Mayari Eika Ishimura

EFEITO ADJUVANTE DA *PROPIONIBACTERIUM ACNES* EM VACINA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS NA PROFILAXIA E TERAPIA DO MELANOMA MURINO

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

São Paulo

2017

Mayari Eika Ishimura

EFEITO ADJUVANTE DA *PROPIONIBACTERIUM ACNES* EM VACINA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS NA PROFILAXIA E TERAPIA DO MELANOMA MURINO

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

Orientadora:
Profa. Dra. Ieda Maria Longo Maugéri

Co-orientadora:
Profa. Dra. Elaine Guadelupe Rodrigues

São Paulo
2017

Ishimura, Mayari Eika

Efeito adjuvante da *Propionibacterium acnes* em vacina de células dendríticas na profilaxia e terapia do melanoma murino / Mayari Eika Ishimura - São Paulo, 2017.

xviii, 85f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia.

Título em Inglês: Adjuvant effect of Killed-*Propionibacterium acnes* on dendritic cells vaccine for prophilaxis and therapy of murine melanoma.

1. *Propionibacterium acnes*. 2. Adjuvante. 3. Vacina de células dendríticas. 4. Melanoma murino.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

Chefe do Departamento:

Prof(a). Dra. Isabel Cristina Affonso Scaletsky

Coordenador do Curso de Pós-graduação:

Prof(a). Dra. Rosana Puccia

Mayari Eika Ishimura

Efeito adjuvante da *Propionibacterium acnes* em vacina de células dendríticas na profilaxia e terapia do melanoma murino

Presidente da banca: Profa. Dra Ieda Maria Longo Maugéri

BANCA EXAMINADORA

Membros Titulares

Profa. Dra. Silvia Beatriz Boscardin

Prof. Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto

Prof. Dr. Luiz Rodolpho Raja Gabaglia Travassos

Profa. Dra. Telma Miyuki Oshiro Sumida

Membros Suplentes

Prof. Dr. Alexandre Salgado Basso

Profa. Dra. Bruna Cunha de Alencar Bargieri

Aprovada em 25/04/2017

Dedicatória

Aos meus pais, Analice e Cláudio,
Por todo amor, carinho e dedicação que
me permitiram chegar onde estou.

Aos meus irmãos, Carla, Lygia e Andrei,
Por toda alegria, amizade e
companheirismo.

Ao meu namorado, William,
Por todo amor e carinho,
por cada momento compartilhado,
por alegrar os meus dias e
por me ajudar a superar as dificuldades da vida.

Agradecimentos

À minha orientadora, Profa. Dra. Ieda Maria Longo Maugéri, por tudo que pude aprender com ela durante esses oito anos de convivência no laboratório. Agradeço por toda a confiança depositada em mim, por me ensinar a ser mais persistente e não me deixar desanimar com os resultados negativos e por todo carinho e amizade.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Elaine Guadelupe Rodrigues, por todo seu conhecimento e sua disponibilidade em nos ajudar a desenvolver esse projeto de pesquisa.

À Carla e à Juliana por tudo que me ensinaram durante a minha iniciação científica, por toda a dedicação e paciência. Tenho grande admiração e carinho por vocês.

À Daniela, por todas as separações celulares que permitiram a realização de muitos experimentos, por toda a ajuda na bancada, por todas as discussões sobre meus resultados e sugestões que permitiram o enriquecimento desse trabalho. Agradeço, principalmente, pelo carinho e amizade fundamentais para superar alguns problemas pessoais. Tenho grande admiração por você, essa menina multitarefa, dedicada, eficiente e inteligente que sempre será um exemplo para mim.

À Gabis, minha companheira nas escapadinhas para comer doces, por tudo que aprendemos juntas, por sempre me ouvir e aconselhar, pelo exemplo de pessoa determinada, por todas as brincadeiras que sempre alegraram os meus dias e pela nossa amizade.

À Mônica, à Liane e à Gabriela pelo convívio no laboratório, pelo auxílio na bancada e por tudo que pude aprender com elas.

À Bruna, uma menina muito dedicada e inteligente, por tudo que aprendemos juntas durante as padronizações dos experimentos, por todas as

brincadeiras que aliviavam os momentos de decepção com alguns resultados negativos, por todo carinho e amizade.

Ao Gabriel e a todos alunos de iniciação científica que pude conhecer aqui no laboratório por me permitirem conhecer como é estar do outro lado, espero ter contribuído um pouco para a formação de vocês.

À Profa. Dra. Valquíria Bueno pelo bom convívio no laboratório e por todo aprendizado proveniente dos trabalhos em colaboração.

À Amanda, pelo seu interesse em aprender, pela sua dedicação ao laboratório e por toda sua alegria contagiante, foi muito bom conviver com você nesses últimos meses do meu doutorado.

À Prof. Dra. Célia Regina Whitaker Carneiro, pela paciência e tempo dedicados a me ensinar a produzir os híbridos de células dendríticas com as células tumorais, o que foi fundamental para o desenvolvimento desse projeto.

À Vanessa e à Elizabeth, por sempre se disponibilizarem a realizar a inoculação do tumor por via endovenosa, o que permitiu a obtenção dos principais resultados desse trabalho; por todas as nossas conversas e passeios, pelo carinho e amizade.

Ao Filipe e ao Felipe, ao Carlos e à Maísa que me ensinaram, respectivamente, a cultivar as células B16F10, a produzir o lisado das células tumorais recém isoladas de camundongos e a diferenciar células dendríticas a partir de progenitores da medula óssea.

Ao Leandro, por termos aprendido juntos a realizar os ensaios com timidina tritiada.

À Lika, por ser sempre prestativa e atenciosa, por compartilhar bons momentos de descontração e pelo carinho e amizade.

A todos os professores da Disciplina de Imunologia da UNIFESP, Profa. Dra. Ana Flávia Popi, Profa. Dra. Daniela Santoro, Profa. Dra. Valquíria Bueno, Prof. Dr. José Daniel Lopes (*in memorian*), Prof. Dr. Mario Mariano, Prof. Dr. Alexandre Basso, Prof. Dr. Alexandre Keller; e aos demais professores da UNIFESP por toda contribuição a minha formação profissional.

A todos os funcionários da Disciplina de Imunologia da UNIFESP que proporcionaram as ferramentas necessárias para o desenvolvimento desse projeto de pesquisa.

A todos os alunos de pós-graduação da Disciplina de Imunologia e do DMIP da UNIFESP que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse trabalho.

A todos meus amigos pelo apoio, incentivo, carinho e momentos de alegria.

À UNIFESP, por toda a infraestrutura que possibilitou o desenvolvimento desse projeto e o meu crescimento profissional.

À FAPESP (Processo 2012/09885-2) pela bolsa de estudos e pelo financiamento desse projeto que permitiram a realização do meu doutorado.

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

Sumário

Dedicatória..... v
Agradecimentos..... vi
Lista de Figuras..... xi
Lista de tabelas..... xiii
Lista de abreviaturas e símbolos..... xiv
Resumo..... xvii
Abstract..... xviii
1. INTRODUÇÃO..... 1
1.1 Melanoma..... 1
1.2 Tumor e Sistema Imune..... 4
1.3 Vacina de células dendríticas..... 13
1.4 *Propionibacterium acnes*..... 20
2. OBJETIVOS..... 26
3. MATERIAL E MÉTODOS..... 27
3.1 Animais..... 27
3.2 Material..... 27
3.3 Soluções..... 29
3.4 Métodos..... 31
3.4.1 Obtenção da suspensão de *P. acnes* morta pelo calor..... 31
3.4.2 Cultivo de células B16F10..... 31
3.4.3 Congelamento de células B16F10..... 31
3.4.4 Obtenção dos antígenos tumorais totais..... 32
3.4.5 Obtenção de culturas enriquecidas em células dendríticas 32
3.4.6 Fusão de células dendríticas com células B16F10..... 33
3.4.7 Avaliação da eficácia de fusão das células dendríticas com células B16F10..... 33
3.4.8 Imunização de camundongos com a vacina de híbridos..... 34
3.4.9 Avaliação da resposta de anticorpo específica para antígenos tumorais induzida pela vacina de híbridos..... 34
3.4.10 Avaliação das populações de células T de memória nos linfonodos drenantes de camundongos vacinados com os híbridos

associados ou não a *P. acnes* 35
3.4.11 Avaliação do perfil de citocinas no sobrenadante das culturas de células TCD4 e TCD8 estimuladas com os antígenos tumorais..... 36
3.4.12 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*..... 37
3.4.13 Indução da colonização pulmonar por células B16F10.... 37
3.4.14 Análise estatística..... 37
4. RESULTADOS..... 38
4.1 Fusão das células dendríticas com células B16F10..... 38
4.2 Avaliação da resposta de anticorpo específica para antígenos da B16F10 induzida pela vacina de híbridos..... 40
4.3 Análise do perfil de citocinas secretadas pelas células T quando estimuladas com antígenos tumorais..... 43
4.4 Avaliação, *in vitro*, da atividade citotóxica de esplenócitos totais de camundongos vacinados com híbridos associados ou não à *P. acnes*..... 45
4.5 Avaliação das populações de células T de memória nos linfonodos drenantes de camundongos vacinados com os híbridos associados ou não a *P. acnes*..... 47
4.6 Efeito da vacina de híbridos associada ou não à *P. acnes* na progressão do tumor..... 52
4.7 Longevidade da resposta imune específica induzida pela vacina de híbridos associados ou não à *P. acnes*..... 55
5. DISCUSSÃO..... 57
6. CONCLUSÕES..... 68
7. REFERÊNCIAS..... 69
8. Anexos..... 78

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema da estrutura da epiderme..... 3
Figura 2. Processo de imunoedição do câncer..... 5
Figura 3. Indução de resposta de células T a tumores..... 12
Figura 4. Representação esquemática dos híbridos de células apresentadoras de antígeno com células tumorais..... 15
Figura 5. Modelo do processamento e apresentação de antígenos pelos híbridos de células dendríticas com células tumorais..... 17
Figura 6. Avaliação da porcentagem de células dendríticas fusionadas com células B16F10..... 39
Figura 7. Efeito adjuvante da *P. acnes* na resposta de anticorpo específica para antígenos da B16F10 induzida pela vacina de híbridos..... 41
Figura 8. Presença da *P. acnes* na vacina de híbridos induz polarização da resposta imune aos antígenos tumorais para o perfil Th1..... 44
Figura 9. Adição de *P. acnes* à vacina de híbridos aumenta a capacidade citotóxica dos esplenócitos contra células de melanoma murino..... 46
Figura 10. Representação esquemática da estratégia de análise para determinar o fenótipo de memória das populações de células TCD4 e TCD8 por citometria de fluxo..... 49
Figura 11. Associação da *P. acnes* à vacina de híbridos aumenta o número absoluto de células TCD4 e TCD8 de memória no linfonodo drenante de camundongos imunizados..... 50
Figura 12. Adição da *P. acnes* à vacina de híbridos eleva a proporção de células TCD4 e TCD8 de memória efetora e central..... 51
Figura 13. Associação da *P. acnes* à vacina de híbridos controla a progressão tardia do tumor..... 53
Figura 14. Redução da progressão do tumor e do tamanho dos

nódulos pulmonares nos animais que receberam a vacina de híbridos com *P. acnes*..... 55
Figura 15. Indução de resposta imune longeva, específica aos antígenos tumorais, pela vacina de híbridos associada ou não à *P. acnes*..... 56
Figura 16. Massa do pulmão dos camundongos 14 dias após o desafio..... 78
Figura 17. Avaliação do efeito terapêutico da vacina de híbridos associados ou não a *P. acnes*..... 79
Figura 18. Terapia Celular Adotiva..... 80

Lista de Tabelas

Tabela 1. Polarização da resposta de anticorpo para o padrão Th1 pela associação da *P. acnes* à vacina de híbridos……..…… 42

Lista de Abreviaturas e Símbolos

APC	Aloficocianina
APCs	Células apresentadoras de antígenos profissionais
B16F10	Células de melanoma murino
BSA	Albumina sérica bovina
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil éster
Cpm	Contagem por minuto
CpG	Dinucleotídeo citocina guanina
CTL	Linfócitos T citotóxicos
DC	Célula Dendrítica
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	*Enzime-Linked Immunosorbent Assay*
Fas	Receptor de morte (CD95)
FasL	Ligante de Fas (CD178)
Fc	Fração cristalizável
FITC	Fluoresceína
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos
gp75	Glicoproteína intracelular expressa em melanossomos
HLA	Antígeno leucocitário humano
IFN-γ	Interferon – gama
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Imunoglobulina G1
IgG2a	Imunoglobulina G2a
IgG2c	Imunoglobulina G2c
IL-1β	Interleucina – 1 beta
IL-4	Interleucina – 4
IL-5	Interleucina – 5
IL-6	Interleucina – 6

IL-7Rα	Subunidade α do receptor de IL–7
IL-10	Interleucina – 10
IL-12	Interleucina – 12
IL-13	Interleucina – 13
IL-17A	Interleucina – 17A
IL-18	Interleucina – 18
IL-21	Interleucina – 21
IL-23	Interleucina – 23
iNKT	Linfócito T *Natural Killer* invariante
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LPS	Lipopolissacarídeo
M1	Macrófago classicamente ativado
M2	Macrófago alternativamente ativado
MC38	Células de carcinoma de cólon murino
MFI	Intensidade média de fluorescência
MHCI	Complexo principal de histocompatibilidade classe I
MHCII	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
MUC1	Mucina – 1
NF-κB	Fator nuclear - κB
NK	*Natural Killer*
NKG2D	Receptor ativador de célula NK e CTL (CD314)
OPD	O-fenilenodiamina
P. acnes	*Propionibacterium acnes*
PBMC	Célula mononuclear de sangue periférico
PBS	Tampão fosfato salina
PEG	Polietilenoglicol
PerCP-Cy5.5	Proteína peridinina clorofila – cianina
PGE2	Prostaglandina E2
OS	Polissacarídeo Solúvel Purificado Extraído da *P. acnes*
RNA	Ácido ribonucleico
$S1P_1$	Receptor 1 de esfingosina 1-fosfato (CD363)
SFB	Soro fetal bovino
STAT-3	*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

T. cruzi	*Trypanosoma cruzi*
Tc17	Células TCD8 produtoras de IL-17
TGF-β	Fator de transformação do crescimento – β
Th1	Linfócitos T *helper* 1
Th2	Linfócitos T *helper* 2
Th9	Linfócitos T *helper* 9
Th17	Linfócitos T *helper* 17
TLRs	Receptores *Toll-like*
TLR2	Receptores *Toll-like* 2
TLR4	Receptores *Toll-like* 4
TLR9	Receptores *Toll-like* 9
TNFR1	Receptor do fator de necrose tumoral 1
TNF-α	Fator de necrose tumoral – alfa
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (CD253)
TRAILR	Receptor de TRAIL
TRP-1	Proteína 1 relacionada a tirosinase
UV	Ultravioleta

Resumo

As vacinas de híbridos de células dendríticas com células tumorais são uma importante ferramenta imunoterapêutica, já que os híbridos formados possuem o conjunto total de antígenos tumorais e a capacidade de apresentação de antígeno da célula dendrítica, o que favorece a ativação policlonal de células TCD4 e TCD8 específicas para os antígenos tumorais. No entanto, a eficácia dessas vacinas nos ensaios clínicos foi menos robusta do que nos modelos experimentais, o que direcionou os pesquisadores a tentarem melhorar a imunogenicidade dessas vacinas pela associação de adjuvantes, principalmente os de natureza biológica como produtos bacterianos ou bactérias propriamente ditas, em forma de suspensão. No presente trabalho, estudamos os efeitos adjuvantes da suspensão de *Propionibacterium acnes* (*P. acnes)* morta pelo calor quando associada a vacina de células híbridas em um modelo murino. Dentre os diferentes efeitos imunomoduladores da *P. acnes* pode-se destacar a indução da síntese de citocinas pró-inflamatórias, a maturação de células dendríticas, o aumento da atividade fagocítica e tumoricida de macrófagos, o aumento da atividade tumoricida de células NKT, bem como o aumento da resposta de anticorpo a diferentes antígenos. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da *P. acnes* na resposta imune específica antitumoral elicitada pela vacina de híbridos de células dendríticas com células B16F10 utilizando como modelo experimental o melanoma murino. Verificamos que a administração de duas doses da vacina de híbridos associada à *P. acnes* aumentou os títulos de IgG total, IgG1 e IgG2c específicos para os antígenos da B16F10, polarizando a resposta humoral para o padrão Th1. Ao avaliar a resposta imune celular, observamos que as células TCD4 do grupo Híbrido+*P. acnes*, quando cultivadas com antígenos tumorais, produziram menos IL-4 e mais IFN-γ; enquanto as células TCD8 sintetizaram níveis mais altos de IL-17 e de IFN-γ do que as células do grupo Híbrido. Além disso, verificamos aumento do número absoluto de células TCD4 e TCD8 de memória no grupo Híbrido+*P. acnes.* Coerentemente com os resultados anteriores, a adição da *P. acnes* à vacina de híbridos aumentou a atividade citotóxica dos esplenócitos contra a B16F10 *in vitro* e evitou a progressão tardia do tumor no modelo de colonização pulmonar. Esses resultados demonstram o efeito adjuvante da suspensão de *P. acnes* morta pelo calor na resposta imune humoral e celular elicitada pela vacina de híbridos de células dendríticas com células tumorais.

Abstract

Hybrid vaccines, which are vaccine models of total antigens expressed by a tumor cell combined with the ability of a dendritic cell (DC) to stimulate immune responses, have been investigated in clinical and experimental studies. However, the response triggered by these vaccines is often weak, requiring the use of adjuvants to increase vaccine immunogenicity. Killed *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) exerts immunomodulatory effects by increasing the phagocytic and tumoricidal activities of macrophages, promoting DC maturation, inducing pro-inflammatory cytokines production and increasing the humoral response to different antigens. Here, we evaluated the effect of *P. acnes* on a specific antitumor immune response elicited by a hybrid vaccine in a C57Bl/6 mouse model of melanoma. Two subcutaneous doses of a hybrid vaccine associated with *P. acnes* increased total IgG-, IgG1- and IgG2c-specific titers to B16F10 antigens, polarizing the humoral response to a T helper 1 (Th1) pattern. Concerning the cellular immune response, the absolute number of memory CD4 and CD8 T cells was increased. Moreover, cells cultured with tumor antigens exhibited increased IFN-γ secretion and reduced IL-4 expression by CD4 T cells, and CD8 T cells secreted larger amounts of IL-17 and IFN-γ. Furthermore, the addition of *P. acnes* to a hybrid vaccine increased the cytotoxic activity of splenocytes toward B16F10 *in vitro* and avoided late tumor progression in a pulmonary colonization model. These results revealed the adjuvant effect of a killed *P. acnes* suspension, as it improved specific humoral and cellular immune responses elicited by DC-tumor cell hybrid vaccines.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Melanoma

O câncer de pele é divido em duas categorias: não-melanoma e melanoma. No Brasil, o câncer de pele do tipo não-melanoma é o mais frequente, correspondendo a 30% dos tumores malignos registrados no país, sendo os mais frequentes o carcinoma basocelular e o carcinoma epidermoide. Contrariamente, o câncer de pele do tipo melanoma apresenta baixa incidência, representa apenas 3% das neoplasias malignas do órgão, porém possui altas taxas de mortalidade (INCA 2016).

O melanoma se origina de mutações gênicas nos melanócitos, tipo de célula localizada predominantemente na pele, folículos capilares e na íris, mas também presente em outras regiões como ouvido interno, coração e sistema nervoso. Os melanócitos produzem melanina, pigmento responsável pela coloração da pele, do cabelo e da íris. Na pele, os melanócitos residem na camada basal da epiderme onde formam as unidades epidérmico-melânicas como resultado da associação com queratinócitos (Figura 1). Moléculas de adesão como E-caderinas e P-caderinas participam das estruturas de contato célula-célula, necessárias para a transferência da melanina para os queratinócitos, processo que é essencial para a proteção contra radiações ultravioleta (UV), uma vez que os grânulos de melanina são acumulados acima do núcleo dos queratinócitos e são responsáveis por absorver e dissipar a energia da radiação UV. Esse tipo de radiação pode provocar alterações genéticas na pele, prejudicar o sistema imunológico cutâneo, aumentar a produção local de fatores de crescimento e induzir a formação de espécies reativas de oxigênio que causam danos ao DNA afetando os queratinócitos e melanócitos (Miller & Mihm, 2006; Cichorek *et al*., 2013).

Os queratinócitos controlam o crescimento e atividade dos melanócitos por meio de fatores de crescimento parácrinos e moléculas de adesão celular. Após exposição à radiação UV, os queratinócitos secretam fatores que regulam a sobrevivência, diferenciação, proliferação e produção de melanina pelos melanócitos. A subversão de vias envolvidas no desenvolvimento e proliferação

dos melanócitos, como mutações em genes críticos reguladores do crescimento, alteração na produção de fatores de crescimento autócrinos e a perda de receptores de adesão contribuem para a alteração da sinalização intracelular nos melanócitos, permitindo que eles escapem da regulação fina realizada pelos queratinócitos. Consequentemente, os melanócitos podem proliferar descontroladamente, dando início à formação do melanoma, e se espalhar, originando metástases locais ou distantes (Cichorek *et al*., 2013; Gray-Schopfer *et al*., 2007).

Os fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma incluem predisposição genética e estressores ambientais como, por exemplo, histórico familiar de melanoma, presença de múltiplos nevos melanocíticos benignos ou atípicos, melanoma prévio, imunossupressão, sensibilidade ao sol e exposição à radiação UV (Miller & Mihm, 2006).

O tratamento do melanoma depende do estágio do câncer. Nos estágios iniciais do melanoma (estágios I e II) o tumor está altamente localizado e pode ser tratado por excisão cirúrgica e terapia adjuvante. No entanto, quando o tumor atinge a forma metastática, com metástase regional ou distante, estágios III e IV, respectivamente, o tratamento se torna difícil e a taxa de sobrevivência diminui drasticamente. Nos estágios III e IV, o tratamento inclui quimioterapia, terapia direcionada e imunoterapia (Millet *et al*., 2017; Dany *et al*., 2016).

O melanoma metastático é conhecido por sua resistência à quimioterapia e à radioterapia convencional (Rotte *et al*., 2015). Além disso, essas terapias por não serem específicas para as células tumorais causam dano às células e tecidos normais, aumentando a morbidade dos pacientes.

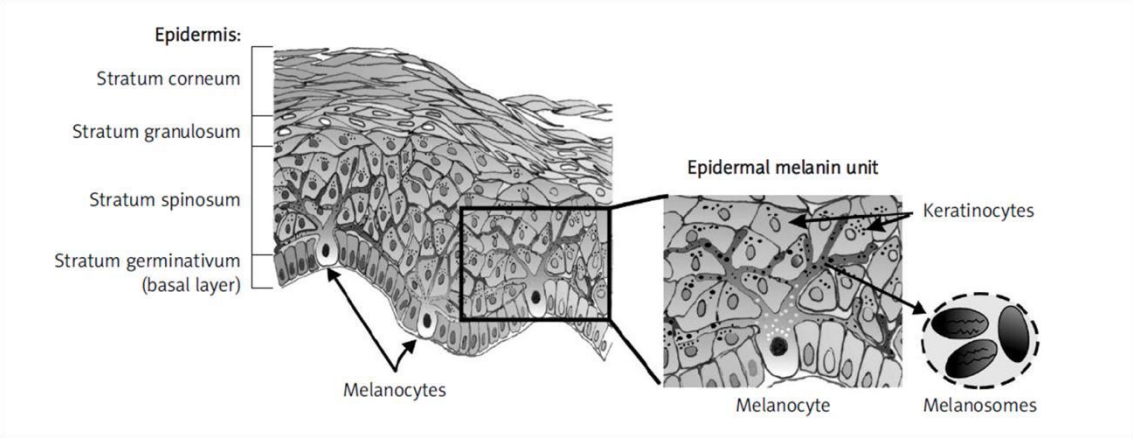

Figura 1. Esquema da estrutura da epiderme. Os melanócitos residem na camada basal da epiderme e seus dendritos se comunicam com 30-40 queratinócitos formando a unidade epidérmico-melânica. Os melanócitos sintetizam e depositam a melanina em organelas denominadas melanossomos, as quais são transferidas para os queratinócitos. Cichorek *et al*., 2013 (Adaptado)

1.2 Tumor e Sistema Imune

Os antígenos tumorais são classificados em antígenos específicos do tumor e antígenos associados ao tumor. Os antígenos específicos do tumor são aqueles expressos em células tumorais, mas não em células normais; podem ser produtos de genes mutados ou antígenos de vírus oncogênicos. Já os antígenos associados ao tumor, que são antígenos expressos por células normais e tumorais, podem ser proteínas e glicolipídeos celulares não mutados, mas hiperexpressos pelas células tumorais, antígenos oncofetais ou antígenos de diferenciação tecido-específico (Munhoz & Postow, 2016).

