

BIANCA RACHID DIAS

Identificação de iGb3 e iGb4 em células de melanoma B16F10-Nex2 e efeito antitumoral de células dendríticas primadas com iGb3 mediado por células iNKT.

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

São Paulo
2010

BIANCA RACHID DIAS

Identificação de iGb3 e iGb4 em células de melanoma B16F10-Nex2 e efeito antitumoral de células dendríticas primadas com iGb3 mediado por células iNKT.

Orientador: Prof. Dr. Luiz R.Travassos

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

São Paulo

2010

Dias, Bianca Rachid

Identificação de iGb3 e iGb4 em células de melanoma murino B16F10-Nex2 e efeito antitumoral de células dendríticas primadas com iGb3 mediado por células iNKT/ Bianca Rachid Dias – São Paulo, 2010.

144 f.

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

Título em inglês: **Identification of iGb3 and iGb4 in melanoma B16F10-Nex2 cells and the iNKT cell-mediated antitumor effect of dendritic cells primed with iGb3**

1. Melanoma B16F10-Nex2
2. Células iNKT
3. Glicosíngolipídeos iGb3, iGb4 e GM3
4. Células Dendríticas
5. Imuno vigilância

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

Dedico essa tese
Aos meus pais Angela Lúcia e José Vitor
Ao meu marido Maury Yamazaki
À minha irmã Briana
À minha madrastra Elaine

Aos amigos da Disciplina de Biologia Celular

Amigos meus – Toquinho

Amigos meus está chegando a hora
Em que a tristeza aproveita pra entrar
E todos nós vamos ter que ir embora
Pra vida lá fora continuar.

Tem sempre aquele que
Toma mais uma no bar
Tem sempre um outro que
Vai direitinho pro lar .

Mas tem também
Uma sala que está vazia,
Sem luz, sem amor, sombria,
Prontinha pro show voltar.

E em novo dia
A gente vê novamente
A sala se encher de gente
Pra gente comemorar.

Pai nosso em aramaico

Abwun d'bwashmaya
Nethqadash shmakh
Teytey malkuthakh
Nehwey tzevyanach aykanna d'bwashmaya aph b'arha.

Hawvlan lachma d'sunqanan yaomana
Washboqlan khaubayan (wakhtahayan)
aykana daph khnan shbwoqan l'khayyabayn

Wela tahlán l'nesyuna
Ela patzan min bisha
Metol dilakhie malkutha wahayla wateshbukhta
l'ahlam almin.
Ameyn.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proteger nas estradas entre Campinas / São Paulo / São José dos Campos, nos dias de chuva e de perigo.

Ao meu orientador, Prof. Luiz R. Travassos que “sofreu” todos esses anos me orientando e corrigindo meus relatórios, paper e tese. Obrigada por compartilhar sua sabedoria. E não poderia deixar de lado um agradecimento pelas comemorações no Outback e pelas celebrações da Queda da Bastilha.

À minha coorientadora Elaine G. Rodrigues, por me ajudar a fazer todo o trabalho pesado nesses anos, pelos seus ensinamentos, conselhos, conversas e apoio.

Ao Prof. Leonardo Nimrichter, por me auxiliar nos primeiros passos das extrações lipídicas.

Ao Prof. Igor C. Almeida e seu aluno Ernesto Nakayasu que me socorreram em todos os momentos difíceis dessa tese e que foram sempre responsáveis por notícias boas.

Aos Professores com quem aprendi a tomar decisões burocráticas nas Comissões e Representações que participei e que sempre respeitaram minhas opiniões, Profa. Célia, Profa. Ieda, Profa. Olga, Profa. Rosana, Profa. Tânia, Prof. José Daniel, Prof. Renato e Prof. Zoilo.

À Fapesp, pelo suporte financeiro dado em todos esses anos.

Aos meus grandes amigos de labuta Alisson, Andrey, Ellen, Fabiana, Márcia, Manoela e Thaysa pelas conversas e risadas na sala de cultura e por me darem forças quando encontrava as células contaminadas, enfim por toda a amizade. Apesar da distância vocês serão sempre meus grandes amigos.

Aos amigos de laboratório Amanda (Profa. Miriam), Ana Beatriz, Carla, Carla (Profa. Ieda), Carlos, Carol (Profa. Célia), Cíntia, Denise, Eliana, Flávia, Filipe, Felipe, Jorge, Juliana, Juliana (Profa. Ieda), Karina, Kátia (Profa. Rosana), Luana, Luis, Mariana, Milene (Profa. Rosana), Natasha, Rafael (Toddy), Sabrina, Simone, Teresa (Prof. Sérgio), Tiemi, Vanessa (Prof. Sérgio). Obrigada por me apoiarem em todos os momentos, por me ensinarem e ajudarem nos experimentos, pelas conversas científicas e descontraídas.

Aos funcionários da Disciplina de Biologia Celular Seu Américo, Seu Antônio Furlaneti, Claudeci, Cláudio, José Carlos, Luizão, Márcia, Maria, Marcelo, Rose e D. Sebastiana que sempre facilitaram meu trabalho me ajudando com os materiais e experimentos que precisava fazer.

À Mércia secretária da Pós-graduação do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, que tantas vezes me socorreu.

Agradeço aos meus primos, tios e meus avós que sempre me acharam louca por querer estudar mais, mas que certamente nesse momento estão muito orgulhosos com minhas conquistas, principalmente meus tios compadres Tio Élon e Tia Marta, Tio Nilson e Tia Valéria, Tio Vicente e Tia Sônia, e meus avós Sebastião e Maria.

Aos meus sogros Mirley e Hitoshi que me levaram vários sábados para o laboratório e ficavam chateados quando as células estavam contaminadas ou quando os experimentos não davam certo.

Aos meus cunhados Guilherme, Joana, Luciana e Walt que por conhecerem parte da área de pesquisa, me aturaram discutindo conceitos científicos, obrigada pela paciência.

Aos meus pais que apesar de às vezes questionarem os caminhos que escolhi, estiveram sempre presentes me apoiando e incentivando. Sofreram e se alegraram comigo tantas vezes, além de serem “patrocinadores” em diversos momentos. Devo tudo à vocês. Amo vocês.

À minha madrasta Elaine que junto com meu pai me apoiou sempre.

Ao meu marido que sempre foi incentivador e companheiro na minha vida, indo comigo aos sábados, domingos e madrugadas ao laboratório. Obrigada por entender quando eu tinha que trabalhar entre Natais e Anos-Novos, quando tinha poucos dias de férias e por sempre estar ao meu lado. Eu te amo muito muitão.

E por último à pessoa que mais amo no mundo, minha irmã Briana, que me apóia incondicionalmente, me incentiva, e em quem eu me espelho pela sua ética, determinação, disciplina e força. Obrigada por tudo, te amo Brizinha.

ÍNDICE

ABREVIACÕES	<i>i</i>
RESUMO	<i>ii</i>
ABSTRACT	<i>iii</i>
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Melanoma	1
1.2 Células <i>i</i>NKT	5
1.2.1 Células NKT e resposta imune anti-tumoral.....	5
1.3 CDI	7
1.4 Lipídeos	9
1.4.1 α -Galactosilceramida.....	10
1.4.1.1 Tratamentos com α -GalCer.....	11
1.4.2. Isoglobosil ceramida.....	12
1.4.3. Gangliosídeos	14
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Animais	17
3.2 Células	17
3.3 Reagentes	18

3.4 Ensaio de citometria de fluxo (FACS).....	19
3.5 Obtenção de células tumorais crescidas in vivo.....	19
3.6 Obtenção de células apresentadoras de antígeno (APCs).....	20
3.6.1 Células monocíticas provenientes de precursores da medula óssea.....	20
3.6.2 Células dendríticas provenientes de precursores de medula óssea.....	21
3.7 Detecção de Mycoplasma sp. através da técnica de PCR.....	21
3.8 Preparo de lisado de células B16F10 -Nex 2 crescidas in vivo.....	22
3.8.1 Obtenção de Lisado com nitrogênio líquido (NL).....	22
3.8.2 Ultracentrifugação dos lisados e obtenção das frações membranas e citosólica	23
3.9 Obtenção de frações lipídicas a partir do melanoma murino B16F10-Nex 2.....	23
3.10 Dessalinização das frações	25
3.11 Cromatografia de Camada Delgada (TLC).....	25
3.12 Ensaio de ativação do hibridoma DN32.D3	26
3.12.1 Ensaio com fibroblastos – CD1d como células apresentadoras de antígenos	26
3.12.2 Ensaio com macrófagos de medula óssea como células apresentadoras de antígenos ..	27
3.12.3 Ensaio com células dendríticas de medula óssea como células apresentadoras de antígenos	27
3.13 Screening das frações lipídicas.....	28
3. 14 Ensaio de detecção de IL -2 e IL-4 por ELISA	29
3.15 Separação dos componentes lipídicos das frações F3A, através de coluna de sílica	29
3.16 Separação de iGb3 por TLC preparativa a partir das frações F3A e F4A.....	30

3.17 Ensaio de estimulação de hibridomas NKT (DN32.D3) utilizando as frações iGb3 F3A e iGb3 F4A.....	31
3.18 Separação de glicosfingolipídeos neutros e de carga negativa	31
3.19 Per-N,O-metilação de Glicosfingolipídeos (GSLs) neutros.....	32
3.20 Análise de GSL permetilados de F3A por espectrometria de massa íon-trap de ionização linear (ESI-LIT-MS).....	33
3.21 Ensaio de citotoxicidade de células dendríticas pulsadas com iGb3 e α-GalCer contra células tumorais B16F10-Nex 2	33
3.21.1 Análise de citotoxicidade in vitro	33
3.22 Experimentos in vivo	34
3.22.1 Análise de sobrevivência de camundongos WT e CD1dKO.....	34
3.22.2 Ensaio de metástase pulmonar <i>in vivo</i>	35
3.23 Análise estatística.....	35
4. RESULTADOS.....	36
4.1 Análise de sobrevivência e desenvolvimento tumoral em animais deficientes em CD1d	36
4.2 Padronização do ensaio de ativação do hibridoma de células NKT, DN32.D3, por fibroblastos – CD1d	39
4.2.1 Caracterização por FACS das células utilizadas no ensaio	39
4.2.2 Padronização do ensaio com α -galactosilceramida	41
4.3 Obtenção de células tumorais B16F10-Nex2 crescidas in vivo.	42
4.4 Obtenção e isolamento de frações lipídicas das células tumorais B16F10-Nex 2..	45

<i>4.5 Dessalinização das frações obtidas</i>	<i>53</i>
<i>4.6 Ensaio de estimulação de células DN32.D3 pelas frações lipídicas do melanoma murino B16F10-Nex2.....</i>	<i>53</i>
<i>4.7 Obtenção de células apresentadoras de antígenos murinas maturadas a partir de precursores de medula óssea para ensaio de ativação de células DN32.D3</i>	<i>60</i>
<i>4.8 Ensaio de ativação de células DN32.D3 pelas frações lipídicas obtidas a partir do melanoma murino B16F10-Nex2 apresentadas por BMDC.....</i>	<i>62</i>
<i>4.9 Dosagem de IL-4 no ensaio de ativação de células DN32.D3 pelas frações F3A e F4A</i>	<i>64</i>
<i>4.10 Inibição da ativação de células DN32.D3 pelo gangliosídeo GM3 adicionado a células dendríticas de medula óssea (BMDC).....</i>	<i>68</i>
<i>4.11 Separação de compostos presentes na fração F3A em coluna de sílica.....</i>	<i>68</i>
<i>4.12 Ensaio de ativação das células DN32.D3 NKT por subfrações obtidas após a fração F3A ser submetida à coluna de sílica.....</i>	<i>71</i>
<i>4.13 Análise preliminar dos componentes lipídicos das frações F3A e F4A. Evidência para a expressão de iGb3 e GM3.</i>	<i>71</i>
<i>4.14 Ensaio de estimulação de células DN32.D3 NKT pelos produtos iGb3F3A e iGb3F4A</i>	<i>74</i>
<i>4.15 Caracterização de lipídeos presentes em F3A por ESI-LIT-MS (electrospray ionization-linear ion trap-mass spectrometry).....</i>	<i>76</i>

