

Mylène Adelaide do Rosário Carrascal

**Estudo da resposta imunológica
desencadeada por células de cancro de
bexiga que expressam antígenos sialil-Tn**

LISBOA

2010

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

**Estudo da resposta imunológica desencadeada por
células de cancro de bexiga que expressam
antígenos sialil-Tn**

Mylène Adelaide do Rosário Carrascal

*Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa para obtenção do Grau de Mestre
em Genética Molecular e Biomedicina*

Orientadora:

Prof^a. Doutora Paula Videira (FCM/UNL)

Co-orientadora:

Doutora Maria Guadalupe Cabral (FCM/UNL)

LISBOA

2010

Agradecimentos

Ao Departamento de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas por me receber no seu laboratório e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Professora Dra. Paula Videira e Dra. Guadalupe Cabral pela amizade, confiança, paciência, disponibilidade, orientação e úteis ensinamentos.

À Dra. Zélia Silva, Paulo Severino e Hélio Crespo pela amizade, ajuda constante e bons conselhos.

Aos restantes integrantes do Departamento de Imunologia, especialmente à Dr.^a Catarina Martins pelos ensinamentos e ajuda em Citometria de Fluxo, à D. Glória Nunes e D. Manuela Correia pela simpatia e disponibilidade, e à D. Luísa e D. Idalina pelo auxílio, alegria e bom humor.

Ao Dr. Dário Ligeiro pela preciosa assistência e tempo dispensado ao microscópio.

Aos meus amigos pelo companheirismo e amizade, em particular à Diana Dias por me ouvir, animar e ajudar sempre.

À minha família pela presença constante e ajuda incondicional ao longo do meu percurso de vida, em particular aos meus pais, José e Benta, à minha avó Maria e à minha irmã Sandra, por todo o carinho, paciência, apoio e incentivo. E, um muito especial agradecimento à minha pequena afilhada Bruna por alegrar os meus dias ao longo deste ano de trabalho.

Resumo

As células dendríticas (DCs) conseguem capturar antígenos tumorais e, se propriamente maturadas, activar linfócitos T específicos capazes de eliminar o tumor. No entanto, quando presentes nos tumores, apresentam um fenótipo pouco maduro, tornando-se frequentemente tolerogénicas.

O antígeno sialil-Tn (sTn), expresso em diversos tipos de cancro, medeia interacções entre células, podendo influenciar o reconhecimento imune. O objectivo deste trabalho consistiu em avaliar se o sTn afecta a interacção das células tumorais com DCs, influenciando a função imunológica destas. Como modelo utilizaram-se, a linha celular, $MCR_{pLenti.ST6GN1}$, sobreexpressando a sialiltransferase *ST6GalNac.I* e, conseqüentemente, sTn, e a linha controlo negativo $MCR_{pLenti.transd}$. Verificou-se que as DCs tendem a aderir mais a células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$. A análise da expressão de moléculas apresentadoras de antígenos e co-estimulatórias, revelou que as DCs que aderiram a $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ apresentavam um perfil significativamente menos maduro, comparativamente a $MCR_{pLenti.transd}$, sendo este fenómeno dependente da interacção célula-célula. Quando apoptóticas as células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ são mais facilmente fagocitadas pelas DCs, potencialmente promovendo tolerância. Estes resultados sugerem que o antígeno sTn protege as células tumorais, suprimindo a imunogenicidade das DCs e favorecendo a tolerância imune. Pelo facto de promover a fagocitose, o sTn nos tumores poderá ser vantajoso no estabelecimento de uma terapia anti-cancro com DCs.

Abstract

Dendritic cells (DCs) are able to capture tumour antigens and, if properly matured, activate specific T cells to eliminate the tumour. However, when they are present in cancer environment, DCs exhibit a poor mature phenotype, becoming frequently tolerogenic.

Sialyl-Tn (sTn) antigens, expressed in diverse types of cancer, mediate cells interactions and may influence immune recognition. The aim of this work was to assess whether sTn affects the interaction between DCs and tumour cells that express this antigen, influencing DCs immune functions. As model we used the bladder cancer cell line $MCR_{pLenti.ST6GN1}$, overexpressing ST6GalNAcI sialyltransferase and, consequently, sTn antigen, and the respective negative control $MCR_{pLenti.transd}$. We observed that DCs had a tendency to adhere more to $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ than $MCR_{pLenti.transd}$ cells. Analysis of the expression of antigen presenting and co-stimulatory molecules revealed that DCs adhered to $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ had a significant lesser mature profile than DCs that adhered to $MCR_{pLenti.transd}$ cells, being these phenomena dependent of cells interactions. $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ cells, when apoptotic, were more easily phagocyted by DCs, promoting probably tolerance. These results suggest that sTn antigen protect tumour cells, repressing DCs immunogenicity and promoting immune tolerance. Because sTn antigen in tumours promotes phagocytosis, it may be advantageous in establishing a DCs-mediated therapy.

O trabalho desenvolvido deu origem a três posters:

Mylène Carrascal; Paulo Severino; M Guadalupe Cabral; Manuela Correia; Helena Gouveia; Rita Faria; Fabio Dall'Olio; Paula A Videira. 2010. Immune tolerance to cancer cells: the role of sialyl Tn antigens. 2010 Annual Meeting of the Society for Glycobiology. Florida

P. F. Severino, M. A. Carrascal, G. Helena, M. G. Cabral, M. Correia, N. Malagolini, M. Chiricolo, F. Dall'Olio, P. A. Videira. 2010. Contribution of Thomsen-Friedenreich antigens to bladder cancer malignancy: characterization of cell line models. 16th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. Coimbra

Paulo F. Severino, Mylène A. Carrascal, M. Guadalupe Cabral, Manuela Correia, Nadia Malagolini, Mariella Chiricolo, Paula A. Videira, Fabio Dall'Olio. 2010. Contribution of Thomsen-Friedenreich antigens to bladder cancer malignancy: characterization of cell line models. Summer Course Glycosciences - 11th European Training Course on Carbohydrates. Wageningen, The Netherlands

Palavras-Chave:

- ➔ Células dendríticas (DCs)
- ➔ Antígeno sialil-Tn (sTn)
- ➔ Sialilação
- ➔ Cancro de bexiga
- ➔ Adesão
- ➔ Fagocitose
- ➔ Maturação

Abreviaturas

7-AAD – *7-amino-actinomycin D*

Antigénio sT – Antigénio sialil-T

Antigénio sTn – Antigénio sialil-Tn

APC – Aloficocianina

Células NK – *Natural Killer Cells*

CFSE – *Carboxyfluorescein succinimidyl Ester*

CLRs – Receptores Lectinas tipo C

CMP-Neu5Ac – Ácido N-acetilneuramínico citidina monofosfato

DCs – Células dendríticas

DMSO – Dimetilsulfóxido

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

FSC – *Forward Scatter*

Gal – Galactose

GalNAc – N-acetilgalactosamina

GlcNAc – N-acetilglucosamina

GM-CSF – *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

IL-4 – Interleucina-4

ITIM – *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*

Linfócitos Tc – Linfócitos T citotóxicos

Linfócitos Th – Linfócitos T auxiliares

Linfócitos Treg – Linfócitos T reguladores

LPS – Lipopolissacarido

MFI – Intensidade de Fluorescência Média

MHC-I – Complexo Major de Histocompatibilidade de Classe I

MHC-II – Complexo Major de Histocompatibilidade de Classe II

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difenil-tetrazólio

Neu5Ac – Ácido N-acetilneuramínico

PAMPs – *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PBS – *Phosphate Buffered Saline*

PE – Ficoeritrina

PRR – *Pattern Recognition Receptors*

PS – Fosfatidilserina

Siglecs – *Sialic acid-binding Ig-like Lectins*

SSC – *Side Scatter*

TACAs – Antígenios Carbo-hidratos Associados a Tumores

TCR – *T Cell Receptor*

TLRs – *Toll-Like Receptors*

Índice

Agradecimentos.....	ii
Resumo	iii
Abstract.....	iv
Palavras-Chave:.....	vi
Abreviaturas	vii
1. Introdução	1
1.1. Glicosilação	1
1.1.1. Ácido siálico.....	2
1.1.2. Sialiltransferases	3
1.1.3. Antígenos carbo-hidratos associados a tumores: relevância do sTn.....	4
1.2. Sistema imunológico.....	7
1.2.1. Imunidade inata	8
1.2.2. Imunidade adaptativa	8
1.2.3. Células Dendríticas (DCs).....	11
1.2.4. DCs no ambiente cancerígeno	13
1.2.5. Imunoterapia contra o cancro – vacinas com base em DCs.....	14
1.3. Introdução ao tema da tese	15
2. Materiais e Métodos	19
2.1. Cultura das linhas celulares de cancro de bexiga e de cancro de mama	19
2.2. Isolamento de monócitos a partir de sangue periférico e obtenção de células dendríticas (DCs) derivadas de monócitos.....	20
2.3. Técnicas	22
2.3.1. Citometria de fluxo	22
2.3.2. Microscopia confocal	23
2.4. Análise do fenótipo das linhas celulares por citometria de fluxo Expressão de antígeno sTn, CD44 e Mucina 1 (MUC1).....	23
2.5. Análise do fenótipo das linhas celulares por microscopia confocal - Expressão de antígeno sTn e da enzima ST6GalNacI	24
2.6. Avaliação da adesão entre DCs e linhas celulares de cancro e análise do estado de maturação das DCs	25
2.6.1. Avaliação da adesão após tratamento com Sialidase	26

2.6.2. Comparação da adesão usando DCs previamente maturadas ou DCs imaturas .	27
2.7. Avaliação da fagocitose de corpos apoptóticos de células de cancro de bexiga pelas DCs	27
2.8. Avaliação, através de um ensaio MTT, da susceptibilidade das células de cancro de bexiga à camptotecina.....	28
2.9. Avaliação, por Citometria de Fluxo, da apoptose de células de cancro de bexiga sujeitas ao tratamento com camptotecina.....	29
2.10. Análise Estatística	30
3. Resultados	31
3.1. Análise do fenótipo das células de cancro de bexiga – Expressão do antigénio sialil-Tn (sTn).....	31
3.2. O papel da expressão do antigénio sTn em células tumorais (MCR e MDA-MB-231) na resposta imunológica das DCs: estudo da adesão, indução de maturação e fagocitose	34
3.2.1. Presença de sTn nas células de cancro aumenta a percentagem de adesão das DCs	34
3.2.2. Presença de antigénio sTn nas células de cancro reprime a indução da maturação nas DCs aderidas, tendo em conta a expressão HLA-DR.....	36
3.2.3. Presença de antigénio sTn nas células de cancro reprime a indução da maturação nas DCs aderidas, tendo em conta a expressão de moléculas co-estimulatórias.....	38
3.2.4. Maturação é desencadeada pelo contacto directo entre as células MCR e as DCs	40
3.2.5. Remoção de ácido siálico presente à superfície das células tumorais promove maior adesão e menor maturação das DCs	42
3.2.6. DCs previamente maturadas aderem menos às células MCR do que as DCs imaturas.....	44
3.2.7. Células apoptóticas MCR _{pLenti.ST6GN1} são mais fagocitadas pelas DCs.....	46
3.3. Células MCR _{pLenti.ST6GN1} são mais susceptíveis ao agente apoptótico camptotecina do que células MCR _{pLenti.transd}	47
3.4. MUC1 e CD44 – Possíveis “portadores” de antigénio sialil-Tn	50
4. Discussão	52
4.1. Antigénio sTn em células tumorais influencia a adesão e maturação das DCs.....	52
4.2. Tratamento com sialidase evidencia a complexidade do reconhecimento de células tumorais pelas DCs	54

4.3. DCs maduras aderem menos a células tumorais do que DCs imaturas	56
4.4. Células apoptóticas MCR _{pLenti.ST6GN1} são mais fagocitadas por DCs do que as MCR _{pLenti.transd}	57
4.5. MCR _{pLenti.ST6GN1} é mais susceptível ao agente Camptotecina do que MCR _{pLenti.transd}	60
4.6. Perspectivas futuras.....	60
4.7. Conclusões gerais.....	61
5. Bibliografia	64
Anexos	75
Anexo I: Plasmídeo pLenti6/V5-D-TOPO utilizado na transdução da linha celular MCR..	76
Anexo II: Plasmídeo pRc-CMV na transfecção da linha celular MDA-MB-231	77
Anexo III: Constituição de soluções tampão utilizadas neste trabalho.....	78
Anexo IV: Comparação de marcação entre dois anticorpos contra antigénio sialil-Tn ...	79
Anexo V: Exemplo de uma análise dos resultados de um ensaio de adesão obtidos por Citometria de Fluxo	80
Anexo VI: Exemplo de uma análise dos resultados de um ensaio de apoptose obtidos por Citometria de Fluxo	81
Anexo VII: Exemplo de uma análise dos resultados de um ensaio de fagocitose obtidos por Citometria de Fluxo	82
Anexo VIII: Sumário submetido para o congresso “16th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research”	83
Anexo IX: Sumário submetido para o congresso “2010 Annual Meeting of the Society for Glycobiology”	84
Anexo X: Sumário submetido para o curso “Summer Course Glycosciences - 11th European Training Course on Carbohydrates”	85

1. Introdução

1.1. Glicosilação

A glicosilação é a modificação pós-traducional mais comum das proteínas e envolve a adição e remoção de carbo-hidratos a proteínas ou lípidos recém sintetizados, realizada por uma sequência de enzimas presentes no complexo de Golgi e no Retículo Endoplasmático (Kornfeld e Kornfeld, 1985 e Gill *et al.*, 2010). Este é um processo altamente regulado, no qual glicanos específicos podem alterar a estabilidade e a função da proteína ou lípido a que se associam. A diversidade estrutural dos carbo-hidratos que se encontram nos glicoconjugados (glicoproteínas e glicolípidos) presentes na superfície celular leva a que as funções biológicas desempenhadas por estes compostos sejam muito diversas. Nomeadamente, têm um importante papel no reconhecimento intercelular, adesão, biologia do desenvolvimento, resposta imune, processo inflamatório, proliferação celular, apoptose, entre outros (Wang *et al.*, 1997, Campbell e Yarema, 2005 e Trottein, *et al.*, 2009).

A glicosilação pode ser de dois tipos: N-glicosilação e O-glicosilação (Fig. 1.1). A N-glicosilação consiste na ligação de resíduos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) a grupos amida do aminoácido asparagina (Asn), enquanto a O-glicosilação consiste na ligação de N-acetilgalactosamina (GalNAc) a resíduos de serina/treonina (Ser/Thr).

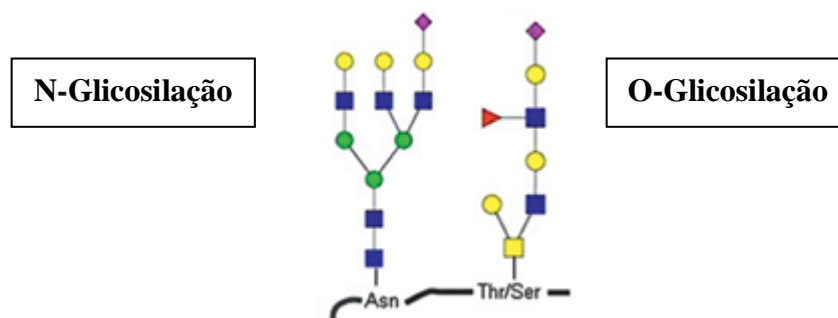


Figura 1.1 – Exemplos de glicoproteínas N-glicosiladas e O-glicosiladas (adaptada de Reis *et al.*, 2010)

Em particular, a O-glicosilação (sobre a qual incidirá mais o trabalho apresentado nesta dissertação) é, normalmente, iniciada no complexo de Golgi, realizada por transferases específicas, que produzem diversas estruturas principais, que podem ainda ser modificadas por sialilação, sulfatação, acetilação, fucosilação e extensão de polilactosaminas (Steen *et al.*, 1998).

Mais especificamente, o primeiro passo na biossíntese de O-glicanos consiste na transferência de um resíduo GalNAc para um resíduo de serina ou treonina de uma proteína ou lípido, que gera o antígeno Tn. Posteriormente, a adição de galactose (Gal) e/ou GlcNAc por glicosiltransferases específicas levam à formação de estruturas comuns de O-glicanos, que podem ainda ser processados e terminarem na adição de resíduos de fucose ou ácido siálico (Julien *et al.*, 2006).

1.1.1. Ácido siálico

Os ácidos siálicos são uma grande família de monossacáridos ácidos de nove carbonos, que são comumente encontrados em animais e alguns microrganismos. Localizam-se geralmente na superfície exterior das células, maioritariamente como componente terminal de glicoconjugados, incluindo glicoproteínas (com N-glicosilação ou O-glicosilação) e glicolípidos (Powell *et al.*, 1987 e Nakahashi *et al.*, 2007), e em secreções celulares (Schauer, 2009). São um grupo heterogêneo de mais de 50 variantes estruturais, sendo o ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), o ácido siálico mais predominante em células de mamíferos (Fig. 1.2) (Nakahashi *et al.*, 2007).

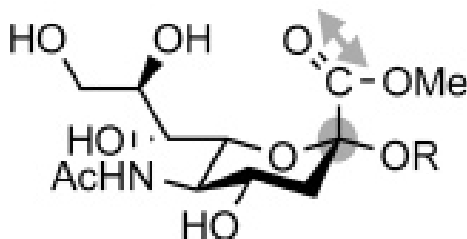


Figura 1.2 – Estrutura estereoquímica de Neu5Ac (Nakahashi *et al.*, 2007)

Devido à sua localização e carga negativa, o ácido siálico desempenha, directa e indirectamente, um importante papel em múltiplos e diversos eventos celulares, sendo difícil atribuir-lhe uma função concreta (Schauer, 2009). Se, por um lado, funciona como ligando para uma variedade de moléculas, mediando o reconhecimento celular e processos de adesão, como, por exemplo, nos casos de adesão de células neuronais, resposta inflamatória e imunológica (Tanner, 2005); por outro lado, os resíduos de ácido siálico “mascaram” locais de reconhecimento, como, por exemplo, glicoproteínas do soro, as quais são protegidas por ácido siálico do reconhecimento e remoção por receptores de asialoglicoproteínas no fígado (Mortensen e Huseby, 1997).

Assim, os ácidos siálicos estão envolvidos em fenómenos de interacção celular e molecular, processos fisiológicos e patológicos (Schauer, 2009).

A biossíntese e metabolismo de sialoconjugados são controlados por sialidases, sialiltransferases, esterases e liases (Weijers *et al.*, 2008)

1.1.2. Sialiltransferases

As sialiltransferases são uma família de enzimas responsáveis pela biossíntese de estruturas sialiladas. Estas enzimas catalisam a transferência de um resíduo de ácido siálico proveniente do ácido N-acetilneuramínico citidina monofosfato (CMP-Neu5Ac) para a cadeia oligossacarídica de glicoproteínas e glicolípidos. A ligação estabelecida pode ser do tipo α -2,3 ou α -2,6 a um resíduo Gal, α -2,6 a um resíduo GalNAc, ou α -2,8 a outro resíduo de ácido siálico (Marcos *et al.*, 2004).

A forma activa de ácido siálico, CMP-Neu5Ac, é gerada a partir do acoplamento directo de citosina trifosfato, CTP, com Neu5Ac, e catalisada pela enzima CMP-Neu5Ac sintetase (Heidlask *et al.*, 1992).

As sialiltransferases consistem em, pelo menos, 20 proteínas glicosiltransferases diferentes, normalmente ligadas à membrana do complexo de Golgi, mas também podem ser solúveis ou ligadas à membrana citoplasmática (Gross *et al.*, 1996; Harduin-Lepers *et al.*, 2001; Cabral *et al.*, 2010), e cada uma catalisa um tipo de ligação e tem uma especificidade própria para com o substrato (Marcos *et al.*, 2004). Estas enzimas são expressas de forma específica num determinado tecido e tipo celular, e a sua expressão é regulada durante os vários estados de desenvolvimento (Julien *et al.*, 2005).

As sialiltransferases têm, indirectamente, um papel importante no desenvolvimento de cancro, visto os ácidos siálicos presentes no terminal de um antígeno glicoconjugado, desempenharem várias funções relevantes, como modular interacções célula-célula através de efeitos não específicos de repulsão de carga, ligar especificamente a moléculas de adesão celular, como Selectinas ou Siglecs, e mascarar a estrutura fundamental dos açúcares (Dall'Olio e Chiricolo, 2001).

Especificamente, a sialiltransferase ST6GalNAc I (à qual damos especial destaque por estar relacionada com o estudo desenvolvido nesta tese) apresenta uma alta especificidade para as estruturas GalNAc α -O-Ser/Thr (antígeno Tn), Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr e Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr, e é responsável pela síntese do antígeno sialil-Tn (sTn) (Fig. 1.3) (Harduin-Lepers *et al.*, 2001 e Ikehara *et al.*, 1999). Em alguns tipos de

cancro a actividade desta sialiltransferase está correlacionada com a expressão do antígeno sTn (Julien *et al.*, 2006). A transfecção de linhas celulares de cancro que expressam antígenos Tn com o cDNA da enzima ST6GalNAc I é suficiente para induzir a expressão de antígeno sTn, o que permite o desenvolvimento de linhas celulares de cancro que sobreexpressam este antígeno (Julien *et al.*, 2001).

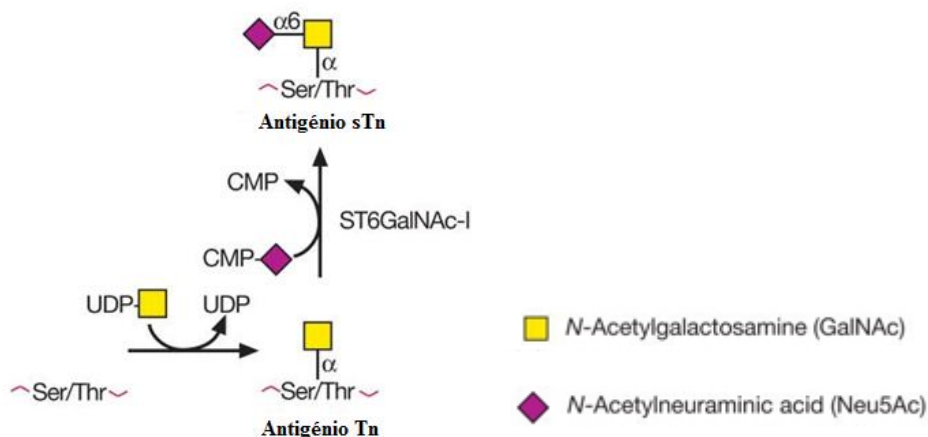


Figura 1.3 – Síntese de antígeno Tn e antígeno sTn (adaptada de Varki *et al.*, 2009)

1.1.3. Antígenos carbo-hidratos associados a tumores: relevância do sTn

As células de cancro expressam alguns antígenos na sua superfície, nomeadamente antígenos carbo-hidratos associados a tumores (TACAs – do inglês *tumour-associated carbohydrates antigens*). Estes podem ser N-glicosilados, como o antígeno Lewis A, Lewis X, sialil-Lewis A e sialil-Lewis X, ou O-glicosilados, como os antígenos Thomsen-Friedenreich, designadamente os antígenos T, Tn e as suas formas sialiladas, o antígeno sTn e sialil-T (sT) (Brocke e Kunz, 2002).

O antígeno Tn é o precursor do antígeno T, e ambos podem ser sialilados por sialiltransferases. Nomeadamente, a sialiltransferase ST6GalNAcI que catalisa a transferência de ácido siálico, para o antígeno Tn, produzindo o antígeno sTn (ácido siálico ligado em α-2,6 a GalNAc), e as sialiltransferases ST3GalII e ST3GalI que catalisam a transferência deste para o antígeno T (Core1), produzindo o antígeno sT (Fig. 1.4) (Ikehara *et al.*, 1999).

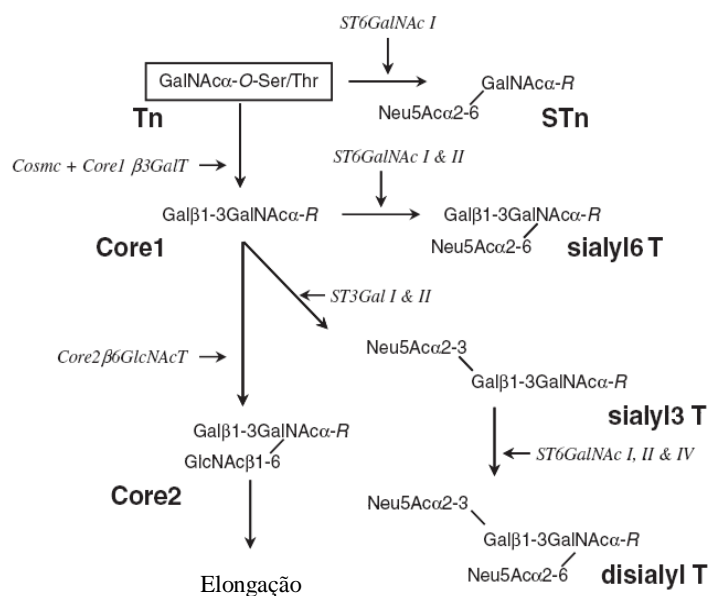


Figura 1.4 – Via de biossíntese dos antígenos Thomsen-Friedenreich (adaptada de Cazet *et al.*, 2010)

O antígeno Tn é detectado em 90% dos carcinomas humanos, incluindo cancro de mama, do cólon, de bexiga e da próstata (Bettahi *et al.*, 2009). Em tecidos normais, os antígenos T e Tn podem se encontrar numa forma críptica, i.e. uma forma que, maioritariamente, não é detectada por anticorpos monoclonais contra estas moléculas, já que os seus epítomos podem estar mascarados por ácido siálico e este por sua vez poderá estar O-acetilado (Dall'Olio, 1996).

O sTn (também designado por CD175s) (Fig. 1.5), que será estudado nesta dissertação, tem atraído muita atenção por parte de clínicos e investigadores por ser, também, bastante expresso na maioria dos cancros, principalmente gástrico, colo-rectal, de ovário, de mama e pancreático, além de ser aberrantemente expresso em lesões pré-malignas do tracto gastrointestinal e neoplasias intraepiteliais pancreáticas, e por estar associado a um fraco prognóstico, a maior agressividade e a baixa resposta à quimioterapia (Marcos *et al.*, 2004 e Sewell *et al.*, 2006). Especificamente, tem sido descrito que a expressão de antígeno sTn é capaz de modular um fenótipo maligno, induzindo um comportamento celular mais agressivo, como a diminuição de agregação célula-célula e aumento de adesão à matriz extracelular, migração e invasão (Pinho *et al.*, 2007).

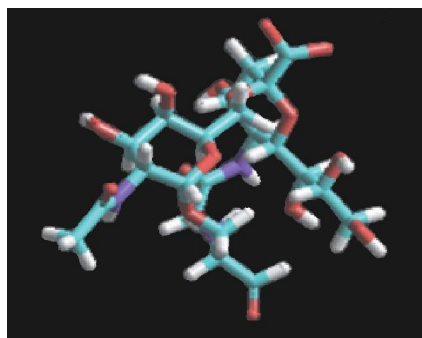


Figura 1.5 – Representação da estrutura do antígeno sTn (Irazoqui *et al.*, 2005)

Para além de ser expresso em tecidos cancerígenos, o antígeno sTn também é, normalmente, expresso no lúmen de tecidos secretores normais, como glândulas salivares, mucosa gástrica, intestinal e uterina, mas está ausente na maioria dos outros tecidos, como tecido de mama, de ovário ou pancreático (Julien *et al.*, 2001). Quando é expresso em tecidos normais do cólon, este antígeno encontra-se num estado críptico devido à O-acetilação do resíduo de ácido siálico constituinte do antígeno, ou seja, não é detectado por anticorpos monoclonais anti-sTn. De facto, diferenças na detecção do antígeno sTn entre tecidos normais e cancerígenos podem ter origem em diferenças de O-acetilação no ácido siálico presente nos antígenos sTn e/ou na expressão anormal destes antígenos em tecidos malignos, não significando que não sejam expressos no tecido normal (Dall'Olio, 1996). Por exemplo, em cancro do cólon, os tecidos normais e os cancerígenos apresentam um nível semelhante da actividade da enzima ST6GalNAcI (responsável pela síntese de sTn), apesar do antígeno sTn só ser detectado nos tecidos malignos (Vázquez-Martín *et al.*, 2004). Verificou-se então que a diferença na detecção de antígeno sTn entre os dois tipos de tecido se devia ao facto de, em tecido normal, o ácido siálico do sTn estar O-acetilado, impossibilitando a sua detecção com recurso a anticorpos. A redução do processo de O-acetilação dos ácidos siálicos parece ocorrer num estado precoce da transformação dos tecidos normais em cancerígenos (Corfield *et al.*, 1999).

