MARIANA PEREIRA PINHO

ENRIQUECIMENTO ANTIGÊNICO DE LINHAGENS TUMORAIS: ESTRATÉGIA PARA ABORDAGENS IMUNOTERAPÊUTICAS PERSONALIZADAS

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. José Alexandre M. Barbuto

Versão Original

São Paulo
2014

RESUMO

PINHO, M. P. **Enriquecimento antigênico de linhagens tumorais: estratégia para abordagens imunoterapêuticas personalizadas.** 2014. 128 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Células dendríticas (DCs) são potentes células apresentadoras de antígenos (APCs) capazes de induzir uma resposta imune antitumoral quando carregadas com antígenos tumorais. Dentre as estratégias de imunoterapia utilizando essas células, se encontra a utilização de híbridos de células dendríticas com células tumorais. O presente projeto avaliou, *in vitro,* a possibilidade de modificar essa estratégia visando diminuir a quantidade de massa tumoral necessária para o tratamento. Essa modificação consistiria na utilização, como parceiro de fusão das DCs, de células de linhagem tumoral previamente transfectadas com mRNA amplificado de células tumorais contra as quais se pretende induzir resposta. Assim, avaliou-se, primeiramente, a possibilidade da fusão induzir uma resposta antígeno-específica. Para isso, DCs maduras (mDCs) foram diferenciadas a partir de monócitos, obtendo-se células com todas as características de APCs profissionais. As mDCs geradas por esse processo foram fundidas com células da linhagem MDA-MB-231, obtendo-se células duplo-positivas para CD11c e Her2/neu. Esses híbridos expressaram diferentes moléculas de co-estímulo, além de HLA-ABC provenientes dos dois tipos celulares usados para gerar os híbridos, e foram capazes de induzir proliferação de linfócitos T tanto autólogos como alogeneicos. Além disso, os híbridos induziram a diferenciação de linfócitos T $CD4^+$ com menor expressão de Foxp3, e de linfócitos T $CD8^+$ citotóxicos capazes de induzir a morte das células tumorais da linhagem utilizada para formação dos híbridos. Num modelo de células tumorais marcadas pela expressão de um antígeno viral, os híbridos também se mostraram capazes de induzir uma expansão antígeno-específica de linfócitos T CD8. Em seguida, dado que os híbridos foram capazes de induzir uma resposta imune específica, avaliou-se a possibilidade de enriquecer uma célula com antígenos de outra, através da transferência de RNA. Células da linhagem MCF-7 que foram transfectadas com RNA total de células da linhagem SK-BR-3 aumentaram a quantidade de mRNA de proteínas presentes nas células SK-BR-3. Além disso, células da linhagem MDA-MB-231, que receberam RNA total de uma célula previamente transfectada com mRNA para GFP, passaram a expressar tal proteína, mostrando que a transferência de RNA é capaz de fazer com que uma célula passe a expressar antígenos presentes em outra. Por fim, analisou-se a possibilidade de se amplificar inespecificamente os mRNAs de uma célula. Foi possível amplificar o mRNA para GFP gerando um material capaz de, quando transfectado, gerar expressão de GFP. Os mRNAs da MDA-MB-231 e da SK-BR-3 amplificados continham mRNAs presentes no preparado inicial, sendo que algumas aumentaram sua representatividade após a amplificação. Esses mRNAs amplificados, porém, não foi capaz de aumentar a expressão das moléculas avaliadas nas células transfectadas, mostrando que o protocolo ainda precisa ser aperfeiçoado. Em conjunto, os resultados apresentados mostram que a nova estratégia de imunoterapia aqui explorada é promissora e merece maior investigação.

Palavras-chave: Células Dendríticas. RNA mensageiro. Vacinas. Imunoterapia. Câncer.

ABSTRACT

PINHO, M. P. **Antigenic enrichment of tumor cell lines: a strategy for personalized immunotherapeutic approaches.** 2014. 128 p. Master thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Dendritic cells (DCs) are powerful antigen presenting cells (APCs) that are able to induce antitumor immune responses when loaded with tumor antigens. Among the immunotherapy strategies that utilize these cells, are those that utilize tumor cell dendritic cell hybrids. The present project evaluated*, in vitro*, the possibility of modifying this strategy, thus diminishing the number of tumor cells needed for the treatment. This modification consists of using cells from tumor cell lines, which were previously transfected with mRNA amplified from tumor cells against which a response is aimed, to fuse with DCs. Thus, first of all, we evaluated if the hybrids could induce an antigen specific immune response. Mature Dendritic cells (mDCs) were differentiated from monocytes, and presented all characteristics of professional APCs. The mDCs were fused with cells from the MDA-MB-231 cell line, generating double-positive cells for CD11c and Her2/neu. These cells expressed different costimulatory molecules and HLA-ABC from both cell types used to generate the hybrids, and were also able to induce autologous and allogeneic T cell proliferation. Moreover, the hybrids induced the differentiation of CD4+ T lymphocytes with diminished Foxp3 expression, and the differentiation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes, that were able to kill tumor cells from the same cell line used for the fusion process. Using a model of tumor cells expressing a viral antigen, we were also able to determine that the hybrids induced the proliferation of antigen-specific CD8+ T cells. Thus, since the hybrids were able to induce a specific immune response, we evaluated if, by the transfer of RNA, tumor cells could be enriched with antigens from another tumor cell line. Cells from the MCF-7 cell line transfected with total RNA from SK-BR-3 cells did increase the amount of mRNAs specific for proteins expressed in SK-BR-3 cells. Furthermore, MDA-MB-231 cells that received total RNA from cell previously transfected with GFP mRNA expressed this protein, showing that cells can express antigens from another one if transfected with their RNA. Lastly, we analyzed if the mRNA from a cell could be nonspecifically amplified. The GFP specific mRNA was successfully amplified, since the amplification product was able to, when transfected, induce GFP expression. The amplified MDA-MB-231 and SK-BR-3 RNAs contained mRNAs that were present in the total extracted RNA, but some were present in increased and other decreased amounts. These amplified mRNAs, however, were not able to increase the expression of the molecules we attempted to detect in the transfected cells, showing that the protocol still need to be improved. Together, these results show that this new strategy is promising and deserves further investigation.