<i>4.16 Ensaio de Citometria de fluxo de células dendríticas incubadas com α-GalCer e iGb3</i>	87
<i>4.17 Ensaio de citotoxicidade in vitro de células NKT estimuladas com iGb3 contra células B16F10-Nex2</i>	87
<i>4.18 Proteção anti-tumoral in vivo conferida por células dendríticas de medula óssea estimuladas com iGb3 e α-GalCer</i>	90
5. DISCUSSÃO	92
6. CONCLUSÕES	97
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
8. ANEXOS	113
<i>8.1 Comitê de Ética</i>	113
<i>8.2 Publicação</i>	114

ABREVIACÕES

a-GalCer – a-galactosilceramida;

B16F10-Nex2 – sublinhagem de melanoma murino B16F10 isolada na UNONEX;

BMDC – células dendríticas de medula óssea;

C34:1 – ácido graxo com 34 carbonos e 1 insaturação;

CD1d-KO – animais knock-out para o gene CD1d;

d18:1 – esfingosina com 18 carbonos e 1 insaturação;

DN32.D3 – hibridoma de célula NKT;

ESI-LIT-MS – “electrospray ionization linear ion-trap mass spectrometer”;

Fibroblastos-CD1d – fibroblastos transfectados com o gene CD1d;

Gb3 – globotrihexosilceramida;

Gb4 – globotetraosilceramida;

GD2 – disialil gangliosídeo 2;

GD3 – disialil gangliosídeo 3;

GM1 – monosialil gangliosídeo 1;

GM2 – monosialil gangliosídeo 2;

GM3 – monosialil gangliosídeo 3;

GSL – glicoesfingolípídeo;

Hex – hexose-hexose;

HPTLC – “high performance thin layer chromatography”;

iGb3 – isoglobotrihexosilceramida;

iGb4 – isoglobotetraosilceramida;

iNKT – linfócitos NKT com TCR invariante responsivas à a-Galactosilceramida;

m/z – massa/carga iônica;

MeN-Ac/Me-N-glicolilneuramínico – ácido *N*-acetilneuramínico metilado / *N*-glicolilneuramínico metilado;

NANA – ácido *N*-acetilneuramínico;

TLC – “thin layer chromatography”;

WT – animais selvagens (wild type).

RESUMO

Células iNKT restritas a CD1d são protetoras contra o desenvolvimento de melanoma murino, B16F10-Nex2, subcutaneamente em animais singênicos. Essa proteção pode ser deduzida pelo desenvolvimento acelerado do tumor em animais geneticamente deficientes na expressão de CD1d (CD1d-KO), com sobrevida significativamente menor do que a observada com animais WT submetidos ao mesmo desafio de células tumorais. CD1d é uma família de glicoproteínas relacionadas a MHC classe I, envolvidas na apresentação, principalmente em células dendríticas, de antígenos lipídicos para células iNKT. No presente trabalho focalizamos a identificação do lipídeo endógeno expresso em células de melanoma capaz de induzir uma resposta de vigilância imune baseada em células iNKT. Verificamos também a possibilidade de proteger animais contra o desenvolvimento tumoral utilizando células dendríticas primadas com o lipídeo endógeno.

A extração dos componentes lipídicos de melanoma foi realizada a partir de tumores crescidos *in vivo*, evitando-se assim artefatos do cultivo celular *in vitro*. Foram testados três diferentes protocolos de extração (A, B e C), obtendo-se 14 frações diferentes que foram testadas na ativação do hibridoma DN32.D3, uma linhagem de células NKT murinas imortalizadas. A fração F3 do protocolo A (F3A) ativou o hibridoma DN32.D3 medido pela produção de IL-2. Para uma eficiente apresentação dos lipídeos dessa fração utilizamos com sucesso células dendríticas de medula óssea (BMDC) nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, para apresentação de F3A e glicolipídeos ativadores de células NKT, a-galactosilceramida (a-GalCer) e isoglobotrihexosilceramida (iGb3).

Na tentativa de isolar o composto estimulatório presente em F3A de melanoma, essa fração foi analisada por HPTLC revelada com diversos reagentes específicos para resíduos de ácido siálico, açúcares neutros, fosfato e lipídeos totais. A fração também foi submetida a separações em colunas de sílica, ensaio de “immunostaining” quimioluminescente com lectina de *Bandeiraea simplicifolia* e análises em espectrometria de massa, onde foram identificados gangliosídeos como GM3 bem como glicosfingolipídeos neutros como iGb3, Gb3, iGb4 e Gb4 por ESI-LIT-MS (electrospray ionization-linear íon trap-mass spectrometry).

Quando iGb3 foi incubado com BMDC e testado com células DN32D3 essas foram ativadas produzindo IL-2. GM3 consistentemente era um inibidor dessa ativação de células iNKT.

Ensaio de citotoxicidade foram então realizados e verificamos que células de NKT estimuladas por BMDC incubadas com a-GalCer ou iGb3 circundavam as células tumorais B16F10-Nex2 visualizadas em microscopia de fluorescência e, em ensaio *in vitro*, as células NKT promoviam lise de até 40% das células tumorais B16F10-Nex2.

Realizamos então ensaios *in vivo*, onde camundongos foram inoculados endovenosamente com células do melanoma murino e tratados ou não com células dendríticas primadas com a-GalCer ou iGb3. Ao excisarmos os pulmões dos animais, notamos que os grupos tratados com lipídeos ativadores de células NKT tinha cerca de 4 vezes menos nódulos pulmonares que o grupo não tratado.

Nossos resultados mostram que o melanoma murino B16F10-Nex2 possui a molécula iGb3 e sua precursora iGb4, capaz de ativar células NKT conferindo a essas capacidade citotóxica *in vitro* contra o melanoma. Esse lipídeo (iGb3) também mostrou um efeito protetor contra metástases pulmonares oriundas do melanoma murino quando apresentado por células dendríticas utilizadas em protocolo de terapia celular.

Esse é o primeiro trabalho mostrando que efetivamente um glicolipídeo endógeno ligante de CD1d é capaz de ativar células NKT com efeito protetor antitumoral, através de terapia celular com células dendríticas.

Palavras chave: Melanoma B16F10-Nex2, células iNKT, glicosfingolipídeos iGb3 e iGb4 GM3, células dendríticas, imuno vigilância.

ABSTRACT

CD1d-restricted iNKT cells are protective against the murine melanoma B16F10-Nex2 growing subcutaneously in syngeneic animals. This is inferred from the fast tumor growth in animals genetically deficient in CD1d (CD1d-KO), which showed a survival time significantly shorter than that of WT animals equally challenged with tumor cells. CD1d belongs to a family of glycoproteins resembling MHC class I, involved in the presentation, chiefly in dendritic cells, of lipidic antigens to iNKT cells. In the present work we focus on the identification of an endogenous lipid component expressed in melanoma cells able to induce an immunosurveillance response based on iNKT. We also investigated the possibility of animal protection against tumor development by using dendritic cells primed with the endogenous lipid.

The extraction of membrane lipid components was carried out from *in vivo* grown tumors, thus avoiding artifacts from the *in vitro* grown cultures. Three different extraction protocols were tested (A, B, C), and 14 different fractions were obtained and tested for the activation of hybridoma DN32.D3, a cell line of immortalized murine NKT cells. Fraction F3 of protocol A (F3A) activated hybridoma DN32.D3 to produce IL-2. For an efficient presentation of lipids from this fraction we successfully used bone marrow dendritic cells (BMDC) on *in vitro* and *in vivo* assays. F3A and NKT-cell activating glycolipids, α -galactosylceramide (α -GalCer) and isoglobohexosylceramide (iGb3), were tested.

In the attempt to isolate the stimulatory component present in the melanoma F3A fraction, HPTLC was used and revealed with several specific reagents for sialic acid residues, neutral sugars, phosphate and total lipids. The fraction was also separated in silica columns, immunostained with *Bandeiraea simplicifolia* BS-1 lectin and analyzed by mass spectrometry. Ganglioside GM3 and neutral glycosphingolipids iGb3, Gb3, iGb4 and Gb4 were identified by ESI-LIT-MS (electrospray ionization-linear ion trap-mass spectrometry).

By incubation of iGb3 with BMDC and these with DN32.D3 cells, the latter were activated to produce IL-2. GM3 consistently inhibited the activation of iNKT cells.

Cytotoxicity assays were then carried out, in which we found that NKT cells stimulated by BMDC, primed with α -GalCer or iGb3, encircled the B16F10-Nex2 tumor

cells as visualized by fluorescent microscopy. NKT cells promoted lysis of up to 40% of tumor cells.

In vivo tests showed that mice injected endovenously with murine melanoma cells and treated with dendritic cells primed with α -GalCer or iGb3, had lungs with 4-fold fewer nodules than an equally challenged but untreated group.

The present results show that the murine melanoma B16F10-Nex2 expresses iGb3 and its precursor iGb4, being able to activate NKT cells and conferring them a cytotoxic activity *in vitro* against melanoma. Such lipid (iGb3) was also protective *in vivo* reducing the melanoma pulmonary metastases when presented by dendritic cells used in cellular therapy protocol.

This is the first work showing effectively that an endogenous CD1d-restricted glycolipid able to activate iNKT cells display a protective antitumor effect, using cellular therapy with dendritic cells.

Key words: B16F10-Nex2 melanoma, iNKT cells, glycosphingolipids iGb3 and iGb4, GM3, dendritic cells, immunosurveillance.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Melanoma

O melanoma é um câncer com origem nos melanócitos. Os melanócitos são células produtoras de pigmento (melanina) em humanos e outros vertebrados. No desenvolvimento embrionário essas células migram de seu ponto de origem na crista neural para a camada basal da epiderme na pele (Baker *et al.*, 1997) (Chudnovsky *et al.*, 2005). A transformação maligna dos melanócitos leva à proliferação anormal dessas células, com crescimento radial e vertical com células invadindo a membrana basal, atingindo a derme, infiltrando-se nas vias linfáticas e nos vasos sanguíneos e dando origem a metástases em sítios distantes do tumor primário.

A homeostasia dos melanócitos é regulada por queratinócitos presentes na epiderme. Em resposta a luz ultravioleta, estes queratinócitos secretam fatores que regulam a sobrevivência, diferenciação, proliferação e motilidade destes melanócitos, estimulando estas células a produzir melanina. Portanto, os melanócitos têm a função de proteger a nossa pele contra os danos causados pela luz ultravioleta (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Existe uma série de fatores de risco para o desencadeamento de tumores da pele. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, sensibilidade ao sol, pele clara e exposição excessiva ao sol são fatores que predisõem ao desenvolvimento do melanoma maligno. Dessa forma, medidas preventivas para se evitar a doença devem ser tomadas, tais como, evitar a exposição prolongada ao sol, principalmente em horários onde a incidência da radiação ultravioleta (UVB) dos raios solares é maior, além do uso de equipamentos de proteção, como óculos escuros, chapéu e filtro solar.