Apesar de o papel funcional do antígeno sTn em células cancerígenas ainda não estar totalmente esclarecido, algumas publicações sugerem que a estrutura sTn pode influenciar o reconhecimento e as interacções célula-célula (Marcos *et al.*, 2004). Por exemplo, o antígeno sTn desempenha um papel no reconhecimento de células cancerígenas pelo sistema imune, parecendo proteger as células metastáticas da degradação na corrente sanguínea (Brockhausen *et al.*, 2001). Por outro lado, a sialilação prematura do antígeno Tn também induz

modificações adicionais do perfil geral de glicosilação da célula favorecendo a exposição ou o disfarce de outras estruturas glicosídicas que podem induzir ou prevenir o reconhecimento das células cancerígenas por moléculas receptoras tipo Lectinas, como Selectinas, Siglecs e Galectinas, presentes em diversas células do sistema imunológico, o que também pode contribuir para o desenvolvimento do cancro (Wang *et al.*, 2001).

O antigénio sTn pode estar associado a diversas proteínas membranares, incluindo mucinas (especialmente MUC1), integrinas e CD44. Como estas proteínas têm funções importantes em processos de adesão e/ou migração, alterações na sua glicosilação podem influenciar estas funções (Cazet *et al.*, 2010). Assim, como a expressão do antigénio sTn em células de cancro pode estar associada com a glicosilação aberrante destas moléculas, as mesmas têm sido utilizadas como alvos da imunoterapia contra o cancro em estudos pré-clínicos e clínicos (Soares, *et al.*, 2001).

Também a associação entre antigénios Tn e sTn promoveu a utilização destes antigénios em imunoterapia activa. De facto, estudos realizados em humanos indicam que o tratamento com vacinas, que consistem na ligação química do antigénio Tn ou sTn a KLH (*keyhole limpet haemocyanin* – proteína que induz uma poderosa resposta imunológica), associado a um adjuvante, pode induzir uma resposta imune humoral contra estes antigénios associados a tumores (ex. MacLean *et al.*, 1993).

1.2. Sistema imunológico

O principal papel do sistema imunológico consiste em garantir a integridade funcional do corpo. Para tal, necessita reconhecer potenciais ameaças que podem colocar em risco essa integridade e eliminá-las (Köhl, 2006).

O sistema imunológico produz uma enorme variedade de células e moléculas que vão, especificamente, reconhecer e eliminar uma extraordinária variedade de invasores estranhos. Estas células e moléculas vão actuar em conjunto numa rede dinâmica, cuja complexidade rivaliza com a do sistema nervoso. Funcionalmente, uma resposta imunológica pode ser dividida em duas actividades – reconhecimento e resposta. O reconhecimento é caracterizado pela sua especificidade, pois consegue reconhecer diferenças químicas subtis que diferenciam um agente patogénico estranho de outro, e consegue discriminar entre moléculas estranhas e células e proteínas do seu próprio organismo. Uma vez que um organismo estranho é reconhecido, o sistema imune recruta várias células e moléculas, que vão produzir uma

resposta eficaz para eliminar e/ou neutralizar o organismo - imunidade inata e imunidade adaptativa (Goldsby *et al.*, 2000).

1.2.1. Imunidade inata

A imunidade inata, ou imunidade não específica, é um dos dois tipos de imunidade produzida pelo sistema imunológico (Palucka e Banchereau, 1999) e encontra-se presente em todos os organismos multicelulares, especificamente vertebrados, invertebrados, plantas e fungos (Fearon e Locksley, 1996). Alguns dos componentes desta imunidade são a pele e a mucosa epitelial (barreira protectora), o complemento, os fagócitos e as células NK, que reconhecem e respondem a organismos estranhos (Fig. 1.6) (Abbas e Lichtman, 2005).

Especificamente, o reconhecimento inato é mediado por um grupo de receptores não clonais, os quais pertencem a diversas famílias proteicas distintas (Medzhitov e Janeway Jr, 1997a). Estes receptores reconhecem padrões moleculares conservados associados a agentes patogénicos microbianos (PAMPs – *pathogen-associated molecular patterns*), e são referidos como PRR (*pattern recognition receptors*). Como os PAMPs são produzidos unicamente por agentes microbianos e não pelo próprio organismo, o seu reconhecimento por PRRs é um sinal de presença de agentes patogénicos (Medzhitov R. e Janeway Jr, C. A. 1997b)

Os fagócitos são um dos principais componentes da imunidade inata e representam uma família heterogénea de células que incluem neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DCs). Os dois primeiros tipos celulares são efectores importantes da imunidade inata, e estão envolvidos na remoção imediata de agentes patogénicos através de mecanismos de indução de morte intracelular dos patógenos fagocitados e respostas inflamatórias locais. As DCs, apesar da sua capacidade fagocítica, não estão directamente envolvidas na remoção imediata de agentes patogénicos, nem são consideradas efectores “convencionais” da imunidade inata. Contudo, são potentes células apresentadoras de antígenos, conseguindo migrar rapidamente dos tecidos para os nódulos linfáticos, activar linfócitos em repouso e iniciar respostas imunes específicas e memória imunológica (Savina e Amigorena, 2007).

1.2.2. Imunidade adaptativa

A imunidade adaptativa é também conhecida por imunidade antígeno-específica ou imunidade adquirida, existe apenas nos vertebrados (Fearon e Locksley, 1996), e os seus elementos essenciais surgem precocemente no curso de evolução dos vertebrados (Flajnik e Kasahara, 2001). Esta imunidade é estimulada por agentes microbianos que invadem os

tecidos do organismo, e apresenta quatro propriedades: a especificidade (reconhece diferentes moléculas), a memória (relembra e responde mais vigorosamente a exposições repetidas do mesmo microrganismo), a diversidade (reconhece uma grande variedade de moléculas) e a não-reacção às próprias moléculas, o que previne respostas imunológicas prejudiciais a células e tecidos do próprio organismo (Abbas e Lichtman, 2004).

As principais células da imunidade adaptativa são os linfócitos, os quais são capazes de reconhecer especificamente antigénios e dividem-se em duas subpopulações principais os linfócitos B e T (Fig. 1.6), que apresentam diferentes receptores antigénicos e funções.

A imunidade adaptativa divide-se em dois tipos: a imunidade humoral e a imunidade mediada por células. A imunidade humoral é mediada por moléculas presentes no sangue, designadas por anticorpos, os quais são produzidos por linfócitos B. Os anticorpos são bifuncionais, pois reconhecem diversos tipos de antigénios e promovem diversos mecanismos efectores, como a neutralização de agentes patogénicos e a fagocitose. Como estes anticorpos são específicos, diferentes tipos de anticorpos podem activar diferentes mecanismos efectores. Por outro lado, a imunidade mediada por células, ou imunidade celular, é mediada por linfócitos T e promove a destruição de agentes microbianos apresentados por fagócitos ou a eliminação de células infectadas intracelularmente ou mesmo células tumorais (Abbas e Lichtman, 2005).

A resposta geral da imunidade adaptativa começa pelo reconhecimento de antigénios estranhos por receptores de linfócitos específicos, os quais respondem proliferando e diferenciando-se em células efectoras, cuja função é eliminar os antigénios estranhos, e em células de memória, as quais melhoram a resposta a futuros encontros com esse mesmo antigénio. Para esta activação de linfócitos, é necessário a presença de antigénios e sinais adicionais, que podem ser provenientes dos agentes microbianos ou da resposta da imunidade inata aos agentes microbianos. Mais especificamente, para a activação de linfócitos T “naïve” e, subsequente, proliferação destes em células efectoras são necessários dois sinais, cujo primeiro consiste no reconhecimento do péptido antigénico, que está ligado à molécula de MHC-II (Complexo Major de Histocompatibilidade classe II), especificamente pelo receptor do linfócito T (TCR, do inglês *T cell receptor*), e o segundo consiste na interacção de membros da família de moléculas co-estimulatórias como B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) presentes na superfície de DCs, com receptores CD28 ou CTLA-4 na superfície dos linfócitos T. Após os linfócitos T reconhecerem os antigénios processados que são apresentados por

moléculas MHC, estes linfócitos proliferam e diferenciam-se em células de memória e efectoras (Goldsby *et al.*, 2000).

Os linfócitos T dividem-se em duas subpopulações bem definidas, os T auxiliares (Th ou T CD4+) e T citotóxicos (Tc, CTL, ou T CD8+). Os linfócitos Th reconhecem antígenos ligados a moléculas MHC-II e, quando activados, segregam citocinas que são importantes na activação de linfócitos B, linfócitos Tc, macrófagos, entre outras células, enquanto os linfócitos Tc reconhecem antígenos estranhos ligados a moléculas MHC-I (Complexo Major de Histocompatibilidade classe I), eliminando as células que apresentam esses antígenos (Goldsby *et al.*, 2000).

Para além destas duas subpopulações, foi descrita há 40 anos, uma população de linfócitos T que conseguia suprimir as respostas imunológicas, a qual se designa, actualmente, por linfócitos T reguladores (Treg), e desempenha um papel importante na manutenção da tolerância ao próprio e na homeostase imune pela supressão de uma grande variedade de respostas patológicas e fisiológicas contra o próprio e o não próprio (Sakaguchi *et al.*, 2004). Estes linfócitos Treg também desempenham um importante papel na tolerância ao cancro, encontrando-se presentes em diversos tipos de cancro e reprimindo respostas imunes anti-tumorais (Nishikawa e Sakaguchi, 2010).

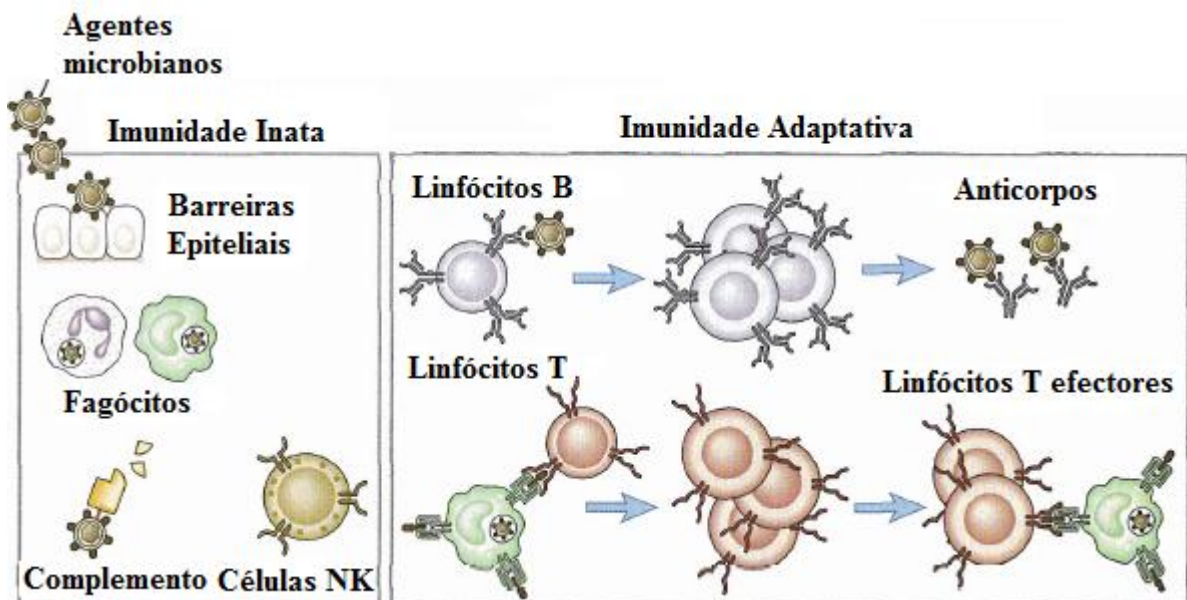


Figura 1.6 – Elementos envolvidos na imunidade inata e adaptativa (adaptada de Abbas e Lichtman, 2005)

1.2.3. Células Dendríticas (DCs)

As DCs representam uma população celular heterogênea com características específicas. A sua heterogeneidade resulta da existência de linhagens distintas, assim como, de diferenças no estado de maturação e na sua capacidade funcional. Idealmente, cada população de DCs deveria ser caracterizada com base em três parâmetros, nomeadamente estrutura, moléculas de superfície (fenótipo) e função, mas, como a origem da linhagem, o estado de maturação e as propriedades funcionais de várias populações de DCs são parâmetros pouco elucidados, a caracterização de todas as linhagens de DCs não está ainda concluída (Keller, 2001 e Liu e Nussenzweig, 2010).

Entre as várias populações de DCs encontram-se as DCs mielóides que incluem as DCs derivadas de monócitos, as células de Langerhans (ou DCs epiteliais), DCs intersticiais, e DCs plasmacitóides. Especificamente, as DCs derivadas de monócitos surgem *in vivo* durante o processo de inflamação e a migração transendotelial dos monócitos do sangue. Esta diferenciação de monócito a DC que ocorre fisiologicamente, pode ser reproduzida *in vitro* quando os monócitos são colocados em cultura com as citocinas *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) e Interleucina-4 (IL-4) (Keller, 2001).

As DCs apresentam três estados de diferenciação, nomeadamente os precursores de DCs, as DCs imaturas e as DCs maduras (Fig. 1.7) (O'Neill et al., 2004).

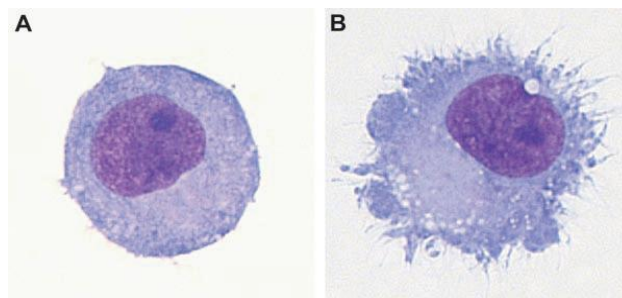


Figura 1.7 – Representação da morfologia de moDCs imaturas (A) e maduras (B)
(O'Neill *et al.*, 2004)

Especificamente, os precursores de DCs libertam algumas citocinas, nomeadamente IFN- α , TNF- α e IL-1. As DCs imaturas apresentam, caracteristicamente, uma grande capacidade para capturar e processar antígenos mas uma baixa capacidade para estimular linfócitos T. Para além disso, possuem, também, MHC-II intracelular e uma baixa expressão de moléculas co-estimulatórias, principalmente CD40, CD80, CD86, CD83.

A maturação consiste num extenso processo de diferenciação dependente de estímulo e irreversível, provocando alterações morfológicas, particularmente a perda de estruturas/placas de adesão, reorganização do citoesqueleto, aquisição de alta mobilidade celular (para permitir a migração das DCs dos tecidos para zonas de linfócitos T nos nódulos linfáticos) e outras alterações fenotípicas e funcionais (O'Neill *et al.*, 2004). As DCs maduras apresentam baixa capacidade de fagocitose/endocitose, elevada expressão, à superfície celular, das moléculas de apresentação MHC-I e MHC-II e co-estimulatórias e outras moléculas envolvidas na formação de sinapse imunológica (Celia *et al.*, 1997 e O'Neill *et al.*, 2004). Para além disso, a maturação conduz à secreção de citocinas essenciais na determinação da natureza da resposta imunológica resultante e ainda a secreção de quimiocinas que recrutam monócitos, outras DCs e subgrupos específicos de linfócitos T para o local da infecção (O'Neill *et al.*, 2004).

Resumidamente, durante o processo da maturação as DCs imaturas (que capturam os antígenos), diferenciam-se em DCs maduras, as quais vão apresentar os antígenos processados a linfócitos T. Assim, o papel das DCs está correlacionado com a transição da resposta da imunidade inata para a da imunidade adaptativa (Keller, 2001 e Steinman e Hemmi, 2006).

Quando imaturas, as DCs reconhecem os estímulos através de PRRs, os quais constituem uma grande superfamília de receptores localizados na superfície celular, no compartimento endossomal e no citosol. Os TLRs (*Toll-Like Receptors*) são os PRRs melhor caracterizados, encontram-se expressos em várias células, incluindo monócitos, macrófagos e DCs, e detectam vários padrões moleculares típicos de antígenos microbianos. As diferentes classes de DCs expressam diferentes grupos de TLRs, definindo o seu papel na resposta inata e, por último, na resposta adaptativa (Takeda, *et al.*, 2003 e Zanoni e Granucci, 2010). Para além destes receptores, as DCs possuem também outros receptores menos descritos que reconhecem estruturas glicosídicas, como os receptores Lectinas tipo C (CLRs, do inglês *C-type lectins*) e Siglecs (*sialic acid-binding Ig-like lectins*). Especificamente, os CLRs representam uma família de lectinas dependentes de cálcio que se ligam a glicoproteínas em geral, incluindo as que são expressas por células tumorais (Dhodapkar *et al.*, 2008), enquanto os receptores Siglecs são membros de uma superfamília de imunoglobulinas (Igs) caracterizada pela sua especificidade para ácidos siálicos que estão ligados na região terminal de glicoconjugados presentes na superfície celular (Crocker e Redelinghuys, 2008). A maioria destes receptores apresenta uma expressão alterada durante o processo de maturação nas DCs,

encontrando-se, na maioria dos casos, diminuída (Engering *et al.*, 2002, van Vliet *et al.*, 2006 e Lock *et al.*, 2004).

Após o reconhecimento antigénico, as DCs capturam os antigénios detectados, por três mecanismos distintos: i) macropinocitose, que consiste na internalização de grandes quantidades de fluido extracelular e solutos nele dissolvidos, com formação de grandes vesículas pinocíticas; ii) endocitose mediada por receptor, que consiste na internalização de pequenas moléculas que se ligam a receptores membranares (receptores de lectinas, TLRs, receptores Fc, receptores do complemento ou outros) e são internalizados por invaginações da membrana que formam pequenas vesículas; iii) fagocitose, que consiste na captura de partículas, como microrganismos, ou fragmentos de células apoptóticas e necróticas, e que também envolve um reconhecimento por receptores da superfície celular (Keller, 2001).

A endocitose realizada pelas DCs não é conhecida como um contributo para as defesas inatas, ou seja, para a remoção e morte intracelular de agentes microbianos, mas é claramente relevante no processamento eficiente de antigénios e apresentação dos seus produtos aos linfócitos T via moléculas MHC-I e MHC-II (Steinman e Hemmi, 2006).

Portanto, após a internalização de antigénios, as DCs degradam-nos, transformando-os em pequenos fragmentos (péptidos), que se vão ligar a moléculas MHC-II. Estes complexos de moléculas MHC-II carregadas com os péptidos são exportados para a superfície celular, mantendo-se estáveis durante vários dias e disponíveis para o reconhecimento de linfócitos T auxiliares. Apesar das DCs imaturas também expressarem moléculas MHC-II, estas moléculas não estão ligadas a nenhum péptido processado, apresentando um tempo de vida muito curto e sendo rapidamente internalizadas após serem expostas à superfície celular, o que previne uma acumulação destas moléculas à superfície quando a DC ainda não internalizou nenhum antigénio (Goldsby *et al.*, 2000 e Cella *et al.*, 1997).

No caso de antigénios glicosilados, nomeadamente glicoproteínas, parece que durante o processamento e apresentação antigénica, as estruturas glicosídicas permanecem ligadas à proteína, influenciando o reconhecimento pelos linfócitos T (Vlad *et al.*, 2002).

1.2.4. DCs no ambiente cancerígeno

No local de crescimento de alguns tumores encontram-se DCs, que apresentam, muitas vezes, um fenótipo imaturo. Estas DCs associadas a tumores possuem uma actividade tolerogénica aumentada devido a factores tumorais, que bloqueiam a maturação das DCs. Os tumores podem, também, segregar factores que induzem apoptose nas DCs, promovendo,

também assim a imunossupressão. Assim, estas DCs que não maturam não conseguem estimular respostas imunes anti-tumorais, favorecendo a tolerância ao tumor (Bennaceur *et al.*, 2009).

Apesar de algumas DCs imaturas que se encontram no local do tumor promoverem a evasão imunológica, foi demonstrado que as DCs são capazes de apresentar antigénios tumorais e que são importantes no desenvolvimento de uma resposta anti-tumoral espontânea *in vivo*. Inclusivamente, alguns estudos identificaram moléculas e mecanismos que conseguem influenciar a qualidade de DCs e a sua capacidade de promover diferentes respostas imunes, de modo a favorecer o desenvolvimento de respostas anti-tumorais. No futuro, espera-se determinar quais as interacções entre as DCs e os componentes do ambiente tumoral que alteram as funções destas células, quais os mecanismos de sinalização envolvidos, e identificar marcadores associados a DCs imuno-estimulatórias versus DCs imunossupressoras, de modo a conseguir prever o desenvolvimento do cancro e a capacidade de resposta ao tratamento (Lina *et al.*, 2010).

1.2.5. Imunoterapia contra o cancro – vacinas com base em DCs

A prevenção de doenças infecciosas através da imunização foi uma das grandes conquistas da medicina moderna. No entanto, permanece por conquistar um melhoramento na eficácia de vacinas contra o cancro e contra determinados agentes patogénicos (Adema, 2009).

A imunoterapia contra o cancro apresenta como vantagens, comparativamente com a radioterapia e a quimioterapia, a sua baixa toxicidade, a activação do sistema imunológico de forma a destruir as células tumorais e concessão de memória imunológica eficaz na remissão de tumores recorrentes. Como muitos tumores expressam antigénios específicos, estes podem ser utilizados como alvos para a imunoterapia (Adema, 2009).

Devido ao papel decisivo das DCs na indução da imunidade e tolerância no cancro, o qual impulsionou a investigação desta capacidade única para modular a imunidade, começou-se a estudar uma possível utilização de DCs em imunoterapia. Neste processo, inicialmente, produzem-se DCs *ex vivo* (derivadas de monócitos do doente), as quais vão ser “activadas” com antigénios tumorais (provenientes de extractos proteicos de células tumorais ou de células tumorais mortas) do mesmo doente. Estes antigénios deverão ser, após internalizados e processados pela DC, apresentados via MHC. As DCs assim activadas são, posteriormente,

readministradas no doente para estimular os seus linfócitos T e assim permitir a erradicação de células tumorais (Fig. 1.8) (Steinman e Dhodapkar, 2001).

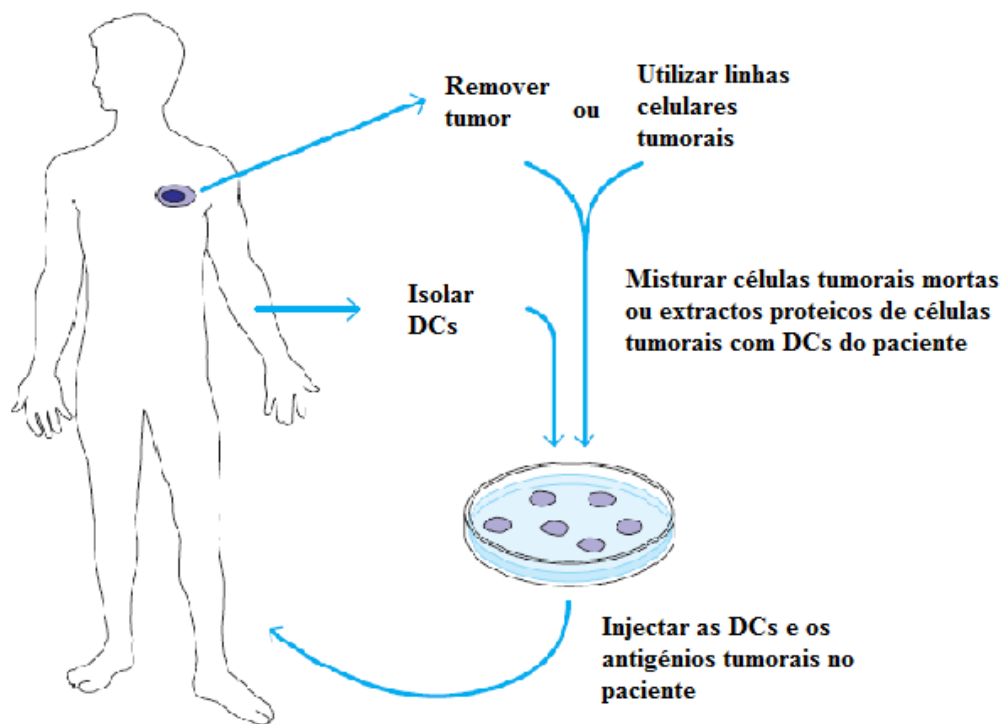


Figura 1.8 – Desenho das vacinas contra cancro baseadas em DCs (adaptado de Goldsby *et al.*, 2000)

Foi demonstrado em murganhos que as DCs geradas *ex vivo* e estimuladas com antígenos associados a tumores são capazes de induzir imunidade anti-tumoral e regressão da estabilidade tumoral (Melief, 2008). A maioria dos estudos realizados em humanos, nomeadamente em doentes com melanoma, a vacinação com base em DCs promove uma abordagem segura de imunoterapia anti-cancro que pode ser efectiva nalguns doentes com um mínimo de efeitos colaterais (Gao *et al.*, 2008).

Futuramente, é necessária uma maior compreensão de como as DCs induzem e modulam a imunidade, de modo a explorá-las, de forma mais eficaz, como vacinas anti-tumorais e melhorar a sua eficiência (Adema, 2009).

1.3. Introdução ao tema da tese

O cancro de bexiga é um dos cancros mais comuns em humanos e a sua incidência tem vindo a aumentar nos últimos anos. Aproximadamente 70% dos cancros de bexiga são

superficiais (não invadem a camada muscular) e tem uma baixa taxa de mortalidade. No entanto, o cancro de bexiga superficial apresenta uma elevada taxa (30-50%) de recorrência após o tratamento inicial, nos quais 15% destes doentes manifestam um agravamento do grau e estado do tumor. Como os tratamentos padrão, nomeadamente a recessão seguida de administração intravesical bacillus Calmette-Guérin (BCG), falham em quase um terço dos doentes, devido a recorrências, progressão do tumor para um maior grau ou intolerância à terapia, o cancro de bexiga tornou-se um sério problema de saúde pública e uma responsabilidade sócio-económica. Assim, como os tratamentos utilizados na terapia deste cancro não são muito eficientes, é necessário testar terapias complementares, como a imunoterapia utilizando DCs, de modo a obter um resultado mais eficiente de tratamento (Videira *et al.*, 2007 e Videira *et al.*, 2009).

Apesar de as DCs terem como característica excepcional, a capacidade de capturar antígenos tumorais e activar especificamente linfócitos T citotóxicos para destruição do tumor, como descrito anteriormente, tem sido demonstrado que no ambiente tumoral, estas células não exercem esta função de modo eficiente favorecendo a sobrevivência do tumor mais do que promovendo a sua destruição. Para isto crê-se que a maior contribuição provém de factores imunossupressores secretados pelas células tumorais e pelo contacto DC: célula tumoral. Contudo, tem-se vindo a explorar a utilização das DCs como potenciais vacinas de cancro, capazes de estimular eficientemente respostas anti-tumorais, quando activadas apropriadamente *ex vivo* (Steinman e Banchereau, 2007). A regressão tumoral com este tipo de imunoterapia ainda é relativamente baixa, pois há muitos factores que têm de ser melhorados para que este tratamento se revele eficaz. Por exemplo, é desejável encontrar formas eficientes de aumentar a imunogenicidade das DCs, o que passa por tentar tornar os antígenos tumorais mais imunogénicos. Por outro lado, uma melhor caracterização dos factores implicados na indução de tolerância é fundamental para uma melhoria da terapêutica.

Durante a transformação do tumor, a instabilidade genómica cria um vasto reportório de células tumorais que são seleccionadas por factores presentes no micro-ambiente, como factores de crescimento, nutrientes e pressão imunológica (Khong e Restifo, 2002). De facto, interacção entre as células de cancro e os elementos do organismo modula as actividades associadas à invasão, crescimento tumoral e mobilidade. Também a expressão de algumas estruturas de glicanos em células cancerígenas tem demonstrado ter uma relevância funcional

para os processos de adesão celular, invasão e metástase (Pinho *et al.*, 2007 e Liotta e Kohn, 2001). Especificamente, a expressão aberrante do antigénio sTn observada em vários tipos de cancro está associada a um prognóstico desfavorável dos doentes, uma vez que este antigénio parece ser capaz de modular o fenótipo de malignidade, induzindo um comportamento mais agressivo das células tumorais, com uma menor capacidade de agregação célula-célula e maior adesão à matriz, migração e invasão (Pinho *et al.*, 2007).

Sabe-se que os antigénios Thomsen-Friedenreich são mais expressos por células de cancro de bexiga do que pelas células de urotélio saudável (Videira *et al.*, 2007). Especificamente, a expressão fenotípica de sTn, em cancro de bexiga, foi confirmada por estudos preliminares de amostras de doentes que foram submetidos a recessão (Santos, L. L., dados não publicados). Assim como também foi comprovado que a expressão da sialiltransferase ST6GalNacI (responsável pela sialilação do antigénio Tn) é mais elevada em amostras humanas de cancro de bexiga do que em amostras de urotélio normal (Videira, P. A., dados não publicados).

