

**Imunogenicidade do vírus vaccinia recombinante
modificado com o gene do Antígeno Cárcino-Embrionário
(CEA) humano em modelo experimental de adenocarcinoma
de cólon.**

ALBERTO JULIUS ALVES WAINSTEIN

**Tese apresentada à Fundação Antonio Prudente
para a obtenção do Grau de Doutor**

Área de concentração: Oncologia

Orientador:

Dr. Roger Chammas

Co-Orientador:

Dr. Howard L. Kaufman.

**São Paulo
2003**

**EXEMPLAR
ESPECIAL**

**FUNDAÇÃO ANTONIO
PRUDENTE
BIBLIOTECA**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Wainstein, Alberto Julius Alves

Imunogenicidade do vírus vaccinia recombinante modificado com o gene do Antígeno Cárceo-Embrionário(CEA) humano em modelo experimental de adenocarcinoma de cólon. / Alberto Julius Alves Wainstein. - São Paulo, 2003.

206p.

Tese(doutorado)–Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Roger Chammas.

Co-Orientador: Howard L. Kaufman

Descritores: 1. IMUNOTERAPIA/uso terapêutico. 2. RESPOSTA IMUNE MUCOSA/imunologia. 3. CANCER DE CÓLON/genética/imunologia/fisiopatologia/terapia. 4. ONCOLOGIA. 5. ANIMAIS TRANSGÊNICOS. 6. VÍRUS RECOMBINANTE. 7. ANTÍGENO CARCINO-EMBRIONÁRIO/imunologia/uso terapêutico. 8. POLIPOSE ADENOMATOSA DO CÓLON.

DEDICATÓRIA

A meu pai Julio “in memoriam” e minha mãe Gilca, pelas suas qualidades e exemplos de vida.

À minha esposa Ana Paula, companheira, incentivadora, amiga e parceira em todos estes anos.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Howard L. Kaufman pelo grande estímulo, apoio, orientação e por me receber em seu laboratório sempre com grande empenho e dedicação para que este projeto fosse concluído. Um grande exemplo de trabalho como cirurgião e pesquisador, produzindo resultados aplicados, beneficiando o paciente que é objetivo de tudo.

Ao Dr. Roger Chammas pela orientação e indispensável ajuda para a finalização desta tese. Um modelo de rigor científico e compromisso com a qualidade que sempre me servirão de exemplo.

À Ana Paula Lage Wainstein, sempre presente. Fonte de inspiração, apoio e amor. Além de grande companheira de vida, também uma parceira no laboratório.

A Robert Glover, Scott Lieberman, Ken Flanagan e Freddy Medina, colegas e pós-graduandos do Albert Einstein Cancer Center pelo apoio dado, proporcionando um ambiente de intensa cooperação técnica/científica que culminou em grandes amizades.

Ao Dr. Michal Bereta, gerente de projetos do Karmanos Cancer Institute, um de meus mestres que com sua dedicação e ilimitada capacidade de trabalho, foi essencial para minha formação e capacitação laboratorial.

À Dra. Heidi Horig, gerente de projetos do Albert Einstein Cancer Center, pelo seu apoio e proveitosas discussões dos resultados encontrados.

Ao Dr. Malcolm Mitchell, Diretor do Karmanos Cancer Institute por acreditar em mim, abrindo as portas de seu laboratório. Sua dedicação e história em muitos dos avanços da imunoterapia aplicada ao câncer sempre foram fonte de inspiração e admiração.

As senhoras Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari e Márcia Miwa Hiratani pela grande atenção e competência dispensadas objetivando sempre, otimizar minhas atividades na pós-graduação.

À senhorita Suely Francisco e demais funcionários da biblioteca pelo apoio e cordialidade essenciais para a finalização deste projeto.

Ao Dr. Jorge Sarsur Neto, grande amigo, sempre presente me apoiando na realização de meus sonhos.

Ao Dr. Ademar Lopes, grande incentivador e exemplo a ser seguido.

Ao Dr. Luiz Fernando Lima Reis, seu apoio e orientação foram de valia em diversos momentos.

Ao Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto, seu grande conhecimento, vasta experiência e competência, demonstrada de maneira simples, nos ensinam a ser humildes.

Ao Dr. Winfried Edelman pelo apoio, informações e disponibilização de animais e recursos técnicos.

Ao Dr. Raju Kucherlapati, Diretor do departamento de Genética em Haward. Durante sua passagem pelo Albert Einstein Cancer Center, participou ativamente do desenvolvimento dos animais duplo transgênicos, contribuindo com interessantes e ricas discussões que ajudaram a direcionar este projeto. Agradeço também pela criação e disponibilização dos animais “knock-out” Apc.

Ao Dr. Robert Russell, veterinário patologista do Albert Einstein Cancer Center, sempre dedicado e atencioso para a realização dos exames de histologia e parte dos exames de imuno-histoquímica.

Ao Dr. Jeffrey Schlom pela participação e influência científica em muitos dos experimentos deste projeto.

Ao Dr. Wolfgang Zimmerman pela disponibilização dos animais transgênicos para o CEA humano.

Aos funcionários do biotério do Albert Einstein Cancer Center pela grande dedicação e facilitação para parte dos experimentos.

Aos Dr. Paulo Roberto Savassi-Rocha, Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho e Dr. Luiz de Paula Castro pela amizade, apoio e incentivos para continuar minha carreira científica. Agradeço também a grande dedicação e empenho pela implantação do programa de vacinas para o câncer em nosso Instituto Alfa/ HC/UFGM.

Ao Dr. José Renan Cunha-Melo, orientador de minha tese de mestrado, um dos meus mestres que sempre me apoiou no sentido do aprimoramento científico/profissional.

Ao Dr. Gustavo Guerra Jacob, amigo e colega da pós-graduação, sempre presente e solidário.

Aos colegas e funcionários do Hospital do Câncer que de alguma maneira contribuíram para a conclusão deste projeto.

A muitos outros colegas e funcionários do Albert Einstein Cancer Center, NY, USA e Karmanos Cancer Institute, MI, USA que não foram aqui citados, mas, certamente tiveram grande importância para a realização deste projeto.

“O correr da vida embrulha tudo.

A vida é assim:

Esquenta e esfria,

Aperta e daí afrouxa.

Sossega e depois desinquieta.

O que ela quer da gente é coragem.”

Guimarães Rosa

RESUMO

Wainstein, AJA. **Imunogenicidade do vírus vaccinia recombinante modificado com o gene do Antígeno Cárcino-Embrionário(CEA) humano em modelo experimental de adenocarcinoma de cólon.** São Paulo; 2003. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: Os adenocarcinomas do trato gastrointestinal desenvolvem inicialmente a partir do epitélio superficial, e em mais de 90% dos casos expressam o CEA. Existe compartimentalização e alguma independência entre o sistema imunológico mucoso e sistêmico com tráfego assimétrico de células entre eles. Um melhor conhecimento da imunologia dos tumores tem gerado o desenvolvimento de várias abordagens de vacinas direcionadas contra antígenos tumorais específicos. O vírus vaccinia está entre os mais potentes para a indução de resposta protetora em animais contra infecções virais e câncer. Este tem sido mostrado como imunogênico em humanos. Imunização com o vírus vaccinia recombinante com o antígeno carcino-embriônico (CEA) pode gerar proteção humoral e celular contra tumores CEA +, dependendo da dose e via de imunização. Um dos obstáculos para o desenvolvimento de vacinas tem sido a falta de modelos animais relevantes para a avaliação apropriada de vacinas e protocolos de imunização. Os resultados poderiam ser mais precisos empregando-se um modelo animal que mimetize a situação humana com tumores espontâneos do trato gastrointestinal com grande expressão de antígenos específicos.

Objetivos: Comparar a imunização intra-retal com a venosa, e a resposta ao nível sistêmico e local após uma dose e dois reforços por estas duas vias. Desenvolvimento de um animal híbrido que desenvolva tumores espontâneos do trato gastrointestinal com evolução previsível: hiperplasia → displasia → adenoma → adenocarcinoma superficial → adenocarcinoma invasivo. Este modelo animal deve também apresentar alta expressão do CEA humano nos tumores e baixa em tecidos saudáveis como observado em humanos.

Material e Métodos: Os animais foram imunizados intra-retal ou intravenoso com 10 milhões de partículas do vírus Vaccinia recombinante com o CEA a cada 15 dias totalizando 3 doses. O grupo controle recebeu a mesma imunização com o mesmo vetor porém, não transduzido com o CEA. Metade dos animais em cada grupo foi sacrificada 7 dias após a última imunização para se avaliar a indução de resposta imunológica contra o CEA no baço (sistêmica) e nas placas de Peyer intestinais (mucosa). Os animais restantes receberam implantes no subcutâneo com tumores de cólon com e sem a expressão de CEA. Os tumores

foram medidos a cada 2 dias. Os animais *Apc* foram gerados por manipulação genética através da desativação do gene da Polipose colônica adenomatosa (APC) com mutação induzida na posição do aminoácido 1648, gerando proteína instável e não funcional. O animal CEA recebeu o gene completo do CEA humano. Estes dois animais transgênicos e *knock out* foram reproduzidos, gerando um modelo de animal híbrido com desenvolvimento espontâneo de tumores do trato GI com alta expressão de CEA humano. **Resultados:** Os animais imunizados com rVac-CEA apresentaram resposta humoral e celular específica contra o CEA e alguma proteção contra tumores CEA +. Todos os animais do grupo controle imunizados sem o CEA não apresentaram nenhuma resposta imunológica ou proteção contra os implantes tumorais. A imunização intra-retal se mostrou comparável à intravenosa com resposta sistêmica bem como nas placas de Peyer, mas com menor grau de proteção tumoral. Alguns animais imunizados não apresentaram crescimento tumoral e todos foram capazes de gerar atividade citolítica contra células CEA +. Entre os animais imunizados que desenvolveram tumores houve diminuição significativa do volume e crescimento tumoral. A imunização não mostrou proteção quando foram implantados tumores CEA negativos mostrando especificidade. Os animais híbridos gerados mostravam-se normais no segundo mês de vida quando começavam a apresentar pólipos hiperplásicos e sangue oculto nas fezes. Aos 4 meses apresentavam pólipos que evoluíam para adenocarcinomas invasivos com o mesmo padrão de displasia e expressão de CEA, observados em tumores colorretais humanos. Os tecidos tumorais apresentavam alta expressão do CEA humano bem como baixa expressão em tecidos como cólon, intestino e estômago. Estes animais mostravam tolerância parcial ou incompleta contra o CEA. **Conclusões:** A imunização intra-retal com o rVac-CEA se mostrou factível com índice de resposta maior que 50%. A citotoxicidade contra o CEA após imunização intra-retal bem como mucosa após imunização sistêmica foi medida no baço e placas de Peyer. Ambas as vias de imunização induziram proteção contra tumores CEA+ mas a via EV foi mais eficiente para tumores implantados no subcutâneo. O camundongo *Apc/CEA* é um relevante modelo animal para o estudo do desenvolvimento espontâneo do câncer de colón da fase de displasia ao adenocarcinoma invasivo. O CEA humano é superexpressado nos tumores. Este modelo representa um sistema para se avaliar diversas opções de tratamentos contra o câncer e para estudar a tolerância induzida e imunidade tumoral.

SUMMARY

Wainstein, AJA. **Immunogenicity of recombinant vaccinia virus modified with human carcinoembryonic antigen gene in an experimental model of colon adenocarcinoma.** [Doctor Degree Thesis - Fundação Antônio Prudente].

Introduction: The adenocarcinomas of the gastrointestinal tract (TGI) develop from superficial epithelium and in more than 90% of cases express CEA. There is compartmentalization with some independence among mucosal versus systemic immune systems and the asymmetric trafficking of cells between them. An improved understanding of tumor immunology has led to the development of several vaccine approaches targeted against specific human tumors antigens. Recombinant vaccinia virus vaccines are among the most potent for inducing protective immunity in animals against many viral infections and cancer. They have been shown to be immunogenic in human. Immunization with recombinant carcinoembryonic antigen (CEA) vaccinia virus can generate humoral and cellular protection against tumors CEA+, depending on the dose and route of administration. One of the major obstacles in vaccine development has been the lack of a relevant animal model for appropriately evaluating vaccine agents and immunization protocols. These results could be more accurate using an animal model that mimics the human situation with development of spontaneous tumors from the gastrointestinal tract with high expression of a specific antigen.