Algumas mutações estão ligadas ao processo maligno nos melanócitos, sendo que cerca de 65% afetam o gene *BRAF* e 20% o *N-RAS*. Além disso, Patton *et al.*, 2005, observou a freqüente perda de função de p53 no melanoma.

Tradicionalmente, o desenvolvimento e a progressão do melanoma apresenta 4 passos característicos. (1) Melanócitos gerando nevus displásico com estrutura e arquitetura atípica

diferente de um nevus comum; (2) Ocorre então uma fase de crescimento radial (RGP) do melanoma primário seguido pelo crescimento vertical (VGP); (3) No VGP, células do melanoma podem infiltrar a membrana basal e invadir a derme; (4) inicia-se o processo metastático com as células tumorais alcançando diversos órgãos (Muller *et al.*, 2009).

Essas transformações celulares apresentam sintomas característicos como o aparecimento de lesões escuras com bordas irregulares, acompanhada de coceira e descamação. Em casos de uma lesão pigmentada pré-existente, ocorre aumento no tamanho, alteração na coloração e na forma da lesão que passa a ser assimétrica com bordas irregulares (INCA). O ABCD das lesões do melanoma são classicamente definidos como segue: **A**ssimetria, uma metade diferente da outra; **B**ordas irregulares, contornos mal definidos; **C**or variável, várias cores numa mesma lesão; **D**iâmetro, maior que 6 milímetros.

De acordo com o INCA, no Brasil, em 2008, de todos os 470.000 casos de câncer cerca de 6.000 casos eram de melanoma, com incidência dessa neoplasia em indivíduos com cor de pele branca. O National Câncer Institute (NCI) estima que em 2009 cerca de 68.720 novos casos ocorreriam nos Estados Unidos com 8.650 mortes devido ao melanoma.

O melanoma de pele é menos freqüente que outros tumores de pele como basocelular e espinocelular porém, devido sua alta capacidade metastática a letalidade é elevada. Nos estágios iniciais do melanoma nos quais as células ainda não se espalharam, tumor e linfonodos podem ser excisados e o paciente apresenta baixo risco de recorrência. Pacientes diagnosticados tardiamente ou com melanoma metastático apresentam um pior prognóstico, pois essas células são resistentes aos tratamentos convencionais, quimioterapia e radioterapia. Esses pacientes apresentam uma média de sobrevida de apenas 6 meses e, de 5 anos em menos de 5% dos pacientes.

Devido à dificuldade de tratamento do melanoma, pesquisadores concordam que novas terapias devem ser desenvolvidas (Gray-Schopfer *et al.*, 2007). Pesquisas bioquímicas têm buscado drogas que possam combater o melanoma ou prevenir sua formação, levando a descoberta de novas quimioterapias com ação antitumoral. A excisão cirúrgica é sempre a primeira opção, mas, em determinados casos, existe um espalhamento da lesão que dificulta essa remoção, justificando um tratamento tópico. Rodrigues *et al.*, 2008, mostraram que camundongos inoculados subcutaneamente com células de melanoma B16F10-Nex2

podiam ser tratados topicamente com gomesina, um peptídeo antimicrobiano isolado de aranha *Acanthoscurria gomesiana*. Além de retardar o crescimento tumoral esse tratamento prolongou significativamente a sobrevivência dos animais tratados. Esse é um raro exemplo desse tipo de intervenção.

Outro ponto crítico no desenvolvimento do melanoma murino é a angiogênese. Diversos pesquisadores vêm buscando formas de impedir a nutrição do tumor inibindo o suprimento sanguíneo. Numerosos trabalhos focalizam esse aspecto do crescimento tumoral bem como os inibidores da angiogênese que podem ter efeito no câncer. Paschoalin *et al.*, 2007, mostraram que a secreção de TOP (Thimet oligopeptidase) não foi diretamente tóxica à célula tumoral, mas protegeu camundongos desafiados com B16F10-Nex 2 quando esses foram tratados com TOP recombinante. Essa enzima degrada bradicinina que está envolvida na angiogênese juntamente com NO.

1.2 Células *iNKT*

Os linfócitos NKT são maturados no timo através de células precursoras $CD4^+CD8^+$ (em timócitos imaturos do córtex) que interagem com CD1, gerando duas subpopulações majoritárias, $CD4^+$ e $CD4^-CD8^-$ (DN) conforme descrito por Bendelac (1995) e Brutkiewicz & Sriram (2002). Essas células produzem citocinas tipo Th1 (IFN- γ) e Th2 (IL-4, IL-13), e cada vez mais tem sido demonstrada sua importância em infecções por microorganismos e na resposta imune antitumoral. Fígado e baço são os órgãos onde há maior população de células NKT, e é rara sua presença em linfonodos (Matsuda *et al.*, 2000).

As células NKT, expressam marcadores das células NK (NK1.1) ao mesmo tempo que apresentam um repertório de TCRs (T-cell receptors) restrito, onde mais de 90% das células contem um determinado TCR invariante (Va14Ja18V β 8 em camundongos e Va24Ja18V β 11 em humanos), sendo pois denominadas NKT invariantes ou *iNKT*. Essas células reconhecem antígenos apresentados por CD1, uma molécula semelhante a MHC classe I, associada à β 2-microglobulina, relativamente não polimórfica, expressa em células da linhagem hematopoética. Foram identificados cinco homólogos para essa molécula,

sendo que um deles é expresso em camundongos, o CD1d, responsável pela seleção positiva de células NKT no timo, resultando na seleção de células NKT CD4⁺ e NKT CD4⁻ CD8⁻ (Brutkiewicz & Sriram, 2002).

Essas células dividem-se em dois subtipos. Linfócitos NKT tipo I reagem com a-GalCer, um glicolípido originado da esponja marinha *Agellus mauritanus*, quando apresentado por CD1d. O segundo tipo dessas células são restritas a CD1d porém não reagem com a-GalCer e seu TCR não é considerado invariante. Estudos realizados por Cui *et al.* em 1997 mostraram que animais deficientes em Ja281 não tinham células NKT tipo I, enquanto Mendiratta *et al.*, 1997, mostraram a ausência de ambos os tipos de NKT em camundongos deficientes em CD1d.

As células NKT podem produzir tanto citocinas tipo Th1 (IFN- γ) como Th2 (IL-4, IL-13), e cada vez mais tem sido demonstrada sua importância em infecções por microorganismos bem como na resposta imune anti-tumoral contribuindo para a ativação de diversas outras células do sistema imune como células dendríticas (DC), NK ou linfócitos T. Dessa forma, as células NKT podem tanto ter papel citotóxico como efeito adjuvante (Seino *et al.*, 2006). Azuma *et al.*, 2003, mostraram que outros componentes celulares podem ser supressores da resposta antitumoral mediada por células NKT, incluindo células T regulatórias (Treg), que podem suprimir a proliferação, produção de citocina, e atividade citotóxica de células NKT.

Embora diversas âncoras de GPI isoladas de microorganismos patogênicos (*Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*) tenham se ligado ao CD1d, nenhuma delas foi capaz de estimular células NKT *ex-vivo* (Procopio *et al.*, 2002; Brutkiewicz & Sriram, 2002). O mecanismo da ação protetora dessas células contra esses patógenos não está esclarecido (Wilson *et al.*, 2002).

Células NKT são ativadas por IL-12, produzida por macrófagos e células dendríticas. Mas igualmente expressam receptores para IFN- γ , o que as torna células de ativação muito rápida (Kawamura *et al.*, 1998).

Como já foi referido, vários trabalhos demonstram que há várias subpopulações de linfócitos NKT com ações distintas, produzindo citocinas pró-inflamatórias e/ou citocinas com perfil anti-inflamatório (Godfrey e Kronenberg, 2004, Brigl e Brenner, 2004 e Smyth *et al.*, 2002, Crowe *et al.*, 2005). Taniguchi *et al.*, 2003, Brigl & Brenner, 2004 e Wu *et al.*,

2005, mostraram que linfócitos NKT produzem, dependendo de sua sub-população IL-4, IL-10, IL-13 e IFN- γ , indicando a participação destas células no processo de modulação do sistema imune.

Atualmente está bem estabelecida a importância de células NKT no sistema imune (Champagne *et al.*, 2005), apresentando atividades antimicrobiana (Sugawara *et al.*, 2002), auto-imune (Cardell, 2006) e anti-tumoral (Brutkiewicz, 2006).

1.2.1 Células NKT e resposta imune anti-tumoral

Células NKT ativadas induzem a morte celular tumoral, por diversos mecanismos incluindo liberação de perforina, assim como a expressão de FASL e TRAIL. A importância das células NKT no desenvolvimento tumoral foi demonstrada pela primeira vez em trabalho onde os animais desenvolvendo melanoma metastático foram injetados com IL-12. Animais deficientes em células NKT tipo I (camundongos Ja18 KO) eram incapazes de controlar o crescimento tumoral nessas condições. Enquanto o animal selvagem injetado com IL-12 não apresentava metástases, animais KO reconstituídos com células NKT comportavam-se como os selvagens (Cui *et al.*, 1997).

Park *et al.*, 2003, complementaram esse estudo demonstrando que células NKT mediarão a rejeição de metástases hepáticas após injeção de IL-12, porém outras células foram efetoras na rejeição de tumores subcutâneos, possivelmente células dendríticas linfóides, sugerindo que células efetoras anti-tumorais variam de acordo com o microambiente tumoral.

A citotoxicidade de células NKT humanas pode ser direta ou via células dendríticas “cross-primed” com antígenos tumorais apresentados por CD1. Vários grupos têm utilizado α -galactosilceramida como ligante de CD1 apresentado por células dendríticas, para ativação de células NKT. Essas podem secretar citocinas como IL-2, IFN- γ , ativadoras de células NK citotóxicas estabelecendo um ativo infiltrado anti-tumoral (Metelitsa *et al.*, 2001).

Motohashi *et al.*, 2002, demonstraram que células V α 24 NKT estão em menor número no sangue periférico em pacientes com câncer em estágio avançado e que células

NKT tipo 2 atuam como células regulatórias suprimindo a resposta antitumoral mediada por linfócitos citotóxicos T CD8+. Terabe *et al.*, 2000, mostraram que em um modelo de recorrência tumoral, fibroblastos transformados produziram tumor em camundongos, o qual inicialmente regrediu pela atividade de CTLs T CD8⁺ e depois foi reativado por células T CD4⁺ CD1d dependentes que produziam IL-13. Recentemente os autores compararam os efeitos da regulação negativa observada em camundongos deficientes em *h281* (com ausência de células NKT tipo I) com camundongos CD1d deficientes (ambos os tipos), identificando células NKT tipo 2 como células regulatórias envolvidas na reativação do crescimento tumoral (Terabe *et al.*, 2005). Seino e Taniguchi, 2005, relataram que linfócitos NKT tipo I e tipo II podem interagir mutuamente reprimindo outras funções e desencadeando um feedback negativo na resposta imune antitumoral. No modelo de Terabe *et al.*, 2000, enquanto animais selvagens apresentavam alta frequência de recorrência tumoral, animais deficientes em CD1d, ou STAT-6 não apresentavam recorrência sugerindo fortemente que o efeito era dependente de células NKT do tipo 2, produtoras de IL-13. Na UNONEX (UNIFESP), foi obtida evidência de que células NKT regulatórias estavam envolvidas na resposta imune contra o melanoma B16F10-Nex2 no camundongo pelo efeito protetor obtido pela neutralização de IL-13 usando a quimera IL-13R α 2-Fc (Hebeler-Barbosa *et al.*, 2008).