Assim, o objectivo desta dissertação foi o de estudar qual o papel dos antigénio sTn expressos por células de cancro de bexiga na interacção com DCs e na modulação da resposta imunitária desencadeada por estas.

Para concretizar este objectivo, foram utilizadas linhas celulares de cancro de bexiga, MCR_{pLenti.ST6GN1} e MCR_{pLenti.transd}. A linha MCR_{pLenti.ST6GN1} sobrepresa a enzima ST6GalNac I, e consequentemente tem uma grande expressão de antigénios sTn, enquanto a linha MCR_{pLenti.transd} não expressa esta enzima, nem antigénio sTn.

A linha celular MCR foi inicialmente escolhida para ser geneticamente manipulada e originar um modelo de expressão do antigénio sTn, isto porque a linha “selvagem” não expressa o antigénio sTn, apresenta uma alta expressão do antigénio Tn e uma baixa expressão da enzima ST6GalNac I (Amado, 2007).

Neste trabalho foram utilizadas DCs derivadas de monócitos humanos, porque esta é uma forma que permite a obtenção razoável de DCs funcionais, uma vez que as DCs são raras em circulação sanguínea. Por outro lado, estas DCs são normalmente as utilizadas nos protocolos de vacinas com base em DCs aplicadas no tratamento de doentes com cancro (Figdor *et al.*, 2004). Especificamente, neste trabalho estudaram-se as diferenças ao nível da adesão dependente de cálcio, entre as DCs e as variantes celulares acima referidas e o grau de maturação das DCs. Adicionalmente, também se investigou o modo como a maturação prévia

das DCs e a remoção do ácido siálico da superfície da célula tumoral por tratamento com sialidase, influenciavam essa adesão e estado de maturação das DCs aderidas. Por outro lado, também se avaliou a capacidade fagocítica das DCs na captura de células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$, após ter-lhes sido induzida quimicamente a apoptose.

Por fim, realizaram-se alguns estudos complementares de caracterização das linhas $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$, nomeadamente a nível da susceptibilidade destas ao agente apoptótico camptotecina, e a identificação de possíveis moléculas “portadoras” do antígeno sTn.

Embora, haja um interesse do grupo em estudar aspectos relacionados com a expressão de antígenos glicosídicos (sialilados vs não sialilados), particularmente em cancro de bexiga, visando contribuir para uma melhoria nas terapias aplicadas no tratamento deste tipo de cancro, espera-se que os resultados obtidos com a utilização destas linhas celulares MCR possam também beneficiar o tratamento de outros tipos de cancro. De facto, as linhas MCR, apesar de serem derivadas de tumores de bexiga, podem ser consideradas um bom modelo para estudar o papel do antígeno sTn na resposta imunológica.

2. Materiais e Métodos

2.1. Cultura das linhas celulares de cancro de bexiga e de cancro de mama

As linhas celulares de cancro de bexiga e de cancro de mama são células aderentes, que foram mantidas em frascos de cultura (Nunc Brand Products), numa estufa a 37°C e com uma atmosfera humedecida com 5% de CO₂.

As células de cancro de bexiga foram cultivadas em meio de cultura completo que consiste em meio base DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich), 2 mM de L-glutamina (Gibco/Invitrogen) e 100 µg/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco). Este meio de cultura foi renovado a cada dois dias e as células foram desaderidas com Tripsina-EDTA (Gibco) e passadas para novos frascos a cada 4-5 dias.

As células de cancro de mama foram cultivadas em meio de cultura completo que consiste em meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich), 2 mM de L-glutamina (Gibco/Invitrogen), 100 µg/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco/Invitrogen) e 1 mg/mL de Geneticina (G418) (Sigma-Aldrich). Estas células foram passadas para novos frascos a cada dois dias.

Estas linhas celulares foram também guardadas a -80° C e em azoto líquido em meio de congelação, que consiste em meio RPMI (Sigma-Aldrich) suplementado com 20% de soro fetal bovino e 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck).

Especificamente, foram utilizadas variantes da linha celular de cancro de bexiga MCR e da linha celular de cancro de mama MDA-MB-231. A linha celular MCR foi, inicialmente, obtida de uma lesão metastática subcutânea de um homem de 51 anos diagnosticado com cancro de bexiga transicional de grau III (Fabbri *et al.*, 2005). A linha celular MDA-MB-231 foi inicialmente obtida de uma efusão pleural de uma mulher com um adenocarcinoma de mama (Cailleau *et al.*, 1974).

A linha celular MCR foi, anteriormente, transduzida com o vector lentiviral, pLenti6/V5-D-TOPO (ver Anexo I), no qual foi inserido o cDNA do gene humano que codifica a enzima ST6GalNAc I, originando a linha celular MCR_{pLenti.ST6GN1}. Como controlo a linha MCR foi também transduzida com o lentivirus pLenti6/V5-D-TOPO sem inserção de cDNA, originando a linha celular MCR_{pLenti.transd} (Amado, 2007). A linha celular de cancro de mama MDA-MB-231 foi, anteriormente, transfectada com o plasmídeo pRc-CMV (ver

Anexo II), no qual foi inserido o cDNA do gene que codifica a enzima ST6GalNAc I, originando a linha celular MDA-MB-231 STn, e, como controlo, transfectada com o vector pRc-CMV sem inserção, originando a linha celular MDA-MB-231 EV. Conforme esperado, as linhas celulares MCR_{pLenti.ST6GN1} e MDA-MB-231 STn sobreexpressam a enzima ST6GalNAc I e têm uma alta expressão do antigénio sialil-Tn (sTn) (Amado, 2007 e Julien *et al.*, 2001).

A linha de cancro de mama foi utilizada de modo a comparar duas linhas que apresentam as mesmas propriedades de expressão de antigénios sTn mas de diferentes tipos de cancro e assim confirmar alguns dos resultados principais.

2.2. Isolamento de monócitos a partir de sangue periférico e obtenção de células dendríticas (DCs) derivadas de monócitos

As DCs utilizadas nesta tese foram derivadas de monócitos humanos, que por sua vez foram obtidos a partir de concentrados leucocitários, de doadores saudáveis, fornecidos pelo Instituto Português do Sangue.

O primeiro passo deste protocolo consiste na separação de células mononucleares em gradiente de densidade utilizando a mistura Ficoll-Hypaque (Biochrom AG). Esta mistura possui uma densidade maior que a dos linfócitos e monócitos mas menor que a dos glóbulos vermelhos e granulócitos, o que permite a separação das células mononucleares em gradiente de densidade. Mais especificamente, o concentrado leucocitário foi diluído numa proporção 2:3 em solução-tampão de fosfatos (PBS – *phosphate buffered saline*) 1x (ver Anexo III). Esta mistura foi centrifugada a 2500 rpm durante 10 min. O anel da interfase (concentrado de leucócitos) foi retirado para um novo tubo e diluído com PBS 1x. De seguida, 10 mL deste concentrado de leucócitos foram adicionados, cuidadosamente, a 6 mL da solução de Ficoll-Hypaque previamente colocados em tubos de vidro. Estes tubos foram centrifugados a 2500 rpm durante 20 min, com a centrífuga configurada sem sistema de travagem. Após a centrifugação, um anel de células mononucleares (linfócitos e monócitos) fica retido na interfase entre o plasma e o Ficoll-Hypaque (fase superior contem o plasma e os seus constituintes e a inferior contem o Ficoll-Hypaque e os eritrócitos e granulócitos depositados no fundo do tubo).

O anel de células mononucleares foi retirado e colocado num novo tubo de vidro, onde foi diluído em PBS 1x e centrifugado a 1400 rpm durante 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células depositadas foram ressuspensas em PBS 1x e

centrifugadas a 800 rpm durante 5 min para remover plaquetas e restos de Ficoll-Hypaque. Foi retirada uma pequena amostra, para determinar a concentração celular no contador hematológico. De seguida, as células foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 80 µL de tampão frio (tampão apropriado para a separação de células utilizando micro-esferas magnéticas – ver Anexo III) mais 20 µL de micro-esferas magnéticas anti-CD14 (Miltenyi Biotec) por cada 3×10^7 células. Foram utilizadas micro-esferas magnéticas anti-CD14 porque CD14 é uma proteína que se encontra à superfície de monócitos mas não de linfócitos, permitindo a marcação exclusiva e isolamento dos monócitos nesta mistura de células mononucleares.

Após incubação a 4° C durante 15-20 min, as células foram lavadas com tampão frio e centrifugadas a 1200 rpm durante 10 min. Este processo permitiu remover as micro-esferas que estavam em excesso e que não se ligaram aos monócitos. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 500 µL de tampão frio por cada 10×10^7 células. De seguida, uma coluna LS (Miltenyi Biotec) foi montada num sistema MidiMACS Separator (Miltenyi Biotec), que actua por acção da força de um magneto. A coluna foi, inicialmente, lavada com 3 mL de tampão frio. De seguida, a mistura celular foi passada nesta coluna, que reteve as células marcadas com as micro-esferas magnéticas anti-CD14, ou seja, os monócitos. Após a passagem da mistura celular, a coluna foi lavada, três vezes, com 3 mL de tampão frio e a fracção negativa (células que não ficaram retidas na coluna), que corresponde, maioritariamente, a linfócitos, foi desprezada. A coluna foi removida do sistema de separação e foram adicionados 5 mL de tampão frio. Por acção da pressão produzida com o auxílio do êmbolo, as células retidas na coluna (fracção positiva) foram retiradas para um tubo de vidro. O número de células CD14⁺ (monócitos) obtidas foi calculado no contador hematológico e as células foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi desprezado e os monócitos depositados foram ressuspensos em meio de cultura apropriado e distribuídos em placas de 24 poços (Greiner Bio-one) numa concentração 1×10^6 células/mL.

Para obter DCs imaturas, os monócitos foram colocados em meio de cultura RPMI completo, que consiste em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2mM de L-glutamina, 100 µg/mL de Penicilina/Estreptomicina, 1% de aminoácidos não-essenciais (Gibco/Invitrogen), 1% de piruvato de sódio (Gibco/Invitrogen) e 50 µM 2-mercaptoetanol (Gibco/Invitrogen), suplementado com 1000 U/mL de Interleucina-4 (IL-4) (R&D Systems) e de GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) (R&D Systems). O meio de cultura foi renovado de dois em dois dias, retirando metade do volume

de cada poço e adicionando a mesma quantidade de meio de cultura fresco com IL-4 e GM-CSF nas quantidades descritas. Ao fim de 6 dias, a maioria dos monócitos encontra-se diferenciada em DCs imaturas.

2.3. Técnicas

2.3.1. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma tecnologia que mede e analisa múltiplas características físicas de partículas em suspensão, normalmente células, quando estas passam numa corrente de fluido através de um feixe de luz. Consegue analisar um grande número de partículas/células num curto espaço de tempo. Um aspecto chave da citometria de fluxo consiste na possibilidade de separar uma amostra celular em diferentes populações, com base nas propriedades que se podem medir em cada partícula/célula analisada individualmente. As propriedades medidas incluem o tamanho relativo da partícula (FSC – *Forward Scatter*), a complexidade interna ou granularidade relativa (SSC – *Side Scatter*) e a intensidade de fluorescência média (MFI).

O sistema de detecção mais comum em citometria usa moléculas fluorescentes que se ligam especificamente a partículas/células de interesse. Normalmente, utilizam-se anticorpos monoclonais ou policlonais fluorescentes que reconhecem receptores específicos nas células, ou corantes fluorescentes que se ligam ao material nuclear, membrana, ou outro.

As características das partículas/células são determinadas através de um sistema combinado óptico-electrónico que regista como cada partícula/célula dispersa a luz do laser incidente e emite a fluorescência. A citometria de fluxo é composta por três sistemas principais: sistema de fluido, que transporta as partículas/células numa corrente de fluidos de modo a serem atravessadas, individualmente, pelo feixe de laser; sistema óptico, que é composto pelo laser que vai incidir sobre as partículas/células e pelos filtros ópticos que direccionam os sinais luminosos para os detectores apropriados; e sistema electrónico, que converte os sinais luminosos detectados em sinais electrónicos passíveis de serem processados por um computador (Robinson, 2004 e BD Biosciences, 2000).

O citómetro de fluxo utilizado nesta tese foi um FACSCalibur Flow Cytometer (Becton Dickinson), que contém quatro filtros, capaz de detectar até quatro fluorescências diferentes – FL-1 (fluorescência verde), FL-2 (amarela), FL-3 (laranja) e FL-4 (vermelha).

2.3.2. Microscopia confocal

A microscopia confocal é uma técnica óptica de imagem usada para aumentar a resolução óptica e o contraste da imagem microscópica e construir imagens tridimensionais através da utilização de um orifício de abertura, *pinhole*, que permite uma grande definição de imagem em amostras mais espessas que o plano focal.

Uma fonte de luz, tipicamente um laser, é focada num local limitado à difracção na amostra pela objectiva. A luz reflectida ou a fluorescência emitida é focada pela mesma lente, objectiva, para um ponto no detector. Neste ponto, o *pinhole* é colocado, assim o detector só capta a luz proveniente do plano focal e não interferências de fora do plano. Pela digitalização de planos sucessivos, pode ser criada uma imagem tri-dimensional da amostra, que é visualizada, processada, produzida e armazenada num computador (Cox, 2002).

O microscópio confocal utilizado foi um Leica TCS SP2 AOBS, no qual se utilizaram a objectiva de imersão a óleo 40x e os filtros de laser de 488nm e 633nm para excitar FITC e Alexa Fluor 633, respectivamente, para observar as lâminas produzidas como descrito na secção 2.5. As imagens adquiridas foram processadas computacionalmente, utilizando o software Advanced Fluorescence Lite 2.1.0 build 4316 (Leica Microsystem).

2.4. Análise do fenótipo das linhas celulares por citometria de fluxo Expressão de antigénio sTn, CD44 e Mucina 1 (MUC1)

O fenótipo das linhas celulares de cancro de bexiga ($MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$), em relação à expressão de antigénio sTn, foi analisado periodicamente, utilizando o anticorpo monoclonal anti-sTn clone TKH2 (produzido a partir de hibridomas E. Clausen (Copenhaga, Dinamarca)) ou clone STn219 (GenWay). A expressão de moléculas candidatas a serem os possíveis “portadores” do antigénio sTn, nomeadamente MUC1 e CD44, foi também analisada, utilizando o anticorpo monoclonal anti-CD44-FITC (Isotiocianato de Fluoresceína) (Dako) e diferentes clones do anticorpo monoclonal anti-MUC1 (clone SM3 e clone 5E5 – que apresentam diferentes especificidades (Marcos *et al.*, 2003)). Para tal, as células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$ (5×10^5 células em 100 μ L) foram incubadas com 15 μ L de anticorpo anti-sTn ou com os anticorpos anti-MUC1 diluídos 2x, durante 30 min a 4°C. Após a marcação, foi adicionado solução FACS FLOW (BD Biosciences) e as células centrifugadas a 1200 rpm durante 5 min, de modo a remover o excesso de anticorpo. De seguida, o sobrenadante foi desprezado e as células depositadas foram ressuspensas em 100 μ L de PBS 1x e marcadas com 10 μ L de anticorpo secundário,

policlonal fluorescente anti-Ig-FITC (Dako), durante 15 min no escuro. Como controlo da marcação específica, marcaram-se células apenas com o anticorpo secundário. No caso da identificação do CD44, foram utilizados 20 μ L de anticorpo fluorescente anti-CD44-FITC, incubando 15 min no escuro.

Após esta marcação, as células foram lavadas na solução FACS FLOW e centrifugadas a 1200 rpm durante 5 min, para remover o excesso de anticorpo. O sobrenadante foi desprezado e as células depositadas foram ressuspensas em 200 μ L de solução FACS FLOW e analisadas por Citometria de Fluxo. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa CellQuest (Becton Dickinson).

2.5. Análise do fenótipo das linhas celulares por microscopia confocal - Expressão de antígeno sTn e da enzima ST6GalNAcI

Num primeiro passo, as células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$ foram cultivadas em meio de cultura DMEM completo, em poços de uma placa de 24 poços ($0,2 \times 10^6$ células/ml), nos quais tinham sido, previamente, colocadas lamelas de vidro.

As células foram incubadas na estufa a 37°C durante 24 horas para aderirem às lamelas. Após a incubação, o meio de cultura foi retirado dos poços e estes foram lavados, três vezes, com PBS 1x durante 5 min cada. Para fixar as células, foi adicionado aos poços uma solução de paraformaldeído 3,7% (Sigma-Aldrich) e a placa foi incubada 10 min à temperatura ambiente. De seguida, os poços foram lavados, três vezes, com PBS 1x durante 5 min cada. As células fixadas foram permeabilizadas com uma solução Triton 0,1% (Sigma-Aldrich) em PBS 1x durante 20 min. Os poços foram lavados, três vezes, com PBS 1x durante 5 min. As células foram incubadas à temperatura ambiente com uma solução de 1% BSA (Sigma-Aldrich) em PBS durante 30 min, para evitar marcação inespecífica. De seguida, os poços foram lavados, três vezes, com PBS 1x durante 5 min.

Após este tratamento, as células foram incubadas com os anticorpos primários de interesse, ou seja, anticorpos anti-sTn (clone TKH2 e clone STn219) e anti-ST6GalNAc I (clone 2C3), utilizando a diluição e o tempo de incubação adequados. Ou seja, a marcação com os anticorpos anti-sTn foi realizada, utilizando estes anticorpos diluídos 5x (20 μ L anticorpo/100 μ L) durante 30 min a 4°C e a marcação com o anticorpo anti-ST6GalNAc I foi realizada usando este anticorpo não diluído também durante 30 min a 4°C. Após a incubação com os anticorpos primários, os poços foram lavados, três vezes, com PBS 1x durante 5 min e foi adicionado o anticorpo policlonal anti-Ig-FITC (Dako), diluído 100x (1 μ l

anticorpo/100µl), e incubado durante 30 min no escuro à temperatura ambiente. Como controlo da marcação, células não marcadas com o anticorpo primário foram também marcadas com o anticorpo secundário. De seguida, os poços foram lavados, três vezes, com PBS 1x durante 5 min. O núcleo das células foi marcado com o corante To-Pro3-Alexa flúor 633 (Invitrogen), diluído 300x (1 µL corante/300 µL), durante 15 min no escuro. Os poços foram lavados, três vezes, com PBS 1x durante 5 min.

No final, as lamelas foram retiradas do fundo dos poços, foi adicionado meio de montagem VectaShield (Leica Microsystem) em cada uma das lamelas e as lâminas foram montadas e seladas com verniz. Estas lâminas foram posteriormente observadas por microscopia confocal.

2.6. Avaliação da adesão entre DCs e linhas celulares de cancro e análise do estado de maturação das DCs

As células de cancro de bexiga e as de cancro de mama foram cultivadas em meio de cultura DMEM completo ($0,2 \times 10^6$ células/mL) em poços de uma placa de cultura de 6 poços durante 24 horas para as células aderirem aos poços e estabilizarem.

Após a incubação, o meio de cultura das células de cancro foi removido e estas foram lavadas com PBS 1x, de modo a retirar completamente o meio de cultura. As DCs, diferenciadas a partir de monócitos, como descrito anteriormente, foram lavadas com PBS 1x e centrifugadas a 1200 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi desprezado e as DCs depositadas foram ressuspensas em tampão de adesão (composição no Anexo III) e contadas no contador hematológico. Uma parte das DCs ressuspensas no tampão de adesão foi adicionada aos poços que contêm as células de cancro aderidas, numa proporção de 5 DCs: 1 célula de cancro. E as restantes foram colocadas num poço vazio, para se avaliar o estado de maturação das DCs antes do contacto com as células tumorais.

Estas co-culturas foram incubadas a 37°C durante 2 horas. O período de 2 horas de incubação foi seleccionado por estar descrito como o necessário para garantir a adesão máxima de células epiteliais a substratos e células (Zhuo *et al.*, 2008). Após a incubação, o tampão de adesão foi retirado dos poços e estes foram lavados, duas vezes, com PBS 1x, de modo a remover as DCs que não aderiram às células de cancro. As DCs não aderentes foram guardadas em tubos para serem, posteriormente, também analisadas relativamente ao seu estado de maturação. A co-cultura, que continha as linhas celulares e as DCs aderidas a estas,

foi removida do poço pela acção da Tripsina-EDTA 1x (Sigma-Aldrich) e colocada em diferentes tubos para análise com anticorpos fluorescentes.

Todos os tubos foram centrifugados a 1200 rpm durante 10 min e as células depositadas foram ressuspensas em 100µl de PBS 1x e marcadas com 5 µL do anticorpo fluorescente anti-HLA-DR-APC (Aloficocianina) (Biolegend), anti-CD80-PE (Ficoeritrina) (Biolegend), anti-CD83-PE (BD Biosciences), ou anti-CD86-PE (Biolegend), durante 15 min no escuro. Após esta marcação, as células foram lavadas com a solução FACS FLOW e centrifugadas a 1200 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi desprezado e as células depositadas foram ressuspensas na solução de FACS FLOW e analisadas por Citometria de Fluxo. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa Paint-a-Gate 3.0.2 PPC (Becton Dickinson).

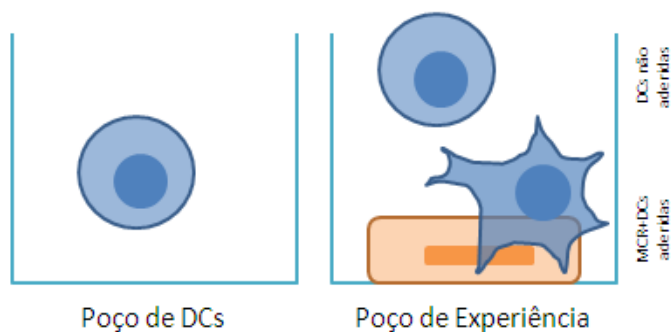


Figura 2.1 – Esquema representativo do ensaio de adesão em placa, no qual o poço de DCs representa as DCs que não estão em contacto com as células tumorais (controlo), e o poço de experiência representa as DCs que estão aderidas a células tumorais e as que não estão.

Como ensaios controlo, as DCs foram incubadas, durante 2 horas a 37°C, com meio de cultura DMEM completo fresco e sobrenadantes provenientes de culturas de 24 horas de células MCR_{pLenti.ST6GN1} ou MCR_{pLenti.transd}, recolhidos na fase exponencial de crescimento.

Após a incubação, as DCs foram removidas da placa para tubos de citometria e centrifugadas a 1200 rpm durante 10 min. As DCs foram marcadas e analisadas para a expressão de HLA-DR, de forma semelhante à descrita anteriormente nesta secção.

2.6.1. Avaliação da adesão após tratamento com Sialidase

Para estudar o efeito da remoção de ácido siálico da superfície das linhas celulares de cancro de bexiga, estas foram cultivadas durante 24h, lavadas com PBS 1x e tratadas com 10

$\mu\text{L}/\text{mL}$ de uma solução a $10 \text{ mU}/\mu\text{L}$ de sialidase de *Clostridium perfringens* (Roche Diagnostics) em meio DMEM simples, por cada $0,6 \times 10^6$ células, durante 1 hora e meia a 37°C na estufa de CO_2 . Após este tratamento, todos os poços foram lavados com PBS 1x e o ensaio de adesão foi executado tal como referido anteriormente na secção 2.6. Em paralelo, foram realizados ensaios controlo com linhas celulares não tratadas com sialidase.

2.6.2. Comparação da adesão usando DCs previamente maturadas ou DCs imaturas

Quando se pretendeu estudar o efeito da maturação das DCs na sua capacidade de adesão às linhas celulares de cancro de bexiga, as DCs utilizadas foram, previamente, estimuladas com lipopolissacarido (LPS) bacteriano. Nomeadamente, as DCs, com 5 dias de diferenciação, foram incubadas em meio de cultura RPMI completo com $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS de *Escherichia coli* 0127:B8 (Sigma-Aldrich) durante 24 horas a 37°C . Prosseguiu-se com o ensaio de adesão como descrito anteriormente na secção 2.6, realizando-se, paralelamente, ensaios controlo com DCs imaturas.

2.7. Avaliação da fagocitose de corpos apoptóticos de células de cancro de bexiga pelas DCs

As células de cancro de bexiga ($\text{MCR}_{\text{pLenti.ST6GN1}}$ e $\text{MCR}_{\text{pLenti.transd}}$) foram colocadas em meio de cultura DMEM completo ($0,2 \times 10^6$ células/ml) em placa de 6 poços. Metade das células foi, previamente, marcada com $1 \mu\text{L}/\text{ml}$ do corante fluorescente CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl Ester*) (Invitrogen) por cada 1×10^6 células/mL durante 10 minutos a 37°C , antes de serem colocadas nos poços. A placa foi incubada durante 24 horas a 37°C na estufa para as células aderirem ao poço e estabilizarem.

Após a incubação, o meio de cultura dos poços foi retirado e os poços foram lavados com PBS 1x. De seguida, foi adicionado meio de cultura DMEM completo com $10 \mu\text{M}$ de camptotecina, composto químico que se verificou induzir a apoptose destas células. A placa foi incubada durante 48 horas a 37°C .

Após esta incubação, as células não marcadas com CFSE foram recolhidas dos poços, guardando também os sobrenadantes no mesmo tubo. Estas células foram centrifugadas, marcadas com Anexina V e 7-AAD e analisadas por Citometria de Fluxo, conforme se descreve a seguir na secção 2.9, de modo a se obter um controlo da % de células apoptóticas $\text{MCR}_{\text{pLenti.ST6GN1}}$ e $\text{MCR}_{\text{pLenti.transd}}$ em cada ensaio.

As células marcadas com CFSE foram recolhidas dos poços, bem como o respectivo sobrenadante e centrifugadas a 2000 rpm durante 10 min. O sobrenadante obtido foi desprezado e as células depositadas foram ressuspensas em meio de cultura RPMI completo.

Entretanto, as DCs, obtidas como descrito na secção 2.2, foram removidas da sua placa, lavadas com PBS 1x e centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células depositadas foram ressuspensas em meio de cultura RPMI completo e contadas no contador hematológico.

As DCs foram colocadas em co-cultura com cada uma das células apoptóticas de cancro de bexiga ($MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$), numa proporção de 2 DCs : 1 célula de cancro, em meio de cultura RPMI completo (500 μ L/poço) em duas placas de 48 poços. Uma placa foi incubada a 37°C na estufa de modo a reproduzir as condições fisiológicas de fagocitose, e a outra placa foi colocada a 4°C, de modo a que a fagocitose fosse inibida.

Após a incubação, as co-culturas foram recolhidas dos poços, lavadas com PBS 1x e centrifugadas a 2000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi desprezado e as células depositadas foram ressuspensas em 100 μ L de PBS 1x e marcadas com 5 μ L de anticorpo fluorescente anti-HLA-DR-APC, durante 15 min no escuro. Após a marcação, as células foram lavadas com a solução FACS FLOW e centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células depositadas foram ressuspensas na solução FACS FLOW e analisadas por Citometria de Fluxo. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa CellQuest.

2.8. Avaliação, através de um ensaio MTT, da susceptibilidade das células de cancro de bexiga à camptotecina

O ensaio de MTT é um ensaio colorimétrico que reflecte a viabilidade celular. Este ensaio baseia-se na capacidade de células metabolicamente activas reduzirem no meio intracelular o sal solúvel de tetrazólio, brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difenil-tetrazólio (MTT), dando origem a cristais de *formazan*, que é um produto de cor roxa insolúvel em água. A redução de MTT é realizada pela acção de desidrogenases mitocondriais, permitindo determinar a actividade mitocondrial das células. Os cristais podem ser dissolvidos numa variedade de solventes orgânicos e a densidade óptica da solução resultante é medida num espectrofotómetro de multi-placas (leitor de placas de Elisa). Este método pode ser utilizado para estudar a resposta de linhas celulares estabelecidas a diversos

agentes químicos (Liu e Schubert, 1997). Assim, foi o método eleito para de um modo rápido e eficiente se comparar de uma forma generalizada a susceptibilidade das duas variantes das linhas de cancro de bexiga ao agente químico camptotecina.

As células de cancro de bexiga ($MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$) foram cultivadas em meio de cultura DMEM completo ($0,15 \times 10^6$ células/ml) em placa de 96 poços (Corning Costar) e incubadas durante 24 horas a 37°C na estufa, de modo às células aderirem aos poços e estabilizarem o seu metabolismo.

Após a incubação, o meio de cultura dos poços foi retirado e estes foram lavados, duas vezes, com PBS 1x. As células sujeitas a dez condições diferentes – meio de cultura DMEM completo, ou meio de cultura DMEM completo com 1% de DMSO, ou contendo $1 \mu\text{M}$, $2,5 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$, $7,5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $12,5 \mu\text{M}$, $15 \mu\text{M}$ ou $20 \mu\text{M}$ de camptotecina. A placa foi incubada durante 24 horas a 37°C na estufa.