Objectives: Comparing intra-rectal and venous immunization, and to evaluate systemic and local immune response after one dose and 2 booster after these routes. Development of a hybrid mouse model that generates spontaneous TGI's tumors with expected evolution: hyperplasia → dysplasia → adenoma → superficial adenocarcinoma → invasive adenocarcinoma. The animal model should have high CEA expression in tumors and low at normal tissues as observed in humans. **Material e Methods:** Animals had intra-rectal (IR) or endovenous immunization with 10 million units of recombinant vaccinia-CEA virus each 15 days in a total of 3 doses. Control had the same immunization routes with vaccinia virus without CEA expression. Half of the animals were sacrificed 7 days after the last immunization to evaluate the induction of an immune response against CEA at the spleen (systemic response) and at the Payer's patches (mucosal response). Subcutaneous colon tumors, with or without the expression of CEA, were implanted in the other animals. Tumors were measured every 2 days. Animals Apc were generated by genetic manipulation with

partial knock out of the APC (Adenomatous Polyposis coli) gene at the amino acid position 1648. The Apc protein was unstable and not functional. The CEA mouse received the complete human CEA DNA. Those 2 transgenic and knock out mice models were crossed generating a hybrid transgenic animal model with spontaneous development of TGI's tumors with high expression of CEA. **Results:** The animals immunized with rVac-CEA presented humoral and cellular specific CEA response and some tumor protection for CEA + tumors. The control group immunized without CEA had no immune response or protection when challenged with CEA tumor implants. Intra-rectal immunization showed to be similar to intravenous immunization, with systemic and mucosal responses but low-grade tumor protection. Some immunized animals were tumor free and all were able to generate cytolytic activity against CEA+ cells. Among those that developed tumor, these were smaller and had decreased growing rate. Immunization did not show protection when animals received CEA-tumors indicating specificity. The double transgenic animals presented at 2 months hyperplastic polyps and occult blood in the feces. At 4 months old they showed gastrointestinal polyps that progressed to invasive adenocarcinomas with a similar pattern of dysplasia and CEA expression as observed in human colorectal cancer. Tumoral tissues had high expression of human CEA and tissues like colon, intestine and stomach also expressed CEA but at low level. These animals exhibited incomplete or partial tolerance to CEA. **Conclusions:** Intra-rectal immunization with rVac-CEA showed an immune response bigger than 40%. CTL against CEA after intra-rectal and systemic immunization was present at the spleen and Peyer's patch. Both route of immunizations induce CEA + tumors protection but the EV route was more effective for subcutaneous tumor. The Apc/CEA mouse is an important animal model for the studying of spontaneous cancer colon development from the dysplasia to adenocarcinoma. The human CEA is over expressed in tumors of these animals. This model represents a system to evaluate different treatment options and induction of tolerance and tumor immunity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A - Esquema da estrutura do gene do CEA humano com seus Introns e Éxons. **14**

B - Esquema da estrutura protéica do CEA humano, seus domínios extracelulares e seus sítios de glicosilação que aumentam a sua massa molecular de 70 para 180 kDa.

Figura 2 - A - Esquema do cassete com o gene do CEA, utilizado para a construção do plasmídeo PSC 11-CEA. **23**

B - Esquema do plasmídeo PSC 11, mostrando o sítio de restrição *Sma*I, para inserção de um segmento de um gene exógeno, este está justaposto ao promotor do gene *p7.5* de expressão precoce do vírus vaccinia. O gene do CEA foi inserido nesta posição para construir o PSC 11-CEA. O gene *LacZ*, codificando *B*-Galactosidase está sob regulação do promotor de *P11*. Ambos os genes estão entre os segmentos direitos e esquerdos do gene viral da Timidina-quinase (TK).

Figura 3 - Fluxo de células imunológicas apresentadoras de antígenos e efectoras entre o sistema imunológico mucoso e sistêmico proposto por NEUTRA et al. (1996). Células redondas são linfócitos e células estreladas são células dendríticas. A figura mostra que tanto linfócitos como células dendríticas podem transitar livremente da mucosa para os demais órgãos, mas que não ocorreria fluxo de células dendríticas do baço para a mucosa, apenas linfócitos trafegariam neste sentido. **30**

Figura 4 - A - Esquema da modificação do gene murino *Apc*. As linhas espessas representam o Éxon 15 e as linhas finas, seqüências não codificantes. O alelo *Apc* mutante é representado pelo segmento A-B associado à inserção do gene *pgkneo* e o normal (selvagem) pelo segmento A-C. **37**

B - Análise de Souther Blot mostrando o gene *Apc* mutado com o tamanho molecular de 3,9 kb e o não mutado de 5,0 kb. Os animais 3, 4, 6, 7, 8, 9 e 10 são heterozigotos, apresentando um alelo *Apc* normal e outro alelo recombinado.

Figura 5 - Citometria de fluxo das linhagens celulares mc-38 (colunas a esquerda) e mc-32 (colunas a direita). Os dois gráficos superiores mostram as populações celulares consideradas para a contagem. Os gráficos abaixo mostram a presença de moléculas MHC classe I presente em 94% das células mc-38 e 92% das células mc-32. O gráfico inferior quantifica a presença do CEA na superfície celular sendo de 3% nas células mc-38 e de 76% nas células mc-32. **73**

Figura 6 - Fotografia de animais adultos entre 10 e 12 meses das linhagens Knock-Out APC, dois superiores à esquerda, transgênico CEA, dois superiores à direita e híbrido Apc/CEA, três animais inferiores. A fotografia mostra que na mesma idade os animais Apc/CEA apresentam-se em pior estado geral. **78**

Figura 7 - Eletroforese de produto de PCR de seis animais testados 2 vezes. Na parte superior os animais CEA + apresentam um produto de 100bp e na inferior os animais Apc + apresentam bandas de 400 (alelo mutado) e 300 bp (alelo normal). Os animais de número 1, 2 e 4 são CEA +. Os animais de número 1, 3, 4 e 6 são Apc positivos sendo os animais 1 e 4 duplo transgênicos Apc/CEA. **80**

Figura 8 - Gráficos de animais Apc + mostrando o aumento proporcional do número (gráfico superior) e tamanho (gráfico inferior) dos pólipos do trato gastrointestinal com o aumento da idade. **81**

Figura 9 - Micrografia representando a análise histopatológica (Hematoxilina - Eosina) de lesões polipóides no cólon de animais APC+. Na figura A vemos um adenoma em um animal de 4 meses e na figura B um adenocarcinoma, invadindo a camada muscular (seta) em um animal de 8 meses. **82**

Figura 10 - Extratos protéicos da linhagem GEO do pulmão, fígado, baço, estômago, intestino, cólon e rim de animais CEA+ foram separados em gel de poliacrilamida SDS, transferidos para membrana PVDF e expostos a anticorpos anti-CEA e revelados com anticorpos secundários. Observam-se bandas de ~180 kDa de massa molecular nos extratos do estômago, intestino delgado e cólon bem como na linhagem de células CEA positivas GEO. Note que há relativamente mais CEA expresso no cólon do que no estômago e intestino. **84**

Figura 11 - Fotografia de animais transgênicos Apc, CEA e Apc/CEA no limite de sua longevidade com mais de 18 meses. Os animais CEA, centro não apresentam alterações macroscópicas. Os animais APC à esquerda apresentam-se desnutridos e caquéticos em decorrência de múltiplos pólipos gastro-intestinais e tumores. Estas alterações são mais exuberantes nos animais APC/CEA, à direita, possivelmente por serem duplo transgênicos. **85**

Figura 12 - Fotografia de exame imuno-histoquímico contra o CEA em pólipo adenomatoso de animal Apc/CEA. A região com alteração polipóide adenomatosa apresenta intensa coloração para o CEA. O tecido adjacente com aspecto normal apresenta-se também positivo, mas com baixa intensidade. **88**

Figura 13 - Maior crescimento do tumor mc-38 em comparação ao tumor mc-32 nos animais C57Bl6. Foram implantados 2×10^5 células de cada linhagem tumoral no flanco, de animais C57Bl6. O tumor era medido a cada 2 dias. **89**

Figura 14 - Crescimento comparável do tumor mc-38 nos animais C57Bl6 e Apc/CEA. Foram implantados 2×10^5 células de cada linhagem tumoral no flanco, sendo o tumor medido a cada 2 dias. A curva de crescimento para os animais Apc e CEA localizava-se entre as duas mostradas.(Dados não mostrados) **91**

Figura 15 - Evolução do tumor mc-32 implantado nos animais C57Bl6, Apc, CEA e Apc/CEA. Os gráficos A e B são idênticos com exceção do desvio padrão que foram mostrados em dois gráficos para serem melhor visualizados. **92**

- Figura 16** - Crescimento comparável do tumor mc-32 nos animais C57Bl6 e híbridos Apc/CEA. Foram implantados 2×10^5 células de cada linhagem tumoral no flanco, sendo o tumor medido a cada 2 dias. **93**
- Figura 17** - Maior crescimento do tumor mc-38 em comparação ao tumor mc-32 nos animais Apc/CEA. Foram implantados 2×10^5 células de cada linhagem tumoral no flanco, sendo o tumor medido a cada 2 dias. **94**
- Figura 18** - Animais no 22º dia após o implante tumoral de 2×10^5 células do tumor mc-32(CEA +) no flanco direito. As fotografias A,B,C, e D mostram animais das linhagens C57Bl6, APC, CEA e Apc/CEA, respectivamente. **95**
- Figura 19** - Fotografia dos tumores ressecados dos animais mostrados na Figura 18, no 22º dia após o implante tumoral de 2×10^5 células do tumor mc-32(CEA +) no flanco direito. As fotografias mostram animais das quatro linhagens estudadas, conforme legenda à esquerda. **96**
- Figura 20** - Imunização com o vetor Vaccinia recombinante com o CEA ou PBS, por via intra-retal ou venosa, não protege contra o implante de tumores CEA negativos. Os animais foram imunizados com 3 doses de rVac-CEA ou PBS, EV ou IR e a seguir, receberam o implante de 2×10^5 células do tumor mc-38 no flanco. **97**
- Figura 21** - Imunização com o vetor Vaccinia recombinante com o CEA, por via intra-retal ou venosa, protege contra o implante de tumores CEA positivos. Os animais foram imunizados com 3 doses de rVac-CEA ou PBS, EV ou IR e a seguir, receberam o implante de 2×10^5 células do tumor mc-32 no flanco. **98**
- Figura 22** - Gráficos mostrando o crescimento do tumor mc-32, CEA + em camundongos imunizados com o vetor rVac-CEA ou rVac-lac-Z por via retal ou venosa. A figura A mostra a área dos tumores após o 22º DPI e a figura B mostra o crescimento progressivo nos 22 dias. **101**
- Figura 23** - Gráficos mostrando o crescimento do tumor mc-38, CEA - em camundongos imunizados com o vetor rVac-CEA ou rVac-lac por via retal ou venosa. A figura A mostra a área dos tumores após o 22º DPI e a figura B mostra o crescimento progressivo nos 22 dias. **102**

- Figura 24** - Curva de Kaplan-Meyer com a análise da sobrevida livre de tumor até o 22º dia em animais imunizados de acordo com a legenda e transplantados com a linhagem mc-38 (CEA-). **103**
- Figura 25** - Curva de Kaplan-Meyer, mostrando a evolução até o dia 22 dos animais imunizados de acordo com a legenda. Estes animais receberam o implante do tumor CEA+, mc-32. **104**
- Figura 26** - Citotoxicidade específica de esplenócitos de animais imunizados com o rVac-CEA por via endovenosa. O eixo x mostra a proporção entre células efectoras/célula alvo, o eixo Y mostra a citotoxicidade ou lise específica e o eixo Z os diferentes alvos celulares. **106**
- Figura 27** - Citotoxicidade específica de esplenócitos de animais imunizados com o rVac-CEA por via intra-retal. O eixo x mostra a proporção entre células efectoras/célula alvo, o eixo Y mostra a citotoxicidade ou lise específica e o eixo Z os diferentes alvos celulares. **107**
- Figura 28** - Citotoxicidade de linfócitos das placas de Peyer em animais imunizados com o rVac-CEA por via endovenosa. O eixo x mostra a proporção entre células efectoras/célula alvo, o eixo Y mostra a citotoxicidade ou lise específica e o eixo Z os diferentes alvos celulares. **108**
- Figura 29** - Citotoxicidade de linfócitos das placas de Peyer em animais imunizados com rVac-CEA por via intra-retal. O eixo x mostra a proporção entre células efectoras/célula alvo, o eixo Y mostra a citotoxicidade ou lise específica e o eixo Z os diferentes alvos celulares. **109**
- Figura 30** - Resumo do experimento, mostrando a citotoxicidade no baço e placas de Peyer em animais imunizados com o vetor controle rVac-LacZ, por via retal ou venosa, de acordo com os alvos CEA(mc-32), Neg (mc-38), Vac (mc38Vac) no 7º dia após o implante tumoral. O gráfico mostra a citotoxicidade com 100 e 50 células efectoras para cada célula alvo respectivamente em azul e vermelho. **110**
- Figura 31** - Citotoxicidade específica de esplenócitos de animais imunizados com o rVac-CEA, por via endovenosa, no 22º dia após o implante tumoral. O eixo x mostra a proporção entre células efectoras/célula alvo, o eixo Y mostra a citotoxicidade ou lise específica e o eixo Z os diferentes alvos celulares. **112**

- Figura 32** - Citotoxicidade específica de esplenócitos de animais imunizados com o rVac-CEA, por via intra-retal, no 22º dia após o implante tumoral. O eixo x mostra a proporção entre células efectoras/célula alvo, o eixo Y mostra a citotoxicidade ou lise específica e o eixo Z os diferentes alvos celulares. **113**
- Figura 33** - Citotoxicidade de linfócitos das placas de Peyer em animais imunizados por via endovenosa no 22º dia após o implante tumoral. O eixo x mostra a proporção entre células efectoras/célula alvo, o eixo Y mostra a citotoxicidade ou lise específica e o eixo Z os diferentes alvos celulares. **114**
- Figura 34** - Citotoxicidade de linfócitos das placas de Peyer em animais imunizados por via intra-retal, no 22º dia após o implante tumoral. O eixo x mostra a proporção entre células efectoras/célula alvo, o eixo Y mostra a citotoxicidade ou lise específica e o eixo Z os diferentes alvos celulares. **115**
- Figura 35** - Resumo do experimento, mostrando a citotoxicidade no baço e placas de Peyer em animais imunizados com o vetor controle rVac-LacZ por via retal ou venosa de acordo com os alvos CEA(mc-32), Neg(mc-38), Vac(mc-38vac) no 22º dia após o implante tumoral. O gráfico mostra a citotoxicidade com 100 e 50 células efectoras para cada célula alvo, respectivamente em azul e vermelho. **116**
- Figura 36** - Produção de anticorpos contra o CEA, figura A e o vírus vaccinia, figura B, em animais imunizados por via intra-retal ou venosa com o vírus vaccinia Lac-Z ou vaccinia CEA. **120**
- Figura 37** - Curva padrão de absorbância para o anticorpo monoclonal anti-CEA Col-1. **121**
- Figura 38** - Proliferação de esplenócitos após imunização venosa ou retal com vaccinia Lac-Z ou vaccinia CEA com os seguintes imunógenos, A e B (peptídeo imunodominante do CEA), C e D (proteína do CEA) e E e F (Lisado com corpos apoptóticos de mc-32). Os gráficos da coluna da esquerda mostram os resultados antes do implante tumoral e os da direita após, no 22º DPI. O eixo Y mostra a porcentagem de proliferação acima do controle. **123**

