ovalbumina (OVA), empregada em diversas apresentações (forma secretória, citosólica, membranas, associada ao complexo MHC, entre outros). A ovalbumina é uma glicoproteína encontrada de forma abundante no ovo da espécie *Gallus gallus* e, além da aplicação como biomarcador, já foi descrita também como sendo imunogênica. Há

décadas o emprego da mesma vêm sido demonstrado. Hariharan (1995), em seu trabalho, desenvolveu uma linhagem tumoral recombinante com ovalbumina para avaliar a contribuição da imunização prévia na resposta do hospedeiro frente ao desafio tumoral. Para isso, ele imunizou animais previamente com OVA associada à alúmen de potássio hidratado, e em seguida, inoculou suas linhagens recombinantes. Com isso, ele evidenciou uma inibição significativa do crescimento tumoral nos animais que foram imunizados. Associado à isto, ele também observou que a depleção de linfócitos TCD8+ e TCD4+ *in vivo* prejudicava a capacidade protetora da imunização (Hariharan et al., 1995).

Zeelenberg (2008), em uma abordagem distinta, avaliou o potencial imunogênico da OVA quando a mesma encontrava-se associada à vesículas (exossomos) em comparação com a forma solúvel. Desta forma, foi evidenciado no trabalho que as linhagens tumorais de fibrosarcoma murino contendo a OVA em associação à vesículas, eram capazes de retardar o crescimento tumoral em camundongos selvagens, mas não em imunodeficientes. Enfatizando assim, a necessidade da participação do sistema imune na indução de uma resposta anti-tumoral específica (Zeelenberg et al., 2008).

Mais recentemente, pesquisadores desenvolveram linhagens tumorais de carcinoma tímico expressantes de OVA em associação com flagelina (um potente ativador de "*Toll-like receptors*"). Em seus experimentos, eles evidenciaram uma melhora do perfil de resposta anti-tumoral em hospedeiros inoculados com estas linhagens, com a ativação da imunidade inata e também, expansão clonal de linfócitos T CD8+ e TCD4+ anti-OVA (Garaude et al., 2012).

Levando-se em consideração todos os trabalhos descritos anteriormente, é possível observarmos uma vasta aplicação da ovalbumina como um excelente candidato para o monitoramento de respostas específicas. No entanto, também existe uma contínua necessidade do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e novos modelos experimentais, uma vez que todos os modelos já descritos na literatura apresentam suas limitações individuais. Sendo assim, o foco deste projeto consiste na criação de um modelo experimental alternativo, que permita o estudo da imunobiologia do melanoma, bem como a avaliação da interação das células do sistema imune com o mesmo, através da utilização de um biomarcador específico, buscando minimizar o máximo possível estas limitações.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo deste projeto consistiu em desenvolver um modelo murino de melanoma, a fim de possibilitar o estudo das interações entre o sistema imune do hospedeiro e o tumor, a partir da presença de um antígeno conhecido (ovalbumina), cuja função seria auxiliar no monitoramento da resposta anti-tumoral.

2.2 Metas específicas

- Clonagem do gene da ovalbumina, em sua forma associada à membrana (mOVA) ou citoplasmática (cOVA), no vetor pMSCV IRES Luciferase.
- Produção de partículas retrovirais recombinantes a partir dos vetores pMSCV IRES Luc, pMSCV IRES Luc.cOVA e pMSCV IRES Luc.mOVA.
- Transdução *in vitro* de células tumorais de melanoma Tm1 com as partículas retrovirais recombinantes e caracterização *in vitro* e *in vivo* das linhagens estáveis estabelecidas.
- Inoculação das linhagens recombinantes em camundongos selvagens e imunodeficientes para acompanhamento do comportamento e crescimento dos tumores.
- Avaliação da resposta imune adaptativa *in vivo* mediante estratégias de imunizações prévias com ovalbumina seguido do desafio tumoral
- Avaliação da resposta imune adaptativa *in vivo* mediante inoculação de altas quantidades de células tumorais viáveis e não-viáveis

3 METODOLOGIA

3.1 Aspectos Gerais

Para a realização do estudo, as etapas experimentais tais como: purificação do produto dispondo de kit de extração de gel, Midi-preparação plasmidial e outros, foram seguidos de acordo com os protocolos emitidos pelos fabricantes (Invitrogen, Qiagen e outros). O projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEP/ICB) e aprovado (protocolo nº 001 nas fls. 15 do livro 03). Os camundongos utilizados neste projeto foram fornecidos pelo Biotério de camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo, sob condições SFP (*Specific-pathogen free*).

3.2 Construção das linhagens recombinantes

3.2.1 *Aquisição dos plasmídeos pCI-neo-mOVA, pCI-neo-cOVA, pMSCV IRES Luciferase*

Para a clonagem do gene da ovalbumina membranária foi utilizado o plasmídeo pCI-neo-mOVA (#25099), e para a ovalbumina citoplasmática partimos do plasmídeo pCI-neo-cOVA (#25097). Ambos foram adquiridos através do site <http://www.addgene.org> e foram enviados ao laboratório de Biologia Celular e Molecular, Departamento de Imunologia ICB-USP, na apresentação de bactérias transformadas semeadas em meio de cultura sólido. Os plasmídeos pCI-neo-cOVA e pCI-neo-mOVA (mapas plasmidiais demonstrados nas figuras 3 e 4, respectivamente) são altamente semelhantes, diferindo apenas na região que compreende o gene da ovalbumina, ou seja, o fragmento mOVA possui 321 nucleotídeos a mais do que o fragmento cOVA. Esta região que compreende os 321 nucleotídeos é responsável por codificar uma proteína denominada “receptor da transferrina murina”, necessária para promover o acoplamento da ovalbumina à superfície da célula. Ao contrário da ovalbumina membranar (mOVA), o fragmento cOVA codifica uma ovalbumina que encontra-se dispersa no citosol da célula (cOVA). As sequências gênicas podem ser encontradas na figura 5.

O vetor pMSCV IRES Luciferase foi gentilmente fornecido pelo Dr. Scott W. Lowe, do “Memorial Sloan Kettering Cancer Center” – NY, USA, na apresentação de plasmídeo purificado. Este vetor foi construído a partir do plasmídeo pMSCV IRES GFP, cuja a finalidade desta construção é servir de ferramenta para a clonagem e produção de partículas retrovirais, uma vez que o “backbone” plasmidial foi construído com genes chaves para a confecção de um retrovírus recombinante, o qual será discutido com mais detalhes a diante. Além disso, o vetor pMSCV IRES Luciferase, contém o gene IRES que possibilita a construção de vetores bicistrônicos o qual resultam na expressão simultânea de dois genes de interesse. Neste caso, a finalidade do uso deste vetor consistiu em construir linhagens que expressem a enzima luciferase *firefly* (gene situado logo após a sequência IRES) e também expressem concomitantemente uma das formas da proteína ovalbumina (forma citosólica ou forma membranar). Como este plasmídeo vetor já contém o gene luciferase, precisávamos apenas proceder inserindo os fragmentos de ovalbumina (mOVA ou cOVA) na região que antecede o gene IRES.

As bactérias contendo os plasmídeos pCI-neo-mOVA e pCI-neo-cOVA foram então dispostas em placas de petri estéreis contendo meio de cultura LB ágar acrescido de 100 µg/mL de ampicilina (gene de resistência bacteriana dos 2 plasmídeos) e mantidas em estufa à 37 °C. Após 24 horas, foi selecionada uma colônia isolada de cada placa para a realização do pré-inóculo, cuja finalidade é de amplificação plasmidial. Para a confecção do mesmo, utilizamos uma ponteira estéril para isolamento da colônia e crescemos a mesma em 4 mL de meio LB líquido + 100 µg/mL de ampicilina, por aproximadamente 18 horas no equipamento Unimax 1010 Shaker com incubadora (Heidolph, catálogo: 36130520) à 37 °C, 300 rpm. Os 3 mapas plasmidiais encontram-se na figura a seguir.

Fig 2 – Plasmídeo pMSCV IRES Luciferase. Mapa plasmidial do vetor pMSCV IRES Luciferase (7380 pb) indicando a localização de determinados genes bem como os sítios de restrição de inúmeras enzimas.

Fig 3 – Plasmídeo pCI-neo-cOVA. Mapa do plasmídeo pCI-neo-cOVA (6261 pb) indicando a localização de determinados genes bem como os sítios de restrição de inúmeras enzimas. O fragmento em cor azul representa a sequência nucleotídica do fragmento cOVA (789 pb) responsável por codificar a proteína ovalbumina em sua forma citosólica. Esta região pode ser clivada por diferentes enzimas de restrição indicadas acima.

Fig 4 – Plasmídeo pCI-neo-mOVA. Mapa do plasmídeo pCI-neo-mOVA (6582 pb) indicando a localização de determinados genes bem como os sítios de restrição de inúmeras enzimas. O fragmento em cor azul representa a sequência nucleotídica do fragmento mOVA (1110 pb) responsável por codificar a proteína ovalbumina em sua forma membranar. Esta região pode ser clivada por diferentes enzimas de restrição indicadas acima.

Sequencia do fragmento mOVA:

```
ATGATGGATCAAGCCAGATCAGCATTCTCTAACTTGTTGGTGGGGAAC
CATTGTCATACACCCGGTTAGCCTTGCTCGGCAAGTAGATGGAGATAAC
AGTCATGTGGAGATGAACTGGCTGCAGATGAAGAAGAAAATGCCGACAA
TAACATGAAGGCTAGTGTGAGAAAACCAAGAGGTTTAAATGGAAGACTCT
GCTTTGCAGCTATTGCACTAGTCATTCTTTCTTGATTGGATTCTAGT
GGCTACCTGGGCTATTGTAAGCGTGTAGAACAAAAAGAGAGTGTGTGAA
ACTGGCTGAAACGGAGGAGACAGACAAGTCAGAAACCATGGAACAGAGG
ATGTTGCTGCAGATCAAGCCAGAAGCTCATCAATTCTGGGTAGAAAAGT
CAGACAAATGGAATTATCAGAAATGTCTTCAGCCAAGCTCCGTGGATTTC
TCAAACATGCAATGGTTCTGGTTAATGCCATTGTCTTCAAAGGACTGTGGG
AGAAAACATTTAAGGATGAAGACACAAAGCAATGCCTTTCAGAGTGA
GAGCAAGAAAGCAAACTGTGCAGATGATGTACCAGATTGGTTTATTAG
AGTGGCATCAATGGCTTCTGAGAAAATGAAGATCCTGGAGCTTCCATTGT
CCAGTGGGACAAATGAGCATGTTGGTGTGTTGGCTGATGAAGTCTCAGGC
CTTGAGCAGCTTGAGAGTATAATCAACTTTGAAAACTGACTGAATGGAC
CAGTTCTAATGTTATGGAAGAGAGGAAGATCAAGTGTACTTACCTCGCA
TGAAGATGGAGGAAAAATACAACCTCACATCTGTCTTAATGGCTATGGGC
ATTACTGACGTGTTTGAAGCTTTCAGCCAATCTGTCTGGCATCTCCTCAGC
ATGAGAGCCTGAAGATATCTCAAGCTGTCCATGCAGCACATGCAGAAATCA
ATGAAGCAGGCGAGAGAGTGGTAGGGTCAGCAGAGGCTGGAGTGGATGCT
GCAAGCGTCTCTGAAGAAATTTAGGGCTGACCATCCATCTCTCTGTAT
CAAGCACATCGCAACCAACGCCGTTCTCTTCTTGGCAGATGTGTTTCCC
CTTAA
```

Sequencia do fragmento cOVA:

```
ATGGGCTCCATCGGCGCAGCAAGCATGGAATTTGTTTGTGATTATCA
AGGAGCTCATCAATTCTGGGTAGAAAAGTCAGACAAATGGAATTATCAGA
AATGTCCTTCAGCCAAGCTCCGTGGATTCTCAAACATGCAATGGTTCTGGT
TAATGCCATTGTCTTCAAAGGACTGTGGGAGAAAACATTTAAGGATGAAG
ACACACAAGCAATGCCTTTCAGAGTGAAGTGAAGCAAGAAAGCAAACTGTG
CAGATGATGTACCAGATTGGTTTATTAGAGTGGCATCAATGGCTTCTGA
GAAATGAAGATCCTGGAGCTTCCATTTGCCAGTGGGACAATGAGCATGT
TGTTGCTGTTGCCTGATGAAGTCTCAGGCCTTGAGCAGCTTGAGAGTATA
ATCAACTTTGAAAACTGACTGAATGGACAGTCTTAAATGTTATGGAAGA
GAGGAAGATCAAAGTGTACTTACCTCGCATGAAGATGGAGGAAAAATACA
ACCTCACATCTGTCTTAATGGCTATGGGCTTACTGACGTGTTTAGCTCT
TCAGCCAATCTGTCTGGCATCTCCTCAGCAGAGAGCTGAAATATCTCA
AGCTGTCCATGCAGCACATGCAGAAATCAATGAAGCAGGCGAGAGAGTGG
TAGGGTCAGCAGAGGCTGGAGTGGATGCTGCAAGCGTCTCTGAAGAAATTT
AGGGCTGACCATCCATTCCTCTTCTGTATCAAGCACATCGCAACCAACGC
CGTCTCTCTTCTTGGCAGATGTGTTTCCCCTTAA
```

Receptor da transferrina murina

Ovalbumina

Fig 5 – Sequências gênicas dos fragmentos de ovalbumina. Representação das sequências genéticas dos fragmentos mOVA e cOVA, que codificam as proteínas ovalbumina na forma membranar e ovalbumina na forma citosólica, respectivamente. Fragmento mOVA: 1.110 pb e fragmento cOVA: 789 pb.

3.2.2 Mini-preparação Plasmidial

Passado o período de crescimento bacteriano, procedemos com as etapas de Mini-preparação Plasmidial a fim de extrairmos os plasmídeos contidos nas bactérias transformadas. Para tal, transferimos 1,5 mL da suspensão bacteriana para um tubo Eppendorf e centrifugamos o tubo à 12000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 200 µl de solução de ressuspensão I (50 mM Tris-HCl, pH=8.0; 10 mM EDTA, 100 µg/RNase A), seguido de uma etapa de homogeneização com auxílio do vórtex. A seguir, 200 µl da solução II (200 mM NaOH, 1% de SDS) para promoção da lise nas bactérias, foram adicionados diretamente no eppendorf ressuspensionado. Homogeneizou-se a amostra por inversões no tubo, seguido de uma incubação à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 200 µl da solução neutralizante III (NaAc 3M, pH=4.8) à amostra, juntamente com uma adequada homogeneização. Ressalta-se que a amostra deve ser homogeneizada 8 vezes por inversão e posteriormente incubada por 15 minutos em banho de gelo. Após esta etapa, procedemos com uma centrifugação de 15 minutos à 12000 rpm, de forma a se obter um sobrenadante. Feito isto, as próximas etapas compreendem a precipitação do DNA plasmidial, no qual transferimos cuidadosamente o sobrenadante para um novo tubo contendo 300 µl de isopropanol gelado; incubamos 10 minutos à temperatura ambiente, e seguimos com uma centrifugação de 10 minutos à 14000 rpm. Após a centrifugação, drenamos o excesso de sobrenadante com auxílio de um papel absorvente. Então, o DNA presente no precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado e homogeneizado por inversão, seguido de uma incubação de 5 minutos à temperatura ambiente. Passado o tempo, centrifugamos uma última vez à 14000 rpm por 5 minutos. Drenamos o excesso do sobrenadante com papel absorvente. Por fim, secamos o pellet contendo o DNA plasmidial purificado com auxílio do equipamento Thermomixer Comfort (Eppendorf) à 50 °C por aproximadamente 15 minutos. Quando completamente seco, o precipitado foi ressuspensionado em 20 µl do Buffer TE 1 X estéril e armazenado em freezer -20 °C.

3.2.3 Confirmação da integridade e concentração do DNA extraído

Após a realização do protocolo acima descrito, procedemos com as medições das concentrações dos DNA plasmidiais extraídos (pCI-neo-mOVA e pCI-neo-cOVA) e do vetor pMSCV IRES Luciferase, analisando suas absorbâncias no comprimento de onda de interesse (dsDNA, ssDNA, RNA e nucleotídeos simples absorvem em 260 nm), além da avaliação dos parâmetros de pureza dos materiais, descritos a seguir. Para tal, utilizamos o equipamento Espectrofotômetro Nanodrop 2000 (ThermoScientific) para realizarmos a medição de uma alíquota de 1ul de amostra. Assim, selecionamos a opção “ácido nucléico” no software (Nanodrop 2000/2000c) e calibramos o equipamento com 1 ul de Buffer TE 1 X estéril (leitura do branco) antes de proceder com a aplicação da amostra. Os gráficos fornecidos foram avaliados quanto à ocorrência de um pico em 260 nm, concentração ng/ul do material, razões 260/280 e razões 260/230. Ressalta-se que o valor obtido com a razão 260/280 diz respeito à pureza do material (DNA ou RNA). Para amostras de DNA, o valor da razão é aproximadamente 1.8 é geralmente aceito como altamente puro. A razão 260/230 é considerada como uma medida secundária de pureza de ácidos nucléicos. Valores que indicam pureza do material mostram-se mais altos do que os informados pela razão 260/280, situando-se em torno de 2.0-2.2 (T042-Technical Bulletin, Nanodrop Spectrophotometers). Além da análise descrita acima, também procedemos com a realização de uma corrida eletroforética em gel de agarose 1% diluído em tampão TAE 1X à 90V/cm por 1 hora e 30 minutos, visando a avaliação da integridade dos plasmídeos (ocorrência ou não de degradações) e confirmação de seus respectivos pesos moleculares (pCI-neo-mOVA: 6582 pb, pCI-neo-cOVA: 6261 pb e pMSVC IRES Luciferase: 7380 pb). Aplicamos então 1 ug das 3 amostras, homogeneizado em 1ul do corante 6 X Loading Dye Solution e 4 ul de água mili-Q. Utilizamos como marcador de peso molecular, o Ladder 1 Kb Plus (Invitrogen). A revelação do gel foi realizada com auxílio de uma etapa de incubação do gel, ao término da corrida eletroforética, em uma solução de brometo de etídeo diluído em água mili-Q (1:10.000) por 15 minutos. Passado o tempo, observamos as bandas coradas com o brometo de etídeo através da utilização do equipamento: “Eletronic U.V. Transilluminator” (Ultra Lum) com emissão de luz ultra-violeta.

3.2.4 Midi-preparação plasmidial

Após a execução dos ensaios descritos anteriormente, partimos para a realização de uma extração de DNA plasmidial em uma escala superior à Mini-preparação Plasmidial, seguindo-se todas as etapas descritas no Kit: The PureLink™ HiPure Plasmid DNA Midiprep Kit (Invitrogen). Ao final do protocolo, os plasmídeos foram ressuspensos em 200 µl de Buffer TE 1 X e, em seguida, submetidos à análise por espectrofotometria (Nanodrop 2000, ThermoScientific).

3.2.5 Análise de mapas e sequências

A seguir, dispondo dos 3 mapas plasmidiais, avaliamos suas sequências genéticas e possíveis sítios de restrição com auxílio das ferramentas gratuitas online “Blast” e “NEBcutter V2.0” e do Software gratuito “Serial Cloner 2.6.1”. Utilizando estes dispositivos, optamos pela utilização da enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen, catálogo: 2707053) para a remoção dos fragmentos mOVA (110 pb), cOVA (789 pb) e para a clivagem em um único ponto (linearização) do plasmídeo vetor pMSCV IRES Luciferase, resultando na formação de extremidades coesivas nas sequências nucleotídicas. Ressalta-se que a enzima *EcoRI* no plasmídeo pCI-neo-mOVA realiza dois cortes nas regiões de 1096 pb e 2206 pb; e a localização do fragmento mOVA situa-se entre 1102-2205 pb. No plasmídeo pCI-neo-cOVA a mesma enzima realiza dois cortes nas regiões 1096 pb e 1885 pb; e o fragmento cOVA localiza-se em 1102-1884 pb. Em relação ao vetor pMSCV IRES Luciferase, a enzima de restrição *EcoRI* cliva o plasmídeo na região de 1428 pb, localizada na porção anterior ao gene da Luciferase *Firefly*. As análises das sequências e dos mapas plasmidiais foram realizadas para procedermos com os experimentos de clonagem molecular, o qual visam a construção de novos plasmídeos recombinantes envolvendo o vetor pMSCV IRES Luciferase e um fragmento de ovalbumina (mOVA ou cOVA) como inserto. Desta forma, teríamos 2 construções distintas expressando 2 genes de interesse, o “gene reporter”, luciferase *firefly*, e o gene da mOVA ou cOVA. Também utilizamos o vetor vazio (pMSCV IRES Luciferase) isento de inserto, para fins comparativos.