Assim, o sistema imune pode ser ativado por antígenos tumorais e, uma vez primado, pode elicitar a resposta antitumoral que em alguns casos resulta na destruição do tumor, processo conhecido como vigilância imune. Portanto, o sistema imune inato e adaptativo trabalham juntos para eliminar o tumor em desenvolvimento antes que ele se torne clinicamente aparente (fase de eliminação). No entanto, se o tumor não é completamente destruído, segue-se uma fase de equilíbrio em que as células tumorais podem acumular diferentes mutações e o sistema imune acaba eliminando as células tumorais imunogênicas e selecionando as variantes que apresentam imunogenicidade reduzida, processo denominado imunoedição tumoral e que torna essas células capazes de escapar da imunovigilância. Após a evasão do sistema imune, as células tumorais proliferam descontroladamente e se tornam clinicamente detectáveis (fase de escape) (Figura 2) (Schreiber *et al.*, 2011; Munhoz & Postow, 2016; Rothschild *et al.,* 2015).

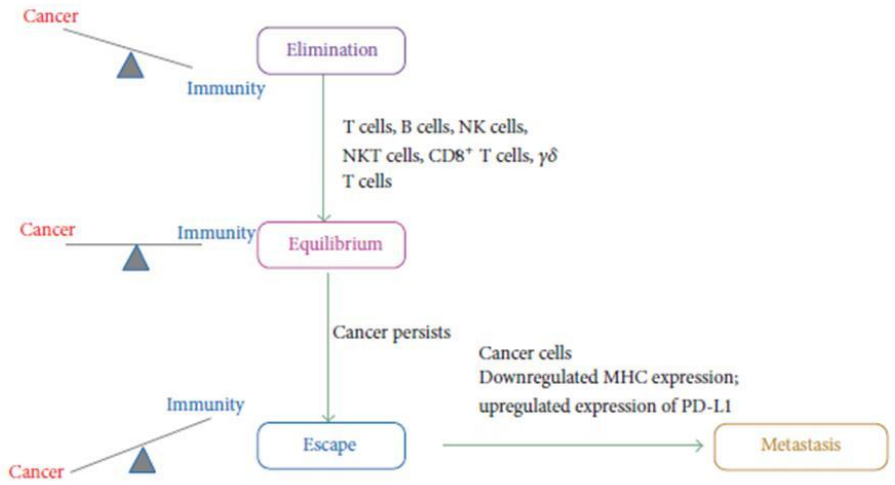

Figura 2. Processo de imunoedição do câncer. O processo de imunoedição do câncer possui três fases: eliminação, equilíbrio e escape. A fase de eliminação envolve a função efetora das células imunes para combater e eliminar as células tumorais. Na fase de equilíbrio é alcançado um balanço entre a progressão do câncer e a eliminação das células tumorais pelo sistema imune. Se o tumor persiste, atinge-se a fase de escape, em que ele se sobrepõe à imunidade e pode metastatizar para outros órgãos. Pandya *et al*., 2016 (Adaptado).

Alterações genéticas e epigenéticas resultam em modificações nos marcadores expressos na membrana celular, bem como no padrão de expressão destes na superfície da célula tumoral. Algumas células tumorais apresentam expressão alterada ou reduzida do MHC (*major histocompatibility complex* ou complexo principal de histocompatibilidade) classe I e assim se tornam alvos das células NK, uma vez que o reconhecimento dessa molécula fornece sinais inibitórios para as células NK, impedindo a sua ativação. Outros tumores expressam glicoproteínas de membrana que se ligam ao receptor ativador NKG2D expresso na superfície da célula NK. A atividade das células NK é regulada pelo fino balanço entre os sinais provenientes dessas diferentes famílias de receptores ativadores e de receptores inibidores. Ao serem ativadas, as células NK secretam grânulos citoplasmáticos contendo perforina e granzimas na sinapse imunológica com a célula-alvo. A perforina induz a formação de poros que permitem a entrada das granzimas no citoplasma da célula-alvo, as quais causam ativação de caspases iniciando o processo de apoptose (Pandya *et al*., 2016; Shevtsov & Multhoff, 2016; Abbas *et al*., 2012).

As células NK também podem induzir a morte de células tumorais opsonizadas por anticorpos da classe IgG por meio do processo denominado citotoxicidade celular dependente de anticorpo, uma vez que expressam os receptores FcγRIIC/CD32c e FcγRIIIA/CD16a. A ativação desses receptores induz a exocitose dos grânulos contendo granzimas e perforina, bem como a síntese e secreção de IFN-γ, que medeiam a morte da célula-alvo. Além disso, as células NK podem induzir a apoptose das células tumorais por meio da secreção de TNF-α ou pela ligação do ligante de Fas (FasL ou CD178) e TRAIL (CD253), expressos na membrana plasmática das células NK, aos seus respectivos receptores de morte expressos na célula-alvo (Pandya *et al*., 2016; Shevtsov & Multhoff, 2016).

Além da atividade tumoricida das células NK, alguns trabalhos tem avaliado a importância de outras células da imunidade inata na rejeição do tumor, como as células iNKT. Essas células podem ser ativadas diretamente, pelo reconhecimento de glicolipídeos apresentados pela molécula CD1d, ou indiretamente, por fatores solúveis como IFN do tipo I, IL-12 e IL-18. As células iNKT expressam granzima e perforina, assim como FasL (CD178). No entanto,

estudos sugerem que o principal papel da célula iNKT na imunidade antitumoral não é pela ação direta sobre as células tumorais, ou seja, não agem primariamente como efetoras, mas recrutam e promovem a resposta por outras células efetoras de modo dependente de IFN-γ. Essa citocina pode induzir proliferação das células NK, bem como estimular a secreção de IFN-γ por estas. A ativação das células iNKT aumenta a expressão do ligante de CD40 (CD40L ou CD154) promovendo ativação e maturação das APCs (células apresentadoras de antígenos) e a produção de IL-12, que por sua vez, mantém a síntese de IFN-γ pelas células iNKT aumentando a imunidade antitumoral. Além disso, a maturação das células dendríticas favorece a ativação de linfócitos $TCD8^+$ *naïve* culminando com a indução de células efetoras e de memória; e o conjunto de citocinas provenientes da ativação das células iNKT pode promover aumento da expressão de ligantes indutores de morte (CD178 e CD253) nas células NK e $TCD8^+$. Assim, as células iNKT não somente conectam a ativação da imunidade inata com a da adaptativa, mas também potencializam a atividade antitumoral de ambas (Godfrey *et al*., 2004; Altman *et al*., 2015; McEwen-Smith *et al*., 2015).

Outra importante população celular envolvida na resposta antitumoral é a de macrófagos, os quais respondem ao estímulo ambiental apresentando polarização funcional. Os macrófagos polarizados são categorizados como classicamente ativados (M1) e alternativamente ativados (M2). O IFN-γ, sozinho ou na presença de produtos bacterianos (LPS) ou citocinas (TNF), induz ativação clássica dos macrófagos, enquanto a IL-4 e a IL-13 induzem a ativação alternativa. Os macrófagos M2 também são induzidos por IL-10, TGF-β e glicocorticoides (Mantovani *et al.* 2004; Takeya & Komohara, 2016).

Os macrófagos M1 induzem inflamação pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IL1-β, TNF-α, IL-6 e IL-23, possuem alta capacidade de apresentação de antígeno, polarizam a resposta imune para o perfil Th1 e expressam CD16 (FcγRIII). Os macrófagos M1 podem destruir as células tumorais pela liberação de enzimas lisossômicas e pela alta produção de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico. Além disso, são capazes de produzir TNF que age, principalmente, pela indução de trombose em vasos

sanguíneos do tumor (Mantovani *et al.* 2004; Abbas *et al*., 2012; Takeya & Komohara, 2016).

Em contraste, macrófagos M2 suprimem a inflamação produzindo citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF-β, bem como outras moléculas como o antagonista do receptor de IL-1 e a prostaglandina E2 (PGE2). Essa subpopulação também pode participar do reparo tecidual induzindo angiogênese e ativando células do estroma a produzirem proteínas da matriz extracelular. Os macrófagos M2 promovem progressão do tumor por vários mecanismos: induzem angiogênese que permite o aporte de oxigênio e nutrientes para as células tumorais; produzem moléculas imunossupressoras como PGE2, TGF-β e IL-10, que suprimem a imunidade antitumoral mediada pelas células T; favorecem o processo de invasão da célula tumoral e metástase por meio da produção de metaloproteinases (MMP2 e MMP9) que degradam a matriz extracelular (Hu *et al*., 2015; Takeya & Komohara, 2016).

A heterogeneidade dos macrófagos associados ao tumor pode depender do tipo de tumor e das alterações do microambiente tumoral, que também determina a conversão mútua entre macrófagos M1 e M2. No entanto, na maioria das neoplasias em seres humanos, os macrófagos do tipo M2 predominam entre os macrófagos associados ao tumor (Hu *et al*., 2015; Takeya & Komohara, 2016). Estudos indicam que na fase inicial do desenvolvimento do tumor, os macrófagos contribuem para a eliminação das células tumorais. Subsequentemente, ocorre a progressão do tumor, que foi associada com o desvio e a subversão da função dos macrófagos durante as fases de equilíbrio e de escape da imunoedição do câncer (Mantovani *et al.*, 2017).

A especificidade do reconhecimento antigênico e a capacidade de formação de memória imunológica são de fundamental importância na resposta antitumoral e na imunoterapia do câncer, características conferidas pela participação das células da imunidade adaptativa na resposta contra o tumor. O papel central das células TCD4 no desenvolvimento da resposta imune, tanto no auxílio das células B para induzir maturação de afinidade e troca de isotipo melhorando a eficiência da resposta de anticorpo, bem como na indução e manutenção da resposta das células TCD8 citotóxicas está bem claro. No entanto, já foi descrito que as células TCD4 também são capazes de exercer atividade citotóxica direta em células-alvo. Os mecanismos citotóxicos

envolvidos na morte celular induzida pelas células TCD4 citotóxicas envolvem tanto o reconhecimento antígeno-específico, com consequente indução de apoptose pela liberação de grânulos citoplasmáticos contendo granzimas e perforina, como a expressão de FasL e TRAIL pelas células TCD4 que induzem ativação dos receptores de morte nas células-alvo (Stalder *et al*., 1994; Williams & Engelhard, 1996; Thomas & Hersey, 1998 [a e b]).

As células TCD4 apresentam alto grau de plasticidade e habilidade de se diferenciar em vários subtipos de células efetoras participando ativamente da formação da resposta antitumoral. As células Th1 e Th2 foram os primeiros subtipos de células T auxiliares a serem descritos, sendo atribuído as células Th1 funções antitumorais devido à alta secreção de IFN-γ, citocina que: 1) aumenta a imunogenicidade do tumor, aumentando a expressão das moléculas de MHCI por essas células; 2) ativa células NK e TCD8 e 3) aumenta a atividade antitumoral de macrófagos. As células Th2 secretam as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 e na maioria dos estudos são associadas com a promoção do crescimento tumoral. No entanto, alguns poucos trabalhos demonstraram que as células Th2 podem ser eficientes na erradicação do tumor após transferência celular adotiva (Lorvik *et al.*, 2016; Vargas e*t al.*, 2017).

Essa dicotomia inicial falhou em explicar a complexidade das respostas das células TCD4 e novos subtipos de células T auxiliares, como as células Th17 e Th9, foram descritos. O papel das células Th17 na imunidade antitumoral ainda é controverso. Alguns trabalhos demonstram que a IL-17A secretada por essas células favorece a neoangiogênese e induz a produção de IL-6, cuja sinalização na célula tumoral causa ativação de STAT-3, favorecendo o crescimento do tumor. No entanto, em modelos animais de melanoma foi verificado que a transferência celular adotiva de células Th17 foi capaz de restringir a progressão do tumor. Essa complexa relação entre as células Th17 e o crescimento do tumor foi ilustrada por observações em humanos que demonstraram que a infiltração de células Th17 é prejudicial no câncer de cólon, mas benéfica no câncer de ovário (Vargas *et al.*, 2017).

As células Th9 são células TCD4 que secretam altos níveis de IL-9 e alguns estudos tem demonstrado que essas células possuem propriedades antitumorais em tumores sólidos, como adenocarcinoma pulmonar e melanoma. As células Th9 já foram identificadas nas lesões cutâneas de

melanoma humano sugerindo que elas devem contribuir na resposta antitumoral. Já foi demonstrado que a transferência celular adotiva de células Th9 inibiu o crescimento do melanoma de forma mais eficiente do que as células Th1 ou Th17, efeito que foi dependente da secreção de IL-9, que aumentou a atividade dos mastócitos resultando na prevenção do crescimento tumoral. Outros trabalhos demonstram que os efeitos antitumorais das células Th9 transferidas adotivamente são dependentes das células TCD8. As células Th9 também secretam IL-21, citocina que tem papel importante nos efeitos antitumorais das células NK e TCD8 aumentando a atividade citotóxica dessas células. Assim, os diferentes subtipos de células T auxiliares podem interferir de modo determinante na resposta imune contra o tumor (Vargas *et al.*, 2017).

Como exemplo pode ser citado o auxílio das células TCD4 na diferenciação das células TCD8 *naïve* em linfócitos T citotóxicos. As células TCD8 são capazes de reconhecer peptídeos derivados da célula tumoral apresentados no contexto da molécula de MHCI, que é expressa por todas as células nucleadas. No entanto, para as células TCD8 *naïve* se diferenciarem em células T efetoras é necessário que haja um segundo sinal proveniente das moléculas coestimuladoras, as quais são expressas apenas em APCs profissionais como células dendríticas, macrófagos e linfócitos B, bem como um terceiro sinal que provém das citocinas secretadas pelas células TCD4 ativadas por esses antígenos tumorais (Abbas *et al*., 2012).

Assim, como a maioria dos tumores não deriva de APCs, portanto não expressam moléculas coestimuladoras, a indução da resposta das células TCD8 contra antígenos tumorais exige a apresentação cruzada desses antígenos por células dendríticas. Essas células capturam as células tumorais e a maior parte dos antígenos endocitados entram na via de apresentação do MHC de classe II, permitindo a ativação dos linfócitos TCD4 específicos, os quais produzirão as citocinas que participarão da ativação dos linfócitos TCD8 (Abbas *et al*., 2012). A apresentação cruzada pode ocorrer por dois mecanismos principais: 1) pela via canônica endossomo-citosol que envolve o transporte de antígenos exógenos das vesículas endossômicas para o citosol, onde eles são processados no proteassomo e subsequentemente carregados em moléculas de MHC de classe I no retículo endoplasmático; 2) por uma via independente do proteassomo em que proteases endossomais das células

dendríticas processam e carregam os antígenos capturados diretamente nas moléculas de MHC de classe I em compartimentos endossômicos (Nierkens *et al*., 2013).

A presença dos três sinais permite a diferenciação dos linfócitos TCD8 em linfócitos T citotóxicos (CTL). Uma vez gerados, os CTL são capazes de reconhecer e destruir as células tumorais sem que haja coestimulação (Figura 3). Os linfócitos TCD8 efetores são altamente citotóxicos e expressam altos níveis de IFN-γ, TNF-α, granzimas e perforina após ativação. O principal mecanismo de morte da célula-alvo mediado pelos CTL envolve a entrega de proteínas citotóxicas, granzimas e perforina, armazenadas em grânulos citoplasmáticos, que induzem a apoptose da célula-alvo, conforme explicado anteriormente. A ativação dos CTL induz expressão de FasL e TRAIL na membrana celular dessas células, os quais podem se ligar nos receptores de morte Fas e TRAILR, expressos em algumas células tumorais, e induzir apoptose. Além disso, o TNF-α secretado pelos CTL pode se ligar no receptor TNFR1, presente em algumas células tumorais, e induzir apoptose da célula-alvo (Mariani *et al*., 1998; Gonzalvez & Ashkenase, 2010; Abbas *et al*., 2012).

Diante desses diferentes mecanismos importantes na resposta imune antitumoral, utilizar o sistema imunológico para combater o câncer tem sido um dos maiores avanços na oncologia, gerando benefícios clínicos a longo prazo e prolongando a sobrevivência dos pacientes. Diferentes estratégias imunoterapêuticas tem sido utilizadas incluindo o uso de citocinas de forma não específica, o desenvolvimento de vacinas e de anticorpos monoclonais e a terapia celular adotiva (Munhoz & Postow, 2016).

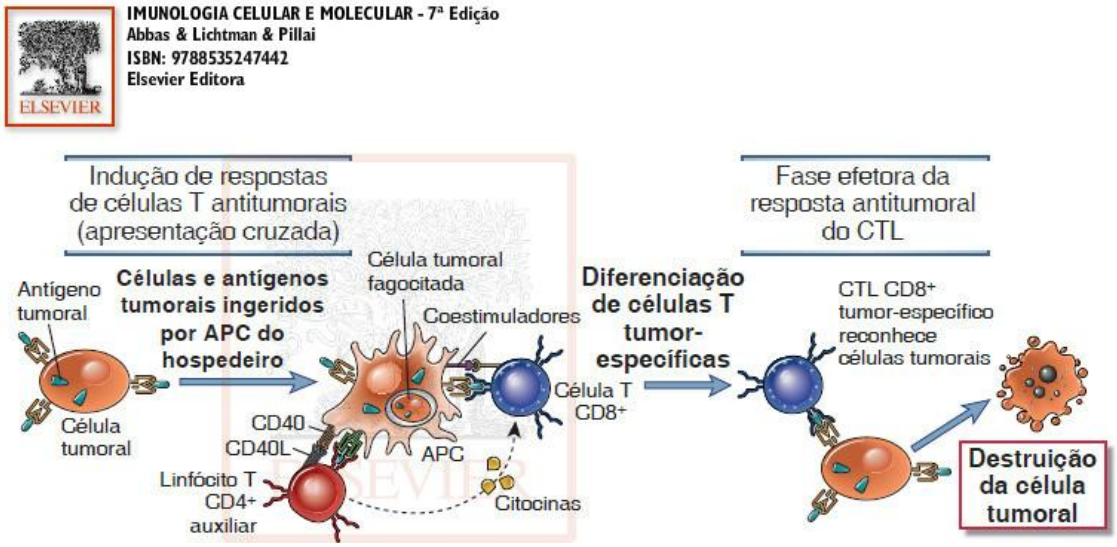

Figura 3. Indução de resposta de células T a tumores. Respostas de células TCD8$^+$ a tumores podem ser induzidas por apresentação cruzada, onde células tumorais ou antígenos tumorais são capturados, processados e apresentados às células T por células apresentadoras de antígeno (APCs) profissionais. Moléculas coestimuladoras expressas pelas APCs fornecem os sinais secundários para a diferenciação das células TCD8$^+$. As APCs também podem estimular as células TCD4 auxiliares, que fornecem o terceiro sinal para o desenvolvimento dos CTL. Os CTL diferenciados matam as células tumorais sem a necessidade de coestimulação ou ajuda das células T. Abbas *et al*., 2012.

1.3 Vacinas de células dendríticas

Um dos objetivos da imunoterapia do câncer consiste no desenvolvimento de vacinas contra o tumor que sejam capazes de instruir o sistema imune a seletivamente induzir a destruição e erradicação das células malignas, minimizando a lesão aos tecidos normais. As células dendríticas são poderosas células apresentadoras de antígenos capazes de interligar a resposta imune inata à adaptativa e uma eficiente apresentação de antígeno por essas células é essencial para a indução de imunidade antitumoral, por isso as células dendríticas se tornaram uma importante ferramenta imunoterapêutica (Avigan *et al*., 2012).

Diferentes modelos vacinais baseados em células dendríticas vêm sendo estudados e uma das abordagens visa o uso de antígenos tumorais individuais para criar uma resposta imune antitumoral centrada e seletiva. Algumas dessas estratégias são as vacinas baseadas em (1) peptídeos tumorais administrados com adjuvantes imunológicos, (2) em RNA ou DNA codificando determinado antígeno tumoral e (3) em vetores virais recombinantes que expressam um antígeno tumoral e moléculas coestimuladoras. Essas vacinas antígeno específicas têm demonstrado elicitar respostas imunológicas e otimizam a especificidade antitumoral. Entretanto, as limitações incluem a perda do potencial imunogênico dos antígenos escolhidos, uma vez que pode ocorrer evasão da resposta imune através da diminuição ou perda da expressão do antígeno alvo, e nas abordagens baseadas em peptídeos ainda há a questão da restrição ao antígeno leucocitário humano (HLA) apropriado (Avigan *et al*., 2012).

Outra estratégia utilizada para desenvolver uma vacina antitumoral eficiente consiste no uso de células tumorais inteiras como fonte de antígeno. Desse modo múltiplos antígenos se tornam alvo da resposta imune incluindo aqueles ainda não identificados ou aquele antígeno talvez expresso somente pelas células malignas de determinado paciente. As estratégias que utilizam a célula tumoral inteira como fonte de antígeno incluem o uso de lisados tumorais, corpos apoptóticos, DNA ou RNA total da célula tumoral, células tumorais manipuladas para expressar citocinas como GM-CSF (fator

estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos), que recruta as células dendríticas para internalizar e apresentar os antígenos derivados da célula tumoral, e as vacinas baseadas na fusão de células dendríticas com células tumorais formando as células híbridas (Avigan *et al*., 2012).

O conceito da vacina de híbridos de células dendríticas com células tumorais é relativamente simples. A célula tumoral expressa antígenos que a distinguem das células normais, mas não apresentam esses antígenos para o sistema imune de modo a estimular uma resposta imune específica efetiva contra o tumor. Já as células dendríticas são potentes indutoras de respostas de células T antígeno específica devido à expressão constitutiva de MHC de classe I e de classe II, alta capacidade de processamento e apresentação de antígenos e expressão de moléculas coestimuladoras. Ao realizar a fusão das células dendríticas com as células tumorais geram-se as células híbridas, que expressam os antígenos associados ao tumor e que possuem a capacidade de processar e apresentar esses antígenos para o sistema imune de modo a induzir imunidade tumoral específica e eficaz (Figura 4). Assim, os híbridos de células dendríticas com células tumorais são atrativos candidatos a imunoterapia do câncer, uma vez que eles expressam múltiplos antígenos tumorais, processam e apresentam esses antígenos tanto na via do MHC de classe I quanto na via do MHC de classe II na presença de coestimulação, a qual é necessária para iniciar as respostas das células T (Browning, 2013).

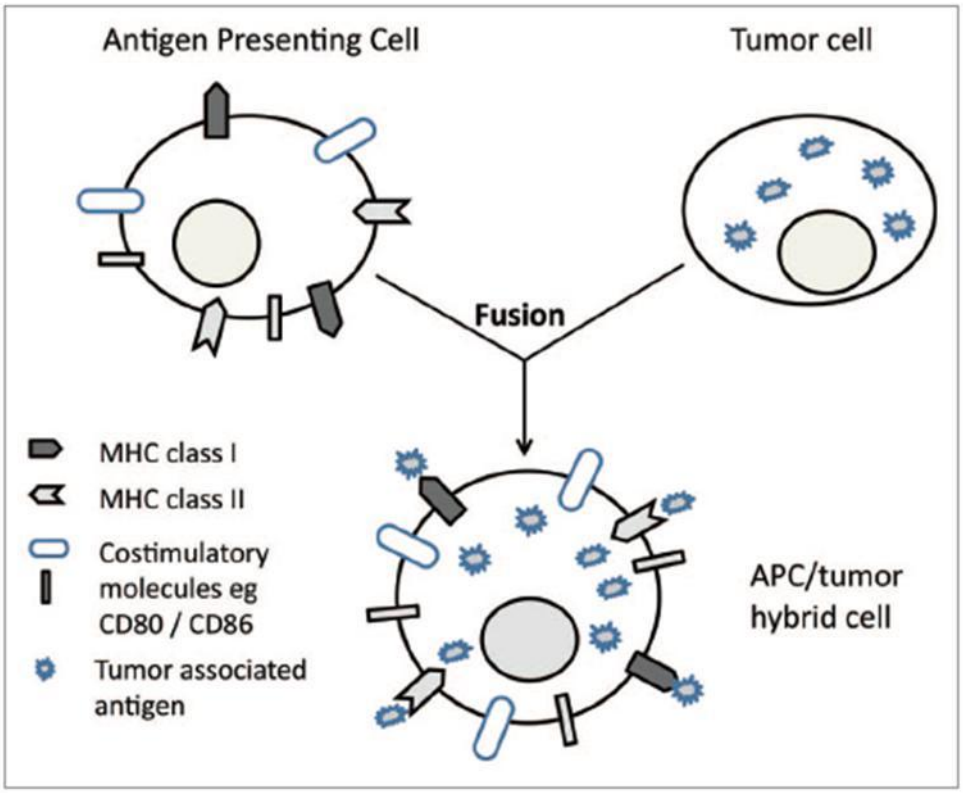

Figura 4. Representação esquemática dos híbridos de células apresentadoras de antígeno com células tumorais. As células tumorais expressam os antígenos associados ao tumor e as células apresentadoras de antígeno expressam moléculas coestimuladoras e moléculas de MHC de classe I e de classe II. Após a fusão, as células híbridas contêm os antígenos associados ao tumor e todas as moléculas necessárias para apresentar os antígenos tumorais às células TCD4 e TCD8 e iniciar respostas imunes efetivas. Browning, 2013 (Adaptado).