Keywords: Dendritic Cells. Messenger RNA. Vaccines. Immunotherapy. Cancer.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O sistema imune é um sistema de reconhecimento que, através dos seus mecanismos inatos e adaptativos, mantém a homeostase dos tecidos. Por ser capaz de reconhecer e eliminar antígenos associados a patógenos, o sistema imune é amplamente referido como um sistema de defesa do corpo. As células dendríticas (DCs) atuam, nesse contexto, como células apresentadoras de antígenos (APCs; do inglês, *antigen presenting cells*), sendo, dentre as APCs profissionais, as células mais aptas a induzir uma resposta imune adaptativa (BANCHEREAU, BRIERE, et al., 2000; STEINMAN, BANCHEREAU, 2007).

As DCs constantemente internalizam o conteúdo extracelular do microambiente onde estão. As proteínas que são capturadas por meio desse processo são degradadas em peptídeos que serão acoplados a moléculas de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e, por meio de apresentação cruzada, a moléculas de classe I do MHC. Essas são as moléculas responsáveis pela apresentação antigênica para os linfócitos T.

Nos tecidos sadios, a maioria das DCs se encontra em um estado denominado imaturo (iDC), monitorando o microambiente através da captura de antígenos (MELLMAN, STEINMAN, 2001). Nesse estado, essas células apresentam alta capacidade endocítica, mas baixa densidade de moléculas coestimuladoras, o que faz com que induzam anergia nos linfócitos T estimulados (STEINMAN, 2003). O contato com produtos de agentes infecciosos ou exposição a estímulos inflamatórios induz mudanças dramáticas nessas células, levando a sua maturação (mDC) (CAUX, MASSACRIER, et al., 1994). As células nesse estado apresentam uma menor capacidade endocítica, mas alta densidade de moléculas coestimuladoras, como CD80 e CD86. As mDCs também expressam o receptor de quimiocinas CCR7, que direciona sua migração para os órgãos linfoides secundários, onde irão atuar na ativação de linfócitos T (SALLUSTO, PALERMO, et al., 1999).

Uma vez nos linfonodos, as mDCs induzem a diferenciação de linfócitos T $CD4^-$ $CD8^+$ em linfócitos T citotóxicos (CTLs), capazes de eliminar especificamente as células que apresentarem, no contexto das moléculas de classe I do MHC, o antígeno para o qual seu receptor clonal é específico (INABA, YOUNG, STEINMAN, 1987). As células dendríticas também ativam os linfócitos T $CD4^+$ $CD8^-$, que são responsáveis por

coordenar a resposta imunológica, sendo comumente denominados de linfócitos T *helper* (Th) (STEINMAN, 2003). Esses linfócitos T podem se diferenciar em subtipos com diferentes funções efetoras dependendo do estímulo que é dado pelas DCs. A expressão diferencial de fatores de transcrição por cada subtipo de Th permite a caracterização dos mesmos. Quando produzem grandes quantidades de TGF-β, as DCs induzem, preferencialmente, a diferenciação dos linfócitos T em células reguladoras (Treg), que se caracterizam pela expressão elevada do receptor de alta afinidade para IL-2 (CD25) e o fator de transcrição Foxp3 (MALDONADO, VON ANDRIAN, 2010). Dentre os subtipos de linfócitos T *helper* efetores, podem-se destacar três subpopulações: linfócitos Th1, que são diferenciados na presença de IL-12 e são caracterizados pela expressão de T-bet e de IFN-γ; linfócitos Th2, diferenciados na presença de IL-4 e caracterizados pela expressão de GATA-3 e IL-4; e linfócitos Th17, diferenciados, em camundongos, na presença de IL-6 e TGF-β e caracterizados pela expressão de RORγt e IL-17 (KAPSENBERG, 2003).