Após a incubação, o sobrenadante de cada poço foi retirado e os poços foram lavados com PBS 1x. Foram adicionados $20 \mu\text{L}$ de uma solução de 5 mg/mL de solução MTT Formazan (Sigma-Aldrich) em cada poço e a placa foi incubada durante 4 horas a 37°C na estufa.

O excesso da solução de MTT foi removido por inversão da placa e foram adicionados $100 \mu\text{L}$ de um solvente orgânico, neste caso, de uma solução pura de DMSO, para solubilizar o produto formado (cristais de *formazan*). A placa foi agitada e lida a absorvância a 540nm num espectrofotómetro multi-placas ETI-System Reader (Sorin Biomedica).

2.9. Avaliação, por Citometria de Fluxo, da apoptose de células de cancro de bexiga sujeitas ao tratamento com camptotecina

As células de cancro de bexiga ($MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$) foram colocadas em meio de cultura DMEM completo ($0,2 \times 10^6$ células/mL) em placas de 6 poços e incubadas durante 24 horas a 37°C . Após a incubação, o meio de cultura dos poços foi retirado e estes foram lavados, duas vezes, com PBS 1x. Foi adicionado meio de cultura DMEM completo com ou sem $10 \mu\text{M}$ de camptotecina (Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas a 37°C na estufa.

Após 24 ou 48 horas de incubação, ambos os sobrenadantes e as respectivas células (retiradas por tripsinização com a solução Tripsina+EDTA 1x) foram recolhidos para tubos e centrifugados a 2000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi desprezado e as células depositadas foram ressuspensas em 1 mL de tampão de ligação da Anexina V 1x (BD

Biosciences). De seguida, foram retirados 185 μL da suspensão celular preparada anteriormente para outro tubo. Estas células foram marcadas com 5 μL de Anexina V-APC (BD Biosciences) e 10 μL de solução 7-AAD (*7-amino-actinomycin D*) (Sigma-Aldrich) e incubadas durante 15 min no escuro à temperatura ambiente. Anexina V liga-se a um componente de fosfolípido da membrana celular, fosfatidilserina (PS), que se encontra, normalmente, no interior da membrana de células vivas, mas num estado precoce de apoptose, durante alterações na membrana, a PS é exposta no exterior da membrana. 7-AAD é um corante específico de DNA utilizado para discriminar células vivas de mortas, pois as células vivas são impermeáveis a este corante, enquanto as células apoptóticas tardias e necróticas são bastante permeáveis, visto apresentarem a sua membrana danificada. Assim, a Anexina V consegue identificar células apoptóticas desde um estado muito precoce de apoptose, enquanto o 7-AAD só identifica células num estado mais tardio de morte celular (apoptóticas ou necróticas) (Sepulveda *et al.*, 2002).

Após a marcação, foram adicionados 200 μL do tampão de ligação da Anexina V 1x em cada tubo e estes foram analisados por Citometria de Fluxo. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa Paint-a-Gate 3.0.2 PPC.

2.10. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados obtidos experimentalmente foi realizada pelo software GraphPad Prism 5 (Windows). Os dados foram, estatisticamente, analisados pelo Teste de t-Student e um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (* significa que o valor P é inferior a 0,05; ** que o P é inferior a 0,01 e *** que o P é inferior a 0,0001).

3. Resultados

3.1. Análise do fenótipo das células de cancro de bexiga – Expressão do antigénio sialil-Tn (sTn)

O principal objectivo deste trabalho consiste em estudar o papel do antigénio glicosídico sTn, expresso por células tumorais, na interacção destas com as células dendríticas (DCs) derivadas de monócitos. Utilizou-se, principalmente, a linha celular de cancro de bexiga, $MCR_{pLenti.ST6GN1}$, transduzida com cDNA de ST6GalNac.I de modo a expressar o antigénio sTn, e a linha celular controlo $MCR_{pLenti.transd}$, geneticamente idêntica mas com o sTn ausente. Ambas as linhas foram obtidas como descrito anteriormente (ver secção 2.1 dos Materiais e Métodos). De modo a garantir que as células utilizadas nos ensaios seguintes apresentavam sempre as particularidades pretendidas, ou seja, que mantivessem sempre o seu fenótipo inicial, a expressão do antigénio sTn na superfície celular foi, periodicamente, analisada por citometria de fluxo. Os ensaios posteriores foram executados desde que as linhas celulares referidas apresentassem níveis de expressão de sTn de acordo com o que seria de esperar, permitindo a sua utilização nos estudos subsequentes com confiança. Nomeadamente, na cultura celular de células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$, no mínimo, 75% das células expressavam o antigénio sTn, e na cultura de células $MCR_{pLenti.transd}$ (controlo negativo), no máximo, 5% das células expressavam sTn (Fig. 3.1). Nos casos em que estas percentagens não se verificaram as culturas foram desprezadas e substituídas por células descongeladas *de novo* a partir do *stock* a $-80^{\circ}C$, nas quais se fez igualmente a análise fenotípica.

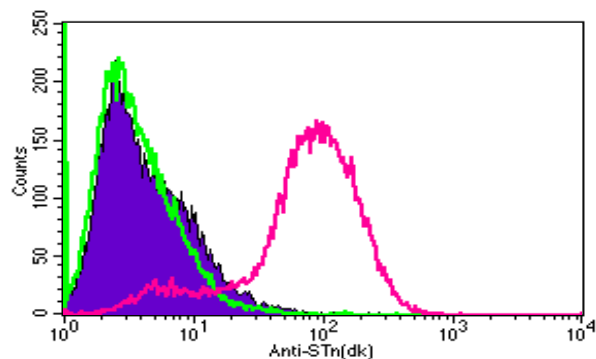


Figura 3.1 – Exemplo de análise da expressão de anticorpo sTn nas células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ (linha rosa), nas células $MCR_{pLenti.transd}$ (fundo roxo) e marcação só com anticorpo secundário (linha verde).

A expressão fenotípica do antígeno sTn foi também avaliada por microscopia confocal, o que permitiu comparar visualmente as células de cancro $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$ e confirmar a localização do antígeno sTn. Assim, observou-se que o antígeno sTn se encontra distribuído uniformemente à superfície celular da maioria das células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ (Fig. 3.2 e) e g)) e de algumas células $MCR_{pLenti.transd}$ (Fig. 3.2 b)), o que vai de encontro aos resultados obtidos por citometria de fluxo.

A expressão da enzima ST6GalNAcI, enzima responsável por transferir o ácido siálico para o antígeno Tn, originando sTn, foi também avaliada por microscopia confocal e verificou-se que é expressa na maioria das células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ (Fig. 3.2 f)) e de algumas células $MCR_{pLenti.transd}$ (Fig. 3.2 c)).

Esta diferença de expressão da enzima ST6GalNAcI nas células tumorais MCR já tinha sido, também, verificada em ensaios de expressão por PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real (Videira, P. A., dados não apresentados). Ao observar visualmente a marcação desta enzima, verificou-se que esta se localiza, junto ao núcleo (espaço perinuclear), provavelmente onde se situa o complexo de Golgi, que se sabe ser o local preferencial de actuação das sialiltransferases (ver secção 1.1.2 da Introdução).

Estas imagens de microscopia foram obtidas após várias experiências de optimização, em que se testaram também vários anticorpos anti-sTn. A comparação da marcação do antígeno sTn com os dois anticorpos anti-sTn, clone TKH2 e clone STn219, demonstrou que o clone TKH2, efectivamente, permite obter melhores resultados do que o clone STn219 em preparações de lâminas para microscopia (ver Anexo IV).

As células que expressam a enzima ST6GalNAcI são provavelmente as mesmas células que marcam para o antígeno sTn, mas, para confirmar esta hipótese, as células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$ deveriam ter sido marcadas, em simultâneo, com o anticorpo anti-sTn e anti-ST6GalNAcI.

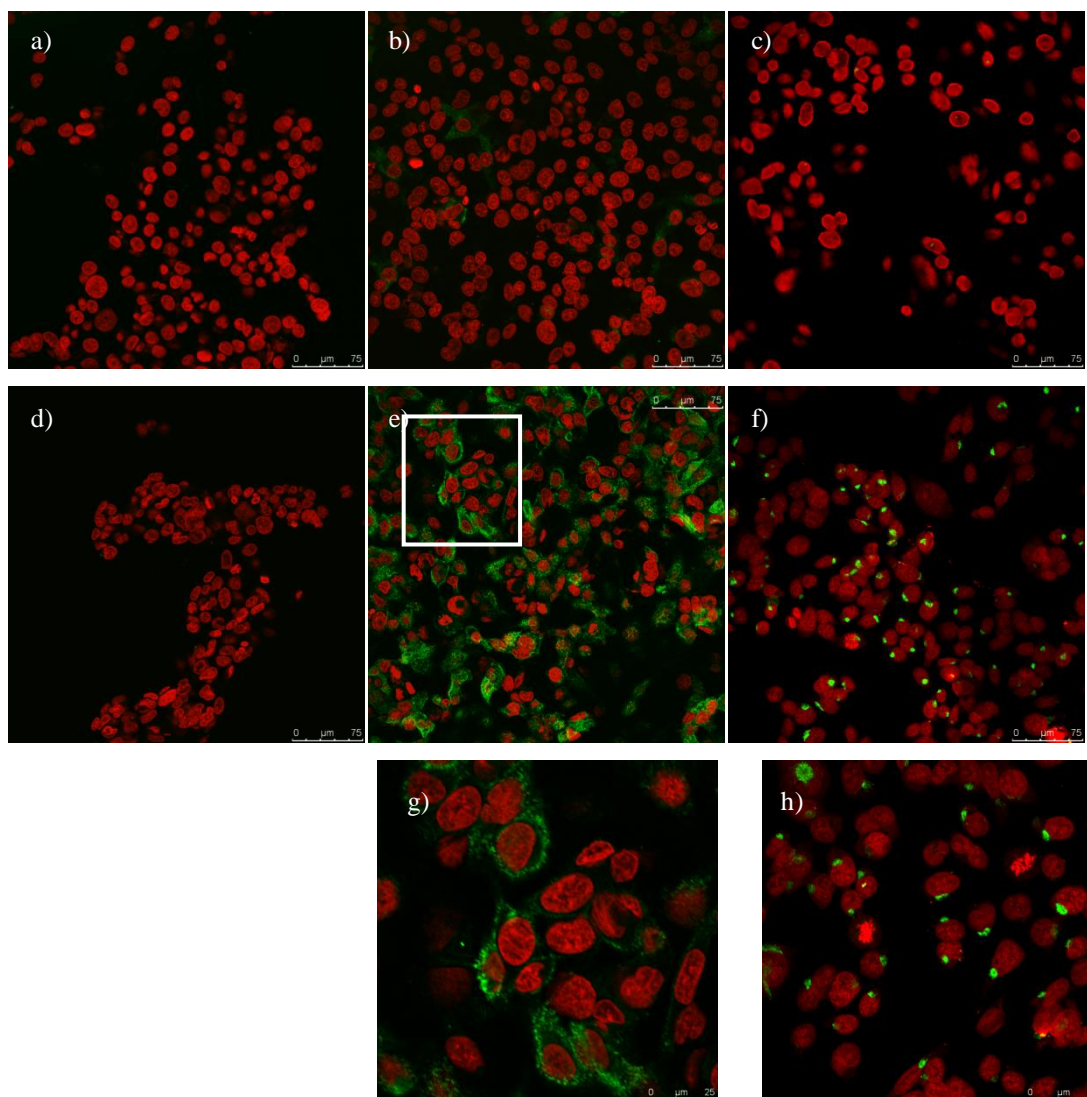


Figura 3.2 – Imagens de microscopia confocal das células de cancro de bexiga $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ [d) – h)] e $MCR_{pLenti.transd}$ [a) – c)] marcadas com anticorpos anti-sTn (clone TKH2) ou anti-ST6GalNAcI. a) Células $MCR_{pLenti.transd}$ marcadas, unicamente, com o anticorpo secundário (controlo da marcação); b) Células $MCR_{pLenti.transd}$ marcadas com anticorpo anti-sTn; c) Células $MCR_{pLenti.transd}$ marcadas com anticorpo anti-ST6GalNAcI; d) Células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ marcadas unicamente com o anticorpo secundário (controlo da marcação); e) Células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ marcadas com anticorpo anti-sTn; f) Células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ marcadas com anticorpo anti-ST6GalNAcI; g) Ampliação da região delimitada da imagem e); h) Ampliação das células marcadas com anticorpo anti-ST6GalNAcI.

3.2. O papel da expressão do antígeno sTn em células tumorais (MCR e MDA-MB-231) na resposta imunológica das DCs: estudo da adesão, indução de maturação e fagocitose

O antígeno sTn desempenha uma função importante nas interações entre células (revisto em Reis *et al.*, 2010). Sabe-se que vários tipos de células tumorais expressam este antígeno glicosídico de forma aberrante (Julien *et al.*, 2006) e que isso pode, de algum modo, modular a resposta imunológica desencadeada contra o próprio tumor. Assim, neste trabalho, pretendeu-se avaliar de que modo a presença do antígeno sTn influencia a capacidade de adesão das DCs às células tumorais e ainda como influencia a indução da maturação nas DCs. Para este estudo, utilizaram-se essencialmente as linhas celulares, MCR_{pLenti.ST6GN1}, e MCR_{pLenti.transd}. A linha celular de cancro de mama, igualmente manipulada de modo a expressar o antígeno sTn – MDA-MB-231 STn – e o seu correspondente controlo negativo – MDA-MB-231 EV – foram também utilizadas em alguns dos ensaios realizados neste estudo, de modo a confirmar os resultados obtidos com as células de cancro de bexiga e, assim, reforçar o papel do sTn na função das DCs.

As co-culturas de células tumorais e DCs, realizadas como descrito na secção 2.6 dos Materiais e Métodos, foram analisadas por citometria de fluxo. Como as células tumorais usadas, ao contrário das DCs, não expressam moléculas HLA-DR (complexo MHC-II), no final da incubação, a co-cultura foi marcada com anticorpos fluorescentes contra estas moléculas. Deste modo, por um lado, distinguem-se as DCs das células tumorais e, por outro lado, avalia-se o estado de maturação das DCs, quando estimuladas pela presença ou na sua ausência das linhas celulares, através da análise da Intensidade de Fluorescência Média (MFI). Como a MFI é proporcional à quantidade de anticorpo que se liga às células, quanto maior a MFI, maior é a expressão de moléculas apresentadoras HLA-DR expressa na superfície das DCs, indicando um estado de maior maturação destas.

3.2.1. Presença de sTn nas células de cancro aumenta a percentagem de adesão das DCs

A percentagem (%) de DCs que permaneceram aderidas às células tumorais MCR após as lavagens, permitiu concluir que há uma tendência das DCs para aderirem em maior quantidade às células MCR_{pLenti.ST6GN1} do que às células MCR_{pLenti.transd} (Fig. 3.3). Apesar da diferença observada não ser significativa ($P > 0,05$), o que, muito provavelmente, se deve à variabilidade que ocorre de ensaio para ensaio, verificou-se que em média a % de DCs que

ficaram aderidas às células que expressam sTn foi de $35,8\% \pm 2,4$, enquanto a % de DCs que ficaram aderidas às células que não expressam sTn está ausente foi de $32,3\% \pm 2,3$. No entanto, na maioria dos ensaios (15 dos 22 ensaios), a % de DCs que aderiu às células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ foi semelhante ou maior do que a % de DCs que aderiu às $MCR_{pLenti.transd}$. A variabilidade observada no total dos ensaios pode, provavelmente, ser explicada pelo facto de DCs obtidas a partir de diferentes dadores terem características inerentes diferentes, que já à partida podem influenciar a sua capacidade de adesão.

Nos ensaios de adesão realizados com uma co-cultura de DCs e células de cancro de mama, a % de DCs que ficaram aderidas a MDA-MB-231 STn foi, significativamente, superior ($49,06\% \pm 7,9$, $P=0,026$) à % de DCs que ficaram aderidas a MDA-MB-231 EV ($33,21\% \pm 9,3$) (Fig. 3.4). Estes resultados vão de encontro à tendência que se verificou ocorrer com as linhas celulares de cancro de bexiga, reforçando a ideia de que o antígeno sTn parece promover a adesão das DCs às células de cancro.

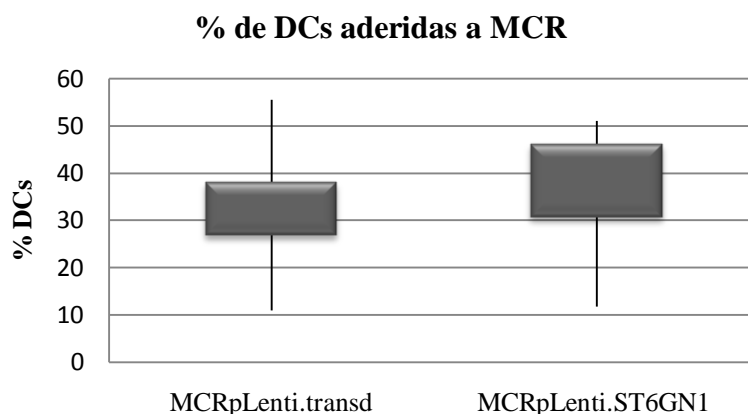


Figura 3.3 – Análise por citometria de fluxo da percentagem (%) de DCs que aderiram às células das linhas celulares de cancro de bexiga MCR ($MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$). Estes resultados estão apresentados num diagrama de caixa com bigodes, no qual a “caixa” indica os resultados contidos entre o quartil inferior e o superior e os “bigodes” indicam o valor máximo e o mínimo. (n= 22)

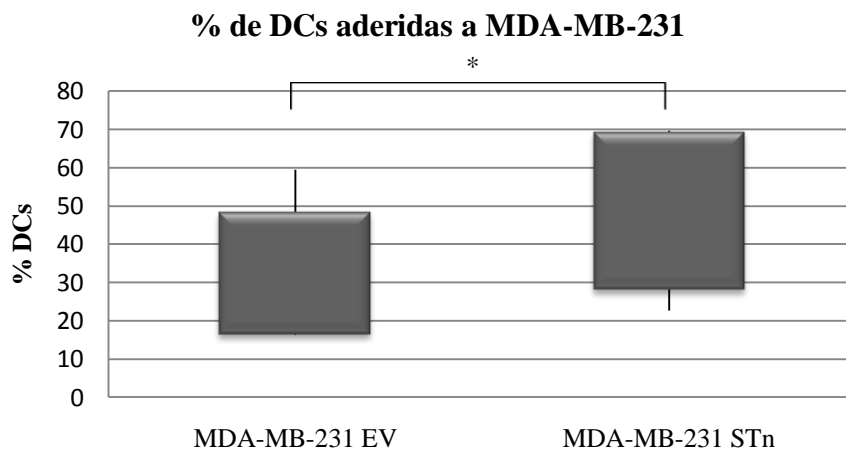


Figura 3.4 – Análise da percentagem (%) de DCs que aderiram às linhas celulares de cancro de mama MDA-MB-231 EV e MDA-MB-231 STn. Estes resultados estão apresentados num diagrama de caixa com bigodes. (n=5; P=0,026)

3.2.2. Presença de antígeno sTn nas células de cancro reprime a indução da maturação nas DCs aderidas, tendo em conta a expressão HLA-DR

Tal como foi dito anteriormente, a expressão de HLA-DR aumenta com o estado de maturação das DCs. Assim, de acordo com a análise do valor de MFI das DCs marcadas com anti-HLA-DR, verificou-se que, de um modo geral, a maturação das DCs é induzida quando estas entram em contacto com células tumorais, pois o valor de MFI das DCs é mais baixo antes da co-cultura do que o valor de MFI das DCs que foram incubadas com as linhas celulares, quer tenham permanecido aderidas ou não às células tumorais (Fig. 3.5). No entanto, são as células que realmente ficaram aderidas às células tumorais que apresentam o fenótico mais maduro (Fig. 3.5). Neste caso, verificou-se uma diferença significativa (P=0,0043) entre os valores de MFI das DCs que aderiram às células MCR que não expressam sTn e as DCs que aderiram às MCR que expressam sTn. Nomeadamente, num estudo mais exaustivo das duas linhas celulares MCR, observou-se que as DCs que aderiram às células MCR_{pLenti.transd} apresentam uma maior expressão de moléculas HLA-DR (MFI igual a $1180 \pm 73,4$), do que DCs que aderiram às células MCR_{pLenti.ST6GN1} (MFI igual a $970,9 \pm 65,2$) (Fig. 3.6). Ou seja, as DCs que aderiram às células tumorais em que o sTn se encontra ausente estão num estado significativamente (P<0,0001) mais maduro do que as DCs que aderiram às células que expressam sTn (Fig. 3.5 e Fig. 3.6).

De igual modo, no ensaio de adesão entre as DCs e as células de cancro de mama, as DCs que aderiram às células MDA-MB-231 STn também se encontram num estado menos maduro (MFI igual a $844,9 \pm 151,2$) do que as DCs que aderiram a MDA-MB-231 EV (MFI igual a $686,7 \pm 147,3$) (Fig. 3.7), o que confirma o resultado observado com as células de cancro de bexiga MCR.

Assim, o antigénio sTn, embora, como vimos anteriormente, promova a adesão entre DCs e células tumorais que o expressam na sua superfície – MCR_{pLenti.ST6GN1} e MDA-MB-231 STn –, parece de algum modo reprimir a maturação das DCs, isto é, torna-as menos imunogénicas.

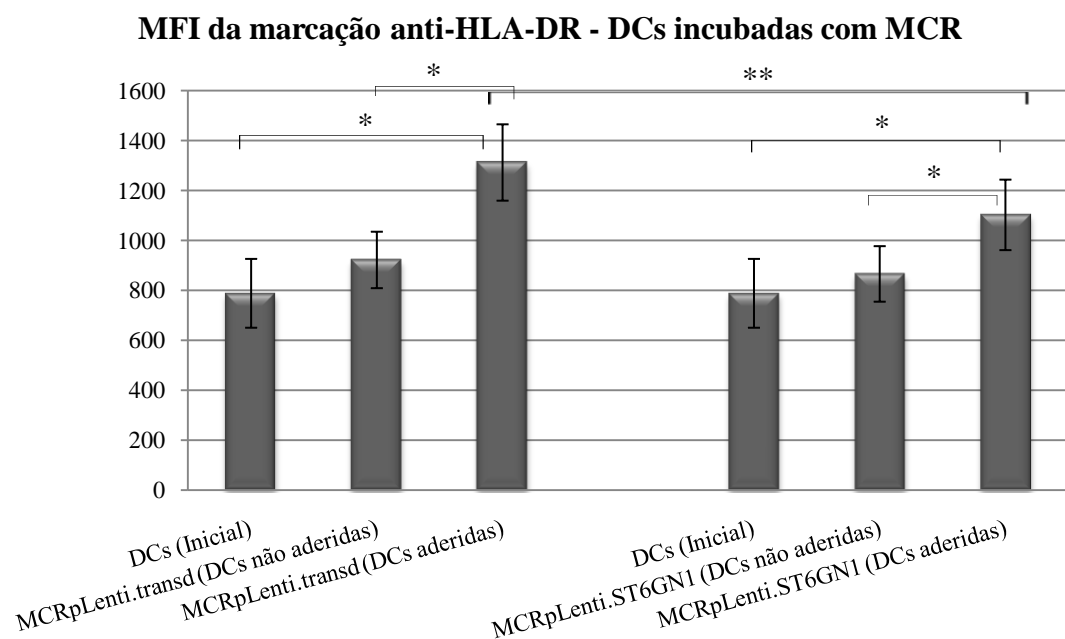


Figura 3.5 – Análise da MFI da marcação com anticorpo anti-HLA-DR das DCs co-cultivadas com MCR_{pLenti.ST6GN1} ou MCR_{pLenti.transd} (n=7): DCs antes da incubação com células de cancro (DCs Inicial), DCs que não aderiram e DCs que aderiram às células de cancro de bexiga MCR. Os resultados estão apresentados num gráfico de barras, indicando a média dos resultados com o erro padrão. Um asterisco (*) significa que a diferença é $P < 0,05$ e dois asteriscos (**) que é $P < 0,01$.

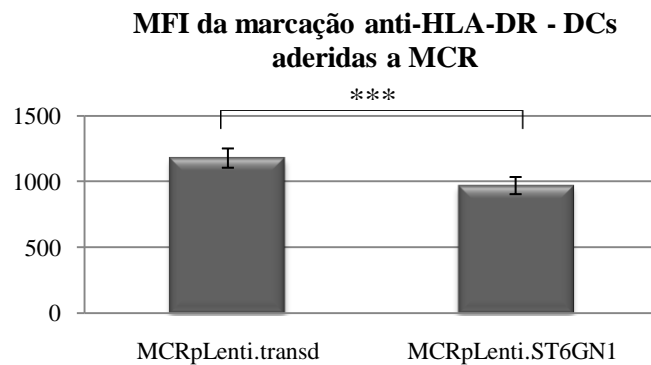


Figura 3.6 – Análise da MFI da marcação com anticorpo anti-HLA-DR das DCs que aderiram às células de cancro de bexiga MCR ($MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$). Os resultados estão apresentados num gráfico de barras, indicando a média dos resultados com o erro padrão. (n=25; $P < 0,0001$)

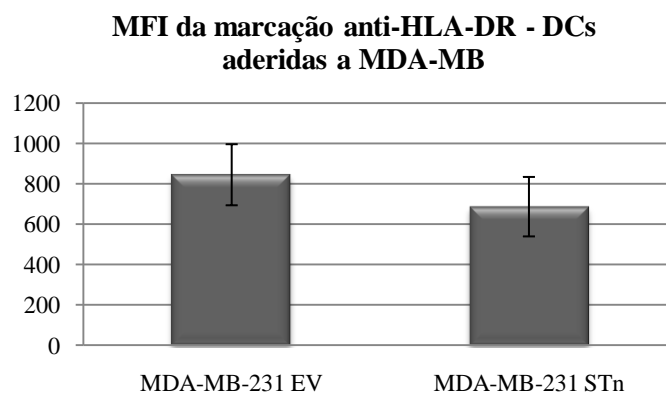


Figura 3.7 – Análise da MFI da marcação com o anticorpo anti-HLA-DR das DCs que aderiram às células de cancro de mama MDA-MB-231 (MDA-MB-231 EV e MDA-MB-231 STn). Estes resultados estão representados num gráfico de barras, indicando a média dos resultados com o erro padrão. (n=5)

3.2.3. Presença de antígeno sTn nas células de cancro reprime a indução da maturação nas DCs aderidas, tendo em conta a expressão de moléculas co-estimulatórias

Sabe-se que a maturação eficiente das DCs implica não só o aumento das moléculas apresentadoras de antígenos (aqui analisado pela expressão de HLA-DR), mas também o aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias. Assim, de modo a confirmar se as

diferenças observadas na expressão de HLA-DR das DCs que aderiram a $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$ correspondia a uma diferença efectiva no estado de maturação, as DCs foram também analisadas pela sua expressão de CD80, CD83 e CD86, que são moléculas co-estimulatórias que aumentam a sua expressão nas DCs quando estas apresentam um fenótipo mais maduro (ver secção 1.2.3 da Introdução).

Pela análise do valor de MFI obtido pela marcação com anticorpos contra estas moléculas co-estimulatórias, verificou-se que a sua expressão nas DCs que aderiram a $MCR_{pLenti.transd}$ é maior (MFI para CD80 igual a $107,9 \pm 19,64$, MFI para CD83 igual a $27,84 \pm 2,6$ e MFI para CD86 igual a $381,5 \pm 81,3$) do que a sua expressão nas DCs que aderiram a $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ (MFI para CD80 igual a $91,84 \pm 13,5$, MFI para CD83 igual a $24,46 \pm 2,7$ e MFI para CD86 igual a $298,5 \pm 99,4$). Ainda que não significativas ($P > 0,05$) (Fig. 3.8), as diferenças encontradas estão de acordo com os resultados obtidos para a expressão de HLA-DR.

Assim, confirmou-se que as DCs que aderiram às células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ encontram-se, efectivamente, num estado menos maduro do que as DCs que aderiram às células $MCR_{pLenti.transd}$, ou seja, estes resultados reforçam a hipótese de que o antígeno sTn possa ter um papel na repressão da imunogenicidade das DCs, contribuindo para uma maior sobrevivência do tumor.