3.2.6 Reação de digestão dos fragmentos de Ovalbumina membranária (mOVA)/ Ovalbumina citoplasmática (cOVA) e do vetor pMSCV IRES Luciferase

Após as análises descritas anteriormente, realizamos a reação de digestão com *EcoRI* de cada um dos 3 plasmídeos. Para isso, usamos 2 ug de cada amostra de DNA para reagir com 1 ul da enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen, catálogo: 2707053), na presença de 5 ul do Buffer Reactive 3 (Invitrogen) e completando para 50 ul com água mili-Q autoclavada. A solução de reação foi então submetida aos tratamentos com auxílio de um termociclador (Thermal Cycler, Thermo): 37 °C por 2 horas (período de clivagem do material por ação enzimática), seguido das etapas de inativação: 65 °C por 20 minutos e 4 °C por 10 minutos. Ao término deste experimento, o vetor pMSCV IRES Luciferase linearizado foi submetido ao tratamento enzimático com CIP (Fosfatase Alcalina Calf Intestinal – NEB, catálogo: 290S) por 1 hora à 37 °C, no intuito de promover a desfosforilação das extremidades recém clivadas, impedindo que as mesmas se liguem entre si e fechem o vetor. As 3 amostras foram então armazenadas em freezer -20 °C. No outro dia, realizamos uma corrida eletroforética em gel de agarose, seguindo as mesmas condições anteriormente descritas, para confirmação da digestão dos 3 plasmídeos e seus respectivos fragmentos.

3.2.7 Extração e purificação dos fragmentos e do vetor linearizado

Seguidamente, repetimos a corrida eletroforética utilizando-se desta vez a agarose ultra-pura L.M.P. (*Low-melting-point*) (Gibco, catálogo: 15517-022) 1%, necessária para a realização dos ensaios de extração e purificação das bandas. Também aplicamos no gel uma quantidade superior das amostras digeridas (30 ul de cada reação solubilizada em 6 ul do corante 6 X Loading Dye Solution, de forma a obtermos uma maior concentração dos materiais extraídos e consequentemente, um melhor rendimento. Ao final da corrida, procedemos com a mesma metodologia de revelação do gel. Os fragmentos de interesse (mOVA e cOVA) e o vetor linearizado foram cortados com auxílio de um bisturi. Cada fragmento foi devidamente pesado em balança analítica e seu respectivo peso anotado, a fim de executarmos as próximas

etapas. Para tal, utilizamos o kit “QIAquick Gel Extraction Kit Protocol” (Qiagen). Ressalta-se que seguimos todas as etapas descritas no manual do fabricante, adaptando apenas o item de nº 10 (etapa de lavagem do material na coluna): Adaptamos o protocolo para 5 aplicações de 750 µl de Buffer PE cada. Após a adição do Buffer, a coluna contendo o material era disposta por 5 minutos à temperatura ambiente. Passado este tempo, centrifugamos a coluna à temperatura ambiente por 1 minuto a 17.900 g. A adaptação do protocolo compreende um acréscimo no número de lavagens do material aderido na coluna, e é justificada uma vez que o protocolo do fabricante sugere apenas 1 lavagem e, ao final da eluição era possível notarmos, através de leituras no espectrofotômetro, um altíssimo grau de contaminação de nossa amostra por sais. Conforme mencionado anteriormente, realizamos medições no equipamento Espectrofotômetro Nanodrop 2000 (ThermoScientific) para avaliação da concentração dos fragmentos extraídos e seus respectivos graus de pureza.

3.2.8 Reação de ligação inserto + vetor

Baseando-se nos valores de concentração de DNA de cada uma das amostras, juntamente com os cálculos demonstrados no quadro abaixo, procedemos com a ligação do vetor pMSCV IRES Luciferase com o seu respectivo inserto (mOVA/cOVA).

Vetor pMSCV IRES Luciferase = 7380 pb
 Fragmento cOVA = 789 pb ($\cong$ 10 x menor que o vetor)
 Fragmento mOVA = 1110 pb ($\cong$ 7 x menor que o vetor)

Reação de ligação: Usa-se **100 ng** do vetor na proporção 1:3
 mOVA 100 ng $\div$ 7 = 14 ng x 3 (proporção 1:3) = **50 ng**
 cOVA 100 ng $\div$ 10 = 10 ng x 3 (proporção 1:3) = **30 ng**

Fig 6 – Cálculos para a ligação do plasmídeo recombinante. Cálculos para determinação da quantidade a ser utilizada de cada inserto e vetor, baseando-se no tamanho de cada fragmento.

Os cálculos demonstrados no quadro (figura 6) auxiliam na obtenção das massas aproximadas (ng) do vetor e dos insertos que serão utilizadas no ensaio de ligação e confecção dos plasmídeos recombinantes. As medições no Espectrofotômetro realizadas anteriormente são necessárias para sabermos o volume (ul) necessário de cada amostra contendo as massas calculadas. Feito isso, preparamos dois tubos micro-ependorfs com os seguintes componentes: um dos tubos continha os volumes calculados do inserto mOVA e do vetor pMSCV IRES Luciferase, juntamente com 1 ul da enzima T4 DNA Ligase (NEB, catálogo: M0202S), 2 ul do T4 DNA Ligase Reaction Buffer (NEB) e água mili-Q autoclavada qsp 20 ul. O outro tubo continha os mesmos volumes do vetor, da enzima e seu respectivo buffer, diferindo nos volumes calculados para o inserto cOVA e para a água mili-Q autoclavada qsp 20 ul. Ambos os tubos com a reação foram dispostos no equipamento Termociclador (Thermal Cycler, Thermo) e deixados *overnight* à 16 °C.

3.2.9 Transformação bacteriana dos plasmídeos recombinantes: Heat-shock Method

Para verificarmos a eficiência do processo de ligação dos fragmentos, utilizamos a abordagem de transformação bacteriana, o qual implica na incorporação dos plasmídeos recombinantes utilizando bactérias termo-competentes da linhagem DH5 α . Este ensaio visa dois objetivos primordiais. O primeiro deles compreende a verificação do fechamento dos plasmídeos pela enzima T4 DNA ligase, de tal forma que caso o plasmídeo não sofra a ligação adequadamente e por sua vez não promova

o fechamento, a informação contida no plasmídeo não é adquirida pela bactéria, principalmente no que diz respeito ao gene de seleção ao antibiótico ampicilina contido no plasmídeo. Desta forma, a bactéria não transformada acaba morrendo no meio de cultura contendo este antibiótico. Assim, a transformação das bactérias com os plasmídeos que carregam o gene de resistência à antibióticos é definida pelo aparecimento de clones isolados na placa (Hanahan et al., 1983), o que nos leva ao segundo objetivo do ensaio: Obtenção de clones. Para atingir nossos objetivos, pegamos 10 ul da reação de ligação e adicionamos em 100 ul de bactérias DH5 α recém-descongeladas. O mesmo protocolo foi realizado para os dois plasmídeos recombinantes (pMSCV IRES Luc.mOVA e pMSCV IRES Luc.cOVA). Após a adição, deixamos as amostras no gelo por 30 minutos. Passado este tempo submetemos as amostras ao “choque térmico” (*Heat-shock*) por 45 segundos à 42 °C seguido de uma rápida incubação em gelo por 2 minutos. Depois adicionamos 1 ml de meio de cultura líquido LB e homogeneizamos as amostras por inversão. Incubamos as mesmas por 45 minutos à 37 °C, 300 rpm no equipamento Unimax 1010 Shaker com incubadora (Heidolph, catálogo: 36130520). Ao término desta etapa, centrifugamos os tubos à 6000 g por 5 minutos e ressuspendemos o pellet formado com 100 ul de meio de cultura LB líquido e plaqueamos em placas de petri contendo meio LB ágar solidificado acrescido de 100 μ g/mL de ampicilina, e deixamos as placas *overnight* em estufa à 37 °C. Ressalta-se que utilizamos o vetor vazio pMSCV IRES Luciferase, que também contém o gene de resistência à ampicilina, como controle positivo deste ensaio, a fim de também avaliarmos a capacidade transformante das bactérias empregadas.

3.2.10 Isolamento dos clones e ensaio de restrição

No dia seguinte à realização do procedimento descrito anteriormente, retiramos as placas da estufa e selecionamos 10 clones de cada placa para procedermos com a execução do pré-inóculo e realização da mini-preparação plasmidial de cada clone seguido da análise de cada material extraído com o Espectrofotômetro Nanodrop 2000 (ThermoScientific). Para certificação de que o inserto estava inserido no vetor e, na posição correta, realizamos ensaios com diferentes enzimas de restrição que realizam

cortes em diferentes regiões dos plasmídeos recombinantes bem como no vetor pMSCV IRES Luciferase, visando à análise do tamanho dos fragmentos liberados, conforme esquematizado a seguir:

Fig 7 – Esquematização do plasmídeo pMSCV IRES Luc.mOVA sob ação da enzima NcoI. Representação dos sítios de restrição da enzima NcoI no plasmídeo pMSCV IRES Luc.mOVA e seus respectivos fragmentos gerados, além da indicação do posicionamento do inserto mOVA (início e final). A condição demonstrada pela letra “**A**” indica o fragmento mOVA clonado corretamente no vetor, resultando nos fragmentos: 1351 pb e 7133 pb, após a digestão com a enzima NcoI. A condição demonstrada pela letra “**B**” indica o fragmento mOVA clonado ao contrário e incorretamente no vetor, resultando nos fragmentos: 917 pb e 7567 pb, após a digestão com a enzima NcoI.

Fig 8 – Esquematização do plasmídeo pMSCV IRES Luc.cOVA sob ação da enzima EcoRV. Representação dos sítios de restrição da enzima EcoRV no plasmídeo pMSCV IRES Luc.cOVA e seus respectivos fragmentos gerados, além da indicação do posicionamento do inserto cOVA (início e final). A condição demonstrada pela letra “**A**” indica o fragmento cOVA clonado corretamente no vetor, resultando nos fragmentos: 253 pb, 1.881 pb, 2.644 pb e 3.385 pb, após a digestão com a enzima EcoRV. A condição demonstrada pela letra “**B**” indica o fragmento cOVA clonado ao contrário e incorretamente no vetor, resultando nos fragmentos: 253 pb, 1.478 pb, 3.047 pb e 3.385 pb, após a digestão com a enzima EcoRV.

As digestões foram analisadas realizando-se uma corrida eletroforética em gel de agarose 1%, e os clones que melhor correspondiam com os fragmentos esperados foram submetidos ao sequenciamento descrito a seguir.

3.2.11 Sequenciamento das amostras

Após a análise da corrida eletroforética, selecionamos 1 clone pMSCV IRES Luc.mOVA e 1 clone pMSCV IRES Luc.cOVA para realizar o sequenciamento do DNA. Para isso, escolhemos o primer seguinte: (CCCTTGAACCTCCTCGTTCGACC) o qual liga-se à região de 1330 pb dos plasmídeos (região próxima ao início da sequência dos insertos) e procedemos com o uso do kit comercial: “BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems) e do equipamento 3100 Avant Genetic Analyzer. Após os clones demonstrarem a presença do inserto na posição correta, através das análises dos gráficos obtidos no sequenciamento, os mesmos foram submetidos à transformação bacteriana novamente, a fim de amplificarmos os plasmídeos. Posteriormente realizamos uma midi-preparação plasmidial destas amostras e uma corrida eletroforética em gel de agarose 1% para uma maior confirmação da presença do inserto nos plasmídeos, em comparação com o controle (vetor vazio pMSCV IRES Luciferase).

3.2.12 Transfecção e produção das partículas retrovirais

Após as etapas descritas anteriormente, prosseguimos para a síntese das partículas retrovirais. Para isso, partimos de uma quantidade satisfatória dos plasmídeos recombinantes, bem como do vetor isento de inserto: pMSCV IRES Luciferase. Com isso, utilizamos a linhagem celular aderente e empacotadora HEK 293 gag pol cultivada em 3 placas de petri (Cell Culture Dish, 100 mm x 20 mm – Corning) com 10mL de meio de cultura DMEM contendo 10% de Soro Fetal Bovino, acrescido de 1% de L-glutamina e 1% do antibiótico Pen-Strep (Penicillin Streptomycin – Gibco). No dia anterior ao início do protocolo de transfecção, as células HEK 293 gag pol confluentes foram repicadas na proporção 1:4. Ou seja, as células dispostas nas placas de petri tiveram seus meios de cultura removidos e as placas foram lavadas com solução tamponante PBS 1 X estéril (pH = 7,4). As células foram então

destacadas das placas por adição da solução de tripsina 0,2% e incubação por 5 minutos em estufa à 37 °C e 5% CO₂. Passado este período as células foram ressuspensas em volume conhecido de meio RPMI 5% SFB para inativação da tripsina, e as mesmas foram transferidas para placas de petri na proporção 1:4 e dispostas novamente na estufa até o próximo dia.

No outro dia, preparamos os seguintes constituintes em 3 tubos eppendorf estéreis: 20 ug do plasmídeo vetor recombinante (pMSCV IRES Luc.cOVA, pMSCV IRES Luc.mOVA ou pMSCV IRES Luciferase), 2,5 ug do plasmídeo de empacotamento *VSV-G Helper System*, 65 ul de PEI (Polyethylemine) e DMEM qsp 1 mL. Ressalta-se que cada tubo eppendorf preparado continha um plasmídeo vetor recombinante diferente, de tal forma a produzir-se 3 retrovírus distintos.

Os tubos então foram homogeneizados e deixados em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos. Passado o tempo, as 3 placas contendo a linhagem HEK 293 gag pol foram submetidas à um lento gotejamento do conteúdo preparado no tubo eppendorf e as mesmas foram deixadas na estufa à 37 °C, 5% CO₂ por 24 horas. No segundo dia do protocolo, cuidadosamente o meio de cultura consumido foi descartado e repostado por meio de cultura DMEM fresco. Ressalta-se a utilização de pipetas e outros materiais descartáveis, realização adequada da limpeza dos equipamentos envolvidos (ex: fluxo laminar) com hipoclorito 2%, entre outras medidas empregadas, assegurando as boas práticas de biossegurança.

Ainda no segundo dia do protocolo, as células alvo para a realização da transdução pelos vírus sintetizados, foram plaqueadas $1,5 \times 10^5$ célula/ poço em 4 poços de uma placa de 6 well. A célula alvo escolhida em nosso estudo foi a linhagem de melanoma murino (camundongos C57Bl/6) Tm1 (aderente, RPMI 5% SFB, 1% L-glutamina e 1% Pen-Strep). Esta linhagem foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Roger Chammas (Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, ICESP) e foi gerada a partir da linhagem de melanócito não tumorigênico “Melan-a” pelos pesquisadores Oba-Shinjo et al., da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), em 2006. A linhagem tumorigênica amelanótica Tm1 foi gerada a partir da submissão da linhagem “Melan-a” a 5 ciclos sequenciais de impedimento de adesão celular (impedimento de ancoragem forçado) (Oba-Shinjo et al., 2006).

Para a realização do plaqueamentos destas células, as mesmas foram submetidas a uma contagem manual em câmara de Neubauer com o auxílio de um

hematocitômetro manual e um microscópio de luz invertido. Ou seja, após as células serem desadheridas (processo descrito anteriormente com as células HEK 293 gag pol) e ressuspensas em volume conhecido de meio RPMI 5% SFB, selecionamos uma alíquota da suspensão celular para ser adicionada à uma quantidade pré-determinada de solução de azul de tripan 0,2%. Esta solução tem como finalidade corar as células que possuem perda da integridade da membrana plasmática, possibilitando a avaliação de células mortas e vivas durante a contagem. Realizando-se a contagem foi possível proceder com o plaqueamento da quantidade desejada de células alvo e posteriormente disposição das placas em estufa à 37 °C e 5% de CO₂.

3.2.13 Transdução das células de melanoma murino

No 3º dia de protocolo de transfecção (e 24 horas após o plaqueamento das células alvo), as placas de petri com as HEK 293 gag pol transfectadas foram submetidas à coleta de seu meio de cultura (sobrenadante viral) com auxílio de uma seringa descartável acoplada a um filtro de 0,45 µm. Os meios coletados e filtrados provenientes de cada uma das placas foram armazenados em tubos falcons de 15 mL estéreis devidamente identificados. A seguir procedemos com as etapas de transdução das células alvo Tm1 com os vírus produzidos. O termo “transdução”, criado por Zinder ND e Lederberg J em 1952, implica na transferência gênica com o uso de vetores não-replicativos. Desta forma, removemos 1,5 mL do meio de cultura RPMI 5%-SFB de cada poço e adicionamos 1,5 mL do sobrenadante viral recém-coletado, gotejando lentamente. A seguir, em cada poço adicionamos 3 µL de Polybrene™ (Abbott) na proporção 1:1000, a fim de auxiliar na inserção do retrovírus na célula-alvo. 48 horas depois, as células foram repicadas e iniciou-se o processo de expansão das linhagens (Tm1.Luc.mova, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc) e congelamento das mesmas.

3.2.14 Obtenção dos clones, avaliação de bioluminescência e confecção dos pools celulares

Após o processo de expansão e congelamento das células, as 3 linhagens foram submetidas ao protocolo de “Diluição limitante” a fim de promover o isolamento de clones de células que foram eficientemente transduzidas. Como essas construções

não possuem genes de seleção, esta abordagem se mostra altamente necessária. Para a realização deste protocolo, partindo das mesmas 3 linhagens recém-transduzidas, foi executada a contagem manual de cada linhagem em câmara de Neubauer com o auxílio de um hematocítmetro e um microscópio de luz invertido. A contagem foi executada para a realização de diluições seriadas com o objetivo de plaquearmos as seguintes condições: 10 células em 100 μ L de meio de cultura RPMI 5%-SFB/ poço em 1 placa de 96 poços; 1 célula em 100 μ L de meio de cultura RPMI 5%-SFB/poço em 1 placa de 96 poços; 0,1 célula em 100 μ L de meio de cultura RPMI 5%-SFB/ poço em 4 placas de 96 poços. As 3 condições foram aplicadas para cada uma das 3 linhagens, de forma que o total de placas utilizadas no ensaio compreendeu 18 placas. O processo empregado encontra-se esquematizado abaixo (figura 8).

Fig 9 – Esquematização do protocolo de isolamento de clones. Ensaio de “Diluição Limitante” das linhagens: Tm1.Luc, Tm1.Luc.mOVA e Tm1.Luc.cOVA com objetivo de obtenção de clones celulares isolados por poço da placa de 96 well.

Ao final do processo de plaqueamento das amostras, as placas foram dispostas em estufa de 5% CO₂, 37 °C para aguardarmos o crescimento dos clones. As placas contendo 10 células/poço levaram cerca de 4 dias para o aparecimento de um pequeno grupo celular, enquanto as demais placas demoraram cerca de 8-10 dias. Com o aparecimento dos clones nas placas de 0,1 célula/poço, as placas de 1 célula/poço e 10 células/poço foram descartadas. Dessa forma, cada clone obtido nas placas de 0,1 célula/poço foi transferido para poços de placas de 6 well e posteriormente para uma placa de petri, afim de promover a expansão de cada clone e congelamento de vials. Após a expansão, cada clone foi testado duas vezes para confirmação da expressão da enzima luciferase, através do uso do kit comercial: “Luciferase Assay System” – Promega (cat: E1500) com certas adaptações para padronização da técnica. Assim, no dia anterior ao ensaio, 2.5×10^5 células/poço foram dispostas em placas de 24 poços em duplicata. Os clones foram testados juntamente com uma amostra controle negativo, a Tm1 selvagem. No outro dia, o meio de cultura dos poços foi inteiramente removido e o mesmo lavado com a solução tampão PBS 1 X. A seguir, foi adicionado 20 µl do Reagente de lise 1 X em cada poço e a placa incubada em gelo por 20 minutos. Passado o tempo, cada poço foi raspado delicadamente com uma ponteira e o conteúdo transferido para um tubo eppendorf. A seguir, os tubos foram centrifugados a 15.000 rpm, 8 minutos à 4 °C. 10 µl do sobrenadante foi transferido para uma placa preta de 96 well fundo em “u”. A seguir 25 µl do substrato luciferina (Luciferase Assay Substrate) devidamente ressuspendido no Luciferase Assay Buffer foi adicionado em cada poço da placa e a leitura das amostras realizada imediatamente após a adição do substrato. Para análise da expressão de luciferase de cada amostra (bioluminescência), utilizamos o equipamento Spectramax 340PC384 Microplate Reader (Molecular devices) e o software “SoftmaxPro .5.4.1” .