As células dendríticas apresentam um grande potencial imunoterapêutico devido a sua habilidade de induzir uma resposta adaptativa e a sua capacidade de quebrar a tolerância a antígenos específicos. Sua utilização em protocolos clínicos, porém, só foi possível após a descrição da possibilidade de sua geração *in vitro* a partir de precursores sanguíneos abundantes (CAUX, DEZUTTER-DAMBUYANT, et al., 1992; SALLUSTO, LANZAVECCHIA, 1994), uma vez que menos do que 1% das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de humanos são células dendríticas (HALLER HASSKAMP, ZAPAS, ELIAS, 2005). Desde então, diversas abordagens terapêuticas foram desenvolvidas visando utilizar o potencial imunomodulador dessas células para desencadear uma resposta imune capaz de eliminar especificamente as células tumorais (BANCHEREAU e PALUCKA, 2005; BARBUTO, ENSINA, et al., 2004). Essas estratégias ficaram conhecidas como vacinas antitumorais, uma vez que visam estimular uma resposta efetora do sistema imune.

Para induzir uma resposta imune, as DCs precisam apresentar, no contexto certo, os antígenos contra os quais se quer induzir uma resposta imune. Portanto, para induzir uma resposta anti-tumoral, as DCs precisam ser carregadas com antígenos do tumor, processo que pode ser feito de diferentes formas. Além do lisado tumoral, também

podem ser usados como fonte de antígenos para carregamento das DCs: células tumorais vivas, *debris* necróticos, corpos apoptóticos e exossomos derivados de tumores (MOSCA, LYERLY, et al., 2007). O tipo de material utilizado, porém, pode interferir de maneira significativa com o tipo de resposta imune obtida (FRY, SHAND, et al., 2009; HUANG, WANG, et al., 2007).

O carregamento das DCs também pode ser feito sem a utilização de materiais derivados de células tumorais, como, por exemplo, utilizando peptídeos antigênicos sintéticos derivados de antígenos associados ao tumor (TAAs; do inglês, *tumor associated antigens*). Estudos explorando essa estratégia mostraram que, de fato, é possível observar uma resposta clínica e imunológica dos pacientes vacinados (BROSSART, WIRTHS, et al., 2000). Além disso, essa metodologia não necessita a obtenção de material tumoral do paciente, que costuma ser escasso. Porém, o uso de peptídeos sintéticos apresenta limitações, uma vez que, devido à heterogeneidade das células tumorais, o tumor pode desenvolver resistência à resposta induzida pela vacina, a partir da seleção e expansão de células tumorais que não expressam os antígenos imunizantes (GILBOA, VIEWEG, 2004). Sendo assim, tem-se priorizado cada vez mais metodologias que envolvam a indução de uma resposta imunológica poliantigênica para o tratamento de neoplasias.

Um método que vem sendo explorado envolve a fusão da célula dendrítica com células tumorais, formando células híbridas que seriam capazes de apresentar antígenos tumorais em um contexto imunogênico (CATHELIN, NICOLAS, et al., 2011). A fusão celular para geração dos híbridos pode ocorrer tanto por adição de polietilenoglicol (YANG, SHEN, 2006) quanto por eletroporação (RAMOS, TEISSIÉ, 2000). As células geradas por esses métodos são capazes de induzir uma resposta imune robusta; os resultados clínicos, porém, permanecem ainda insatisfatórios (KOIDO, HOMMA, et al., 2011).

Estas respostas clínicas desanimadoras podem ser um reflexo da utilização de DCs derivadas de monócitos do próprio paciente com câncer para formação dos híbridos (BARBUTO, 2013). Estudos do nosso laboratório mostram que as DCs geradas *in vitro*, a partir de monócitos do sangue de pacientes com câncer, possuem fenótipo típico de células imaturas (NEVES, ENSINA, et al., 2005). Essas células também apresentam uma

menor capacidade de induzir linfoproliferação quando comparadas às DCs obtidas de doadores saudáveis, além de induzir uma maior produção de linfócitos T reguladores (RAMOS, CHIN, et al., 2012). As DCs de pacientes com câncer geradas *in vitro* também são mais suscetíveis às condições encontradas no tumor, como baixo pH (SANTOS, 2010). Portanto, defeitos encontrados já nos precursores sanguíneos de células dendríticas em pacientes com câncer são capazes de explicar a ausência de sucesso pleno da imunoterapia com híbridos autólogos.

Todas essas alterações apontam para a existência de mecanismos de escape tumoral que impedem a destruição das células tumorais pelas células do sistema imune (DUNN, BRUCE, et al., 2002). Sendo as células dendríticas tão importantes no desencadeamento de uma resposta efetora, não é surpreendente que o tumor tenha desenvolvido estratégias para modular sua ação, visando gerar tolerância do sistema (DELLA BELLA, CLERICI, VILLA, 2007). No microambiente tumoral, são produzidos diversos fatores solúveis como VEGF, IL-10 e IL-6 que são capazes de inibir a diferenciação e maturação das DCs (GABRILOVICH, 2004), fatores como o CD83 solúvel que alteram a capacidade de linfoestimulação dessas células (BALEEIRO, BARBUTO, 2008), além de fatores capazes de desencadear o processo de apoptose nas DCs (PINZON-CHARRY, LÓPEZ, 2009). Portanto, ao desenhar protocolos de imunoterapia, deve-se levar em conta o forte equilíbrio existente entre o sistema imune e o tumor nos pacientes acometidos pela doença, que deve ser quebrado para que se consiga uma resposta imune eficaz.