Figura 39 - Gráfico mostrando a disseminação viral após a injeção endovenosa de 10^7 pfu do vetor rVac-CEA. O eixo Y mostra o número de partículas virais por ml de tecido. O eixo X mostra o tempo após a inoculação. Foram avaliados os títulos no baço, ovário, placas de Peyer e sangue.	125
Figura 40 - Gráfico mostrando a disseminação viral após a injeção intra-retal de 10^7 pfu do vetor rVac-CEA. O eixo Y mostra o número de partículas virais por ml de tecido. O eixo X mostra o tempo após a inoculação. Foram avaliados os títulos no baço, ovário, placas de Peyer e sangue.	126
Figura 41 - Citotoxicidade sistêmica contra alvo CEA negativo em animais de 2 meses de idade imunizados por via venosa com rVac-CEA.	128
Figura 42 - Citotoxicidade sistêmica contra alvo CEA positivo em animais de 2 meses de idade imunizados por via venosa com rVac-CEA.	128
Figura 43 - Citotoxicidade sistêmica contra alvo CEA negativo em animais de 9 meses de idade imunizados por via venosa com rVac-CEA.	129
Figura 44 - Citotoxicidade sistêmica contra alvo CEA positivo em animais de 9 meses de idade imunizados por via venosa com rVac-CEA.	130
Figura 45 - Evolução por animal C57Bl6 da área do tumor implantado mc-32 mostrada individualmente.	165
Figura 46 - Evolução por animal Apc da área do tumor implantado mc-32 mostrada individualmente.	165
Figura 47 - Evolução por animal CEA da área do tumor implantado mc-32 mostrada individualmente.	166
Figura 48 - Evolução por animal Apc/CEA da área do tumor implantado mc-32 mostrada individualmente.	166
Figura 49 - Evolução por animal Apc/CEA da área do tumor implantado mc-38 mostrada individualmente.	167
Figura 50 - Evolução por animal Apc/CEA da área do tumor implantado mc-32 mostrada individualmente.	168

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela mostrando a porcentagem de animais Apc/CEA com 86
pólipos, displasia ou adenoma e adenocarcinoma nas idades de 2, 4, 6 e 8
meses.

Tabela 2 - Tabela mostrando animais C57Bl6, CEA e Apc/CEA aos 2, 4, 6 e 87
8 meses e sua relação com a presença de CEA nas fezes, no soro e sangue
oculto nas fezes.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Polipose colônica adenomatosa
Bp	Pares de bases
EV	Endovenoso
CEA	Antígeno Cárcino-Embrionário
DPI	Dia pós-implante tumoral
DTH	Hipersensibilidade tipo tardia
GI	Gastrointestinal
HLA	Antígeno leucocitário humano
KDa	Kilodalton
Kb	Kilobase
IR	Intra-retal
mc-38-Vac	Linhagem celular mc-38 infectada com o vírus vaccinia
MHC	Complexo de histocompatibilidade maior
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pfu	Partícula formadora de unidade viral
rVac-CEA	Vírus vaccinia modificado recombinante com o gene do CEA humano
rVac-lac-Z	Vírus vaccinia modificado recombinante com o gene do Lac-Z
TAA	Antígenos associados a tumores
TCR	Receptores de linfócitos T
TK	Timidina-quinase
VAC	Vírus Vaccinia

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1. MECANISMOS DE CARCINOGENESE	10
2.2. ANTÍGENOS TUMORAIS	12
2.3. CEA	13
2.4. IMUNOLOGIA DOS TUMORES CEA POSITIVOS	17
2.5. TRATAMENTO DO CÂNCER	18
2.5.1. Cirurgia	18
2.5.2. Quimioterapia	19
2.5.3. Radioterapia	20
2.6. IMUNOTERAPIA CONTRA O CÂNCER	20
2.6.1. Vetores virais	21
2.7. COMPARTIMENTAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO (SISTÊMICO E MUCOSO)	24
2.8. TUMORES DE CÓLON	32
2.9. MODELOS ANIMAIS	33
3. OBJETIVOS	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. REAGENTES	41
4.2. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	43
4.3. LINHAGENS TUMORAIS	45
4.3.1. Linhagem para replicação viral	45
4.3.1.1. BSC-1	45
4.3.1.2. HeLa	45
4.3.2. Tumor de cólon murino CEA negativo (mc-38)	46
4.3.3. Tumor de cólon murino CEA positivo (mc-32)	46
4.4. VETORES	47
4.4.1. Vaccinia vírus	48

4.4.2. Vaccinia vírus transduzido com o CEA	48
4.4.3. Vaccinia vírus transduzido com o Lac-Z	49
4.5. ANIMAIS	49
4.5.1. Animais transgênicos Apc	50
4.5.1.1.Apc	50
4.5.1.2.Genotipagem	50
4.5.1.3.Pólipos	52
4.5.1.4.Histologia	53
4.5.2. Animais transgênicos CEA	53
4.5.2.1.Genotipagem	53
4.5.2.2.Sangue oculto nas fezes	54
4.5.2.3.Çoncentração de CEA sérico e fecal	54
4.5.2.4.Expressão protéica (Western Blot)	54
4.5.3. Animais híbridos Apc/CEA	55
4.5.3.1.Genotipagem	55
4.5.3.2.Imuno-histoquímica (Pólipos-CEA)	55
4.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	56
Experimento A	56
Experimento B	58
Experimento C	64
Experimento D	65
4.6.1. Imunização venosa	67
4.6.2. Imunização mucosa (intra-retal)	67
4.7. IMPLANTE TUMORAL	68
4.8. MENSURAÇÃO TUMORAL	68
4.9. MEDIDA DA CITOTOXICIDADE PELA LIBERAÇÃO DE CROMO ⁵¹	70
4.9.1. Processamento das células efetoras	71
4.9.1.1.Coleta de linfócitos do Baço	71
4.9.1.2.Coleta de linfócitos das Placas de Peyer	72
4.9.2 Processamento das células alvo	74
4.9.2.1 mc-38	74

4.9.2.2 mc-32	74
4.9.2.3 mc-38 expressando antígenos do vírus vaccinia	74
4.10. DOSAGEM DE ANTICORPOS	75
4.10.1. Anticorpos contra o CEA	75
4.10.2. Anticorpos contra Vaccinia	76
4.11. MEDIDA DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS	76
5. RESULTADOS	78
5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS TRANSGÊNICOS.	78
5.1.1. Genotipagem	79
5.1.2. Apc - Pólipos.	80
5.1.3. Apc- Histologia.	81
5.1.4. CEA - Genotipagem.	83
5.1.5. CEA - Expressão protéica.	83
5.1.6. Fenótipo - Animais Apc/CEA.	85
5.1.7. Apc/CEA - Genotipagem.	87
5.1.8. Apc/CEA - Imuno-histoquímica (Pólipos/CEA).	88
5.2. EVOLUÇÃO DOS TUMORES IMPLANTADOS NOS ANIMAIS C57BL6 NÃO IMUNIZADOS.	89
5.3. EVOLUÇÃO COMPARATIVA DOS TUMORES IMPLANTADOS NOS ANIMAIS C57BL6, Apc, CEA E Apc/CEA.	90
5.4. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL NOS ANIMAIS IMUNIZADOS EM COMPARAÇÃO AO GRUPO CONTROLE IMUNIZADO COM SOLUÇÃO SALINA PBS.	97
5.5. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL NOS ANIMAIS IMUNIZADOS EM COMPARAÇÃO AO GRUPO CONTROLE IMUNIZADO COM O VETOR VACCINIA RECOMBINANTE COM Lac-Z.	99
5.6. RESPOSTA IMUNOLÓGICA (CTL) NOS ANIMAIS IMUNIZADOS ANTES DO IMPLANTE TUMORAL.	104

5.7. RESPOSTA IMUNOLÓGICA (CTL) NOS ANIMAIS IMUNIZADOS APÓS O IMPLANTE TUMORAL.	111
5.8. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O CEA E ANTÍGENOS VIRAIS.	117
5.9. PROLIFERAÇÃO LINFOCITARIA APÓS IMUNIZAÇÃO.	121
5.10. QUANTIFICAÇÃO DA DISSEMINAÇÃO VIRAL SISTÊMICA APÓS IMUNIZAÇÃO VENOSA E INTRA-RETAL ATRAVÉS DA TITULAÇÃO VIRAL.	124
5.11. RESPOSTA IMUNOLÓGICA (CTL) NOS ANIMAIS TRANSGÊNICOS IMUNIZADOS.	126
6. DISCUSSÃO	131
6.1. MODELOS ANIMAIS TRANSGÊNICOS CEA, KNOCK-OUT APC E HÍBRIDO Apc/CEA	131
6.2. IMUNIZAÇÃO COM O VETOR rVac-CEA	141
6.3. IMUNIZAÇÃO INTRA-RETAL	143
6.4. COMPARTIMENTALIZAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO	149
6.5. TOLERÂNCIA A ANTÍGENOS TUMORAIS	162
7. CONCLUSÕES	175
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	177

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa e busca de novas opções de tratamentos para o câncer é um dos maiores objetivos da prática médica. Atualmente existem basicamente três opções terapêuticas já consagradas, a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. Apesar dos grandes benefícios que estas modalidades têm proporcionado aos pacientes nas últimas décadas, uma grande proporção destes com tumores sólidos já disseminados não conseguem a cura (TUBIANA et al. 1986). Isto se deve principalmente ao comportamento biológico dos tumores. Assume-se uma origem monoclonal em 90 a 95% dos tumores, mas um mesmo tumor em um mesmo paciente pode ser composto por bilhões de células com características biológicas heterogêneas bem como vias moleculares e metabólicas completamente distintas (GIOVAGNOLI et al. 1999). Isto pode ser facilmente aferido pelo grande número de pacientes que são considerados curados sem doença residual após alguns destes tratamentos, e pouco tempo depois, apresentam recidivas tumorais que frequentemente o levam ao óbito (BAARS et al. 2003).

Um pequeno tumor de 1cm^3 pesa cerca de 1 grama e está um pouco acima do limite diagnóstico atual de nossos equipamentos. Este pequeno tumor pode ter cerca de 10^9 ou 1 bilhão de células cancerosas. A cirurgia, a quimioterapia ou a radioterapia podem ser empregadas para destruir este tumor. Mesmo com uma grande eficácia, estes tratamentos poderiam destruir 99,99999% das células tumorais, mas isso não é o suficiente. Com este resultado o paciente ainda persistiria com aproximadamente 0,00001% do tumor original ou cerca de 100 células tumorais.

Este tumor residual teria um volume menor do que $0,01\text{mm}^3$, muito abaixo do limite de resolução diagnóstica de qualquer equipamento que dispomos hoje como tomografia computadorizada, ressonância nuclear magnética ou PET-SCAN. Desta forma, muito possivelmente este paciente seria considerado curado durante os primeiros meses seguintes ao tratamento empregado. Este é o grande problema da abordagem de pacientes oncológicos. O câncer é uma patologia extremamente complexa onde não devemos esperar bons resultados com tratamentos ou soluções simples. A cirurgia é muito eficaz para lesões primárias, mas tem poucas chances de sucesso quando o tumor já se encontra metastatizado. A radioterapia é campo limitado e depende de radicais livres para gerar dano ao DNA tumoral que freqüentemente é reparado. E por último, a quimioterapia mesmo com seus recentes avanços, empregando drogas mais racionais, ainda depende da inibição de processos metabólicos essenciais às células tumorais. Infelizmente, a maioria destes processos metabólicos tumorais são compartilhados com células normais. Isso impede que muitas das drogas quimioterápicas sejam empregadas em uma dose otimizada para o tecido tumoral, tornando a quimioterapia muito dose limitante, restringindo muito seus resultados terapêuticos (HENSLEY et al. 1999).

Como todos os tratamentos disponíveis atualmente apresentam baixa eficácia para tumores disseminados, novas opções terapêuticas têm sido desenvolvidas e aplicadas. Muitos destes novos tratamentos já apresentam resultados significativos, e estão deixando de ser terapias experimentais já sendo padronizados para alguns tumores. Entre eles, destaca-se a imunoterapia, tema principal deste projeto, que até o momento, também não apresenta alta eficácia.

Os avanços recentes em nosso conhecimento sobre a biologia tumoral, imunologia e biologia molecular renovaram o interesse na pesquisa de vacinas para a prevenção e tratamento do câncer. A partir do final do último século foram e continuam sendo descobertos diversos antígenos tumorais conhecidos como antígenos associados aos tumores (NAGORSEN et al. 2002). Estes apresentam seqüências de aminoácidos capazes de serem reconhecidos pelo sistema imunológico e capazes de iniciarem uma resposta citotóxica contra as células tumorais. Um dos passos fundamentais para estes avanços foi um melhor domínio dos mecanismos de apresentação de antígenos com maior conhecimento das células apresentadoras de antígenos (células dendríticas). Existem diversas implicações em como um antígeno é apresentado pela célula dendrítica. Variáveis como a presença de moléculas co-estimuladoras, perfil de citocinas e quimiocinas bem como o tipo de populações linfocitárias e outros, podem dirigir a resposta imunológica para gerar antigenicidade ou tolerância (Clark 2000).