Apenas parte dos clones demonstrou expressão de luciferase e estes foram selecionados para confeccionar o “Pool de clones positivos” de cada uma das 3 linhagens. O total de clones obtido por Diluição Limitante foi: 20 clones linhagem Tm1.Luc (dos quais 7 clones são luciferase positivos), 15 clones Tm1.Luc.mOVA (6 clones luciferase positivos) e 16 clones Tm1.Luc.cOVA (9 clones luciferase positivos). Procedemos escolhendo o número mínimo de clones para confecção do pool, de tal forma a assegurar homogeneidade entre as linhagens. Em cada uma das linhagens,

selecionamos 6 clones positivos (1×10^6 célula de cada clone), juntamos em 1 tubo falcon e plaqueamos em garrafas médias, na proporção 1:1. Assim, obtivemos: Tm1.Luc pool, Tm1.Luc.mOVA pool e Tm1.Luc.cOVA pool.

3.3 Caracterização *in vitro* das linhagens recombinantes

3.3.1 Avaliação de bioluminescência dos pools celulares

Os pools foram então expandidos, submetidos ao Ensaio de Luciferase conforme protocolo já descrito e posteriormente congelados seguindo o critério: 5×10^6 células/1 mL de meio criogênico (meio criogênico: 90% Soro Fetal Bovino e 10% DMSO). As amostras foram então congeladas por 2 dias em freezer à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e em seguida, armazenadas em caixas específicas no interior de galões contendo nitrogênio líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3.3.2 Avaliação da expressão relativa de RNA mensageiro (RNA_m) nos pools

3.3.2.1 Plaqueamento das células

Após a avaliação da emissão de bioluminescência pelos pools celulares, o próximo passo consistiu em avaliar a expressão do gene da ovalbumina, bem como o gene da luciferase, nas linhagens recém-construídas no que diz respeito à produção de RNA mensageiro. Para tal, cada linhagem celular (Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA) foi plaqueada, em condições estéreis e em triplicata, em placas de 6 poços (4×10^5 células/poço) juntamente com meio de cultura RPMI 5% acrescido de 1% L-glutamina e 1% de penstrep. Após o plaqueamento das células, a placa foi mantida na estufa à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Passado o tempo, as células foram desaderidas dos poços conforme já descrito anteriormente para a execução do protocolo de extração de RNA.

3.3.2.2. Extração de RNA com trizol

Após a desadesão, as células foram passadas para tubos eppendorf de 1.5 mL, centrifugados à 300 g, 4 °C por 5 minutos e o pellet celular ressuspensionado em 500 µl de solução contendo trizol. Seguida à adição de trizol, adicionou-se à cada tubo, 100 µl de clorofórmio e os mesmos foram agitados vigorosamente por 15 segundos. A seguir, os tubos repousaram à temperatura ambiente por 3 minutos. Passado o tempo, seguiu-se com uma etapa de centrifugação à 12000 g, 15 minutos, 4 °C. Após esta etapa, em cada tubo foi-se coletado a camada superficial do sobrenadante (contendo RNAs) cuidadosamente tendo a mesma transferida para novos tubos. Nestes tubos foram adicionados 250 µl de isopropanol seguido de agitação por 10 segundos e repouso de 15 minutos à temperatura ambiente. Depois, os mesmos foram centrifugados (12000 g, 15 minutos, 4 °C) e o sobrenadante descartado em papel absorvente. Em seguida, adicionou-se 500 µl de etanol 75% e centrifugou-se à 7500 g, 5 minutos, 4 °C. O sobrenadante foi novamente removido em papel absorvente e o pellet ressuspensionado mais uma vez com 500 µl de etanol 75% para assegurar a adequada lavagem do material. Os tubos foram centrifugados à 7500 g, 5 minutos, 4 °C e ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Os tubos foram então submetidos à uma nova centrifugação (7500 g, 5 minutos, 4 °C) a fim de remover resquícios de etanol na amostra. O etanol remanescente foi removido cuidadosamente dos tubos com auxílio de uma pipeta. Os tubos foram posicionados com suas tampas abertas no thermomixer à 65 °C por 10 minutos, para completa secagem do pellet. Ao final desta etapa, os mesmos foram ressuspensionados com 20 µl de água estéril DNase/RNase Free. Após a ressuspensão do pellet, as amostras foram dispostas novamente no thermomixer à 60 °C por 10 minutos. Passado o tempo, os tubos foram dispostos no gelo e a concentração de RNA nas amostras, bem como o grau de pureza dos materiais foram mensurados com auxílio do equipamento Espectrofotômetro Nanodrop 2000 (ThermoScientific). As amostras foram armazenadas em freezer -80 °C.

3.3.2.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a realização da síntese do cDNA, cada amostra teve 2 ug de RNA retirados e diluídos em água esteril DNase/RNase Free (volume final: 10 ul), em novos tubos eppendorf. Em seguida foi-se adicionado em cada tubo 500 ng de oligo DT, seguido de aquecimento dos tubos à 70 °C por 10 minutos e posterior repouso de 5 minutos em gelo. Em seguida, cada tubo recebeu 8,4 ul do preparado “Mix para Transcrição Reversa” a partir do Kit: ImProm II – Reverse Transcription System™ – Promega (catálogo: A3800), contendo: 4 ul Reaction Buffer 5 X; 2,4 ul de Cloreto de Magnésio; 1 ul de dNTP Mix e 1 ul de ImProm-II Reverse Transcriptase. Os tubos foram então dispostos no equipamento termociclador (Thermo Electron’s Corporation Px2 Thermal Cycler) para seguinte sequência: 25 °C por 5 minutos seguidos de 1 hora à 42 °C e por fim, 15 minutos à 70 °C (inativação da enzima). Em seguida os tubos contendo agora o cDNA foram dispostos em gelo para a realização das próximas etapas.

3.3.2.4 Quantificação da expressão gênica - Reação de PCR em Tempo Real (qPCR)

Para a realização da qPCR foi utilizado o Kit Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG™ (ThermoFisher). Inicialmente preparamos o mix contendo: 5 ul SYBR, 0,16 ul de cada primer à 50 uM, 50 ng de cDNA e água esteril DNase/RNase Free para volume final 10 ul. As amostras foram colocadas no equipamento QuantStudio 12K Flex System™ (ThermoFisher) e o perfil térmico aplicado foi: 95 °C por 10 minutos seguido de 50 ciclos à 95 °C por 10 minutos e 60 °C por 1 minuto. A aquisição dados dados foi realizada no: “QuantStudio 12K Flex System™ Software”. Os primers murinos utilizados foram:

LUC Forward: GAGGCGAACTGTGTGTGAGA

LUC Reverse: GTGTTCGTCTTCGTCCCAGT

OVA Forward: TCAAGCACATCGCAACCAAC

OVA Reverse: AGGGGAAACACATCTGCCAA

β-actina Forward: TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAG

β-actina Reverse: TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG

Para a realização da análise da expressão gênica das linhagens foi utilizado a abordagem de quantificação relativa, no qual inicialmente analisamos os valores de “Ct” de cada uma das amostras. Considerando que cada ciclo de uma reação de qPCR implica em um aumento na fluorescência emitida pelas amostras, imaginamos que no momento em que a fluorescência atingir um limiar denominado de “*threshold*”, a análise comparativa se torna passível de ser realizada. Em outras palavras, o valor de “Ct” (“*threshold cycle*”) informa em qual ciclo, a fluorescência da amostra atingiu o limiar e entrou na fase exponencial. Ressalta-se que o valor de “Ct” é inversamente proporcional à quantidade de fitas molde. Para cada amostra, o “Ct” dos genes de interesse bem como o “Ct” do gene controle endógeno ou “*housekeeping gene*” (β -actina) foram analisados. O controle endógeno não deve apresentar diferença estatística em sua expressão. Para a execução dos cálculos, inicialmente foi subtraído, em cada uma das amostras, o valor de “Ct” do gene de interesse em relação ao “Ct” de seu controle endógeno. O valor obtido é dito ΔCt . Para a obtenção do $\Delta\Delta Ct$ foi realizada a subtração dos valores de ΔCt das amostras pertencentes ao grupo teste em relação aos ΔCt das células do grupo controle. Obtido este valor, o próximo passo implica em calcular o $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para estabelecer a relação de cada grupo e com sua amostra de referência. O valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ representa quantas vezes a expressão de dada amostra encontra-se aumentada ou diminuída em relação a uma outra amostra controle. No caso, para a verificação da expressão do gene Luciferase, foi utilizada como amostra controle a linhagem Tm1.Luc e para a análise da expressão do gene Ovalbumina, foi determinada como controle positivo a linhagem Tm1.Luc.cOVA.

3.3.3 Cinética *in vitro* dos pools Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA

Além da caracterização dos pools de clones: Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA em relação à emissão de bioluminescência através do Ensaio de Luciferase e avaliação da expressão de RNAm por PCR em temp real, também foi realizada uma cinética de crescimento celular de cada uma das linhagens recém-obtidas da seguinte forma: Foram plaqueadas, em triplicatas, 5×10^4 células/poço de cada pool celular em uma placa de 6 poços. A contagem foi realizada manualmente em câmara de Neubauer com o auxílio de um hematocitômetro manual e um microscópio de luz invertido, conforme já descrito anteriormente. Sendo assim, o total

de poços plaqueados foi: 63 poços (3 linhagens x triplicatas x 7 dias). A cada 24 horas, cada triplicata de cada linhagem foi submetida à contagem. Ao final do experimento, calculou-se a média e desvio padrão dos valores obtidos entre as triplicatas, em cada dia de contagem. Os dados foram então utilizados para a confecção de curvas de crescimento entre os pools. Atualmente, em paralelo aos ensaios *in vivo*, está sendo padronizada a técnica de citometria de fluxo para demonstração da presença da proteína ovalbumina nos 3 pools celulares.

3.4 Caracterização *in vivo* das linhagens recombinantes em animais selvagens

3.4.1 Padronização e avaliação de bioluminescência *in vivo*

A partir da confirmação de que os 3 pools celulares apresentavam comportamentos semelhantes *in vitro*, iniciou-se os protocolos *in vivo*. Para tal, foram selecionados 15 camundongos C57Bl/6 selvagens machos com idade entre 6-8 semanas, para a administração dos pools celulares. Os animais foram anestesiados intra-peritonealmente com a solução de anestésicos preparadas previamente: 200 ul de solução de ketamina 10% (100 mg/mL) + 100 ul de solução de xilazina 2% (20 mg/mL) + 1,7 mL de PBS 1 X estéril. A partir desta solução, foram aplicados 200 ul em cada animal. Aguardou-se cerca de 10 minutos até os animais estarem completamente anestesiados para a realização da tricotomização e inoculação das células. Os pools celulares foram previamente contados em câmara de Neubauer, centrifugados à 5 minutos 200 g e ressuspensos em tubos Eppendorf contendo PBS 1 X estéril. Durante a manipulação dos animais os tubos foram mantidos em gelo. Após a tricotomização dos animais, foi realizada 1 aplicação subcutânea de 2.5×10^5 células (100 ul) na região central do flanco de cada animal. 5 animais receberam inoculações com a linhagem Tm1.Luc, outros 5 animais receberam Tm1.Luc.cOVA e os restantes, por sua vez, receberam inoculações de Tm1.Luc.mOVA. Os animais tiveram suas orelhas furadas para auxiliar na identificação e monitoramento de cada um deles. 7 dias após as inoculações, os animais foram levados para a avaliação da emissão de bioluminescência através do uso do equipamento para imageamento *in vitro* e *in vivo*, IVIS Spectrum (PerkinElmer). Primeiramente, antes do início do imageamento dos grupos de animais, foi selecionado apenas um animal para a

padronização do método de detecção e realização de uma cinética de emissão de bioluminescência. Esta etapa é essencial para a padronização do modelo e escolha do melhor tempo para a realização das aquisições das imagens, sendo este dado referente ao pico máximo de emissão de bioluminescências pelas células inoculadas. Trabalhos demonstram que a dinâmica de intensidade do sinal emitido possui uma grande variação entre tumores, de tal forma que alguns tumores levam tempos maiores para que a intensidade máxima de sinal seja atingida. No entanto, este tempo necessário para atingir o sinal máximo é independente do volume tumoral (Shan L et al., 2008). Tendo em vista estas informações, selecionamos um animal C57Bl/6 macho previamente inoculado com a linhagem Tm1.Luc em ambos os flancos para a realização da cinética. Desta forma, o animal selecionado foi submetido à câmara de anestesia inalatória contendo 2% isofurano. Ainda com o animal sedado, foi administrado intra-peritonealmente o substrato previamente preparado: D-Luciferina (Beetle Luciferin, Potassium Salt – Promega, catálogo: E1605) 150 mg/kg solubilizado em PBS 1 X seguida de esterilização em filtro de 0,22 µm. Logo após a administração do substrato, o animal foi rapidamente posicionado na plataforma aquecida, no interior do equipamento, onde ele recebe contínua exposição de isofurano 2%. Para a execução da cinética, o equipamento adquiriu imagens no intervalo de 2 minutos por cerca de 1 hora. As imagens foram então analisadas e estabeleceu-se o tempo de exposição do animal ao substrato D-Luciferina de tal forma a obter o máximo de intensidade de sinal. Os demais animais foram então imageados de acordo com o tempo estabelecido na padronização. A quantificação da bioluminescência utilizando-se o equipamento IVIS Spectrum (PerkinElmer) foi realizada nos grupos de animais no 7º e 14º dia pós-inoculação tumoral.

3.4.2 Avaliação manual do crescimento tumoral

As medições dos tumores manualmente com o auxílio de um paquímetro foram realizadas a partir do 7º dia pós-inoculação quando os tumores já encontravam-se palpáveis. As demais medições ocorreram no 14º e 17º dia pós-inoculação. Ao final das medições, foi realizado o cálculo de volume tumoral (cm³), considerando-se a fórmula: $V = 0,5a \times b^2$, onde “a” e “b” correspondem ao diâmetro maior e diâmetro menor do tumor, respectivamente.

3.5 Caracterização *in vivo* das linhagens recombinantes em animais imunodeficientes

3.5.1 Avaliação do crescimento tumoral e emissão de bioluminescência

Após a realização de experimentos *in vivo* com animais selvagens, procedemos para a avaliação do perfil de crescimento tumoral das linhagens recombinantes quando estas eram inoculadas em animais imunodeficientes a fim de avaliarmos o impacto da participação do sistema imune adaptativo em nosso modelo recém-desenvolvido. Para isso, utilizamos 15 animais machos (6-8 semanas) imunodeficientes C57Bl/6 RAG2^{-/-}, os quais apresentam uma mutação no gene “recombinase 2” com consequente inibição da síntese de receptores de linfócitos T e B (Shinkai U et al., 1992). Desta forma, esses animais carecem destas 2 populações celulares. Dentro destes 15 animais C57Bl/6 RAG2^{-/-}, 5 receberam Tm1.Luc, outros 5 animais receberam Tm1.Luc.cOVA e os restantes receberam Tm1.Luc.mOVA. Juntamente com estes animais, também utilizamos 15 animais C57Bl/6 selvagens pareados com os imunodeficientes. Estes animais também foram inoculados com as 3 linhagens tumorais, respeitando novamente o n = 5 animais/linhagem. Os animais selvagens (grupo controle) e os imunodeficientes (grupo experimental) foram monitorados para avaliação do crescimento tumoral com auxílio do paquímetro nos dias 7^o, 10^o, 14^o e 17^o e nos dias 7^o e 14^o eles foram submetidos à análise de bioluminescência *in vivo*, com o uso do IVIS Spectrum.

3.6 Caracterização *in vivo* das linhagens recombinantes em animais previamente imunizados com ovalbumina

3.6.1 Preparo da imunização, inoculação e avaliação *in vivo*

Após a realização dos experimentos para avaliação do perfil de crescimento tumoral das linhagens recombinantes tanto em animais selvagens quanto em imunodeficientes, prosseguimos com uma nova estratégia para verificar se o perfil de crescimento tumoral poderia ser alterado caso os animais fossem previamente imunizados com a proteína ovalbumina e posteriormente desafiados com as linhagens tumorais recombinantes. Sendo assim, selecionamos 15 animais C57Bl/6 selvagens

para constituírem o grupo experimental submetido à imunização e 15 animais C57Bl/6 selvagens (grupo controle) o qual não recebeu a intervenção.

Para a realização da imunização, foi preparada previamente a “emulsão OVA+ CFA” a qual consiste na adição, seguindo a proporção 1:1, de 2 mg/mL de ovalbumina (OVA) grau V (Sigma-Aldrich, catálogo: A5503) solubilizada em PBS 1 X estéril, com o Adjuvante Completo de Freund (CFA, Sigma-Aldrich, catálogo: F5881). A mistura dos 2 componentes foi realizada com auxílio de seringas de vidro reutilizáveis. Com a emulsão já pronta, cada animal do grupo experimental recebeu a aplicação subcutânea de 2 injeções de 50 µl da emulsão em ambos os lados na base da cauda. Ou seja, cada animal recebeu 100 µg de ovalbumina emulsionada em CFA. Uma vez que o CFA contém na sua composição a bactéria *mycobacterium tuberculosis* na forma inativada, é considerado um potente adjuvante dado a sua contribuição na ativação da resposta imune. 7 dias após a imunização, todos os animais (grupo controle e experimental) receberam as linhagens tumorais Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA, respeitando o n = 5 animais/linhagem. Os 2 grupos foram então monitorados para avaliação do crescimento tumoral manual e emissão de bioluminescência *in vivo*, conforme os mesmos critérios adotados nos experimentos anteriores já descritos.

3.7 Avaliação da resposta imune citotóxica anti-ovalbumina

Para que fosse avaliada um possível potencial de ativação de linfócitos T CD8+ citotóxicos em nossas linhagens tumorais expressantes de ovalbumina, procedemos com um ensaio denominado “Citotoxicidade *in vivo*” baseando-se no modelo experimental de Machado e cols (2006). Para isso utilizamos o epítipo do peptídeo de ovalbumina SIINFELK H-2K_b (257-264), sintetizado pela empresa Proteimax. A avaliação da resposta T CD8+ anti-ovalbumina foi avaliada nos pontos 7º, 14º e 18º pós-inoculação tumoral. Além disso, a realização do ensaio também teve como objetivo comparar a capacidade indutora de uma resposta citotóxica quando utilizamos um antígeno citosólico (cOVA) x um antígeno membranar (mOVA).

3.7.1 Obtenção de esplenócitos

Como primeira etapa do protocolo, inicialmente animais C57Bl/6 selvagens (6-8 semanas) foram sacrificados com overdose de anestésicos administrados via intra-peritoneal, seguido de deslocamento cervical, para remoção do baço. Foi calculado 1 animal doador (contendo aproximadamente 1×10^8 esplenócitos/baço) para cada 2 animais receptores, discutido mais a diante. Após a esplenectomia dos animais doadores, os baços foram então macerados em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, em condições estéreis. A suspensão de esplenócitos foi então transferida para um único tubo falcon de 50 mL e o mesmo deixado em repouso por 10 minutos no gelo para decantação das cápsulas e demais fragmentos macerados. Passado o tempo, o sobrenadante (contendo as células de interesse) foi delicadamente removido e transferido para um novo tubo falcon. O tubo foi então centrifugado à 500 g, 5 minutos. Ao término da centrifugação foi adicionado 4 mL de tampão hemolítico/baço (0,15 M NH_4Cl , 1 mM KHCO_3 , 0,1 mM Na EDTA, pH = 7,2) para promover a lise de eritrócitos. O tubo contendo o tampão enzimático foi deixado em repouso de por 2 minutos e, em seguida, foi adicionado 4 mL de RPMI 10% SFB para cada 1mL da suspensão celular, seguido de uma nova etapa de centrifugação (500 g, 5 minutos). Por fim, as células foram ressuspensas em RPMI 10% para contagem celular em câmara de Neubauer e avaliação da viabilidade celular realizada com auxílio do corante vital azul de tripan 0,2%.