Nesse contexto, surgiram estratégias que utilizam a fusão de células tumorais autólogas com células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos de doadores saudáveis (DE GRUIJL, VAN DEN EERTWEGH, et al., 2008; TREFZER, WALDEN, 2003). Além do efeito adjuvante alogeneico, que pode ser capaz de quebrar a tolerância já estabelecida entre o sistema imune e o tumor, essa estratégia permitiria que antígenos tumorais, conhecidos ou não, sejam apresentados mediante a co-estimulação adequada, que não é encontrada em células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos do próprio paciente (TREFZER, HERBERTH, et al., 2005). De fato, nosso grupo mostrou que esse protocolo foi capaz de estabilizar a doença em pacientes com melanoma metastático ou com carcinoma celular renal em estágios muito avançados, por um

período mediano de cerca de 6 meses em 70% dos casos, sem desencadear efeitos colaterais significativos (BARBUTO, ENSINA, et al., 2004).

Um fator limitante da estratégia de fusão é a quantidade de massa tumoral que deve ser obtida para realizar várias doses da vacinação. Estratégias que necessitem de pouca ou nenhuma massa tumoral têm sido desenvolvidas, tornando possível a vacinação por longo período. Uma estratégia que tem sido explorada é o uso de células tumorais alogênicas, obtidas de linhagens tumorais já estabelecidas, para obtenção de antígenos ou formação de híbridos com células dendríticas (LÓPEZ, PEREDA, et al., 2009; YANG, CAO, et al., 2010). Essa abordagem, porém, sofre de uma falta de especificidade para o repertório de antígenos expressos pelas células tumorais de um dado paciente (SRIVATSAN, PATEL, et al., 2013).

Outra estratégia que vem sendo desenvolvida envolve o uso de células dendríticas geneticamente modificadas para expressar antígenos tumorais por meio da transdução de DNA codificando genes ou da transfecção de mRNAs provenientes das células tumorais de pacientes (MILAZZO, REICHARDT, et al., 2003). Essa estratégia permite a indução de resposta contra os antígenos específicos do próprio paciente (HEISER, MAURICE, et al., 2001). Além disso, utilizando essa abordagem, é possível reduzir a quantidade de massa tumoral necessária, uma vez que o mRNA das células tumorais poderia ser amplificado *in vitro* a partir de uma pequena quantidade inicial (BAUGH, HILL, et al., 2001; VAN GELDER, VON ZASTROW, et al., 1990).

Para que ocorra a amplificação do mRNA tumoral total, é necessário que o mesmo sofra um processo de transcrição reversa, produzindo fitas de cDNA que podem ser amplificadas através de uma reação de PCR. O cDNA amplificado, então, deve ser submetido a uma reação de transcrição *in vitro*, formando novas fitas de mRNA que serão utilizadas para a transfecção. Sendo assim, as reações devem ser feitas de forma a inserir a sequência promotora da enzima T7 RNA polimerase, que é usada no processo de transcrição *in vitro* (BOCZKOWSKI, NAIR, et al., 2000). O material obtido dessa forma mantém cópias de mRNAs das proteínas tumorais expressas pelas células doadoras (NI, RICHMOND, et al., 2008).

De fato, diversos estudos pré-clínicos feitos em diferentes modelos de diferentes tipos de câncer mostraram que DCs transfectadas com mRNA tumoral, amplificados ou

não, são capazes de induzir a diferenciação de linfócitos T citotóxicos capazes de eliminar, ao menos *in vitro*, especificamente as células tumorais (MILANO, RYGIEL, et al., 2007; MÜLLER, TSAKOU, et al., 2004; NI, RICHMOND, et al., 2008). Estudos de fase I, porém, mostram uma resposta clínica muito aquém do esperado, apesar de ser observada uma resposta imune específica para o tumor em muitos dos pacientes (CARUSO, ORME, et al., 2004; SU, DANNULL, et al., 2003). Em um estudo envolvendo o tratamento de pacientes com neuroblastoma, por exemplo, não foi possível observar uma resposta clínica objetiva (CARUSO, ORME, et al., 2005).

É possível observar que as células dendríticas transfectadas com mRNA tumoral expressam, ao menos transientemente, proteínas tumorais (GAO, FAN, et al., 2007; TONIOLO, 2010). Essa expressão transiente é necessária para que as células dendríticas processem tais antígenos e apresentem os peptídeos tumorais em suas moléculas de classe I do MHC. Porém, dentre as proteínas que serão expressas pelas DCs, estão aquelas que as células tumorais produzem visando atrapalhar a resposta imune. Sendo assim, esse fenômeno pode ser uma das explicações para a baixa resposta clínica obtida com esse tipo de metodologia.

As células dendríticas são altamente heterogêneas, e são capazes de modular a expressão de suas proteínas de superfície dependendo do microambiente em que se encontram, sendo conhecidas pela sua grande plasticidade (HUANG, LIU, et al., 2001; ITO, LIU, KADOWAKI, 2005). Estudos do nosso laboratório têm mostrado que a simples exposição aos agentes de transfecção lipídicos é capaz de alterar significativamente a expressão de moléculas de superfície importantes para modulação da resposta imune. Esse comportamento é indesejável para desenvolvimento de um tratamento clínico, uma vez que ainda não se sabe qual perfil de expressão de moléculas é capaz de induzir uma melhor resposta imune. Além disso, as DCs são muito sensíveis a transfecção, podendo apresentar baixa viabilidade dependendo do método utilizado.