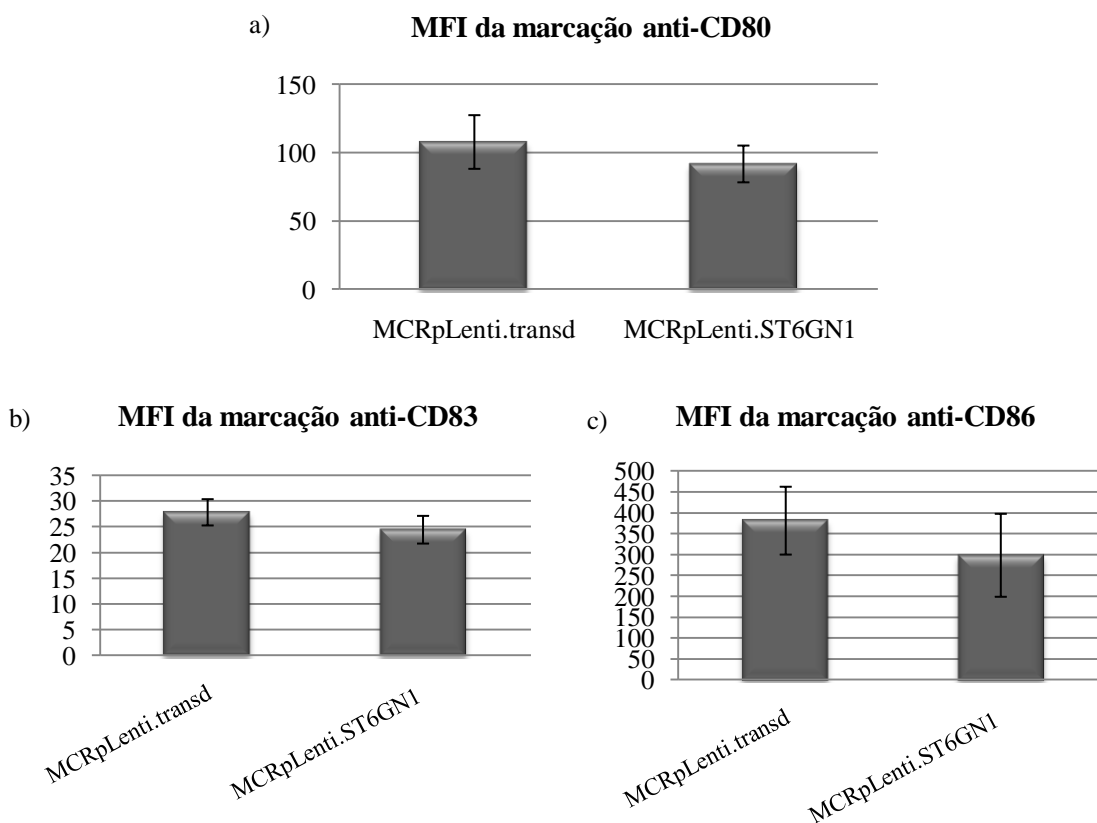


Figura 3.8 – Análise da MFI da marcação com os anticorpos anti-CD80 (a), anti-CD83 (b) e anti-CD86 (c) nas DCs que aderiram às células de cancro de bexiga MCR ($MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$). Os resultados estão apresentados em gráficos de barras, indicando a média dos resultados com o erro padrão. [a) e b) n=4; c) n=3]

3.2.4. Maturação é desencadeada pelo contacto directo entre as células MCR e as DCs

O reconhecimento pelas DCs de determinados antígenos, solúveis ou membranares, desencadeia, juntamente com outras alterações morfológicas e funcionais, a sua maturação (ver secção 1.2.3 da Introdução). Estas moléculas podem ter sido secretadas (maturação sem contacto entre células) ou estarem presente na superfície de células estranhas ou tumorais (maturação por contacto entre células).

De modo a verificar se o aumento do estado de maturação das DCs que se observou quando estas foram incubadas juntamente com células tumorais (ver secção 3.2.2) se devia ao contacto directo entre as DCs e as células MCR, ou eventuais moléculas secretadas pelas células MCR para o meio de cultura, ao invés de uma co-cultura, as DCs foram incubadas

com os meios provenientes das culturas de $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$ (recolhidos na fase exponencial), e como controlo, com o meio de cultura DMEM completo fresco.

O estado de maturação das DCs incubadas nos diferentes meios foi então avaliado com base no nível de expressão do marcador de maturação HLA-DR. Neste estudo, observou-se que as DCs que foram incubadas com o meio proveniente das culturas de células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e de $MCR_{pLenti.transd}$ não apresentaram diferenças significativas entre elas ou relativamente ao meio fresco ($P > 0,05$) (Fig. 3.9).

Com estes resultados comprovou-se que a incubação das DCs com os sobrenadantes das culturas de células MCR não é suficiente para maturá-las, ou seja, eventuais moléculas que tenham sido secretadas para o meio envolvente não foram responsáveis pela diferença no perfil diferencial de maturação das DCs que se verificou nos ensaios apresentados anteriormente (secções 3.2.2), parecendo ser essencial o contacto célula-a-célula, entre DCs e células tumorais.

Curiosamente, DCs incubadas na presença de tampão de adesão apresentaram uma maior expressão de HLA-DR do que as DCs nas condições referidas acima (dados não apresentados), sugerindo que este tampão tem a capacidade de induzir um aumento no estado de maturação das DCs, provavelmente devido à elevada concentração de Ca^{2+} (ver composição no Anexo III).

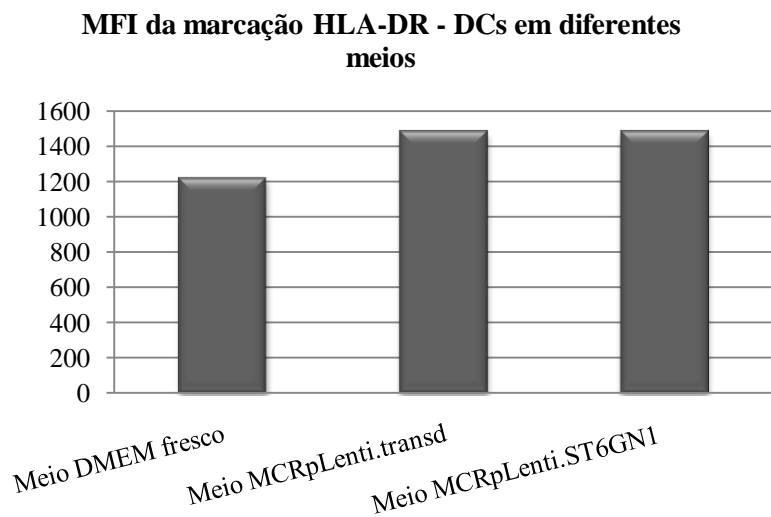


Figura 3.9 – Análise da MFI da marcação com o anticorpo anti-HLA-DR das DCs incubadas em diferentes meios: meio de cultura DMEM completo fresco, meio proveniente da cultura de $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e de $MCR_{pLenti.transd}$. Os resultados estão apresentados num gráfico de barras, indicando a média da razão ($n=2$)

3.2.5. Remoção de ácido siálico presente à superfície das células tumorais promove maior adesão e menor maturação das DCs

De modo a comprovar se o ácido siálico, que se encontra ligado ao antigénio Tn, no caso do sTn, é o componente chave que justifica a diferença observada nos ensaios anteriores (secções 3.2.2 e 3.2.3) entre o perfil de maturação das DCs que aderiram às duas linhas MCR, as células tumorais foram tratadas com uma sialidase, que consegue remover o ácido siálico da superfície celular. A sialidase utilizada neste tratamento remove, de um modo geral, todos os ácidos siálicos com os vários tipos de ligações ao glicoconjugado, mas está descrito que apresenta preferência por remover, em primeiro lugar, os ácidos siálicos com ligação do tipo α -2,3, deixando os que têm ligações do tipo α -2,6 e α -2,8 de ácido siálico para serem clivadas em último lugar.

Apesar da ligação do ácido siálico presente no antigénio sTn ser uma ligação do tipo α -2,6 (ver secção 1.1.3 da Introdução), pode dizer-se que o tratamento com esta sialidase foi eficaz na remoção de todo o ácido siálico ligado a este antigénio nas células MCR_{pLenti.ST6GN1}, uma vez que se verificou que as células tumorais tratadas não marcaram com anticorpo anti-sTn (dados não apresentados).

Após o tratamento com sialidase, a percentagem de DCs que aderiram às células MCR tratadas foi cerca de 30% superior à observada nas células não tratadas (Fig. 3.10 a)), o que indica que a remoção do ácido siálico de glicoconjugados, catalisada por esta sialidase, favorece *per se* a adesão de DCs a estas células tumorais. Quando se compararam os resultados de adesão as linhas celulares tratadas, verificou-se que as DCs parecem aderir mais às células MCR_{pLenti.trand} do que às MCR_{pLenti.ST6GN1} (Fig. 3.10 b)), o que indica que o tratamento com sialidase inverte a tendência verificada anteriormente (resultados obtidos na secção 3.2.1).

Comparando os resultados de expressão de HLA-DR obtidos com células tumorais não tratadas e tratadas, verificou-se que a diferença de maturação observada entre as DCs aderidas às linhas celulares não tratadas (ver também secção 3.2.2) se manteve nas DCs que aderiram às linhas celulares MCR_{pLenti.trand} (MFI igual a $1043 \pm 74,8$) e MCR_{pLenti.ST6GN1} (MFI igual a $894,8 \pm 57,2$) tratadas (Fig. 3.11). Estes resultados demonstram que o tratamento com sialidase não é capaz de inverter o facto de as células MCR_{pLenti.ST6GN1} induzirem um menor grau de maturação nas DCs. Como o tratamento com sialidase não remove, exclusivamente, o ácido siálico presente no antigénio sTn, estes resultados são, provavelmente, influenciados por outras moléculas descobertas pela acção da sialidase utilizada. Assim, são necessários

estudos adicionais para um melhor entendimento destes resultados.

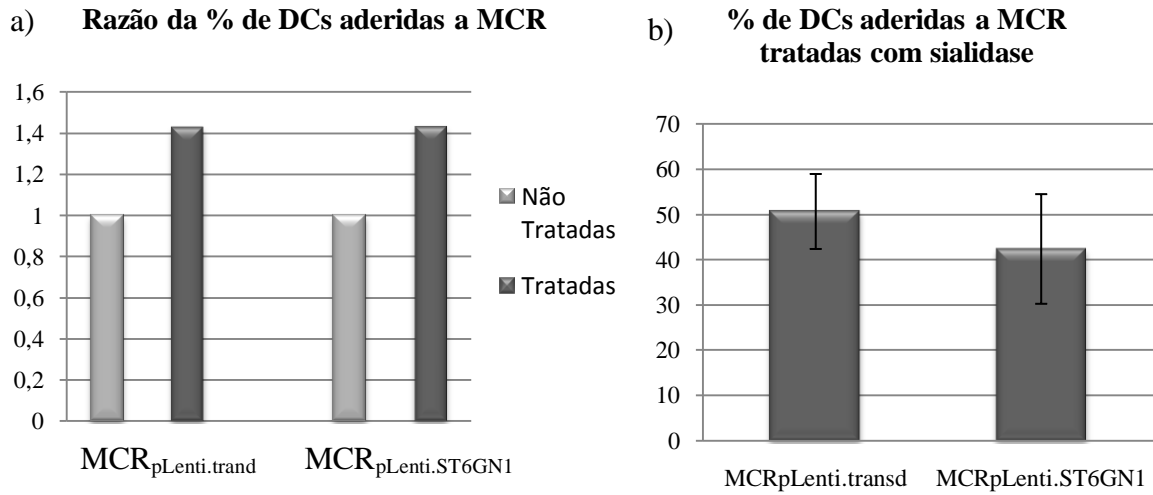


Figura 3.10 – a) Representação da razão da percentagem de DCs que aderiram a células MCR_{pLenti.ST6GN1} e a MCR_{pLenti.transd} tratadas com sialidase, comparativamente à percentagem que aderiram a células não tratadas (valor = 1). b) Representação da percentagem de DCs que aderiram a MCR_{pLenti.ST6GN1} e a MCR_{pLenti.transd} tratadas com sialidase. Os resultados estão apresentados num gráfico de barras, indicando a média da razão (a) e a média da percentagem de moDCs aderidas, com o erro padrão (b). (n=3)

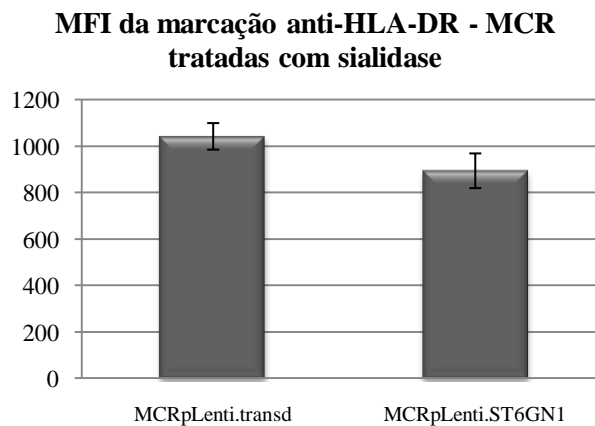


Figura 3.11 – Representação da MFI da marcação da expressão de HLA-DR nas DCs que aderiram às células tumorais MCR_{pLenti.ST6GN1} e a MCR_{pLenti.transd} tratadas com sialidase. Os resultados estão apresentados num gráfico de barras, indicando a média da MFI da marcação com o erro padrão (n=3)

3.2.6. DCs previamente maturadas aderem menos às células MCR do que as DCs imaturas

As DCs maduras apresentam várias alterações, nomeadamente em moléculas que promovem o reconhecimento e a adesão, relativamente às imaturas (ver secção 1.2.3 da Introdução). Com o objectivo de avaliar de que forma a maturação influenciava a adesão das DCs às células tumorais, foram também realizados ensaios de adesão semelhantes aos descritos nas secções anteriores, mas em que se utilizaram DCs previamente maturadas pela adição de um conhecido estímulo (LPS) ao seu meio de cultura. Este estímulo está descrito por aumentar substancialmente a expressão quer de moléculas de apresentação de antigénios, quer das co-estimulatórias (Tsujiimoto *et al.*, 2006).

Ao comparar a interacção entre DCs previamente maturadas e as células de cancro, com a interacção entre estas e as DCs imaturas, verificou-se que as primeiras aderem cerca de 40% menos às MCR do que as segundas. (Fig. 3.12 a)). Por outro lado, comparando os resultados entre as duas linhas celulares de cancro de bexiga, verificou-se que as DCs aderiram menos a MCR_{pLenti.ST6GN1} (32,76%) do que a MCR_{pLenti.transd} (41,56%) (Fig. 3.12 b)), diferente do que se verifica no caso das DCs não maturadas (secção 3.2.1).

Relativamente ao nível de expressão da molécula HLA-DR, uma vez que foram previamente maturadas, as DCs já apresentavam um valor mais elevado. Ainda assim, foi possível observar uma diferença nos valores da expressão de HLA-DR das DCs maduras que aderiram a MCR_{pLenti.ST6GN1} (MFI igual a 2326) e a MCR_{pLenti.transd} (MFI igual a 2551), que, apesar de não ser significativa ($P > 0,05$), sugere um perfil mais maduro para as DCs que aderiram a MCR_{pLenti.transd} (Fig. 3.13), tal como se havia verificado para as DCs não maturadas (secção 3.2.2).

Assim, estes resultados sugerem que a maturação prévia das DCs com LPS influencia essencialmente a capacidade de adesão destas às células tumorais, inibindo a sua adesão, principalmente às células que expressam sTn. Estes dados poderão estar relacionados com alterações no nível de expressão de moléculas envolvidas no reconhecimento e adesão entre células, que ocorrem como consequência da activação das DCs por estímulos, como LPS. No futuro, estas alterações moleculares terão de ser mais profundamente investigadas.

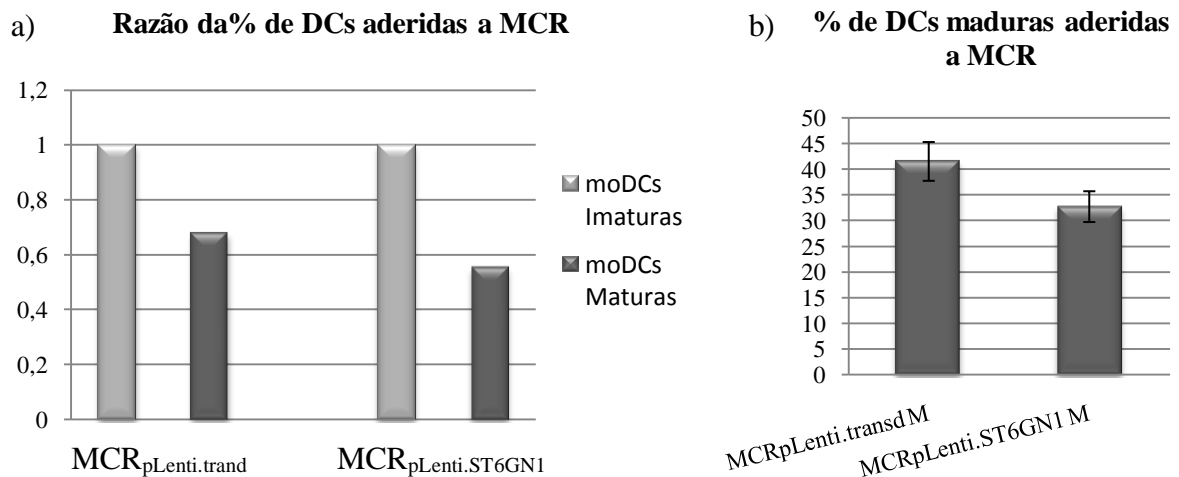


Figura 3.12 – a) Representação da razão da percentagem de DCs maduras que aderiram a células MCR_{pLenti.ST6GN1} e a MCR_{pLenti.transd} comparativamente à percentagem de DCs imaturas (valor = 1) que aderiram. b) Representação da percentagem de DCs maduras que aderiram às linhas celulares MCR_{pLenti.ST6GN1} e a MCR_{pLenti.transd}. Os resultados estão apresentados num gráfico de barras, indicando a média da razão (a) e a média da percentagem de moDCs aderidas, com o erro padrão (b)). (n=3)

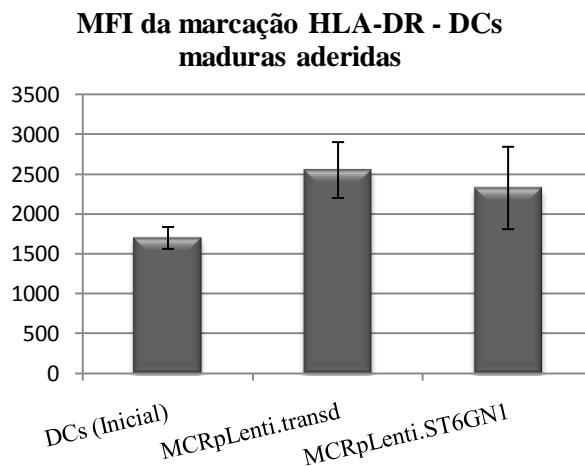


Figura 3.13 – Representação da MFI da marcação da expressão de HLA-DR nas DCs antes da incubação com as células tumorais (DCs Inicial) e nas DCs maduras que aderiram às células MCR_{pLenti.ST6GN1} e a MCR_{pLenti.transd}. Os resultados estão apresentados num gráfico de barras, indicando a média da MFI da marcação com o erro padrão (n=3)

3.2.7. Células apoptóticas $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ são mais fagocitadas pelas DCs

A fagocitose de células apoptóticas é uma função fisiológica importante das DCs imaturas, que tem vindo a ser explorada para fins terapêuticos. Neste estudo, com o objectivo de verificar se a presença de antigénio sTn influenciava a % de células apoptóticas MCR que são fagocitadas pelas DCs, foram realizados ensaios onde células apoptóticas $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$ (após 48 horas de incubação com 10 μ M do agente camptotecina) foram incubadas com DCs a 37° C ou 4° C (controlo). A percentagem de células apoptóticas MCR (no mínimo 50% do total das células) e a presença de antigénio sTn nas células apoptóticas $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ foram verificadas antes da co-incubação destas com as DCs imaturas (dados não apresentados).

A % de células MCR apoptóticas que foram fagocitadas pelas DCs foi analisada por citometria de fluxo com base na avaliação das DCs (marcadas com anti-HLA-DR) que adquiriram, também, marcação positiva para o CFSE (corante fluorescente citoplasmático com que as células MCR haviam sido, previamente, marcadas). Assim, observou-se que, após a incubação a 37° C das DCs com as linhas celulares MCR apoptóticas, uma maior percentagem de DCs adquiriu a fluorescência do CFSE no caso de $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ (70,5%; $P=0,014$) do que no caso de $MCR_{pLenti.transd}$ (61,8%) (Fig. 3.14 a)). Nas células incubadas a 4° C (controlo), a percentagem de DCs que ficou com a fluorescência das MCR foi apenas 26,36% no caso de $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e 23,94% no caso de $MCR_{pLenti.transd}$ (dados não apresentados). Uma vez que a fagocitose, propriamente dita, só ocorre a uma temperatura fisiológica, pode-se pensar que, no caso das células incubadas a 4° C, as DCs adquiriram dupla fluorescência por adesão dos corpos apoptóticos à superfície das DCs (“background”). Pelo facto de, nestes ensaios a 4° C, não se terem observado diferenças relevantes entre os ensaios realizados com as duas linhas celulares MCR, pode-se concluir que as duas linhas não apresentam diferenças significativas em termos de adesão de corpos apoptóticos das linhas celulares. Por outro lado, pode-se também concluir que a diferença que se verificou nos ensaios a 37° C resulta de uma diferença real na capacidade fagocítica das DCs, ou seja, no facto destas serem capazes de internalizar mais corpos apoptóticos derivados das células que expressam sTn do que das células que não expressam este antigénio.

Relativamente à expressão de HLA-DR, não se observaram diferenças entre a MFI das DCs que fagocitaram as células apoptóticas $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ (559,5) e as $MCR_{pLenti.transd}$ (542,2), (Fig. 3.14 b)). Portanto, após a fagocitose, as DCs encontram-se no mesmo estado de maturação, quer tenham fagocitado células apoptóticas MCR com ou sem sTn.

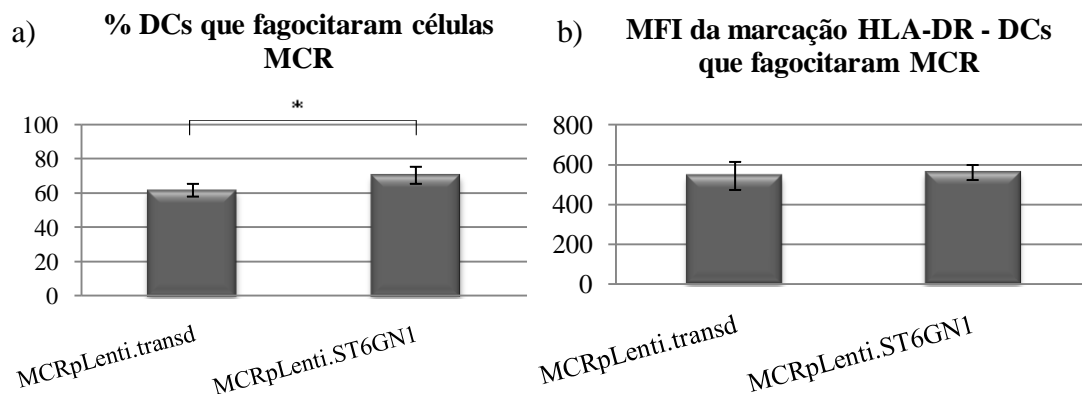


Figura 3.14 – Análise da percentagem (%) de DCs que fagocitaram células apoptóticas MCR ($MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$) ($P=0,014$) (a) e da MFI da marcação de HLA-DR destas DCs (b)), quando incubadas a 37°C. A co-cultura foi marcada com anticorpo anti-HLA-DR (marca só DCs), enquanto as MCR tinham sido, previamente, marcadas com CFSE (n=4)

3.3. Células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ são mais susceptíveis ao agente apoptótico camptotecina do que células $MCR_{pLenti.transd}$

A apoptose é também conhecida como a forma de morte celular programada. De todas as formas de morte celular é a melhor caracterizada e a sua natureza altamente regulada torna-a um atractivo alvo para o desenho de novas terapias. Existem vários tipos de estímulos de stress celular que podem provocar a entrada em apoptose de uma célula, incluindo agentes quimioterapêuticos, irradiação e stress oxidativo (Fulda *et al.*, 2010).

A expressão de determinados antigénios nas células tumorais, ao influenciar a sua interacção com o meio circundante, pode também modular a sobrevivência e a susceptibilidade das células a várias terapias, nomeadamente a agentes apoptóticos. Nestes ensaios, foi utilizado o agente químico camptotecina de modo a induzir a apoptose nas células de cancro $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$, e verificar a ocorrência de possíveis diferenças de susceptibilidade a este agente, conforme as células contém antigénio sTn ou não. Camptotecina é um dos mais promissores agentes anti-tumorais e possui um mecanismo de acção único, actuando como inibidor da DNA topoisomerase I, clivando o complexo DNA-Enzima. Assim, este agente promove danos no DNA, provocando a apoptose das células sujeitas à sua acção (Ulivi *et al.*, 2005).

Numa primeira fase, através de um ensaio colorimétrico de MTT, foi testada a susceptibilidade das linhas celulares MCR a várias concentrações (0; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5;

15; 20 μM) do agente camptotecina, durante 24 horas. MTT é um sal tetrazólico de cor amarelo, que é convertido a *formazan*, um precipitado violeta, por desidrogenases mitocondriais de células vivas, sendo utilizado para estudos de viabilidade celular por reflectir a capacidade redutora das mitocôndrias. Verificou-se então que a viabilidade das células $\text{MCR}_{\text{pLenti.ST6GN1}}$ ficou comprometida com concentrações de camptotecina mais baixas do que a viabilidade das $\text{MCR}_{\text{pLenti.transd}}$ (Fig. 3.15). Por exemplo, uma concentração de 2,5 μM inibe cerca de 74% da actividade mitocondrial das células da linha celular MCR que expressa sTn, mas afecta apenas em 33% a actividade mitocondrial das células da linha celular MCR que não expressa sTn. Concluiu-se então que a linha $\text{MCR}_{\text{pLenti.ST6GN1}}$ é, aparentemente, mais susceptível a este agente do que a $\text{MCR}_{\text{pLenti.transd}}$.

De modo a verificar esta diferença na susceptibilidade à camptotecina entre as células $\text{MCR}_{\text{pLenti.ST6GN1}}$ e $\text{MCR}_{\text{pLenti.transd}}$, foram, posteriormente, realizados ensaios de avaliação da apoptose, após a sua indução, utilizando 10 μM de camptotecina, durante 24 e 48 horas de incubação. O método utilizado para avaliar as células apoptóticas foi a marcação dupla com Anexina V (marcador de apoptose que se liga à fosfatidilserina presente exclusivamente em células apoptóticas/necróticas) e 7-AAD (marcador nuclear que só penetra em células inviáveis, cuja membrana citoplasmática esteja danificada) analisada, posteriormente, por citometria de fluxo. A concentração de camptotecina (10 μM) testada neste ensaio foi escolhida com base no ensaio de MTT, que revelou que esta concentração reduz ao mínimo, a actividade mitocondrial das duas linhas celulares. Após 24 horas, as células $\text{MCR}_{\text{pLenti.ST6GN1}}$ apresentaram maior percentagem de células apoptóticas (69%) e menor percentagem de células vivas (24%) do que as $\text{MCR}_{\text{pLenti.transd}}$ (34% células apoptóticas e 64% de células vivas). Após 48 horas, as células $\text{MCR}_{\text{pLenti.ST6GN1}}$ apresentavam 79% de células apoptóticas e 16,5% de células vivas e as células $\text{MCR}_{\text{pLenti.transd}}$ apresentavam 46% de células apoptóticas e 51% de células vivas (Fig. 3.16). Estes resultados foram comparados com resultados obtidos com um ensaio controlo em que as células foram incubadas em meio de cultura sem o agente apoptótico camptotecina, obtendo-se, neste caso, uma média de 85% de células vivas e 13% de células apoptóticas em células $\text{MCR}_{\text{pLenti.transd}}$, e de 89% de células vivas e 10% de células apoptóticas em $\text{MCR}_{\text{pLenti.ST6GN1}}$ (resultados não apresentados).

Estes resultados confirmaram que as células $\text{MCR}_{\text{pLenti.ST6GN1}}$ são mais susceptíveis ao agente camptotecina do que as $\text{MCR}_{\text{pLenti.transd}}$, sugerindo que a presença do antígeno sTn em células tumorais pode influenciar o sucesso de uma terapia com base em agentes químicos de actuação semelhante à camptotecina.