Dependendo do microambiente tumoral células NKT apresentam um efeito protetor direto ou mesmo indireto. Para isso, elas devem ser estimuladas via ligante específico de natureza lipídica ou glicolipídica com CD1d. Wu *et al.*, 2003 demonstraram que o gangliosídeo GD3, expresso em altas concentrações em linhagens de melanoma humano, pode ligar-se à CD1d e reagir com linfócitos NKT murinos. Nesse trabalho, os autores também sugerem que a apresentação de GD3 ocorra via *cross-priming*, ou seja, GD3 deve ser captado e apresentado por uma célula apresentadora de antígenos e não pela própria célula tumoral, uma vez que esta última não expressa em sua superfície a molécula de CD1d. O eventual efeito estimulante de células NKT por gangliosídeos como o GD3 relatado nesse trabalho é, no entanto, contrário a um grande número de outras evidências que mostram que gangliosídeos agem como moléculas imunossupressoras. De fato, a liberação de glicolipídeos no meio tem sido considerada como uma forma de evasão do tumor contra a sua detecção, resultando em disseminação para sítios metastáticos distantes

(Zeng *et al.*, 2000a). A supressão da expressão de GD3 reduz o crescimento tumoral, angiogênese e produção de VEGF (Zeng *et al.*, 2000b). Na prática, estratégias de quimioterapia e vacinas antitumorais incluem o bloqueio da síntese de glucoesfingolipídeos bem como anticorpos anti-gangliosídeos, respectivamente (Radin, 1999; Livingston, 1998).

A importância das células NKT no controle do desenvolvimento tumoral quando IL-12 é aplicado ao hospedeiro foi demonstrada por Cui *et al.*, 1997 e por Park *et al.*, 2003. No entanto, o papel dessas células na rejeição tumoral na ausência dessa interleucina ainda não foi determinado. Em nosso trabalho, animais deficientes em CD1d tem rápido desenvolvimento de melanoma implantado subcutaneamente indicando que células efectoras CD1d-restritas são essenciais para a imunovigilância (ver em Resultados).

1.3 CD1

Ao contrário das moléculas de MHC I, que apresentam peptídeos aos linfócitos T CD8+ citotóxicos, moléculas de CD1 apresentam lipídeos e glicolipídeos a células NKT (Porcelli & Modlin, 1999).

O CD1 é uma família de glicoproteínas de membrana composta por heterodímeros em que a segunda molécula é β 2-microglobulina, de maneira similar a MHC classe I. Em humanos essas moléculas são codificadas por cinco genes CD1a, CD1b e CD1c (classificados como grupo I), CD1d (grupo II) e CD1e (considerado um grupo intermediário). Em camundongos, somente CD1d está presente (Calabi, 1986).

Apesar de CD1d e MHC I terem semelhanças nas suas estruturas secundárias e terciárias e nos domínios associados de forma não covalente a β 2-microglobulina, as diferenças são notadas na topografia e na superfície molecular onde o antígeno se liga, sendo esta superfície maior, com dois “pockets” de ligação lipídica (A' e F') e com características mais hidrofóbicas (Zeng *et al.*, 1997). Assim, os principais ligantes das moléculas CD1d são os que possuem características lipídicas.

Uma das várias dificuldades encontradas no estudo das células de mamíferos, normais e tumorais, é a de encontrar um ligante natural, endógeno para CD1d. Para as moléculas CD1a, b e c, alguns ligantes já são conhecidos. Lipídeos encontrados na parede

celular de micobactérias, como ácido micólico, manosídeo fosfatidilinositol (PIM), lipoarabinomanose (LAM) são apresentados por CD1b (Sieling *et al.*, 1995), enquanto CD1a é capaz de reconhecer um lipopeptídeo de *Mycobacterium tuberculosis* e CD1c reconhece um glicofosfolípídeo micobacteriano que possui somente uma cauda lipídica curta (Brigl & Brenner, 2004). Gumperz *et al.*, 2000 descreveu o reconhecimento por CD1d de glicolípídeos e lipídeos endógenos encontrados em células de mamíferos (self-lipids) como fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina e fosfatidilglicerol.

O principal ligante conhecido de CD1d que ativa células NKT é a α -galactosilceramida (α -GalCer), um glicolípídeo extraído da uma esponja marinha *Agellus mauritanus*, e provavelmente expresso em bactérias. Experimentos realizados por vários grupos mostram que a falta de interação CD1d-NKT e da ativação de linfócitos NKT podem prejudicar a resposta imune murina contra alguns agentes infecciosos, como por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Borrelia burgdorferi* (Sköld *et al.*, 2003), *Mycobacterium tuberculosis* (Sugawara *et al.*, 2002), *Plasmodium yoelii* (Mannoor *et al.*, 2001) e *Leishmania major* (Ishikawa *et al.*, 2000). Quando camundongos são infectados endovenosamente com esporozoítas de *Plasmodium berghei* e *P. yoelii* e tratados com a α -GalCer, observou-se parasitemia reduzida (González-Aseguinolaza *et al.*, 2000).

Zajonc *et al.*, 2008 mostraram a estrutura cristalizada do complexo CD1d-iGb3. A cadeia ceramida de cada antígeno é geralmente ancorada dentro de um “groove” de ligação hidrofóbica, onde no pocket A’ liga-se a cadeia de ácido graxo e no pocket F’ insere-se a esfingosina. A parte glicídica encontra-se na porção externa ao CD1 para ser reconhecida e interagir com TCR de linfócitos NKT.

Giabbai *et al.*, 2005, também mostraram a estrutura cristalizada de CD1d murino nesse trabalho ligado a fosfatidilcolina, com ácidos graxos contendo dupla ligação *cis* apresentando melhor ligação ao pocket A’ do CD1d murino, o mesmo não sendo observado para a ligação insaturada *trans*.

Rauch *et al.*, 2003 demonstraram que um hibridoma de células NKT murinas reconheceu moléculas de fosfatidiletanolamina que continham pelo menos uma cadeia acil insaturada em configuração *cis*, e que a intensidade da ligação ao CD1d aumentava de acordo com o aumento da insaturação. Fischer *et al.*, 2004 relataram que fosfatidilinositol

manosídeo isolado de micobactérias foi capaz de induzir células NKT humanas e murinas a secretar IFN- γ .

1.4 Lipídeos

Um número cada vez maior de pesquisadores tem demonstrado que moléculas de natureza lipídica como gangliosídeos, esfingolipídeos neutros e fosfo-esfingolipídeos, âncoras de glicosilfosfatidilinositol entre outros, interagem com células do sistema imune induzindo respostas estimulatórias assim como imunossupressoras, sugerindo que receptores lipídicos podem ser muito importantes na regulação da resposta imune.

Células responsáveis pela resposta imune inata (macrófagos, células dendríticas, células NKT), assim como células responsáveis pela resposta imune adaptativa (linfócitos T e B) respondem a estímulos induzidos por determinadas moléculas de natureza lipídica, como esfingosina-1-fosfato (S1P) que é um esfingolipídeo implicado na regulação de funções celulares cardíacas (Liliom *et al.*, 2001; Sugiyama *et al.*, 2000b) e pressoras (Sugiyama *et al.*, 2000a) tendo sua concentração livre no organismo regulada pela atividade de fosfatases (Mandala *et al.*, 2000), limitando assim os efeitos colaterais desta molécula.

É um conhecimento clássico que moléculas lipídicas isoladas de microorganismos patogênicos para o homem são capazes de interagir com células do hospedeiro. A mais estudada é o LPS (lipopolissacarídeo), isolado da membrana externa de bactérias Gram-negativas, o qual, ao interagir com a proteína-ligante de LPS e CD14, promove a formação de agregado com TLR-4 (Toll-like receptor-4), que ativa a expressão de genes de moléculas pro-inflamatórias através de sinalização por NF- κ B e MAP quinase.

Diversos estudos foram recentemente desenvolvidos com lipoglicanos de parasitos. Ancoras GPI altamente purificadas isoladas de *Trypanosoma cruzi* reagiram com TLR-2 (Toll-like receptor-2) e induziram a produção de IL-12, TNF- α e NO por macrófagos murinos e humanos (Campos *et al.*, 2001). Um GIPL (glicoinositolfosfolipídeo) isolado desse mesmo parasita quando associado a LPS apresentou atividade imunoregulatória sobre macrófagos e células dendríticas humanas, reduzindo a expressão de moléculas de MHC

classe I, CD86, CD40, e redução na secreção de TNF- α , IL-10 e IL-12, sendo a porção ceramida da molécula a responsável pela maior parte das atividades apresentadas (Brodszyn *et al.*, 2002).

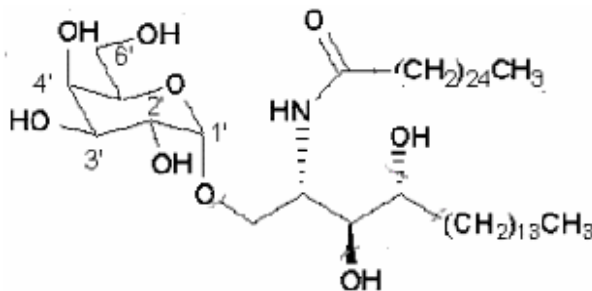
Durante a resposta de fase aguda, a interação de HDL (high density lipoproteins) e LDL (low density lipoproteins) ativa enzimas complexadas a elas, induzindo o aparecimento de espécies oxidadas de LDL, que apresentam atividade pro-inflamatória. Essas moléculas oxidadas, cujo maior componente é a lisofosfatidilcolina, ligam-se à receptores acoplados à proteína G e promovem a diferenciação de monócitos em células dendríticas maduras, capazes de secretar IL-12 mas não IL-10 e de estimular a produção de IL-2 e IFN- γ por linfócitos T singênicos e alogênicos. Essa atividade pode ser inibida por excesso de LDL nativo, refletindo as condições de homeostase do indivíduo e sugerindo que um aumento na concentração de fosfolípidos seja um sinal endógeno de ativação do sistema imune, altamente controlado por lipoproteínas durante a resposta de fase aguda (Perrin-Cocon *et al.*, 2001; Coutant *et al.*, 2002).

Outros trabalhos têm comentado sobre o reconhecimento de moléculas com características lipídicas por células NKT. Entre eles estão o de Kinjo *et al.*, 2005, que descreve o reconhecimento de um glicosíngolípido de *Sphingomonas*, uma bactéria gram-negativa que não contém lipopolissacarídeo. Frações glicolípídicas isoladas da parede celular de *M. tuberculosis* contendo fosfatidilinositolmanosídeos foram as responsáveis pelo recrutamento de células NKT para as lesões granulomatosas, onde células NKT são os leucócitos predominantes (Apostolou *et al.*, 1999). Todavia, animais deficientes em CD1d comportavam-se exatamente da mesma forma que os selvagens quando infectados com *M. tuberculosis* (Behar *et al.*, 1999). Quando tratados com α -GalCer, no entanto, camundongos infectados com *M. tuberculosis* apresentaram um aumento no recrutamento de linfócitos ao pulmão, redução de CFU (colony forming units) micobacteriana pulmonar e aumento na sobrevivência (Chackerian *et al.*, 2002)

1.4.1 α -Galactoceramida

Até pouco tempo, o único ligante de CD1d descrito, capaz de eficientemente estimular e proliferar células NKT com TCR invariante era a α -galactosilceramida (α -

GalCer), um glicolipídeo com açúcar α -anomérico contendo uma cadeia acilada de 26 carbonos e esfingosina, isolada da esponja marinha, *Agellus mauritanus*, pela Kirin Brewery Company (Japão).