Outro grande avanço é dispormos, hoje, de diversos agentes como bactérias, vírus, DNA, RNA, e outros capazes de manipular o sistema imunológico ensinando-o a reconhecer e destruir tumores. Todos estes conhecimentos permitiram que a imunização, que é atualmente o procedimento padrão para a prevenção da maioria das doenças infecciosas, passasse a ser empregada pelos oncologistas e fosse objeto de pesquisa na luta contra o câncer (WEINER e KIM 2002). O argumento para o uso de vacinas contra o câncer foi baseado nestes princípios e tem sua base nas idéias de Paul Ehrlich, descrito por muitos como o precursor da oncologia moderna. Os aprimoramentos advindos dos conhecimentos de vacinas para prevenção permitem rever as abordagens vacinais para uso terapêutico. Esta designação cria alguma

confusão, pois o termo vacina originalmente descrito para procedimentos de prevenção esta sendo empregado nas abordagens terapêuticas do câncer. O emprego de vacinas preventivas aplicadas à oncologia, apesar de muito estudado, ainda não faz parte de nossa realidade.

O conceito de vacinas contra o câncer é antigo e data de 1897 quando Willian Coley relatou na reunião da Associação Médica Americana, que pacientes com sarcomas avançados e inoperáveis, apresentavam melhor prognóstico quando desenvolviam erisipelas sobre os tumores. Nesta ocasião foi vaiado e expulso da reunião científica. É relatado que na reunião do ano seguinte a apresentação de COLEY (1911) foi a de maior impacto científico, pois comprovou seus resultados e apresentou a primeira vacina descrita contra o câncer. Tratava-se do extrato de erisipela de COLEY (1911). Certamente não se tornou uma opção terapêutica promissora, mas desde então a imunologia dos tumores e a busca de vacinas contra os mesmos tornou-se um campo de estudos promissores, alternando períodos de maior ou menor entusiasmo (MOCELLIN et al. 2002).

Diversos estudos em animais mostraram inicialmente que é plenamente possível induzir uma resposta imunológica capaz de reconhecer e destruir tumores. Estes tumores apresentam diversos antígenos que na maioria das vezes estão presentes em outros tecidos. A polêmica teoria da imunovigilância preconiza que o sistema imunológico estaria constantemente patrulhando os marcadores de nossas células. Este seria capaz de detectar e destruir células que apresentem antígenos mutantes o que poderia ser um marcador precoce da carcinogênese. Apesar de estar de acordo com muitos conceitos básicos da imunologia, esta teoria não vem se sustentando com o maior conhecimento sobre o complexo funcionamento do sistema

imunológico e os resultados de protocolos experimentais (SPEISER et al. 1997). É extremamente rara a presença de antígenos tumorais únicos. Na maioria das vezes eles estão mais expressos nos tumores, mas são também compartilhados com muitas células normais sendo conhecidos por antígenos associados aos tumores (TAA). Existem diversas razões que justificam porque estes antígenos podem possibilitar e mediar o reconhecimento e destruição de células tumorais. Apesar de compartilhados com células normais, estes antígenos podem ser mutantes nas células tumorais com apresentação de peptídeos únicos em proteínas truncadas. Também podem estar com diferentes graus de glicosilação ou mesmo expressos em grandes quantidades nas células tumorais (KAYSER et al. 2003; PAULI et al. 2003; NAGORSEN et al. 2003).

Um dos passos mais importantes para o desenvolvimento da imunoterapia contra o câncer foi a descoberta de que os linfócitos T eram os mediadores da maioria das respostas imunes anti-tumorais. A partir de então não bastava descobrir antígenos tumorais, a atenção foi direcionada em antígenos específicos capazes de serem reconhecidos pelos receptores de células T (TCR) destes linfócitos. Estes antígenos geralmente são pequenos peptídeos compostos de seqüências de aminoácidos que após a degradação intracelular das proteínas são apresentados em moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC). Muitos tumores conseguem escapar do reconhecimento pelo sistema imunológico através da não apresentação de antígenos em um contexto MHC ou mesmo diminuindo o número destas moléculas em sua superfície. Outro mecanismo de escape tumoral seria a expressão de moléculas indutoras de apoptose em sua superfície como o Fas-L, fazendo com que

linfócitos ativados, que poderiam destruir células tumorais, entrem em apoptose assim que ocorra a interação entre TCR-MHC.

Quando um possível antígeno não é apresentado ou processado pelas células apresentadoras de antígenos podemos dizer de maneira genérica que ocorreu anergia. Quando este antígeno é apresentado pode ocorrer uma resposta imunológica capaz de gerar antigenicidade ou tolerância. O estudo de moléculas co-estimuladoras mostrou claramente que não bastava um antígeno tumoral ser processado e apresentado em uma molécula MHC. Isto deveria ser feito em um contexto de imunogenicidade conhecido como *Danger signal* onde um antígeno é apresentado como algo que deve ser procurado, reconhecido e destruído (MATZINGER 1994). Existem diversas moléculas co-estimulatórias como ICAM, ICOS, CD40L e outros, que fazem, com que um antígeno previamente não imunogênico, quando apresentado em seu contexto, seja capaz de gerar uma resposta imunológica com antigenicidade e citotoxicidade (HODGE et al. 2002).

A ativação de células T requer ao menos 2 sinais distintos. O primeiro sinal é antígeno específico através de receptores TCR que interagem com o complexo MHC peptídeo e fazem com que este linfócito inicie o ciclo celular. O segundo sinal, a co-estimulação, é necessário para a produção de citocinas e proliferação. Estes linfócitos, frutos de diversas interações entre ligantes e seus receptores podem ser capazes de processar respostas de citotoxicidade típica TH1 ou desencadear e induzir tolerância sistêmica como a desencadeada pelos linfócitos CD4⁺ CD25⁺.

É a combinação de diferentes concentrações de moléculas co-estimulatórias, citocinas e quimiocinas em tempos muito específicos que dirige o tipo de resposta imunológica e a magnitude e população de linfócitos envolvida (SCHLOM e

HODGE 1999; MASON et al. 1998). Todo este processo tem um alto nível de complexidade e costumam ser muito específicos para cada situação (HAMANN et al. 1999).

O sistema de processamento e apresentação de antígenos quando manipulado para se induzir uma resposta ativa quase sempre tem a participação de células apresentadoras de antígenos. Dentre as várias linhagens celulares, as células dendríticas são as mais potentes e capazes de apresentar antígenos por maior tempo. Elas podem ser pulsadas com peptídeos, lisados tumorais, corpos apoptóticos, e também com DNA e RNA, codificando antígenos tumorais e induzidas a apresentar peptídeos de tumores em um contexto de antigenicidade (ENGLEMAN 2003).

Mesmo que se consiga identificar um potente e específico antígeno tumoral, fazendo-se com que este seja processado e apresentado por células apresentadoras de antígenos, gerando-se números significativos de linfócitos T capazes de reconhecer e destruir o tumor, ainda faltaria uma etapa essencial. Esta mobilização imunológica anti-tumoral gerada, precisa localizar as células tumorais e ser efetiva no ambiente tumoral. O ideal seria a geração de uma resposta imunológica sistêmica em todo o indivíduo. Muitas publicações têm mostrado que o sistema imunológico poderia ser dividido em sistêmico e mucoso e que uma resposta induzida em um destes sítios não necessariamente seria efetiva em ambos (BELYAKOV et al. 1999). Para avançarmos sobre este campo desenvolvemos e comparamos a imunização por via sistêmica (endovenosa) com a via mucosa (intra-retal), comparando a resposta obtida.

É importante ser considerado que existem diversas vias de se gerar imunidade sistêmica. A via mucosa é uma delas. Esta via apresenta limitações para se gerar uma resposta imune mucosa e sistêmica, mas isto é factível com o uso de potentes

adjuvantes e vetores em um sistema otimizado de imunização (WANG et al. 2001). Para tanto empregamos como vetor de imunização o vírus vaccinia recombinante com o Antígeno Cárcino-Embrionário (CEA). Este vírus é capaz de ser transfectado com grandes segmentos de genes exógenos. É também um vetor muito confiável já que induz a produção das proteínas deste gene de maneira precisa. Apresenta também uma replicação com baixíssimo índice de mutações.

O CEA está presente em uma grande proporção de adenocarcinomas humanos (THOMPSON e ZIMMERMAN 1988) e os resultados obtidos poderiam ser translacionais para imunizações em pacientes com tumores de diferentes órgãos. A grande expressão do CEA em tumores do trato gastrointestinal permite que o mesmo seja estudado, avaliando-se várias implicações de imunizações sistêmicas e mucosas. A rota de imunização intra-retal seria teoricamente mais efetiva do que a intranasal ou intravaginal pelo maior número de possíveis locais de indução imunológica disponíveis no reto, conhecidos como placas de Peyer (HOPKINS et al. 1995). Estas placas de Peyer poderiam ser sumariamente descritas como unidades de processamento e apresentação de antígenos, sendo muito importantes para o processo de geração de resposta imunológica. Apesar de todas estas abordagens acima representarem soluções lógicas para a imunoterapia do câncer, ainda não está claro qual seria o melhor vetor, dose, rota de imunização e esquema terapêutico, que seriam pontos essenciais em qualquer imunização (ZINKERNAGEL 2000a).

O emprego de um modelo animal otimizado poderia ser uma etapa essencial para definirem-se soluções para os pontos levantados acima. Neste trabalho desenvolvemos um modelo animal transgênico para o CEA humano e knock-out para o gene Apc (HORIG et al. 2001). Estes animais desenvolvem pólipos espontâneos do

trato gastrointestinal que evoluem para adenomas, adenocarcinomas locais e invasivos. Hiperplasias polipóides frequentemente regridem, mas nestes animais este é um processo de progressão relativamente constante e previsível. Os pólipos que progridem já são histologicamente adenomas. Estes pólipos que já são tumores benignos (adenomas) ou malignos (adenocarcinomas) apresentam expressão do CEA maior do que nos tecidos normais. Isso torna este modelo otimizado para o estudo da expressão de antígenos associados ao tumor e todas as implicações referentes à indução de tolerância e/ou resposta imune contra o câncer (HORIG et al. 2001).

Um dos objetivos da criação deste modelo animal foi avaliar a relação entre os pólipos e o CEA. O CEA sendo uma proteína embriológica seria expressa nos pólipos. Esta expressão de CEA nos pólipos poderia aumentar ou diminuir a tolerância ao CEA? O CEA estaria mais expresso nos tecidos tumorais? A resposta a estas perguntas seria essencial para melhor entendermos os mecanismos de tolerância a antígenos tumorais e definirmos abordagens imunoterápicas mais adequadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MECANISMOS DE CARCINOGENESE

É importante serem abordados os mecanismos de carcinogênese porque a imunoterapia pode atuar em diversas fases deste processo complexo.

A carcinogênese é o conjunto de mecanismos que governam a transformação de uma célula normal em uma célula tumoral através de uma seqüência de processos, que rompem a homeostasia celular transformando o fenótipo da célula. São basicamente seis mecanismos que causam alterações essenciais na fisiologia celular e que permitem a transformação maligna e o desenvolvimento e disseminação do tumor, levando o hospedeiro à morte (HANAHAN e WEINBERG 2000). As fases mais importantes são a iniciação, promoção, manutenção, progressão e metastatização que são facilidades progressivamente acumuladas para a progressão tumoral.

O primeiro é a auto-suficiência em sinais de crescimento, permitindo que a célula se torne independente de estímulos para replicar. As células tumorais são capazes de gerar seus próprios sinais para a replicação de maneira autócrina ou mesmo induzir elementos do micro-ambiente tumoral para que eles desempenhem esta função de maneira parácrina.

A célula precisa também se tornar insensível a estímulos antiproliferativos que mantém as células normais quiescentes, uma característica importante para a homeostasia tecidual. As células que replicam indevidamente podem ser obrigadas a

interromper a proliferação ativa retornando à forma quiescente G0 ou serem induzidas a uma diferenciação, relacionada a um estágio pós-mitótico. As células tumorais escapam destes controles, porque podem acumular alterações genotípicas que conferem resistência aos sinais antiproliferativos.

A célula precisa desenvolver mecanismos para escapar da morte celular programada ou apoptose, que esta presente em todas as células do organismo. A apoptose é uma das grandes barreiras que as células cancerosas devem vencer para continuar proliferando e geralmente é conseguida através da inativação de reguladores pró-apoptóticos como o gene *p53*. A inativação deste gene ou seus produtos está presente em mais de 50% dos tumores humanos.

Também precisa sobrepujar o limite intrínseco de replicação de cada tipo celular. A cada ciclo celular o telômero diminui chegando ao ponto em que a célula morre por apoptose. A manutenção do telômero está presente em mais de 80% dos tumores malignos, permitindo que as células tenham a capacidade de replicar indefinidamente.

É preciso que o tumor estabeleça angiogênese capaz de manter o tumor viável, suprido de oxigênio e principalmente nutrientes em quantidade suficiente para permitir o crescimento tumoral.

E por último, a capacidade de invasão tecidual e estabelecer metástases à distância que é a causa de óbito mais importante nos pacientes com tumores (FIDLER et al. 2002).

Estas seis capacidades adquiridas são compartilhadas pela maioria ou possivelmente a totalidade dos tumores malignos (HANAHAN e WEINBERG

2000). Isto permite que sejam descobertos mecanismos comuns capazes de inativar diversos tumores que compartilham processos semelhantes.