Dentro desse contexto, o presente projeto visa desenvolver uma estratégia diferente de carregamento de células dendríticas com antígenos tumorais, que consiste na fusão de células de linhagens tumorais transfectadas com o mRNA amplificado de células tumorais obtidas dos pacientes, com células dendríticas derivadas de doadores saudáveis. A escolha de doadores saudáveis como fonte de precursores para formação

de células dendríticas decorre do fato das células do paciente apresentarem deficiência funcional, como anteriormente mencionado.

Linhagens tumorais transfectadas com genes capazes de torná-las mais imunogênicas já foram utilizadas, combinadas com a injeção sistêmica de IL-2, em ensaios clínicos (ANTONIA, SEIGNE, et al., 2002). No presente projeto, a transfecção de linhagens com o mRNA tumoral dos pacientes visa introduzir antígenos tumorais dos mesmos, enquanto a fusão dessas células com DCs visa torná-las imunogênicas.

Como modelo para testar essa estratégia, serão utilizadas células de linhagens de câncer de mama. O câncer de mama é o tipo de câncer que mais afeta as mulheres. Estima-se que 12,29% das mulheres que nasceram hoje serão diagnosticadas com câncer de mama em algum momento durante sua vida (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2012). Felizmente, quando o câncer é diagnosticado em estágios iniciais, a chance de cura é muito grande.

Após a cirurgia para retirada das células tumorais, pacientes com tumores em estágios iniciais com pior prognóstico são submetidos a uma terapia adjuvante. Esse tratamento, que pode ser à base de quimioterapia, radioterapia ou hormonioterapia, visa matar as células tumorais que por ventura ainda estejam no corpo do paciente após o processo cirúrgico (MCARTHUR, HUDIS, 2007). Porém, nem todos os pacientes se beneficiam igualmente dos tratamentos adjuvantes (ENG-WONG, ISAACS, 2010). Além disso, parte das mulheres que passam por esse processo não apresentam mais células tumorais, e, portanto, não enfrentariam recidiva da doença, mas acabam sofrendo com os efeitos colaterais dessas terapias, que, geralmente, são mais do que apenas incômodos (SHAPIRO, RECHT, 2001).

Uma vez que o tumor tenha sido retirado, vacinas utilizando esse material poderiam ser feitas visando desenvolver uma terapia adjuvante com menores efeitos danosos para as pacientes. Nesse contexto, o protocolo em estudo nesse projeto poderia ser interessante para o tratamento dessas pacientes, uma vez que diversas doses de vacinas poderiam ser feitas mesmo com tumores em estágios iniciais, que são muito pequenos.

Tumores de mama podem ser classificados dependendo da expressão, pelas células tumorais, do receptor de estrógeno (ER) ou de progesterona (PR), além da

superexpressão de Her2/neu, um receptor tirosina quinase da família dos receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR). Tumores que não apresentam nenhuma das três características são denominados triplo-negativos, e apresentam o pior prognóstico quando comparados com os positivos para os receptores ER e PR e os que apresentam superexpressão de Her2/neu (PARISE, BAUER, et al., 2009). Além de alto valor prognóstico, essas proteínas também são utilizadas como alvos por diversas terapias.

Nesse trabalho, células tumorais das linhagens de câncer de mama MDA-MB-231 (triplo-negativa), MCF-7 (ER positiva) e SK-BR-3 (superexpressão de Her2/neu) foram utilizadas como doadoras e receptoras de mRNA, sendo a expressão de ER, PR e Her2/neu avaliadas como marcadores de eficiência do processo de amplificação e transfecção das células.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que:

- Híbridos de células dendríticas e células tumorais expressam moléculas de classe I do MHC provenientes das duas células, além de moléculas de co-estímulo, sendo, portanto, potencialmente capazes de apresentar antígenos tumorais em um contexto imunogênico.

- Linfócitos T podem ser estimulados por híbridos de células dendríticas e células tumorais a se diferenciarem e proliferarem e, aparentemente, os linfócitos T assim estimulados apresentam menor expressão de Foxp3 do que os estimulados apenas com a mistura dos dois tipos celulares.

- Híbridos de células dendríticas e células tumorais são capazes de induzir uma resposta imune antígeno-específica, ou seja, induzir uma expansão clonal linfocitária de linfócitos capazes de responder contra o antígeno.

- Híbridos de células dendríticas e células tumorais parecem continuar sendo capazes de processar e apresentar novos antígenos após o processo de eletroporação.

- RNA total de uma célula pode ser transfectado em outra, levando ao aumento da quantidade de mRNA específico para algumas moléculas e podendo levar a expressão de novas moléculas pela célula transfectada.

- Um mRNA pode ser amplificado por um processo complexo, gerando novas moléculas de mRNAs íntegras que podem ser traduzidas e gerar, quando transfectadas em uma célula, a proteína que este mRNA codifica.

- Uma amostra complexa com diferentes mRNAs também pode ser amplificada, mas diferenças na quantidade de cada mRNA podem ser observada após a amplificação.

- O processo de amplificação de mRNA total obtido de células tumorais precisa ser aperfeiçoado, uma vez que não se observou expressão de proteínas contidas na amostra amplificada, quando esta foi transfectada em outras células.