As células TCD4 e TCD8 são estimuladas a responder contra o tumor pelos híbridos, o que é crítico para a indução de uma resposta imune duradoura. Além disso, vale ressaltar que nos híbridos os antígenos tumorais tem livre acesso à via endógena de processamento de antígeno, enquanto as células dendríticas pulsadas com células tumorais apoptóticas ou lisado tumoral dependem da apresentação cruzada sendo, portanto, menos eficientes (Gong *et al.*, 2008; Avigan *et al.*, 2012).

Nos híbridos, o citoplasma de ambas as células são integrados sem que haja fusão nuclear. Essa característica morfológica permite a retenção das funções de ambos os tipos celulares originais, incluindo a coexpressão de todos antígenos tumorais associados ao tumor e das moléculas coestimuladoras, MHCI e MHCII provenientes das células dendríticas (Koido, 2016).

Os híbridos processam os múltiplos peptídeos antigênicos provenientes da célula tumoral e carregam esses antígenos em moléculas de MHC de classe I no retículo endoplasmático. Os complexos peptídeo-MHCI são expressos na superfície dos híbridos e apresentados aos linfócitos TCD8. Dessa forma, a via endógena de processamento e apresentação de antígeno nos híbridos é preservada. Os híbridos podem sintetizar peptídeos da célula tumoral no retículo endoplasmático, os quais podem convergir para a rota das moléculas de MHCII derivadas das células dendríticas, possibilitando a formação de complexos peptídeo-MHCII que serão expressos na superfície dos híbridos e apresentados aos linfócitos TCD4 (Figura 5). Assim, os híbridos são capazes de migrar para os linfonodos drenantes e induzir ativação policlonal de células TCD4 e TCD8 específicas para os antígenos tumorais (Koido, 2016).

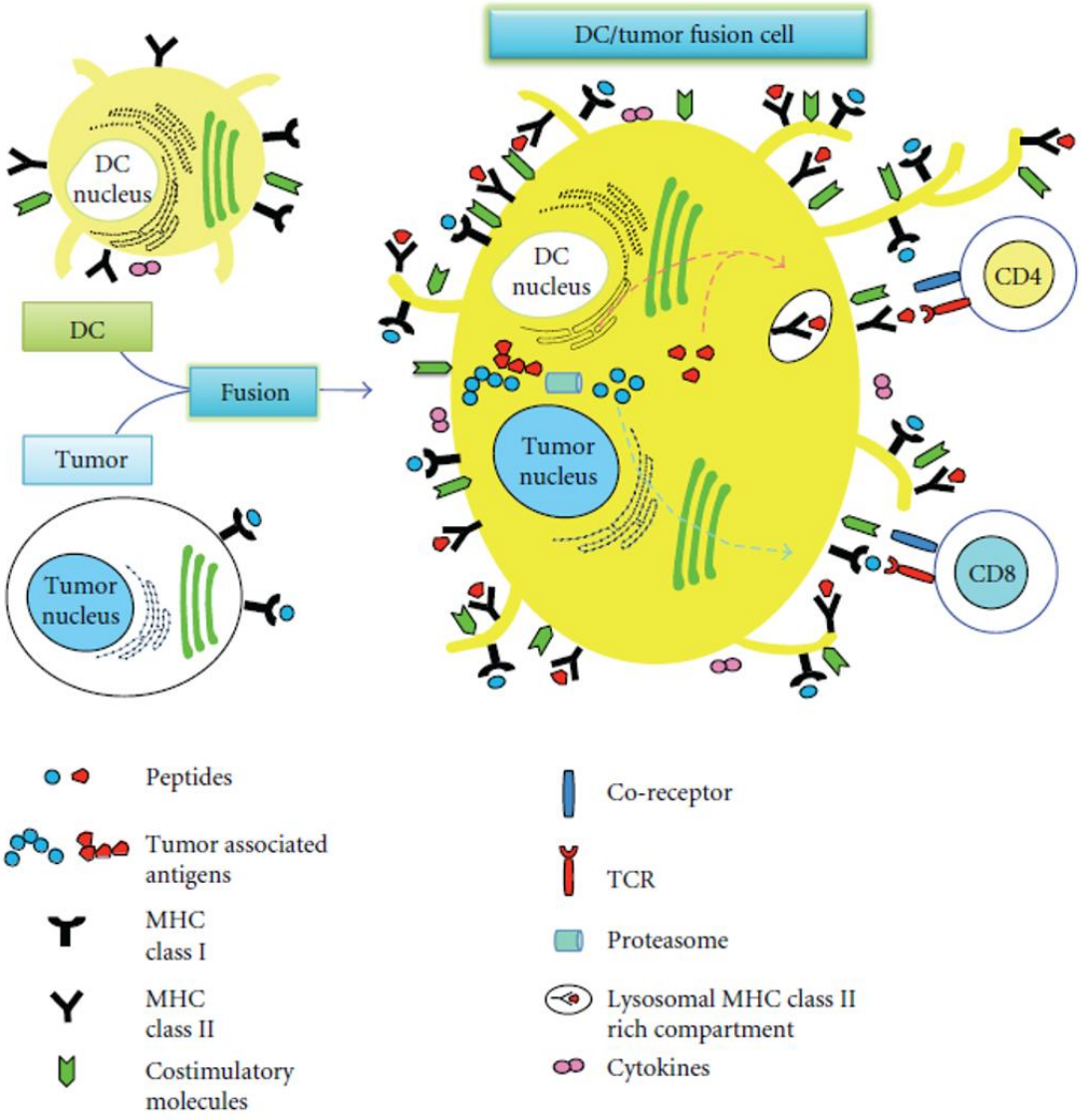

Figura 5. Modelo do processamento e apresentação de antígenos pelos híbridos de células dendríticas com células tumorais. Nos híbridos, o citoplasma de ambas as células são integrados sem que haja fusão nuclear, o que permite a retenção das funções de ambos os tipos celulares. Dessa forma, os híbridos gerados a partir de células dendríticas e células tumorais expressam moléculas de MHC de classe I e de classe II, moléculas coestimuladoras e múltiplos antígenos associados ao tumor (identificados e não identificados). Isso permite que os antígenos sejam apresentados no contexto de moléculas MHC de classe I e de classe II, levando a ativação policlonal de células TCD4 e TCD8 específicas para o tumor. Koido *et al.*, 2011 (Adaptado).

Essa abordagem da vacinação com híbridos foi primeiramente descrita por Guo e colaboradores (1994), que demonstraram que ratos vacinados com híbridos de células B ativadas e células de carcinoma hepatocelular foram resistentes ao desafio tumoral e os animais com tumor estabelecido rejeitaram-no de modo dependente de células TCD4 e TCD8. Dando continuidade aos estudos em modelos animais, Gong *et al*. (1997) observaram que a vacinação de camundongos com híbridos de células dendríticas e células de carcinoma de cólon murino (MC38) induzia linfócitos T citotóxicos *in vivo* e proteção contra o desafio com MC38 (Browning, 2013).

Diversos estudos subsequentes, em modelo animal, confirmaram que os híbridos são capazes de induzir resposta imune específica contra uma grande variedade de tipos de câncer como o renal, de cólon, de pulmão, de mama, carcinoma hepático e cervical, melanoma, sarcoma e tumores hematológicos. De acordo com esses estudos, a capacidade das vacinas de híbridos de elicitar imunidade protetora parece depender da indução da resposta tanto das células TCD4 quanto das TCD8 específicas para o tumor. Também foi verificado que híbridos contendo células dendríticas alogênicas são eficazes na indução de resposta imune específica e de proteção após desafio com o tumor (Browning, 2013).

A eficácia da vacina de híbridos em modelos animais instigou os pesquisadores a avaliarem os efeitos dessa vacina em seres humanos. Alguns trabalhos demonstraram, *in vitro*, a indução de linfócitos T citotóxicos específicos para o tumor pelos híbridos de células dendríticas com células tumorais humanas. Ensaios clínicos de fase I e fase II foram reportados em pacientes com diferentes tipos de tumor incluindo melanoma, câncer renal e de mama e mieloma múltiplo. Como frequentemente ocorre, os resultados das vacinas de híbridos em ensaios clínicos foram menos satisfatórios do que nos estudos animais. No entanto, respostas imunológicas foram relatadas em muitos pacientes, sendo observada resposta clínica em alguns deles. Além disso, esse modelo vacinal se mostrou seguro e com toxicidade mínima (Browning, 2013).

Trefzer *et al*. (2004) relataram uma remissão clínica completa, uma resposta parcial e seis casos de estabilização da doença em um estudo com 17

pacientes com melanoma em estágio III/IV, imunizados com a vacina de híbridos contendo células tumorais autólogas e células dendríticas alogênicas. Em um estudo contendo 21 pacientes com câncer renal, vacinados com híbridos de células dendríticas alogênicas e células tumorais autólogas, foi verificada resposta clínica parcial em dois pacientes e estabilização da doença em oito indivíduos. Dez dos 21 pacientes desse estudo apresentaram resposta imune antitumoral após a imunização, sendo observado aumento da expressão de IFN-γ por células TCD4 e TCD8, *ex vivo*, após estímulo com lisado tumoral (Browning, 2013).

Também foi realizado um estudo envolvendo 35 pacientes com melanoma metastático ou carcinoma de célula renal progressivo, refratários a outras abordagens terapêuticas, em estado avançado da doença e apresentando resultados negativos em testes cutâneos de hipersensibilidade do tipo tardio para antígenos comuns. Após imunização com os híbridos, 71% dos pacientes apresentaram estabilização da doença por períodos variando de 4 meses a mais de 20 meses. Dentre os pacientes com carcinoma de célula renal (22 indivíduos) 14% apresentaram resposta clínica objetiva. Além disso, a resposta imunológica apresentou clara tendência de ser melhorada nos pacientes vacinados, ao ser avaliada por testes cutâneos de hipersensibilidade do tipo tardio a antígenos recorrentes ou pela capacidade proliferativa das células do sangue periférico em resposta a antígenos tumorais ou estímulos inespecíficos (Barbuto *et al*., 2004).

Diante de todos esses resultados, as vacinas de híbridos de células dendríticas com células tumorais se mostraram uma importante ferramenta da imunoterapia do câncer, no entanto mais estudos são necessários para tentar tornar a resposta imunológica elicitada por essas vacinas mais robusta como, por exemplo, a associação de tais vacinas com adjuvantes.

1.4 *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)

A *P. acnes* é um bacilo anaeróbio e Gram-positivo pertencente à microbiota cutânea humana que possui como *habitat* o folículo sebáceo e está relacionada à patogenia da acne (Leyden *et al*., 1975; Kligman *et al*., 1976; Leyden *et al*., 1998). Quando morta, sob a forma de suspensão, a *P. acnes* é capaz de modular ou restaurar várias funções da resposta imune inata e adaptativa.

Um dos primeiros efeitos moduladores descritos dessa bactéria foi sua capacidade de ativar o sistema fagocitário mononuclear (Halpern *et al*., 1964). Já foi demonstrado que o tratamento de camundongos com *P. acnes* por via intraperitoneal ou subcutânea induz aumento da atividade fagocítica de macrófagos (Braga, 1998). Esse efeito pode explicar, em parte, o aumento da resistência de animais pré-tratados com a bactéria e desafiados com diversos patógenos, tais como: *Trypanosoma cruzi, Mycobacterium lepraemurium, Leishmania major* e *Klebsiella pneumoniae* (Brener & Cardoso, 1976; Ha *et al*., 1986; Hill, 1987; Abath *et al*., 1988; Squaiella *et al*., 2001), o que foi correlacionado com o aumento da sobrevida e diminuição da parasitemia nos animais tratados em relação aos grupos controles.

Também foi verificado que essa bactéria é capaz de induzir atividade citotóxica em macrófagos frente a diferentes linhagens tumorais, demonstrada *in vivo* pela diminuição do crescimento tumoral e aumento da sobrevida, tanto em estudos experimentais (Halpern *et al*.,1966; Kennedy *et al*., 1989; Woodruff *et al*., 1974), como clínicos, em associação com quimioterapia e radioterapia (Fisher *et al.*, 1990; Lipton *et al.*, 1991; Salomaa *et al.*, 1995). A atividade tumoricida também foi demonstrada, *in vitro,* com macrófagos oriundos de animais tratados ou previamente incubados com a bactéria e co-cultivados com diferentes linhagens tumorais. Keller e colaboradores (1991) demonstraram que macrófagos da medula óssea de ratos, incubados com *P. acnes in vitro*, apresentaram atividade citotóxica contra células de mastocitoma. Em nosso laboratório, foi verificado que macrófagos peritoneais de camundongos tratados por via intraperitoneal, com três doses de *P. acnes* em dias alternados, quando cocultivados com células de melanoma murino apresentaram maior atividade

citotóxica contra as células tumorais em relação aos macrófagos de animais não tratados (Keller *et al.*, 1991; Ananias *et al.*, 2007).

Além de modular a imunidade inata, a *P. acnes* também atua sobre a imunidade adaptativa. Já foi demonstrado efeito adjuvante da *P. acnes* na resposta imune humoral de camundongos para antígenos presentes em patógenos como *Streptococcus pneumoniae, Trypanosoma cruzi e Klebsiella pneumoniae,* bem como para toxóide tetânico e para ovoalbumina (Hebert *et al*., 1985; Squaiella *et al*., 2001; Mussalem *et al*., 2006; Squaiella e*t al*., 2008).

Esses dados que demonstram a capacidade da *P. acnes* de modular o sistema imune, principalmente os resultados observados em estudos clínicos, possibilitaram o uso dessa bactéria em imunoterapia ativa inespecífica, assim a *P. acnes* já foi comercializada em nosso meio (Parvulan® e Imunoparvum®) e empregada no tratamento de pacientes com patologias associadas à depressão da resposta imune.

A atividade imunomoduladora da *P. acnes* está relacionada com a indução de citocinas pró-inflamatórias, uma vez que foi observado aumento dos níveis de IFN-γ, IL-1α, IL-6, TNF-α, IL-12 e IL-18 em camundongos tratados com a bactéria (Green *et al*., 1977; Smith *et al*.,1993; Matsui *et al*., 1997).

No entanto, os mecanismos pelos quais a bactéria modula, ativando ou aumentando diferentes populações celulares e induzindo a síntese de citocinas, precisam ser mais elucidados. Nesse sentido, tem sido objeto de estudo de nosso laboratório a avaliação de populações celulares e, principalmente, a expressão de receptores de superfície celular modulados pelo tratamento de animais com a *P. acnes,* bem como identificar e purificar componentes bacterianos envolvidos na modulação da resposta imune induzida pela bactéria.

Dessa forma, foi realizada a purificação e caracterização do polissacarídeo solúvel (PS) obtido da membrana da *P. acnes* por extração fenólica (Longhini, 2002; Squaiella *et al*., 2008), uma vez que na suspensão bacteriana comercial utilizada em pacientes, a bactéria é morta pelo fenol, portanto preserva, principalmente, os complexos peptideoglicanos-polissacarídeos e os ácidos teicóicos e lipoteicóicos, constituintes de superfície de bactérias Gram-positivas.

Foi demonstrado que a suspensão de *P. acnes* morta pelo calor e seu componente polissacarídico solúvel purificado aumentam a resposta imune celular murina do tipo Th1, após imunização com vacina DNA para *Trypanosoma cruzi.* Isso foi verificado pelo aumento da síntese de IFN-γ e de anticorpos da classe IgG2a específicos para trans-sialidase, proteína codificada por um gene contido no plasmídeo, e correlacionado com a diminuição da parasitemia, após desafio dos animais com *T. cruzi* (Mussalem *et al*.,2006).

Em um modelo murino de hipersensibilidade imediata à ovoalbumina foi verificado que a suspensão bacteriana e o PS são capazes de aumentar ou diminuir a resposta celular a um antígeno tipicamente indutor de resposta Th2 (ovoalbumina), dependendo do protocolo de administração desses adjuvantes. Os animais foram sensibilizados com o implante de clara solidificada de ovo de galinha no tecido subcutâneo e desafiados após 14 dias com ovoalbumina agregada na pata, onde se desenvolve uma reação eosinofílica tipicamente Th2. O pré-tratamento dos animais com *P. acnes*, por via subcutânea, mudou o perfil Th2 em resposta a ovoalbumina para Th1, quando a última injeção da bactéria ocorreu uma semana antes da sensibilização. Por outro lado, quando a última injeção de *P. acnes* foi administrada no dia da sensibilização, foi observada exacerbação da resposta Th2, elevando a síntese de IgE específica e de esplenócitos produtores de IL-4, bem como o infiltrado eosinofílico nas patas dos animais, 24 horas após o desafio, compatível com a fase tardia observada na asma alérgica humana (Braga *et al*., 2003; Squaiella *et al*., 2008). Esses diferentes efeitos da *P. acnes* sobre a resposta imune celular pode estar relacionado à capacidade dessa bactéria de induzir secreção de IL-18. Xu *et al*. (2000) demonstraram que a IL-18, na presença de IL-12, possui efeito sinérgico na indução de células Th1, mas na ausência de IL-12, a IL-18 induz resposta Th2. Esse modelo permitiu concluir que a modulação da resposta imune celular, provavelmente, ocorre por ação direta da *P. acnes* ou do polissacarídeo sobre as APCs, uma vez que a indução de diferentes respostas celulares está relacionada com o estado de ativação dessas células e com o ambiente de citocinas gerado por estas frente a um determinado antígeno.

Já foi demonstrado que a *P. acnes* é capaz de agir sobre precursores de células dendríticas presentes na medula óssea de camundongos, induzindo

recrutamento, ativação e maturação dessas células. A adição dessa bactéria a culturas de células da medula óssea de camundongos induz maturação de células dendríticas com aumento da expressão de CD11c, MHCII e moléculas coestimuladoras (MacDonald *et al*., 2001). Além disso, o aumento no número de precursores dessas células foi observado na circulação de animais tratados endovenosamente com a *P. acnes* (Yoneyama *et al*., 2001).

Em nosso laboratório, foi verificado o aumento no número de células dendríticas no peritôneo de camundongos tratados com *P. acnes* ou PS por via intraperitoneal (Ananias *et al*., 2007). Observou-se também, aumento da porcentagem de células tronco ($CD34^+$) e de precursores de células dendríticas *in vivo* na medula óssea de camundongos tratados com a bactéria ou seu componente. Essas células da medula óssea dos animais tratados se diferenciavam mais em células dendríticas *in vitro,* o que foi demonstrado pelo aumento do número de células $CD11c^+MHCII^+$. Também foi observado aumento da maturação dessas células devido a maior expressão de CD80 e CD86, maior síntese de citocinas como IL-4 e IL-12, diminuição da atividade fagocítica e aumento da capacidade de apresentação de antígenos para linfócitos T (Squaiella *et al*., 2006).

O mecanismo pelo qual a *P. acnes* age sobre as células apresentadoras de antígenos precisa ser melhor estudado, porém já foi observada a participação de receptores *Toll-like* (TLRs). Tais receptores são proteínas transmembranas, que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) presentes em bactérias, vírus, fungos e protozoários. A ativação desses receptores regula tanto a resposta imune inata como a adaptativa (Takeda *et al*., 2003; Kopp *et al*., 2003).

Kim *et al.* (2002) estudando o papel dos receptores *toll-like* na patogenia da acne demonstraram que a transfecção do TLR2, em uma linhagem celular não responsiva, foi suficiente para ativar a sinalização celular via NF-κB em resposta à *P. acnes.* Esses autores comprovaram que a *P. acnes* induz ativação do promotor da IL-12p40 por mecanismo dependente de TLR2 e que a quantidade de macrófagos $TLR2^+$ presentes nas lesões de acne aumentou durante a evolução da doença, sugerindo que essa bactéria induz inflamação na acne pela ativação de TLR2 e subsequente liberação de citocinas que regulam a resposta imune local. A *P. acnes* também é capaz de aumentar a

expressão de TLR2 e TLR4 em queratinócitos, mecanismo importante para desencadear o processo inflamatório da acne (Jugeau *et al*., 2005).

Em um modelo de insuficiência hepática; foi verificado que a *P. acnes* aumenta a expressão de TLR4 em células do fígado de animais tratados. Como o TLR4 liga-se ao lipopolissacarídeo presente em bactérias Gram-negativas, acredita-se que a potencialização do choque endotóxico induzida pela *P. acnes* frente ao LPS deva-se ao aumento da expressão desse receptor (Romics *et al*., 2004).

Kalis *et al*. (2005) verificaram que o TLR9 é essencial para a indução de IFN-γ pela *P. acnes*, sendo esse receptor necessário para que os efeitos imunomoduladores desse adjuvante biológico sejam induzidos, como por exemplo, a esplenomegalia, a hematopoiese extramedular, alterações histológicas do fígado, indução de hipersensibilidade a componentes bacterianos e aumento da resistência a infecções (Kalis *et al*., 2005).

O TLR9 é um receptor intracelular presente no retículo endoplasmático e nas membranas endossômicas, que reconhece ilhas CpG não metiladas comuns em DNA de procariotos (Abbas *et al*., 2012). A expressão desse receptor também foi observada na membrana plasmática de linfócitos B de sangue periférico humano e na superfície de linfócitos B1 de camundongos (Dasari *et al*., 2005; Mussalem *et al*., 2012). O tratamento intraperitoneal com *P. acnes* é capaz de aumentar o número de linfócitos B1b expressando não somente TLR9 extra e intracelular, mas também TLR2 e TLR4 (Mussalem *et al*., 2012). Também foi demonstrado que a sinalização via TLR2 pode estar envolvida no aumento do número de células B1b induzida pela *P. acnes* e que a diferenciação das células B1 em fagócitos também é dependente dessa sinalização (Gambero *et al*., 2016).

No modelo murino que mimetiza a reação tardia observada na asma alérgica humana, estudado por nosso grupo, foi observado que a *P. acnes* aumentou o número de APCs expressando TLR2, TLR4 e TLR9 intra e extracelular (Squaiella-Baptistão *et al*., 2015). Assim, a *P. acnes* parece exercer seus efeitos tanto pela ligação a TLRs, quanto pela indução da sua expressão.

Fica claro, portanto, a capacidade da *P. acnes* de modular a função de células apresentadoras de antígenos como células dendríticas, macrófagos, linfócitos B clássicos e B1.

As vacinas de células dendríticas são uma importante ferramenta na imunoterapia contra o câncer, uma vez que essas células são responsáveis por direcionar o padrão da resposta imune e por ativar linfócitos *naïve* específicos contra os antígenos tumorais. No entanto, a resposta imune desencadeada por essas vacinas muitas vezes é fraca e incapaz de combater as células tumorais, assim outras estratégias capazes de aumentar a imunidade antitumoral devem ser estudadas e empregadas.

Diversos estudos têm avaliado o uso de adjuvantes para modular e potencializar a resposta imune protetora, uma vez que tem sido observada a eficácia dessas substâncias tanto em imunoprofilaxia quanto em imunoterapia. Entre as substâncias adjuvantes estudadas, destacam-se os adjuvantes biológicos, que são bactérias ou constituintes bacterianos que fazem parte da microbiota, o que favorece o uso dessas substâncias como constituintes de vacinas para humanos. Como exemplo, podem ser citados o bacilo de Calmette-Guérin (BCG) (Hu *et al*., 2016), a *Bordetela pertussis* e suas toxinas (Chen *et al*., 2006; Denkinger *et al*., 2007) e a *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), objeto do presente estudo.