A imunoterapia pode ser aplicada para prevenir tumores como em casos de hepatite B, papiloma vírus e *Helicobacter pylori* onde a erradicação de agentes infecciosos diretamente relacionados com o processo de carcinogênese pode diminuir a incidência de tumores (LOLLINI e FORNI 2002). Em fases iniciais a imunoterapia com interferon pode diminuir a incidência de tumores em pacientes cirróticos, tendo como um dos seus mecanismos de ação o aumento da expressão de moléculas MHC nas células tumorais e a possível lise e destruição destas pelo sistema imune (SUN e TANG 2003). Para se tentar destruir lesões pré-malignas, já existem trabalhos em animais que mostraram ser possível prevenir câncer de mama em camundongos, utilizando-se o gene HER-2/neu. Estas metodologias já estão em fase pré-clínica já sendo programado protocolo fase I (LOLLINI e FORNI 2002). Em fases avançadas para controlar ou destruir tumores já estabelecidos, existem diversas modalidades de imunizações com linfócitos ativados, peptídeos, vetores, células dendríticas e muitas outras. Um outro campo bastante promissor para a prevenção e tratamento do câncer deveria ser a terapia gênica baseada na biologia molecular onde possivelmente a ativação do sistema imunológico pode não ser necessária.

2.2 ANTÍGENOS TUMORAIS

O sucesso amplo da imunoterapia contra tumores deve-se basear em parte na descoberta de antígenos específicos dos tumores capazes de estimular uma resposta imunológica específica nos pacientes. A cada dia são descobertos novos antígenos

tumorais, capazes de serem reconhecidos não apenas por pacientes com tumores, mas também por indivíduos saudáveis. Muitos antígenos tumorais são compartilhados por tumores de mesma origem histológica em diversos pacientes e também em tumores completamente distintos em um mesmo paciente (KAO et al. 2001), não sendo necessariamente tumor específico.

2.3 CEA

O CEA foi um dos primeiros antígenos associados aos tumores humanos a ser descrito e tem sido bem caracterizado como uma glicoproteína expressa em altas concentrações no tecido colônico fetal. Parece ter uma implicação no processo de *anoikis* (morte celular por desalojamento), que direciona a polaridade e correta posição de cada tipo celular nas criptas intestinais. Algumas isoformas do CEA parecem inibir o processo de apoptose que deveria ocorrer quando a célula perde sua ancoragem, polaridade e correta posição histológica (ORDONES et al. 2000). Durante a vida adulta é expresso em baixas concentrações no epitélio colônico. Seu nível sérico pode estar muito elevado quando algum processo inflamatório se instala em qualquer tecido de origem endodérmica como em alguns processos benignos e principalmente em tumores malignos do cólon, estômago, intestino delgado, pâncreas, fígado, mama, ovário e pulmão (GOLDENBERG et al. 1976). Pode também estar elevado em indivíduos que fumam (JOTHY 1986).

O CEA apresenta grande utilidade clínica para acompanhamento de pacientes no pós-operatório. Pacientes com tumores CEA positivos, principalmente de cólon, podem ser monitorados quanto a uma possível recidiva tumoral através da dosagem

periódica do CEA sérico. Quando ocorre uma elevação sustentada deste marcador, existe uma grande possibilidade da presença de recidiva tumoral e estaria indicada a propedêutica com métodos de imagem, para a localização e possível tratamento de metástases ocultas.

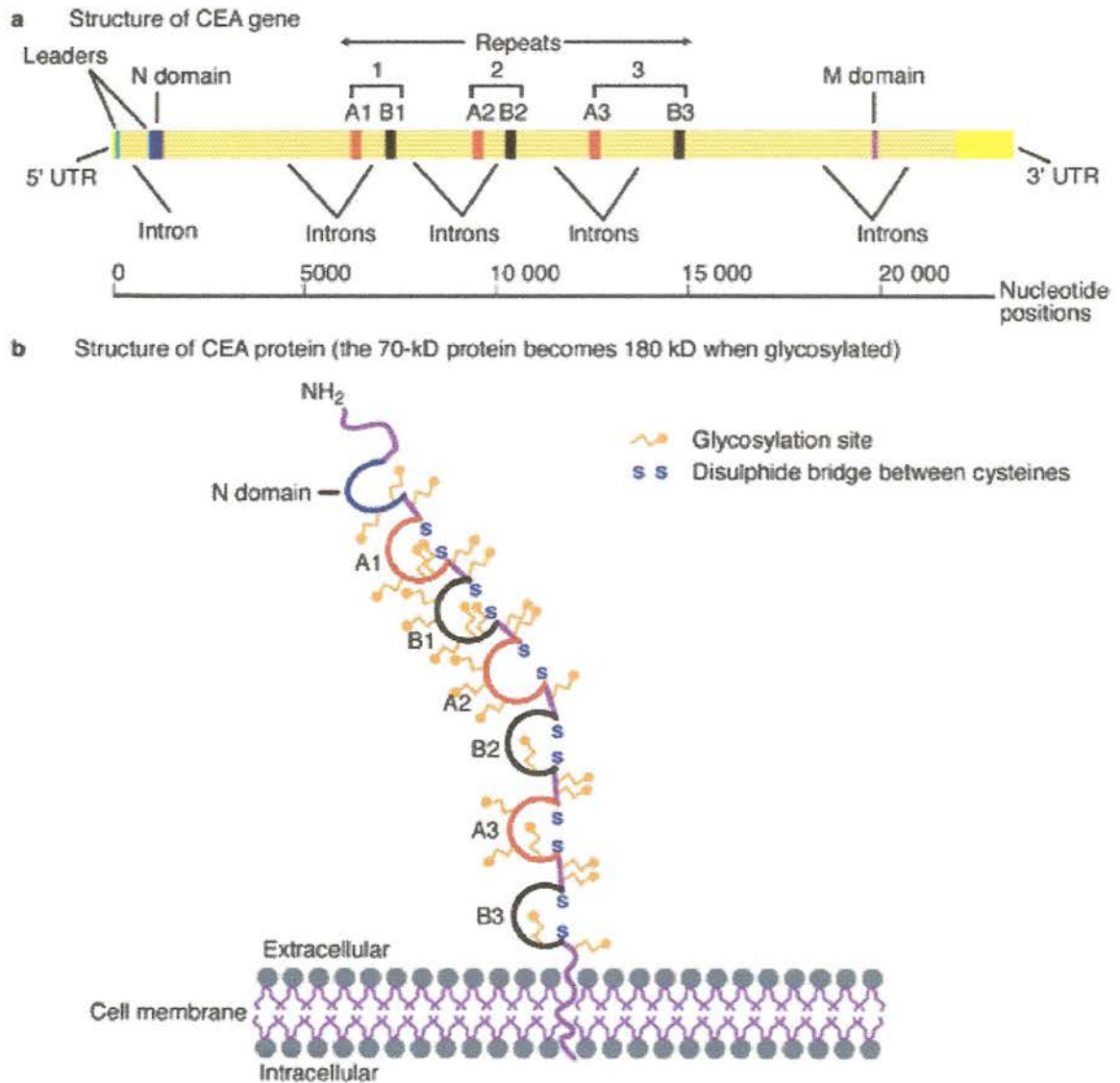


Figura 1 - A - Esquema da estrutura do gene do CEA humano com seus Introns e Éxons.

B - Esquema da estrutura protéica do CEA humano, seus domínios extracelulares e seus sítios de glicosilação que aumentam a sua massa molecular de 70 para 180 kDa.

Várias modalidades de imunizações baseadas no CEA podem ser promissoras para pacientes com diversos tumores. Existem diversos protocolos pré-clínicos e clínicos baseados em vetores, cDNA, mRNA, anticorpos, peptídeos, células dendríticas e linfócitos, que têm como objetivo destruir células tumorais CEA positivas através da ativação do sistema imunológico contra este antígeno (MARSHALL 2003).

Uma das funções biológicas do CEA é como molécula de adesão e agregação. Também promove a orientação espacial das células epiteliais do cólon e a organização destas com a matriz extracelular durante o desenvolvimento fetal. O CEA em epitélio colônico adulto, está relacionado com a manutenção da integridade do epitélio luminal. A alteração desta integridade em tumores onde o CEA é encontrado de maneira totalmente desorganizada pode estar relacionada com a ruptura da adesão entre colonócitos, crescimento desorganizado e malignização.

O CEA também está envolvido no processo de metástases. É um membro da superfamília das imunoglobulinas, caracterizado pela homologia nos domínios globulares extracelulares (A1-A3; B1-B3), sendo, portanto, uma molécula de adesão conforme mostrado na Figura 1. De fato há evidências experimentais que o CEA medeia a interação célula-célula (OBRINK 1997). Por ser considerada uma molécula de adesão também é implicado como potencializador do processo de metástase em alguns modelos experimentais, principalmente metástases hepáticas (TIBBETTS et al. 1993; MINAMI et al. 2001). O CEA pode ser reconhecido por células de Kupffer pela seqüência de 5 aminoácidos, Pro-Glu-Leu-Pro-Lys. Este reconhecimento resulta em liberação de citocinas implicadas no processo de estabelecimento de metástases

hepáticas. Esta interação induz as células endoteliais sinusoidais a expressar moléculas de adesão que podem facilitar o estabelecimento de células tumorais no fígado (GANGOPADHYAY et al. 1996).

O gene que codifica o CEA foi inicialmente descrito em 1986, estando localizado no cromossomo 19. O seu mRNA tem 3100 pares de base que codificam uma proteína de 70 kDa. A massa molecular final do CEA de 180KD é obtida pela adição de carboidratos por uma extensiva glicosilação, conforme esquematizado na Figura 1. A estrutura do CEA consiste em um domínio amino terminal com a repetição de 178 aminoácidos e um domínio C hidrofóbico. Pela sua estrutura, passou a ser um membro da superfamília das imunoglobulinas (OKINAWA et al. 1987). Existem diversos outros antígenos semelhantes ao CEA como a glicoproteína biliar específica, CGM-6 e diversas glicoproteínas específicas da gravidez. Existem 29 genes distintos que codificam produtos relacionados ao CEA. A maioria destes genes também se localiza no braço longo do cromossomo 19 (ZIMMERMANN 1987).

O potencial do CEA para iniciar uma resposta imunológica celular tipo TH1 específica foi inicialmente descrito em 1982. Mostrou-se que pacientes que tinham tumores de cólon freqüentemente exibiam hipersensibilidade tardia (DTH) contra a proteína do CEA purificada (OREFICE 1982). Desde então vários grupos independentes têm demonstrado diversos epítomos na molécula do CEA capazes de serem reconhecidos por linfócitos em um contexto HLA (Human Leucocyte Antigen) restrito, gerando resposta T citotóxica (HUANG e KAUFMAN 2002).

Muito se especulou sobre os mecanismos de indução de tolerância contra o CEA em animais transgênicos para esta proteína. Este é um assunto muito

controverso, principalmente porque ainda não existe consenso científico absoluto de como é induzida ou processada a tolerância contra antígenos constitucionais. O CEA não é expresso no timo de animais transgênicos. Portanto, baseando-se na hipótese de indução de tolerância central durante a embriogênese, não existe impedimento para que estes animais fossem incapazes de desenvolver imunidade contra o CEA por seleção tímica negativa (HASEGAWA et al. 1992; EADES-PERNER e ZIMMERMANN 1995).

2.4 IMUNOLOGIA DOS TUMORES CEA POSITIVOS

Um dos grandes desafios para o desenvolvimento de vacinas contra o câncer é a tolerância imunológica contra a maioria dos antígenos tumorais. Com exceção de cerca de 10% dos tumores humanos que são desencadeados por vírus, os demais tumores não costumam apresentar antígenos únicos que poderiam ser alvos para o ataque do sistema imunológico. Os antígenos tumorais são compartilhados em maior ou menor grau com tecidos saudáveis, contra os quais, o sistema imunológico deve ser tolerante. Sendo assim, os pacientes já apresentam uma tolerância inata contra os antígenos tumorais, que podem ser considerados auto-antígenos.

Uma das melhores maneiras de se estudar o fenômeno da tolerância é através de animais transgênicos ou por modelos de auto-imunidade onde a tolerância é quebrada. KASS et al. (1999) mostrou que animais transgênicos para o CEA eram tolerantes contra esta proteína e não produziam citotoxicidade *in vitro* quando estimulados com o CEA. Porém, quando imunizados com vetores expressando o CEA, estes animais foram capazes de gerar resposta contra o CEA em tumores, sem

dano aparente aos tecidos saudáveis que também expressavam o CEA (KASS et al. 1999). Mesmo assim, a resposta imunológica contra este antígeno nos animais transgênicos foi aproximadamente 40 vezes menor do que nos animais normais. Isto mostra que eles eram parcialmente tolerantes ao CEA, mas que esta tolerância poderia ser quebrada, gerando uma resposta imunológica contra tumores CEA positivos.

Existem trabalhos que mostram uma significativa resposta humoral contra tumores CEA positivos. Porém, esta resposta humoral pode também desencadear uma resposta celular e ainda não está claro qual a sua importância (FOON et al. 1999).