Sendo assim, conclui-se que a metodologia proposta por esse trabalho é uma estratégia promissora, que merece ser explorada, mas que ainda necessita aperfeiçoamento para que se consiga expressão suficiente de antígenos codificados pelo mRNA extraído das células tumorais dos pacientes nas células híbridas dendriticas-tumorais.

REFERÊNCIAS

Referências[1]

ANTONIA, S. J. et al. Phase I trial of a B7-1 (CD80) gene modified autologous tumor cell vaccine in combination with systemic interleukin-2 in patients with metastatic renal cell carcinoma. **J. Urol.**, v. 167, p. 1995-2000, 2002.

BALEEIRO, R. B.; BARBUTO, J. A. Local secretion/shedding of tumor-derived CD83 molecules as a novel tumor escape mechanism. **Mol. Immunol.**, v. 45, n. 12, p. 3502-3504, 2008.

BANCHEREAU, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 767-811, 2000.

BANCHEREAU, J.; PALUCKA, A. K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, n. 4, p. 296-306, 2005.

BARBUTO, J. A. Are dysfunctional monocyte-derived dendritic cells in cancer an explanation for cancer vaccine failures? **Immunotherapy**, v. 5, n. 2, p. 105-107, 2013.

BARBUTO, J. A. et al. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 53, n. 12, p. 1111-1118, 2004.

BAUGH, L. R. et al. Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 5, p. e29, 2001.

BENZ, C. C. et al. Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 24, n. 2, p. 85-95, 1992.

[1]De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BERGANT, M. et al. Preparation of native and amplified tumour RNA for dendritic cell transfection and generation of in vitro anti-tumour CTL responses. **Immunobiology**, v. 211, n. 3, p. 179-189, 2006.

BIRON, C. A. Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. **Immunity**, v. 14, n. 6, p. 661-664, 2001.

BOCZKOWSKI, D. et al. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. **Cancer Res.**, v. 60, n. 4, p. 1028-1034, 2000.

BROSSART, P. et al. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. **Blood**, v. 96, n. 9, p. 3102-3108, 2000.

CAO, M. D.; CHEN, Z. D.; XING, Y. Gamma irradiation of human dendritic cells influences proliferation and cytokine profile of T cells in autologous mixed lymphocyte reaction. **Cell Biol. Int.**, v. 28, n. 3, p. 223-228, 2004.

CAO, W.; LEE, S. H.; LU, J. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. **Biochem. J.**, v. 385, p. 85-93, 2005.

CARUSO, D. A. et al. Results of a phase 1 study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children and young adults with brain cancer. **Neuro Oncol.**, v. 6, n. 3, p. 236-246, 2004.

CARUSO, D. A. et al. Results of a Phase I study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children with Stage 4 neuroblastoma. **Cancer**, v. 103, n. 6, p. 1280-1291, 2005.

CATHELIN, D. et al. Dendritic cell-tumor cell hybrids and immunotherapy: what's next? **Cytotherapy**, v. 13, n. 7, p. 774-785, 2011.

CAUX, C. et al. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. **Nature**, v. 360, n. 6401, p. 258-261, 1992.

CAUX, C. et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. **J. Exp. Med.**, v. 180, n. 4, p. 1263-1272, 1994.

CHUNG, D. J. et al. Langerhans-type and monocyte-derived human dendritic cells have different susceptibilities to mRNA electroporation with distinct effects on maturation and activation: implications for immunogenicity in dendritic cell-based immunotherapy. **J. Transl. Med.**, v. 11, p. 166, 2013.

DE GRUIJL, T. D. et al. Whole-cell cancer vaccination: from autologous to allogeneic tumor- and dendritic cell-based vaccines. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 57, n. 10, p. 1569-1577, 2008.

DELLA BELLA, S.; CLERICI, M.; VILLA, M. L. Disarming dendritic cells: a tumor strategy to escape from immune control? **Expert. Rev. Clin. Immunol.**, v. 3, n. 3, p. 411-422, 2007.

DUNN, G. P. et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat. Immunol.**, v. 3, n. 11, p. 991-998, 2002.

ENG-WONG, J.; ISAACS, C. Prediction of benefit from adjuvant treatment in patients with breast cancer. **Clin. Breast Cancer**, v. 10, p. E32-E37, 2010.

FOX, B. A. et al. Lipofection indirectly increases expression of endogenous major histocompatibility complex class I molecules on tumor cells. **Cancer Gene Ther.**, v. 5, n. 5, p. 307-312, 1998.

FRY, T. J. et al. Antigen loading of DCs with irradiated apoptotic tumor cells induces improved anti-tumor immunity compared to other approaches. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 58, n. 8, p. 1257-1264, 2009.

GABRILOVICH, D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 12, p. 941-952, 2004.

GAO, L. et al. Impact of transfection with total RNA of K562 cells upon antigen presenting, maturation, and function of human dendritic cells from peripheral blood mononuclear cells. **Transfusion**, v. 47, n. 2, p. 256-265, 2007.

GILBOA, E.; VIEWEG, J. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. **Immunol. Rev.**, v. 199, p. 251-263, 2004.

GONG, J. et al. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. **Nat. Med.**, v. 3, n. 5, p. 558-561, 1997.