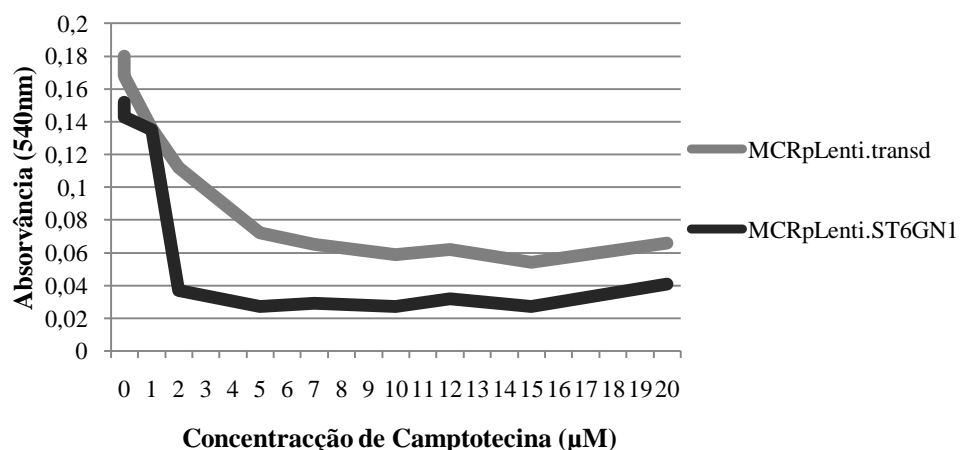


Figura 3.15 – Análise do ensaio de MTT das células MCR_{pLenti.ST6GN1} e MCR_{pLenti.transd}, testando várias concentrações (0; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 20 μM) do agente camptotecina, durante 24 horas de incubação. (n=1)

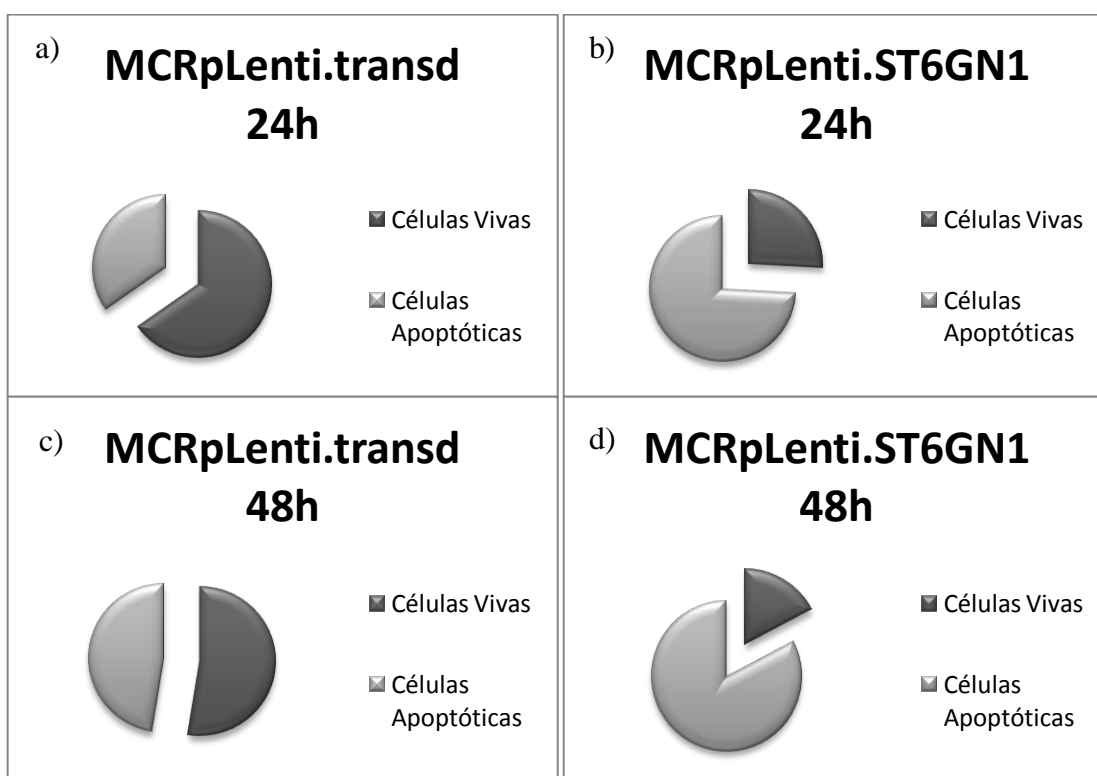


Figura 3.16 – Análise da percentagem de células vivas (escuro) e apoptóticas (claro) das das linhas cleulares MCR_{pLenti.ST6GN1} e MCR_{pLenti.transd} durante 24 horas (a) e b)) e 48 horas (c) e d)) de exposição ao agente camptotecina (10μM) (n=2)

3.4. MUC1 e CD44 – Possíveis “portadores” de antígeno sialil-Tn

O antígeno sTn está, normalmente, associado a proteínas que desempenham funções na adesão e/ou migração, como CD44 e mucinas, principalmente MUC1 (secção 1.1.3 da Introdução). As células de cancro $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ contêm antígenos sTn à sua superfície mas ainda não foram identificados o(s) “portador(es)” deste açúcar. O objectivo deste ensaio é tentar elucidar algum dos possíveis “portadores” do antígeno sTn, nomeadamente CD44 e MUC1.

As células de cancro $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$ marcaram de forma idêntica com um anticorpo anti-CD44, o que indica que esta molécula é expressa igualmente por estas duas linhas de cancro de bexiga (MFI de $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ igual a 62,2 e de $MCR_{pLenti.transd}$ igual a 70,2) (Fig. 3.17 a). Uma vez que o anticorpo utilizado não distingue a glicosilação do CD44, serão necessários estudos adicionais para concluir se esta molécula é “portadora” de antígeno sTn.

No caso da identificação do portador MUC1, foram utilizados dois anticorpos cuja especificidade para com a MUC1 depende da glicosilação desta proteína. As células das duas linhas celulares MCR ($MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$) apresentaram uma fraca marcação com o anticorpo anti-MUC1, clone SM3 (MFI de $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ igual a 8,7 e de $MCR_{pLenti.transd}$ igual a 8,2) (Fig. 3.17 b)), que reconhece as formas pouco glicosiladas da MUC1. Assim, pode-se afirmar que estas células não possuem muitas moléculas MUC1 fracamente glicosiladas.

No caso do anticorpo anti-MUC1, clone 5E5, obtiveram-se resultados distintos para as duas células. Este anticorpo reconhece a proteína MUC1 glicosilada na sua região GSTA com antígeno Tn ou sTn. Como a % de marcação positiva nas células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ foi maior do que a % nas $MCR_{pLenti.transd}$ (MFI de $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ igual a 34,9 e de $MCR_{pLenti.transd}$ igual a 15,2) (Fig. 3.17 c)), poder-se-á supor que as primeiras possuem mais MUC1 glicosiladas com antígeno Tn ou sTn, o que sugere que é possível que a molécula MUC1 seja “portadora” de antígeno sTn.

No entanto, estes dados são relativos a resultados muito preliminares que necessitam de ser confirmados. Além disso, outras metodologias têm que ser aplicadas para aprofundar este estudo e esclarecer quais as possíveis moléculas às quais o antígeno sTn pode estar associado em cancro de bexiga.

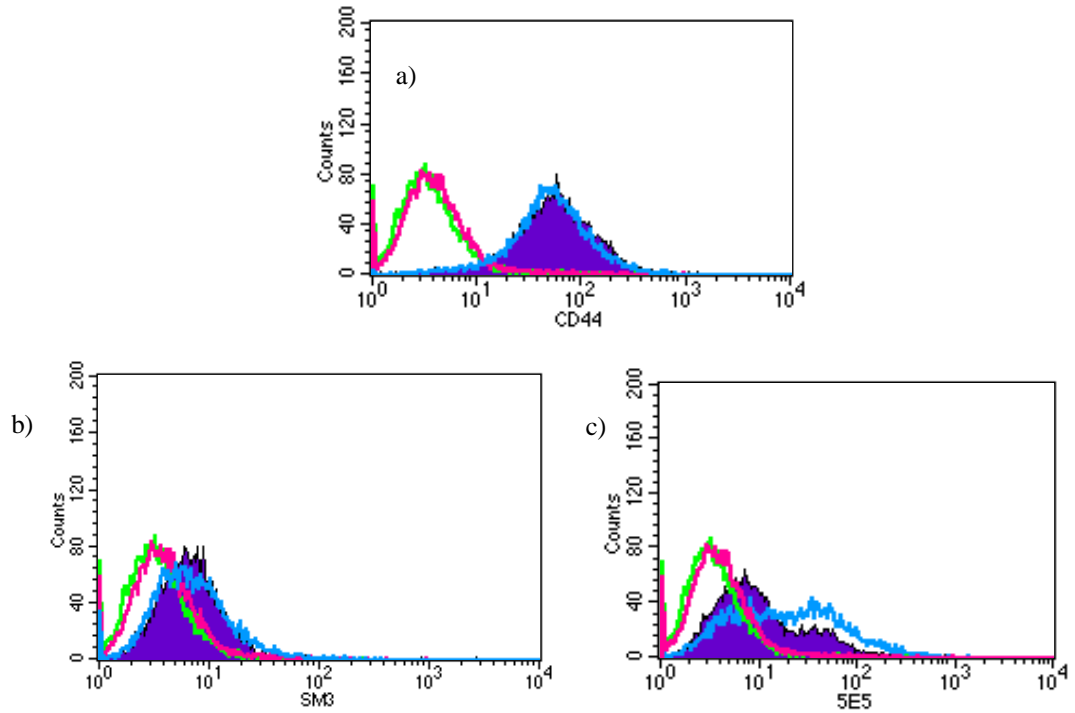


Figura 3.17 – Análise da marcação com os anticorpos anti-CD44 (a)), anti-MUC1 clone SM3 (b)) e anti-MUC1 clone 5E5 (c)) das células MCR (MCR_{pLenti.ST6GN1} (Azul) e MCR_{pLenti.transd} (Roxo)), e da marcação com anticorpo secundário (controlo) das células MCR_{pLenti.ST6GN1} (Rosa) e MCR_{pLenti.transd} (Verde) (n=1)

4. Discussão

As células tumorais frequentemente exibem estruturas de glicanos alterados na sua superfície celular, o que contribui, significativamente, para alterações nas propriedades de adesão e reconhecimento pelo sistema imunológico (Hakomori, 2001, Singh *et al.*, 2009 e Vlad e Finn, 2004).

Como diferentes funções do sistema imunológico requerem a presença ou ausência de açúcares específicos em determinadas glicoproteínas, as alterações na glicosilação podem afectar diversas funções imunológicas, nomeadamente criando ou mascarando locais de ligação. Por exemplo, existem padrões específicos de glicosilação que regulam diversos processos, como o tráfego e migração de leucócitos, ou a selecção de timócitos no sistema imunológico (Nonaka *et al.*, 2008). De modo semelhante, alterações na glicosilação também influenciam a interacção de células dendríticas (DCs) com outras células, modulando a sua resposta imunológica (van Vliet *et al.*, 2005).

O aumento de estruturas sialiladas é uma das mais frequentes alterações de glicosilação em células tumorais (Aarnoudse *et al.*, 2006). A presença de antígenos carboidratos associados a tumores (TACAs) sialilados, nomeadamente sialil-Lewis X e sialil-Tn (sTn), em cancro de mama, está associada a um pior prognóstico e a uma reduzida sobrevivência dos doentes, influenciando também a adesão celular, migração, proliferação e crescimento do tumor (Cazet *et al.*, 2010).

Neste trabalho pretendeu-se essencialmente estudar a resposta imunológica de DCs derivadas de monócitos, especificamente a adesão, maturação e fagocitose, desencadeada por células de cancro de bexiga que expressam um tipo de antígeno de Thomsen-Friedenreich, o antígeno sTn, nomeadamente a linha de cancro MCR_{pLenti.ST6GN1}, que expressa o antígeno sTn, e a linha controlo MCR_{pLenti.transd}.

4.1. Antígeno sTn em células tumorais influencia a adesão e maturação das DCs

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que as DCs têm preferência para aderir mais a células de cancro de bexiga e mama que contêm antígeno sTn, comparativamente a essas mesmas células de cancro com expressão negligenciável deste antígeno. A variabilidade observada nos resultados foi promovida, muito provavelmente, pelo facto de se terem utilizado DCs provenientes de diferentes doadores, com características intrínsecas particulares. Contudo, é clara a maior tendência das DCs para a adesão às células tumorais

que contêm antigénio sTn (claramente significativa no caso das células de cancro de mama), o que sugere que as DCs expressam receptores e/ou moléculas de adesão que reconhecem o antigénio sTn expressos pelas células tumorais.

Vários receptores expressos pelas DCs podem estar envolvidos no reconhecimento de antigénios tumorais, nomeadamente o DC-SIGN, receptores *Macrophage Galactose-Type C-Type Lectin* (MGL) ou o receptor da manose. Todavia, de acordo com a literatura, estes têm preferência por ligandos não sialilados. Por exemplo o MGL reconhece antigénios Tn (Napoletano *et al.*, 2007) mas não reconhece o antigénio sTn (van Vliet *et al.*, 2005, Singh *et al.*, 2009).

Supõe-se que glicofomas sialiladas de MUC1 interajam com receptores da família Siglec (*Sialic acid-binding Ig-like Lectins*), os quais são receptores com uma grande afinidade para estruturas que contêm ácido siálico (Aarnoudse *et al.*, 2006). Em estudos anteriores, foi verificado que vários dos receptores da família Siglec, principalmente Siglec-2, Siglec-3, Siglec-5, Siglec-6, Siglec-14 e Siglec-15, são capazes de reconhecer o antigénio sTn (Angata *et al.*, 2006; Angata *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 1999, Brinkman-Van der Linden e Varki, 2000). Contudo, a especificidade do receptor depende significativamente da molécula portadora dos antigénios sTn. Destes receptores, as Siglec-3, Siglec-5, Siglec-7 e Siglec-9 são expressos por DCs (Lock *et al.*, 2004). Assim, ainda que nesta fase não se conheçam os glicoconjugados expressos nas células tumorais estudadas, que sejam os portadores do antigénio sTn, pode-se supor que sejam as Siglecs, os principais receptores responsáveis pelo reconhecimento, por parte das DCs, de células tumorais que contenham o antigénio sTn. A expressão abundante de Siglecs pelas DCs favoreceria a interacção entre estas e as células tumorais. No entanto, para provar a hipótese de que a adesão de DCs a células tumorais que expressam sTn pode ser mediada por receptores da família das Siglecs expressos em DCs, serão necessários ensaios adicionais e mais específicos, como por exemplo ensaios de adesão realizados como os descritos anteriormente mas na presença de anticorpos bloqueantes anti-Siglecs.

Apesar de as DCs aderirem mais a células tumorais que expressam antigénios sTn, estas encontram-se mais imaturas (expressam menos HLA-DR e menos moléculas co-estimulatórias) do que as DCs que aderiram a células tumorais que não expressam sTn (quer nas linhas celulares de cancro de bexiga, quer nas linhas celulares de cancro de mama). Estes resultados sugerem que a presença de antigénios sTn inibe a indução da maturação das DCs aderidas, possivelmente, conduzindo a uma resposta imunológica mais tolerogénica. Ou seja, os antigénios sTn poderão então permitir que as células tumorais escapem de forma mais

eficiente à resposta anti-tumoral, levada a cabo pelos linfócitos T, evitando ser destruídas por uma resposta imunológica efectora.

Estes dados estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram que o reconhecimento de determinados TACAs por receptores de DCs parece induzir uma resposta de tolerância ao tumor. São exemplos dessa situação, o reconhecimento de CEA (antigénio carcino-embriogénico) com motivos Lewis X e Lewis Y pelo receptor DC-SIGN presente em DCs (van Gisbergen *et al.*, 2005) e o reconhecimento de MUC1 contendo antigénios Tn (MUC1-Tn) pelo receptor MGL de DCs (Saeland *et al.*, 2007 e Singh *et al.*, 2009). Foi também descrito que, DCs em contacto com a glicofoma MUC1-Sialil-T (sT) apresentavam um menor estado de maturação do que quando estavam em contacto com MUC1 não glicosilado (Rughetti *et al.*, 2005), sugerindo que a estrutura MUC1-sT desencadeava um efeito de inibição da maturação nas DCs. Assim, a presença de antigénios sTn na superfície de células tumorais, usadas neste trabalho, à semelhança da acção da glicofoma MUC1-sT, e de outros antigénios tumorais, parece desfavorecer a imunogenicidade das DCs. Ou seja sTn inibe de algum modo a capacidade das DCs de maturarem e apresentarem de forma eficiente os antigénios tumorais aos linfócitos T.

Estes dados reforçam de alguma forma a hipótese de que as Siglecs expressas pelas DCs são os principais receptores responsáveis pelo reconhecimento de células tumorais que contenham o antigénio sTn. De facto, a grande maioria destes receptores possui motivos ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*), que podem desencadear mecanismos de sinalização inibitórios das funções celulares (Bax *et al.*, 2007, Crocker e Varki, 2001 e Paul, *et al.*, 2000), neste caso a repressão da indução de maturação.

4.2. Tratamento com sialidase evidencia a complexidade do reconhecimento de células tumorais pelas DCs

Uma vez que os resultados dos ensaios de adesão sugerem que o antigénio sTn promove a adesão das DCs a células tumorais, pretendeu-se provar o papel dos antigénios sTn neste fenómeno, removendo-se o ácido siálico deste antigénio, através do tratamento com sialidase. Verificou-se que a % de DCs aderidas a linhas celulares inverte-se após tratamento com sialidase das células tumorais, relativamente à % de DCs aderidas a células tumorais não tratadas. Ou seja, as DCs tendem a aderir menos a MCR_{pLenti.ST6GN1} dessialilada comparativamente a MCR_{pLenti.trand} dessialilada. Interessante, independentemente do fenótipo, a % de DCs aderidas a ambas as linhas celulares tratadas com sialidase é muito superior à

correspondente % de DCs aderidas a células tumorais não dessialiladas, sugerindo que o tratamento com sialidase *per se* promove a adesão celular.

Com o tratamento com sialidase, a diferença na expressão de marcadores de maturação das DCs aderidas a MCR_{pLenti.ST6GN1} e a MCR_{pLenti.transd} manteve-se, tal como para as células tumorais não dessialiladas. Ou seja, a linha celular MCR_{pLenti.ST6GN1}, mesmo dessialilada, induz um fenótipo menos maduro nas DCs. Como possível explicação, temos o facto de ter sido utilizada uma sialidase que não é específica da ligação em causa (preferência por α -2,3 ácido siálico). Assim, apesar de se saber que as células MCR tratadas com esta sialidase perderem os antígenos sTn, não podemos garantir que esta remoção tenha sido exclusiva. Provavelmente, este tratamento deve afectar outras moléculas que possuem ácido siálico, com os vários tipos de ligações α -2,3, α -2,6 e α -2,8, nomeadamente moléculas de adesão e/ou receptores. A comprová-lo, temos o facto de ambas as células tumorais terem uma muito maior tendência para aderirem DCs, após sialidase. Este aumento da adesão influenciará inevitavelmente o resultado final da adesão e indução da maturação das DCs, mascarando o efeito da remoção exclusiva do ácido siálico presente no antígeno sTn.

Uma outra explicação para a obtenção de resultados diferentes do esperado pode estar relacionada com o facto de que a sobreexpressão da enzima ST6GalNAcI nas células MCR_{pLenti.ST6GN1}, poder influenciar, por competição, a via de biossíntese de outros antígenos glicosídicos, tal como os restantes membros da família de antígenos Thomsen-Friedenreich. O facto de se favorecer a produção de antígenos sTn, pode desfavorecer a formação de outros antígenos (como antígenos Tn, T e sT). A observação de uma menor expressão de antígenos T nas células MCR_{pLenti.ST6GN1}, comparativamente com MCR_{pLenti.transd} (resultados não apresentados), bem como o facto de Julien e colaboradores (2001) terem verificado que nas células de cancro de mama transduzidas com ST6GalNAcI havia igualmente uma menor expressão de antígeno T relativamente ao controlo negativo, tornou evidente esta suposição. Deste modo, neste sistema complexo, pode-se pensar, ao serem tratadas com sialidase, as células MCR_{pLenti.ST6GN1} deverão apresentar um conteúdo de antígenos não sialilados diferente das células MCR_{pLenti.transd}, o que dificulta, por este método, a obtenção de resultados conclusivos, a propósito do papel de sTn na adesão às DCs.

Simultaneamente, não se pode descartar a hipótese de que a célula, durante o tempo que decorre o ensaio de adesão (2 horas), poder repor os seus níveis de ácido siálico superficial e assim os glicoconjugados, nomeadamente o antígeno sTn, recuperando o ácido siálico removido pelo tratamento com sialidase. A síntese *de novo* de glicoconjugados e/ou a

presença de eventuais sialiltransferases solúveis ou citoplasmáticas podem repor a sialilação das células tratadas, influenciando os resultados obtidos. Este tipo de reposição de glicoconjugados na superfície de células tumorais, após tratamento com sialidase, nomeadamente MUC1 contendo sT, foi observado por Swanson e colaboradores (2007). Neste caso, a reposição da glicosilação contribuía para que, em ensaios de adesão entre células Schwann e linhas de cancro pancreático, não houvessem diferenças quando se usavam células tumorais tratadas e não tratadas com sialidase. Uma forma de contornar o mecanismo de reposição dos glicoconjugados sialilados, a ter em conta em experiências futuras, consiste na inibição do tráfego molecular, nomeadamente, através de ensaios de adesão realizados a 4°C ou através da adição de substâncias químicas nos ensaios para inibir o transporte molecular intracelular (Swanson *et al.*, 2007).

Assim esta parte do estudo não foi conclusiva, mas serve de base para uma optimização dos ensaios a realizar no futuro de modo a esclarecer melhor este assunto.

4.3. DCs maduras aderem menos a células tumorais do que DCs imaturas

As DCs podem adoptar vários fenótipos conforme o ambiente celular a que estão expostas, nomeadamente diversos perfis de expressão de receptores e/ou moléculas de adesão. Sabe-se que a maturação das DCs com LPS altera a expressão de receptores na sua superfície celular. Mais especificamente, a maturação das DCs com LPS regula negativamente a expressão de vários receptores da família “*C-type lectins*” (CLR), como DC-SIGN, MR e MGL (Engering *et al.*, 2002 e van Vliet *et al.*, 2006), e da família das Siglecs, como Siglec-7 e Siglec-9 (Lock *et al.*, 2004). O estímulo das DCs com LPS altera, também, a expressão de receptores “Toll-Like” (TLRs), nomeadamente a expressão de TLR-2 aumenta e a expressão de TLR-4 diminui durante a maturação das DCs (Tsujimoto *et al.*, 2006).

Por outro lado, as moléculas de adesão envolvidas na interacção entre DCs e linfócitos T aumentam a sua expressão durante a maturação das DCs, enquanto as estruturas de adesão a matrizes extracelulares diminuem de modo a facilitar a migração das DCs maduras para os nódulos linfáticos (O’Neill *et al.*, 2004).

Assim, os resultados obtidos neste trabalho, que mostraram que a percentagem de DCs previamente maturadas com LPS que aderiram às células tumorais diminuiu, comparativamente às DCs imaturas, estão de acordo com os estudos anteriores que descrevem que, durante a maturação, há diminuição da expressão de vários receptores envolvidos no reconhecimento de estruturas glicosídicas (van Vliet *et al.*, 2006) e de moléculas de adesão.

Por exemplo, Saeland e colaboradores (2007) verificaram que a expressão do receptor MGL presente em DCs diminuía durante a maturação e, conseqüentemente, a % de adesão entre DCs e o glicoconjugado MUC1-Tn era menor.

No caso da interacção das DCs com as linhas MCR, pode-se pensar que a expressão do(s) receptor(es) e/ou moléculas de adesão envolvidos no reconhecimento e adesão entre as DCs e as linhas celulares $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$ também diminuem durante o processo de maturação das DCs. Para além disso, como se verifica uma tendência para as DCs previamente maturadas aderirem mais a $MCR_{pLenti.transd}$ do que $MCR_{pLenti.ST6GN1}$, supõe-se que os receptores e/ou moléculas de adesão que reconhecem os antigénios presentes em $MCR_{pLenti.ST6GN1}$, nomeadamente o antigénio sTn, são menos expressos, em DCs maduras, do que os que reconhecem os outros antigénios presentes em $MCR_{pLenti.transd}$. Se se considerar que os receptores Siglec estão descritos pela sua especificidade para estruturas sialiladas, nomeadamente sTn (Brinkman-Van der Linden e Varki, 2000) e que a sua expressão em DCs é diminuída com a maturação destas, poder-se-á dizer que estes dados relativos às DCs maturadas corroboram a hipótese de que a interacção DCs com as células tumorais que expressam sTn é mediada por receptores tipo Siglec.

Por outro lado, após contacto com as linhas $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e $MCR_{pLenti.transd}$, verificou-se que as DCs previamente maturadas com LPS, apresentavam ainda um fenótipo mais maduro do que antes do contacto com as MCR, significando isto, que mesmo após o estímulo com LPS, as DCs quando cultivadas em co-cultura com as células tumorais ainda conseguem aumentar o seu perfil de maturação. Comparando as DCs maturada com LPS que aderiram a $MCR_{pLenti.transd}$ e a $MCR_{pLenti.ST6GN1}$, parece que as primeiras apresentaram um fenótipo mais maduro do que as segundas, o que coincide com os resultados obtidos com as DCs imaturas. Conclui-se com estes dados que, mesmo quando as DCs já estão previamente maturadas por um outro estímulo, diferentes células tumorais influenciam o incremento nesse estado de maturação de modo distinto, consoante o tipo de antigénios expressos.

4.4. Células apoptóticas $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ são mais fagocitadas por DCs do que as $MCR_{pLenti.transd}$

Os resultados referentes à fagocitose das linhas celulares apoptóticas pelas DCs poderão ser interpretados do ponto de vista de metodologia empregue para obtenção de vacinas contra o cancro ou do ponto de vista fisiológico.

Relativamente ao primeiro aspecto, a imunoterapia baseada em DCs está a ser desenvolvida como uma nova forma de vacinação contra o cancro. As DCs têm o potencial de capturar antígenos tumorais e apresentá-los a linfócitos T auxiliares e citotóxicos (Goldszmid *et al.*, 2003). Assim, dadas estas propriedades únicas e a facilidade com que nos dias de hoje se podem gerar DCs *in vitro* para estimular linfócitos T, não é de surpreender que diferentes protocolos clínicos baseados em DCs estejam a ser amplamente explorados e contra inúmeros tipos de cancro (Delirezh *et al.*, 2009). No entanto, a capacidade de captura de diferentes antígenos tumorais pelas DCs e o despoletar da sua imunogenicidade requerem ainda muita investigação, de modo a melhorar a eficácia destas vacinas anti-cancro. Nomeadamente, ainda não foi encontrada a melhor estratégia para a internalização de antígenos tumorais pelas DCs e, conseqüente, apresentação destes. Já foram testadas diversas técnicas, com sucesso relativo, como o uso de péptidos tumorais, lisados celulares e células tumorais apoptóticas ou necróticas, que quando adicionados às DCs, permitem a uma internalização eficiente de antígenos tumorais e activação das DCs (Saeland *et al.*, 2007).

Estudos anteriores demonstraram que diferentes modos de induzir morte nas células tumorais nomeadamente apoptose, necrose, e fusão (técnica que utiliza a transfecção da célula tumoral com uma membrana fusogénica, que leva à morte por fusão de várias células, resultando numa grande sincício multinucleado), não apresentaram diferenças no modo como influenciavam a capacidade para as DCs capturarem os antígenos tumorais, activarem factores de transcrição, produzirem citocinas pró-inflamatórias e estimularem os linfócitos T (Larmonier *et al.*, 2006). No entanto, a maioria dos protocolos desenvolvidos utiliza células tumorais apoptóticas como fonte de antígenos a serem internalizados pelas DCs (Henry *et al.*, 1999, Jenne *et al.*, 2000, Feng *et al.*, 2002, Goldszmid *et al.*, 2003, Kokhaei *et al.*, 2003, Ebstein *et al.*, 2004, e Delirezh *et al.*, 2009).

Neste estudo, foram também utilizadas células de cancro de bexiga apoptóticas para estudar a capacidade de fagocitose das DCs e avaliar de que modo o antígeno sTn influenciava este processo.

Como a percentagem de DCs que fagocitaram as células MCR_{pLenti.ST6GN1} foi maior do que a de DCs que fagocitaram as MCR_{pLenti.transd}, sugere-se que a presença de antígeno sTn nas células apoptóticas promove a fagocitose.

Fisiologicamente, a morte das células tumorais é um processo inerente ao próprio desenvolvimento tumoral. Esta pode ocorrer por diversos mecanismos desencadeados pelo

sistema imunitário, mas também por privação de nutrientes (Fonseca e Dranoff, 2008.). As células tumorais apoptóticas desencadeiam por seu turno uma série de eventos imunológicos, incluindo a sua fagocitose por macrófagos e DCs.