A *P. acnes* é capaz de modular a função de células apresentadoras de antígenos como as células dendríticas, as quais tem papel fundamental na indução de resposta imune protetora e eficaz no momento da apresentação de antígeno, o que depende do padrão de expressão de moléculas de superfície destas células, vias de ativação e do ambiente de citocinas. Assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar o efeito da *Propionibacterium acnes* na resposta imune específica antitumoral induzida pela vacina de híbridos de células dendríticas com células B16F10 utilizando como modelo experimental o melanoma murino.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o efeito da *Propionibacterium acnes* na imunogenicidade da vacina de híbridos de células dendríticas com células B16F10 em modelo murino de melanoma.

2.2 Específicos

2.2.1 Avaliação da resposta imune específica de animais vacinados com os híbridos associados ou não a *P. acnes*; a saber:

- Detecção de imunoglobulinas específicas (isotipos) para antígenos tumorais;

- Capacidade de induzir formação de células TCD4 e TCD8 de memória;

- Perfil de citocinas no sobrenadante de cultura de linfócitos TCD4 e TCD8 cultivados na presença de antígenos tumorais;

- Citotoxicidade *in vitro* mediada por esplenócitos totais.

2.2.2 Avaliação do efeito profilático das vacinas por contagem de nódulos pulmonares em animais imunizados ou não e desafiados com células de melanoma.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57Bl/6, adultos jovens (6 a 8 semanas de idade) fêmeas. Essa linhagem foi adquirida do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia (CEDEME - UNIFESP). Todos os animais foram mantidos no biotério da Disciplina de Imunologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (CEP 0120/12).

3.2 Material

• Ácido cítrico (Dinâmica)
• Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Nuclear)
• Ácido sulfúrico (Dinamica)
• Albumina Sérica Bovina (BSA) (Sigma)
• Aminoácidos não-essenciais (Gibco)
• anti-CD3 de camundongo conjugado a aloficocianina (APC) (eBioscience – Número de Catálogo: 17003183)
• anti-CD3 de camundongo conjugado a fluoresceína isotiocianato (FITC) (BD – Número de Catálogo: 553062)
• anti-CD4 de camundongo conjugado a aloficocianina (APC) (eBioscience – Número de Catálogo: 17004283)
• anti-CD4 de camundongo conjugado a proteína peridinina clorofila - cianina (PerCP-Cy5.5) (eBioscience – Número de Catálogo: 45004282)
• anti-CD44 de camundongo conjugado a proteína peridinina clorofila - cianina (PerCP-Cy5.5) (eBioscience – Número de Catálogo: 45044182)
• anti-CD62L de camundongo conjugado a R-ficoeritrina (PE) (eBioscience – Número de Catálogo: 12062182)

• anti-CD69 de camundongo biotinilado (Invitrogen – Número de Catálogo: HM40153)
• anti-CD8 de camundongo conjugado a aloficocianina (APC) (eBioscience – Número de Catálogo: 17008183)
• anti-CD8 de camundongo conjugado a R-ficoeritrina (PE) (eBioscience – Número de Catálogo: 12008183)
• anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma – Número de Catálogo: A5906)
• anti-IgG1 de camundongo conjugado a peroxidase (Southern Biotech – Número de Catálogo: 107005)
• anti-IgG2c de camundongo conjugado a peroxidase (Southern Biotech – Número de Catálogo: 107905)
• Azul de Trypan (Gibco)
• Bicarbonato de Sódio (Nuclear)
• Carbonato de Sódio (Dinâmica)
• *CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit* (Life Technologies)
•CFSE (5,6-carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster) (Life Technologies)
• Cloreto de amônia (Dinâmica)
• Cloreto de potássio (Merck)
• Cloreto de sódio (Dinâmica)
• Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma)
• Dulbecco's Modified Eagle's Medium *high glucose* (DMEM) (Gibco)
• Estreptoavidina conjugada a Pacific Orange (Invitrogen)
• Fosfato de potássio monobásico (Synth)
• Fosfato de sódio dibásico (Dinâmica)
• Fosfato de sódio dibásico anidro (Dinâmica)
• GM-CSF recombinante (Gibco)
• Hemobac adulto (Probac)
• Hepes (Gibco)
• L-glutamina (Gibco)
• Líquido de cintilação (Perkin Elmer)
• 2-mercaptoetanol (Gibco)
• O-fenilenodiamina (OPD) (Sigma)
• Paraformaldeído (Sigma)

• Penicilina-Estreptomicina (Gibco)
• Peróxido de hidrogênio 30 % (ADV)
• Piruvato de Sódio (Gibco)
• Polietilenoglicol 50% PM= 1450 (Sigma)
• *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) obtida de cultura
• RPMI 1640 (Gibco)
• Solução de vitamina (Gibco)
• Solução fisiológica 0,9 % (ADV)
• Soro fetal bovino (SFB) (Gibco)
• Soro normal de camundongo
• Timidina Tritiada (Amersham Biosciences)
• Tween 20 (Synth)

3.3 Soluções

• Meio RPMI: 10,4 g de RPMI 1640, 2 g de bicarbonato de sódio e 5,69 g de hepes foram diluídos em 1 L de água bidestilada e deionizada, sob agitação. Foram retirados 51 mL de meio e acrescentados 10 mL de L-glutamina (200 mM), 10 mL de piruvato de sódio (100 mM), 10 mL de solução de vitamina (100x), 10 mL de aminoácidos não essenciais (100x), 10 mL de penicilina-estreptomicina (10.000 unidades/mL) e 1 mL de 2-mercaptoethanol (55 mM). A solução foi filtrada (0,22 µm) e armazenada a 4ºC.

• Meio R10: meio RPMI suplementado com 10 % de SFB.

• Dulbecco's Modified Eagle's Medium *high glucose* (DMEM): 13,4 g de DMEM e 3,7 g de bicarbonato de sódio foram diluídos em 1 L de água bidestilada e deionizada, sob agitação. Foram retirados 41 mL de meio e acrescentados 10 mL de piruvato de sódio (100 mM), 10 mL de solução de vitamina (100x), 10 mL de aminoácidos não essenciais (100x), 10 mL de penicilina-estreptomicina (10.000 unidades/mL) e 1 mL de 2-mercaptoethanol (55 mM). A solução foi filtrada (0,22 µm), suplementada com 10% de SFB e armazenada a 4ºC.

• Solução de PBS – 160 g de cloreto de sódio, 4 g de cloreto de potássio, 4 g de fosfato de potássio monobásico e 18,47 g de fosfato de sódio dibásico foram dissolvidos em 1 L de água destilada. Após filtragem, a solução foi armazenada a 4ºC e diluída 20x em água destilada no momento do uso. O pH foi ajustado para valores entre 7,2 e 7,4.

• Solução de PBS-BSA 1 %: solução de PBS foi acrescida de 1 % de BSA e armazenada a 4ºC.

• Solução de PBS-Tween: solução de PBS foi acrescida de 0,05 % de Tween 20 e armazenada a 4ºC.

• Solução fixadora para citometria de fluxo: solução de PBS foi acrescida de 1 % de paraformaldeído e armazenada a 4ºC.

• Tampão Citrato: 25,7 mL de solução de fosfato de sódio dibásico 0,4M, 15,15 mL de ácido cítrico 0,4M e 300 µL de peróxido de hidrogênio 30% foram diluídos em água bidestilada até completar um volume final de 200 mL. O pH foi ajustado para 5,3 e a solução foi armazenada a 4ºC.

• Solução de substrato-OPD: 50 mg de OPD foram diluídos em 50 mL de tampão citrato. Após homogeneização a solução foi utilizada imediatamente.

• Solução stop: solução de ácido sulfúrico 4 N armazenada a 4ºC.

• Tampão Hemolítico: 8,024 g de cloreto de amônia, 0,84 g de bicarbonato de sódio e 0,04 g de EDTA dissódico foram diluídos em 1 L água. A solução foi autoclavada e armazenada a 4ºC.

• Tampão carbonato 0,05M: 0,795 g de carbonato de sódio e 1,465 g de bicarbonato de sódio foram diluídos em 500 mL de água bidestilada. O pH foi ajustado para 9,6 e a solução foi armazenada a 4ºC.

• PBS-EDTA 0,02%: 0,2 g de EDTA foram diluídos em 1L de solução de PBS. A solução foi autoclavada e armazenada a 4ºC.

3.4 Métodos

3.4.1 Obtenção da suspensão de *P. acnes* morta pelo calor

A cultura "stock" de *Propionibacterium acnes* é mantida em garrafas contendo 40 mL de meio de cultura para anaerobiose Hemobac à temperatura ambiente. Foi coletado assepticamente 1 mL dessa cultura e semeado em garrafas de meio Hemobac mantidas em estufa a 37ºC por 3 dias. Após este período de crescimento, as bactérias foram centrifugadas por 30 minutos a 2.000*g* em centrífuga refrigerada e então ressuspensas em solução fisiológica 0,9% obtida comercialmente. Esse procedimento de lavagem foi repetido por mais duas vezes. A suspensão foi então autoclavada durante 20 minutos a 120ºC e submetida à dosagem proteica pelo método de Bradford (Bradford, 1976), sendo a concentração proteica obtida utilizada como parâmetro para determinar a dose de suspensão a ser inoculada nos animais.

3.4.2 Cultivo de células B16F10

As células da linhagem de melanoma murino B16F10, singeneicas a camundongos C57Bl/6, foram cultivadas em meio R10 a 37°C e 5% de CO_2. Após atingirem confluência de 80%, as células foram desaderidas da garrafa de cultura com PBS-EDTA 0,02% incubando-as por 5 minutos a 37ºC. Em seguida, a suspensão celular foi coletada e centrifugada a 320*g* por 5 minutos.

3.4.3 Congelamento de células B16F10

As células B16F10 expandidas, conforme descrito no item 3.4.2. foram ressuspensas em meio de congelamento, contendo 90% de soro fetal bovino e 10% de DMSO, e armazenadas em tubos criogênicos a -70°C.

3.4.4 Obtenção dos antígenos tumorais totais

Para a sensibilização das placas de ELISA, foram utilizados antígenos tumorais provenientes da lise da célula B16F10 expandida em cultura. Então, após atingirem confluência de 80%, as células tumorais foram desaderidas, contadas e submetidas a cinco ciclos de congelamento/descongelamento, alternando a incubação em nitrogênio líquido e em banho a 37ºC. O lisado foi utilizado imediatamente após o último ciclo de congelamento/descongelamento para a sensibilização das placas de ELISA.

Para a avaliação do perfil de citocinas secretadas pelas células T, quando estimuladas com antígenos tumorais, foram utilizados antígenos obtidos da lise de células B16F10 recém isoladas do pulmão de camundongos inoculados com o tumor. As células tumorais foram lisadas conforme descrito anteriormente, e, em seguida, o lisado total foi aliquotado e armazenado a -20ºC até ser utilizado.

Em ambos os casos, a concentração total de proteína nos lisados foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e foi utilizada para calcular a quantidade de antígeno necessária para cada experimento.

3.4.5 Obtenção de culturas enriquecidas em células dendríticas

A medula óssea da tíbia e do fêmur de camundongos C57Bl/6 foi extraída e contada. Em seguida, a concentração da suspensão celular foi ajustada para $2,5x10^5$ células/mL e as células foram cultivadas em placas de 6 orifícios, contendo 2 mL de suspensão celular em meio DMEM suplementado com 20 ng de GM-CSF/mL. As placas foram mantidas em estufa a 37ºC e 5% de CO_2 e após quatro dias em cultura, em cada orifício, foi adicionado 1 mL de meio DMEM suplementado com a mesma concentração de GM-CSF. No sétimo dia de cultura, foram retirados 500 µL de meio de cada orifício e, em seguida, foi adicionado 1 mL de meio sem GM-CSF. No nono dia de cultura, as placas de cultura foram mantidas em gelo por 15 minutos. As células do sobrenadante foram coletadas, foi adicionado 2 mL de RPMI gelado e com a pipeta foi realizada a lavagem do orifício. Em seguida, as células que

desaderiram com essa lavagem também foram coletadas e o total de células coletado foi centrifugado a 160*g* por 8 minutos a 4ºC. A concentração e a viabilidade celular foram determinadas por meio da contagem em câmara de Neubauer na presença de Azul de Trypan.

3.4.6 Fusão de células dendríticas com células B16F10

As células B16F10 foram desaderidas, irradiadas (200Gy) e contadas, então $1x10^7$ células tumorais foram misturadas com $1x10^7$ células dendríticas. Em seguida, essas células foram centrifugadas por 5 minutos a 160*g.* O sobrenadante foi descartado de modo que o *pellet* ficasse completamente seco. Após soltar o *pellet*, lentamente, foi adicionado sobre este 500µL de Polietilenoglicol (PEG), mantendo-se o tubo que continha as células em banho a 37ºC. Em seguida, a suspensão celular foi mantida por 90 segundos em repouso no banho a 37ºC. Ao final desse período, lentamente foi adicionado 40 mL de RPMI ao tubo contendo as células fusionadas, adicionando-se aproximadamente 1 mL de meio a cada 15 segundos. Ao completar a diluição em RPMI, a suspensão celular foi mantida por 5 minutos em banho a 37ºC. Ao final da incubação, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 160*g*, ressuspensas em 20 mL de RPMI e mantidas por 1 hora em estufa a 37ºC e 5% de CO_2. Então, as células foram coletadas e contadas para a determinação da concentração celular e preparo das vacinas.

3.4.7 Avaliação da eficácia de fusão das células dendríticas com células B16F10

No nono dia de cultura, as células dendríticas foram desaderidas, contadas e marcadas com *Cell Trace Violet*. Para marcar $1x10^7$ células dendríticas foi utilizado 1µL de *Cell Trace Violet* diluído em 2 mL de PBS aquecido. A suspensão celular permaneceu por 20 minutos a 37ºC e após a incubação foram realizadas duas lavagens com 10 mL de R10. Ao final da última lavagem, as células dendríticas foram ressuspensas em 1 mL de RPMI para determinação da concentração celular.

Em paralelo, as células B16F10 foram desaderidas, contadas e marcadas com CFSE 1,25 µM por 10 minutos, em estufa a 37°C. O volume de CFSE utilizado foi determinado de acordo com a seguinte proporção: 1 mL de CFSE 1,25 µM para cada $5x10^6$ células. Ao final dessa incubação, as células foram lavadas três vezes com meio R10 por 5 minutos a 160*g*. Por fim, as células B16F10 foram ressuspensas em 1 mL de RPMI e foi determinada a concentração celular.

Após as contagens, foi realizada a fusão celular conforme descrito no item 3.4.6. e as células foram avaliadas por citometria de fluxo (Attune™ Acoustic Focusing Flow Cytometer - Invitrogen™).

3.4.8 Imunização de camundongos com a vacina de híbridos

Cada camundongo recebeu duas doses da vacina de células dendríticas fusionadas com as células B16F10, por via subcutânea, na região dorsal próximo a base da cauda. O intervalo entre as doses foi de duas semanas e cada vacina continha $5x10^5$ híbridos viáveis associados ou não a 140 µg de proteína da *P. acnes*. Os animais dos grupos controles receberam apenas o veículo (PBS) ou o adjuvante (140µg proteína da *P. acnes*).

3.4.9 Avaliação da resposta de anticorpo específica para antígenos tumorais induzida pela vacina de híbridos

O soro dos animais imunizados e controles foram coletados sete dias após a segunda dose da vacina e armazenados em pool a -20ºC até a dosagem de anticorpos específicos para antígenos da B16F10 (IgG_{total}, IgG1 e IgG2c).

A sensibilização das placas de ELISA foi realizada com o lisado da B16F10, produzido conforme descrito no item 3.4.4.. Foram utilizados 50 µg de proteína do lisado/orifício em volume final de 200 µL de tampão carbonato 0,05M, seguindo-se incubação *overnight* a 4ºC. Após esse período, foram realizadas 3 lavagens com PBS-Tween 0,05% e, posteriormente, o bloqueio dos sítios inespecíficos com 200 µL PBS-Tween 0,05% acrescido de 5% de

leite em pó desnatado (Molico) e 1% de albumina sérica bovina/orifício, por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas 3 etapas de lavagem com PBS-Tween 0,05%, e, então, foram adicionados 100 μL/orifício das amostras de soro, diluídas na solução de bloqueio de 1/200 até 1/25.600 para IgG total e de 1/50 até 1/6.400 para IgG1 e IgG2c. Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS-Tween 0,05% e acrescidas de 100 μL/orifício dos seguintes anticorpos monoclonais diluídos na solução de bloqueio: anti-IgG conjugado a peroxidase (1/1.000), anti-IgG1 e anti-IgG2c conjugados a peroxidase (1/4.000). As placas permaneceram à temperatura ambiente por mais 1 hora, e os orifícios foram novamente lavados 5 vezes com PBS-Tween 0,05%. As reações foram reveladas pela adição de 100 μL/orifício de tampão citrato-OPD, incubando-se por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz.

As reações foram então interrompidas com 50 μL/orifício de ácido sulfúrico 4N e as absorbâncias foram determinadas pelo aparelho *EnSpire® Multimode Plate Reader* (PerkinElmer) a 492 nm.

O primeiro ponto da curva da diluição do soro com absorbância maior que 0,100 foi considerado o título do anticorpo em questão. Para avaliar o balanço entre o padrão Th1 e Th2, a razão dos isotipos foi calculada pela divisão do título de IgG1 pelo de IgG2c.

3.4.10 Avaliação das populações de células T de memória nos linfonodos drenantes de camundongos vacinados com os híbridos associados ou não a *P. acnes*

Os linfonodos inguinais dos animais vacinados foram coletados 24 horas após a segunda dose da vacina. Esses órgãos linfoides foram macerados e foi determinado o número absoluto de células. Em seguida, foi realizado o bloqueio do receptor Fc incubando-se as células com 5% de soro normal de camundongo por 30 minutos a 4ºC. Após uma lavagem, as células foram marcadas, sob as mesmas condições, com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos: anti-CD3 FITC, anti-CD4 ou anti-CD8 APC, anti-CD44 PerCP-Cy5.5 e anti-CD62L PE. As células também foram

marcadas com anticorpo monoclonal anti-CD69 biotinilado. Após essa incubação, foi realizada uma etapa de lavagem e, então, foi adicionado às células estreptoavidina conjugada a Pacific Orange, por 30 minutos a 4ºC. Em seguida, foi realizada mais uma etapa de lavagem e as células foram avaliadas por citometria de fluxo (BD FACSCanto^{TM}II) para avaliação das populações de células TCD4 e TCD8 *naïve* ($CD44^{low}CD62L^{high}$), de memória central ($CD44^{high}CD62L^{high}$) e de memória efetora ($CD44^{high}CD62L^{low}$). Também foi avaliada a porcentagem e grau de ativação das células TCD4 e TCD8 de acordo com a expressão de CD69. O número absoluto de cada população foi calculado multiplicando-se o número total de células obtido dos linfonodos pela porcentagem de cada subpopulação.

3.4.11 Avaliação do perfil de citocinas no sobrenadante das culturas de células TCD4 e TCD8 estimuladas com os antígenos tumorais

O baço dos camundongos foi extraído e macerado, 14 dias após a última dose da vacina. A suspensão de células foi incubada com tampão hemolítico (2mL/baço por 2 minutos) e lavada duas vezes com RPMI. Em seguida, foi determinada a concentração celular e realizado o bloqueio do receptor Fc, com 5% de soro normal de camundongo, por 30 minutos a 4ºC. Sob essas mesmas condições, as células foram marcadas com os anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos anti-CD3 APC, anti-CD4 PerCP e anti-CD8 PE. Ao término da incubação, as células TCD4 e TCD8 foram purificadas pelo citômetro FACSAria^{TM}II - Cell Sorter (BD).

Então, $1x10^5$ células TCD4 ou TCD8 foram plaqueadas juntamente com $2,5x10^4$ células dendríticas e antígenos tumorais (23,6 µg de proteína/mL em volume final de 200µL), obtidos por meio da lise da B16F10 recém isolada, conforme descrito no item 3.4.4..

Após cinco dias em cultura, a 37ºC e 5% CO_2, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20ºC. Para a avaliação do perfil de citocinas no sobrenadante de cultura, foi utilizado o *Cytometric Bead Array (CBA) mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine kit* (BD) de acordo com as instruções do fabricante.

3.4.12 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*

As células B16F10 ($2x10^5$ células/mL) foram cultivadas em meio contendo timidina tritiada (5 µCi/mL) por 24 horas, a 37ºC e 5% de CO_2. Após esse período as células foram desaderidas, lavadas e foi determinada a concentração celular. Em seguida, foram plaqueadas $1x10^4$ células B16F10/orifício, em placas de cultura de 96 orifícios (fundo U), juntamente com os esplenócitos totais dos animais dos grupos vacinados ou controles. Foi utilizada a proporção de 1 célula-alvo para 50 células efetoras para determinar a citotoxicidade contra o melanoma (C). A lise espontânea (E) foi determinada cultivando-se a célula-alvo (B16F10) somente com R10. As placas de cultura foram mantidas por 3,5 horas em estufa a 37ºC e 5% CO_2. Após esse período as células foram colhidas em *Cell-Harvester* (PerkinElmer) e a radioatividade foi quantificada em contador β (MicroBeta^2 LumiJET-PerkinElmer), na presença de líquido de cintilação. A porcentagem de lise foi determinada de acordo com a seguinte fórmula: %Lise = [(E cpm – C cpm)/E cpm] x 100.

3.4.13 Indução da colonização pulmonar por células B16F10

Para a indução da colonização pulmonar, as células B16F10 foram ressuspensas em PBS e a concentração celular foi determinada. Os camundongos foram desafiados com $3x10^5$ B16F10, por via endovenosa, sete dias após a segunda imunização. Os animais foram eutanasiados 14 ou 20 dias depois do desafio para a determinação do número de nódulos pulmonares.

3.4.14 Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA de uma via, seguido do pós-teste Tukey's Multiple Comparison Test, no programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, CA, USA), e as diferenças foram consideradas significantes quando os valores de *p* foram menores do que 0,05 ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Fusão das células dendríticas com células B16F10

Foi realizada a padronização de uma metodologia para a fusão de células dendríticas com as células B16F10 utilizando polietilenoglicol (PEG). Para avaliar a porcentagem de híbridos formados com PEG, as células dendríticas foram marcadas com *CellTrace™ Violet* e as células B16F10 com CFSE, previamente ao processo de fusão.

Na análise por citometria de fluxo, as células foram selecionadas (Figura 6A) e avaliadas quanto a fluorescência do CFSE e do *CellTrace™ Violet* (Figura 6B e 6C).

Inicialmente, foi avaliada a eficácia de fusão na proporção de uma célula dendrítica para cinco células B16F10. Foi verificado que do total de células cerca de 5,7% correspondiam às células dendríticas, ou seja, células marcadas com *Cell Trace Violet* e 57,7% do total de células correspondiam às células tumorais. Apenas 13,3% do total de células eram duplo-positivas para *Cell Trace Violet* e CFSE, ou seja, células dendríticas fusionadas com células B16F10 (Figura 6B).

Uma vez que a porcentagem de híbridos formados estava baixa (13,3%) e havia uma alta porcentagem de células tumorais não fusionadas (57,7%) (Figura 6B), foi avaliada a porcentagem de híbridos formados realizando a fusão das células dendríticas com as células tumorais na proporção 1:1. A análise por citometria de fluxo permitiu verificar que diminuir a proporção de célula tumoral para cada célula dendrítica de 5:1 para 1:1 aumentou a eficiência de fusão, uma vez que foi obtido 22,2% de células duplo-positivas para *CellTrace™ Violet* e CFSE, ou seja, células dendríticas fusionadas com células B16F10 (Figura 6C). Além disso, foi possível reduzir a porcentagem de células tumorais não fusionadas para 16,0% do total de células.