2.5 TRATAMENTO DO CÂNCER

2.5.1 Cirurgia

A cirurgia é o tratamento mais antigo para o câncer e até recentemente, o único que podia proporcionar a cura do paciente (HILL 1979). O tratamento cirúrgico é baseado no princípio de ressecar o tumor ou metástases englobadas em tecido sadio (margem de segurança), para em caso de sucesso, deixar o paciente livre de tecido canceroso. Os resultados desse tratamento dependem do estágio da doença, comportamento biológico do tumor, da condição clínica do paciente e capacitação técnica do cirurgião. Todas essas variáveis podem significar pouco se o tumor for disseminado, o que inviabiliza qualquer possibilidade de cura para o paciente (SILBERMAN 1982). O cirurgião não tem tratamento para as micrometástases, e a capacidade de metastatizar é a principal característica prognóstica dos tumores

malignos. O desenvolvimento de novas opções de tratamentos adjuvantes como a imunoterapia poderia resultar em maior índice de sucesso pela sinergia dos tratamentos. Como dito, a cirurgia não trata micrometástases a distância, bem como a imunoterapia não tem grandes chances de sucesso contra grandes massas tumorais. Caso possamos desenvolver imunoterapias específicas para cada tumor, esta poderia destruir pequenos focos tumorais após cirurgias oncológicas.

2.5.2 Quimioterapia

A quimioterapia foi introduzida como tratamento do câncer no final da 4^a e início da 5^a década do século passado. Observou-se desde então, que em sua grande maioria, os quimioterápicos apresentam alta toxicidade também contra as células normais, o que limita sua dose e, conseqüentemente, diminuiu seus efeitos tumoricidas. Mais de 90% das curas por agentes oncológicos ocorrem em menos de 10% dos tipos de câncer (DeVita 1991)

As drogas quimioterápicas destroem principalmente as células tumorais em replicação, através de alvos metabólicos do processo de divisão celular. Um tumor considerado altamente proliferativo não apresenta mais do que 20% de suas células em replicação. Em um determinado momento, cerca de 80% da massa tumoral pode ser resistente a algum tratamento baseado no processo de divisão celular. Para tentar superar parcialmente este fato, na maioria dos esquemas de tratamentos quimioterápicos a dose total dos medicamentos é fracionada em múltiplas doses (Buzzoni et al. 1991).

2.5.3 Radioterapia

Os efeitos da radiação ocorrem de maneira randômica e podem ser diretos ou indiretos. O principal alvo da radioterapia é a lesão do DNA mas esta, também pode lesar as células pela produção de radicais livres ou ação sobre a membrana celular. A radioterapia baseia-se no emprego de radiação ionizante com o objetivo de causar necrose, apoptose, envelhecimento, diferenciação terminal ou perda da capacidade replicativa do tecido tumoral. A dose de radiação empregada expressa a interação da energia absorvida por unidade de massa de tecido. Atualmente emprega-se a unidade Gray, que equivale à energia de 1 Joule por quilograma. O objetivo principal da radiação ionizante é a lesão da estrutura do DNA. Pode ocorrer dano letal ou potencialmente reparável. A radiação ionizante também pode reagir com moléculas de água, produzindo radicais livres tóxicos para as células tumorais e normais. O efeito da radiação depende da fração de células sobreviventes após cada dose. Este número depende da eficiência do tumor em reparar o dano celular e replicar para repor as células lesadas. Existem diversos modelos de curva de sobrevivência que tentam prever a porcentagem de células que sobrevivem a cada dose de radiação.

2.6 IMUNOTERAPIA CONTRA O CÂNCER

O maior objetivo da imunoterapia é ser capaz de erradicar o tumor com o mínimo risco de dano aos tecidos normais que expressam os mesmos antígenos. Vários fatores ainda estão sendo estudados e influenciam decisivamente o resultado da imunoterapia e são: rota da imunização, vetor, esquema, dose, tipo de antígeno, veículo e outros.

Várias modalidades de imunoterapia têm sido empregadas em protocolos clínicos contra o câncer. Apesar de alguns resultados bastante promissores, a grande maioria tem sido desapontadora. Uma das explicações decorre do fato de que estes tratamentos são empregados em pacientes que já receberam outros tratamentos e não responderam a todas possibilidades já estabelecidas, abordadas previamente como cirurgia, quimioterapia e radioterapia. Não raro, são pacientes terminais, desnutridos e com o sistema imunológico comprometido. Mesmo quando respondem a antígenos comuns como toxoide tetânico, influenza ou BCG, esta resposta deve-se à memória imunológica. Frequentemente estes pacientes já não são mais capazes de gerar uma nova e potente resposta contra antígenos tumorais. Além disto o microambiente tumoral é imunossupressivo necessitando de respostas ainda mais potentes (MOCELLIN et al. 2001; RIVOLTINI et al. 2002; WHITESIDE 2002).

Uma etapa essencial para o desenvolvimento e avaliação de imunoterapias contra o câncer é a demonstração de sua eficácia em um modelo experimental. Para tanto, o modelo experimental deve ser otimizado para que o resultado da imunoterapia não seja afetado por fatores adversos a sua metodologia e principalmente tente mimetizar com a máxima precisão a situação humana.

2.6.1 Vetores virais

Uma das maneiras de apresentar antígenos para que sejam processados pelo sistema imunológico é através de vetores virais. A aplicação de vírus para a imunização contra doenças infecto-contagiosas é empregada com sucesso há décadas e usando-se o vírus vaccinia foi-se capaz de erradicar a varíola (SMITH e VANDERPLASSCHEN 2002). Um dos métodos mais bem estudado para o

desenvolvimento de vacinas contra o câncer é a manipulação de vetores virais, conforme mostrado na Figura 2. Os vírus da família poxvírus, particularmente o vaccinia vírus é um dos mais bem caracterizados e apresenta as seguintes vantagens: aceita DNA exógeno de grande tamanho, apresenta a replicação precisa, fácil manipulação, permite modificações pós-transducionais como glicosilação e principalmente, é um potente imunógeno, ativando o sistema imunológico contra sua presença e conseqüentemente contra os antígenos dos genes que carrega (MOSS 1996). Após a infecção celular a montagem do vírus vaccinia é um processo complexo que resulta em duas formas: o vírus intracelular maduro e o vírus extracelular envelopado. Uma forma intermediária chamada vírus intracelular envelopado induz a polimerização da actina que propõe a unidade viral em direção à membrana plasmática onde o vírus é liberado para o meio extracelular para infectar novas células. A proporção entre as formas envelopadas ou não e a quantidade de partículas virais infectivas, que são realmente produzidas, dependem do tipo celular e da cepa viral (SMITH e McFADDEN 2002).

A co-apresentação de um fraco imunógeno como o CEA com um potente imunógeno como o vírus vaccinia representa uma boa alternativa para se obter uma resposta imunológica anti-CEA para a imunoterapia de tumores. O vírus vaccinia é altamente imunogênico e estimula tanto uma resposta humoral como celular (KANTOR et al. 1992).

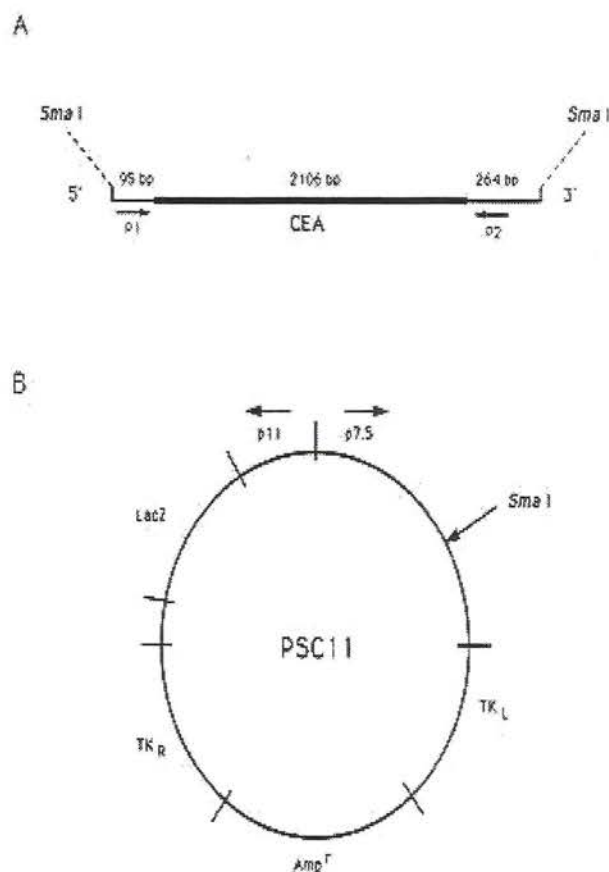


Figura 2 - A - Esquema do cassete com o gene do CEA, utilizado para a construção do plasmídeo PSC 11-CEA.

B - Esquema do plasmídeo PSC 11, mostrando o sítio de restrição SmaI, para inserção de um segmento de um gene exógeno, este está justaposto ao promotor do gene *p7.5* de expressão precoce do vírus vaccinia. O gene do CEA foi inserido nesta posição para construir o PSC 11-CEA. O gene *LacZ*, codificando *B*-Galactosidase está sob regulação do promotor de *P11*. Ambos os genes estão entre os segmentos direitos e esquerdos do gene viral da Timidina-quinase (TK).

Um dos inconvenientes deste vetor é ser muito imunogênico desencadeando a formação de grandes quantidades de anticorpos neutralizantes o que rapidamente inativa doses adicionais de reforços. Uma maneira eficaz de driblar estes obstáculos é o uso de vírus atenuados por múltiplas deleções como a cepa vaccinia New York (NYVAC). Nestes casos o vírus é infectivo, mas não replicativo. Outra opção

interessante é alternar diferentes vetores virais, carregando o mesmo antígeno tumoral ou mesmo o emprego de vírus de aves como fowpox e canarypox. Estes últimos são capazes de infectar células humanas, mas são incapazes de replicar em mamíferos sendo ótimos vetores para a entrega de genes de antígenos tumorais em células apresentadoras de antígenos (PAOLETTI 1996). Uma desvantagem destes últimos é que seriam menos imunogênicos o que também poderia ser uma vantagem, dependendo dos objetivos da imunização e do gene que carrega.

2.7 COMPARTIMENTALIZAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO (SISTÊMICO E MUCOSO)

O conceito de sistema imunológico mucoso compartimentalizado do ponto de vista indução e efetor, se refere a um sistema de defesa específico, operando nas superfícies mucosas, de alguma maneira independente imunologicamente dos sítios sistêmicos. A estimulação antigênica mucosa local pode gerar três tipos de resposta. Uma resposta local e à distância de mesma magnitude; alta resposta local com baixa resposta sistêmica; e, alta resposta sistêmica com baixa resposta local. Também é descrita uma resposta local simultânea com outro sítio a distância sem resposta sistêmica como resposta na mucosa nasal após imunização intravaginal sem resposta sistêmica mensurável. Grande parte dessas respostas são decorrentes da recirculação de linfócitos e células apresentadoras de antígenos (HANEBERG et al. 1994; MESTECKY et al. 1994; HOPKINS et al. 1995; MOWAT e VINEY 1997).

A mucosa é a maior porta de entrada para o nosso corpo. O conteúdo alimentar e fecal que mantém íntimo contato com a mucosa do trato gastrointestinal

apresenta grande concentração de patógenos que devem ser barrados pela mucosa (Clark et al. 2003). Os mecanismos que controlam e impedem a invasão destes patógenos devem ser precisos e eficientes, porque muitos destes patógenos apresentam grande capacidade para a colonização e invasão do tecido mucoso. Ao mesmo tempo, o intestino está exposto a enormes quantidades de antígenos da dieta que devem ser tolerados e absorvidos. Mais de 60% de nosso tecido linfóide está distribuído na mucosa intestinal, que é considerada o nosso maior órgão linfóide, densamente povoado por diversas células do sistema imunológico (McGHEE et al. 1992). A superfície mucosa do trato gastrointestinal e respiratório tem uma área superior à 400m² (NEUTRA et al. 1996). Ainda não está completamente claro como o tecido linfóide associado ao intestino é capaz de diferenciar patógenos dos alimentos, mas existem indícios de que funcione com certa independência do sistema imunológico sistêmico, podendo ser muito flexível e rigoroso ao mesmo tempo (FUJIHASHI et al. 2001).

O desenvolvimento de tolerância ou imunidade mucosa requer a colaboração coordenada da expressão de diversos genes que codificam a produção de citocinas e molécula co-estimulatórias presentes no tecido linfóide associado à mucosa (mucosa associated lymphoid tissue (MALT)). Um típico folículo intestinal tem uma zona periférica rica em células B com um centro germinativo. É separado do epitélio por uma camada composta de células B, linfócitos CD4⁺, células dendríticas e macrófagos. Estes folículos agregados e organizados são separados dos adjacentes por uma zona interfolicular rica em linfócitos T. São os linfócitos T os responsáveis pelo estabelecimento e manutenção da tolerância que é dependente dos tipos de citocinas secretadas no momento da apresentação e processamento dos antígenos. Se

forem secretadas citocinas da resposta Th1(IFN- γ e IL-2) gerar-se-a imunidade e possível citotoxicidade, e caso seja tipo Th2(IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) gerar-se-a tolerância. Apesar desta polaridade já ser bem estabelecida, não é a regra. Existem respostas mistas Th1/Th2, respostas alérgicas e diversos outros fatores que influenciam na maneira de apresentação antigênica. Esta zona interfolicular é também rica em vasos que facilitam a recirculação de células e a migração para sítios efetores locais e distantes. Independente do tipo de resposta imunológica que será gerada, o primeiro passo é o transporte dos antígenos pela barreira epitelial. Todos os epitélios estão envolvidos em diferentes graus no processo de se obter amostras do meio externo para o sistema imunológico, ao mesmo tempo em que mantêm uma barreira seletiva (SHANAHAN 2000; LIANG et al. 2001). Como são grandes áreas expostas, os epitélios e mucosas são capacitados a desencadear uma resposta imunológica inicial se sua integridade for ameaçada por patógenos ao mesmo tempo em que desencadeiam uma resposta sistêmica (KRAEHENBUHL et al. 1997).