GRIMM, E. A. et al. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. III. Evidence that IL-2 is sufficient for direct activation of peripheral blood lymphocytes into lymphokine-activated killer cells. **J. Exp. Med.**, v. 158, n. 5, p. 1356-1361, 1983.

GRÜNEBACH, F. et al. Delivery of tumor-derived RNA for the induction of cytotoxic T-lymphocytes. **Gene Ther.**, v. 10, n. 5, p. 367-374, 2003.

HALLER HASSKAMP, J.; ZAPAS, J. L.; ELIAS, E. G. Dendritic cell counts in the peripheral blood of healthy adults. **Am. J. Hematol.**, v. 78, n. 4, p. 314-315, 2005.

HEISER, A. et al. Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA. **J. Immunol.**, v. 166, n. 5, p. 2953-2960, 2001.

HERRMANN, F. et al. HER-2/neu-mediated regulation of components of the MHC class I antigen-processing pathway. **Cancer Res.**, v. 64, n. 1, p. 215-220, 2004.

HUANG, H. et al. Effects of two different antigen-loading methods on the activity of dendritic cell vaccine for colorectal carcinoma cell inhibition in vitro. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**, v. 27, n. 4, p. 492-495, 2007.

HUANG, Q. et al. The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 870-875, 2001.

INABA, K.; YOUNG, J. W.; STEINMAN, R. M. Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 166, n. 1, p. 182-194, 1987.

ITO, T.; LIU, Y. J.; KADOWAKI, N. Functional diversity and plasticity of human dendritic cell subsets. **Int. J. Hematol.**, v. 81, n. 3, p. 188-196, 2005.

KANEKO, K. et al. Clinical implication of HLA class I expression in breast cancer. **BMC Cancer**, v. 11, p. 454-454, 2011.

KAPSENBERG, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, n. 12, p. 984-993, 2003.

KOIDO, S. et al. Immunologic monitoring of cellular responses by dendritic/tumor cell fusion vaccines. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2011, p. 910836, 2011.

KOIDO, S.; GONG, J. Characterization of structure and direct antigen presentation by dendritic/tumor-fused cells as cancer vaccines. **Anticancer Res.**, v. 33, n. 2, p. 347-354, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LÓPEZ, M. N. et al. Prolonged survival of dendritic cell-vaccinated melanoma patients correlates with tumor-specific delayed type IV hypersensitivity response and reduction of tumor growth factor beta-expressing T cells. **J. Clin. Oncol.**, v. 27, n. 6, p. 945-952, 2009.

LU, D. et al. Optimization of methods to achieve mRNA-mediated transfection of tumor cells in vitro and in vivo employing cationic liposome vectors. **Cancer Gene Ther.**, v. 1, n. 4, p. 245-252, 1994.

MALDONADO, R. A.; VON ANDRIAN, U. H. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. **Adv. Immunol.**, v. 108, p. 111-165, 2010.

MCARTHUR, H. L.; HUDIS, C. A. Adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer. **Hematol. Oncol. Clin. North. Am.**, v. 21, n. 2, p. 207-222, 2007.

MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 255-258, 2001.

MERKENS, L. S.; BRYAN, S. K.; MOSES, R. E. Inactivation of the 5'-3' exonuclease of Thermus aquaticus DNA polymerase. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1264, n. 2, p. 243-248, 1995.

MILANO, F. et al. An ex vivo readout for evaluation of dendritic cell-induced autologous cytotoxic T lymphocyte responses against esophageal cancer. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 56, n. 12, p. 1967-1977, 2007.

MILAZZO, C. et al. Induction of myeloma-specific cytotoxic T cells using dendritic cells transfected with tumor-derived RNA. **Blood**, v. 101, n. 3, p. 977-982, 2003.

MOSCA, P. J. et al. Dendritic cell vaccines. **Front. Biosci.**, v. 12, p. 4050-4060, 2007.

MÜLLER, M. R. et al. Induction of chronic lymphocytic leukemia (CLL)-specific CD4- and CD8-mediated T-cell responses using RNA-transfected dendritic cells. **Blood**, v. 103, n. 5, p. 1763-1769, 2004.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. SEER incidence and NCHS mortality statistics. **SEER Cancer Statistics Review 1975-2010**, 2012. Disponivel em: <http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/>. Acesso em: 18 Outubro 2013.

NENCIONI, A. et al. Dendritic cells transfected with tumor RNA for the induction of antitumor CTL in colorectal cancer. **Cancer Gene Ther.**, v. 10, n. 3, p. 209-214, 2003.

NEVES, A. R. et al. Dendritic cells derived from metastatic cancer patients vaccinated with allogeneic dendritic cell-autologous tumor cell hybrids express more CD86 and induce higher levels of interferon-gamma in mixed lymphocyte reactions. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 54, n. 1, p. 61-66, 2005.

NI, X. et al. Induction of T-cell responses against cutaneous T-cell lymphomas ex vivo by autologous dendritic cells transfected with amplified tumor mRNA. **J. Invest. Dermatol.**, v. 128, n. 11, p. 2631-2639, 2008.

PARISE, C. A. et al. Breast cancer subtypes as defined by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) among women with invasive breast cancer in California, 1999-2004. **Breast J.**, v. 15, n. 6, p. 593-602, 2009.