Embora a ligação dessa molécula e de seu equivalente sintético, KRN7000, provoque forte secreção de IL-4 e IFN- γ por células NKT, o glicolipídeo não foi isolado em células de mamíferos e outros organismos, que são incapazes de sintetizar glicosfingolipídeos com terminais de α -GalCer (Brutkiewicz & Sriram, 2002, Wilson *et al.*, 2002).

Há estudos que mostram a importância da variação nas porções N-acil de moléculas de α -galactosilceramidas no reconhecimento por NKT restritas a CD1d. Conforme descrito por Yu *et al.*, 2005, uma molécula com 20 carbonos e duas insaturações no ácido graxo tem sua apresentação por células apresentadoras de antígeno não profissionais facilitada comparativamente à α -GalCer KRN7000, tida com ativadora clássica de linfócitos NKT via CD1d.

Brossay, 1998 relata que α -Galcer contendo esfingosina com 18 carbonos é capaz de estimular mais eficientemente células NKT restritas a apresentação via CD1d do que α -GalCer composta por uma esfingosina com um número menor de carbonos. Da mesma forma, uma cadeia de ácido graxo composta por 26 carbonos foi mais eficiente na estimulação do que aquelas moléculas que possuíam 2 carbonos a menos.

Kronenberg (2005) também cita os efeitos da alteração na estrutura molecular de α -GalCer. Um análogo de α -GalCer com a base esfingóide mais curta, OCH, apresentou maior secreção de IL-4 do que IFN- γ quando adicionado a esplenócitos em cultura. A secreção de citocinas do tipo Th2 está correlacionada com a redução do comprimento da cadeia alifática de OCH. Em contraste, molécula C-glicosídica análoga a α -GalCer

estimulou mais a produção de IFN- γ que IL-4 por células NKT murinas, conforme descreveram Schmieg *et al.*, 2005.

1.4.1.1 Tratamentos com α -GalCer

Inquéritos clínicos (clinical trials) utilizando injeções endovenosas de α -GalCer foram realizados como descreve Giaccone *et al.*, 2002. As doses foram bem toleradas pelos pacientes, entretanto um aumento nos níveis de citocinas TNF- α e GM-CSF foi observado somente em pacientes com altos níveis de células NKT Va24, sem efeito antitumoral.

Em compensação, estudos com células dendríticas pulsadas com α -GalCer aumentaram a resposta antitumoral em camundongos, tendo esse tratamento ativado células NKT *in vivo*, inibindo a metástase tumoral. Uma completa inibição de metástases de melanoma B16 no fígado foi observada com esse tratamento (Toura *et al.*, 1999).

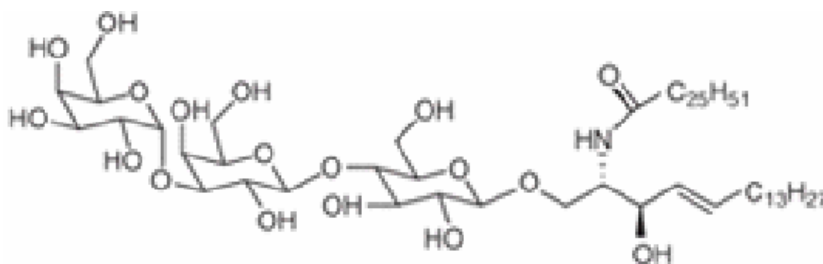
Em 2005 Ishikawa *et al.*, avaliaram em estudos clínicos de fase I que, de 11 pacientes com câncer de pulmão em estágio avançado, tratados com injeções endovenosas de células dendríticas pulsadas com α -GalCer, 1 paciente depois da primeira e segunda dose do tratamento teve um aumento significativo de células NKT Va24 no sangue periférico. Dois outros pacientes apresentaram respostas significativas após a terceira dose. Nieda *et al.*, 2004 também desenvolveram um estudo com esse mesmo tratamento em pacientes com metástases malignas, mostrando que linfócitos NKT ativados induziram uma ativação de células T e NK e aumentaram os níveis séricos de IFN- γ . Efeitos benéficos desse tratamento foram observados igualmente em pacientes com adenocarcinoma.

A α -GalCer exerce um efeito tão intenso de ativação de células NKT com uma única administração que elas ficam anérgicas a re-estimulação por pelo menos 30 dias (Sullivan *et al.*, 2005; Parekh *et al.*, 2005). Além disso α -GalCer ativa células iNKT a produzir citocinas do tipo 1 e 2 limitando sua eficácia. Derivados químicos desse glicoesfingolípido com ceramidas modificadas estão sendo investigados tendo como alvo respostas imunes especificamente ligadas a um tipo, Th-1 ou Th-2 (Savage *et al.*, 2006).

1.4.2. Isoglobosilceramida

Existem evidências de respostas imunes do tipo Th-1 contra patógenos exógenos que seriam induzidas por células iNKT após o reconhecimento de um ligante endógeno na presença de IL-12. Esse ligante foi identificado como iGb3 (Mattner *et al.*, 2005). Contudo, células iNKT podem reconhecer outros antígenos endógenos (Porubsky *et al.*, 2007) e portanto o microambiente de diferentes tecidos ou tipos de inflamação podem determinar o fenótipo da produção de citocinas por células iNKT.

A molécula de iGb3 é um glicoesfingolípídeo neutro contendo 3 hexoses (2 galactoses e 1 glucose) ligadas a ceramida.



O glicosídeo globotriaosilceramida (Gb3) é o principal glicoesfingolípídeo neutro de leucócitos, plaquetas, fígado, baço e a maioria de outros tecidos não neurais. É o determinante P^k no sistema P de grupo sanguíneo. A sua estrutura contém uma galactose terminal ligada α -(1-4) a β -lactose. A forma isogloblo (iGb3) contém, ao invés disso, uma galactose terminal ligada α -(1-3) a β -lactose, e está presente em concentrações muito inferiores ao Gb3. O iGb3 mas não Gb3 é capaz de estimular células NKT de maneira similar a a-GalCer.

Zhou *et al.*, 2004 reforçam a importância da estrutura da molécula que se liga ao CD1d. Da mesma forma que Gb3 e iGb3, existem as isoformas Gb4 e iGb4. Gb4, ou globotetraosylceramida é o determinante P com a estrutura: GalNAc(β 1-3)-Gal(α 1-4)-Gal(β 1-4)-GlcCer. O iGb4 tem a Gal subterminal ligada α -(1-3) a lactose-ceramida. Os autores mostraram que isoglobotetraosilceramida não estimula linfócitos NKT, porém

quando a β -hexosaminidase (enzima lisossomal) remove a porção terminal GalNAc desta molécula, gera iGb3 (isoglobotrihexosilceramida) que apresenta ação estimulatória ao linfócito, demonstrando assim que a alteração da molécula através do processamento de iGb4 em iGb3 é importante para o reconhecimento e ativação de NKT. Ainda nesse trabalho, quando células DN32.D3 são estimuladas com iGb3 e SAP B, ocorre maior produção de IL-2. Os autores sugerem que iGb3 possa ser um ligante endógeno do V α 14 murino.

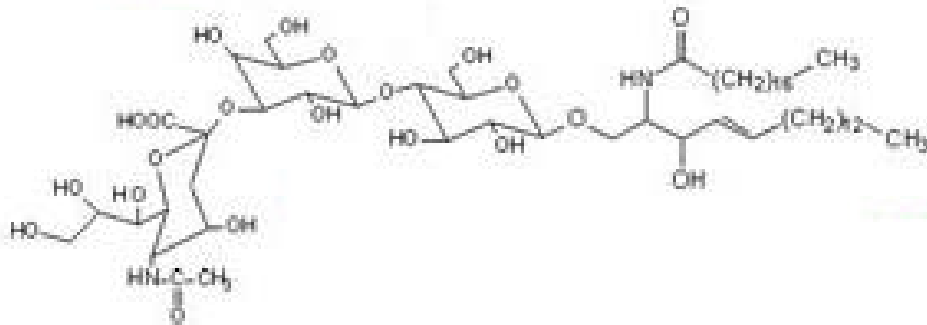
Zhou, 2006 e Mattner *et al.*, 2005 obtiveram dados semelhantes, e sugeriram que a expressão de iGb3 em tecidos periféricos esteja envolvida no controle da resposta de células NKT contra infecções, tumores e doenças auto-imunes.

Em alguns trabalhos iGb3 não foi encontrado quando timo e células dendríticas humanas e murinas foram analisadas em HPLC (Speak *et al.*, 2007), apesar do RNA mensageiro de iGb3 sintase ter sido detectado em diversos tecidos murinos incluindo no timo (Milland *et al.*, 2006; Porubsky *et al.*, 2007). Outro trabalho (Christiansen *et al.*, 2008) sugere que a falta de iGb3 seria devida a ausência de uma iGb3-sintase funcional em humanos. Em contraste a esses resultados, tetraglicosilceramidas de isoglobo e globo séries foram recentemente identificados no timo humano, assim como iGb3 e iGb4 foram identificados no timo murino por ESI-LIT-MS extremamente sensível (Li *et al.*, 2008a, 2008b, 2009).

Um dos componentes que pode se ligar ao iGb3 é uma lectina de *Bandeiraea simplicifolia*, especificamente a isolectina B4 (BSI-B4) que tem grande afinidade pela porção terminal de resíduos a-D- galactosil.

1.4.3. Gangliosídeos

Os gangliosídeos são formados por uma ceramida, pelo menos duas moléculas de hexoses complexadas a pelo menos um ácido siálico, que pode ser ácido *N*-acetilneuramínico ou ácido *N*-glicolilneuramínico. Essa molécula em particular refere-se ao gangliosídeo GM3.



Os gangliosídeos tem diversas funções biológicas incluindo a modulação do sistema imunológico. Essas moléculas estão diferencialmente expressas em diversas células neoplásicas se comparadas com suas correspondentes normais, além de estarem envolvidas na progressão tumoral e na imunossupressão de uma resposta antitumoral produzida pelo hospedeiro.

Gangliosídeos secretados por tumores de origem neuroectodérmica (neuroblastoma e melanoma) interferem na maturação de células dendríticas. Na presença de GM2, precursores monocíticos mostram aderência aumentada, expressão reduzida de MHC classe II, de moléculas estimulatórias e receptor para GM-CSF (CD116), bem como reduzida estimulação de linfócitos T, células dendríticas maduras não foram afetadas pela presença do gangliosídeo. Os autores sugerem que a diferenciação interrompida por GM2 dos precursores de células dendríticas possa ser um mecanismo de escape tumoral (Wolfl *et al.*, 2002). Anticorpos anti-gangliosídeos (ex. GD3, GD2, GM2) reagem com células de melanoma as quais hiper-expressam esses glicolipídeos. Um anticorpo monoclonal (R24), específico pra GD3, foi utilizado para a regressão de lesões metastáticas de melanoma humano (Houghton *et al.*, 1985).

Moléculas do gangliosídeo GM3 contendo ácido *N*-glicolilneuramínico foi capaz de modular negativamente a expressão de células T CD4⁺ murinas, especialmente quando essas células não estavam ativadas (de León *et al.*, 2006). Da mesma forma Deng et al., 2000 mostrou que células de melanoma MEB4 (ricas em GM3) depletadas do gangliosídeo endógeno [através do tratamento com 1-phenyl-2-hexadecanoylamino-3-pyrrolidino-3-propanol (PPPP)], apresentou baixa capacidade tumorigênica quando injetadas em camundongos.