Relativamente aos resultados obtidos, está descrito de facto, que as DCs menos maduras (neste caso, as DCs que aderem a células tumorais que expressam sTn) apresentam maior capacidade fagocítica (O'Neill *et al.*, 2004) e maior afinidade para com células tumorais. Além disso, está também descrito que as DCs tolerogénicas têm não só um menor grau de maturação, mas também maior capacidade fagocítica, o que pode sugerir, uma vez mais, a correlação entre a presença de sTn em células tumorais e a indução de tolerância em DCs.

Uma vez que a fagocitose de células apoptóticas é um processo mediado por receptor, também neste caso se pode pensar que nas DCs estão presentes mais receptores (eventualmente receptores da família das Siglecs ou outros) com maior afinidade para o antígeno sTn, do que para outros mais expressos pelas células MCR_{pLenti.transd}, favorecendo o reconhecimento e a captura de corpos apoptóticos resultantes da linha celular MCR_{pLenti.ST6GN1}.

Por outro lado, após a fagocitose, o estado de maturação das DCs que fagocitaram células apoptóticas de ambas as linhas MCR é equivalente, o que indica que, uma vez internalizados os corpos apoptóticos, o estado de maturação atingido pelas DCs e, provavelmente, a sua capacidade imunoestimulatória é idêntica.

Assim, embora fisiologicamente, a maturação das DCs na presença de células tumorais que expressam antígenos sTn seja inibida comparativamente a células que não expressam este antígeno, quando as células tumorais se encontram apoptóticas, a presença de sTn só parece influenciar a capacidade fagocítica das DCs, não afectando o estado de maturação pós fagocitose.

As funções do sTn que estes resultados sugerem são, especialmente, relevantes tendo em conta a investigação a ser desenvolvida em torno da imunoterapia com base em DCs. Se, por um lado, as células tumorais que expressam o antígeno sTn parecem conseguir escapar mais eficazmente a uma resposta efectora do sistema imunitário, como é sugerido pelo facto das DCs que aderiram a estas células terem um perfil relativamente menos imunogénico, por outro lado, a indução de apoptose nas células que expressam sTn conduziu a um aumento no número de DCs que as fagocitaram (não afectando a indução da maturação). Esta situação

sugere uma vantagem na utilização de protocolos de imunoterapia utilizando DCs para estimular o sistema imunitário a combater tipos de cancro que apresentem a particularidade de expressar antígenos sTn.

4.5. $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ é mais susceptível ao agente Camptotecina do que $MCR_{pLenti.transd}$

Como a alteração de estruturas glicosiladas à superfície celular influencia inúmeros processos biológicos, como interacções entre células, migração, diferenciação e proliferação celular (Saxon e Bertozzi, 2001), poderá também influenciar a susceptibilidade a agentes anti-tumorais, nomeadamente ao agente camptotecina.

Estudos anteriores evidenciam que a presença de estruturas sialiladas, nomeadamente MUC1 e integrina β sialiladas, tornam as células tumorais mais resistentes à apoptose (Zhuo, *et al.*, 2008 e Tamada *et al.*, 2007). Contudo, verificou-se que as células de cancro de bexiga que expressam antígeno sTn, $MCR_{pLenti.ST6GN1}$, são mais susceptíveis ao agente anti-tumoral camptotecina do que as células que não expressam sTn, $MCR_{pLenti.transd}$. Neste caso, a sobreexpressão da enzima ST6GalNAcI, quer pelo aumento do fardo metabólico, quer pela indução da expressão de antígenos sTn na superfície das células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ influenciam negativamente a resistência das células a este agente anti-tumoral.

Apesar de serem necessários outros tipos de estudos para esclarecer este fenómeno, estes resultados poderão ser úteis no desenvolvimento de terapias contra células tumorais que expressam antígenos sTn, principalmente numa terapia conjunta, utilizando um agente químico com acção semelhante ao agente camptotecina e vacinas de DCs, as quais irão apresentar antígenos tumorais.

4.6. Perspectivas futuras

Os ensaios realizados durante o tempo possível para a produção desta tese permitiram na sua maioria tirar algumas conclusões relevantes sobre o possível papel do antígeno sTn expresso na superfície de células tumorais na interacção com a DC. Alguns dados embora pouco conclusivos, sugeriram pistas para prosseguir com estudos mais aprofundados num futuro próximo.

Por exemplo, de modo a comprovar que a presença de antígeno sTn na superfície celular é o factor responsável pelas diferenças observadas nos ensaios de adesão entre DCs e células tumorais, nomeadamente ao nível da inibição da maturação, idealizaram-se alguns

ensaios de adesão adicionais. Por exemplo, na presença de anticorpos bloqueantes (anti-sTn, anti- proteínas portadoras de sTn ou anti-Siglec), ou com células tumorais tratadas com uma sialidase diferente da utilizada neste trabalho, especificamente uma que clive unicamente O-glicanos, de modo a que este tratamento afecte uma menor quantidade de glicoconjugados, comparativamente ao ensaio realizado nesta tese, ou ainda, na presença de agentes inibitórios do tráfego molecular intracelular que impeçam a reposição das estruturas sialiladas durante o tempo de duração do ensaio.

Adicionalmente, realizar-se-ão estudos de expressão de citocinas pelas DCs quando estas se encontram em contacto com as células tumorais, assim como se prosseguirá com o estudo para determinar quais os possíveis “portadores” de antígeno sTn na superfície das células tumorais de bexiga e dos receptores e/ou moléculas de adesão, presentes nas DCs, que estão envolvidos no reconhecimento das estruturas de antígeno sTn.

Por outro lado, a percentagem de DCs que fagocitaram células tumorais MCR terá de ser comprovada utilizando microscopia confocal. E, por fim, serão também realizados ensaios para avaliar a resposta dos linfócitos T, quando activados com as DCs que fagocitaram as células apoptóticas $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ ou $MCR_{pLenti.transd}$, especificamente será estudada a proliferação dos vários sub-tipos de linfócitos T (citotóxicos, auxiliares e reguladores) e/ou as citocinas produzidas por estas células (como por ex. o interferão gama).

4.7. Conclusões gerais

A presença de antígeno sTn na superfície de células tumorais influencia a resposta das DCs a estas células, particularmente a nível da adesão e maturação (contacto das DCs com as células tumorais vivas) e a nível da fagocitose de células tumorais apoptóticas. De facto, as DCs apresentaram uma tendência para aderirem em maior proporção a células tumorais que apresentam antígenos sTn na sua superfície, nomeadamente $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e MDA-MB-231 STn, comparativamente a células tumorais que não expressam antígenos sTn, $MCR_{pLenti.transd}$ e MDA-MB-231 EV. Apesar de as DCs manifestarem esta tendência para aderir mais a $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e MDA-MB-231 STn, o grau de maturação das DCs aderidas a estas células, tendo em conta o nível de expressão de moléculas apresentadoras de antígenos e co-estimulatórias, foi significativamente menor do que o apresentado pelas DCs aderidas a $MCR_{pLenti.transd}$ e MDA-MB-231 EV. Portanto, o antígeno sTn parece desempenhar uma possível função protectora das células tumorais, impedindo que as DCs madurem completamente, promovendo, possivelmente, uma maior tolerância ao tumor. No entanto,

ensaios de adesão mais específicos, como os referidos anteriormente, terão ainda de ser realizados para completar este estudo e confirmar se as diferenças observadas com as variantes celulares estudadas se devem, de facto, à presença do antígeno sTn.

Relativamente à fagocitose de células de cancro de bexiga apoptóticas pelas DCs, verificou-se que a presença de antígeno sTn promove a fagocitose, o que suporta a hipótese de que as DCs em contacto com células tumorais expressando estes antígenos são mais imaturas e potencialmente tolerogénicas. Estes dados e o facto de as DCs após fagocitose, atingirem um nível de maturação independente do fenótipo sTn da célula tumoral fagocitada, sugerem que protocolos de imunoterapia com DCs poderiam ser aplicados a tumores com elevada expressão de sTn potencialmente com sucesso. Para além disso, também se observou que as células que expressam antígenos sTn são mais susceptíveis ao agente anti-cancerígeno camptotecina, o que sugere que os doentes com tumores, nos quais o antígeno sTn está abundantemente expresso (como cancro de bexiga, de mama, entre outros), poderiam tirar vantagem do desenho de quimio-imunoterapias combinadas, com agentes apoptóticos de acção semelhante à camptotecina e DCs (Fig. 4.1).

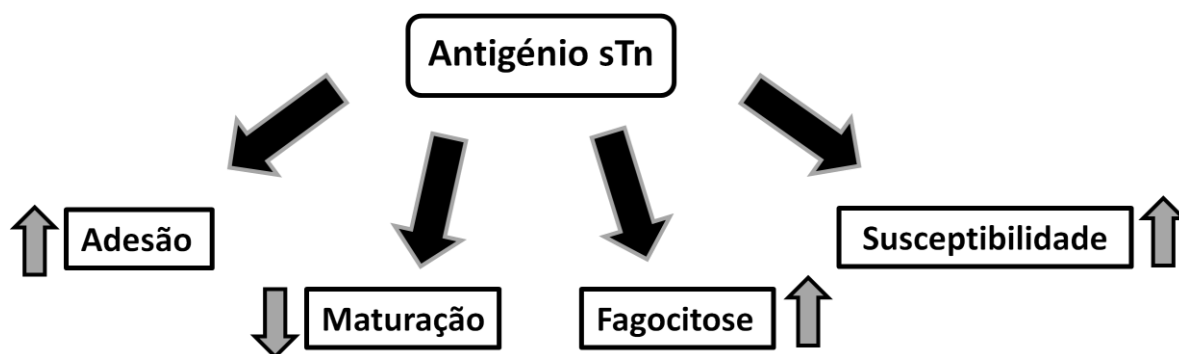


Figura 4.1 – Esquema representativo das principais conclusões apresentadas nesta dissertação, ou seja, a presença de antígeno sTn à superfície de células de cancro de bexiga favorece a adesão destas células a DCs, impede o desenvolvimento da maturação das DCs aderidas a estas células de cancro de bexiga, promove a fagocitose destas células de cancro, quando se encontram apoptóticas, pelas DCs e aumenta a susceptibilidade destas células de cancro a agentes químicos, como a Camptotecina.

Como conclusão geral, apesar de se ter em conta que alguns assuntos relacionados com este estudo ainda requerem ser mais aprofundados, pode-se adiantar que o antígeno sTn parece ter um papel na interação com as DCs. Por um lado, do ponto de vista fisiológico, a presença de sTn no tumor sugere um pior prognóstico para o doente, já que parece estar relacionado com uma maior tolerância imune; por outro lado, se se pensar em termos de terapia, talvez a presença de sTn no tumor possa ser uma vantagem, favorecendo o sucesso de uma combinação quimio-imunoterapia.

5. Bibliografia

- Aarnoudse, C. A., García-Vallejo, J. J., Saeland, E. e van Kooyk, Y. 2006. Recognition of tumor glycans by antigen-presenting cells. *Current Opinion in Immunology* 18: 105-111
- Abbas, A. K. e Lichtman, A. 2004. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*, 2^a ed., Saunders
- Abbas, A. K. e Lichtman, A. 2005. *Cellular and Molecular Immunology*, 5^a ed., Saunders
- Adema, G. J. 2009. Dendritic cells from bench to bedside and back. *Immunology Letters* 122: 128-130
- Amado, I. 2007. Sialylated antigens: Modulation of the expression in bladder cancer cell lines and profile analysis of dendritic cells. Tese de Licenciatura. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
- Angata, T., Hayakawa, T., Yamanaka, M., Varki, A. e Nakamura, M. 2006. Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates. *The FASEB Journal* 20(12): 1964-1973
- Angata, T., Tabuchi, Y., Nakamura, K. e Nakamura, M. 2007. Siglec-15: an immune system Siglec conserved throughout vertebrate evolution. *Glycobiology* 17(8): 828-846
- Bax, M., García-Vallejo, J. J., Jang-Lee, J., North, S. J., Gilmartin, T. J., Hernández, G., Crocker, P. R., Leffler, H., Head, S. R., Haslam, S. M., Dell, A. e van Kooyk, Y. 2007. Dendritic Cell Maturation Results in Pronounced Changes in Glycan Expression Affecting Recognition by Siglecs and Galectins. *The Journal of Immunology* 179: 8216-8224
- BD Biosciences. 2000. *Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide. Manual* Part Number: 11-11032-01. Becton, Dickinson and Company
- Bennaceur, K., Chapman, J.A., Touraine, J.L. e Portoukalian, J. 2009. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their effect in dendritic cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1795(1): 16-24
- Bettahi, I., Dasgupta, G., Renaudet, O., Chentoufi, A. A., Zhang, X., Carpenter, D., Yoon, S., Dumy, P. e BenMohamed, L. 2009. Antitumor activity of a self-adjuvanting

- glyco-lipopeptide vaccine bearing B cell, CD4+ and CD8+ T cell epitopes. *Cancer Immunol Immunother* 58: 187–200
- Brinkman-Van der Linden, E. C. e Varki, A. 2000. New Aspects of Siglec Binding Specificities, Including the Significance of Fucosylation and of the Sialyl-Tn Epitope. *The Journal of Biological Chemistry* 275(12): 8625-8632
 - Brocke, C. e Kunz, H. 2002. Synthesis of Tumor-Associated Glycopeptide Antigens. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 10: 3085-3112
 - Brockhausen, I., Yang, J., Lehotay, M., Ogata, S. e Itzkowitz, S. 2001. Pathways of mucin O-glycosylation in normal and malignant rat colonic epithelial cells reveal a mechanism for cancer-associated Sialyl-Tn antigen expression. *Biological Chemistry* 382: 219-232
 - Cabral, M. G., Piteira, A. R., Silva, Z., Ligeiro, D., Brossmerc, R. e Videira, P. A. 2010. Human dendritic cells contain cell surface sialyltransferase activity. *Immunology Letters* 131: 89–96
 - Cailleau, R., Young, R., Olivé, M. e Reeves W. J. Jr. 1974. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute* 53: 661-674
 - Campbell, C. T. e Yarema, K. J. 2005. Large-scale approaches for glycobiology. *Genome Biology* 6: 236.
 - Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Krzewinski-Recchi, M.-A., Harduin-Lepers, A., Groux-Degroote, S. e Delannoy, P. 2010. Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. *Carbohydrate Research* 345: 1377–1383
 - Celia, M., Sallusto, F. e Lanzavecchia, A. 1997. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Immunology* 9: 10-16
 - Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J. e Lanzavecchia, A. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388: 782-787
 - Corfield, A. P., Myerscough, N., Warren, B. F., Durdey, P., Paraskeva, C. e Schauer, R. 1999. Reduction of sialic acid O-acetylation in human colonic mucins in the adenoma-carcinoma sequence. *Glycoconjugate Journal* 16: 307-317
 - Cox, G. 2002. Biological confocal microscopy. *Materials Today* 5: 34-41
 - Crocker, P. R. e Redelinghuys, P. 2008. Siglecs as positive and negative regulators of the immune system. *Biochemical Society Transactions* 36: 1467-1471

- Crocker, P. R. e Varki, A. 2001. Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends in Immunology* 22(6): 337-342
- Dall'Olio, F. 1996. Protein glycosylation in cancer biology: an overview. *Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology* 49: 126-135
- Dall'Olio, F. e Chiricolo M. 2001. Sialyltransferases in cancer. *Glycoconjugate Journal* 18: 841–850
- Delirezh, N., Moazzeni, S. M., Shokri, F., Shokrgozar, M. A., Atri, M. e Kokhaei, P. 2009. Autologous dendritic cells loaded with apoptotic tumor cells induce T cell-mediated immune responses against breast cancer in vitro. *Cellular Immunology* 257: 23-31
- Dhodapkar, M. V., Dhodapkar, K. M. e Palucka, A. K. 2008. Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance. *Cell Death and Differentiation* 15:39-50
- Ebstein, F., Sapede, C., Royer, P.-J., Marcq, M., Ligeza-Poisson, C., Barbieux, I., Cellerin, L., Dabouis, G. e Grégoire, M. 2004. Cytotoxic T Cell Responses against Mesothelioma by Apoptotic Cell-pulsed Dendritic Cells. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 169: 1322-1330
- Engering, A., Geijtenbeek, T. B. H., van Vliet, S. J., Wijers, M., van Liempt, E., Demareux, N., Lanzavecchia, A., Fransen, J., Figdor, C. G., Piguet, V. e van Kooyk, Y. 2002. The Dendritic Cell-Specific Adhesion Receptor DC-SIGN Internalizes Antigen for Presentation to T Cells. *The Journal of Immunology* 168: 2118-2126
- Fabbri, F., Briigliadori, G., Ulivi, P., Tesei, A., Vannini, I., Rosetti, M., Bravaccini, S., Amadori, D., Bolla, M. e Zoli, W. 2005. Pro-apoptotic effect of a nitric oxide-donating NSAID, NCX 4040, on bladder carcinoma cells. *Apoptosis* 10: 1095-1103
- Fearon, D. T. e Locksley, R. M. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response *Science* 272: 50-54
- Feng, H., Zeng, Y., Graner, M. W. e Katsanis, E. 2002. Stressed apoptotic tumor cells stimulate dendritic cells and induce specific cytotoxic T cells. *Blood* 100(12): 4108-4115
- Figdor, C. G., de Vries, I. J. M., Lesterhuis, W. J. e Melief, C. J. M. 2004. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nature Medicine* 19(5): 475-480
- Flajnik, M. F. e Kasahara, M. 2001. Comparative genomics of the MHC: glimpses into the evolution of the adaptive immune system. *Immunity* 15: 351–362

- Fonseca, C. e Dranoff, G. 2008. Capitalizing on the immunogenicity of dying tumor cells. *Clinical Cancer Research* 14(6): 1603-1608
- Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O. e Samali, A. 2010. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. *International Journal of Cell Biology* 2010: 1-23
- Gao, J.-Q., Okada, N., Mayumi, T. e Nakagawa, S. 2008. Immune cell recruitment and cell-based system for cancer therapy. *Pharmaceutical Research* 25(4): 752-768
- Gill, D. F., Chia, J., Senewiratne, J. e Bard, F. 2010. Regulation of O-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes. *The Journal of Cell Biology* 189(5): 843-858
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A. e Kuby, J. I. 2000. *Kuby Immunology*, 4^aed., W.H. Freeman & Company
- Goldszmid, R. S., Idoyaga, J., Bravo, A. I., Steinman, R., Mordoh, J. e Wainstok, R. 2003. Dendritic Cells Charged with Apoptotic Tumor Cells Induce Long-Lived Protective CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Immunity against B16 Melanoma. *The Journal of Immunology* 171: 5840-5947
- Gross, H. J., Merling, A., Moldenhauer, G. e Schwartz-Albiez, R. 1996. Ecto-sialyltransferase of human B lymphocytes reconstitutes differentiation markers in the presence of exogenous CMP-N-Acetyl neuraminic acid. *Blood* 87: 5113-5126
- Hakomori, S. 2001. Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 491: 369-402
- Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M.-A., Samyn-Petit, B., Julien, S. e Delannoy, P. 2001. The human sialyltransferase family. *Biochimie* 83: 727-737
- Heidlask, J. E., Williams, K. W. e Whitesides, G. M. 1992. Nucleoside phosphate sugars: syntheses on practical scales for use as reagents in the enzymatic preparation of oligosaccharides and glycoconjugates. *Accounts of Chemical Research* 25: 307-314
- Henry, F., Boisteau, O., Bretaudeau, L., Lieubeau, B., Meflah, K. e Grégoire, M. 1999. Antigen-presenting cells that phagocytose apoptotic tumor-derived cells are potent tumor vaccines. *Cancer Research* 59: 3329-3332
- Ikehara, Y., Kojima, N., Kurosawa, N., Kudo, T., Kono, M., Nishihara, S., Issiki, S., Morozumi, K., Itzkowitz, S., Tsuda, T., Nishimura, S.-I., Tsuji S. e Narimatsu, H. 1999. Cloning and expression of a human gene encoding an *N*-acetylgalactosamine-

- α 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I): a candidate for synthesis of cancer-associated sialyl-Tn antigens. *Glycobiology* 9(11): 1213-1224
- Irazoqui, F. J., Sendra, V. G., Lardone, R. D. e Nores, G. A. 2005. Immune response to Thomsen-Friedenreich disaccharide and glycan engineering. *Immunology and Cell Biology* 83: 405-412
 - Jenne, L., Arrighi, J.-F., Jonuleit, H., Saurat, J.-H. e Hauser, C. 2000. Dendritic cells containing apoptotic melanoma cells prime human CD81 T cells for efficient tumor cell lysis. *Cancer Research* 60: 4446-4452
 - Julien, S., Adriaenssens, E., Ottenberg, K., Furlan, A., Courtand, G., Vercoutter-Edouart, A. S., Hanisch, F. G., Delannoy, P. e Le Bourhis, X. 2006. ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity. *Glycobiology* 16(1): 54-64
 - Julien, S., Krzewinski-Recchi, M.-A., Harduin-Lepers, A., Gouyer, V., Huet, G., Le Bourhis, X. e Delannoy, P. 2001. Expression of Sialyl-Tn antigen in breast cancer cells transfected with the human CMP-Neu5Ac:GalNAc α 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I) cDNA. *Glycoconjugate Journal* 18: 883–893
 - Julien, S., Lagadec, C., Krzewinski-Recchi, M.-A., Courtand, G., Le Bourhis, X. e Delannoy P. 2005. Stable expression of sialyl-Tn antigen in T47-D cells induces a decrease of cell adhesion and an increase of cell migration. *Breast Cancer Research and Treatment* 90: 77–84
 - Keller, R. 2001. Dendritic cells: their significance in health and disease. *Immunology Letters* 78: 113–122
 - Khong, H. T. e Restifo, N. P. 2002. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nature Immunology* 3: 999–1005
 - Köhl, J. 2006. Self, non-self, and danger: a complementary view. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 586: 71-94
 - Kokhaei, P., Rezvany, M. R., Virving, L., Choudhury, A., Rabbani, H., Österborg, A. e Mellstedt, H. 2003. Dendritic cells loaded with apoptotic tumour cells induce a stronger T-cell response than dendritic cell–tumour hybrids in B-CLL. *Leukemia* 17: 894-899
 - Kornfeld, R. e Kornfeld, S. 1985. Assembly of asparagines-linked oligosaccharides. *Annual Review of Biochemistry* 54: 631-664

- Larmonier, N., Mérino, D., Nicolas, A., Cathelin, D., Besson, A., Bateman, A., Solary, E., Martin, F., Katsanis, E. e Bonnotte, B. 2006. Apoptotic, necrotic, or fused tumor cells: An equivalent source of antigen for dendritic cell loading. *Apoptosis* 11: 1513-1524
- Lina, A., Schildknechta, A., Nguyena, L. T. e Ohashia, P. S. 2010. Dendritic cells integrate signals from the tumor microenvironment to modulate immunity and tumor growth. *Immunology Letters* 127: 77-84
- Liotta, L. A. e Kohn, E. C. 2001. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411(6835): 375-379
- Liu, K. e Nussenzweig, M. C. 2010. Origin and development of dendritic cells. *Immunological Reviews* 234(1): 45-54
- Liu, Y. e Schubert, D. 1997. Cytotoxic Amyloid Peptides Inhibit Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction by enhancing MTT Formazan exocytosis. *Journal of Neurochemistry* 69: 2285-2293
- Lock, K., Zhang, J., Lu, J., Leeb, S. H. e Crocker, P. R. 2004. Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology* 209: 199-207
- MacLean, G. D., Reddish, M., Koganty, R. R., Wong, T., Gandhi, S., Smolenski, M., Samuel, J., Nabholtzl, J. M. e Longenecker, B. M. 1993. Immunization of breast cancer patients using a synthetic sialyl-Tn glycoconjugate plus Detox adjuvant. *Cancer Immunol Immunother* 36: 215-22
- Marcos, N. T., Cruz, A., Silva, F., Almeida, R., David, L., Mandel, U., Clausen, H., von Mensdorff-Pouilly, S. e Reis, C. A. 2003. Polypeptide GalNAc-transferases, ST6GalNAc-transferase I, and ST3Gal-transferase I expression in gastric carcinoma cell lines. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 51(6): 761-771
- Marcos, N. T., Pinho, S., Grandela, C., Cruz, A., Samyn-Petit, B., Harduin-Lepers, A., Almeida, R., Silva, F., Morais, V., Costa, J., Kihlberg, J., Clausen, H. e Reis, C. A. 2004. Role of the human ST6GalNAc-I and ST6GalNAc-II in the synthesis of the cancer-associated sialyl-Tn antigen. *Cancer Research* 64: 7050-7057
- Medzhitov, R. e Janeway Jr, C. A. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current Opinion in Immunology* 9: 4-9
- Medzhitov R. e Janeway Jr, C. A. 1997. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91: 295-298

- Melief, C. J. 2008. Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity* 29(3): 372-383
- Mortensen, B. e Huseby, N.-E. 1997. Clearance of circulating γ -glutamyltransferase by the asialoglycoprotein receptor. Enzyme forms with different sialic acid content are eliminated at different clearance rates and without apparent desialylation. *Clinica Chimica Acta* 258: 47-58
- Nakahashi, A., Taniguchi, T., Miura, N. e Monde, K. 2007. Stereochemical studies of sialic acid derivatives by vibrational circular dichroism. *Organic Letters* 9(23): 4741-4744
- Napoletano, C., Rughetti, A., Tarp, M. P. A., Coleman, J., Bennett, E. P., Picco, G., Sale, P., Denda-Nagai, K., Irimura, T., Mandel, U., Clausen, H., Frati, L., Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, J. e Nuti, M. 2007. Tumor-associated Tn-MUC1 glycoform is internalized through the macrophage galactose-type C-type lectin and delivered to the HLA class I and II compartments in dendritic cells. *Cancer Research* 67(17): 8358-8367
- Nishikawa, H. e Sakaguchi, S. 2010. Regulatory T cells in tumor immunity. *International Journal of Cancer* 127: 759-767
- Nonaka, M., Ma, B. Y., Murai, R., Nakamura, N., Baba, M., Kawasaki, N., Hodohara, K., Asano, S. e Kawasaki, K. 2008. Glycosylation-dependent interactions of C-type lectin DC-SIGN with colorectal tumor-associated Lewis glycans impair the function and differentiation of monocyte-derived dendritic cells. *The Journal of Immunology* 180: 3347-3356
- O'Neill, D. W., Adams, S. e Bhardwaj, N. 2004. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood* 104 (8): 2235-2246
- Palucka, K. e Banchereau, J. 1999. Dendritic Cells: A link between innate and adaptive immunity. *Journal of Clinical Immunology* 19(1): 12-25
- Patel, N., Brinkman-Van der Linden, E. C., Altmann, S. W., Gish, K., Balasubramanian, S., Timans, J. C., Peterson, D., Bell, M. P., Bazan, J. F., Varki, A. e Kastelein, R. A. 1999. OB-BP1/Siglec-6: a leptin- and sialic acid-binding protein of the immunoglobulin superfamily. *The Journal of Biological Chemistry* 274(32): 22729-22738

- Paul, S. P., Taylor, L. S., Stansbury, E. K. e McVicar, D. W. 2000. Myeloid specific human CD33 is an inhibitory receptor with differential ITIM function in recruiting the phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Blood* 96: 483–490
- Pinho, S., Marcos, N. T., Ferreira, B., Carvalho, A. S., Oliveira, M. J., Santos-Silva, F., Harduin-Lepers, A. e Reis, C. A. 2007. Biological significance of cancer-associated sialyl-Tn antigen: Modulation of malignant phenotype in gastric carcinoma cells. *Cancer Letters* 249: 157–170
- Powell, L. D., Whiteheart, S. W. e Hart, G. W. 1987. Cell surface sialic acid influences tumor cell recognition in the mixed lymphocyte reaction. *The Journal of Immunology* 139: 262-270
- Reis, C. A., Osorio, H., Silva, L., Gomes, C. e David, L. 2010. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *Journal of Clinical Pathology* 63: 322-329
- Robinson, J. 2004. Flow Cytometry. In *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* (G. L. Bowlin; G. Wnek), pp. 630-640, Informa Healthcare
- Rughetti, A., Pellicciotta, I., Biffoni, M., Bäckström, M., Link, T., Bennet, E. P., Clausen, H., Noll, T., Hansson, G. C., Burchell, J. M., Frati, L., Taylor-Papadimitriou, J. e Nuti, M. 2005. Recombinant tumor-associated MUC1 glycoprotein impairs the differentiation and function of dendritic cells. *The Journal of Immunology* 174: 7764-7772
- Saeland, E., van Vliet, S. J., Bäckström, M., van den Berg, V. C., Geijtenbeek, T. B., Meijer, G. A. e van Kooyk, Y. 2007. The C-type lectin MGL expressed by dendritic cells detects glycan changes on MUC1 in colon carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 56: 1225-1236
- Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review of Immunology* 22: 531-562
- Savina, A. e Amigorena, S. 2007. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunological Reviews* 219: 143–156
- Saxon, E. e Bertozzi, C. R. 2001. Chemical and biological strategies for engineering cell surface glycosylation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17: 1-23