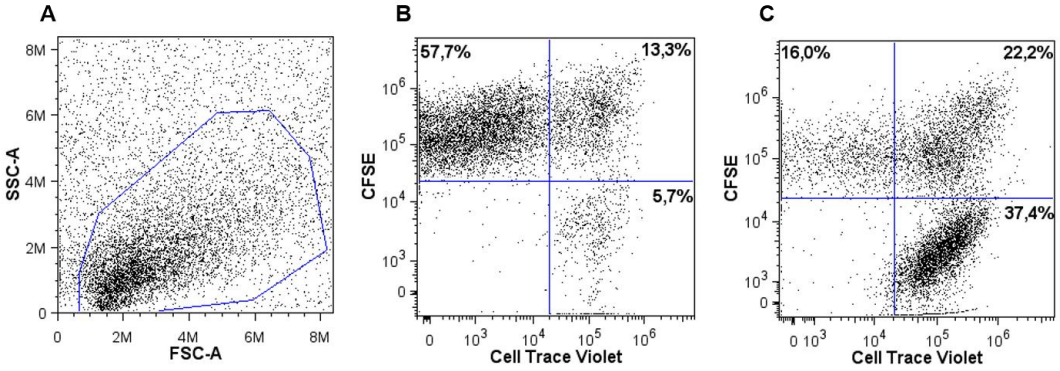

Figura 6. Avaliação da porcentagem de células dendríticas fusionadas com células B16F10. No nono dia de cultura, as células dendríticas foram coletadas e marcadas com *CellTrace™ Violet*. Em paralelo, as células B16F10 foram marcadas com CFSE 1,25 µM. Após as marcações, as células dendríticas foram misturadas com células B16F10 nas proporções 1:5 e 1:1, respectivamente, para realização da fusão celular utilizando polietilenoglicol. Após a fusão, as células permaneceram por 1 hora em estufa a 37ºC e 5% CO_2. Em seguida, as células foram coletadas e avaliadas por citometria de fluxo. As células foram selecionadas (A) e avaliadas quanto à porcentagem de híbridos formados após fusão nas proporções 1:5 (B) e 1:1 (C).

4.2 Avaliação da resposta de anticorpo específica para antígenos da B16F10 induzida pela vacina de híbridos

Para verificar se a vacina de híbridos seria capaz de induzir resposta de anticorpo contra antígenos do melanoma e se a *P. acnes* modularia essa resposta, foi padronizado um ELISA, conforme descrito no item 3.4.9.. Foi observado que a vacina de híbridos induziu a síntese de baixos níveis de IgG específicos para os antígenos da B16F10, inclusive dos isotipos IgG1 e IgG2c. A associação da *P. acnes* à vacina de híbridos induziu aumento estatisticamente significante ($p < 0,05$) dos títulos de IgG_{total}, IgG1 e IgG2c específicos para os antígenos tumorais em relação ao grupo Híbrido. Como esperado, não foram detectados anticorpos específicos para B16F10 nos grupos controles (PBS e *P. acnes*) (Figura 7).

Para avaliar o balanço entre os padrões Th1 e Th2, a razão entre as subclasses IgG1 e IgG2c foi analisada. Altos valores da razão IgG1/IgG2c indicam um padrão de resposta imune do tipo Th2, enquanto valores menores indicam o predomínio da resposta Th1. No grupo Híbrido+*P. acnes*, a razão IgG1/IgG2c foi igual a 4,0 (Tabela 1), já no grupo Híbrido esse valor foi igual a 14,0 (Tabela 1). Isso demonstra que o adjuvante foi capaz de polarizar a resposta imune para o padrão Th1.

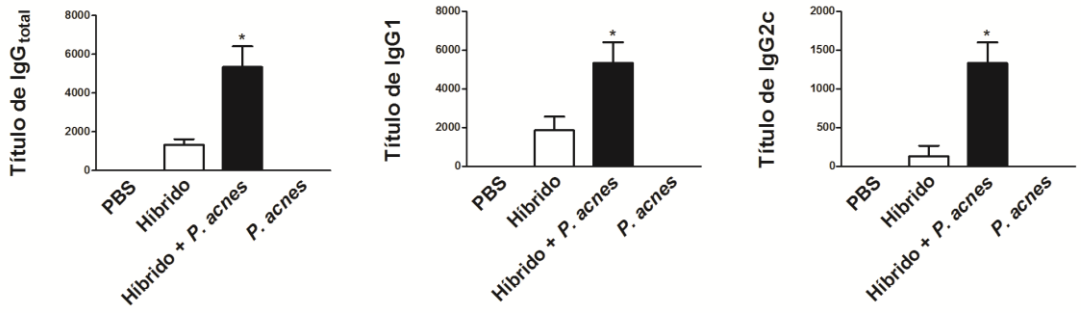

Figura 7. Efeito adjuvante da *P. acnes* na resposta de anticorpo específica para antígenos da B16F10 induzida pela vacina de híbridos. Foram administradas 2 doses da vacina, por via subcutânea, com intervalo de 14 dias entre elas. Cada dose continha $5x10^5$ híbridos viáveis associados ou não a 140 µg de proteína da *P. acnes.* Sete dias após a última dose, o soro dos animais foi coletado e os títulos de IgG_{total}, IgG1 e IgG2c específicos para antígenos da B16F10 foram determinados por ELISA. O título corresponde a primeira diluição do soro com absorbância maior que 0,1. Os gráficos representam a média de três experimentos independentes. * $p < 0,05$

Tabela 1. Polarização da resposta de anticorpo para o padrão Th1 pela associação da *P. acnes* à vacina de híbridos

Grupo	Título das subclasses de IgG		Razão IgG1/IgG2c
	IgG1	IgG2c	
Híbrido	1866	133	14,0
Híbrido + *P. acnes*	5333	1333	4,0

O soro dos animais imunizados com a vacina de híbridos foi avaliado por ELISA para detectar os isotipos de IgG específicos para os antígenos da B16F10. As médias dos títulos de IgG1 e IgG2c foram calculadas com dados de três experimentos independentes. A razão das subclasses de IgG foi calculada para cada grupo dividindo-se a média do título do isotipo IgG1 pela média do título de IgG2c.

4.3 Análise do perfil de citocinas secretadas pelas células T quando estimuladas com antígenos tumorais

Para avaliar o padrão de citocinas induzido pela resposta imune específica, 14 dias após a segunda imunização, os linfócitos TCD4 e TCD8 isolados dos esplenócitos totais foram cultivados com antígenos tumorais por 5 dias.

Foi verificado que as células TCD4 do grupo Híbrido+*P. acnes* secretaram maior quantidade de IFN-γ quando estimuladas com antígenos da B16F10 do que as células dos grupos Híbrido, *P. acnes* e PBS. A vacina de híbridos associada ou não à *P. acnes* aumentou a secreção de IL-10, IL-17, IL-6 e IL-4 pelas células TCD4 em relação ao grupo PBS, enquanto a produção de TNF e IL-2 foi similar entre esses grupos. Por outro lado, a associação da *P. acnes* à vacina de híbridos reduziu a secreção de IL-10, IL-17 e IL-4 em relação ao grupo Híbrido, polarizando a resposta para o perfil Th1. O padrão de citocinas secretadas pelas células TCD4 do grupo *P. acnes* não foi diferente do observado no grupo PBS (Figura 8A).

No sobrenadante de cultura dos linfócitos TCD8 do grupo Híbrido+*P. acnes,* foi observada maior concentração de IL-17 e IFN-γ quando comparado aos grupos Híbrido, *P. acnes* e PBS. As células TCD8 de todos os grupos secretaram quantidades similares de TNF e IL-6 e os níveis de IL-2, IL-4 e IL-10 foram praticamente indetectáveis (Figura 8B).

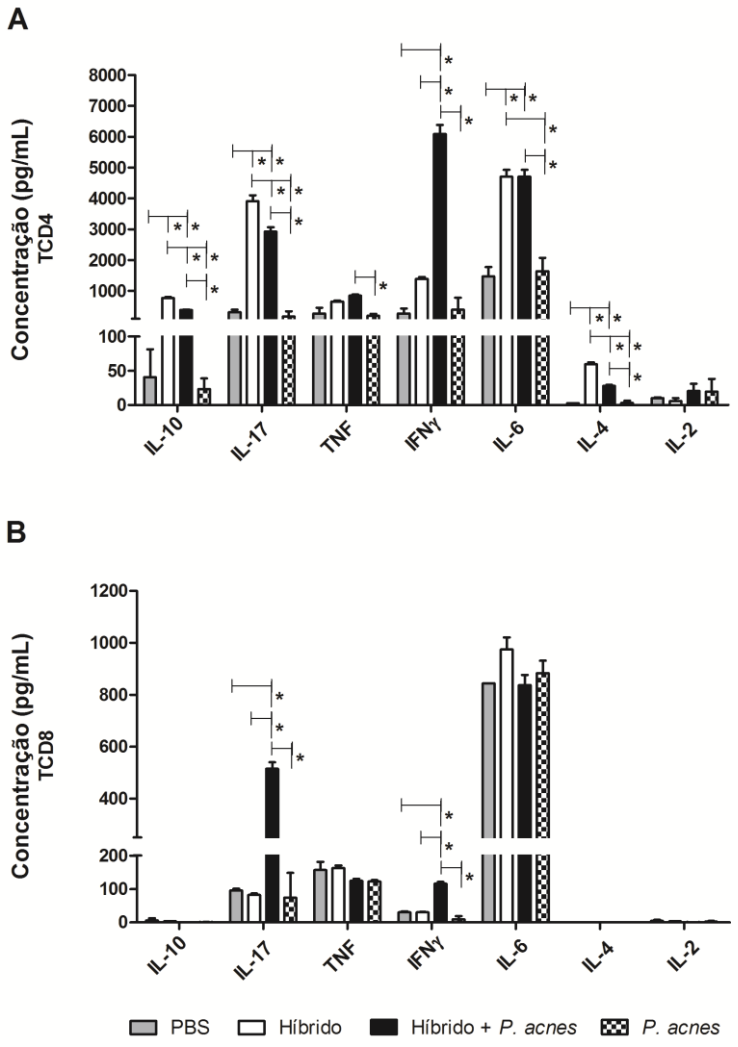

Figura 8. Presença da *P. acnes* na vacina de híbridos induz polarização da resposta imune aos antígenos tumorais para o perfil Th1. Duas semanas após a segunda dose da vacina, os linfócitos TCD4 (A) e TCD8 (B) foram purificados a partir dos esplenócitos totais (FACS ARIAII – Cell Sorter) e cultivados com células dendríticas e antígenos tumorais. O sobrenadante dessas culturas foi coletado após 5 dias e armazenado a -20°C. Para a avaliação do perfil de citocinas no sobrenadante de cultura, foi utilizado o *Cytometric Bead Array (CBA)* com anticorpos de detecção para IL-10, IL-17, TNF, IFN-γ, IL-6, IL-4 e IL-2, conforme as instruções do fabricante. * $p < 0,05$

4.4 Avaliação, *in vitro*, da atividade citotóxica de esplenócitos totais de camundongos vacinados com híbridos associados ou não à *P. acnes*

Para investigar a capacidade dos esplenócitos de induzirem lise das células tumorais, vinte e quatro horas após a última dose da vacina, os esplenócitos foram obtidos e co-cultivados com células B16F10, previamente incubadas com timidina tritiada.

As células do grupo Híbrido+*P. acnes* foram mais citotóxicas do que os esplenócitos dos demais grupos, uma vez que a porcentagem de lise das células B16F10 nesse grupo foi igual a 40,2 ± 2,2%, enquanto nos demais grupos foi apenas de 27,2 ± 0,7% (Híbrido), 29,4 ± 1,8% (PBS) e 26,3 ± 1,9% (*P. acnes*) (Figura 9).

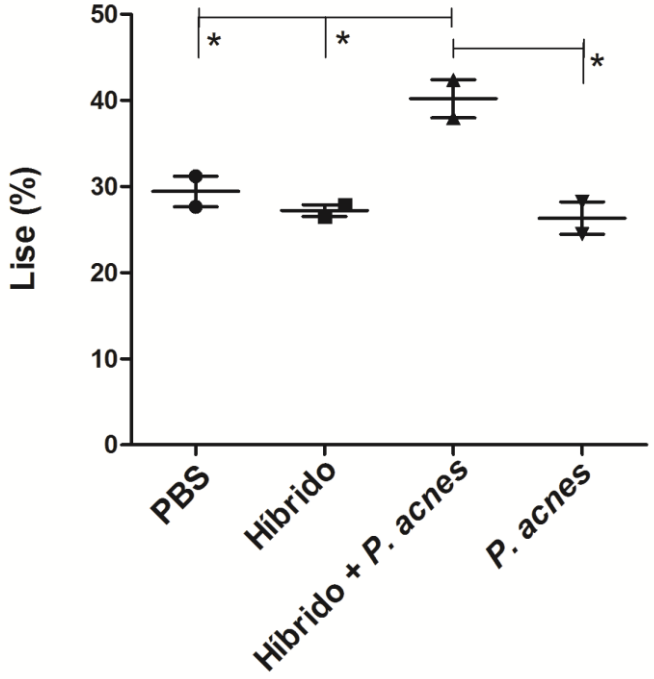

Figura 9. Adição de *P. acnes* à vacina de híbridos aumenta a capacidade citotóxica dos esplenócitos contra células de melanoma murino. Vinte e quatro horas após a segunda dose da vacina, os esplenócitos foram obtidos e cultivados com B16F10, previamente incubada com timidina tritiada. As células foram mantidas na proporção de 1 célula-alvo para 50 células efetoras por 3,5 horas, a 37ºC e 5% CO_2. Após a incubação, as células foram colhidas em *Cell-Harvester*, a radioatividade foi mensurada em contador β e convertida em porcentagem de lise . * $p < 0,05$

4.5 Avaliação das populações de células T de memória nos linfonodos drenantes de camundongos vacinados com os híbridos associados ou não a *P. acnes*

Os linfonodos inguinais foram extraídos dos animais, vinte e quatro horas após a segunda imunização, para a avaliação do fenótipo de memória dos linfócitos T. As células foram selecionadas num gráfico do tipo *dot plot* de tamanho por complexidade (FSC x SSC) (Figura 10A), em seguida, foi realizada a exclusão de *doublets* (Figura 10B) e as células TCD4 (Figura 10C) ou TCD8 (Figura 10D) foram avaliadas quanto à expressão de CD44 e CD62L (Figura 10E e 10F) ou CD69 (Figura 10G e 10H).

Todos os tratamentos aumentaram o número total de células TCD4 e TCD8 em relação ao grupo PBS (Figura 11A). Ao avaliar a população de células T *naïve*, foi verificado aumento dessa subpopulação de células TCD4 e TCD8 no grupo *P. acnes* e de células TCD8 no grupo Híbrido+*P. acnes* em relação ao PBS (Figura 11B).

No entanto, foi verificado que a vacina de híbridos associada a *P. acnes* aumentou significativamente o número absoluto de células TCD4 e TCD8 de memória efetora e central quando comparado aos demais grupos (Figura 11C e 11D). Apesar da vacina de híbridos induzir células TCD4 ($2{,}10 \times 10^5 \pm 0{,}10$) e TCD8 ($4{,}20 \times 10^5 \pm 0{,}20$) de memória central, no grupo Híbrido+*P. acnes* o número absoluto desse fenótipo celular foi estatisticamente maior (TCD4= $5{,}25 \times 10^5 \pm 0{,}25$ e TCD8= $15{,}75 \times 10^5 \pm 0{,}75$) (Figura 11C).

Além disso, a adição da *P. acnes* à vacina de híbridos aumentou o número absoluto de células TCD4 de memória efetora ($6{,}30 \times 10^5 \pm 0{,}30$) em relação aos demais grupos (Híbrido= $2{,}10 \times 10^5 \pm 0{,}10$; PBS= $0{,}90 \times 10^5 \pm 0{,}10$; *P. acnes*= $3{,}90 \times 10^5 \pm 0{,}10$) (Figura 11D) e somente a associação do adjuvante à vacina de híbridos foi capaz de induzir a formação de células TCD8 de memória efetora (Figura 11D).

Também foi verificado que o grupo Híbrido+*P. acnes* foi capaz de aumentar o número absoluto de células TCD4 e TCD8 ativadas quando comparado ao grupo Híbrido (Figura 11E). Porém não foi observada diferença quanto ao grau de ativação dessas células (Figura 11F).

Quando a proporção de cada fenótipo celular foi calculada em relação a porcentagem total de células TCD4 ou TCD8 de memória efetora, memória central e *naïve*, foi verificado que no grupo Híbrido+*P. acnes* a porcentagem de células TCD4 de memória central foi 2,9x, 2,1x e 1,5x maior do que o observado nos grupos PBS, Híbrido e *P. acnes*, respectivamente. Para as células TCD8, esse valor foi 3,0x maior no grupo Híbrido+*P. acnes* do que no PBS e 2,2x maior do que nos grupos Híbrido e *P. acnes* (Figura 12A e 12B).

A proporção de células TCD4 efetoras de memória estava aumentada no grupo Híbrido+*P. acnes* 2,8x, 1,8x e 1,5x em relação aos grupos PBS, Híbrido e *P. acnes*, respectivamente. Ao comparar a frequência de células TCD8 de memória efetora dentre os três fenótipos avaliados, a porcentagem do grupo Híbrido+*P. acnes* aumentou 2,0x, 1,7x e 1,4x quando comparado aos grupos PBS, Híbrido e *P. acnes*, respectivamente (Figura 12A e 12B).

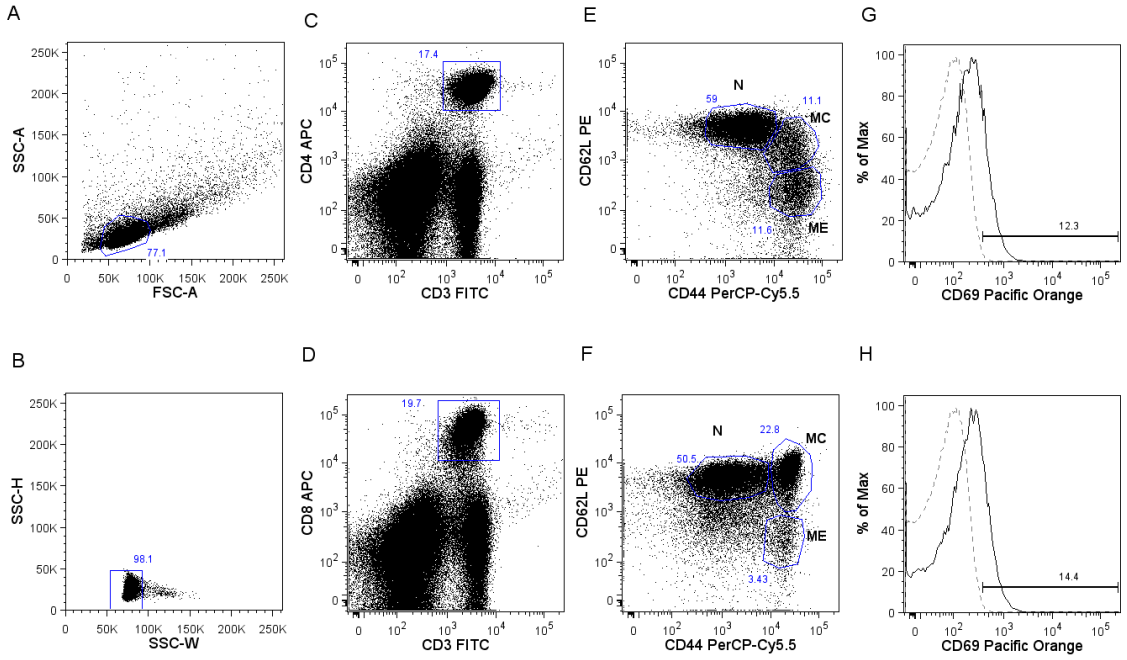

Figura 10. Representação esquemática da estratégia de análise para determinar o fenótipo de memória das populações de células TCD4 e TCD8 por citometria de fluxo. As células dos linfonodos inguinais dos camundongos imunizados com os híbridos associados ou não a *P. acnes* foram marcadas com os anticorpos monoclonais CD3 FITC, CD4 ou CD8 APC, CD44 PerCP, CD62L PE e CD69 biotinilado + estreptoavidina PO e analisadas por citometria de fluxo. As células foram selecionadas em um gráfico do tipo *dot plot* (A), foi realizada a exclusão de *doublets* (B) e as células $CD3^{+}CD4^{+}$ (C) ou $CD3^{+}CD8^{+}$ (D) foram selecionadas e avaliadas quanto à expressão de CD44 e CD62L (E e F) ou CD69 (G e H). As células $CD44^{high}CD62L^{high}$ correspondem à população de células de memória central (**MC** em E e F), já as células de memória efetora são $CD44^{high}CD62L^{low}$ (**ME** em E e F) e as células *naïve* são $CD44^{low}CD62L^{high}$ (**N** em E e F).

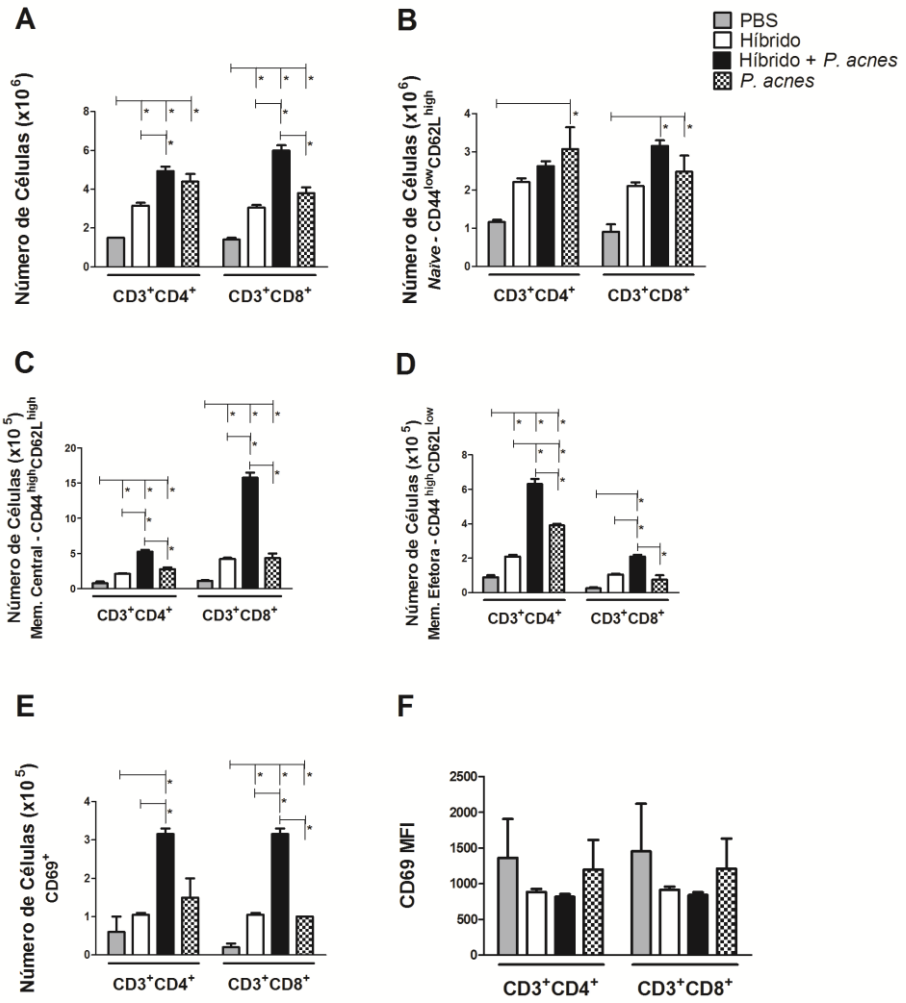

Figura 11. Associação da *P. acnes* à vacina de híbridos aumenta o número absoluto de células TCD4 e TCD8 de memória no linfonodo drenante de camundongos imunizados. Vinte e quatro horas após a última dose da vacina, foi determinado o número absoluto de células nos linfonodos inguinais e, então, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais e avaliadas por citometria de fluxo. O número absoluto de cada subpopulação foi calculado multiplicando-se o número total de células pela frequência de cada fenótipo obtida por citometria de fluxo. Os gráficos representam o número absoluto de linfócitos TCD4 e TCD8 (A) e suas subpopulações de células *naïve* ($CD44^{low}CD62L^{high}$) (B), memória central ($CD44^{high}CD62L^{high}$) (C), memória efetora ($CD44^{high}CD62L^{low}$) (D), bem como o número total de células TCD4 e TCD8 ativadas ($CD69^{+}$) (E) e o grau de ativação dessas células (intensidade média de fluorescência do $CD69^{+}$) (F). * $p < 0,05$

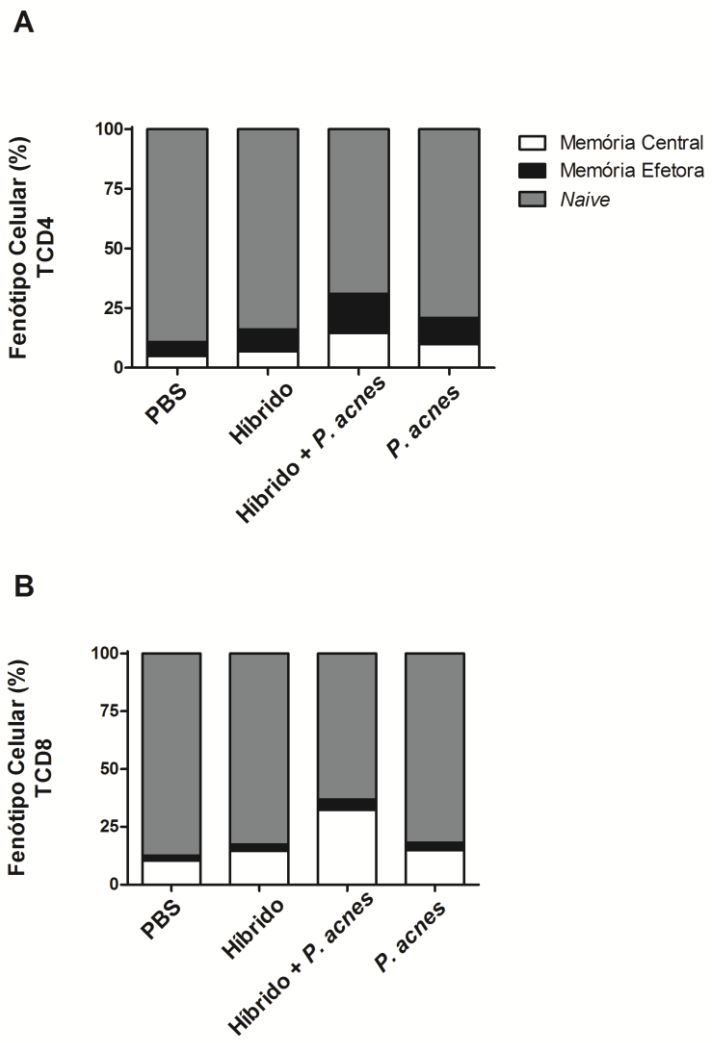

Figura 12. Adição da *P. acnes* à vacina de híbridos eleva a proporção de células TCD4 e TCD8 de memória efetora e central. As células dos linfonodos inguinais foram coletadas 24h após a segunda dose da vacina, então foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos e analisadas por citometria de fluxo. A proporção de cada subpopulação de células TCD4 (A) e TCD8 (B) foi calculada em relação à porcentagem total de células *naïve* (barra cinza), de memória central (barra branca) e de memória efetora (barra preta).