Anteriormente, em 1987, Ladish *et al.*, já havia relatado que entre várias células da sublinhagem de linfoma AKR, as que apresentavam maiores concentrações de gangliosídeos eram altamente tumorigênicas e tinham mais capacidade metastática. Estas publicações demonstram a atividade inibitória dos gangliosídeos sobre o sistema imune, dando suporte a nossa hipótese que gangliosídeos presentes no melanoma murino B16F10 regulam negativamente a atividade estimulatória de outros componentes lipídicos dessas células.

Células dendríticas derivadas de medula óssea, tratadas com GD3 e GM3 antes da maturação induzida por LPS, tiveram suprimidas a expressão de CD40, CD80, CD86 e MHC II, além de apresentarem uma queda na produção das citocinas IL-6, IL-10, IL-2 e TNF- α no ensaio com GD3 (Bronnum *et al.*, 2005).

Shurin, 2001 já havia demonstrado por citometria de fluxo que o gangliosídeo GD2 derivado de células tumorais de neuroblastoma murino (N2a), conferiu significativa redução de CD11c, CD86 e MHC II em células dendríticas de camundongo tratadas em cultura com o gangliosídeo.

É sabido que linhagens de melanoma murino e humano liberam (“shedding”) antígenos tumorais no meio de cultura e isso ocorre igualmente *in vivo*.

Aparentemente, entre os glicolipídeos liberados, e atuando em baixas concentrações, alguns são estimulatórios de respostas imunes como as que envolvem células NKT, e outros são imunomoduladores negativos como os gangliosídeos. O crescimento tumoral é combatido pelas células iNKT (produtoras de IFN- γ) mas é favorecido pelos gangliosídeos

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho centraram-se na obtenção e identificação de um composto lipídico do melanoma murino B16F10-Nex2 capaz de estimular células NKT a exercer uma atividade imune antitumoral. Eles se basearam na determinação prévia de que células NKT tem um papel importante na imunidade inata contra o melanoma num modelo singênico.

Nossos esforços procuraram pois:

- Obter frações lipídicas provenientes de protocolos de extração lipídica de melanoma murino obtido de crescimento *in vivo*;
- Testar as frações obtidas nos protocolos de extração lipídica quanto ao seu potencial de ativação de hibridomas de células NKT;
- Obter células apresentadoras de antígenos provenientes de medula óssea em especial células dendríticas (BMDC);
- Em colaboração com a Universidade do Texas El Paso (Prof. Igor C. Almeida), identificar possíveis lipídeos estimulatórios utilizando espectrometria de massa (ion-trap);
- Realizar ensaios de citotoxicidade de hibridomas NKT ativados após cultivo com BMDC primadas com iGb3 contra células tumorais B16F10-Nex 2;
- Realizar ensaios *in vivo* com BMDC incubadas com glicosfingolipídeos a fim de testar a proteção com esse tratamento contra a metástase pulmonar por células de B16F10-Nex2.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57Bl/6 machos de seis a oito semanas (WT), adquiridos do Biotério do ICB-USP e camundongos C57Bl/6 machos geneticamente deletados de CD1d (KO) da mesma idade, cedidos pelo professor Ricardo T. Gazzinelli (UFMG). Os camundongos foram mantidos no CEDEME (UNIFESP) em condições “spf” (sala isolada de acesso restrito, em isoladores, com água, ração e serragem autoclavadas, e manipulação em fluxo laminar). Todas as experiências com animais foram aprovadas pelo Comitê de Ética da UNIFESP.

3.2 Células

Células B16F10-Nex 2, sublinhagem isolada na UNONEX-UNIFESP do melanoma murino B16F10, foram mantidas em meio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, GIBCO). A linhagem B16F10 foi isolada por Fidler (1975) de um tumor espontâneo e é singênica em camundongos C57Bl/6.

Em alguns experimentos foram utilizados fibroblastos murinos (linhagem RBL) transfectados com o gene de CD1d murino (fibroblastos-CD1d), cedidos pelo professor Ricardo T. Gazzinelli, foram mantidos em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB em presença do antibiótico G418 (Geneticin, GIBCO). Hibridomas DN32.D3 (NKT), também cedidos pelo professor Ricardo T. Gazzinelli foram mantidos em um meio de cultura constituído de 50% de RPMI e 50% de α -MEM (GIBCO), suplementado com 5% SFB, 2mM de L-glutamina, 100U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina e 50 μ M de 2- β -mercaptoetanol, todos os reagentes adquiridos da Gibco.

Células L929 (NCTC clone 929), um fibrossarcoma murino capaz de produzir TNF, foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% SFB. Quando as células estavam quase com 70% de confluência o meio foi trocado, as células foram lavadas na garrafa com PBS 1x e adicionado 50 ml de meio para a garrafa de 150 cm². O meio foi recolhido a cada sete dias e testado para micoplasma, e os sobrenadantes negativos foram centrifugados por 5 minutos a 2.000 rpm, filtrados e congelados a -20° C, originando o meio L usado na diferenciação dos macrófagos.

3.3 Reagentes

a-Galactosilceramida (cedida pelo Prof. Dapeng Zhou, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX), foi utilizada como ligante clássico na estimulação de hibridomas NKT e ensaios *in vivo*.

GD3 e GM3 (Matreya, USA), foram utilizados para cromatografias HPTLC e ensaio de estimulação do hibridoma DN32.D3 *in vitro*.

Isoglobotrihexosilceramida (Aléxis Biochemical) foi utilizado como padrão em cromatografias HPTLC, para ensaios de immunostaining, estimulação de hibridoma NKT e ensaios *in vivo*.

Metanol, clorofórmio, 1-butanol, diisopropil-éter, n-propanol, acetona (Merck), e hidróxido de amônia (QUIMIS), coluna Sep-Pak Plus C18 (Waters) foram utilizados nas extrações de frações lipídicas de células tumorais, e placas de TLC (thin layer chromatography) de alumínio com sílica (Merck) para a verificação da composição geral das frações tumorais de natureza lipídica obtidas.

As placas de TLC foram reveladas com solução de resorcinol (USB) – HCl (200mg de resorcinol diluídos em 80mL de HCl e 0,25 mL de 0,1M de sulfato de cobre, completando o volume para 100mL com água), coloração específica para resíduos de ácido siálico, a 150°C durante 10 minutos. Os glicoconjugados foram revelados com solução de orcinol (USB) – H₂SO₄ (0,5g de orcinol em 100mL de 3M de ácido sulfúrico) a 130°C, lipídeos e fosfolipídeos foram revelados com uma solução de ácido orto-fosfórico (5,16g de sulfato de cobre pentahidratado diluído em 80 mL de água, adicionado de 9,4 mL de ácido

orto-fosfórico, volume final de 100mL com água) a 180°C; fosfolipídios especificamente, foram corados com solução de molibdênio (SIGMA) (4g de trióxido de molibdênio dissolvido por aquecimento em 50mL de ácido sulfúrico) à temperatura ambiente, e lipídeos foram visualizados através de iodo sublimado à temperatura ambiente.

3.4 Ensaio de citometria de fluxo (FACS)

Entre 5×10^5 a 10^6 células/marcador foram lavadas uma vez com PBS-BSA (Sigma) 1% e centrifugadas a 1.500 rpm por 3 minutos. As células foram novamente lavadas uma vez com PBS, centrifugadas e o pellet ressuspendido em 60µl de PBS contendo 2µl do anticorpo biotilado conjugado com o fluorocromo, sendo em seguida incubadas em gelo durante uma hora. Lavou-se duas vezes com PBS e 500 µl de paraformaldeído 2% foi adicionado para fixação, seguindo-se a leitura das amostras em equipamento FACScalibur, Becton and Dickinson.

As células DN32.D3 foram incubadas com anticorpos reativos para os seguintes marcadores: NK1.1-FITC, $\nabla\beta$ 8-PE e CD3 ϵ -PE. Os fibroblastos transfectados com CD1d foram incubados com anticorpos contra MHC classe I-FITC e CD1d-FITC. Células dendríticas provenientes de medula óssea (BMDC) foram marcadas para CD1d-FITC, CD86-FITC, CD80-FITC, CD11c-PE, MHC I-FITC e MHC II-FITC. Macrófagos de medula óssea foram marcados com F4/80-FITC, CD1d-FITC, MHC II-FITC, CD11b-PE e CD11c-PE.

Todos os anticorpos utilizados foram da Pharmingen.

3.5 Obtenção de células tumorais crescidas *in vivo*

Para extração das frações lipídicas das células B16F10-Nex 2, optou-se pela utilização das células crescidas *in vivo*, ao invés das células cultivadas *in vitro*, chegando desta forma mais próximo da forma nativa de desenvolvimento tumoral. Animais C57Bl/6 foram injetados subcutaneamente com 5×10^4 células em 100 µl. O crescimento tumoral foi

acompanhado com paquímetro a cada dois ou três dias a partir do surgimento de nódulo tumoral. O cálculo do volume tumoral foi realizado utilizando-se dois diâmetros, sendo o diâmetro maior **D** e o menor **d**, compondo a seguinte fórmula: $V = (D \times d^2) 0,52/1000$ (cm³). A fórmula baseia-se num volume apresentando uma forma geométrica elíptica. Em todas as circunstâncias todos os animais foram sacrificados com tumores máximos subcutâneos de 3 cm³.

Para efeito de obtenção dos tumores para extração asséptica de lipídeos, volumes de 1cm³ foram utilizados. Antes do armazenamento, uma amostra foi retirada com alça de platina flambada e colocada em 5 ml de meio LB para controle de contaminação bacteriana e uma outra alíquota foi utilizada para verificação de contaminação por *Mycoplasma sp.* Alguns tumores foram congelados a -70°C e outros foram congelados e liofilizados.

3.6 Obtenção de células apresentadoras de antígeno (APCs)

3.6.1 Células monocíticas provenientes de precursores da medula óssea

Ossos femurais de camundongos machos C57Bl/6 foram excisados e limpos, retirando-se toda a musculatura a eles aderida, lavados em álcool 70%, posteriormente em álcool iodado e por último em PBS 1X/antibiótico [50 ml de PBS 1X, 500 µl de penicilina/estreptomicina (100x) e 50 µl de garamicina (40 mg/ml)]. As epífises foram cortadas com o auxílio de uma tesoura estéril e as células da medula óssea foram obtidas após a lavagem do seu interior utilizando-se seringa. Para cada fêmur foi utilizado 10 ml de meio de diferenciação (meio RPMI + 30% meio L + 20% SFB), e as células foram plaqueadas em placas de Petri. No quarto dia a partir da extração foi adicionado à placa de Petri mais 10 ml de meio de diferenciação. As células foram mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37° C e estavam aptas a serem utilizadas para os ensaios de ativação no sétimo dia após a extração.

A maturação de macrófagos a partir de precursores medulares foi confirmada pela presença de marcadores específicos em FACS como descrito a seguir: CD11c, CD1d, CD11b, MHC II, F4/80.