3.7.2 Marcação, pulsação e inoculação de esplenócitos

Os esplenócitos obtidos na etapa anterior foram então subdivididos em 4 tubos falcons de 15 mL identificados como: CFSE^{high}, CellTrace^{high}, CFSE^{low} e CellTrace^{low} e submetidos a um novo ciclo de centrifugação por 5 minutos a 500 g. Em paralelo, em outros 4 tubos falcons, foi preparada a diluição dos marcadores vitais: “CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit” (ThermoFisher, catálogo: C34554) e “CellTrace Violet Cell Proliferation Kit” (ThermoFisher, catálogo: C34557), em PBS 1 X estéril, para que os tubos: CFSE^{high} e CellTrace^{high} apresentassem seus marcadores em uma concentração final de 10 uM e, e os dois outros tubos (CFSE^{low} e CellTrace^{low}) apresentassem 1 uM de concentração final de seus respectivos marcadores. Os 4

tubos contendo os marcadores diluídos em PBS 1 X foram incubados em estufa à 37 °C por 15 minutos e, em seguida, foram vertidos nos tubos falcons que continham o *pellet* celular (esplenócitos) e centrifugados novamente (500 g, 5 minutos). Terminada a centrifugação, as células foram ressuspensas em meio RPMI 10% SFB pré-aquecido e, pulsadas com o peptídeo SIINFELK. Ressalta-se que apenas as populações “high” foram pulsadas, onde a população CellTrace^{high} foi pulsada com 10 uM (concentração final) de peptídeo, e a população CFSE^{high} foi pulsada com 1 mM (concentração final) do peptídeo. O objetivo de testarmos 2 concentrações diferentes do peptídeo implicava em avaliar se a concentração influenciava na intensidade da resposta citóxica anti-ovalbumina. As células com o peptídeo foram incubadas por 1 hora à 37 °C. Ao final da incubação as células foram lavadas com RPMI 10% SFB seguida por centrifugação (500 g, 5 minutos) em 3 ciclos. Ao final das lavagens, as 4 populações foram novamente contadas em câmara de Neubauer a fim de calcular a quantidade exata de células para que todas elas sejam juntadas na proporção 1:1:1:1 em um novo tubo falcon. As 4 populações de esplenócitos já juntas, foram injetadas intravenosamente (via retro-orbital) na concentração 4×10^7 esplenócitos/animal em 200 ul de RPMI não-suplementado, nos animais receptores. Os animais receptores, no caso, foram os animais selvagens C57Bl/6 previamente inoculados as linhagens tumorais recombinantes (n = 5 animais/linhagem). O ensaio de citotoxicidade em diferentes grupos de animais: Animais no 7º dia pós-inoculação tumoral, animais no 14º dia pós-inoculação tumoral e por fim, grupos de animais no 18º dia pós-inoculação tumoral. Passados 18 horas da injeção dos esplenócitos nos animais receptores, os mesmos foram sacrificados e tiveram seus baços removidos. De maneira semelhante ao que já foi descrito, os baços foram então processados individualmente (maceração) seguido da etapa de repouso da suspensão celular em gelo por 10 minutos e transferência do sobrenadante para novos tubos. Os tubos foram então centrifugados e em cada *pellet* foi adicionado 4 mL de tampão hemolítico (incubação de 2 minutos seguida de inativação com RPMI 10% SFB). Os tubos foram novamente centrifugados e cada amostra teve seu *pellet* ressuspensão e fixado com paraformaldeído 1% diluído em PBS 1X.

3.7.3 Análise da lise específica por citometria de fluxo

Os baços fixados foram analisados por citometria de fluxo no equipamento FacsCanto II (Becton Dickinson) para avaliação da lise específica mediadas pelas células T CD8+ citóxicas contra as células-alvo pulsadas com o peptídeo. A estratégia de *gate* utilizada para a aquisição dos eventos foi a seguinte: Inicialmente foi selecionado os eixos “FSC-A” x “FSC-H” para exclusão de aglomerados celulares (“doublets”), em seguida foi criado um segundo *gate* com os eixos “FSC-A” x “SSC-A” para exclusão de restos celulares (“debris”). Depois, um terceiro *gate* foi criado para avaliação da marcação das populações. Para isso, o terceiro *gate* continha os eixos “CFSE” x “CellTrace”. A estratégia de *gate* está demonstrada na figura abaixo (figura 9). Após a aquisição dos eventos, foi realizada a análise no *software* FlowJo (TreeStar) para determinação do número de células em cada uma das populações (CFSE^{high}, CFSE^{low}, CellTrace^{high} e CellTrace^{low}). O cálculo da porcentagem de lise específica foi realizada aplicando-se a seguinte fórmula:

$$1 - \frac{\% \text{CFSE}^{\text{high}} \text{ experimental} / \% \text{CFSE}^{\text{low}} \text{ experimental}}{\% \text{CFSE}^{\text{high}} \text{ controle} / \% \text{CFSE}^{\text{low}} \text{ controle}} \times 100\%$$

Figura 10 – Cálculo e estratégia de gate do ensaio de citotoxicidade *in vivo*. Descrição da fórmula utilizada para execução do cálculo para avaliação da porcentagem de lise específica. Estratégia de gate aplicada nos experimentos. Para o primeiro gate usa-se os eixos FSC-H x FSC-A para exclusão de aglomerados celulares. Para o segundo gate usa-se os eixos SSC-A x FSC-A para exclusão de restos e fragmentos celulares. Para o último gate, aplica-se nos eixos os marcadores CFSE x Cell Trace para a avaliação das populações alvo.

3.8 Avaliação da resposta imune citotóxica anti-ovalbumina mediante a administração de grandes quantidades celulares viáveis

3.8.1 Ensaio de citotoxicidade *in vivo*

Após a realização dos experimentos anteriores para avaliação da resposta citotóxica contra a ovalbumina nas linhagens tumorais (inoculadas nas condições 2.5×10^5 células/animal), optamos pela realização de um novo experimento de “Citotoxicidade *in vivo*” para investigarmos a capacidade do sistema imune adaptativo em ser ativado e criar uma resposta citotóxica efetora anti-ovalbumina mesmo quando o hospedeiro é inoculado com quantidades 20 vezes superiores das linhagens tumorais (5×10^6 células/animal). Para isso, conforme já descrito em mais detalhes anteriormente, processamos as 3 linhagens tumorais e inoculamos em animais C57Bl/6 selvagens ($n = 5$ animais/linhagem) previamente anestesiados (5×10^6 células/animal em 100 μ l). O ensaio de “Citotoxicidade *in vivo*” foi realizado no 7º dia pós-inoculação das linhagens, seguindo todas as etapas do protocolo já descrito.

3.9 Avaliação da resposta imune citotóxica anti-ovalbumina mediante a administração de grandes quantidades celulares não-viáveis

Em uma última abordagem, decidimos avaliar novamente o perfil de resposta de linfócitos T CD8+ citotóxicos anti-ovalbumina no 7º dia pós-inoculação, só que desta vez as linhagens foram administradas (ainda na concentração 5×10^6 células/animal) na forma de extrato celular necrótico.

3.9.1 Indução de necrose nas células tumorais e avaliação da citotoxicidade *in vivo*

Para induzir a necrose nas linhagens tumorais primeiramente as mesmas foram preparadas *in vitro* (contadas e separadas em tubos eppendorf na concentração: 5×10^6 células/ 100 μ l PBS 1X estéril). Os tubos foram submetidos à ciclos de congelamento brusco seguido de aquecimento finalizado em agitação. Para as etapas de congelamento foi preparada uma pasta de gelo seco + etanol (temperatura da pasta = aproximadamente -80°C). Os tubos foram submersos na pasta e instantaneamente sofreram congelamento. Após a detecção do congelamento da amostra, os tubos foram rapidamente transferidos para o thermomixer à 80°C e

deixados por 5 minutos. Passado o tempo, os tubos foram vortexados por 20 segundos. As 3 etapas descritas compreendem 1 único “ciclo”. Ressalta-se que todas as amostras foram submetidas à 4 ciclos e no final destas, 1 alíquota de cada tubo foi retirada para ser corada com azul de tripan no intuito de certificação da morte celular. Após a confirmação da morte, as linhagens foram inoculadas em animais C57Bl/6 selvagens (n = 5 animais/linhagem). E, no 7º dia pós-inoculação, os animais foram submetidos ao ensaio de “Citotoxicidade *in vivo*” conforme protocolo já descrito.

3.10 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software* GraphPad Prism™ (Graphpad Software Incorporation, versão 5). As análises estatísticas empregadas foram: Two-way ANOVA ou One-way ANOVA, seguida por teste de Bonferroni. Diferenças indicativas do valor de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***) foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Construção dos plasmídeos recombinantes

Conforme descrito mais detalhadamente na metodologia, logo após o recebimento dos 3 plasmídeos (pMSCV IRES Luciferase, pCI-neo-cOVA e pCI-neo-mOVA) foi realizada uma análise para verificação da integridade e concentração de cada um deles. A corrida eletroforética em gel de agarose 1% demonstrou que todos os plasmídeos não encontravam-se degradados e as bandas mostravam-se coerentes com o tamanho de cada DNA plasmidial (pMSCV IRES Luciferase: 7380pb, pCI-neo-cOVA: 6261 pb e pCI-neo-mOVA: 6582 pb). As análises de absorbância com o uso do Espectrofotômetro Nanodrop 2000 (ThermoScientific) evidenciaram que os 3 plasmídeos apresentavam picos de absorbância em 260nm, razão 260/280 próximo de 1.8 e razão 260/230 próximo de 2.0 (parâmetros adequados para uma amostra de DNA purificada e isenta de contaminação). As concentrações de DNA obtidas foram suficientes para a execução das demais etapas. Desta forma, já era possível procedermos com as demais etapas de clonagem até a confecção dos plasmídeos recombinantes.

Após todas as etapas descritas detalhadamente na metodologia (crescimento das bactérias, midi-preparação plasmidial e análise das sequências gênicas), foi realizada a digestão dos plasmídeos com a enzima *EcoRI* e purificação dos fragmentos obtidos, conforme evidenciado abaixo (figura 11 e 12).

Fig 11 – Digestão dos vetores para isolamento de fragmentos. Ensaio de restrição com *EcoRI*. À esquerda do gel: Informação dos pesos moleculares presentes no marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen). No gel, da esquerda para a direita: Marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen), plasmídeo pCI-neo-cOVA digerido (bandas esperadas: 789 pb e 5.472 pb), plasmídeo pCI-neo-mOVA digerido (bandas esperadas: 1.110 pb e 5.472 pb). Os fragmentos de interesse o qual foram posteriormente purificados e utilizados na confecção dos plasmídeos recombinantes (mOVA e cOVA) estão indicados pelas setas na figura. Gel de agarose 1%.

Fig 12 - Digestão do vetor. Ensaio de restrição com *EcoRI*. À esquerda: Ilustração dos pesos moleculares presentes no marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen). No gel, da esquerda para a direita: Marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen) seguido do vetor pMSCV IRES Luciferase na sua forma linearizada (banda esperada: 7380 pb). Gel de agarose 1%.

As bandas de interesse de ambos os géis foram purificadas conforme descrito anteriormente e medidas no equipamento Espectrofotômetro Nanodrop 2000 (ThermoScientific). Os fragmentos recém-clivados foram submetidos às reações de ligação com a enzima T4 DNA Ligase. Com o auxílio do Software “Serial Cloner 2.6.1”, simulamos os mapas plasmidiais pós-recombinação dos plasmídeos pMSCV IRES Luc.mOVA e pMSCV IRES Luc.cOVA, figura disposta abaixo.

Fig 13 – Mapa plasmidial pMSCV IRES Luc.mOVA. Mapa esquemático do plasmídeo recombinado pMSCV IRES Luc.mOVA (8484 pb), indicando seus genes bem como suas localizações.

Fig 14 – Mapa plasmidial pMSCV IRES Luc.cOVA. Mapa esquemático do plasmídeo recombinado pMSCV Luc.cOVA (8163 pb), indicando seus genes bem como suas localizações.

A realização da ligação inserto + vetor e posterior transformação bacteriana resultou em inúmeras colônias. O próximo passo então foi avaliar quais colônias de bactérias obtidas possuíam os fragmentos de interesse recém adicionados, além de também averiguarmos se o mesmo havia sido adicionado na posição correta, no vetor. Para que estes fatores fossem certificados, optamos por duas abordagens diferentes (a realização de um novo ensaio de restrição para verificação dos fragmentos liberados em gel de agarose e o sequenciamento dos plasmídeos). Primeiramente foi realizado um ensaio de restrição com todos os clones obtidos na transformação bacteriana. Assim, ainda com o uso Software “Serial Cloner 2.6.1”, foi possível decidir a melhor enzima de restrição para a realização do ensaio e os fragmentos que seriam liberados com esta abordagem. Desta forma, para os clones do plasmídeo pMSCV Luc.mOVA, foi utilizada a enzima de restrição NcoI, responsável por resultar em fragmentos de 1.351 pb e 7.133 pb, caso o inserto estivesse localizado na posição correta no vetor. A mesma enzima, na situação do plasmídeo conter o inserto em uma posição incorreta, geraria 2 fragmentos de 917 pb e 7.567 pb. Em relação ao vetor pMSCV IRES Luciferase isento de qualquer inserto, na presença da enzima NcoI, acaba linearizando em decorrência de um corte único na região de 2010 pb. A diferença entre os tamanhos dos fragmentos dispostos no gel ajudou a elucidar quais

clones de bactérias contém o plasmídeo recombinante com o inserto corretamente. O resultado deste ensaio de restrição pode ser encontrado abaixo.

Fig 15 – Digestão dos clones com a enzima NcoI. Ensaio de restrição dos clones obtidos com a transformação bacteriana do plasmídeo pMSCV Luc.mOVA. À direita do gel: Indicação dos pesos moleculares do marcador. Da esquerda para a direita, no gel: Marcador de peso molecular 1 kb Plus (Invitrogen), clones pMSCV Luc.mOVA de 1 à 10, vetor vazio pMSCV IRES Luciferase. Todas as amostras foram digeridas com a enzima NcoI. Setas em vermelho: Seta 1 - clone pMSCV Luc.mOVA selecionado para a execução do sequenciamento de seu DNA (bandas esperadas: 7.133 pb e 1.351 pb); Seta 2 – vetor vazio pMSCV IRES Luciferase linearizado (banda esperada: 7.380 pb). Gel de agarose 1%.

O resultado da corrida eletroforética acima possibilitou a seleção do clone do plasmídeo pMSCV Luc.mOVA, indicado pela seta 1 no gel da figura 15, para procedermos com o sequenciamento deste material. Esta amostra foi escolhida por indicar a presença das 2 bandas esperadas e portanto, representar um potencial clone pMSCV Luc.mOVA que contém o inserto no interior do vetor na posição correta. As demais amostras apresentaram inúmeras bandas incoerentes com o resultado esperado, sendo assim não foram selecionadas para serem utilizadas nas etapas futuras.

A mesma estratégia foi aplicada para os clones obtidos do plasmídeo pMSCV Luc.cOVA utilizando-se a enzima *EcoRV*. Para os clones que contém o inserto cOVA na posição correta, as bandas esperadas são: 3.385 pb, 2.644 pb, 1.881 pb e 253 pb. No caso de os clones apresentarem o inserto na forma invertida, as bandas esperadas são: 3.385 pb, 3.047 pb, 1.478 pb e 253 pb. Em relação ao vetor vazio pMSCV IRES Luciferase, a enzima *EcoRV* realiza 3 cortes resultando nos fragmentos: 3.742 pb, 3.385 pb e 253 pb. O resultado da corrida eletroforética após a digestão dos clones pMSCV IRES Luc.cOVA e do vetor pMSCV IRES Luciferase, com a enzima *EcoRV*, encontra-se disposta abaixo.

Fig 16 – Digestão dos clones com a enzima *EcoRV*. Ensaio de restrição dos clones obtidos com a transformação bacteriana do plasmídeo pMSCV IRES Luc.cOVA. À esquerda do gel: Indicação dos pesos moleculares do marcador. Da esquerda para a direita, no gel: Marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen), clones pMSCV IRES Luc.cOVA de 1 à 7, vetor vazio pMSCV IRES Luciferase. Todas as amostras foram digeridas com a enzima *EcoRV*. Setas em vermelho: Seta 1 – clone pMSCV Luc.cOVA selecionado para a execução do sequenciamento de seu DNA (bandas esperadas: 3.385 pb e 2.644 pb e 1.881 pb); Seta 2 – vetor vazio pMSCV IRES Luciferase (bandas esperadas: 3.742 pb e 3.385 pb). Gel de agarose 1%.

A corrida eletroforética acima evidenciou que inúmeros clones demonstraram o perfil de bandas esperadas para uma clonagem adequada, inclusive uma das bandas provenientes da digestão do vetor vazio pMSCV IRES Luciferase com a enzima *EcoRV*, coincide com uma das bandas esperada decorrente da digestão do clone pMSCV Luc.cOVA (banda de 3.385 pb). Nenhuma amostra apresentou o perfil esperado para uma clonagem com o inserto na posição incorreta. Tanto no vetor pMSCV IRES Luciferase quanto nos clones contendo o inserto na posição correta, esperávamos obter uma banda de 253 pb, no entanto esta banda não foi observada na corrida eletroforética, fato que pode ser possivelmente justificado por se tratar de um fragmento pequeno passível de comprometer a sua visualização no gel de agarose.

Desta forma, conforme comentado anteriormente, foi selecionado um clone do plasmídeo pMSCV Luc.mova e outro clone do plasmídeo pMSCV Luc.cOVA para a execução da reação de sequenciamento. Os clones escolhidos já foram demonstrados previamente acima.

Após a realização do sequenciamento das amostras, os gráficos obtidos confirmaram a presença do inserto de maneira correta na sequência dos plasmídeos. Os gráficos de sequenciamento, analisados com o software “Bioedit 7.2.5” encontram-se abaixo.

Fig 17 – Sequenciamento pMSCV IRES Luc.cOVA. **A)** Eletroferograma referente ao sequenciamento do plasmídeo pMSCV IRES Luc.cOVA indicando a sequência presente no vetor pMSCV IRES Luciferase devidamente clonado com o inserto cOVA, evidenciado na região demarcada como “início do inserto cOVA”. A sequência do inserto também indica a inserção do mesmo na posição correta. **B)** Sequências nucleotídicas esperadas do vetor e do inserto cOVA, com a realização do sequenciamento do plasmídeo pMSCV IRES Luc.cOVA.

Fig 18 – Sequenciamento pMSCV IRES Luc.mOVA. A) Eletroferograma referente ao sequenciamento do plasmídeo pMSCV IRES Luc.mOVA indicando a sequência presente no vetor pMSCV IRES Luciferase devidamente clonado com o inserto mOVA, evidenciado na região demarcada como “início do inserto mOVA”. A sequência do inserto também indica a inserção do mesmo na posição correta. **B)** Sequências nucleotídicas esperadas do vetor e do inserto mOVA, com a realização do sequenciamento do plasmídeo pMSCV IRES Luc.mOVA.

De maneira a consolidar a presença do inserto nos plasmídeos, foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose 1%, com as duas amostras juntamente com o vetor pMSCV IRES Luciferase isento de inserto. O resultado da corrida encontra-se abaixo.

Fig 19 – Gel de agarose com os plasmídeos recombinados. Corrida eletroforética dos plasmídeos recombinados juntamente com o vetor vazio. À esquerda do gel: Indicação dos pesos moleculares do marcador. Amostra indicada pela seta 1: Vetor vazio pMSCV IRES Luciferase (7.380 pb). Amostra indicada pela seta 2: Plasmídeo recombinado pMSCV Luc.cOVA (8.163 pb). Amostra indicada pela seta 3: Plasmídeo recombinado pMSCV Luc.mOVA (8.484 pb). Ladder 1 kb (Invitrogen); gel de agarose 1%.

O resultado da corrida eletroforética ressalta, mais uma vez, a evidência da presença do inserto nos plasmídeos recombinantes. Ou seja, é possível observarmos que as bandas dos plasmídeos recombinantes possuem pesos moleculares superiores em relação ao plasmídeo vetor vazio pMSCV IRES Luciferase, justamente por possuírem o inserto. Além da comparação de ambos plasmídeos com o vetor, também é possível realizar uma comparação entre os 2 plasmídeos recombinantes, uma vez que eles apresentam pesos moleculares distintos. Apesar de sutil a diferença entre os tamanhos das bandas, é possível observarmos que o plasmídeo pMSCV Luc.mOVA (amostra indicada pela seta “3”) tem um peso molecular discretamente maior do que o plasmídeo pMSCV Luc.cOVA, em função da presença dos 321 nucleotídeos a mais na sequência da ovalbumina (mOVA), conforme discutido anteriormente. Com isso, os resultados da clonagem evidenciam que o desenvolvimento dos plasmídeos recombinantes foi bem-sucedido e as 2 construções plasmidiais contém de maneira adequada os nossos genes de interesse.

4.2 Clones recém-transduzidos apresentaram alta variabilidade na emissão de bioluminescência

Após a construção dos plasmídeos recombinantes, o próximo passo implicou na produção das partículas retrovirais e transdução nas células-alvo de melanoma murino Tm1, conforme protocolo descrito na metodologia. Já dispondo das células recém-transduzidas as etapas seguintes envolveram a realização do protocolo de “diluição limitante”, a fim de selecionarmos apenas aqueles clones de células que foram eficientemente transduzidos e portanto, que expressam nossos genes de interesse, uma vez que as construções não possuem genes de seleção. Desta forma, o objetivo foi obter o número máximo de clones por linhagens para testar quais deles expressavam a enzima luciferase e consequentemente, reagiam na presença do substrato D-Luciferina para emitir a luminescência esperada. Os valores de luminescência obtidos com a realização do “Ensaio de Luciferase” foram compilados em gráficos dispostos a seguir.

Fig 20 – Detecção de bioluminescência dos clones Tm1.Luc.mOVA. Ensaio de Luciferase com os clones de células Tm1.Luc.mOVA. Total de clones isolados e mensurados no ensaio: 15 clones representados no eixo “x”. Valores de bioluminescência - “Unidades Relativas de Luz” (RLU) representados no eixo “y”. As barras vermelhas representam os clones com maior emissão de bioluminescência e portanto, selecionados para a confecção do pool de clones Tm1.Luc.mOVA. Resultados representativos de 2 experimentos independentes.