4.6 Efeito da vacina de híbridos associada ou não à *P. acnes* na progressão do tumor

O próximo passo foi verificar *in vivo* a capacidade dessas vacinas protegerem contra a colonização pulmonar. Então, sete dias depois da segunda imunização, os camundongos foram desafiados endovenosamente com células B16F10 e o número de nódulos pulmonares foi determinado após 14 (Figura 13A) ou 20 (Figura 13B) dias.

Quatorze dias após o desafio, foi observado que a vacina de híbridos associada ou não a *P. acnes* protegeu igualmente contra a colonização pulmonar, uma vez que as médias de nódulos pulmonares foi de 73,5 no grupo Híbrido+*P. acnes* e de 66,2 no grupo Híbrido, enquanto nos grupos PBS e *P. acnes* os pulmões estavam altamente colonizados (500 nódulos) (Figura 13A). Entretanto, 20 dias após o desafio, somente o grupo Híbrido+*P. acnes* apresentou redução do número de nódulos pulmonares (média = 91,4 nódulos) em relação aos grupos Híbrido (média = 346,8 nódulos), PBS (500 nódulos) e *P. acnes* (500 nódulos) (Figura 13B). Foi possível verificar que 20 dias após o desafio, o grupo Híbrido+*P. acnes* manteve o número de nódulos pulmonares similar ao observado 14 dias após o desafio (Figura 13A e 13B). Por outro lado, o grupo Híbrido progrediu de 66,2 nódulos, em média, para 346,8 nódulos e, como esperado, os grupos PBS e *P. acnes* continuaram apresentando intensa colonização pulmonar. Ou seja, o grupo Híbrido+*P. acnes* foi o único capaz de impedir a progressão tardia do tumor.

As imagens dos pulmões demonstram claramente as diferenças na colonização tardia do tumor entre esses grupos, uma vez que somente no grupo Híbrido+*P. acnes* quase não havia nódulos tumorais no pulmão dos camundongos e os existentes eram muito menores do que os nódulos observados nos outros três grupos (Figura 14).

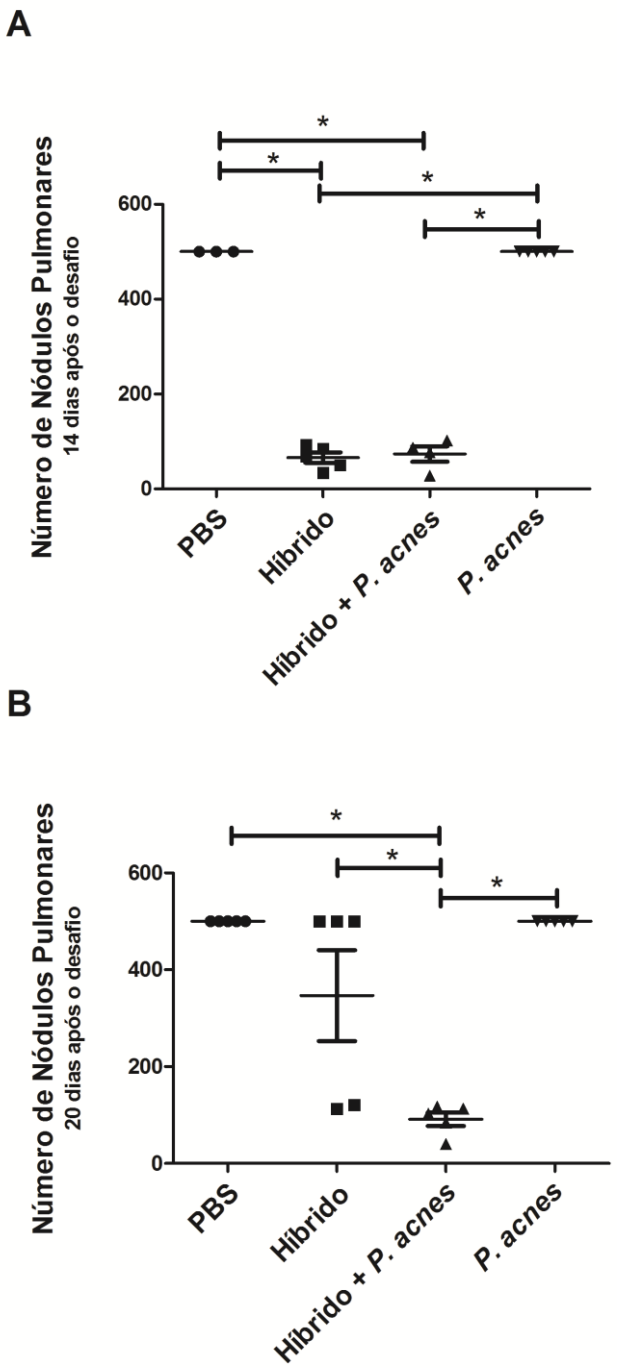

Figura 13. Associação da *P. acnes* à vacina de híbridos controla a progressão tardia do tumor. Os camundongos receberam as duas doses da vacina de híbridos associada ou não a *P. acnes*. Os animais dos grupos controle foram tratados somente com PBS ou *P. acnes*. Sete dias após a segunda dose, os animais foram desafiados com $3x10^5$ células B16F10, por via endovenosa. O número de nódulos pulmonares foi avaliado 14 (A) ou 20 (B) dias após o desafio. * $p < 0,05$

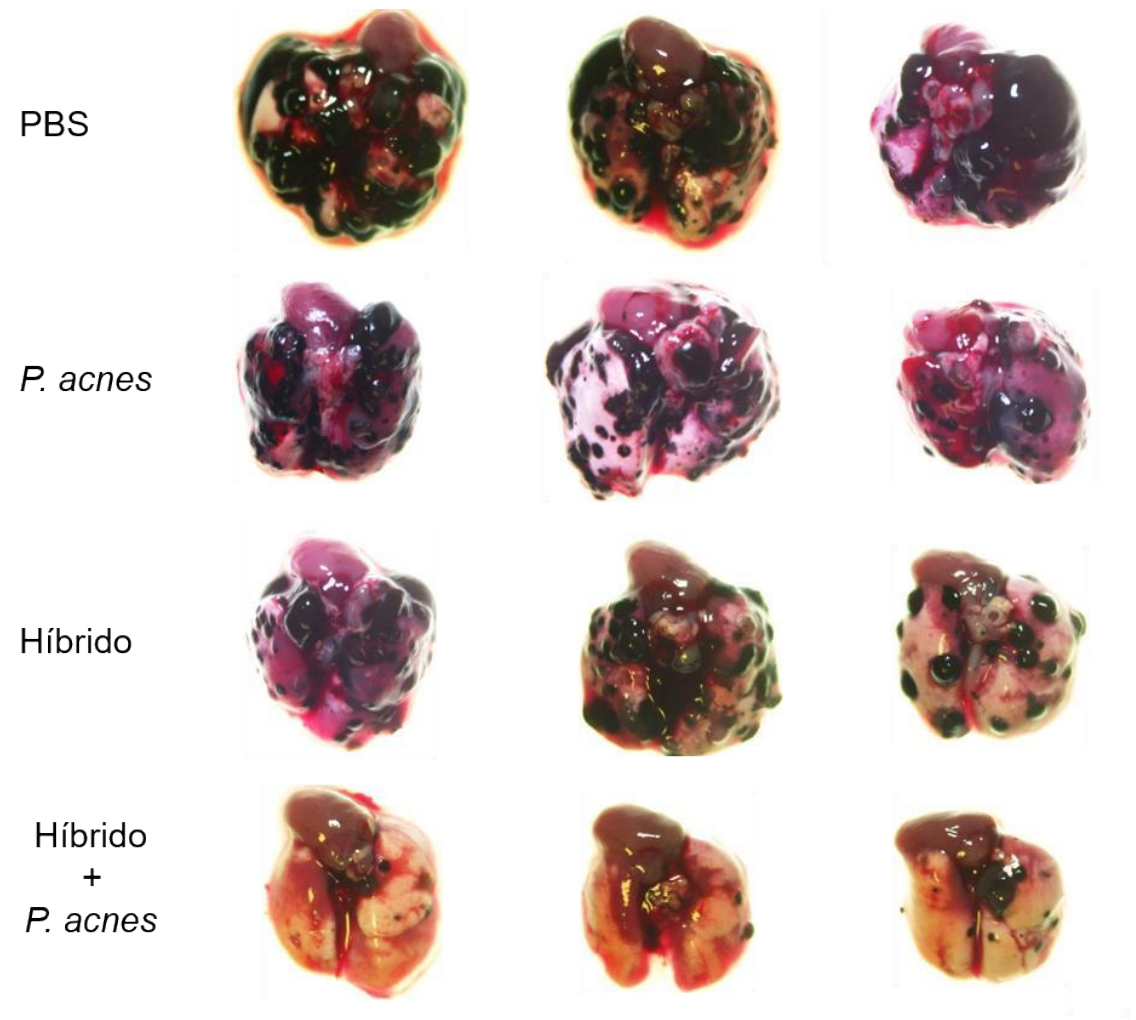

Figura 14. Redução da progressão do tumor e do tamanho dos nódulos pulmonares nos animais que receberam a vacina de híbridos com *P. acnes*. Os camundongos receberam duas doses da vacina de híbridos associados ou não a *P. acnes.* Os animais dos grupos controle receberam apenas PBS ou *P. acnes*. Sete dias após a última dose, foi realizado o desafio com $3x10^5$ células B16F10, por via endovenosa. Vinte dias após o desafio os animais foram eutanaziados, o pulmão foi retirado e a imagem desse órgão foi adquirida em um microscópio com câmera fotográfica acoplada (Nikon).

4.7 Longevidade da resposta imune específica induzida pela vacina de híbridos associados ou não à *P. acnes*

Para avaliar a longevidade da resposta imunológica induzida pelos híbridos, os camundongos receberam 2 doses da vacina de híbridos associados ou não a *P. acnes* e, trinta e seis dias após a última dose, os camundongos foram desafiados com B16F10, por via endovenosa. Após 14 dias, os animais foram eutanaziados e foi realizada a contagem dos nódulos pulmonares.

Foi observado que a vacina de híbridos associada ou não ao adjuvante induziu igualmente proteção contra a colonização pulmonar ($p < 0,05$), em relação ao grupo controle (PBS) (Figura 15). Conforme esperado, nos animais que receberam somente o adjuvante, não foi observada proteção contra o crescimento do tumor (Figura 15).

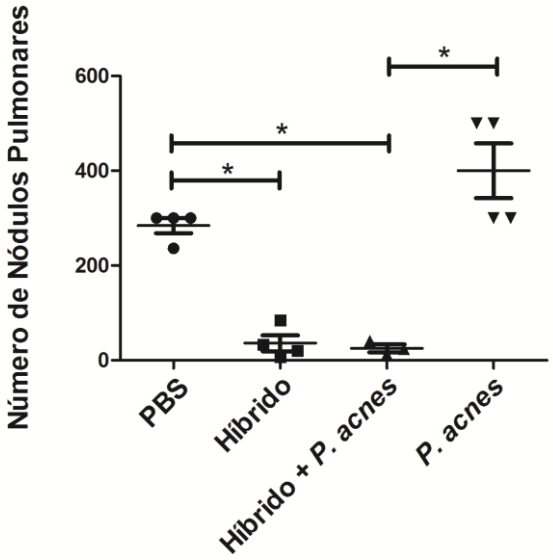

Figura 15. Indução de resposta imune longeva, específica aos antígenos tumorais, pela vacina de híbridos associada ou não à *P. acnes*. Foram administradas 2 doses da vacina, por via subcutânea, com intervalo de 14 dias entre elas. Cada dose continha $5x10^5$ híbridos viáveis associados ou não a *P. acnes.* Trinta e seis dias após a última dose, os camundongos foram desafiados com $3x10^5$ B16F10, por via endovenosa. Após 14 dias, os animais foram eutanaziados e foi realizada a contagem dos nódulos pulmonares. * $p < 0,05$

5 DISCUSSÃO

A *P. acnes* é um adjuvante biológico, já utilizado em seres humanos, capaz de modular tanto a imunidade inata como a adaptativa. Os efeitos antitumorais dessa suspensão bacteriana já foram demonstrados em diversos trabalhos clínicos e experimentais, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Halpern *et al*., 1966; Woodruff *et al*., 1974; Ghaffar *et al*., 1975; Lipton *et al*., 1991; Kennedy *et al*., 1989; Fisher *et al*., 1990; Keller *et al*., 1991; Ananias *et al*., 2007). Assim, tivemos por objetivo no presente estudo associar esse adjuvante à vacina de híbridos de células dendríticas com células B16F10 e investigar se a *P. acnes* modularia a resposta imune específica aos antígenos tumorais elicitada por essa vacina, cuja imunogenicidade em geral é baixa e precisa ser melhorada.

Inicialmente, padronizamos a produção da vacina de híbridos fusionando células dendríticas (DC), diferenciadas a partir de progenitores da medula óssea, com células B16F10 utilizando PEG. Na proporção de 1 DC:5 B16F10, a eficácia de fusão foi baixa (13,3%) e a porcentagem de células tumorais não fusionadas com células dendríticas estava alta (57,7%). Assim, a proporção de B16F10 para cada célula dendrítica foi reduzida para 1:1, o que possibilitou aumentar a eficácia de fusão para 22,2% e reduzir a porcentagem de células tumorais não fusionadas para 16% (Figura 6). Como o total de células após a fusão é utilizado no preparo da vacina, mesmo as células dendríticas não fusionadas contidas na suspensão (37,4%) também eram inoculadas pois podem exercer um papel importante ao iniciar a resposta imune específica, após fagocitar as células tumorais e apresentar os antígenos no contexto da molécula de MHC, na presença de moléculas coestimuladoras.

Wang *et al.* (1998) demonstraram que a eficácia de fusão utilizando PEG ficou entre 15 – 25% ao usar a proporção de três células dendríticas para cada célula de melanoma murino e cultivá-las por 24h após a fusão. Assim, o protocolo para obtenção de híbridos, descrito no presente trabalho, foi capaz de induzir uma porcentagem de híbridos similar ao descrito por Wang e colaboradores sem a necessidade de manter as células em cultura por um dia.

Em outro trabalho, células de carcinoma de mama isoladas dos pacientes foram fusionadas com células dendríticas autólogas, diferenciadas a

partir de células mononucleares de sangue periférico, na proporção de 1: 10, respectivamente. Nesse estudo, após a fusão com PEG as células foram cultivadas por 7 dias, em meio R10 suplementado com GM-CSF, e considerando as amostras de 6 pacientes, obteve-se entre 30-50% de híbridos (Gong *et al*., 2000). Avigan *et al.* (2004) realizaram a fusão de células dendríticas com células de carcinoma de mama, na proporção de 1:3 até 1:10, de acordo com a disponibilidade de célula de cada paciente. Após a fusão, as células foram mantidas por 3 dias em cultura, na presença de GM-CSF, e a porcentagem de híbridos formados variou entre 18-71%, apresentando uma média de 45% de híbridos. Desse modo, na literatura são encontrados diferentes protocolos de fusão ao se comparar a proporção de células dendríticas e tumorais utilizadas, bem como o tempo em que essas células são mantidas em cultura após a fusão. No entanto, os diferentes protocolos foram capazes de estimular a resposta imune específica aos antígenos tumorais e se mostraram seguros devido à baixa toxicidade.

No presente trabalho, a vacina de híbridos foi capaz de induzir resposta de anticorpo específica para os antígenos da B16F10. No entanto, a associação da *P. acnes* à vacina aumentou o título de IgG total, bem como dos isotipos IgG1 e IgG2c (Figura 7). Além de aumentar os títulos dessas subclasses de IgG, a *P. acnes* reduziu a razão IgG1/IgG2c, polarizando a resposta imune para o perfil Th1 (Tabela 1). Já foi demonstrado que a administração de *P. acnes* por via intraperitoneal é capaz de aumentar a magnitude da resposta de anticorpo específica para *Streptococcus pneumoniae* e para o toxóide tetânico (Hebert *et al*., 1985). O efeito da *P. acnes* na resposta de anticorpo induzida por uma vacina DNA, contendo o gene que codifica a proteína trans-sialidase expressa pelo *Trypanosoma cruzi,* também foi avaliado em nosso laboratório. Foi verificado que a administração prévia de *P. acnes*, por via subcutânea, seguida de três imunizações intramusculares com a vacina DNA, concomitantemente à administração de *P. acnes* por via subcutânea, aumentou o título de IgG2a específico para trans-sialidase e polarizou a resposta imune para o perfil Th1 em camundongos BALB/c (Mussalem *et al*., 2006).

Não investigamos a participação desses anticorpos induzidos pela vacina de híbridos na resposta antitumoral, no entanto essas moléculas podem

participar de mecanismos efetores importantes no combate às células tumorais, como citotoxicidade dependente de complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (Scott *et al*., 2012; Pio *et al*., 2014).

Em seres humanos, a presença de células B infiltrantes do tumor e anticorpos reativos ao tumor foram correlacionados com o aumento da sobrevida dos pacientes, em diferentes tipos de câncer. Análises por imunohistoquímica correlacionaram a densidade de células B no tumor e/ou em linfonodos metastáticos com um melhor prognóstico dos pacientes com melanoma, câncer de cabeça e pescoço e câncer de ovário. A presença de anticorpos específicos para o tumor tem sido reportada em pacientes com câncer. No entanto, poucos estudos tem procurado correlacionar essas respostas de anticorpo espontâneas, específicas para os antígenos tumorais, com a sobrevida dos pacientes. Em um estudo com pacientes com câncer pancreático, o aumento do título sérico de anticorpos específicos para MUC1, glicoproteína associada à membrana celular cuja glicosilação frequentemente está alterada em células tumorais, foi associado ao aumento da sobrevida do paciente (Guy *et al*., 2016).

No melanoma, com relação ao prognóstico, não foi observada diferença estatística entre os pacientes que produziram anticorpos, contra algum dos 29 antígenos associados ao tumor avaliados, e aqueles que não produziram anticorpos. No entanto, a presença de anticorpos séricos contra alguns antígenos associados ao tumor foram associados com pior prognóstico clínico (Zornig *et al*., 2015). Zornig e colaboradores não avaliaram a influência do isotipo dos anticorpos encontrados no soro dos pacientes com melanoma, o que deve ser considerado uma vez que porções Fc diferentes exercem funções efetoras distintas. Em um modelo animal, a administração terapêutica de TA99, um anticorpo monoclonal de isotipo IgG2a específico para um antígeno do melanoma (gp75), apresentou efeitos positivos contra tumor subcutâneo e metastático da B16F10 em camundongos. Um estudo subsequente comparando o efeito de anticorpos de mesma especificidade, mas de diferentes isotipos, verificou que IgG2a e, em menor grau, IgG2b protegeram os camundongos da colonização pulmonar após inoculação do tumor por via endovenosa, efeito que não foi verificado com os isotipos IgG1 e IgG3 (Guy *et al*., 2016). Dessa forma, a polarização da resposta imune para o perfil Th1 e o

aumento do título de IgG2c (alelo expresso em C57Bl/6 equivalente ao IgG2a) verificados no grupo Híbrido+*P. acnes* reforçam a importância da associação desse adjuvante à vacina de híbridos, uma vez que essa modulação da resposta imune pode conferir maior proteção contra a B16F10.

A polarização da resposta imune para o padrão Th1 foi confirmada pelo perfil de citocinas no sobrenadante de cultura de células TCD4 e TCD8, purificadas dos esplenócitos totais dos animais imunizados, após estímulo com antígenos tumorais *in vitro*. Verificamos que a vacina de híbridos aumentou a secreção de IL-4 e IL-17, mas não modificou a síntese de IFN-γ pelas células TCD4 estimuladas com os antígenos da B16F10. A associação da *P. acnes* a essa vacina, além de induzir a secreção de IFN-γ em altos níveis pelas células TCD4, levou a uma pequena redução da síntese de IL-4 e IL-17 em relação ao grupo Híbrido. Ao avaliar o sobrenadante de cultura dos linfócitos TCD8, foi observado que somente no grupo Híbrido+*P. acnes* foi detectado aumento da síntese de IFN-γ e IL-17 (Figura 8).

A *P. acnes* promove a síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF-α, mas principalmente IL-12 e IL-18, que induzem a produção de IFN-γ, citocina característica da resposta imune Th1 (Green *et al*., 1977; Smith *et al*.,1993; Matsui *et al*., 1997; Tsuji *et al*., 1999). Já foi demonstrado que a suspensão de *P. acnes* morta pelo calor aumenta a resposta imune celular murina do tipo Th1, após imunização com vacina DNA para *Trypanosoma cruzi*, uma vez que as células dos animais imunizados na presença do adjuvante apresentaram maior síntese de IFN-γ frente ao antígeno de *T. cruzi* (proteína trans-sialidase), em relação às células do grupo imunizado na ausência do adjuvante (Mussalem *et al*., 2006).

Nosso grupo também já demonstrou que a suspensão bacteriana é capaz de mudar o perfil Th2 em resposta a ovoalbumina para Th1, quando camundongos são tratados com *P. acnes* 7 dias antes da sensibilização com o antígeno. Por outro lado, os mesmos componentes são capazes de exacerbar a resposta Th2 quando injetados simultaneamente à ovoalbumina, elevando a síntese de IgE específica e de IL-4 e o infiltrado eosinofílico nas patas dos animais, 24 horas após o desafio (Braga *et al*., 2003 e Squaiella *et al*., 2008). Esse modelo permitiu concluir que a modulação da resposta imune celular,

provavelmente, ocorre por ação direta da *P. acnes* sobre as células apresentadoras de antígenos que são responsáveis por direcionar o padrão da resposta imune. A *P. acnes* não somente induz ativação das células da imunidade inata por meio da sinalização via TLR2 e TLR9 (Kim *et al*., 2002; Kalis *et al*., 2005), mas também modifica a expressão de TLR, bem como de moléculas coestimuladoras, na superfície de células do sistema imune (Squaiella *et al*., 2006; Squaiella-Baptistão *et al*., 2015; Mussalem *et al*., 2012; Gambero *et al*., 2016) modulando a função dessas células e o direcionamento da resposta imune.