3.6.2 Células dendríticas provenientes de precursores de medula óssea

A mesma técnica descrita no item anterior foi utilizada e as células de medula óssea foram obtidas após a lavagem interna dos ossos femurais com 10 mL de uma solução de PBS/antibióticos [50 ml de PBS 1X, 500 µl de penicilina/estreptomicina (100x) e 50 µl de gamicina (40 mg/ml)] utilizando-se seringa. As células foram centrifugadas por 3 minutos a 1.000 rpm, e ressuspensas em meio para diferenciação (RPMI suplementado com 10% SFB, aminoácidos não-essenciais (50x) GIBCO, 50 µM β-mercaptoetanol GIBCO, 30 ng/ml de GM-CSF PEPROTECH e 10 ng/ml de IL-4 PEPROTECH), sendo então plaqueadas 2,5x10⁶ células/ 800 µl/ well em placas de 24 poços. No terceiro e sexto dias a partir da extração o meio foi trocado lentamente e as células mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. As células estavam aptas a serem utilizadas para os ensaios no sétimo dia após a extração.

A maturação de células dendríticas a partir de precursores medulares foi confirmada pela presença de marcadores específicos em FACS citados a seguir: CD11c, CD1d, MHC I, F4/80, CD80, CD86

3.7 Detecção de Mycoplasma sp. através da técnica de PCR

A fim de excluir contaminação com *Mycoplasma sp.* dos tumores crescidos *in vivo*, a amostra foi aquecida durante 5 minutos a 95°C com 50 µl de tampão LOTE (3 mM de Tris-HCl pH 7,5, 0,2 mM de EDTA) e 10 µl dessa solução foram incubados com 10 pmol/µl de primers sense 5'GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG 3' e anti-sense 5'CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT 3', 50 mM de MgCl₂, buffer 10x para PCR (200 mM

Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCL), 10 mM de dNTP , 5 U (1µl) de Taq e água para um volume final de 30 µl (todos os reagentes são da GIBCO).

A reação foi realizada em aparelho termociclador PTC-200 (MJ Reaearch), em 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1,5 minutos, com uma extensão final de 72°C por 10 minutos, mantendo-se a reação a 4°C ao final. Os produtos obtidos foram analisados em gel de agarose 1,2% e o fragmento esperado deve conter aproximadamente 350 pb.

Todas as células utilizadas nos ensaios de estimulação de DN32.D3 também foram testadas para *Mycoplasma sp.* Retiramos 1 ml de cada cultura de células, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e adicionado tampão LOTE como descrito acima.

3.8 Preparo de lisado de células B16F10 -Nex 2 crescidas in vivo

Foi utilizado o método de lise das células tumorais com nitrogênio líquido alternando congelamento e descongelamento do tumor. O tumor foi primeiramente macerado com êmbolo de seringa em placa de Petri adicionando-se 5 ml de PBS 1x e transferido para um tubo Falcon de 15 ml, e colocado para repousar por 10 minutos. Com pipeta Pasteur somente o sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon com 50 ml e o volume completado com PBS 1x, o sobrenadante foi filtrado em filtro “Cell Strainer” (COSTAR) com pipeta, centrifugado e lavado com PBS 1x por 5 minutos a 1.500 rpm. O procedimento foi repetido três vezes.

3.8.2 Obtenção de Lisado com nitrogênio líquido (NL)

O sobrenadante foi transferido para tubo Falcon de 50 ml e passou por sessões consecutivas de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho a 37° C. O procedimento foi realizado 6 vezes e a eficiência da lise foi verificada em microscópio

óptico, o sobrenadante após centrifugação a 1.500 rpm foi reservado para a ultracentrifugação.

3.8.3 Ultracentrifugação dos lisados e obtenção das frações membranas e citosólica

Os sobrenadantes foram transferidos para tubos utilizados em rotor SW 41ti, e ultracentrifugados por 1h 30 minutos a 100.000g. O sobrenadante (referente ao citosol - NLc) foi separado do pellet (referente à membrana - NLM) e as amostras foram irradiadas com 30.000 rads a fim de esterilizar a amostra, estando essas prontas para os ensaios de estimulação. As frações foram padronizadas pela quantidade em mg/ml de proteína presente nas amostras.

3.9 Obtenção de frações lipídicas a partir do melanoma murino B16F10-Nex 2

Foram utilizados três protocolos de extração lipídica dos tumores crescidos *in vivo*. O **Protocolo A** utiliza a clássica partição de Folch. Sobre 200 mg de tumor liofilizado foi adicionado 1 ml de solução de clorofórmio : metanol (C:M) 1:1 (v/v) e agitado em vortex à temperatura ambiente em alta velocidade por 1 minuto, sendo em seguida a amostra centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos. Todos os sobrenadantes foram recolhidos e o processo foi repetido três vezes sobre o pellet. Dos sobrenadantes recuperados, parte foi reservada e parte foi evaporada em fluxo de nitrogênio gasoso (N₂). Ambas as partes foram consideradas como primeira fração denominada **F1A**. O pellet sofreu nova extração com os solventes clorofórmio : metanol : água (C:M:W) 1:2:0,8 (v/v/v) a extração foi realizada por três vezes obtendo dos sobrenadantes combinados a segunda fração, **F2A**.

À fração **F1A** foram adicionados 6 ml de clorofórmio : metanol (2:1) com 1 ml de água, a mistura foi vigorosamente agitada em vortex e centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos gerando duas fases, a fase superior (**F3A**) e a fase inferior (**F4A**). Assim como a

fração **F1A**, parte do sobrenadante de **F4A** foi reservado e a outra parte foi seca em N₂. Sobre **F4A** seca adicionamos 5 ml de clorofórmio : metanol : água 1:100:100. Essa mistura foi vortexada e centrifugada (da mesma forma descrita acima) obtendo duas novas fases correspondentes às frações **F5A** e **F6A**.

Foi utilizado um segundo protocolo de extração de componentes lipídicos das células tumorais, o **Protocolo B**, onde 1g de tumor liofilizado foi sonicado em 20 ml de clorofórmio : metanol 1:1 (v/v), o tubo preenchido com nitrogênio gasoso, fechado hermeticamente e a mistura foi agitada com magneto por 18 horas a 4°C. A amostra foi então centrifugada a 2.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para outro tubo. O pellet foi re-extraído com clorofórmio : metanol 1:1 por 4 horas a 4°C. Os sobrenadantes foram combinados e reduzidos a ¼ do volume em N₂ e deixado por 18 horas a -20°C. A amostra foi novamente centrifugada e o sobrenadante originou a fração **F1B**, que foi seca em N₂ e liofilizado. Ao material liofilizado adicionou-se diisopropiléter (DIPE) : 1-butanol 3:2, agitou-se no vortex e em seguida a mistura foi sonicada por 1 minuto, adicionando 0,3% de NaCl aquoso (10 ml para cada 1 g de tumor). A amostra foi novamente agitada em vortex seguida de sonicção por 2 minutos, centrifugada a 2.000 rpm por 10 minutos, originando uma fase superior (**F2B**) e uma fase inferior (**F3B**). Sobre a fase inferior adicionou-se 20 ml DIPE : 1-butanol 3:2. A amostra foi agitada em vortex, e sonicada por 2 minutos, centrifugada, originando uma nova fase superior (**F4B**) e inferior (**F5B**).

No **Protocolo C** ao tumor não liofilizado adicionou-se 3 mL de água; ele foi macerado em um homogeneizador de tecidos tipo Potter, mantendo-se sempre a amostra em gelo. Em seguida, adicionamos metanol, a amostra foi agitada, e finalmente completamos com clorofórmio na proporção final de clorofórmio : metanol : água (C:M:W) 4:8:3. A amostra foi agitada em agitador orbital em temperatura ambiente por 1 hora, centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos, e os sobrenadante reservado. O pellet foi re-extraído com C:M:W 4:8:3, e todos os sobrenadantes foram combinados observando o volume exato obtido. Aos sobrenadantes combinados que continham a concentração de C:M:W 4:8:3, adicionou-se água até obter a proporção 4:8:5,6. Após essa etapa a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 rpm, formando uma fase superior (**F1C**), e uma inferior (**F2C**). A fração F2C foi seca em nitrogênio e foi re-extraída com C:M:W 4:8:5,6 ,

combinando a fase superior à **F1C**. A fase **F1C** foi seca em nitrogênio e ressuspensa em 3 mL de C:M:W 2:43:55 e purificada em coluna SepPak C18. A eluição do material da coluna foi feita com 3 ml metanol 100% seguida de 3 ml de C:M 1:1. A combinação de ambos eluentes originaram a fração **F3C**.

Todas as frações obtidas foram mantidas secas, a -20°C , sendo todas as frações diluídas em metanol, exceto F2C que é diluída em clorofórmio, antes de serem cromatografadas. Para um primeiro ensaio de estimulação do hibridoma DN32.D3, as frações foram diluídas em 500 μl e uma alíquota de 50 μl foi retirada e transferida para um tubo estéril. Essas alíquotas foram secas em nitrogênio e posteriormente ressuspensas em de meio RPMI 1640, diluídas e incubadas com as células como descrito no ensaio de estimulação.

Após essa etapa, todas as amostras foram padronizadas por peso seco obtido na fração.

3.10 Dessalinização das frações

As frações foram passadas por uma coluna SepPack C18 (WATERS) para retirar contaminantes por sais. A coluna foi lavada com o auxílio de uma seringa de vidro com 5 ml de água destilada, 3 ml metanol : água 1:1, 3 ml metanol, 3 ml metanol : água (1:1) e equilibrada com clorofórmio : metanol : água (C:M:W) 2:43:55. Cada amostra foi diluída em 1 ml de C:M:W 2:43:55 e aplicadas na coluna. O material não ligado foi recolhido e testado em TLC para certificar que toda a amostra estava ligada na coluna. Lavamos a coluna com 10 ml de C:M:W 2:43:55 para retirar excesso de contaminantes e então a amostra foi eluída com 4 ml de metanol e 4 ml de C:M 1:1. Todas as frações obtidas foram mantidas secas, a -20°C .

3.11 Cromatografia de Camada Delgada (TLC)

Todas as frações obtidas foram diluídas em 500 µl de C:M 1:1 e foram aplicados 4 µl de cada uma delas em placas de alumínio com sílica para cromatografia (Merck). As amostras foram cromatografadas em cuba de vidro contendo uma solução de clorofórmio : metanol : 0,25% KCl aquoso na proporção de 60:35:8. Alteramos a fase móvel (solvente) para HPTLC a fim de melhorarmos a visualização das bandas lipídicas, passamos a utilizar a combinação de n-propanol: NH₄OH: água na proporção 60 : 9,5 : 11,5.

Por fim com o mesmo objetivo alteramos novamente o sistema de solvente para C:M:W 60:35:8, permitindo que as bandas nas TLCs não migrassem até o front e possibilitando a migração de todo iGb3 aplicado.

As placas foram secas e reveladas com iodo, resorcinol, orcinol, solução de sulfato de cobre e molibdênio e queimadas em estufa nas temperaturas de 25°C, 150°C, 130°C, 180°C e temperatura ambiente, respectivamente. Todas as placas coradas foram fotografadas com câmera digital.