Fig 21 – Detecção de bioluminescência dos clones Tm1.Luc.cOVA. Ensaio de Luciferase com os clones de células Tm1.Luc.cOVA. Total de clones isolados e mensurados no ensaio: 16 clones representados no eixo “x”. Valores de bioluminescência - “Unidades Relativas de Luz” (RLU) representados no eixo “y”. As barras vermelhas representam os clones com maior emissão de bioluminescência e portanto, selecionados para a confecção do pool de clones Tm1.Luc.cOVA. Resultados representativos de 2 experimentos independentes.

Fig 22 – Detecção de bioluminescência dos clones Tm1.Luc. Ensaio de Luciferase com os clones de células Tm1.Luc. Total de clones isolados e mensurados no ensaio: 20 clones representados no eixo “x”. Valores de bioluminescência - “Unidades Relativas de Luz” (RLU) representados no eixo “y”. As barras vermelhas representam os clones com maior emissão de bioluminescência e portanto, selecionados para a confecção do pool de clones Tm1.Luc. Resultados representativos de 2 experimentos independentes.

A análise dos gráficos obtidos acima evidenciou uma alta variabilidade nos dados referentes à emissão de bioluminescência entre os clones, enfatizando a necessidade da confecção dos pools de clones para buscar uma maior

homogeneidade entre as 3 linhagens celulares. Levando este fato em consideração, foi selecionado um número mínimo de clones positivos para o ensaio, em cada uma das linhagens. Assim, 6 clones (representados pelas barras vermelhas nos gráficos acima) foram utilizados para a produção dos pools de clones, de cada uma das linhagens, seguindo a proporção 1:1. Ao término da produção dos pools, os mesmos foram submetidos também ao Ensaio de Luciferase para avaliação se a homogeneidade desejada entre as linhagens foi atingida, entre outros ensaios de caracterização demonstrados a seguir.

4.3 Confeção dos pools resultou em maior similiaridade entre as amostras

A realização do “Ensaio de luciferase” abaixo (figura 23) mostrou que a estratégia de formação de pools celulares assegurou uma maior homogeneidade entre as amostras no quesito de emissão de bioluminescência. Ou seja, diferentemente das variações discrepantes encontradas nos ensaios anteriores, os pools celulares não apresentaram diferenças na emissão de “Unidades Relativas de Luz” estatisticamente significativas quando comparados entre eles e submetidos à análise estatística: Teste One-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni. Em contrapartida, a amostra Tm1 selvagem (controle negativo) quando comparada aos pools celulares demonstrou, conforme o esperado, uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0046$).

Ensaio de Luciferase - Pool de clones

Fig 23 – Detecção de bioluminescência nos pools celulares. Ensaio de Luciferase entre as amostras: Tm1 (linhagem utilizada como controle negativo do ensaio) e os pools de clones: Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA. O eixo “y” indica os valores de bioluminescência representados em “Unidades Relativas de Luz (RLU)” e o eixo “x” indica as amostras utilizadas neste ensaio. Os histogramas representam a média aritmética $\pm$ desvio padrão. A análise estatística dos valores foi executada utilizando-se o teste One-way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. As diferenças entre as amostras foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Resultados representativos de 3 experimentos independentes.

Além da avaliação da emissão de bioluminescência entre os pools celulares, outro ensaio de caracterização efetuado antes de prosseguirmos para as etapas *in vivo* foi a avaliação da expressão de RNAm de cada pool de clone. O resultado da expressão relativa dos genes luciferase e ovalbumina encontram-se abaixo (figura 24 e 25).

Fig 24 – Expressão de RNAm para luciferase. Expressão relativa de RNA mensageiro luciferase entre os pools Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA, Tm1.Luc.mOVA e a linhagem Tm1. A linhagem Tm1. Luc foi utilizado como o gene referência para comparação da expressão das 2 outras linhagens em relação à ele. O eixo “x” indica o nível de expressão relativo de RNAm e o eixo “y” contém as amostras. Resultados representativos de 2 experimentos independentes.

Fig 25 – Expressão de RNAm para ovalbumina. Expressão relativa de RNA mensageiro ovalbumina entre os pools Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA, Tm1.Luc.mOVA e a linhagem Tm1. A linhagem Tm1. Luc foi utilizado como o gene referência para comparação da expressão das 2 outras linhagens em relação à ele. O eixo “x” indica o nível de expressão relativo de RNAm e o eixo “y” contém as amostras. Resultados representativos de 2 experimentos independentes.

A análise da qPCR para o gene luciferase indicou uma expressão relativamente superior na linhagem Tm1.Luc em relação às linhagens expressantes de ovalbumina. No entanto, o nível de expressão do gene luciferase mostrou-se

bastante semelhante entre as 2 linhagens expressantes de ovalbumina (Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA). Além disso, não houve amplificação gênica no controle negativo do experimento (linhagem Tm1 selvagem). Em relação ao gene ovalbumina (figura 24), o resultado do ensaio de qPCR demonstrou bastante similaridade na expressão gênica entre as linhagens Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA, sendo um resultado com impacto positivo para os próximos ensaios. Os controles negativos Tm1 selvagem e Tm1.Luc também indicaram amplificação gênica de ovalbumina próximo de zero. A seguir, foi avaliado o perfil de crescimento *in vitro* das 3 linhagens recombinantes mediante contagem diária manual em câmara de Neubauer (figura 26).

Fig 26 – Cinética *in vitro* dos pools celulares. Gráfico representativo da cinética *in vitro* dos pools: Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA. Eixo “x” representa os dias e eixo “y” o número de células viáveis obtido através de contagem manual em câmara de Neubauer de cada amostra com exclusão das células mortas (coradas com azul de tripan). O gráfico foi submetido à análise estatística utilizando-se o teste One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. As curvas estão representadas com média aritmética $\pm$ desvio padrão. Os valores são considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$. Os valores obtidos resultantes da comparação entre os grupos indicam que as variações não são estatisticamente significativas (sigla “ns” no gráfico). Resultados de 3 experimentos independentes.

A avaliação das curvas de crescimento celular acima demonstrou que os pools não apresentam padrões de crescimento com diferenças estatisticamente significativas, de acordo com o teste One-way ANOVA, seguido do teste de Bonferroni. O nível de significância (p) obtido no ensaio foi: $p = 0,9861$ (para dados

estatisticamente significativos: $p < 0,05$). Ou seja, as linhagens Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA apresentam uma taxa de crescimento semelhante. Desta forma, consideramos que as pools celulares encontravam-se aptos para o início dos protocolos *in vivo*.

4.4 Emissão máxima de bioluminescência *in vivo* é detectada em $t = 8$ minutos

Conforme descrito mais detalhadamente anteriormente, as linhagens Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA foram inoculadas subcutâneamente na região central do flanco de camundongos C57Bl/6 selvagens para a avaliação do crescimento tumoral e emissão de bioluminescência. Anteriormente ao início do protocolo de imageamento dos grupos, foi selecionado um animal inoculado há 7 dias com 2.5×10^5 células Tm1.Luc para a realização da cinética *in vivo* e padronização da técnica. O animal inoculado via intraperitoneal com solução de D-Luciferina 150 mg/kg em PBS 1 X foi submetido à aquisição de imagens com intervalos de 2 minutos, durante 1 hora, no equipamento IVIS Spectrum (PerkinElmer). As imagens da cinética encontram-se a seguir. A análise de cada imagem adquirida foi realizada utilizando-se a ferramenta “*Region of interest*” (ROI) no qual possibilita a seleção de uma área específica da imagem adquirida, de tal forma que o software “Living Image Software (IVIS Imaging Systems)” estabelece a quantificação de luminescência apenas na área delimitada pelo ROI. Cada imagem apresentou uma quantificação do sinal emitido em “unidades relativas de luz/segundo” e os mesmos foram convertidos para porcentagem e dispostos no gráfico da figura abaixo (figura 27).

Fig 27 – Curva de cinética de bioluminescência *in vivo*. Dados referentes à padronização da cinética de bioluminescência *in vivo* (experimento indicado no na figura 24) utilizando-se os valores obtidos dos ROIs de cada imagem adquirida *versus* o tempo de exposição ao substrato D-Luciferina. Pico de intensidade máxima de emissão de bioluminescência no tempo = 8 minutos, conforme indicado pela seta vermelha no gráfico.

A análise dos dados de cinética demonstrou que intensidade máxima de bioluminescência pelas células Tm1.Luc foi atingida em 8 minutos após a administração do substrato D-Luciferina no animal. Ou seja, o intervalo de 6-10 minutos representa o tempo de exposição ao substrato adequado para a aquisição das imagens. Analisando ainda o gráfico, é possível observar o decaimento rápido do sinal em função do tempo, fruto do consumo do substrato pela enzima luciferase. O gráfico demonstra que a intensidade do sinal passa a ser inferior à intensidade obtida no início da administração (2 minutos pós-administração), após aproximadamente 35 minutos da administração do substrato, demonstrando que a reação entre a enzima luciferase e seu substrato inicia-se rapidamente atingindo em poucos minutos a emissão máxima. Após a realização da cinética *in vivo* e estabelecimento do tempo ideal de intensidade máxima de RLU emitidos, os grupos de animais selvagens foram submetidos ao imageamento nos dias: 7^o e 14^o pós-inoculação das linhagens, resultado a seguir (figura 28).

4.5 Linhagens tumorais inoculadas *in vivo* não apresentaram diferenças na emissão de bioluminescência mas sim no perfil de crescimento tumoral

A análise dos dados referentes à emissão de bioluminescência *in vivo* nos animais C57Bl/6 selvagens que receberam as linhagens tumorais recombinantes não demonstrou diferença estatisticamente significativa em nenhum dos dias em que os animais foram imageados (figura 28). No entanto, todos os animais submetidos ao imageamento no equipamento IVIS Spectrum que constam neste estudo, foram imageados apenas nos dias 7º e 14º. Quando analisamos os dados de crescimento tumoral mensurados manualmente com o auxílio do paquímetro (figura 29), é possível notar que no dia 17º pós-inoculação tumoral, os animais que receberam a linhagem Tm1.Luc.cOVA demonstraram um aumento no volume tumoral bastante notável em relação aos animais que receberam a linhagem Tm1.Luc. O que indica que possivelmente se estes animais também fossem imageados no dia 17º pós-inoculação tumoral, provavelmente os valores de emissão de bioluminescência nestes animais também resultariam em diferenças estatisticamente significativas.

A partir do resultado de crescimento tumoral mensurado manualmente, estudamos a possibilidade da presença da ovalbumina na forma citosólica na linhagem Tm1.Luc.cOVA estar contribuindo para uma alteração no perfil de crescimento, discutido mais adiante. Ressaltamos que a partir do 7º dia pós-inoculação já mostravam-se palpáveis e passíveis de serem medidos com o auxílio de um paquímetro para a aquisição do cálculo de volume tumoral, onde $V = 0,5a \times b^2$ (sendo a = diâmetro maior e b = diâmetro menor). Com isso, a média de 3 experimentos independentes junto com o desvio padrão entre os volumes tumorais obtidos foram dispostos no gráfico abaixo (figura 29).

Fig 28 – Bioluminescência *in vivo* em camundongos selvagens. Camundongos C57Bl/6 selvagens inoculados com as linhagens Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA (2.5×10^5 células/animal) e avaliados nos dias 7º e 14º pós inoculação. O camundongo representado pela numeração “1” representa o mesmo animal em ambas imagens. O mesmo se aplica ao camundongo de número “2” **A)** Quantificação da emissão de “unidades relativas de luz” (RLU) nos animais recém-inoculados com o substrato D-Luciferina. Quantificação feita com auxílio do equipamento IVIS Spectrum (PerkinElmer). A análise estatística utilizada foi: Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni. Os dados estão representados com suas médias aritméticas $\pm$ desvio padrão. “ns” = não houve diferença estatística significativa. Média de 3 experimentos independentes. **B)** Resultado do imageamento realizado pelo equipamento IVIS Spectrum (PerkinElmer) dos camundongos recém-inoculados com o substrato D-Luciferina. As imagens foram utilizadas para a quantificação de RLU utilizando-se o software “Living Image Software” (IVIS Imaging Systems).

Fig 29 – Crescimento tumoral in vivo em camundongos selvagens. Avaliação do crescimento tumoral de cada uma das linhagens: Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA, inoculadas em animais C57Bl/6 selvagens, através de medições manuais com auxílio de um paquímetro nos dias 7º, 10º, 14º e 17º pós-inoculação tumoral. Os valores obtidos com a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes foram submetidos à análise estatística Two-way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni. **($p < 0,01$).

4.6 Inoculação das linhagens em animais imunodeficientes altera o crescimento tumoral nas linhagens Tm1.Luc e Tm1.Luc.mOVA

A fim de avaliarmos se o perfil de crescimento *in vivo* das linhagens recombinantes sofria algum tipo de alteração por parte do sistema imune adaptativo, inoculamos as linhagens em camundongos imunodeficientes C57Bl/6 RAG2^{-/-}, carentes de linfócitos T e B, e em camundongos C57Bl/6 imunocompetentes (selvagens). Dada a importância já muito bem descrita da atuação destas células no controle anti-tumoral, imaginamos que os animais imunodeficientes teriam uma maior dificuldade de controlar o crescimento tumoral quando comparados com os animais selvagens. Em nossos resultados, evidenciamos uma diferença estatisticamente significativa no perfil de crescimento tumoral (perda no controle do crescimento tumoral) quando os animais imunodeficientes eram inoculados com a linhagem Tm1.Luc (figura 30) e com a linhagem Tm1.Luc.mOVA (figura 31). Não houve diferença significativa quando os mesmos eram inoculados com a linhagem Tm1.Luc.cOVA (figura 32).

Fig 30 – Crescimento tumoral in vivo selvagens x imunodeficientes (Tm1.Luc). Avaliação do crescimento tumoral da linhagem Tm1.Luc em animais RAG2-/- e selvagens, através de medições manuais com auxílio de um paquímetro nos dias 7º, 10º, 14º e 17º pós-inoculação tumoral. Os valores obtidos com a média e desvio padrão de 2 experimentos independentes foram submetidos à análise estatística Two-way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni. ***($p < 0,001$).

Fig 31 - Crescimento tumoral in vivo selvagens x imunodeficientes (Tm1.Luc.mOVA). Avaliação do crescimento tumoral da linhagem Tm1.Luc.mOVA em animais RAG2-/- e selvagens, através de medições manuais com auxílio de um paquímetro nos dias 7º, 10º, 14º e 17º pós-inoculação tumoral. Os valores obtidos com a média e desvio padrão de 2 experimentos independentes foram submetidos à análise estatística Two-way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni. ***($p < 0,001$).

Fig 32 - Crescimento tumoral in vivo selvagens x imunodeficientes (Tm1.Luc.cOVA). Avaliação do crescimento tumoral da linhagem Tm1.Luc.cOVA em animais RAG2-/- e selvagens, através de medições manuais com auxílio de um paquímetro nos dias 7º, 10º, 14º e 17º pós-inoculação tumoral. Os valores obtidos com a média e desvio padrão de 2 experimentos independentes foram submetidos à análise estatística Two-way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni. ns = não estatisticamente significativo.

4.7 Imunização prévia com OVA altera o perfil de crescimento tumoral nas linhagens expressantes de ovalbumina

No intuito de avaliar se a presença da ovalbumina (mOVA/ cOVA) nas linhagens recombinantes poderia atuar com papel imunogênico, animais selvagens foram previamente imunizados com OVA+CFA na base da cauda e 7º dia após a imunização, foram inoculados com as 3 linhagens recombinantes. A fim de compararmos os efeitos da imunização, também inoculamos as linhagens recombinantes em animais selvagens não-imunizados (grupo controle). O procedimento de imunização por esta técnica demonstrou uma alteração no perfil de crescimento tumoral nos animais imunizados e inoculados com as linhagens expressantes de ovalbumina. Os animais tanto imunizados quanto não-imunizados quando inoculados com Tm1.Luc, não demonstraram alteração no crescimento celular (figura 33). Indicando, conforme o esperado, que a imunização não altera o perfil de crescimento tumoral. Por outro lado, a imunização exerceu efeito (estatisticamente significativo) nos animais que receberam as linhagens expressantes de ovalbumina (figuras 33). Ou seja, nos animais imunizados, houve um aumento no volume tumoral

expressivo quando eram inoculados com Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA. Uma possível hipótese para este resultado envolveria uma ativação primária do sistema imune (imunização com OVA) seguida de uma ativação secundária (devido ao encontro das células do sistema imune com a proteína ovalbumina nas células tumorais) e com consequente migração destas células para o sítio tumoral (aumento do infiltrado celular), o que culminaria com um volume tumoral aumentado, fato discutido mais a diante em outra seção. Novamente, a análise de emissão de bioluminescência com o equipamento IVIS Spectrum nos dias 7º e 14º pós-inoculação tumoral não evidenciou diferença estatisticamente significativa entre os grupos de animais imunizados x não-imunizados (figuras 34 e 35).

Fig 33 - Crescimento tumoral das linhagens Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA em animais imunizados e não-imunizados. Avaliação do crescimento tumoral das 3 linhagens recombinantes em animais selvagens previamente imunizados com OVA+CFA e

animais selvagens não-imunizados, através de medições manuais com auxílio de um paquímetro nos dias 7º, 10º, 14º e 17º pós-inoculação tumoral. Os valores obtidos com a média e desvio padrão de 2 experimentos independentes foram submetidos à análise estatística Two-way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni. ** ($p < 0,01$).

Fig 34 – Imageamento *in vivo* de animais imunizados e não-imunizados. Avaliação da emissão de bioluminescência nos animais selvagens não-imunizados e imunizados posteriormente inoculados com as linhagens Tm1.Luc., Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA.

Avaliação realizada nos dias 7º e 14º pós-inoculação tumoral. O camundongo representado pela numeração “1” representa o mesmo animal em ambas imagens. O mesmo se aplica aos demais animais. **A)** Animais imunizados e posteriormente inoculados com as linhagens tumorais para realização do imageamento *in vivo*. **B)** Animais não-imunizados e inoculados com as linhagens tumorais para realização do imageamento *in vivo*.

Fig 35 – Quantificação da bioluminescência em animais imunizados e não-imunizados. Avaliação da emissão de bioluminescência nos animais selvagens previamente imunizados e posteriormente inoculados com as linhagens Tm1.Luc., Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA. Avaliação realizada nos dias 7º e 14º pós-inoculação tumoral. Os valores obtidos com a média e desvio padrão de 2 experimentos independentes foram submetidos à análise estatística Two-way ANOVA, seguido de teste de Bonferroni. ns = não estatisticamente significativo. **A)** Animais imunizados e posteriormente inoculados com as linhagens tumorais para realização do imageamento *in vivo* e quantificação. **B)** Animais não-imunizados e inoculados com as linhagens tumorais para realização do imageamento *in vivo* e quantificação.

4.8 Animais inoculados com Tm1.Luc.cOVA demonstraram lise específica de células-alvo pulsadas, apenas no 7º dia pós-inoculação tumoral

O próximo passo do projeto consistiu em avaliar a participação das células T CD8+ citotóxicas em nosso modelo desenvolvido. Inicialmente, testamos a capacidade da presença da ovalbumina (tanto na forma membranar quanto na forma citosólica) em induzir uma resposta mune adaptativa. Para isso, utilizamos um grupo controle, sendo este representado por animais selvagens imunizados com OVA+CFA na base da cauda e os grupos experimentais, os quais receberam as linhagens tumorais. A avaliação da resposta citotóxica foi feita nos pontos 7, 14 e 18 pós-procedimento (inoculação tumoral ou imunização). Os resultados podem ser observados nas figuras abaixo (figura 36 e 37), os quais demonstraram que ativação de células T CD8+ anti-ovalbumina ocorreu apenas no 7º dia. Nos demais dias não houve detecção da resposta celular específica. Além disso, no 7º dia os animais que demonstraram resultados de lise específica das células-alvo significativos foram os animais controle (OVA+CFA) e os animais que receberam a linhagem Tm1.Luc.cOVA.

Na figura 36, também é possível evidenciar que a capacidade de lise específica (valores de porcentagem de células em cada população) mostrou-se bastante similar nos 2 marcadores vitais (Cell Trace e CFSE), indicando que o potencial citotóxico manteve-se semelhante independente da quantidade de peptídeo pulsado (10uM ou 1uM).