Células epiteliais apoptóticas podem ser fagocitadas por células dendríticas da mucosa gastrointestinal e processadas em tecidos linfóides mucosos (placas de Peyer) ou mesentéricos (linfonodos) e serem reapresentadas para o sistema imunológico. Estas células podem apresentar o CEA em seus corpos apoptóticos. Nesta situação o CEA poderia ser apresentado em um contexto de imunogenicidade ou tolerância (HUANG et al. 2000).

Os pólipos gastrintestinais são neoplasias benignas, que podem apresentar focos de malignização, por atipias na arquitetura tecidual. Estes pólipos degenerados são tecidos com crescimento relativamente anárquico, apresentando uma histologia desorganizada e fora dos padrões de lâminas. O cólon normal apresenta lâminas de

tecido mucoso, submucoso, muscular próprio, muscular e seroso de espessuras proporcionais. Estes tecidos costumam ser heterogêneos apresentando áreas de alto grau de proliferação, áreas de involução e necrose muito próximas. Estas anormalidades podem alterar o equilíbrio de tolerância ao CEA. Pode-se induzir maior tolerância se o mesmo for superexpresso e eliminado na luz intestinal “sendo interpretado como alimento” bem como pode ser também super expresso nos pólipos onde geraria tolerância como um auto-antígeno. Existe também a possibilidade de no pólipo ocorrer necroses setoriais com processo inflamatório e indução de lise celular e também corpos apoptóticos com altas concentrações de CEA. Este CEA poderia ser fagocitado por células dendríticas e apresentado em um contexto de imunogenicidade.

Vários experimentos em modelos animais têm demonstrado que a rota de imunização é uma questão importante para a otimização de vacinas afetando diretamente o tipo de resposta imunológica obtida (EGGERT et al. 1999; FONG et al. 2001).

A barreira epitelial mucosa varia muito em seus diversos tecidos no corpo quanto a sua organização celular bem como suas estratégias de avaliação e processamento de antígenos presentes dentro da sua luz. Em mucosas, as células dendríticas migram até o limite externo do epitélio, endocitam amostras para processamento e posterior apresentação local ou em tecidos linfóides organizados a distância. Em epitélios mucosos simples como o gastrointestinal, esta tarefa é feita pelas células M que fagocitam material do lume e transportam por via trans-epitelial para tecidos linfóides organizados na mucosa que iniciam a resposta imunológica (NEUTRA et al. 1996). As células dendríticas mucosas depois de pulsadas com

antígenos e maduras podem migrar para linfonodos e tecidos distantes para cumprir o seu papel de células apresentadoras de antígenos. Elas ativam linfócitos que iniciam uma replicação clonal contra os antígenos, contra os quais foram ativados. Esta célula dendrítica que migrou para sítios efetores a distância pode ser substituída por novas células dendríticas da medula óssea o que ocorre a cada 2 dias em um processo contínuo (HOLT et al. 1994). Grande número de respostas imunológicas geradas no intestino são processadas nas placas de Peyer (Farstad et al 1994). Este tecido imunológico organizado é composto por linfócitos B e T, células dendríticas e alguns macrófagos. A maioria dos linfócitos é CD4⁺ e praticamente não apresentam receptores gama/delta como os típicos linfócitos intraepiteliais. O restante é composto por linfócitos CD8⁺ (JUMP e LEVINE 2002).

Vários vírus e bactérias podem usar as células M ou células dendríticas como via de invasão e disseminação bem como invadir qualquer outro tipo celular por vias ativas de interiorização. Após serem endocitados podem ser transportados para outros locais onde destroem as células que o fagocitaram e disseminam, gerando uma infecção sistêmica (SANSONETTI e PHALIPON 1999).

BERZOFSKY et al. (2001) tem mostrado que a imunização mucosa poderia sobrepujar uma imunidade sistêmica prévia. Ele hipotetizou que após a imunização sistêmica com vetores virais, os tecidos imunológicos mucosos permaneceriam virgens, sendo, portanto, passíveis de uma segunda imunização por via mucosa (BELYAKOV et al. 1999). Seus resultados também mostraram uma independente compartimentalização do sistema imunológico mucoso versus sistêmico com um tráfego de células imunológicas assimétrico entre estes sistemas. Ele preconizou que a imunização mucosa permitiria que células *naive* do sistema mucoso pudessem ser

imunizadas com subsequente migração dos locais de indução antigênica mucosa para a circulação linfóide sistêmica com conseqüente imunidade sistêmica. Ele também preconizou que a migração inversa seria pouco provável e que os sítios de indução imunológica mucosos poderiam permanecer virgens após a imunização sistêmica. Todo este fluxo de apresentação e processamento de antígenos à migração destas células bem como a ativação e fluxo de células imunológicas está mostrado de maneira esquemática na Figura 3. Nesta figura vemos que a resposta imunológica pode ser processada em um sítio mucoso, apresentando disseminação sistêmica através da migração de células apresentadoras de antígenos bem como linfócitos efetores. A migração oposta no sentido sistêmico para o mucoso também seria possível, conforme mostrado nesta mesma figura, contradizendo parcialmente as conclusões de BERZOFSKY et al. (2001).

Uma grande aplicação clínica para este conceito de que a migração inversa seja provável seria a possibilidade de se empregar o vírus vaccinia com maior eficiência para se imunizar pacientes acima de 40 anos. A imunização contra a varíola persistiu em algumas áreas até a década de 70 e era feita com o vírus vaccinia. As pessoas previamente imunizadas já teriam anticorpos neutralizantes contra o vírus vaccinia e qualquer imunização sistêmica posterior, utilizando-se este vetor, seria rapidamente neutralizada e menos eficaz. Neste contexto, estes pacientes previamente imunizados poderiam ainda se beneficiar de novas imunizações com vetores da família dos poxvírus utilizando-se outra via como a mucosa por teoricamente ainda serem sítios imunológicos não virgens.

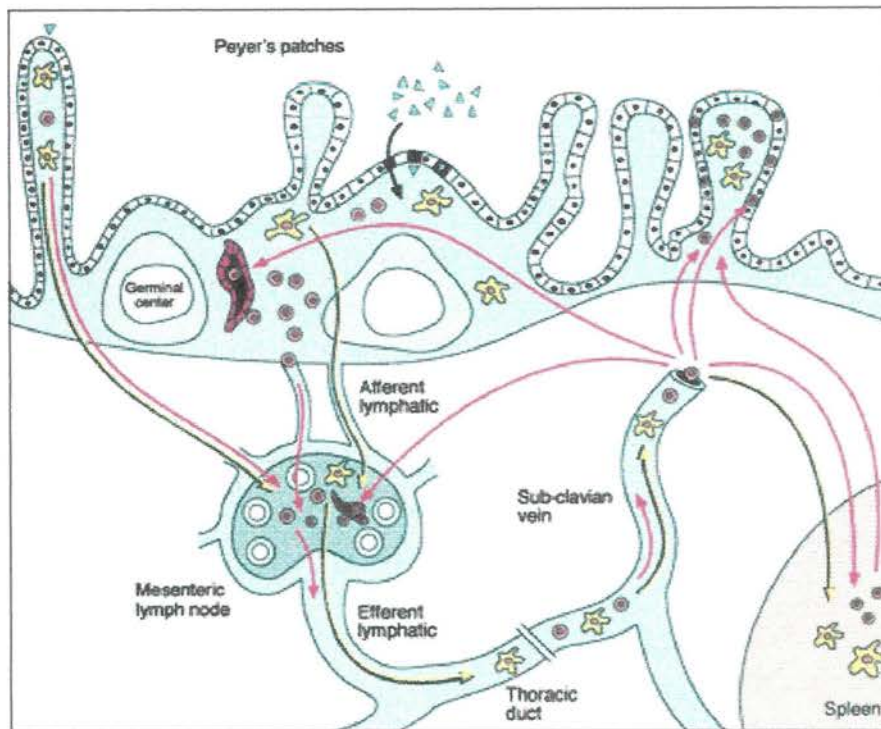


Figura 3 - Fluxo de células imunológicas apresentadoras de antígenos e efetoras entre o sistema imunológico mucoso e sistêmico proposto por NEUTRA et al. (1996). Células redondas são linfócitos e células estreladas são células dendríticas. A figura mostra que tanto linfócitos como células dendríticas podem transitar livremente da mucosa para os demais órgãos, mas que não ocorreria fluxo de células dendríticas do baço para a mucosa, apenas linfócitos trafegariam neste sentido.

Existem várias vias para a imunização mucosa como a intranasal, intra-retal, gástrica, intestinal, vaginal e pulmonar. Todas estas vias têm sido comparadas, mas as respostas obtidas e as variações entre os diversos resultados não são conclusivas. MORENO-FIERROS et al. (2000) mostra que a imunização intranasal seria mais potente do que a vaginal, oral ou retal para gerar resposta imunológica e anticorpos no trato genital. Já a rota oral tem se mostrado inefetiva na maioria das vezes por induzir tolerância ou resposta imunológica limitada e de curta duração (JACKSON et al. 1993). Estes resultados mostram que este ainda é um assunto polêmico e pouco

estudado. Não existem grandes séries ou trabalhos de diferentes instituições e grupos para serem comparados, e poucas conclusões podem ser consideradas definitivas.

Um dos grandes objetivos para o desenvolvimento de vacinas é a possibilidade de um reforço com doses subseqüentes para gerar uma amplificação da resposta contra um antígeno específico. Isto poderia ser obtido utilizando-se um mesmo vetor, mudando-se a via de imunização ou mudando-se o vetor e mantendo-se o mesmo antígeno ou via.

Merece ser mencionado, que apesar de não ser consenso, existem raros relatos de que os enterócitos também seriam capazes de endocitar antígenos e apresentá-los como células apresentadoras de antígenos em um contexto ainda não esclarecido (KAISERLIAN et al. 1989; MAYER et al. 1992).

Entre as várias vias de imunização a via intra-retal pode ser uma das que merece ser mais profundamente estudadas, principalmente para tumores do trato digestivo. Se a tolerância contra os antígenos tumorais for induzida no trato digestivo, este poderá ser o primeiro lugar a ser imunizado para se quebrar esta tolerância (RYAN et al. 2001).

2.8 TUMORES DE CÓLON

A iniciação e progressão do câncer são sabidamente conhecidos como um processo que ocorre em etapas. Pela sua gradual evolução para a malignidade os tumores de cólon podem servir como excelentes exemplos para se estudar os genes e processos envolvidos na transformação maligna. Os tumores de cólon são uma importante causa de mortalidade e morbidade em todo o mundo. A forma mais

comum é o câncer polipóide esporádico. Informações importantes para um melhor conhecimento e desenvolvimento de tratamentos mais otimizados podem ser obtidos, estudando-se a rara e hereditária forma de tumores de cólon autossômica dominante denominada, Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) (FICARI et al. 2000).

Pacientes com FAP nascem normais e durante a adolescência desenvolvem até milhares de pólipos no intestino grosso que progressivamente progridem para adenocarcinomas. Esta síndrome é decorrente de uma mutação na linhagem germinativa localizada no cromossomo 5, braço 5q21 (YANG et al. 1997). Após esta transformação inicial, muitos outros genes são envolvidos em diferentes estágios da carcinogênese dos tumores de cólon como o *Apc*, *K-ras*, *DCC* e *p53*. Entre todos, uma mutação no gene *Apc* (adenomatosis poliposis coli) tem um papel especial por estar diretamente envolvido nos processos iniciais de transformação de adenoma para adenocarcinoma por ter um papel crucial na formação dos pólipos. Observa-se em muitos casos de tumores colo retais esporádicos mutações neste gene. Isto sugere uma participação deste gene em tumores familiares e esporádicos. Vários outros genes foram e estão sendo identificados por participarem ativamente deste processo de carcinogênese. Uma interação importante é entre os genes relacionados com a adesão celular, *b-Catenina* / *e-caderina* e o *Apc* (TUCKER et al. 2003). A *b-catenina* intracelular é regulada pela formação de um complexo com a proteína *Apc*. A hiperativação deste processo com acúmulo da proteína *b-catenina* no citoplasma está relacionada com o desenvolvimento de adenocarcinomas coloretais e pode ser decorrente de mutação do gene oncosupressor *Apc* ou mutação ativa no Éxon 3 do gene *b-catenina* (TAKEI et al. 2003). Já a translocação nuclear do gene *b-catenina*

pode estar relacionada com um genótipo que potencializa a capacidade de invasão das células neoplásicas (VALENTINI et al. 2003).

2.9 MODELOS ANIMAIS

Em humanos é muito difícil realizar um estudo detalhado, devido a dificuldade de acompanhar todo o processo do início até a progressão do câncer colo retal. Além das restrições éticas, as variações fenotípicas, genotípicas, do ambiente e hábitos alimentares seriam grandes fatores de confusão. O estudo da carcinogênese tumoral, sua progressão, os genes envolvidos em cada etapa e principalmente quais e como os produtos destes genes interagem para influenciar na progressão tumoral ainda não são bem conhecidos. Atualmente uma das melhores maneiras de controlar todas as variáveis e poder manipular todos os fatores de interesse é através de experimentos em animais.

Contudo, o estudo em animais de experimentação embora permita grandes manipulações e o emprego de grandes séries com significado estatístico, apresentam ainda diversas restrições, tornando os resultados muitas vezes pouco expressivos e de complexa extrapolação para os estudos do câncer em humanos.