3.12 Ensaio de ativação do hibridoma DN32.D3

3.12.1 Ensaio com fibroblastos – CD1d como células apresentadoras de antígenos

Fibroblastos-CD1d foram plaqueados em placas para cultura com 96 poços, 5x10⁴ células/50 µl/poço. Após 1 hora, quando as células já estavam aderidas, o meio foi aspirado adicionando-se em seguida 100 µl/poço de α-galactosilceramida (α-GalCer), diluído em meio RPMI 10% SFB com 5% DMSO, partindo-se da concentração de 10 ng/mL e realizando-se diluições seriadas até 1,25 ng/mL. A cada diluição seriada realizada a suspensão foi sonicada por 1 minuto em banho com gelo. Incubou-se as células por 4 horas em estufa com 5% CO₂ a 37°C, e em seguida adicionou-se o hibridoma DN32.D3, 5x10⁴ células/100 µl/poço incubando-se a reação por 18 horas em estufa com 5% CO₂ a 37°C. Ao término do período de incubação, recolheu-se o sobrenadante para dosagem da IL-2 secretada pelo hibridoma estimulado via ligação com CD1d expressando o antígeno. Em alguns experimentos, o protocolo sofreu algumas variações na quantidade de DMSO

utilizada e no tempo de incubação, como descrito em Resultados. Utilizando concentrações de 5 ng/ml até 0,15 ng/ml de α -GalCer fibroblastos-CD1d foram incubados por 24 h, o ensaio desenvolvendo-se como o anterior. Como controles foram utilizados fibroblastos-CD1d incubados com DN32.D3, sem estímulo, e a detecção de IL-2 nesse controle denominamos de produção basal de IL-2.

3.12.2 Ensaio com macrófagos de medula óssea como células apresentadoras de antígenos

Macrófagos provenientes de medula óssea foram plaqueados em placas para cultura com 12 poços, 5×10^5 células/600 μ L/poço. Após 1 hora, quando as células já estavam aderidas, ao meio foi adicionado 50 μ l/poço de α -galactosilceramida (controle positivo), iGb3 ou frações, diluídos em meio RPMI 10% SFB em diversas concentrações. Incubaram-se as células por 24 horas em estufa com 5% CO₂ a 37°C, e em seguida adicionou-se o hibridoma DN32.D3, 5×10^5 células/600 μ l/poço incubando-se a reação por 18 horas em estufa com 5% CO₂ a 37°C. Ao término do período de incubação, recolheu-se o sobrenadante para dosagem da IL-2 secretada pelo hibridoma estimulado via ligação com CD1d expressando o antígeno. Como controles foram utilizadas células dendríticas (DC), DN32.D3, e estas duas células juntas, todas sem estímulo, sendo esta última combinação considerada como o branco da reação.

3.12.3 Ensaio com células dendríticas de medula óssea como células apresentadoras de antígenos

Células dendríticas provenientes de medula óssea foram plaqueadas em placas para cultura com 12 poços, 5×10^5 células/600 μ L/poço. Após 1 hora, quando as células já estavam aderidas, ao meio foi adicionado 50 μ l/poço de α -galactosilceramida (controle positivo), iGb3 ou frações, diluídos em meio RPMI 10% SFB em diversas concentrações. Incubaram-se as células por 24 horas em estufa com 5% CO₂ a 37°C, e em seguida adicionou-se o

hibridoma DN32.D3, 5×10^5 células/600 μ l/poço incubando-se a reação por 18 horas em estufa com 5% CO₂ a 37°C. Ao término do período de incubação, recolheu-se o sobrenadante para dosagem da IL-2 secretada pelo hibridoma estimulado via ligação com CD1d expressando o antígeno. Como controles foram utilizados células dendríticas (DC), DN32.D3, e estas duas células juntas, todas sem estímulo, sendo esta última combinação considerada como o branco da reação.

3.13 Screening das frações lipídicas

Todas as frações obtidas nos 3 protocolos de extração de componentes lipídicos das células tumorais foram testadas quanto à sua capacidade de ligação ao CD1d e consequente ativação do hibridoma de células NKT, DN32.D3.

Fibroblastos-CD1d, 5×10^4 células/50 μ l/poço em placa de 96 poços, foram mantidos por 1 hora em estufa com 5% CO₂ a 37°C. Durante esse período, as frações foram solubilizadas em 500 μ l de metanol (exceto F2C que foi solubilizada em clorofórmio), agitadas em vortex e sonicadas. Uma alíquota correspondente a 10% do volume de cada fração foi retirada, transferida para um tubo estéril e seca em fluxo de nitrogênio gasoso. Essas alíquotas foram então solubilizadas em 500 μ l de meio RPMI contendo 10% SFB para o ensaio com 24 horas de incubação. Foram realizadas diluições seriadas para cada fração a ser testada, e a cada nova diluição a amostra foi agitada em vortex e sonicada.

O meio de cultura dos fibroblastos-CD1d foi substituído por 100 μ l do meio acima citado contendo as frações diluídas, incubando-se por 24 horas. Ao final desta incubação adicionaram-se 5×10^4 células/100 μ L/poço de DN32.D3, incubando-se em seguida em estufa com 5% CO₂ a 37°C por 18 horas. Os sobrenadantes foram recolhidos para dosagem de IL-2.

Como controle positivo foi utilizado α -galactosilceramida em diluições seriadas a partir das concentrações iniciais de 10 ng/ml ou 5 ng/ml. O “background” da reação foi quantificado pela incubação da DN32.D3 com os fibroblastos não estimulados em meio RPMI.

3. 14 Ensaio de detecção de IL -2 e IL-4 por ELISA

Nos sobrenadantes dos ensaios descritos foram quantificadas a interleucina-2 (IL-2) e também a IL-4, somente para as frações F3A, F4A e a-GalCer . Placa de ELISA Maxi-Sorb (NUNC) foi sensibilizada com 2µg/mL de anticorpo de captura anti-IL-2 murina e com 4µg/mL de anticorpo de captura anti-IL-4 murina em um volume de 50 µl/poço, diluído em PBS e incubada por 12 horas à temperatura ambiente (t.a.). As placas foram lavadas três vezes cada com PBS/Tween 20- 0,05% e incubada com 200 µl de PBS/BSA 1% por uma hora à t.a., e novamente lavada 3 vezes com PBS/Tween. Adicionaram-se os sobrenadantes de cultura descritos no item anterior e a IL-2 e a IL-4 recombinantes em suas respectivas placas, 50 µl/poço, durante 2 horas à t.a. As placas foram lavadas com PBS/Tween e adicionou-se 50 µl/poço de anticorpo anti-IL-2 e anti-IL-4 biotinizados na concentração de 200 ng/ml de cada anticorpo incubando-se à t.a. por duas horas. As placas foram novamente lavadas por mais 3 vezes e então 50 µl/poço de streptavidina-peroxidase diluída 1:1000 foi adicionada, incubando-se por 1 hora à t.a.. Lavou-se mais três vezes as placas com PBS/Tween, mais três vezes com PBS e a revelação foi realizada com uma solução de 5 ml de tampão citrato-fosfato, 2 mg de OPD (SIGMA), 2,5 ml de água e 10 µl de água oxigenada 30%, 50 µl/poço, em estufa a 37°C por 10 minutos envolvendo as placas com papel alumínio. Para parar a reação adicionou-se 50 µl/poço de ácido sulfúrico 4N, e realizamos a leitura em leitor de ELISA Multiskan Titertek em comprimento de onda de 492 nm. Todos os anticorpos e as interleucinas recombinantes foram adquiridos da Pharmingen e diluídos em PBS-BSA 0,1%.

3.15 Separação dos componentes lipídicos das frações F3A, através de coluna de sílica

A coluna de sílica, com volume de 15 ml (HPLC sorbent, 60 μ - SIGMA), foi equilibrada com clorofórmio. As frações F3A após serem dessalinizadas em coluna C18 foram ressuspensas em clorofórmio : metanol (2:1) e aplicado no máximo 2 mg da fração com uma pipeta Pasteur de vidro sobre o topo da sílica. Para cada solvente utilizado para a eluição, amostras de 4 ml foram recolhidas.

O material foi eluído da coluna de acordo com sua polaridade, utilizando-se solventes com polaridades crescentes. Iniciou-se a eluição com clorofórmio (aproximadamente 60 ml) e compostos de baixa polaridade, denominados C, foram recolhidos. Foi realizado um *dot-blot* de cada alíquota coletada em placas de sílica para TLC, posteriormente coradas com iodo sublimado. Após a eluição completa das moléculas lipídicas com afinidade pelo clorofórmio, iniciou-se a eluição da amostra com acetona (Ac), utilizando aproximadamente 50 ml do solvente, obtendo-se lipídeos com características mais polares. O mesmo procedimento de *dot-blot* foi realizado para controle da eluição dos componentes solúveis em acetona, finalizando a eluição com metanol (M) (cerca de 50 ml), por fim recolhendo o restante dos lipídeos com características mais polares. O processo de eluição de F3A durou de 9 - 11 horas, em fluxo gravitacional.

As alíquotas contendo o material eluído com cada solvente foram combinadas, secas e pesadas, submetidas à cromatografia e testes quanto à capacidade de ativação de células NKT.

3.16 Separação de iGb3 por TLC preparativa a partir das frações F3A e F4A

As frações lipídicas obtidas após extração usada no protocolo A foram secas em nitrogênio e ressuspensas em C:M 1:1 em concentração final 1 mg/ml para serem aplicadas em placas de HPTLC como já descrito anteriormente. A aplicação da amostra foi feita de forma preparativa, contínua em 9cm de extensão e no 10^o cm foi aplicado 10 μ g de iGb3 como padrão. Após a cromatografia a porção final da TLC (contendo iGb3 padrão e parte da amostra aplicada) foi recortada e corada com iodo para detecção das bandas. O R_f da banda única de iGb3 padrão foi marcado e usado como guia para a amostra cromatografada. Toda sílica da TLC que estava na altura da banda de iGb3 foi raspada e

reservada para a extração dos lipídeos ligados à sílica. Os lipídeos foram extraídos da sílica com C:M (1:2), C:M (1:1) e C:M (2:1), e o extrato centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos e seco em nitrogênio gasoso. As amostras denominadas iGb3 F3A e iGb3 F4A foram novamente cromatografadas e coradas com iodo, orcinol e resorcinol para verificação de sua purificação. As frações foram também testadas no ensaio de estimulação do hibridoma de células NKT, DN32.D3

3.17 Ensaio de estimulação de hibridomas NKT (DN32.D3) utilizando as frações iGb3 F3A e iGb3 F4A

As frações iGb3 F3A e iGb3 F4A foram testadas quanto à sua capacidade de ativação do hibridoma de células NKT, DN32.D3.

Células dendríticas da medula foram plaqueadas em placa de 96 poços, 5×10^4 células/50 μ l/poço, e mantidas por 2 horas em estufa com 5% CO² a 37°C. Durante esse período, as frações foram solubilizadas em C:M (1:1) 1 mg/ml, agitadas em vortex e sonicadas. Alíquotas de diferentes concentrações de cada fração foram retiradas, transferidas para um tubo estéril e secas em fluxo de nitrogênio gasoso. Essas alíquotas foram então solubilizadas em meio RPMI contendo 10% SFB nas concentrações finais de 100 μ g/ml, 12 μ g/ml, 3 μ g/ml, 1 μ g/ml e controle (células sem estímulo) para iGb3 F3A e 100 μ g/ml, 25 μ g/ml, 5 μ g/ml, 1 μ g/ml e controle (para iGb3 F4A), todos em volume final de 100 μ l/poço. A cada nova diluição a amostra foi sonicada. As amostras foram incubadas por 24 horas. Ao final desta incubação adicionaram-se 5×10^4 células/100 μ l/poço de DN32.D3, incubando-se em seguida em estufa com 5% CO² a 37°C por 18 horas. Os sobrenadantes foram recolhidos para dosagem de IL-2.

3.18 Separação de glicosfingolipídeos neutros e de carga negativa

A fração F3A foi cromatografada em uma resina de troca de ânions forte (SAX) (POROS 50 HQ, Applied Biosystems, São Paulo, Brazil) para separação de