Fig 36 – Estratégia de gate e resultados das avaliações citotóxicas nos dias 7, 14 e 18 pós-inoculação tumoral. Todas as amostras foram primeiramente analisadas para exclusão de aglomerados celulares (“doublets”) no gate com eixos: FSC-H x FSC-A. A seguir, a população selecionada foi utilizada para a confecção do segundo gate (exclusão de restos celulares ou “debris”) com eixos: SSC-H x SSC-A. O terceiro e último gate foi selecionado para a análise das 4 populações marcadas com os marcadores vitais Cell Trace e CFSE. (4 populações: CFSE^{high}, CellTrace^{high}, CFSE^{low} e CellTrace^{low}). O ensaio contou com as seguintes amostras: animais imunizados OVA+CFA, animais inoculados com Tm1.Luc, animais inoculados com Tm1.Luc.cOVA e animais inoculados com Tm1.Luc.mOVA. Os dados adquiridos no software FlowJo foram submetidos aos cálculos para obtenção da lise das células-alvo. Os valores de porcentagem média de células totais em cada um dos 4 gates (CFSE^{high}, CellTrace^{high}, CFSE^{low} e CellTrace^{low}), os quais são provenientes de 2 experimentos independentes, estão dispostos em seus respectivos gates. As porcentagens de cada gate (média e desvio padrão) foi também submetida à análise estatística One-way ANOVA, seguida por teste de Bonferroni. ns = não estatisticamente significativo, * (p<0,05), ** (p<0,01) e *** (p<0,001).

Fig 37 – Ensaio de citotoxicidade *in vivo* nos dias 7, 14 e 18 pós-inoculação tumoral.

Ensaio de citotoxicidade *in vivo* em dias diferentes realizados com animais imunizados OVA+CFA, animais inoculados com Tm1.Luc, animais inoculados com Tm1.Luc.cOVA e animais inoculados com Tm1.Luc.mOVA. Os dados são provenientes de 2 experimentos independentes, considerando a média e desvio padrão dos mesmos. Dados submetidos à análise estatística One-way ANOVA seguida por teste de Bonferroni. ns = não estatisticamente significativo, * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). **A)** Experimento realizado no 7º dia pós inoculação tumoral/pós imunização do grupo OVA+CFA. **B)** Experimento realizado no 14º dia pós inoculação tumoral/pós imunização do grupo OVA+CFA. **C)** Experimento realizado no 18º dia pós inoculação tumoral/pós imunização do grupo OVA+CFA.

4.9 A administração de altas quantidades de células tumorais viáveis não resulta em lise específica

Uma vez que foi evidenciado a capacidade da linhagem Tm1.Luc.cOVA em ativar o sistema imune e desencadear uma resposta T CD8+ citotóxica anti-ovalbumina, o próximo passo foi avaliar se a administração de uma quantidade superior de células tumorais poderia alterar a capacidade de ativação do sistema imune, no sentido de promover melhorias no perfil de lise ou não, no 7º dia pós-inoculação. Realizando esta abordagem, foi evidenciado (figura 38) que alta administração de células tumorais impactou negativamente na capacidade de reconhecimento e ativação de linfócitos T CD8+ citotóxicos anti-ovalbumina.

Fig 38 – Avaliação citotóxica em linhagens tumorais viáveis inoculadas em altas quantidades. A) Ensaio de citotoxicidade *in vivo* em camundongos selvagens no 7º dia pós-inoculação de altas quantidades das linhagens Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA. Dados submetidos à análise estatística One-way ANOVA seguida por teste de Bonferroni. ns = não estatisticamente significativo. **B)** Avaliação microscópica do fenótipo celular viável antes da inoculação nos animais. Cada linhagem tumoral teve uma alíquota removida para coloração com azul de tripan e avaliação em microscopia óptica (objetiva de 40x).

4.10 Inoculação de altas quantidades de células tumorais em necrose é capaz de promover lise específica em animais que receberam Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA

Baseando-se na evidência de que a aplicação de uma alta quantidade de células tumorais resultam em uma piora do perfil de resposta celular específica, foi executado um novo ensaio de citotoxicidade *in vivo* para avaliação se o mesmo padrão se confirma quando estas linhagens são administradas na mesma quantidade só que em estado necrótico. O resultado do experimento (figura 39) indicou que os animais que receberam tanto Tm1.Luc.cOVA quanto Tm1.Luc.mOVA em estado necrótico conseguiram desenvolver uma resposta citotóxica anti-ovalbumina.

Fig 39 – Avaliação fenotípica e ensaio de citotoxicidade *in vivo* de animais inoculados com linhagens tumorais não-viáveis em altas quantidades. **A)** Resultado do ensaio de citotoxicidade *in vivo* em camundongos selvagens no 7º dia pós-inoculação de altas quantidades das linhagens necróticas: Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA. Dados submetidos à análise estatística One-way ANOVA seguida por teste de Bonferroni. ns = não estatisticamente significativo. **B)** Avaliação microscópica do fenótipo necrótico antes da inoculação nos animais. Cada linhagem tumoral, após a indução de necrose, teve uma alíquota removida para coloração com azul de tripan e avaliação em microscopia óptica (objetiva de 40x).

Para finalizar, a estratégia de gate utilizada para os experimentos de avaliação citotóxica com linhagens tumorais viáveis e não-viáveis encontra-se a seguir, destacando também as informações referentes à porcentagem de células totais em cada população: CFSE^{high}, CellTrace^{high}, CFSE^{low} e CellTrace^{low} (figura 40). É possível observar novamente que a capacidade de lise específica mostrou-se bastante similar nos 2 marcadores vitais (Cell Trace e CFSE), indicando de novo que o potencial citotóxico manteve-se semelhante independente da quantidade de peptídeo pulsado.

Fig 40 – Estratégia de gate e resultados das avaliações citotóxicas nos dias 7, 14 e 18 pós-inoculação tumoral de células viáveis e não-viáveis. Todas as amostras foram primeiramente analisadas para exclusão de aglomerados celulares (“doublets”) no gate com eixos: FSC-H x FSC-A. A seguir, a população selecionada foi utilizada para a confecção do segundo gate (exclusão de restos celulares ou “debris”) com eixos: SSC-H x SSC-A. O terceiro e último gate foi selecionado para a análise das 4 populações marcadas com os marcadores vitais Cell Trace e CFSE. (4 populações: CFSE^{high}, CellTrace^{high}, CFSE^{low} e CellTrace^{low}). O ensaio contou com as seguintes amostras: animais imunizados OVA+CFA, animais inoculados com Tm1.Luc, animais inoculados com Tm1.Luc.cOVA e animais inoculados com Tm1.Luc.mOVA. Os dados adquiridos no software FlowJo foram submetidos aos cálculos para obtenção da lise das células-alvo. Os valores de porcentagem média de células totais em cada um dos 4 gates (CFSE^{high}, CellTrace^{high}, CFSE^{low} e CellTrace^{low}), os quais são provenientes de 2 experimentos independentes, estão dispostos em seus respectivos gates. As porcentagens de cada gate (média e desvio padrão) foi também submetida à análise estatística One-way ANOVA, seguida por teste de Bonferroni. ns = não estatisticamente significativo, * (p<0,05), ** (p<0,01) e *** (p<0,001).

5 DISCUSSÃO

O câncer é caracterizado como uma doença resultante de um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que resultam em uma perda do controle do processo regulatório celular normal (McCormick, Milman, 2013; Tian et al., 2011). Em meados de 1960 iniciou-se uma discussão na comunidade científica a cerca de uma possível vigilância de tumores (sejam estes induzidos quimicamente ou espontâneos) por parte do sistema imunológico. Ao longo dos anos, membros centrais deste processo tais como: Linfócitos T, linfócitos B, células NK, células NKT, Interferons do tipo I e II e perforinas tiveram seus papéis cada mais elucidados (Kim et al, 2007).

No decorrer dos anos a confirmação da importância do papel do sistema imune no combate à tumores se tornou cada vez mais evidente e com isso, dezenas de instituições focaram suas pesquisas no intuito de investir na otimização e melhoria do perfil de resposta imunológica do hospedeiro frente ao câncer. Em 2013, a revista “Science” elegeu a “Imunoterapia do câncer” como o maior avanço do ano, em decorrência do surgimento de inúmeras ferramentas terapêuticas anti-tumorais altamente específicas, como por exemplo o uso de anticorpos monoclonais como anti-CTLA-4 (Ipilimumab), além da aplicação com sucesso de diversos protocolos clínicos especialmente para câncer de pele do tipo melanoma. Ainda usando como exemplo o Ipilimumab, pacientes com melanoma estadio III com alto risco de recidiva, demonstraram queda de 25% no risco relativo de recidiva tumoral (Eggermont et al., 2015) e aumento na expectativa de vida em torno de 2-5 anos (Schadendorf et al., 2015).

Embora tenhamos resultados bastante positivos ao longo dos anos em relação ao tratamento do câncer, foi-se observado que a incidência de casos de melanoma triplicou nas últimas 2 décadas (incidência global é de 15-25 pessoas a cada 100.000 indivíduos) (Hauschild, Schadendorf, 2014). Além disso, o melanoma continua sendo o maior responsável por mortalidades associadas ao câncer de pele mundialmente, em partes este fator é decorrente da dificuldade de tratamento de pacientes quando estes desenvolvem melanoma metastático. Até o momento, nenhum tratamento demonstrou aumento da sobrevida de pacientes quando estes encontravam-se com a forma metastática da doença (Maio, 2012). Ressalta-se que os estadios avançados do melanoma geralmente implicam em uma forte tolerância imunológica (Davar et al.,

2013) e que diante das limitações dos tratamentos atuais, existe então uma real necessidade do aparecimento de novos tratamentos, mais eficazes (Maio, 2012).

Tendo em vista as informações descritas acima, primeiramente nosso grupo de pesquisa optou por desenvolver um modelo experimental de melanoma que possibilitasse o estudo e a investigação de interações do sistema imune com o tumor. Para isso, o objetivo primordial era que o modelo apresentasse um antígeno conhecido (no caso: a ovalbumina) para que fosse possível o monitoramento e avaliação de respostas imunes específicas contra este antígeno, bem como a avaliação de respostas citotóxicas, produção de anticorpos anti-ovalbumina, entre outros. Associado à isto, a escolha da ovalbumina se mostrou interessante principalmente por compreender uma proteína amplamente utilizada em modelos experimentais mundialmente até os dias atuais em modelos como: Modelos de doenças crônicas como asma (Sharry et al., 2014); modelos de câncer (Wu et al, 2016), modelos envolvendo doenças infecciosas (Ladell et al., 2015), entre outros. Em função da ampla aplicação desta proteína em inúmeros trabalhos, é possível encontrarmos um vasto número de ferramentas analíticas disponíveis atualmente, como por exemplo: peptídeos de ovalbumina sintéticos, camundongos com TCR transgênicos para ovalbumina (tanto camundongos C57Bl/6 quanto linhagens Balb/c), anticorpos monoclonais anti-ovalbumina, pentâmeros, entre outros.

Além da expressão da ovalbumina, nosso laboratório optou em adicionar uma segunda proteína (luciferase), via tecnologia de construções bicistrônicas, para otimizar o modelo. Desta forma, o modelo possibilitaria a detecção, não-invasiva, do crescimento tumoral e o possível aparecimento de metástases. Ou seja, a utilização de linhagens tumorais que contém “*genes reporters*” auxilia a observação de tumores antes mesmo de se tornarem palpáveis e visualizadas a olho nu. O trabalho de Kim Jae-Beom e cols., em 2010, demonstrou o altíssimo grau de sensibilidade desta ferramenta demonstrando a detecção da emissão de bioluminescência dispondo-se apenas de uma única célula. Seu modelo construído a partir da linhagem tumoral 4T1 transduzida por partículas lentivirais contendo o cDNA da enzima “*luciferase firefly*” e submetido a diluições limitantes permitiu o isolamento de clones de celulares. Dispondo de grupos de animais C57Bl/6 nude, eles inocularam através de micro-injeções uma única célula em parte dos animais e em outros, a inoculação foi realizada com 10 células. O imageamento utilizando o equipamento IVIS Spectruim

(PerkinElmer), imediatamente após a administração das células evidenciou que a detecção de bioluminescência proveniente de uma única célula foi possível em alguns animais (Kim et al., 2010). Além da sensibilidade de detecção demonstrada acima, estratégias de monitoramento *in vivo* por bioluminescência constituem metodologias com alta aplicabilidade em diferentes linhagens celulares, principalmente em linhagens tumorais que resultam em massas tumorais profundas. Trabalhos utilizando modelos de osteossarcoma encapsulados informaram dificuldades na realização de medições físicas para acompanhamento do crescimento tumoral.

É também necessário enfatizar que o modelo visou assegurar como característica fundamental uma expressão sustentada e duradoura de ambas as proteínas (ovalbumina e luciferase), evitando-se a perda gradativa de expressão das mesmas. Para isso, as linhagens geradas foram obtidas utilizando-se vetores retrovirais, os quais representam estratégias adequadas para esta finalidade, uma vez que possuem a capacidade de integração no genoma da célula-alvo. Além disso, são vírus que oferecem simplicidade na inserção do cassete de expressão, rapidez para a produção do vírus, entre outras vantagens (Morales, 2007).

Como um objetivo complementar da construção do modelo, nosso grupo desejou avaliar uma possível contribuição imunogênica da proteína ovalbumina no sistema proposto. Para tal, desenvolvemos linhagens isentas de ovalbumina (controle negativo) e duas linhagens com diferentes apresentações desta proteína associada à membrana celular e citosólica, a fim de comparar a capacidade das ambas as proteínas em estimular uma resposta imune adaptativa específica. Inúmeros trabalhos, envolvendo diferentes abordagens, já demonstraram que a presença da ovalbumina em linhagens tumorais pode auxiliar no reconhecimento imunológico do tumor. Brown DM e cols, utilizando uma linhagem pouco imunogênica de câncer de pulmão denominada “Line 1” foi transfectada com ovalbumina para avaliação se havia uma melhoria imunogênica. A linhagem foi então administrada *in vivo* e resultou na presença de células B anti-OVA nos linfonodos drenantes e altas concentrações de anticorpos IgG anti-OVA no soro destes animais. Os pesquisadores também compararam a resposta imunológica obtida com a resposta de animais que receberam ovalbumina emulsionada em “Adjuvante Completo de Freud” (CFA). Eles observaram que os títulos de anticorpos IgG-anti OVA era bem semelhante entre estes 2 grupos (Brown et al., 2001). Atualmente muitos outros trabalhos têm sido publicado

demonstrando o potencial da ovalbumina principalmente como um possível adjuvante na resposta anti-tumoral. Como um dos exemplos podemos citar o trabalho de Prato S e cols, o qual evidenciou, em um modelo de linfoma de células B expressantes de ovalbumina, que camundongos previamente imunizados com OVA e em seguida inoculados com o tumor tornavam-se susceptíveis à morte mediada por linfócitos T CD8+ citotóxicos anti-OVA (Prato et al., 2011).

É necessário ressaltar que para a execução do modelo proposto neste projeto, inúmeras ferramentas de biologia molecular foram empregadas neste projeto já descritas anteriormente e, após com a criação das linhagens recombinantes, o próximo passo implicou primeiramente na avaliação de bioluminescência dos clones obtidos em cada linhagem. Conforme já descrito mais detalhadamente na metodologia, os clones considerados positivamente transduzidos apresentaram sinal de bioluminescência, quando submetidos ao “Ensaio de luciferase” e foram selecionados para a confecção do “pool celular”. A decisão de trabalharmos com o “pool celular” ao invés de utilizarmos apenas clones, é justificada pela tentativa de uniformizar as linhagens recombinantes (Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA). Em outras palavras, torná-las mais homogêneas entre si, reduzindo possíveis variações intrínsecas das linhagens como por exemplo: variações de expressões proteicas ou mutações ocasionais.

Com a construção dos “pools celulares”, evidenciamos que os valores discrepantes encontrados com a emissão de bioluminescência entre os clones, mostraram-se muito mais equivalente entre as linhagens com o emprego desta abordagem. Além disso, em termos de crescimento *in vitro*, os “pools celulares” também demonstraram uma maior similaridade de valores (diferença estatística não-significativa, figura 26).

No que diz respeito à expressão de RNAm (figuras 24 e 25) a expressão relativa de ovalbumina e luciferase entre as linhagens Tm1.Luc.mOVA e Tm1.Luc.cOVA mostrou-se extremamente semelhante. No entanto, quando comparamos a expressão relativa de RNAm luciferase (figura 24) da linhagem Tm1.Luc em relação às linhagens Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA, é possível observamos que o vetor vazio (Tm1.Luc) demonstrou uma quantidade de RNAm relativamente superior do que as linhagens expressantes de ovalbumina. Este resultado pode ser decorrente de uma maior transdução das células Tm1, durante a geração da linhagem Tm1.Luc, com as

partículas retrovirais, em relação as outras duas linhagens. Ou seja, uma vez que a titulação viral não foi realizada em nossos experimentos, a linhagem-alvo (Tm1) pode ter recebido um número maior de partículas retrovirais recombinantes, durante o processo de transdução, que poderia então, resultar em uma expressão gênica diferenciada em comparativo com as demais linhagens (Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA). Esta constatação gerou um questionamento a cerca de um possível impacto negativo em nossos experimentos futuros. No entanto, quando analisamos todos os resultados de emissão de bioluminescência *in vivo* (utilizando o equipamento IVIS Spectrum) em comparação com os valores obtidos de volume tumoral (utilizando o paquímetro manual), observamos que esta relação entre estes dois experimentos, se mantêm, em praticamente todos os experimentos realizados, semelhante. Em outras palavras, nota-se uma correspondência similar entre os valores de bioluminescência *in vivo* e a medição manual com auxílio do paquímetro. Com isso, desacreditamos que o resultado de RNAm para luciferase obtido possa impactar negativamente em nossos resultados, no que diz respeito à avaliação do crescimento tumoral entre as linhagens. Ainda associado à isto, uma vez evidenciado que as três linhagens mostraram valores satisfatórios em termos de expressão de RNAm de ovalbumina (figura 25) (ausência de RNAm de ovalbumina na linhagem Tm1.Luc e valores altamente semelhantes nas linhagens expressantes de ovalbumina), consideramos este último dado como um aspecto bastante positivo para a execução das próximas etapas. Desta forma, juntamente com os demais resultados *in vitro*, ficou determinado então que as linhagens estavam prontas para serem aplicadas nos ensaios *in vivo*.

Inicialmente, conforme já descrito anteriormente, avaliamos a cinética de emissão de bioluminescência das linhagens quando inoculadas em camundongos C57Bl/6 e posteriormente imageados no equipamento IVIS Spectrum (PerkinElmer). O trabalho de Shan (2008), demonstraram, através da utilização de linhagens bioluminescentes de câncer de mama MDA-MB-231-Luc, que o tempo de exposição ao substrato, para que as células atinjam a intensidade máxima do sinal, difere significativamente do tipo de linhagem tumoral utilizada, independente do volume tumoral da mesma (Shan et. al., 2008) Assim, enfatiza-se a necessidade de padronização da cinética de emissão de bioluminescência para cada modelo

desenvolvido. Ao término desta etapa, procedemos avaliando o perfil de crescimento tumoral das linhagens nos animais C57Bl/6.

Na cinética tumoral *in vivo* foi constatada inicialmente que os tumores das 3 linhagens inoculadas tornam-se visíveis e palpáveis a partir do 7º dia pós-inoculação, o que é coerente com o que já foi descrito a questão da linhagem Tm1. Durante a construção da linhagem Tm1 em 2006, a inoculação da mesma *in vivo* subcutâneamente no flanco de animais C57Bl/6 selvagens (1×10^6 células/animal) demonstrou que o crescimento desta linhagem apresentava um período de latência. Ou seja, o aparecimento dos tumores foi evidenciado apenas no 10º dia. Além disso, neste mesmo trabalho, os pesquisadores apontam um fenótipo agressivo desta linhagem com detecção de metástases espontâneas em linfonodos, mediante a inoculação desta quantidade celular (Oba-shinjo et al, 2006). Em nossos resultados, após o 7º dia pós-inoculação tumoral, não foi evidenciada nenhuma diferença estatística no perfil de crescimento das linhagens recombinantes. A diferença estatística ($p < 0,01$) foi observada quando comparada as linhagens: Tm1.Luc.cOVA em relação à Tm1.Luc, no 17º dia pós-inoculação. Levando-se em consideração que modelos de tumor subcutâneos já demonstraram que o uso de medidas físicas (ferramentas mecânicas ou eletrônicas) não representa um método minucioso de análise, uma vez que a presença de centros necróticos e edema contribuem para o aumento do volume tumoral (Vaupel et al., 1989), todos os animais utilizados neste estudo tiveram seus tumores removidos no último dia do protocolo (17º) para a confecção de lâminas histológicas. Como etapas futuras, estas lâminas serão avaliadas para investigação do micro-ambiente tumoral, através de colorações histológicas (hematoxilina-eosina) e ensaios específicos de imuno-histoquímica para caracterização celular.