O balaço Th1/Th2 tem um importante papel na regulação da resposta imune e os dados da literatura evidenciam que a resposta Th1 é superior à resposta Th2 na indução da imunidade antitumoral (Nishimura *et al*., 2000; Marchi *et al*., 2011). No entanto, alguns trabalhos tem demonstrado que as células Th2 também podem exercer atividade antitumoral. Shen *et al*. (1996) observaram que um clone de células TCD4, produtor de IL-4, IL-5 e IL-6, mas não de IFN-γ e TNF-α, específico para sarcoma induzido por metilcolantreno, foi capaz de induzir regressão do tumor após ser transferido adotivamente para camundongos com o tumor já estabelecido. Tal efeito foi dependente da presença de células TCD8 nos camundongos receptores, sugerindo que as células Th2 específicas para o tumor estão envolvidas na regressão do tumor pela ativação de linfócitos TCD8 citotóxicos (Shen *et al*., 1996). Em outro trabalho, foi demonstrado que a terapia celular adotiva com células Th2 idiotipo específicas erradicou o mieloma subcutâneo, negativo para a expressão de MHCII, de forma independente de células B, NKT, TCD8 ou IFN-γ. Após a transferência celular adotiva, as células Th2 induziram inflamação no sítio tumoral com infiltração massiva de macrófagos do tipo M2. Também foi evidenciado que a eliminação do mieloma foi dependente da arginase produzida pelos macrófagos M2 infiltrantes do tumor recrutados pelas células Th2 idiotipo específicas (Lorvik *et al*., 2016).

O aumento da produção de IFN-γ pelas células TCD4 e TCD8 do grupo Híbrido+*P. acnes* pode melhorar a imunidade antitumoral por diferentes mecanismos. O IFN-γ aumenta a quantidade e variedade de determinantes antigênicos apresentados aumentando a expressão de genes envolvidos na

apresentação de antígenos, como os genes que codificam as moléculas de MHC; e a degradação das partículas endocitadas por células fagocíticas. Essa citocina é capaz de ativar macrófagos, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico; e de potencializar as funções efetoras das células NK. Além disso, já foi descrito que o IFN-γ tem papel antiproliferativo em diversos tipos de tumor, como câncer colorretal, câncer ovariano, câncer hepatocelular e melanoma (Kursunel *et al*., 2016). Essa citocina também aumenta a suscetibilidade das células tumorais à apoptose regulando a expressão de Fas-FasL (Kursunel *et al*., 2016).

A IL-17 é outra citocina cuja síntese estava aumentada pelas células TCD4, tanto do grupo Híbrido quanto do Híbrido+*P. acnes.* Kryczek *et al*. (2007) descreveram a presença de células Th17 no microambiente tumoral, tanto em camundongos quanto em seres humanos. O papel dessas células na imunidade antitumoral ainda é controverso. Algumas citocinas pró-inflamatórias sintetizadas pelas células Th17, como IL-17A, IL-6 e IL-23, tem sido associadas à redução da infiltração das células TCD8 no sítio tumoral, além de promover a neovascularização de tumores (Yu *et al*., 2007; Langowski *et al*., 2006). No entanto, foi demonstrado em um modelo murino de melanoma que a terapia celular adotiva com células polarizadas para o perfil Th17 específicas para TRP-1, antígeno expresso por melanócitos normais e pelo melanoma, foi capaz de induzir rejeição do tumor, sendo o efeito terapêutico dependente da produção de IFN-γ (Muranski *et al*., 2008). Também foi verificado aumento da população de células Th17, bem como de células Th1, em pacientes com melanoma que apresentaram resposta imunológica após imunização com vacina de células dendríticas pulsadas com lisado de células de melanoma. Essas populações celulares foram associadas ao aumento da sobrevida dos pacientes (Durán-Aniotz *et al*., 2013).

Assim, mais estudos são necessários para esclarecer o papel dessas subpopulações de células T auxiliares, no entanto, na resposta imune contra o melanoma parece haver uma cooperação entre as células Th1 e Th17 no combate às células tumorais.

Em nosso trabalho, além de ter sido detectado aumento da síntese de IFN-γ pelas células TCD8 do grupo Híbrido+*P. acnes*, também foi observado

maior produção de IL-17 por essas células. As células TCD8 produtoras de IL-17 (Tc17) foram identificadas em camundongos e humanos e podem ser geradas *in vitro* na presença de TGF-β e IL-6 (Liu *et al*., 2007). Essas células apresentam expressão reduzida de *Eomes*, regulador mestre da transcrição que confere diferenciação citolítica às células NK e TCD8, o que condiz com a ausência da expressão de granzima B e perforina pelas células Tc17 (Hinrichs *et al*., 2009; Garcia-Hernandez *et al*., 2010). No entanto, após transferência celular adotiva para camundongos com melanoma estabelecido, as células TCD8 secretoras de IL-17 foram capazes de se converter em células efetoras produtoras de IFN-γ e mediaram a regressão do tumor. Além disso, essas células apresentaram aumento da expressão de IL-7Rα e da persistência das células transferidas (Hinrichs *et al*., 2009).

Agak *et al*. (2014) demonstraram que o estímulo, *in vitro,* com *P. acnes* induz as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis a produzirem IL-17 e IFN-γ, mas não IL-4. Eles verificaram a presença de células TCD4 e TCD8 produtoras de IFN-γ após o estímulo com *P. acnes*, no entanto somente células TCD4 produtoras de IL-17 foram observadas nessas culturas. Além disso, células T *naïve* ativadas com anti-CD3 e anti-CD28, na presença do sobrenadante das culturas de PBMC estimuladas com *P. acnes,* se diferenciaram em células produtoras de IFN-γ e IL-17. Dessa forma, a ativação das células mononucleares de sangue periférico com *P. acnes* induz a secreção de citocinas que promovem a diferenciação das células T *naïve* em células Th1 e Th17 (Agak *et al*., 2014).

No presente trabalho, não foi observado aumento da síntese de IFN-γ e IL-17 pelas células TCD4 e TCD8 do grupo *P. acnes* em relação ao grupo PBS, porém essas células foram estimuladas *in vitro* com antígenos tumorais e não com a própria bactéria. Dessa forma, no grupo imunizado com os híbridos associados à *P. acnes,* a resposta imunológica contra a *P. acnes* polarizada para Th1 e para Th17, *in vivo*, pode criar um ambiente de citocinas que favoreça a diferenciação das células T específicas para o melanoma para esses dois perfis de resposta, os quais são os mais protetores nesse modelo experimental.

Ao avaliar a capacidade citotóxica dos esplenócitos dos camundongos imunizados com os híbridos de células dendríticas com células B16F10 foi observado que somente a associação da *P. acnes* à vacina de híbridos aumentou a lise da B16F10 (Figura 9). Nesse experimento, a citotoxicidade contra as células-alvo pode ter sido mediada tanto pelas células da imunidade inata, quanto pelas células da imunidade adquirida, uma vez que foram utilizados esplenócitos totais e que a resposta imune inata e adquirida estão interligadas. O perfil de citocinas no sobrenadante de cultura das células TCD4 e TCD8 polarizado para o padrão Th1, no grupo Híbrido+*P. acnes,* já era um indício de que essas células apresentariam maior capacidade citotóxica frente à B16F10. Conforme já demonstrado na literatura, este perfil é mais protetor contra o tumor do que o Th2 (Nishimura *et al*., 2000; Marchi *et al*., 2011). Os esplenócitos dos animais vacinados com os híbridos associados à *P. acnes*, provavelmente, estão mais ativados e a alta secreção de IFN-γ induzida por esse adjuvante pelas células da imunidade inata, conforme demonstrado na literatura (Smith *et al*., 1993; Matsui *et al*., 1997; Tsuji *et al*., 1999), bem como pelos linfócitos TCD4 e TCD8, como observado no ensaio de apresentação de antígenos tumorais, pode aumentar a exposição da célula tumoral ao sistema imune e potencializar a ação citotóxica desses esplenócitos contra a B16F10 *in vitro*.

Sabe-se que a *P. acnes* é capaz de aumentar a atividade fagocítica de macrófagos (Woodruff *et al*., 1974; Braga, 1998), bem como a atividade tumoricida dessas células (Ghaffar *et al*., 1975; Keller *et al*., 1991). Em nosso laboratório foi demonstrado que o tratamento intraperitoneal com 3 doses, em dias alternados, da suspensão de *P. acnes* morta pelo calor (420 µg de proteína), aumenta a citotoxicidade das células do exsudato peritoneal contra as células B16F10. Essa atividade citotóxica foi mediada, principalmente, por células NKT e por macrófagos, de modo dependente de óxido nítrico (Ananias *et al*., 2007). A produção de óxido nítrico pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) é regulada transcricionalmente, sendo o principal indutor o IFN-γ (Vila-del Sol *et al*., 2007).

As células TCD4 do tipo Th1, secretoras de IFN-γ, são cruciais para indução e manutenção dos CTL (Tatsumi *et al*., 2002), os quais também

produzem IFN-γ que pode ativar macrófagos, células NK e NKT. Ou seja, forma-se uma alça de retroalimentação positiva importante para combater o tumor.

O aumento da atividade citotóxica dos esplenócitos do grupo Híbrido+*P. acnes* também pode estar associado ao maior número de células TCD4 e TCD8 de memória central e de memória efetora, bem como ao maior número de linfócitos T ativados nesse grupo (Figuras 11 e 12). Os linfócitos T de memória central são menos diferenciados e apresentam capacidade limitada de desempenhar funções efetoras, mas após o encontro com o antígeno proliferam rapidamente, dando origem as células T efetoras. Já os linfócitos T de memória efetora, após estímulo antigênico, não proliferam muito, mas rapidamente se diferenciam em células efetoras produtoras de citocinas. No caso dos linfócitos TCD8, as células efetoras secretam quantidades elevadas de IFN-γ e são altamente citotóxicas (Reiser & Banerjee, 2016). Assim, o aumento da proporção de células de memória no grupo Híbrido+*P. acnes*, pode ter favorecido o aumento da lise da B16F10 induzida pelos esplenócitos desse grupo, uma vez que as células de memória respondem mais rapidamente após o encontro com seu antígeno específico podendo se expandir e diferenciar em células efetoras. Estas podem agir diretamente sobre a célula-alvo ou indiretamente, por meio da produção de citocinas que ativarão outras células do sistema imune, as quais também irão combater as células tumorais.

O aumento do número de células de memória no grupo Híbrido+*P. acnes* pode ser correlacionado com o aumento do número de células expressando CD69. Essa molécula é uma glicoproteína cuja expressão é rapidamente induzida na superfície celular após a ativação dos linfócitos T. Nessas células, o sinal via CD69 induz expressão da subunidade α do receptor de IL-2 (CD25), a síntese de diferentes citocinas, como IL-2, TNF-α e IFN-γ, bem como proliferação celular (Lopez-Cabrera *et al*., 1993). O CD69 se liga ao receptor 1 de esfingosina 1-fosfato ($S1P_1$), reduzindo a expressão e função desse receptor, que medeia a saída das células T dos órgãos linfoides (Shiow *et al*., 2006). Isso faz com que as células T ativadas fiquem retidas nos órgãos linfoides tempo suficiente para receber os sinais que iniciam sua proliferação e diferenciação em células efetoras e de memória (Abbas *et al*., 2012).

Ao avaliar a capacidade de impedir a progressão tardia do tumor encontramos diferenças relevantes entre essas vacinas. Verificamos que, até 14 dias após o desafio, a vacina de híbridos foi capaz de inibir a colonização pulmonar pela B16F10 tanto quanto a vacina associada à *P. acnes*. No entanto, somente o grupo Híbrido+*P. acnes* foi capaz de inibir o crescimento tardio do tumor, 20 dias depois do desafio quando a última avaliação do crescimento do tumor foi realizada *in vivo* (Figuras 13 e 14).

De acordo com o resultado que avalia a perfil de citocinas no sobrenadante de cultura das células TCD4, foi observado que a vacina de híbridos, provavelmente, induziu polarização dessas células para o perfil Th17, o qual tem sido associado a um efeito protetor contra o melanoma de acordo com dados da literatura (Muranski *et al*., 2008; Durán-Aniotz *et al*., 2013). Já no sobrenadante de cultura do grupo Híbrido+*P. acnes* foram observadas altas concentrações de IL-17 e, principalmente, IFN-γ, sugerindo a presença de células Th17 e Th1. Talvez a presença de células T auxiliares de ambos os subtipos nesse grupo, com predomínio das células Th1, tenha gerado uma resposta mais duradoura e eficiente no combate à progressão tardia do tumor.

O efeito protetor da vacina de híbridos já foi descrito na literatura (Gong *et al*., 1997; Lespagnard *et al*., 1998), porém no presente trabalho nós demonstramos um importante efeito adjuvante da associação da *P. acnes* à vacina de híbridos. A presença desse adjuvante na vacina foi capaz de inibir a progressão tardia do tumor o que, provavelmente, resulta da indução das células T de memória e do direcionamento da resposta imune para o perfil Th1, que aumentou a capacidade de combater às células tumorais.

Uma vez que foi observada a presença de células de memória já em 24 horas após a segunda dose da vacina de híbridos, fomos investigar a longevidade da resposta imune desencadeada por essa imunização. Verificamos que as vacinas conferiram proteção contra a colonização pulmonar mesmo realizando o desafio 36 dias após a segunda imunização. Ao avaliar a quantidade de nódulos da B16F10 no pulmão dos camundongos, foi observado que, 14 dias após o desafio, a vacina de híbridos associada ou não a *P. acnes* protegeu igualmente contra a colonização pulmonar pelas células tumorais (Figura 15). Conforme demonstrado anteriormente, as células T de memória também foram encontradas no grupo Híbrido, apesar de estar em menor

número absoluto quando comparado ao grupo Híbrido+*P. acnes,* o que justifica a longevidade da resposta protetora desencadeada por ambas as vacinas.

Nossos resultados demonstram que a *P. acnes* aumenta a imunogenicidade da vacina de híbridos melhorando a resposta imune específica elicitada por essa vacina e prolongando a capacidade de controlar o crescimento do tumor. Além disso, essa é uma abordagem interessante que merece ser mais estudada para potencial aplicação clínica.

6 CONCLUSÕES

- A eficácia de fusão das células dendríticas com as células B16F10 foi maior na proporção 1:1.
- A vacina de híbridos induziu proteção contra colonização pulmonar pelas células B16F10, gerando uma resposta duradoura.
- A associação da *P. acnes* à vacina induziu:
    - Aumento dos títulos de IgG_{total}, IgG1 e IgG2c específicos para os antígenos da B16F10;
    - Polarização da resposta humoral para um perfil Th1;
    - Aumento do número absoluto de células TCD4 e TCD8 de memória central e de memória efetora, bem como de células TCD4 e TCD8 ativadas;
    - Aumento da síntese de IFN-γ e redução da síntese de IL-4 pelas células TCD4 estimuladas com antígenos da B16F10;
    - Aumento da síntese de IL-17 e IFN-γ pelas células TCD8 estimuladas com antígenos da B16F10;
    - Aumento da atividade citotóxica dos esplenócitos frente à B16F10, *in vitro*;
    - Inibição da progressão tardia do tumor no modelo de colonização pulmonar.

7 REFERÊNCIAS

Abath FG, Coutinho EM, Montenegro SM, Gomes YM, Carvalho AB. The use of non-specific immunopotentiators in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988; 82(1):73-6.

Abbas AK, Lichtman AH and Pillai S. Imunologia Celular e Molecular, 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

Agak GW, Qin M, Nobe J, Kim MH, Krutzik SR, Tristan GR, Elashoff D, Garbán HJ, Kim J. *Propionibacterium acnes* Induces an IL-17 Response in Acne Vulgaris that Is Regulated by Vitamin A and Vitamin D. *J Invest Dermatol*. 2014; 134(2):366-73.

Altman JB, Benavides AD, Das R, Bassiri H. Antitumor Responses of Invariant Natural Killer T Cells. *J Immunol Res*. 2015; 2015:652875.

Ananias RZ, Rodrigues EG, Braga EG, Squaiella CC, Mussalem JS, Longhini ALF, *et al.* Modulatory effect of killed-*Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on peritonial exudate cells from C57Bl/6 mice: major NKT cell recruitment and increased cytotoxicity. *Scand J Immunol*. 2007; *65:538.*

Avigan D, Rosenblatt J, Kufe D. Dendritic/tumor fusion cells as cancer vaccines. *Semin Oncol*. 2012; 39(3):287-95.

Avigan D, Vasir B, Gong J, Borges V, Wu Z, Uhl L, Atkins M, Mier J, McDermott D, Smith T, Giallambardo N, Stone C, Schadt K, Dolgoff J, Tetreault JD, Villarroel M, and Kufe D. Fusion Cell Vaccination of Patients with Metastatic Breast and Renal Cancer Induces Immunological and Clinical Responses. *Clinical Cancer Research*. 2004; *Vol. 10, 4699–4708.*

Barbuto JA, Ensina LF, Neves AR, Bergami-Santos P, Leite KR, Marques R, Costa F, Martins SC, Camara-Lopes LH, Buzaid AC. Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2004; 53(12):1111-8.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 1976; 72: 248-254.

Braga EG, Ananias RZ, Mussalem JS, Squaiella CC, Longhini ALF, Mariano M, *et al*. Treatment with *Propionibacterium acnes* modulates the late phase reaction of immediate hypersensitivity in mice. *Immunol Lett.* 2003; *88: 163*.

Braga EG. *Propionibacterium acnes*: imunogenicidade, efeitos sobre atividade fagocítica de macrófagos e resistência ao crescimento tumoral em camundongos [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 1998.

Brener Z, Cardoso JE. Nonspecific resistance against *Trypanosoma cruzi* enhanced by *Corynebacterium parvum*. *J Parasitol*. 1976; 62(4):645-6.

Browning MJ. Antigen presenting cell/ tumor cell fusion vaccines for cancer immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother*. 2013; 9(7):1545-8.

Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol*. 2013; 30(1):30-41.

Dany M, Nganga R, Chidiac A, Hanna E, Matar S, Elston D. Advances in immunotherapy for melanoma management. *Hum Vaccin Immunother*. 2016; 12(10):2501-2511.

Dasari P, Nicholson IC, Hodge G, Dandie GW, Zola H. Expression of toll-like receptors on B lymphocytes. *Cell Immunol*. 2005; 236(1-2):140-5.

Durán-Aniotz C, Segal G, Salazar L, Pereda C, Falcón C, Tempio F, Aguilera R, González R, Pérez C, Tittarelli A, Catalán D, Nervi B, Larrondo M, Salazar-Onfray F, López MN. The immunological response and post-treatment survival of DC-vaccinated melanoma patients are associated with increased Th1/Th17 and reduced Th3 cytokine responses. *Cancer Immunol Immunother*. 2013; 62(4):761-72.

Fisher B, Brown A, Wolmark N, Fisher ER, Redmond C, Wickerham DL, Margolese R, Dimitrov N, Pilch Y, Glass A, *et al*. Evaluation of the worth of *Corynebacterium parvum* in conjunction with chemotherapy as adjuvant treatment for primary breast cancer. Eight-year results from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-10. *Cancer*. 1990; 66(2):220-7.

Gambero M, Teixeira D, Butin L, Ishimura ME, Mariano M, Popi AF, Longo-Maugéri IM. *Propionibacterium acnes* induces an adjuvant effect in B-1 cells and affects their phagocyte differentiation via a TLR2-mediated mechanism. *Immunobiology*. 2016; 221(9):1001-11.

Garcia-Hernandez M de L, Hamada H, Reome JB, Misra SK, Tighe MP, Dutton RW. Adoptive Transfer of Tumor-Specific Tc17 Effector T Cells Controls the Growth of B16 Melanoma in Mice. *J Immunol*. 2010; 184(8):4215-27.

Ghaffar A, Cullen RT and Woodruff MA. Further analysis of the anti-tumour effect *in vitro* of peritonial exudate cells from mice treated with *Corynebacterium parvum*. *Br J Cancer.* 1975; *31:15*.

Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest*. 2004; 114(10):1379-88.

Gong J, Avigan D, Chen D, Wu Z, Koido S, Kashiwaba M, and Kufe D. Activation of antitumor cytotoxic T lymphocytes by fusions of human dendritic cells and breast carcinoma cells. PNAS. 2000; Vol. 97, 2715-2118.

Gong J, Chen D, Kashiwaba M and Kufe D. Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Nat Med*. 1997; 3(5):558-61.
Gong J, Koido S, Calderwood SK. Cell fusion: from hybridoma to dendritic cell-based vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 2008; 7(7):1055-68.

Gonzalvez F, Ashkenazi A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. Oncogene. 2010; 29(34):4752-65.

Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. 2007; 445(7130):851-7.

Green S, Dobrjansky MA, Chiasson MA, Carswell E, Schwartz MK, Old LJ. *Corynebcterium parvum* as the priming agent in the production of tumor necrosis factor in the mouse. *J Natl Cancer Inst.* 1977; 59: 1519-1522.

Guo Y, Wu M, Chen H, Wang X, Liu G, Li G, *et al*. Effective tumor vaccine generated by fusion of hepatoma cells with activated B cells. *Science* 1994; 263:518-20.

Guy TV, Terry AM, Bolton HA, Hancock DG, Shklovskaya E, Fazekas de St. Groth B. Pro- and anti-tumour effects of B cells and antibodies in cancer: a comparison of clinical studies and preclinical models. *Cancer Immunol Immunother*. 2016; 65(8):885-96.

Ha DKK, Lawton JWM, Gardner ID. The effect of *in vitro* modulation of macrophage activation on *Mycobacterium lepraemurinum* infection. *J Comp Pathol*, 1986; 96: 565-573.

Halpern BN, Biozzi G, Stiffel C and Mouton D. Inhibition of tumour growth by administration of killed *Corynebacterium parvum*. *Nature.* 1966; *212:853.*

Halpern BN, Prévot R, Biozzi G, Stiffel C, Mounton D, Morard JC, Bouthillier Y, Decreusefond C. Stimulation de l'activité phagocytaire du système reticuloendothélial provoquée par *Corynebacterium parvum*. J Reticuloendothel Soc, 1964; 1: 77-96.

Hebert JC, Ershle WB, Gamelli RL. Corynebacterium parvum augments antibody production in splenectomized mice and mice with sham operations. *Infect Immun*. 1985;48(3):795-8.

Hill JO. Modulation of the pattern of development of experimental disseminated leishmaniasis by *Corynebacterium parvum*. *J Leukoc Biol*. 1987; 41(2):165-9.

Hinrichs CS, Kaiser A, Paulos CM, Cassard L, Sanchez-Perez L, Heemskerk B, *et al*. Type 17 CD8 T cells display enhanced antitumor immunity. *Blood*. 2009; 114(3): 596–599.

Hu W, Li X, Zhang C, Yang Y, Jiang J, Wu C. Tumor-associated macrophages in cancers. *Clin Transl Oncol*. 2016; 18(3):251-8.

Jugeau S, Tenaud I, Knol AC, Jarrousse V, Quereux G, Khammari A, Dreno B. Induction of toll-like receptors by *Propionibacterium acnes*. *Br J Dermatol*. 2005; 153(6):1105-13.

Kalis C, Gumenscheimer M, Freudenberg N, Tchaptchet S, Fejer G, Heit A*, et al.* Requirement for TLR9 in the immunomodulatory activity of *Propionibacterium acnes. J Immunol.* 2005; 174: 4295-300.

Keller R, Keist R and van der Meide PH. Modulation of tumoricidal activity, induced in bone-marrow-derived mononuclear phagocytes by interferon gamma or *Corynebacterium parvum*, by interferon beta, tumor necrosis factor, prostaglandin E2, and transforming growth factor beta. *Int J* Cancer. 1991; *49:796*.

Kennedy JD, Sutton RC and Conley FK. Effect of intracerebrally injected *Corynebacterium parvum* on the development and growth of metastatic brain tumor in mice. *Neurosurgery*. 1989; 25:709.

Kim J, Ochoa MT, Krutzik SR, Takeuchi O, Uematsu S, Legaspi AJ, Brightbill HD, Holland D, Cunliffe WJ, Akira S, Sieling PA, Godowski PJ, Modlin RL. Activation of toll-like receptor 2 in acne triggers inflammatory cytokine responses. *J Immunol*. 2002; 169(3):1535-41.

Kligman AM, Leyden JJ, McGinley KJ. Bacteriology. *J Invest Dermatol*. 1976; 67(1):160-8.

Koido S, Homma S, Takahara A, Namiki Y, Komita H, Nagasaki E, Ito M, Nagatsuma K, Uchiyama K, Satoh K, Ohkusa T, Gong J, Tajiri H. Immunologic monitoring of cellular responses by dendritic/tumor cell fusion vaccines. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011:910836.

Koido S. Dendritic-Tumor Fusion Cell-Based Cancer Vaccines. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(6).

Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 2003; 15(4):396-401.

Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwaijri S, Szeliga W, Kolls J, Chang A, Zou W. Cutting Edge: Th17 and Regulatory T Cell Dynamics and the Regulation by IL-2 in the Tumor Microenvironment. *J Immunol*. 2007; 178(11):6730-3.

Kursunel MA and Esendagli G. The untold story of IFN-γ in cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2016; 31:73-81.

Langowski JL, Zhang X, Wu L, Mattson JD, Chen T, Smith K, Basham B, McClanahan T, Kastelein RA, Oft M. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*. 2006; 442(7101):461-5.

Lespagnard L, Mettens P, Verheyden AM, Tasiaux N, Thielemans K, van Meirvenne S, *et al*. Dendritic cells fused with mastocytoma cells elicit therapeutic antitumor immunity. *Int J Cancer.* 1998; 76(2):250-8.

Leyden JJ, McGinley KJ, Mills OH, Kligman AM. Age-related changes in the resident bacterial flora of the human face. *J Invest Dermatol*. 1975; 65(4):379-81.

Leyden JJ, McGinley KJ, Vowels B. *Propionibacterium acnes* colonization in acne and nonacne. Dermatology. 1998; 196(1):55-8.

Lipton A, Harvey HA, Balch CM, Antle CE, Heckard R, Bartolucci AA. *Corynebacterium parvum* versus bacille Calmette-Guérin adjuvant immunotherapy of stage II malignant melanoma. *J Clin Oncol*. 1991; 9(7):1151-6.

Liu SJ, Tsai JP, Shen CR, Sher YP, Hsieh CL, Yeh YC, Chou AH, Chang SR, Hsiao KN, Yu FW, Chen HW. Induction of a distinct CD8 Tnc17 subset by transforming growth factor-beta and interleukin-6. *J Leukoc Biol*. 2007; 82(2):354-60.

Longhini ALF. Glicoconjugados de *Propionibacterium acnes* com atividade imunomodulatória sobre células peritoneais de camundongos [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2002.

López-Cabrera M, Santis AG, Fernández-Ruiz E, Blacher R, Esch F, Sánchez-Mateos P, Sánchez-Madrid F. Molecular Cloning, Expression, and Chromosomal Localization of the Human Earliest Lymphocyte Activation Antigen AIM/CD69, a New Member of the C-Type Animal Lectin Superfamily of Signal-transmitting Receptors. *J Exp Med*. 1993; 178(2):537-47.

Lorvik KB, Hammarström C, Fauskanger M, Haabeth OA, Zangani M, Haraldsen G, Bogen B, Corthay A. Adoptive Transfer of Tumor-Specific Th2 Cells Eradicates Tumors by Triggering an in situ Inflamatory Immune Response. *Cancer Res*. 2016; 76 (23):6864-6876.

MacDonald AS, Straw AD, Bauman B, Pearce EJ. CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. *J Immunol*. 2001; 167(4):1982-8.

Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017. [Epub ahead of print] doi:10.1038/nrclinonc.2016.217.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004; 25(12):677-86.

Marchi LH, Paschoalin T, Travassos LR, Rodrigues EG. Gene therapy with interleukin-10 receptor and interleukin-12 induces a protective interferon-γ-

dependent response against B16F10-Nex2 melanoma. *Cancer Gene Ther*. 2011; 18(2):110-22.

Mariani SM, Krammer PH. Surface expression of TRAIL/Apo-2 ligand in activated mouse T and B cells. *Eur J Immunol*. 1998; 28(5):1492-8.

Matsui K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Hyodo Y, Hayashi N, Hiroishi K, *et al*. *Propionibacterium acnes* treatment diminishes $CD4^+$ $NK1.1^+$ T cells but induces type I T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from Kupffer cells. *J Immunol*. 1997; 159:97.

McEwen-Smith RM, Salio M, Cerundolo V. The regulatory role of invariant NKT cells in tumor immunity. *Cancer Immunol Res*. 2015; 3(5):425-35.

Miller AJ & Mihm MC. Melanoma. *N Engl J Med*. 2006; 355:51-65.

Millet A, Martin AR, Ronco C, Rocchi S, Benhida R. Metastatic Melanoma: Insights Into the Evolution of the Treatments and Future Challenges. *Med Res Rev.* 2017; 37(1):98-148.

Munhoz RR, Postow MA. Recent advances in understanding antitumor immunity. *F1000Res*. 2016; 5:2545.

Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, Paulos CM, Palmer DC, Touloukian CE, Ptak K, Gattinoni L, Wrzesinski C, Hinrichs CS, Kerstann KW, Feigenbaum L, Chan CC, Restifo NP. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*. 2008; 112(2):362-73.

Mussalem JS, Squaiella-Baptistão CC, Teixeira D, Yendo TM, Thies FG, Popi AF, *et al*. Adjuvant Effect of Killed *Propionibacterium acnes* on Mouse Peritoneal B-1 Lymphocytes and Their Early Phagocyte Differentiation. *PLoS One* 2012; 7(3): e33955.

Mussalem JS, Vasconcelos JRC, Squaiella CC, Ananias RZ, Braga EG, Rodrigues MM, Longo-Maugéri IM. Adjuvant effect of the *Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on the immunization with plasmidial DNA containing a *Trypanosoma cruzi* gene. *Microbiol Immunol*. 2006; 50: 253-63.

Nierkens S, Tel J, Janssen E, Adema GJ. Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: one general or all sergeants? *Trends Immunol*. 2013; 34(8):361-70.

Nishimura T, Nakui M, Sato M, Iwakabe K, Kitamura H, Sekimoto M, Ohta A, Koda T, Nishimura S. The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2000; 46.

Pandya PH, Murray ME, Pollok KE, Renbarger JL. The Immune System in Cancer Pathogenesis: Potential Therapeutic Approaches. *J Immunol Res*. 2016; 2016:4273943.

Pio R, Corrales L, Lambris JD. The role of complement in tumor growth. *Adv Exp Med Biol*. 2014; 772:229-62.

Reiser J, Banerjee A. Effector, Memory, and Dysfunctional CD8+ T Cell Fates in the Antitumor Immune Response. *J Immunol Res.* 2016; 2016:8941260.
Rivera Vargas T, Humblin E, Végran F, Ghiringhelli F, Apetoh L. TH9 cells in anti-tumor immunity. *Semin Immunopathol*. 2017; 39(1):39-46.

Romics L Jr, Dolganiuc A, Kodys K, Drechsler Y, Oak S, Velayudham A, Mandrekar P, Szabo G. Selective priming to Toll-like receptor 4 (TLR4), not TLR2, ligands by *P. acnes* involves up-regulation of MD-2 in mice. *Hepatology*. 2004; 40(3):555-64.

Rothschild SI, Thommen DS, Moersig W, Müller P, Zippelius A. Cancer immunology - development of novel anti-cancer therapies. *Swiss Med Wkly*. 2015; 145:w14066.

Rotte A, Bhandaru M, Zhou Y, McElwee KJ. Immunotherapy of melanoma: present options and future promises. Cancer Metastasis Rev. 2015; 34(1):115-28.

Salomaa ER, Pulkki K, Helenius H. Pleurodesis with doxycycline or *Corynebacterium parvum* in malignant pleural effusion. *Acta Oncol*. 1995; 34(1):117-21.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011; 331(6024):1565-70.
Scott AM, Wolchok JD, Old LJ. Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):278-87.

Shen Y, Fujimoto S. A tumor-specific Th2 clone initiating tumor rejection via primed CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activation in mice. *Cancer Res.* 1996; 56(21):5005-11.

Shevtsov M, Multhoff G. Immunological and Translational Aspects of NK Cell-Based Antitumor Immunotherapies. *Front Immunol*. 2016; 7:492.

Shiow LR, Rosen DB, Brdicková N, Xu Y, An J, Lanier LL, Cyster JG, Matloubian M. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature*.2006; 440(7083):540-4.

Smith SR, Calzetta A, Bankowski J, Kenworthy-Bott L and Terminelli C. Lipopolysaccharide-induced cytokine production and mortality in mice treated with *Corynebacterium parvum*. *J Leukoc Biol.* 1993; 54:23.

Squaiella CC, Ananias RZ, Mussalem JS, Braga EG, Rodrigues EG, Travassos LR, *et al*. *In vivo* and *in vitro* effect of killed *Propionibacterium acnes* and its purified soluble polysaccharide on mouse bone marrow stem cells and dendritic cell differentiation. *Immunobiology*. 2006; 211: 105-16.

Squaiella CC, Braga EG, Ananias RZ, Longhini ALF, Mussalem JS, Silva RM, Longo-Maugéri IM. Efeito do tratamento de camundongos com *Propionibacterium acnes* sobre a resposta específica e atividade de células do sistema imune na infecção por *Klebsiella pneumoniae* [resumo]. Anais do IX Congresso de Iniciação Científica – PIBIC, 2001; 1: 7. [Apresentado no IX Congresso de Iniciação Científica – PIBIC; 2001; São Paulo].

Squaiella CC, Longhini ALF, Braga EG, Mussalem JS, Ananias RZ, Yendo TM, *et al*. Modulation of the type I hypersensitivity late phase reaction to OVA by *Propionibacterium acnes*-soluble polysaccharide. *Immunol Lett*. 2008; *121:157.*

Squaiella-Baptistão CC, Teixeira D, Mussalem JS, Ishimura ME and Longo-Maugéri IM. Modulation of Th1/Th2 immune responses by killed *Propionibacterium acnes* and Its soluble polysaccharide fraction in a type I hypersensitivity murine model: induction of different activation status of antigen-presenting cells. *J Immunol Res. 2015;* 2015:132083.

Stalder T, Hahn S, Erb P. Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol*. 1994; 152(3):1127-33.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003; 21:335-76.

Takeya M, Komohara Y. Role of tumor-associated macrophages in human malignancies: friend or foe? *Pathol Int*. 2016; 66(9):491-505.

Tatsumi T, Kierstead LS, Ranieri E, Gesualdo L, Schena FP, Finke JH, Bukowski RM, Mueller-Berghaus J, Kirkwood JM, Kwok WW, Storkus WJ. Disease-associated Bias in T Helper Type 1 (Th1)/Th2 CD4 T Cell Responses Against MAGE-6 in HLA-DRB10401(+) Patients With Renal Cell Carcinoma or Melanoma. *J Exp Med.* 2002; 196(5):619-28.

[a]Thomas WD, Hersey P. CD4 T cells kill melanoma cells by mechanisms that are independent of Fas (CD95). *Int J Cancer*. 1998; 75(3):384-90.

[b]Thomas WD, Hersey P. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *J Immunol*. 1998; 161(5):2195-200.

Trefzer U, Herberth G, Wohlan K, Milling A, Thiemann M, Sherev T, et al. Vaccination with hybrids of tumor and dendritic cells induces tumor specific T-cell and clinical responses in melanoma stage III and IV patients. *Int J Cancer* 2004; 110(5):730-40.

Tsuji H, Mukaida N, Harada A, Kaneko S, Matsushita E, Nakanuma Y, *et al*. Alleviation of Lipopolysaccharide-Induced Acute Liver Injury in *Propionibacterium acnes*-Primed IFN-γ-Deficient Mice by a Concomitant Reduction of TNF- α, IL-12, and IL-18 Production. *J Immunol.* 1999; 162:1049-1055.

Vargas TR, Humblin E, Végran F, Ghiringhelli F, Apetoh L. TH9 cells in anti-tumor immunity. *Semin Immunopathol*. 2017; 39(1):39-46.

Vila-del Sol V, Díaz-Muñoz MD, Fresno M. Requirement of tumor necrosis factor alpha and nuclear factor-kappaB in the induction by IFN-gamma of inducible nitric oxide synthase in macrophages. *J Leukoc Biol.* 2007; 81(1):272-83.

Wang J, Saffold S, Cao X, Krauss J, and Chen W. Eliciting T Cell Immunity Against Poorly Immunogenic Tumors by Immunization with Dendritic Cell-Tumor Fusion Vaccines. *The Journal of Immunology.* 1998; 161: 5516–5524.

Williams NS, Engelhard VH. Identification of a population of $CD4^+$ CTL that utilizes a perforin- rather than a Fas ligand-dependent cytotoxic mechanism. *J Immunol*. 1996; 156(1):153-9.

Woodruff MF, McBride WH, Dunbar N. Tumour growth, phagocytic activity and antibody response in *Corynebacterium parvum*-treated mice. *Clin Exp Immunol.* 1974; 17(3):509-18.

Xu D, Trajkovic V, Hunter D, Leung BP, Schulz K, Gracie JA, McInnes IB, Liew FY. IL-18 induces the differentiation of Th1 or Th2 cells depending upon cytokine milieu and genetic background. *Eur J Immunol*. 2000; 30(11):3147-56.

Yoneyama H, Matsuno K, Zhang Y, Murai M, Itakura M, Ishikawa S, Hasegawa G, Naito M, Asakura H, Matsushima K. Regulation by chemokines of circulating dendritic cell precursors, and the formation of portal tract-associated lymphoid tissue, in a granulomatous liver disease. *J Exp Med*. 2001; 193(1):35-49.

Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7(1):41-51.

Zörnig I, Halama N, Lorenzo Bermejo J, Ziegelmeier C, Dickes E, Migdoll A, Kaiser I, Waterboer T, Pawlita M, Grabe N, Ugurel S, Schadendorf D, Falk C, Eichmüller SB, Jäger D. Prognostic significance of spontaneous antibody responses against tumor-associated antigens in malignant melanoma patients. *Int J Cancer*. 2015; 136(1):138-51.

8 Anexos

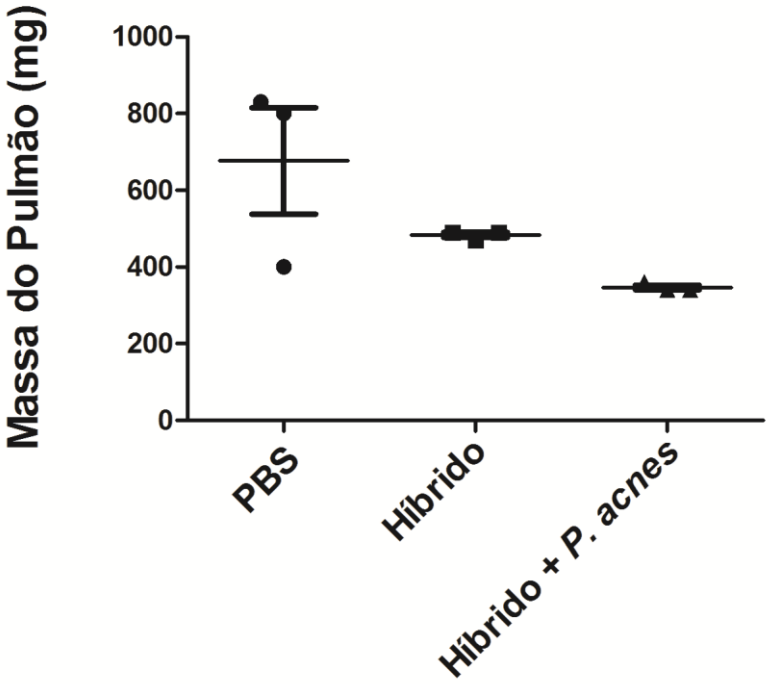

Figura 16. Massa do pulmão dos camundongos 14 dias após o desafio. Os camundongos receberam as duas doses da vacina de híbridos associada ou não a *P. acnes* com intervalo de 14 dias entre as imunizações. Os animais do grupo controle foram tratados somente com PBS. Sete dias após a segunda dose, os animais foram desafiados com $3x10^5$ células B16F10, por via endovenosa. A massa (mg) do pulmão de cada camundongo foi determinada 14 dias após o desafio. Apenas um experimento foi realizado.

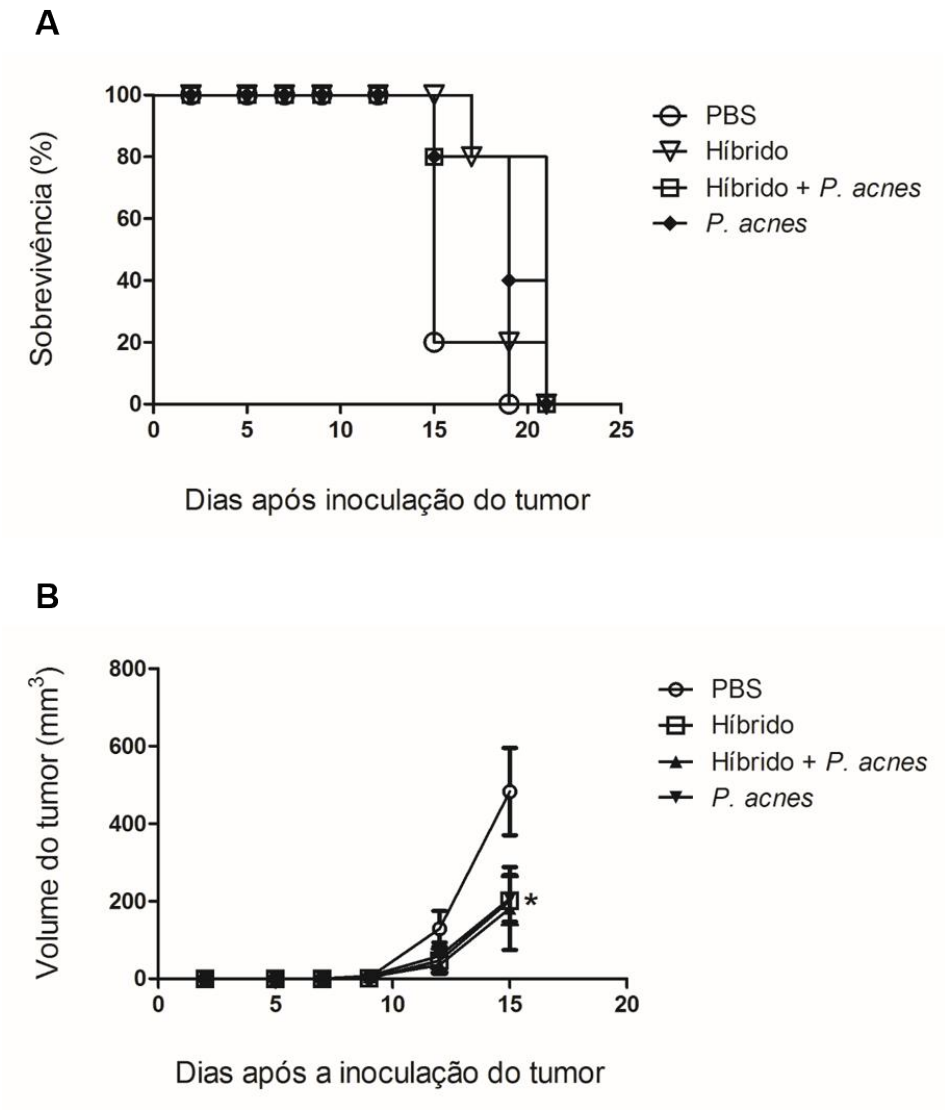

Figura 17. Avaliação do efeito terapêutico da vacina de híbridos associados ou não a *P. acnes*. As células B16F10 ($1x10^5$ células) foram inoculadas nos animais por via subcutânea. Após 24 horas, os animais receberam a primeira dose da vacina de híbridos associados ou não à *P. acnes*. Cada camundongo recebeu até três doses da vacina de híbridos ($5x10^5$ híbridos/dose) com intervalo de 7 dias entre as imunizações. Os animais dos grupos controle foram tratados somente com PBS ou *P. acnes.* O crescimento tumoral foi acompanhado a cada 2-3 dias, utilizando-se um paquímetro para medir o maior (D) e o menor (d) diâmetro do tumor. (A) Porcentagem de camundongos sobreviventes. (B) Volume do tumor calculado com a seguinte fórmula: $V=0,52 \times D \times d^2$. Apenas um experimento foi realizado. * $p < 0,05$

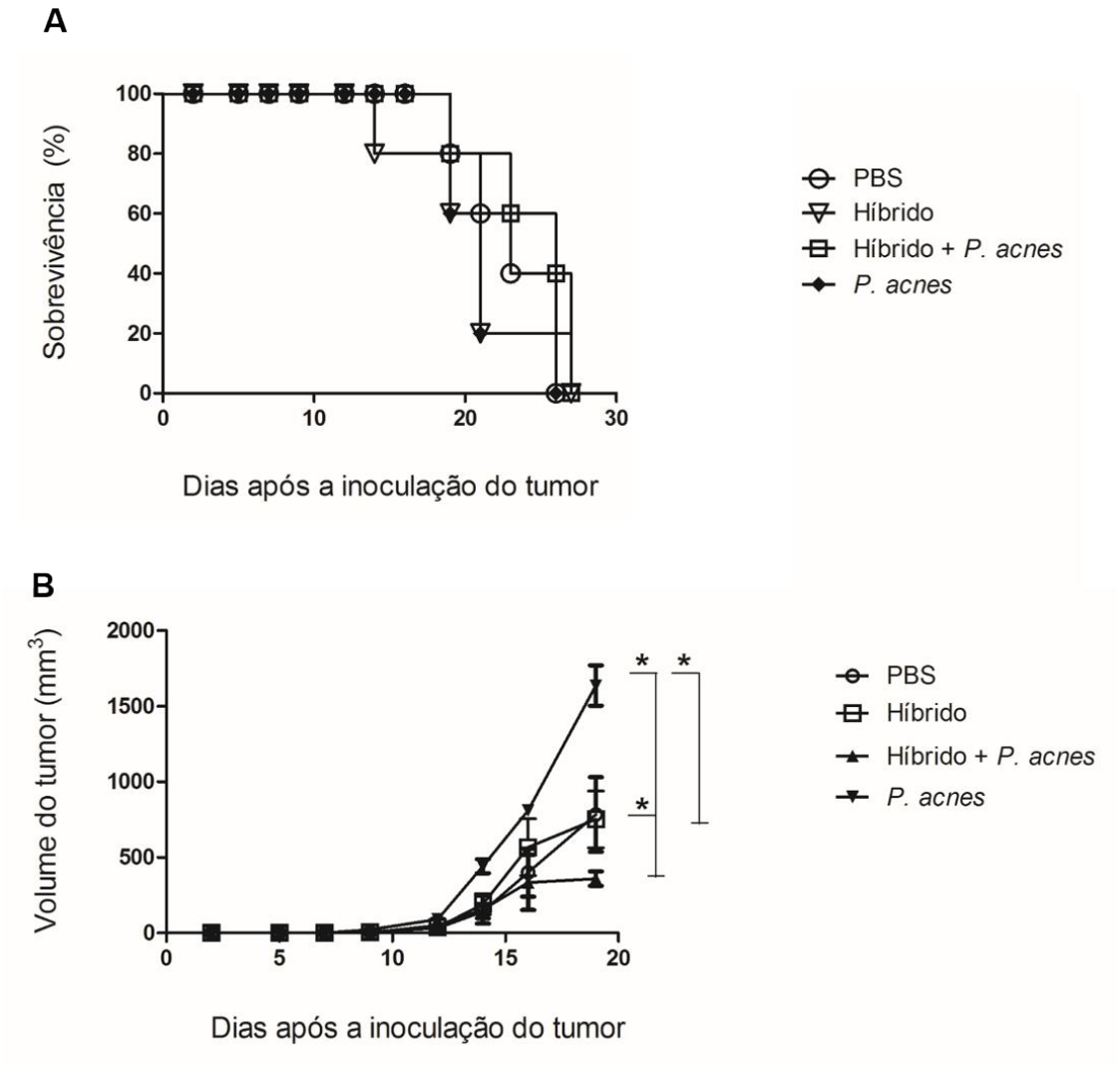

Figura 18. Terapia Celular Adotiva. Os animais doadores foram imunizados com duas doses de híbridos associados ou não a *P. acnes* com intervalo de 14 dias entre as doses. Os doadores dos grupos controle foram tratados somente com PBS ou *P. acnes.* Sete dias após a segunda imunização, os doadores foram eutanasiados e foi realizado um pool de células do baço e dos linfonodos inguinais de cada grupo doador. Os animais receptores foram inoculados com $1x10^5$ células B16F10, por via subcutânea, 24 horas antes de receberem a primeira transferência celular adotiva contendo $1x10^7$ células, provenientes do pool de células de seu respectivo grupo doador. A segunda transferência celular foi realizada 7 dias após a primeira. O crescimento tumoral foi acompanhado a cada 2-3 dias, utilizando-se um paquímetro para medir o maior (D) e o menor (d) diâmetro do tumor. (A) Porcentagem de camundongos sobreviventes. (B) Volume do tumor calculado com a seguinte fórmula:
$V=0,52 \times D \times d^2$. Apenas um experimento foi realizado. * $p < 0,05$