PINZON-CHARRY, A.; LÓPEZ, J. A. Tumor-Derived Factors Responsible for Dendritic Cell Dysfunction. In: SHURIN, M. R.; SALTER, R. D. **Dendritic Cells in Cancer**. New York: Springer, 2009. cap. 7, p. 103-117.

RAMOS, C.; TEISSIÉ, J. Electrofusion: a biophysical modification of cell membrane and a mechanism in exocytosis. **Biochimie.**, v. 82, n. 5, p. 511-518, 2000.

RAMOS, R. N. et al. Monocyte-derived dendritic cells from breast cancer patients are biased to induce CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. **J. Leukocyte Biol.**, v. 92, n. 3, p. 673-682, 2012.

REUBEN, J. M. et al. The effect of low dose gamma irradiation on the differentiation and maturation of monocyte derived dendritic cells. **J. Gravit. Physiol.**, v. 11, n. 2, p. 49-52, 2004.

ROMAGNOLI, G. G. et al. Tumour cells incorporate exosomes derived from Dendritic Cells through a mechanism involving the tetraspanin CD9. **Exosomes and Microvesicles**, v. 4, p. 21-32, 2013.

SALLUSTO, F. et al. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. **Eur. J. Immunol.**, v. 29, n. 5, p. 1617-1625, 1999.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **J. Exp. Med.**, v. 179, n. 4, p. 1109-1118, 1994.

SANTOS, A. P. S. A. **Efeito do microambiente tumoral sobre as características funcionais e fenotípicas de células dendríticas geradas in vitro a partir de monócitos do sangue periférico de voluntárias saudáveis e de pacientes com câncer de mama.** 115 p. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2010.

SCANDELLA, E. et al. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. **Blood**, v. 100, n. 4, p. 1354-1361, 2002.

SELIGER, B. Molecular mechanisms of MHC class I abnormalities and APM components in human tumors. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 57, n. 11, p. 1719-1726, 2008.

SHAGIN, D. A. et al. Regulation of average length of complex PCR product. **Nucleic Acids Res.**, v. 27, n. 18, p. e23-e23, 1999.

SHAPIRO, C. L.; RECHT, A. Side effects of adjuvant treatment of breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 26, p. 1997-2008, 2001.

SIMMS, P. E.; ELLIS, T. M. Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 3, n. 3, p. 301-304, 1996.

SOMMER, S. S.; COHEN, J. E. The size distributions of proteins, mRNA, and nuclear RNA. **J. Mol. Evol.**, v. 15, n. 1, p. 37-57, 1980.

SRIVATSAN, S. et al. Allogeneic tumor cell vaccines: The promise and limitations in clinical trials. **Hum .Vaccin. Immunother.**, v. 10, n. 1, 2013.

STEINMAN, R. M. Some interfaces of dendritic cell biology. **APMIS**, v. 111, n. 7-8, p. 675-697, 2003.

STEINMAN, R. M. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. **Pathol. Biol.**, v. 51, n. 2, p. 59-60, 2003.

STEINMAN, R. M.; BANCHEREAU, J. Taking dendritic cells into medicine. **Nature**, v. 449, n. 7161, p. 419-426, 2007.

SU, Z. et al. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. **Cancer Res.**, v. 63, n. 9, p. 2127-2133, 2003.

SUNDARASETTY, B. S. et al. Lentivirus-induced dendritic cells for immunization against high-risk WT1(+) acute myeloid leukemia. **Hum. Gene. Ther.**, v. 24, n. 2, p. 220-237, 2013.

SUZUKI, K. et al. Transfection of single-stranded hepatitis A virus RNA activates MHC class I pathway. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 127, n. 2, p. 234-242, 2002.

TAN, J. T. et al. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naïve T cells. **Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 98, n. 15, p. 8732-8737, 2001.

THIBODEAU, J.; BOURGEOIS-DAIGNEAULT, M. C.; LAPOINTE, R. Targeting the MHC Class II antigen presentation pathway in cancer immunotherapy. **Oncoimmunology.**, v. 1, n. 6, p. 908-916, 2012.

TONIOLO, P. A. **Avaliação da transfecção de células dendríticas com RNA tumoral como estratégia para indução de imunidade específica em pacientes com leucemia linfóide crônica.** 129 p. Tese (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2010.

TRAUTMANN, L. et al. Selection of T cell clones expressing high-affinity public TCRs within Human cytomegalovirus-specific CD8 T cell responses. **J. Immunol.**, v. 175, n. 9, p. 6123-6132, 2005.

TREFZER, U. et al. Tumour-dendritic hybrid cell vaccination for the treatment of patients with malignant melanoma: immunological effects and clinical results. **Vaccine**, v. 23, n. 17-18, p. 2367-2373, 2005.

TREFZER, U.; WALDEN, P. Hybrid-cell vaccines for cancer immune therapy. **Mol. Biotechnol.**, v. 25, n. 1, p. 63-69, 2003.

VAN GELDER, R. N. et al. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 87, n. 5, p. 1663-1667, 1990.

YANG, J. Y. et al. Dendritic cells fused with allogeneic hepatocellular carcinoma cell line compared with fused autologous tumor cells as hepatocellular carcinoma vaccines. **Hepatol. Res.**, v. 40, n. 5, p. 505-513, 2010.