Ressalta-se que, enquanto inúmeros trabalhos demonstram que a presença de edemas e infiltrados inflamatórios contribuem para o desenvolvimento e progressão dos tumores, é possível encontrar relatos e publicações constatando que a intensidade de infiltrado linfocítico resulta em um bom prognóstico (Nakano et al., 2001). Ou seja, a infiltração de células do sistema imune no micro-ambiente tumoral pode acarretar em uma resposta anti-tumoral benéfica ao hospedeiro, ao mesmo tempo que o infiltrado celular também pode gerar respostas promotoras à tumorigênese e inibitórias da resposta imune anti-tumoral. Acredita-se que esses

papéis controversos sejam dependentes da composição do infiltrado celular (Balkwill, Crusz, 2015).

Considerando ainda o resultado de cinética de crescimento tumoral *in vivo* (figura 29) foi estabelecida a hipótese de que o aumento significativo no volume tumoral encontrado na linhagem Tm1.Luc.cOVA poderia ser então decorrente de um infiltrado inflamatório no micro-ambiente tumoral. O micro-ambiente tumoral é basicamente constituído por células tumorais proliferativas, estroma tumoral, vasos sanguíneos, infiltrado de células inflamatórias e demais células associadas ao tecido. O infiltrado inflamatório inclui células da imunidade adaptativa como linfócitos T, linfócitos B e células dendríticas, bem como células da imunidade inata: células NK, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares.

Considerando que a população de células do sistema imune de maior prevalência no micro-ambiente tumoral são os linfócitos infiltrantes de tumor (Whiteside, 2008), e que a linhagem Tm1.Luc.cOVA expressa o antígeno OVA via MHC I o qual é reconhecido por linfócitos T CD8+, é, portanto, esperado que esta linhagem tenha um aumento no volume tumoral em comparação com outras linhagens (Tm1.Luc e Tm1.Luc.mOVA), fruto de um possível reconhecimento antigênico e consequente estímulo de respostas imunes específicas. Assim, este fato estaria em concordância com os resultados obtidos. Em alguns casos, devido à mecanismos de evasão tumoral, inúmeros TIL apresentam comprometimento de sinalização via receptor de linfócito T (TCR), bloqueio na proliferação celular, incapacidade de mediar citotoxicidade, entre outros (Balkwill, Crusz, 2015). Assim, acreditamos também que a presença de um antígeno tumoral extra (representado pela ovalbumina) auxiliaria o sistema imunológico no reconhecimento do tumor e na ativação de uma resposta imune anti-tumoral, conforme já foi descrito anteriormente em modelos de tumores que expressam ovalbumina.

Quando analisamos ainda o mesmo resultado de cinética tumoral *in vivo*, observamos que não houve diferença estatística significativa no crescimento da linhagem Tm1.Luc.mOVA, em relação às demais. Acreditamos que a linhagem Tm1.Luc.mOVA, em decorrência de possuir a ovalbumina na forma associada à membrana celular e, portanto, estar relacionada preferencialmente à uma indução de resposta imune do tipo humoral, acabe estimulando uma resposta anti-tumoral mais fraca quando comparada à linhagem Tm1.Luc.cOVA, o qual observamos uma

alteração significativa no padrão de crescimento celular. Esta especulação baseia-se no fato da contribuição das células B na resposta anti-tumoral ainda não ser totalmente elucidada e mais recentemente trabalhos têm demonstrado um papel contraditório destas células, conforme já abordado anteriormente.

Para avaliarmos se de fato o sistema imunológico adaptativo estava tendo um participação em nosso modelo tumoral, inoculamos as linhagens tumorais Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA em animais imunodeficientes C57Bl/6 RAG2^{-/-}. Estes animais possuem a deleção das enzimas recombinases Rag1 ou Rag2, os quais são necessárias no reconhecimento e no rearranjo somático das imunoglobulinas em linfócitos B e dos receptores de linfócitos T. Para que a ação catalítica ocorra, é necessária a presença de ambas proteínas. Com isso, a deleção do gene RAG2 ocasiona o bloqueio da geração de linfócitos T e B (Shinkai et al., 1992). Neste mesmo trabalho, Shinkai (1992) também observaram que estes camundongos apresentavam seus baços, timos e linfonodos com tamanho bastante reduzido e hipoplásico. No entanto, foi evidenciado um número significativamente aumentado de células NK no baço, juntamente com um aumento de macrófagos e outros granulócitos, quando comparados com animais imunocompetentes. Os pesquisadores atribuíram estes resultados à uma possível expansão clonal destas populações no sentido de compensar a ausência da população de linfócitos maduros (Shinkai et al., 1992). A contribuição destas células, bem como outros membros da imunidade inata na resposta anti-tumoral está sendo cada vez mais demonstrada ao longos dos anos.

As células denominadas “Natural Killer” (células NK) são células efetoras linfóides identificadas em camundongos pela primeira vez em 1975. Em 1981, foi demonstrada a capacidade destas células em inibir a metástase tumoral *in vivo* (Hanna, Burton, 1981). Outro trabalho demonstrou a resistência ao crescimento tumoral promovida por células NK, principalmente através da produção de mediadores anti-angiogênicos (Hayakawa et al., 2002). Mais recentemente, foi demonstrado que camundongos imunodeficientes para o sistema imune adaptativo, na presença de sarcomas induzidos por MCA, mediam a indução de macrófagos M1 por ação das células NK juntamente com IFN γ (O’Sullivan et al., 2012). Estas células, denominadas macrófagos M1, são componentes do sistema imune inato e da família dos chamados “Macrófagos associados à tumores” (TAM).

Através da produção de altas quantidades da citocina IL-12 e baixas quantidades de IL-10, esta população contribui para o controle do desenvolvimento tumoral (Hagemann T et al., 2006). Em contrapartida, macrófagos com fenótipo M2 estão associados com a imunossupressão do micro-ambiente tumoral, produzindo citocinas como IL-4 e IL-10 (Burugu et al., 2016; Medrek et al., 2012). As células T gamma-delta e as células NKT são exemplos de outras populações celulares pertencentes ao sistema imune inato e que, portanto, estão presentes nos animais C57Bl/6 RAG2^{-/-} e possuem relatos na literatura a cerca de papéis anti-tumorais. Camundongos deficientes de células T gamma-delta apresentam um aumento na incidência de tumores induzidos por DMBA/TPA (Girardi et al., 2001). Estas células, quando ativadas, produzem citocinas efetoras (INF γ e TNF α), além de desempenhar atividade citolítica (Kondo et al., 2008). Em relação às células NKT, existem inúmeras publicações demonstrando a atividade anti-tumoral desta população. No entanto, relatos também demonstram uma possível função paradoxal destas células durante o desenvolvimento tumoral, decorrente da capacidade inerente das mesmas em produzirem citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (de Visser et al., 2006; Godfrey, Smyth, 2000).

Considerando os trabalhos descritos acima a cerca da imunidade inata juntamente com o que já foi demonstrado a respeito dos animais C57Bl/6 RAG2^{-/-}, acreditamos que nossos resultados de crescimento tumoral sejam condizentes como o esperado. Ou seja, nas figuras 30, 31 e 32, observamos que nas duas primeiras semanas pós-inoculação tumoral, o padrão de crescimento entre as linhagens são relativamente semelhantes ao padrão de crescimentos das mesmas quando estas são inoculadas nos animais RAG2^{-/-}. Acreditamos então, que neste período, os animais imunodeficientes estejam conseguindo controlar até certo ponto o crescimento tumoral, possivelmente com auxílio da imunidade inata. No entanto, com o contínuo crescimento da massa tumoral, a falta da existência do sistema imune adaptativo nestes animais imunocomprometidos impacta decisivamente na perda do controle do crescimento tumoral. Isso pode ser evidenciado quando analisamos os valores de volume tumoral referentes aos dias 14^o e 17^o pós-inoculação. No entanto, o fato da linhagem Tm1.Luc.cOVA quando inoculada em animais imunodeficientes, não ter gerado diferença no perfil de crescimento de maneira estatisticamente significativa

(figura 32) não é de completa compreensão de nosso grupo de pesquisa. Enfatizando a necessidade de maior investigação futura.

Em uma terceira abordagem, decidimos avaliar se a administração prévia da proteína ovalbumina emulsionada com “Adjuvante Completo de Freund” (CFA) nos animais selvagens C57Bl/6 (protocolo de imunização), impactaria no padrão de crescimento tumoral das linhagens Tm1.Luc, Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA, quando as mesmas eram inoculadas 7 dias após a imunização dos animais. Uma vez que vacinações com proteínas ou peptídeos purificados comumente resultam em uma resposta imunológica fraca ou em alguns casos, em indução de tolerância, optamos por utilizar um adjuvante bacteriano (CFA) já conhecido, há décadas, por induzir fortes respostas imunes, principalmente devido à habilidade do componente micobacterial do CFA em ativar células apresentadoras de antígenos (APC), como por exemplo células dendríticas. A ativação das mesmas resulta em aumento de moléculas co-estimulatórias e produção de IL-12 (Freund, 1956).

Os nossos resultados (figuras 33, 34 e 35) indicam que a imunização prévia dos animais altera o padrão de crescimento tumoral no 17º dia nas linhagens expressantes de ovalbumina, mas não na linhagem não-expressante de ovalbumina (Tm1.Luc). Assim, o resultado mostra-se condizente com o padrão esperado, o qual demonstra que a imunização com ovalbumina seguida do desafio com linhagens expressantes de ovalbumina, resulta na mudança do perfil de crescimento tumoral; enquanto na linhagem não-expressante de ovalbumina, a imunização não parece influenciar o perfil de resposta. Acreditamos também na possibilidade de que o aumento significativo no volume tumoral das linhagens Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA em animais imunizados deva-se à uma maior ativação das células do sistema imune e consequente migração e infiltração tumoral, em resposta à imunização.

Imunizações envolvendo CFA já foram demonstradas como ativadoras de células imunes, principalmente em linfócitos T CD4+, como por exemplo no trabalho de Shibaki A e cols. Neste trabalho, os pesquisadores utilizaram a estratégia de imunização OVA+CFA em comparação com a imunização OVA+IFA (“Adjuvante Incompleto de Freud”, o qual não possui material micobacterial). A primeira imunização induziu fortes respostas de células T CD4+ auxiliares do tipo I (Th1), as quais são responsáveis por produzir IFN γ e IL-2, envolvidas na indução da

imunidade celular. A segunda imunização implicou em uma resposta de células T CD4⁺ auxiliares do tipo II (Th2), mais voltada à indução de imunidade humoral (produção de IL-4, 5 e 10) (Mosmann et al., 1989; Shibaki et al., 2002). Além disso, ambas imunizações resultaram em estímulo de células dendríticas com liberação de IL-12, além do aumento na expressão de moléculas co-estimulatórias nestas mesmas células (Shibaki et al., 2002).

Vale ressaltar que ao longo dos anos inúmeras estratégias de vacinação foram surgindo e estão sendo aplicadas amplamente atualmente em modelos experimentais de tumor, em decorrência dos resultados positivos gerados. Mais recentemente, foi publicado um trabalho envolvendo a administração de uma combinação de adjuvantes e a verificação do efeito estimulador anti-tumoral, entre eles haviam agonistas de “Toll-Like Receptores” 7, 3 e 4, juntamente com ovalbumina proteína e um agonista de moléculas de superfície CD40 (efeito ativador de células dendríticas, células B, entre outros). Com a utilização desta combinação de adjuvantes, os pesquisadores evidenciaram a indução de respostas imunes adaptativas no sentido de rejeição tumoral em animais desafiados com a linhagem tumoral EG7.OVA, inicialmente descrita como não-imunogênica. Em relação à resposta imune inata, também foi observado um aumento no número de células dendríticas e células NK (Aranda et al., 2011).

O trabalho de Rowe (2006), através do uso de diferentes vetores lentivirais recombinantes: Vetores expressantes de ovalbumina na forma secretada, citoplasmática, membrana (com receptor de transferrina) e ovalbumina fusionada com a cadeia invariante, constataram que a imunização prévia dos camundongos utilizando os vetores recombinantes seguido do desafio com uma linhagem tumoral que expressa ovalbumina (EG7.OVA) resultou em uma proteção significativa frente ao desafio tumoral. Mais especificamente, todos os vetores administrados resultaram em uma resposta de linfócitos T CD4⁺. Além disso, o vetor retroviral contendo a ovalbumina associada à cadeia invariante mostrou-se fortemente indutor de respostas tanto de linfócitos TCD4⁺ quanto de linfócitos TCD8⁺, além de demonstrar proteção completa de todos os animais frente ao desafio tumoral. Ou seja, apenas 2/10 dos animais desenvolveram o tumor, o qual acabou regredindo dentro de 1 semana (Rowe et al., 2006). Além dos exemplos citados, diversas outras estratégias de imunização

com o uso de células dendríticas e vetores virais também já foram amplamente descritas e demonstradas com atividade adjuvante anti-tumoral.

Após a avaliação de um efeito modulador do crescimento tumoral induzido pela estratégia de imunização com ovalbumina, decidimos investigar se o nosso modelo experimental também induzia um efeito citotóxico mediado por linfócitos T CD8+ citotóxicas em resposta à presença de ovalbumina. Para isso, procedemos com o Ensaio de Citotoxicidade *in vivo*. O ensaio, como já descrito anteriormente, visa o reconhecimento específico de um antígeno alvo pelas células T CD8+ citotóxicas (CTL), no caso a ovalbumina, e consequente eliminação das células-alvo (linhagens expressantes de ovalbumina). Estas células apresentam uma alta especificidade de resposta e eficácia na morte de células tumorais e células infectadas por patógenos intra-celulares, mesmo na presença de uma densidade antigênica baixa na superfície da célula-alvo (Matsumura et al., 1992) . Conforme já descrito anteriormente, o mecanismo pelo qual a célula T CD8+ citotóxica atua envolve a formação de Sinapses Imunológicas a partir do contato célula-célula a partir do reconhecimento específico do Receptor de Célula T (TCR) com peptídeo apresentado no interior da fenda do Complexo Principal de Histocompatibilidade do tipo 1 (MHC 1), com consequente liberação de mediadores citotóxicos que culminam na morte da célula-alvo (Basu et al., 2016; Stinchcombe et al., 2007). Quando analisamos os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade *in vivo*, notamos primeiramente que os animais que receberam as linhagens Tm1.Luc e Tm1.Luc.mOVA não demonstraram lise específica das células alvo pulsadas com o peptídeo SIINFELK em nenhum dos dias (7º, 14º e 18º pós-inoculação tumoral). Considerando que este ensaio visa avaliar resposta celular mediada por linfócitos T CD8+ citotóxicos e que linhagem Tm1.Luc.mOVA está mais relacionada à estimulação de respostas humorais específicas para OVA ao invés de respostas celulares, é esperado que a linhagem Tm1.Luc.mOVA não tenha, ou tenha pouca participação na estimulação de células TCD8+; embora exista a possibilidade, mas menos provável, em comparação com a linhagem Tm1.Luc.cOVA, da ovalbumina na linhagem Tm1.Luc.mOVA, ser apresentada via MHC de classe I. Ao mesmo tempo, também é racional que a linhagem vetor vazio (Tm1.Luc), por não apresentar o antígeno ovalbumina, não seja capaz de estimular uma resposta anti-OVA. Ainda em concordância com o esperado, a linhagem que apresenta a ovalbumina na forma citosólica e portanto, induz respostas preferencialmente de

linfócitos T CD8+, demonstrou lise específica das células-alvo. E esta, mostrou-se estatisticamente significativa em relação ao controle negativo (Tm1.Luc).

Ainda em relação aos mesmos resultados, observamos que o padrão de lise específica (estatisticamente significativa) nos animais imunizados com OVA+CFA demonstrou-se semelhante as fases, já bem descritas, de uma resposta imune primária. Sendo que esta, na presença de um antígeno, é iniciada primeiramente por ação do sistema imune inato e posteriormente ocorre a estimulação das células especializadas do sistema imune adaptativo. Resumidamente, em média, a ativação destas células com consequente expansão clonal e diferenciação para o fenótipo efetor leva cerca de 7 dias, o qual ocorre no interior de órgãos linfóides. Após o 7º dia, as células efetoras migram para o sítio de ação e iniciam a eliminação das células-alvo (imunidade humoral ou imunidade celular) até aproximadamente o 14º dia. A partir daí, as populações celulares efetoras passam pela fase de “contração clonal”, o qual implica na morte celular por apoptose, restando apenas células de memória (Abbas et al., 2011). Ressalta-se também que a natureza do antígeno bem como a via de inoculação utilizada podem alterar o tempo de resposta gerada (Ademokun, Dunn-Walters, 2010). É necessário enfatizar que mediante quadros infecciosos ou a presença de estímulos crônicos (como no caso do câncer ou em doenças auto-imunes), as fases clássicas da resposta imune podem ser drasticamente alteradas, o qual será discutido mais adiante, no contexto de “Cancer-Immunity Cycle”.

Ainda em nossos resultados, as figuras 36 e 37 referentes aos ensaios de citotoxicidade *in vivo* realizado nos dias 7, 14 e 18 pós-inoculação tumoral, demonstram que no 7º dia pós-inoculação, a porcentagem de células-alvo vivas é menor do que a porcentagem das mesmas quando estas são avaliadas nos dias 14º e 18º. Isto indica que de fato, no 7º dia, temos uma evidente população de células TCD8+ citotóxicas anti-ovalbumina no baço destes animais, o que é condizente com os dados descritos na literatura. E, no decorrer dos dias, foi observado o decaimento gradual destas células no baço, indicando que as mesmas possivelmente já encontram-se nas demais fases da resposta imune. Estes resultados também confirmam que a imunização com OVA+CFA é eficaz e capaz de estimular linfócitos T CD8+.

Para a análise dos demais animais (animais que receberam Tm1.Luc.cOVA e Tm1.Luc.mOVA) submetidos ao ensaio de citotoxicidade *in vivo*, devemos considerar

algumas informações encontradas na literatura a cerca das respostas imunes anti-tumorais. Uma publicação recente denominou a série de eventos envolvidos na resposta imune anti-tumoral como “Cancer-Immunity Cycle” (CIC). De acordo com os autores da publicação, a primeira etapa do CIC envolve captação de neoantígenos por células apresentadoras de antígenos, principalmente as células dendríticas juntamente com a geração de sinais imunogênicos (citocinas pró-inflamatórias, DAMPS e outros). A seguir, os neoantígenos capturados e apresentados para ativação de células T efectoras. A seguir, usando como exemplo as células T CD8+ efectoras, ocorre uma migração para o sítio tumoral e infiltração. Com o reconhecimento do neoantígeno-alvo, as células T CD8+ efectoras exercem seu efeito citotóxico (Chen, Mellman, 2013). Em muitos aspectos, as etapas agora descritas se assemelham muito ao perfil normal de ativação da resposta imune primária. Porém, pela existência de uma cronicidade no estímulo imunogênico decorrente do tumor; ou seja, a lise celular promovida pelo ataque do sistema imune ao tumor e por conseguinte liberação de mais neoantígenos, a resposta neste caso é considerada “cíclica” em decorrência de um re-estímulo constante.

Baseando-se no que se foi proposto a cerca do CIC e caso este racional fosse aplicado em nossos resultados de citotoxicidade *in vivo* nos animais que receberam as linhagens expressantes de OVA (no caso, a Tm1.Luc.cOVA, dada a sua preferência em ativar células TCD8+), imaginaríamos detectar respostas citotóxicas durante todos os dias avaliados (7º, 14º e 18º). Ao contrário deste racional, obtivemos resposta citotóxica apenas no 7º dia, em animais que receberam Tm1.Luc.cOVA (figuras 36 e 37). No entanto, devemos considerar também que ao decorrer dos dias, uma vez que o sistema imune não é extremamente eficaz no combate anti-tumoral, a massa tumoral continua proliferando e com isso, pode-se ocorrer certas alterações bem como: Promoção de angiogênese, o qual conforme já publicado, VEGF prejudica a função de células dendríticas e a maturação de precursores hematopoiéticos CD34+ (Coukos, Motz, 2014; Gabrilovich, 1996); liberação de mediadores supressores (IL-10, TGF β) entre outros, e que acabam impactando na eficiência da resposta imune anti-tumoral. Também já foi descrito que a ativação crônica das células do sistema imune inato pode indiretamente contribuir para o crescimento tumoral mediante a supressão de respostas imunes adaptativas (de Visser et al., 2006). Uma das populações

responsáveis por este efeito são as células denominadas células mielo-derivadas supressoras (do inglês: “*Myeloid-derived Suppressor Cells*” ou MDSC).

As células mielo-derivadas supressoras podem ser divididas em 2 populações. Uma população que compreende neutrófilos imaturos remanescentes e o restante apresenta um fenótipo semelhante á monócitos. Estas células já foram descritas por exercerem um papel inibitório potente em células NK, linfócitos T e na maturação de células dendríticas (Almand et al., 2001; Gabrilovich et al., 2007; Stockmann et al., 2014). Estas células podem ser encontradas em vários modelos murinos (Kusmartsev et al., 2002) e contribuir também para a neoformação de vasos sanguíneos no tumor por liberação de uma proteína denominada Bv8 (Shojaei et al, 2007).