- Schauer, R. 2009. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Current Opinion in Structural Biology* 19: 507–514
- Sepulveda, V. A. T., Shen, X. e Falzon M. 2002. Intracrine PTHrP protects against serum starvation-induced apoptosis and regulates the cell cycle in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 143(2): 596-606
- Sewell, R., Bäckström, M., Dalziel, M., Gschmeissner, S., Karlsson, H., Noll, T., Gätgens, J., Clausen, H., Hansson, G. C., Burchell, J. e Taylor-Papadimitriou, J. 2006. The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer. *The Journal of Biological Chemistry* 281(6): 3586–3594
- Singh, S. K., Streng-Ouwehand, I., Litjens, M., Weelij, D. R., García-Vallejo, J. J., van Vliet, S. J., Saeland, E. e van Kooyk Y. 2009. Characterization of murine MGL1 and MGL2 C-type lectins: Distinct glycan specificities and tumor binding properties. *Molecular Immunology* 46: 1240-1249
- Soares, M. M., Mehta, V. e Finn, O. J. 2001. Three different vaccines based on the 140-amino acid MUC1 peptide with seven tandemly repeated tumor-specific epitopes elicit distinct immune effector mechanisms in wild-type versus MUC1-transgenic mice with different potential for tumor rejection. *The Journal of Immunology* 166: 6555–6563
- Steen, P. V., Rudd, P. M., Dwek, R. A. e Opdenakker, G. 1998. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 33(3): 151-208
- Steinman, R. M. e Banchereau, J. 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449(7161): 419-26
- Steinman, R. M. e Dhodapkar, M. 2001. Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future. *International Journal of Cancer* 94: 459-473
- Steinman, R. M. e Hemmi, H. 2006. Dendritic Cells: Translating Innate to Adaptive Immunity. *CTMI* 311: 17–58
- Swanson, B. J., McDermott, K. M., Singh, P. K., Eggers, J. P., Crocker, P. R. e Hollingsworth, M. A. 2007. MUC1 is a counter-receptor for myelin-associated glycoprotein (Siglec-4a) and their interaction contributes to adhesion in pancreatic cancer perineural invasion. *Cancer Research* 67(21): 10222-10229

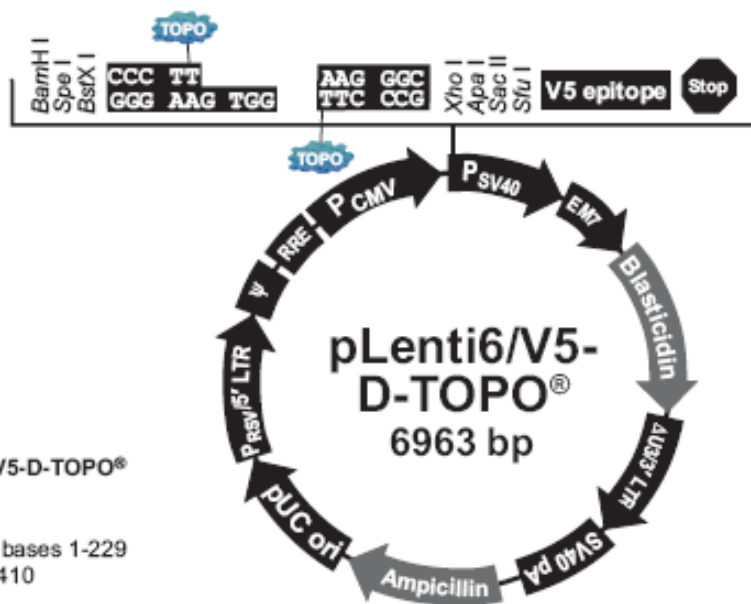
- Takeda, K., Kaisho, T. e Akira, S. 2003. Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology* 21: 335-376
- Tamada, Y., Takeuchi, H., Suzuki, N., Susumu, N., Aoki, D. e Irimura, T. 2007. Biological and therapeutic significance of MUC1 with sialoglycans in clear cell adenocarcinoma of the ovary. *Cancer Science* 98(10): 1586-1591
- Tanner, M. E. 2005. The enzymes of sialic acid biosynthesis. *Bioorganic Chemistry* 33: 216–228
- Trottein, F., Schaffer, L., Ivanov, S., Paget, C., Vendeville, C., Cazet, A., Groux-Degroote, S., Lee, S., Krzewinski-Recchi, M.A., Faveeuw, C., Head, S.R., Gosset, P. e Delannoy, P. 2009. Glycosyltransferase and sulfotransferase gene expression profiles in human monocytes, dendritic cells and macrophages. *Glycoconjugate Journal*
- Tsujimoto, H., Efron, P. A., Matsumoto, T., Ungaro, R. F., Abouhamze, A., Ono, S., Mochizuki, H. e Moldawer, L. L. 2006. Maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells with poly(I:C) produces altered TLR-9 expression and response to CpG DNA. *Immunology Letters* 107: 155-162
- Ulivi, P., Zoli, W., Fabbri, F., Brigliadori, G., Ricotti, L., Tesei, A., Rosetti, M., De Cesarey, M., Berettay, G. L., Cornay, E., Supinoy, R. e Zuninoy, F. 2005. Cellular basis of antiproliferative and antitumor activity of the novel camptothecin derivative, gimatecan, in bladder carcinoma models. *Neoplasia* 7(2): 152-161
- Vázquez-Martín, C., Cuevas, E., Gil-Martín, E. e Fernández-Briera, A. 2004. Correlation analysis between tumour associated antigen sialyl-Tn expression and ST6GalNAc I activity in human colon adenocarcinoma. *Oncology* 67: 159-165
- van Gisbergen, K. P., Aarnoudse, C. A., Meijer, G. A., Geijtenbeek, T. B. e van Kooyk, Y. 2005. Dendritic cells recognize tumor-specific glycosylation of carcinoembryonic antigen on colorectal cancer cells through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin. *Cancer Research* 65(13): 5935-5944
- van Vliet, S. J., van Liempt, E., Geijtenbeek, T. B. H. e van Kooyk, Y. 2006. Differential regulation of C-type lectin expression on tolerogenic dendritic cell subsets. *Immunobiology* 211: 577-585
- van Vliet, S. J., van Liempt, E., Saeland, E., Aarnoudse, C. A., Appelmelk, B., Irimura, T., Geijtenbeek, T. B. H., Blixt, O., Alvarez, R., van Die, I. e van Kooyk, Y. 2005. Carbohydrate profiling reveals a distinctive role for the C-type lectin MGL in

- the recognition of helminth parasites and tumor antigens by dendritic cells. *International Immunology* 17(5): 661-669
- Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W. e Etzler, M. E. 2009. *Essentials of Glycobiology*, 2^aed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
 - Videira, P. A., Amado, I. F., Correia, M., Calais da Silva, F. M., Calais da Silva, F., Dall'Olio, F., Ligeiro, D. e Trindade, H. 2007. Abnormal glycosylation related to bladder cancer: Assessment of its prognostic Value. *URO* 17
 - Videira, P.A., Correia, M., Malagolini, N., Crespo, H. J., Ligeiro, D., Calais, F. M., Trindade, H. e Dall'Olio, F. 2009. ST3Gal.I sialyltransferase relevance in bladder cancer tissues and cell lines. *BMC Cancer* 9(357): 1-15
 - Vlad, A. M. e Finn, O. J. 2004. Glycoprotein tumor antigens for immunotherapy of breast cancer. *Breast Disease* 20: 73-79
 - Vlad, A. M., Muller, S., Cudic, M., Paulsen, H., Otvos, L. Jr., Hanisch, F. G. e Finn, O. J. 2002. Complex carbohydrates are not removed during processing of glycoproteins by dendritic cells: processing of tumor antigen MUC1 glycopeptides for presentation to major histocompatibility complex class II-restricted T cells. *The Journal of Experimental Medicine* 196(11): 1435-1446
 - Wang, B., Springer, G. F. e Carlstedt, S. C. 1997. Quantitative Computerized Image Analysis of Tn and T (Thomsen–Friedenreich) Epitopes in Prognostication of Human Breast Carcinoma. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 45(10): 1393-1400
 - Wang, F., Goto, M., Kim, Y. S., Higashi, M., Imai, K., Sato, E. e Yonezawa, S. 2001. Altered GalNAc- α -2,6-sialylation Compartments for Mucin-associated Sialyl-Tn Antigen in Colorectal Adenoma and Adenocarcinoma. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 49(12): 1581–1591
 - Weijers, C. A., Franssen, M. C. e Visser, G. M. 2008. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnology Advances* 26: 436-456.
 - Zanoni, I. e Granucci, F. 2010. Regulation of antigen uptake, migration, and lifespan of dendritic cell by Toll-like receptors. *Journal of Molecular Medicine* 88(9): 873-880

Anexos

Anexo I

Plasmídeo pLenti6/V5-D-TOPO utilizado na transdução da linha celular MCR

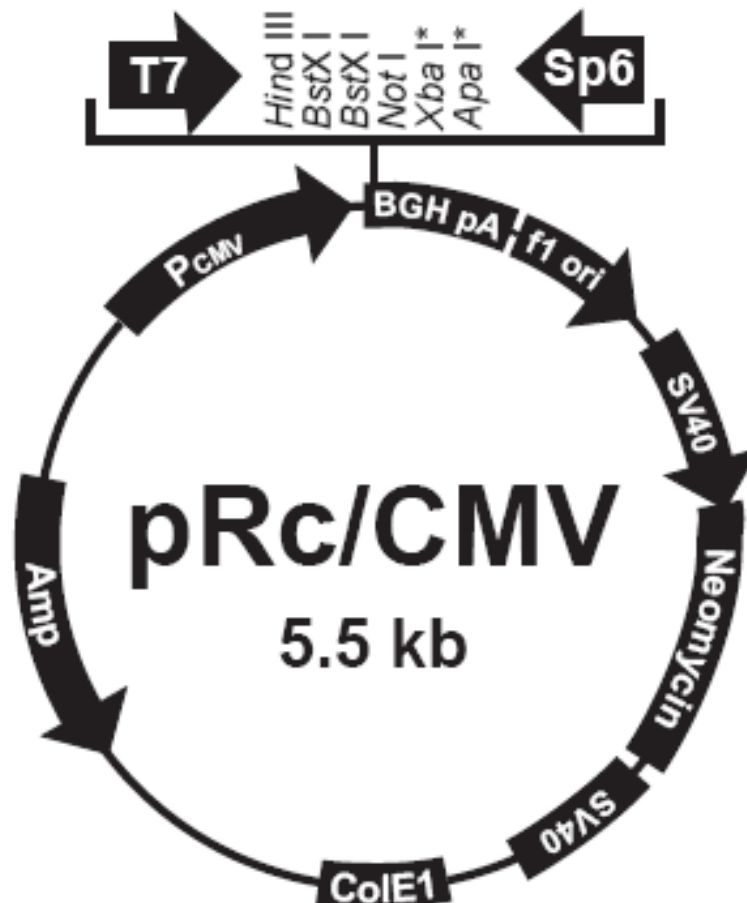


Comments for pLenti6/V5-D-TOPO®
6963 nucleotides

RSV enhancer/promoter: bases 1-229
HIV-1 5' LTR: bases 230-410
5' splice donor: base 520
HIV-1 psi (ψ) packaging sequence: bases 521-565
HIV-1 Rev response element (RRE): bases 1075-1308
3' splice acceptor: base 1656
3' splice acceptor: base 1684
CMV promoter: bases 1809-2392
CMV forward priming site: bases 2274-2294
Directional TOPO® site: bases 2431-2444
V5 epitope: bases 2473-2514
V5(C-term) reverse priming site: bases 2482-2502
SV40 early promoter and origin: bases 2569-2877
EM7 promoter: bases 2932-2998
Blasticidin resistance gene: bases 2999-3397
ΔU3/HIV-1 3' LTR: bases 3484-3717
 ΔU3: bases 3484-3536
 Truncated HIV-1 3' LTR: bases 3537-3717
SV40 polyadenylation signal: bases 3789-3920
b/a promoter: bases 4779-4877
Ampicillin (b/a) resistance gene: bases 4878-5738
pUC origin: bases 5883-6556

Anexo II

Plasmídeo pRc-CMV na transfecção da linha celular MDA-MB-231



Comments for pRc/CMV:
5542 nucleotides

CMV promoter: bases 209-864
T7 promoter: bases 865-883
Polylinker: bases 890-995
Sp6 promoter: bases 1008-1017
BGH poly A signal: bases 1019-1250
f1 origin: bases 1306-1828
SV40 Promoter: bases 1890-2215
SV40 origin of replication: bases 2084-2169
Neo ORF: bases 2251-3045
SV40 poly A: bases 3219-3348
ColE1 origin: bases 3728-4400
Ampicillin resistance gene: bases 5406-4546
(complementary strand)

* There is an ATG upstream of the Xba I site.

Anexo III

Constituição de soluções tampão utilizadas neste trabalho

Solução-tampão de fosfatos (PBS 1x):

Solução contendo 1.47mM KH_2PO_4 , 4.29mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 137mM NaCl e 2.68mM KCl (pH=7,3) em água destilada.

Tampão frio utilizado na separação de monócitos:

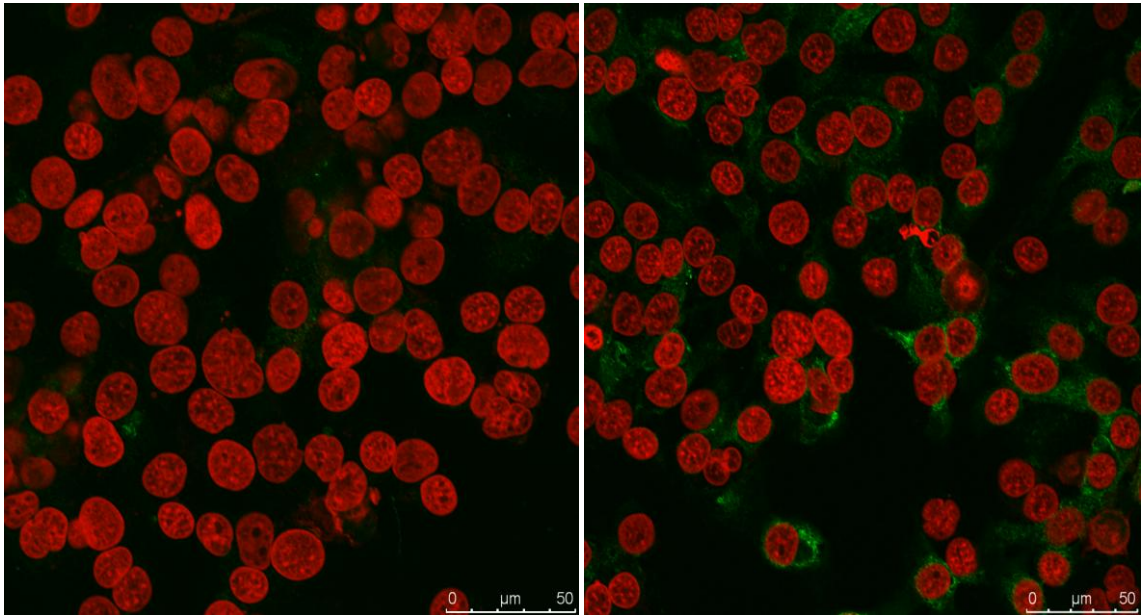
Solução com 0,5% de BSA e 2mM de EDTA numa solução-tampão de PBS 1x

Tampão de adesão utilizado nos vários ensaios de adesão:

Solução contendo 20mmol/L de *Trizma Hydrochloride* (Tris-HCl) (pH 8.0) (Sigma), 150mmol/L Cloreto de Sódio (NaCl), 1mmol/L Cloreto de Cálcio (CaCl_2), 1mmol/L Cloreto de Magnésio (MgCl_2) e 0,5% Albumina de Soro Bovino (BSA) (van Gisbergen *et al.*, 2005).

Anexo IV

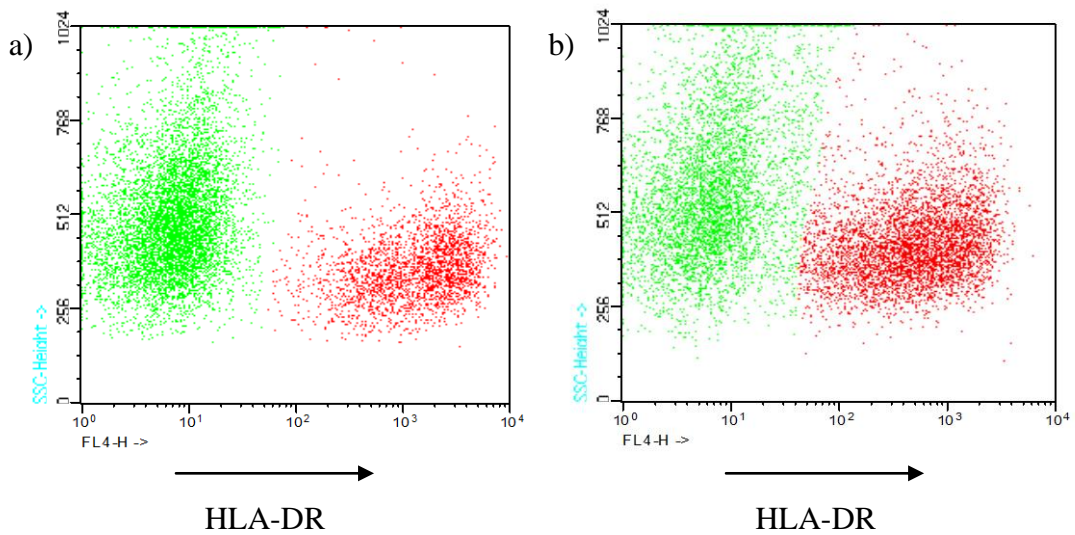
Comparação de marcação entre dois anticorpos contra antígeno sialil-Tn



Imagens de microscopia confocal, nas quais as células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ foram marcadas com anticorpos anti-sTn, nomeadamente o clone STn219 (esquerda) e clone TKH2 (direita).

Anexo V

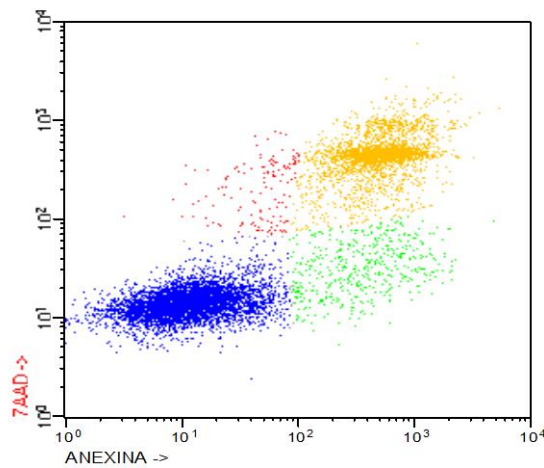
Exemplo de uma análise dos resultados de um ensaio de adesão obtidos por Citometria de Fluxo



Dot Plots resultantes da aquisição, por Citometria de Fluxo, de uma amostra de co-cultura das células dendríticas (DCs) (Vermelho) e linhas MCR (Verde), após marcação desta com HLA-DR, num ensaio de adesão. a) 27,1% DCs que aderiram a células $MCR_{pLenti.transd}$ e apresentam uma MFI da marcação igual a 1807,2; b) 50,1% DCs que aderiram a células $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e apresentam uma MFI de marcação igual a 732,4.

Anexo VI

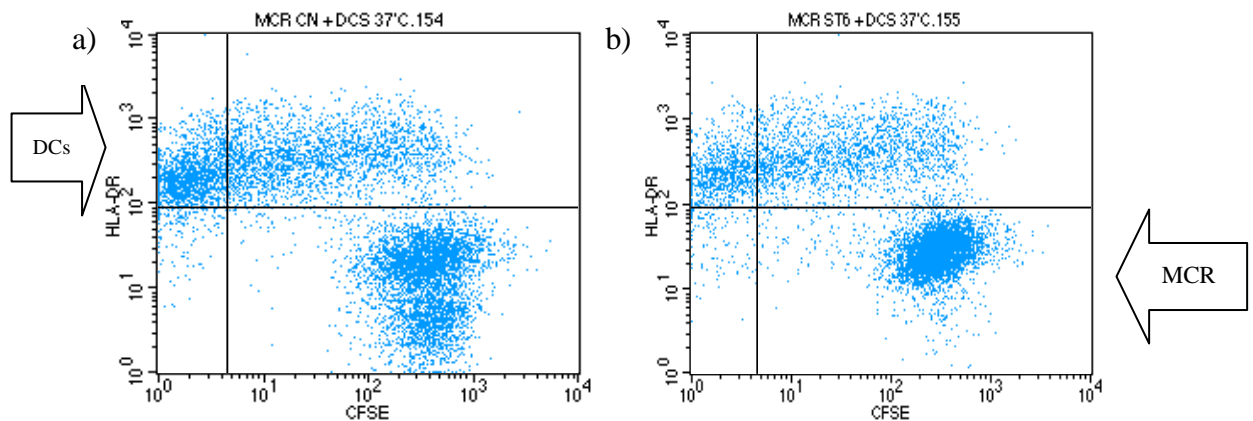
Exemplo de uma análise dos resultados de um ensaio de apoptose obtidos por Citometria de Fluxo



Dot Plots resultantes da aquisição, por Citometria de Fluxo, de uma amostra de células $MCR_{pLenti.transd}$ sujeita à acção do agente Camptotecina durante 24 horas, e após marcação desta com Anexina-V e 7-AAD. Azul – 60,4% de células vivas; Verde – 5,6% de células apoptóticas num estado precoce; Amarelo – 32,9% de células apoptóticas num estado tardio ou de células necróticas; Vermelho – 1,1% de células necróticas

Anexo VII

Exemplo de uma análise dos resultados de um ensaio de fagocitose obtidos por Citometria de Fluxo



Dot Plots resultantes da aquisição, por Citometria de Fluxo, de uma amostra de co-cultura das células dendríticas (DCs) e linhas MCR apoptóticas (previamente marcadas com CFSE), e após marcação das DCs com HLA-DR, num ensaio de fagocitose. a) Co-cultura de $MCR_{pLenti.transd}$ e DCs, na qual 67% das DCs fagocitaram células MCR apoptóticas, apresentando um valor de MFI da marcação com HLA-DR igual a 118,4; b) Co-cultura de $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ e DCs, na qual 75% das DCs fagocitaram células MCR apoptóticas, apresentando um valor de MFI da marcação com HLA-DR igual a 152,1. Os quadrantes foram desenhados com base nos controlos negativos da marcação, ou seja, DCs e células MCR apoptóticas não marcadas.

Anexo VIII

Sumário submetido para o congresso “16th International Charles Heidelberg Symposium on Cancer Research”

“Contribution of Thomsen-Friedenreich antigens to bladder cancer malignancy: characterization of cell line models”

P. F. Severino, M. A. Carrascal, G. Helena, M. G. Cabral, M. Correia, N. Malagolini, M. Chiricolo, F. Dall’Olio, P. A. Videira

A particular type of glycans has been associated with cancer, the O-linked glycosidic Thomsen-Friedenreich (TF) antigens -T and Tn, and the sialylated forms sT and sTn. The expression of TF antigens in bladder cancer (BC) has also been reported, although the correlation with prognosis is controversial. Furthermore, the molecular basis underlying their expression and the role played by the enzymes sialyltransferases (STs), responsible for the expression of sialylated forms, are unknown.

For a better understanding, we chose to study the cell line models: MCR and HT1376, exhibiting a low cell surface expression of the sTn and sT respectively, that were transduced with “ST6GalNac.I” or “ST3Gal.I” STs cDNA. The resulted transduced cells MCR_{ST6GalNac1} and HT1376_{ST3Gal1} were purified by immune-magnetic sorting for the sTn, and selected clones for the expression of sT.

Our preliminary results show differences concerning to cell adhesion ability and immunogenicity. Namely, dendritic cells (DCs) and MCR_{ST6GalNac1} in co-cultures, results in an increased expression of TGF- β and IL-10, and decreased of TNF- α and IL-6. After adhesion, MCR negative control (MCR_{NC}) induces higher maturation on DCs (higher expression of HLA-DR, CD80, CD83 and CD86). Concerning to phagocytosis, it was seen that HT1376_{ST3Gal1} are apparently more resistant to phagocytosis by macrophages, in respect to negative control (HT1376_{NC}), and MCR_{ST6GalNac1} less resistant to phagocytosis by DCs, in respect to MCR_{NC}.

Anexo IX

Sumário submetido para o congresso “2010 Annual Meeting of the Society for Glycobiology”

“Immune tolerance to cancer cells: the role of sialyl Tn antigens”

Mylène Carrascal; Paulo Severino; M Guadalupe Cabral; Manuela Correia; Helena Gouveia; Rita Faria; Fabio Dall'Olio; Paula A Videira

The expression of the tumour-associated carbohydrate antigens, sialyl-Tn (STn) is usually associated with poor prognosis in different cancers. Dendritic cells (DCs) are able to recognize, capture and process tumour antigens and, if properly matured, activate specific effector T cells to eliminate the tumour cells. However, under unknown circumstances, DCs became tolerogenic to cancer cells, residing incompletely mature, with enhanced phagocytic ability and increased secretion of immunosuppressive cytokines. Because STn antigens affect cell-cell connections we investigated its potential to affect DC:cancer cell interaction and DC-mediated immune responses. As STn⁺ cancer cell models, we used ST6GalNacI-overexpressing bladder cancer cell lines and supported the evidences with ST6GalNacI-overexpressing breast cancer cells. We observed that human monocyte-derived DCs (mo-DCs) have a tendency to adhere more to STn⁺ cancer cells than to control STn⁻ cells. However, the contact with STn⁺ cells leads mo-DCs to have significant smaller expression of major histocompatibility complex class II antigen-presenting proteins and costimulatory ligands, as compared with control STn⁻ cancer cells. In addition, STn⁺ co-cultures presented higher expression of tolerogenic cytokines such as IL-10 and decreased expression of TNF- α pro-inflammatory cytokine. These phenomena seem to require cell: cell contact and were not observed when mo-DCs were previously matured with bacterial lipopolysaccharide. Interesting, when apoptotic, STn⁺ cancer cells seems to be better phagocytosed by mo-DCs than STn⁻. Our data suggest that STn antigen ascribe reduced immunogenicity to the cancer cells, favouring the induction of more tolerogenic DC profile. Further investigations are in progress to understand the underlying mechanisms.

Anexo X

Sumário submetido para o curso “Summer Course Glycosciences - 11th European Training Course on Carbohydrates”

“Contribution of Thomsen-Friedenreich antigens to bladder cancer malignancy: characterization of cell line models”

Paulo F. Severino, Mylène A. Carrascal, M. Guadalupe Cabral, Manuela Correia, Nadia Malagolini, Mariella Chiricolo, Paula A. Videira; Fabio Dall’Olio

Almost every type of cancer shows a deranged glycan expression on cell surface and secreted glycoconjugates. A particular type of glycans that has been associated with cancer are the O-linked chains associated to the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen, which comprises a group of four glycosidic structures – T and Tn, and corresponding sialylated forms sialyl-T and sialyl-Tn. These structures are usually related with worse prognosis, playing an important pathophysiological role in cancer. The expression of TF antigens in bladder cancer (BC) has also been reported in the literature, although the correlation with prognosis is controversial. Furthermore, the molecular basis underlying their expression and the role played by the enzymes sialyltransferases (STs), responsible for the expression of sialylated forms, in BC progression, are still unknown. To allow a better understanding of the function of the sialylation of TF antigens in tumorigenesis and malignancy of bladder cancer, we considered the use of cell line models: MCR and HT1376, exhibiting a low cell surface expression of the sialyl-Tn and sialyl-T respectively, that were transduced with “*ST6GalNac.P*” or “*ST3Gal.P*” STs cDNA respectively. The comparative phenotypic analysis of the resulting genetically modified cell lines with wild type or mock-transduced cells lines will give us new insights about the role played by sialylated TF-related antigens in bladder cancer progression. For a better characterization, we have initiated several approaches to enrich the MCR (ST6GalNac.I) and the HT1376 (ST3Gal.I) in higher positive sialylated cell population. MCR have been efficiently enriched in the sialyl-Tn population (74% to 95%) by a specific immunomagnetic labelling. Enriched cells were also tested for ST6GalNac.I mRNA level and enzyme activity. The comparison between the transduced MCR (ST6GalNac.I) and MCR (control) has revealed slight but important differences in terms of cell growth. The study of other parameters as immunogenicity and cell adhesion capacity are ongoing.