Em 2011 já havia sido demonstrado a capacidade do endotélio tumoral em atuar como uma barreira seletiva, permitindo o tráfego de células T reguladoras (Tregs) para o interior dos tumores ao mesmo tempo que impedia o influxo de células T CD8+ (Shetty et al, 2011). Mais recentemente, o trabalho de Motz (2014), também evidenciou este fenômeno. Além disso, os pesquisadores também identificar que o mecanismo regulador deste permeabilidade seletiva era dependente da expressão de FasL pelo endotélio tumoral. Além disso, fatores como: VEGF-A, IL-10 e PGE2 estimulavam a expressão de FasL por estas células e por sua vez, conseguiam promover a morte das células T CD8+ mas não das células T reguladoras, em função da alta expressão da molécula c-FLIP nestas células (Motz et al., 2014).

Considerando o que foi descrito brevemente acima a cerca da resistência tumoral à ação do sistema imune e, retomando novamente os resultados de citotoxicidade *in vivo*, podemos especular que a ausência de respostas citotóxicas nos demais dias (14^o e 18^o), nos animais que receberam Tm1.Luc.cOVA, mostra-se coerente. Pensando neste raciocínio, decidimos então testar como seria a resposta citotóxica no 7^o dia, caso as linhagens tumorais fossem administradas em doses bem superiores às habituais em nosso modelo (20 vezes maior). Realizada esta abordagem, observamos que praticamente não houve eliminação das células-alvo pulsadas com ovalbumina em nenhum dos animais (figura 38), independente da linhagem tumoral inoculada. Uma possível explicação é que a inoculação da quantidade habitual de células tumorais (2.5×10^5 células/animal) seja capaz de estimular uma resposta citotóxica nos animais que receberam Tm1.Luc.cOVA, uma vez que a quantidade inoculada ainda permite um reconhecimento antigênico e

estímulo da imunidade adaptativa. A partir do momento em que inoculamos um número superior de células tumorais (5×10^6 células/animal) e com isso, aceleramos o crescimento tumoral, acreditamos que os mecanismos de evasão tumoral e mecanismos imunossupressores sejam mais rapidamente desenvolvidos nestes tumores, dificultando o reconhecimento e atuação por parte do sistema imune.

Em nossos últimos experimentos, ainda investigando a participação das células T CD8+, testamos novamente a inoculação da alta quantidade de células tumorais (5×10^6 células/animal) só que administrando as mesmas no estado necrótico para posterior avaliação da citotoxicidade 7º dia depois. O resultado deste experimento demonstrou uma diferença significativa na eliminação das células-alvo tanto em animais que receberam Tm1.Luc.cOVA não-viável quanto em animais inoculados com Tm1.Luc.mOVA não-viável, em comparação ao grupo controle negativo (Tm1.Luc não-viável) (figura 39) Este resultado demonstrou que a administração de células necróticas promove uma melhoria no reconhecimento do antígeno ovalbumina e ativação de células efectoras específicas. Acreditamos que a inoculação do extrato celular necrótico além de facilitar a exposição dos neoantígenos para as células residentes, contribui também com a exposição de DAMPS e consequente ativação celular, conforme já descrito em diversas publicações inicialmente em um contexto de “morte celular imunogênica” (Aaes et al, 2016).

Um trabalho recente avaliou a resposta imune *in vivo* contra um tumor cerebral, sob o contexto de imunização utilizando células dendríticas pulsadas com células tumorais necróticas. Os resultados deste trabalho demonstraram que a vacinação tanto no sentido profilático quanto no contexto de tratamento culminaram em um aumento de células TCD4+ auxiliares do tipo 1 (Th1) infiltrantes no cérebro juntamente com a redução de células T reguladoras, TAMs e MDSC (Vandenberk et al, 2014). Outra publicação demonstrou que a vacinação com células em necroptose com liberação de DAMPs promove a maturação de DCs, uma apresentação cruzada de antígenos com consequente ativação de CTLs *in vivo*, além de uma potente produção de IFN γ *ex vivo* (Aaes et al, 2016). Ressaltamos também que a administração das células tumorais não-viáveis em nosso modelo tumoral, inviabiliza qualquer influência imunossupressora e mecanismo de evasão que a linhagem tumoral poderia se beneficiar.

É necessário que seja enfatizado que todos os animais utilizados neste estudo tiveram alíquotas de sangue extraídas para processamento de seus soros e posterior dosagem de anticorpos anti-ovalbumina nos pontos 7º, 14º e 18º pós-inoculação tumoral. Além disso, animais selvagens, imunodeficientes e previamente imunizados com posterior inoculação tumoral, tiveram seus tumores removidos no último dia do protocolo para a confecção de lâminas histológicas para avaliação do infiltrado tumoral. No atual momento, as amostras estão sendo processadas no Laboratório de Histotecnologia do Instituto de Ciências Biomédica IV para a confecção de lâminas coradas com o corante hematoxilina-eosina. Como perspectivas futuras, as lâminas histológicas serão analisadas e caso seja evidenciada a presença de um infiltrado celular, os materiais serão submetidos à técnicas de imunohistoquímica para caracterização celular. Além disso, os soros dos animais já armazenados serão submetidos aos ensaios de ELISA para a detecção de anticorpos específicos anti-OVA (IgM, IgG1 e IgG2a).

Para finalizar, consideramos que o modelo tumoral desenvolvido neste projeto atendeu todas as características desejadas e esperadas (expressão dos genes de interesse, cinética de crescimento *in vitro* semelhante, perfil de expressão semelhante, entre outros). Além disso, os resultados obtidos nos ensaios *in vivo* são bastante condizentes com as informações presentes na literatura e demonstram que o modelo se mostra extremamente aplicável para diversos estudos futuros. Ainda associado a isso, conseguimos também demonstrar que a aplicação de estratégias de vacinação podem ativar o sistema imune no fortalecimento de uma resposta anti-tumoral, enfatizando mais uma vez na importância do desenvolvimento e aplicação de estratégias adjuvantes no combate ao câncer.

6 CONCLUSÃO

- O emprego das técnicas de clonagem molecular resultou na produção bem-sucedida dos vetores recombinantes desejados.
- A transdução da linhagem alvo de melanoma com as partículas retrovirais recombinantes resultou na expressão dos genes de interesse.
- A confecção dos pools celulares conferiu maior homogeneidade entre as linhagens recém-transduzidas.
- A inoculação das linhagens tumorais recombinantes em animais selvagens, resultou em um volume tumoral significativamente maior no 18º dia pós-inoculação, nos animais que receberam a linhagem Tm1.Luc.cOVA, em relação aos demais.
- A inoculação das linhagens tumorais recombinantes em animais imunodeficientes, resultou em um volume tumoral significativamente maior no 14º e 18º dia pós-inoculação, nos animais que receberam as linhagens Tm1.Luc.mOVA e Tm1.Luc, em relação aos demais.
- Imunização prévia dos animais com ovalbumina e posterior inoculação das linhagens tumorais, altera o perfil de crescimento tumoral dos animais selvagens inoculados com as linhagens expressantes de ovalbumina.
- Animais selvagens inoculados com as linhagens tumorais recombinantes demonstraram lise específica das células-alvo mediante a execução do ensaio de citotoxicidade *in vivo*, somente quando estes foram inoculados com a linhagem Tm1.Luc.cOVA e o ensaio, realizado no 7º dia pós-inoculação.
- A inoculação de altas quantidades de células tumorais viáveis em animais selvagens não resulta em lise específica das células alvo. Em contrapartida, a inoculação de células necróticas implica em lise específica em animais que receberam as linhagens expressantes de ovalbumina e foram submetidos à avaliação citotóxica 7º dias após.

REFERÊNCIAS*

Aaes TL, Kaczmarek A, et al. Vaccination with Necroptotic Cancer Cells Induces Efficient Anti-tumor Immunity. *Cell*. 2016;15:1-14.

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. São Paulo: Elsevier; 2011. 545p.

Ademokun AA, Dunn-walters D. *Immune response: primary and secondary*. London: John Wiley & Sons; 2010:1-10.

Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *Journal of Immunology*. 2001;166(1):678–89

American Cancer Society. Rising Global Cancer Epidemic. Disponível em: <<http://www.cancer.org/research/infographicgallery/rising-global-cancer-epidemic>> acesso em: 27 de julho de 2016.

American Cancer Society. Melanoma Skin Cancer. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003120-pdf.pdf>> acesso em: 26 nov 2013.

Barnhill R, Mihm MC, Elgart G. Malignant Melanoma. *Skin Cancer*. 2008;11:140-63.

Basu R, Whilock BM, et al. Cytotoxic T cells use mechanical force to potentiate target cell killing. *Cell*. 2016;165(1):100-10.

Brehmer F, Ulrich M, Haenssle HA. Strategies for early recognition of cutaneous melanoma—present and future. *Dermatology Practical & Conceptual*. 2012;2(3):29-37.

Bulman A, Neagu M, Constantin C. *Immunomics in Skin Cancer - Improvement in Diagnosis, Prognosis and Therapy Monitoring*. Bentham Science Publishers. 2013; 10 (3):202-17.

Burugu S, Asleh-Aburaya K, et al. Immune infiltrates in the breast cancer microenvironment: detection, characterization and clinical implication. *Breast Cancer*. 2016: 1-13.

Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Journal of the American Society of Hematology*. 2013;112(3):461-9.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.or>

Chen DS, Mellman I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity Review*. 2013;39:1-10.

Coffelt SB, Visser KE. Immune-mediated mechanisms influencing the efficacy of anticancer therapies. *Trends in Immunology*. 2015;26:198-216.

Coronella-Wood J. A, Hersh EM. Naturally occurring B-cell responses to breast cancer. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2003; 52:715–38.

Crusz SM, Balkwill FR. Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nature Reviews*. 2015;10:1038.

Davar D, Tarhini AA, Kirkwood JM. Adjuvant immunotherapy of melanoma and development of new approaches using the neoadjuvant approach. *Clinical Dermatology*. 2013;31(3):237-50.

De Visser KE, Eichten A, et al. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews on Cancer*. 2006; 6(1):24-37.

De Visser KE, Korets LV, Coussens LM. De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell*. 2005;7(5):411-23.

Eggermont AM, Chiarion-Sileni V, Grob JJ, et al: Ipilimumab versus placebo after complete resection of stage III melanoma: Initial efficacy and safety results from the EORTC 18071 phase III trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;16(5):522-530.

Eggermont AMM, Robert C. New drugs in melanoma: it's a whole new world. *European Journal of Cancer*. 2011;47:2150-7.

Fiorentino DF, Zlotnik A, et al. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages" *Journal of Immunology*. 1991;147(11):3815-22.

Fonken E; Uhlmann EJ; Anand SRF, et al. Melanoma brain metastasis: overview of current management and emerging targeted therapies. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2012;12:1207–15.

Freund J. The mode of action of immunogenic adjuvants. *Advances in Tuberculosis Research*. 1956;7:130-48.

Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Natural Medicine*. 1996;2:1096–1103.

Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, Colombo MP, Ochoa A, OstrandRosenberg S, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Research*. 2007; 67(1):425-6.

Garaude J, Kent A, et al. Simultaneous targeting of toll- and nod-like receptors induces effective tumor-specific immune responses. *Science Translational Medicine*. 2012;4(120):1-11.

Girardi M, Oppenheim DE, et al. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science*. 2001;294:605-9.

Goldstein BG, Goldstein AO. Diagnosis and Management of Malignant Melanoma. *American Family Physician*. 2001; 63(7):1359- 68.

Gonzalez S, Rodríguez-gonzález AP, Suárez-àlvarez B et al. Conceptual aspects of self and nonself discrimination. *Landes Bioscience*. 2011; 2(1):19-25.

Gore M. Optimal approach for melanoma. The European Cancer Organization. 2013.

Hagemann T, Wilson J, Burke F, Kulbe H, Li NF, et al. Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *J. Immunology*. 2006; 176:5023–32

Hanahan, D. Studies on transformation of escherichia coli with plasmids. *Journal of Molecular Structure*. 1983;166: 557-80.

Hanna N, Burton RC. Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastasis in vivo. *The Journal of Immunology*. 1981;127(5):1755-57.

Hariharan K, Braslawsky G, et al. The induction of cytotoxic T cells and tumor regression by soluble antigen formulation. *Cancer Research*. 1995;55:3486-89.

Hayakawa Y, Takeda K, et al. IFN-gamma-mediated inhibition of tumor angiogenesis by natural killer T-cell ligand, alpha-galactosylceramide. *Blood*. 2002;100(5):1728-33.

Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 2012; 150 (2):251-63.

Holger A, Haenssle MD, Korpas B, et al. Selection of Patients for Long-term Surveillance With Digital Dermoscopy by Assessment of Melanoma Risk Factors. *The Journal of the American Medical Association Dermatology*. 2010;146 (3):257-64.

Hussein MR. Tumor-associated macrophages and melanoma tumourigenesis: integrating the complexity. *International Journal of Experimental Pathology*. 2006; 87: 163-78.

Inman BA, Frigola X, Dong H, et al. Costimulation, coinhibition and cancer. *Current Cancer Drug Targets*. 2007; 7:15-30.

Instituto nacional de câncer. Estimativa 2016. Disponível em: < http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322> acesso em: 27 julho 2016.

Internacional agency for research on cancer. World Cancer Report 2008. Disponível em: <<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/>> acesso em: 13 jun 2012.

Kim JB, et al. Non-invasive detection of a small number of bioluminescent cancer cells in vivo. PLoS one. 2010;5.

Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. Immunology. 2007;121(1):1-14.

Kondo M, Sakuta K, Noguchi A, et al. Zoledronate facilitates large-scale ex vivo expansion of functional $\gamma\delta$ T cells from cancer patients for use in adoptive immunotherapy. Cytotherapy. 2008; 10:842-56.

Kusmartsev S, Gabrilovich DI. Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. Cancer Immunology Immunotherapy. 2002; 51(6):293–8.

Ladell K, Hazenberg MD et al. Continuous Antigenic Stimulation of DO11.10 TCR Transgenic Mice in the Presence or Absence of IL-1 β : Possible Implications for Mechanisms of T Cell Depletion in HIV Disease. Journal of Immunology. 2015;195(9):4096-105.

Linan HA, et al. Animal models of melanoma. The Society for Investigative Dermatology. 2005.

Lindner S, Dahlke K, et al. Interleukin 21-induced granzyme b-expressing b cells infiltrate tumors and regulate t cells. Cancer Research. 2013;73(8):2468-79.

Loi S, Sirtaine N, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy. Journal of Clinical Oncology. 2013;31:860-7.

Lord EM, Brown DM, et al. Tumors can act as adjuvants for humoral immunity. Immunology. 2001;102:486-97.

Machado A, Cardoso J, Claser C, Rodrigues M, Gazzinelli R, Bruna-Romero O. Long-term protective immunity induced against Trypanosoma cruzi infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. Human Gene Therapy. 2006;17(9):898–908.

Maldonado J.L, Fridlyand J, Patel H, et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. Journal of National Cancer Institute. 2003; 95 (24):1878-80.

Maio M. Melanoma as a model tumor for immuno-oncology. Annals of Oncology. 2012; 23 (8):10-4.

Matsumura M, Fremont D, et al. Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules. Science. 1992; 257: 927-34.

Medrek C, Ponten F, et al. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2012; 65:159-63

Milman T, Mc Cormick. The molecular genetics of eyelid tumors: recent advances and future directions. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2013; 251(2):419-33.

Molgó M, Santa Maria Mls, Lubiano, A. Epidemiología del cáncer cutáneo. *Piel*. 2006; 21(1):9-13.

Morales M. Terapias Avançadas: Células-tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde. São Paulo: Atheneu; 2007. 356p.

Motz GT, Coukos G. Deciphering and Reversing Tumor Immune Suppression. *Immunity*. 2013;39(1):61-73.

Nakano O, et al. Proliferative activity of intratumoral CD8+ lymphocytes are as prognostic factor in human renal cell carcinoma: Clinicopathi-logic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Reserach*. 2001;61:5132-6.

National Cancer Institute. Melanoma Treatment. General information about melanoma. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/melanoma/HealthProfessional/page1>> acesso em: 25 nov 2013.

O' Sullivan T, Saddawi-Konefka R, et al. Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptative immunity. *The Journal of Experimental Medicine*. 2012; 209(10):1869-82

Oba-shinjo SM, Correa M, Ricca TI, Molognoni F; Pinhal MA et al. Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. *Neoplasia*. 2006; 8(3): 231-41.

Prato S, Minter JD, et al. Induction of antigen-specific effector-phase tolerance following vaccination against a previously ignored B-cell lymphoma. *Immunology and Cell Biology*. 2011; 89:595-603.

Rastrelli M, Alaibac M, Stramare R, et al. Melanoma M (Zero): Diagnosis and Therapy. *International Scholarly Research Notices Dermatology*. 2013:1-10.

Richmond A, Su Y. Mouse xenograft models vs GEM models for human câncer therapeutics. *Disease Models & Mechanisms*. 2008;1:78-82.

Robert C, Mateus C, Routier E, et al. Metastatic melanoma: New paradigms of treatment and new toxicities. 2-13, The European Cancer Organization. 2013.

Rowe HM, et al. Immunization with a lentiviral vector stimulates both CD4 and CD8 T cell responses to an ovalbumin transgene. *Molecular Therapy*. 2006;13:310-19

Schadendorf D, Fisher DE et al. Melanoma. *Nature Reviews*. 2015;1:1038.

Shadendorf D, Hauschild A. Melanoma – The run of success continues. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2014;11:75-6.

Shan L, Wang S, et al. Bioluminescent animal models of human breast cancer for tumor biomass evaluation and metastasis detection. *Ethnicity & Disease*. 2008;18:62-68.

Sharry JM, Shalaby KH, et al. Concomitant Exposure to Ovalbumin and Endotoxin Augments Airway Inflammation but Not Airway Hyperresponsiveness in a Murine Model of Asthma. *Plos One*. 2014; 9(6):1-12.

Shetty S, Weston CJ, et al. Common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor-1 mediates the transmigration of regulatory T cells across human hepatic sinusoidal endothelium. *Journal of Immunology*. 2011;186(7):4147-55.

Shibaki A, Katz SI. Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund's adjuvant. *Experimental Dermatology*. 2002;11:126-34.

Shinkai U, Rathburn G, et al. RAG-2 deficient mice lack mature lymphocyte owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*. 1992;68:855-67.

Shojaei F, Wu X, Zhong C, Yu L, Liang XH, Yao J, et al. Bv8 regulates myeloid cell-dependent tumour angiogenesis. *Nature*. 2007; 450(7171):825–31.

Smyth J, Godfred DI. NKT cells and tumor immunity – a double-edge sword. *Nature Immunology*. 2000; 1: 459-460.

Sorrentino R, Morello S, et al. B cells contribute to the antitumor activity of CpG-oligodeoxynucleotide in a mouse model of metastatic lung carcinoma. *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2011;183(10):1369-79.

Stinchcombe JC, Griffiths GM. Secretory mechanisms in cell mediated cytotoxicity. *Annual Review of Cell Development*. 2007; 23:495-517.

Stockmann C, Schadendorf D, et al. The Impact of the Immune System on Tumor: Angiogenesis and Vascular Remodeling. *Frontiers in Oncology*. 2014;4(69):1-13.

Tang X. Tumor associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. *Cancer Lett*. 2013; 332:3-10.

Tarhini, Aa; Gogas, H; Kirkwood, JM. IFN- α in the Treatment of Melanoma. *The Journal of Immunology*. 2012;189:3789-93.

Tentori L, Lacal PM, Graziani G. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2013;34(12):656-66.

Tian T, Olson S. The origins of cancer robustness and evolvability. *Integrative Biology*. 2011;(1):17-30.

Vandenberk L, Garg AD, et al. Irradiation of necrotic cancer cells, employed for pulsing dendritic cells (Dcs) potentiates DC vaccine-induced antitumor immunity against high-grade glioma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. 2014; 2(3): 163.

Vaupel P, Kallinowski F, et al. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenviroment of human tumors: a review. *Cancer Research*.1898;49:6449-65.

Whiteside TL. The tumor microenviroment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*. 2008; 27: 5904-12

Wu CC, Liu SJ, et al. A toll-like receptor 2 agonist-fused antigen enhanced antitumor immunity by increasing antigen presentation and the CD8 memory T cells population. *Oncotarget*. 2016;7(21):30804-19.

Zeelenberg IS, Ostrowski M, et al. Targeting tumor antigens to secreted vesicles in vivo induces efficient antitumor immune response. *Cancer Research*. 2008;68(4):1228-35.

Zinder ND, Lederberg J. Genetic exchange in Salmonella. *Journal of Bacteriology*. 1952; 64(5): 679–99.