Em modelos com implante de tumores, estes tumores são cirurgicamente inseridos em um contexto inicialmente artificial que em seguida inicia um processo de interação com o micro-ambiente semelhante aos tumores esporádicos já estabelecidos. Muitas das relações tumor hospedeiro são anormais já que não ocorreram os processos iniciais de carcinogênese. As relações do tumor com o microambiente ao seu redor foram iniciadas subitamente no momento do implante e

estabelecidas e amadurecidas após este momento já tardio do processo de carcinogênese. Mesmo assim, estes modelos apresentam grande importância científica e são muito utilizados por diversos fatores. Podemos selecionar em qual órgão vamos implantar o tumor, inclusive de maneira ortotópica. Podemos implantar diversas linhagens tumorais bem como definir o número e as condições das células tumorais a serem implantadas.

Nos modelos com tumores induzidos quimicamente, estes agentes desencadeiam diversos processos patológicos, subvertendo a relação do tumor com o hospedeiro, sendo um deles a carcinogênese que desencadeia o tumor desejado. Podem existir outras alterações teciduais, metabólicas e imunológicas não desejadas que poderiam subverter resultados obtidos nestes animais. Estes animais apresentam múltiplas mutações gênicas e a precisa relação entre a indução e progressão tumoral não é bem conhecida para muitos deles. Uma grande aplicação destes modelos é o estudo de carcinóides ambientais que também desencadeiam outros processos.

Tumores de origem viral são comuns a expressão de antígenos tumorais únicos, tornando-os um alvo preciso para o sistema imunológico. Estes são excelentes modelos para os estudos de tumores, associados ao vírus da imunodeficiência humana adquirida, hepatite C, papilomavírus e outros. Também deve ser mencionado que as relações tumor/hospedeiro, nestes casos, também são diferentes de tumores de origem espontânea.

Os modelos animais ideais para estudos controlados de carcinogênese parecem ser aqueles gerados geneticamente em que suas funções biológicas estão menos manipuladas. Estes animais podem ter genes homólogos a genes humanos, estes sendo manipulados tornariam seus resultados mais relevantes. Os

camundongos apresentam um gene homólogo ao *Apc* humano. Através de manipulação genética de células tronco germinativas de camundongos C57BL/6, foi introduzido um gene com atividade fosfotransferase que confere resistência ao antibiótico neomicina. Este gene foi inserido em um sítio de restrição para *Sma*I, localizado no Éxon 15 do gene *Apc*. Este sítio correspondente ao códon 1638 do cDNA do gene *Apc*, conforme mostrado na Figura 4. Estas células tronco quiméricas foram introduzidas em blastócitos de animais de mesma linhagem que expressavam este gene mutante quando adultos, com transmissão mendeliana (FODDE et al. 1994). Quando o DNA mutante é transcrito, este produz um mRNA que codifica a produção de uma proteína mutante de 1660 aminoácidos, sendo os primeiros 1638 homólogos a proteína codificada pelo gene *Apc* normal. Não existem evidências de que seja uma proteína truncada, mas possivelmente muito instável (FODDE et al. 1994). Este modelo animal passou a ser designado *Apc* 1638 e apresentava o desenvolvimento espontâneo de tumores no trato gastrointestinal (YANG et al. 1997). É um dos únicos modelos animais onde o tumor se inicia de estágios pré-malignos como hiperplasia polipóide e plana com atipias simples, o que representa um marcador precoce da carcinogênese do trato gastrointestinal. Estas lesões evoluem para múltiplos adenomas e adenocarcinomas com comportamento semelhante ao observado em humanos.

Os modelos manipulados geneticamente como o *Apc* 1638 descrito acima são muito importantes para o estudo da carcinogênese, mas são imprecisos para protocolos que empregam a imunoterapia para tratar o câncer. Como a imunoterapia para tratar tumores deve ser a mais precisa e específica possível, necessita de um alvo conhecido como antígenos associados ao tumor (TAA). A maioria das abordagens

de imunoterapia contra o câncer utilizam procedimentos tecnicamente complexos e de alto custo buscando uma maneira efetiva de tratar tumores em humanos. Portanto, também nestes modelos, o alvo da imunoterapia deve ser um antígeno também presente em tumores humanos para facilitar a pesquisa translacional. Para tantos existem diversos modelos animais geneticamente modificados para expressarem antígenos humanos.

O modelo Apc 1638 apresenta muitas semelhanças com outros modelos animais de tumores do aparelho digestivo como os camundongos Min. Estes dois modelos desenvolvem pólipos espontâneos em todo o trato digestivo, evoluindo de hiperplasia para adenomas e adenocarcinomas. O modelo Apc apresenta duas grandes vantagens sobre os animais Min: a primeira é sua expectativa de vida. Apesar de ambos os modelos morrerem por complicações de múltiplos pólipos e tumores do trato digestivo, os animais Min morrem em menos de 120 dias enquanto os animais Apc sobrevivem por mais de um ano. Esta longa sobrevivência permite que os animais Apc 1638 possam ser usados em prolongados experimentos terapêuticos e imunológicos. A segunda vantagem já mencionada é que o modelo Apc 1638 é gerado pela inserção de um cassete que gera uma proteína mutada que inativa o gene Apc. Ao contrário, o camundongo Min foi gerado por indução química com Etil Nitroureia que induz uma *stop mutation* no códon 850 do gene Apc (SU et al. 1992).

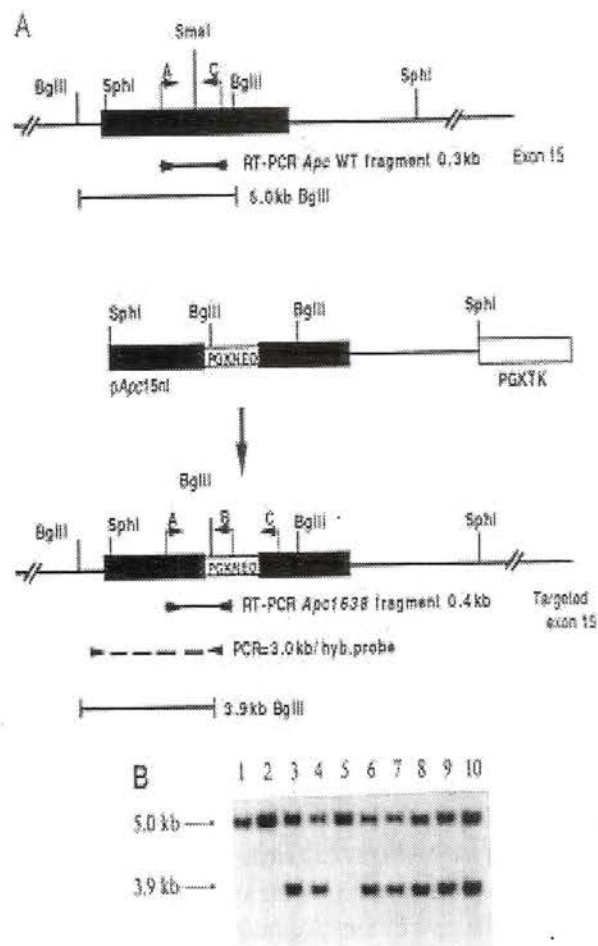


Figura 4 - A - Esquema da modificação do gene murino *Apc*. As linhas espessas representam o Éxon 15 e as linhas finas, seqüências não codificantes. O alelo *Apc* mutante é representado pelo segmento A-B associado à inserção do gene *pgkneo* e o normal (selvagem) pelo segmento A-C.

B - Análise de Souther Blot mostrando o gene *Apc* mutado com o tamanho molecular de 3,9 kb e o não mutado de 5,0 kb. Os animais 3, 4, 6, 7, 8, 9 e 10 são heterozigotos, apresentando um alelo *Apc* normal e outro alelo recombinado.

Muitos dos modelos de carcinogênese animal induzidos por produtos químicos induzem a formação de tecido neoplásico, mas também a produção de proteínas unicamente expressas no tecido tumoral. Estas proteínas tornam o modelo menos próximo do natural já que podem ser imunogênicas e podem induzir resposta contra o tecido tumoral.

Em humanos são raros os casos de antígenos tumorais exclusivos como nos tumores induzidos por vírus e agentes carcinóides, sendo ainda pouco descritos para tumores espontâneos. Devem ser mencionados alguns exemplos como o câncer de cólon de útero e as diversas cepas de HPV bem como a leucemia mielóide crônica.

Decidimos trabalhar com o CEA como antígeno tumoral por estar expresso na grande maioria dos tumores do trato digestivo e alguns outros. Entretanto, em camundongos não se conhecem nenhum gene homólogo ao CEA ou proteínas semelhantes. Foi então criado o camundongo transgênico para o Antígeno carcinoembriogênico humano. Um fragmento de 32,6 kb, contendo o gene completo do CEA humano e as seqüências do flanco foi isolado e inserido em células germinativas de camundongos da linhagem C57Bl/6 (EADES-PERNER et al. 1994; CLARKE et al. 1998). Foram integradas 19 cópias do gene do CEA em um único cromossomo. Estes camundongos passaram a expressar o CEA humano em células da língua, esôfago, estômago, intestino delgado, cólon, ceco e traquéia. Por um curto período embrionário foi detectado na uretra, pulmão e núcleo pulposo da coluna vertebral o que pode estar relacionado com uma das possíveis funções biológicas do CEA a *anoikis*, processo que regula a migração e correto posicionamento celular em cada tecido. Também apresentavam CEA nas fezes não sendo detectado no soro.

Estes resultados mostraram que a expressão do CEA e suas propriedades nos tecidos apresentavam a mesma distribuição espaço-temporal observada em tecidos humanos. Estes animais também apresentavam CEA em tecidos normais como em humanos sendo um ótimo modelo para se avaliar os efeitos colaterais como auto-imunidade de qualquer imunoterapia tendo o CEA como alvo. Pôde-se concluir que a transferência do gene do CEA continha todos os elementos regulatórios para a correta produção do CEA.

Mesmo os camundongos não tendo este gene, apresentavam o repertório completo de fatores de transcrição necessários para que conservassem uma mesma expressão entre humanos e camundongos (EADES-PERNER et al. 1994). O CEA passou a ser também um auto-antígeno como são a grande maioria dos antígenos tumorais. Nestes animais a geração de antigenicidade contra o CEA é mais difícil do que em humanos já que eles expressam o CEA em maior concentração (GUADAGNI et al 1997). Em humanos os valores normais do CEA sérico estão entre 2 e 5 ng/ml, já nestes animais o valor sérico do CEA chegou a atingir 60 ng/ml, ou o mesmo do que em pacientes já com tumores de cólon muito avançados e com alta expressão de CEA (KASS et al. 1999).

Para o estudo e desenvolvimento da imunoterapia de tumores é desejável um animal que tenha predisposição genética para desenvolver tumores espontâneos e apresente um antígeno tumoral relevante passível de emprego em imunoterapia em humanos. Este antígeno deve estar expresso em maior concentração nos tecidos tumorais, mas também deve ser encontrado em tecidos normais.

3 OBJETIVOS

- 1 Avaliar a capacidade da imunização venosa e mucosa intra-retal com um vetor viral recombinante construído com o gene do CEA humano, de gerar resposta imunológica específica contra o produto deste gene.
- 2 Avaliar compartimentalização do sistema imunológico, através da resposta sistêmica à imunização mucosa e resposta mucosa à imunização sistêmica.
- 3 Gerar um modelo murino híbrido knock-out para o gene Apc e transgênico para o CEA humano e fazer sua caracterização morfológica, fisiológica e imunológica.
- 4 Especificar a resposta imunológica induzida pela imunização em animais transgênicos Apc, CEA e Apc/CEA comparando-se com camundongos normais C57Bl6.
- 5 Quantificar a disseminação viral no sangue, baço, placas de Peyer e ovários após a imunização mucosa e sistêmica.
- 6 Determinar o grau de proteção induzido pela imunização intra-retal e intravenosa contra tumores CEA positivos e negativos implantados no subcutâneo.
- 7 Avaliar se a presença de tumores CEA + e CEA - potencializa, inibe ou não afeta a resposta imunológica à imunização.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

- Cromo radioativo - $\text{Na}_2[^{51}\text{Cr}]\text{O}_4$ (Amersham Corp., Arlington Heights, IL)
- Solução para lise de eritrócitos (Sigma)
0.15 M NH_4Cl ,
10 mM KHCO_3 ,
0.1 mM Na_2EDTA .
- CEA proteína ultrapura (International Enzymes, Fallbrook, CA)
- CEA proteína ultrapura (Sigma)
- Anticorpo policlonal ovino conjugado a peroxidase(HRP) contra IgG murino (Amersham Corp., Arlington Heights, IL).
- Meio completo- (Gibco BRL, Grand Island, NY),
DMEM
10% Soro fetal bovino (GIBCO),
2mM L-glutamina,
Penicilina (100 unid/ml) e estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$),
10mM de Aminoácidos não essenciais,
 5×10^{-5} M de 2-mercaptoetanol .
- Solução de digestão para extração de DNA genômico(Solução 1)
Proteinase K 0,7mg/ml (Sigma)

0,1 M Tris (pH 8.0)

0,01 M EDTA

0,5% Tween 20

- Solução tampão de inibidores de proteases para reação de Western Blot (Solução 2)

1 ml NaCL 400mM

10 mM tris Cl pH 7.6

1 mM EDTA pH8.0

Fenil Metil Sulfonil Fluoride 20 ug/ml (Sigma)

Aprotonina 1ug/ml (Sigma)

Leupeptina 10 ug/ml (Sigma)

Pepstatina 10 ug/ml (Sigma)

- Água nanopura (Sigma)
- Clorofórmio (Sigma)
- Fenol(Sigma)
- Etanol(Sigma)
- Triton x 100 (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA,USA)
- Anticorpo monoclonal murino contra CEA humano COL-1 (Zymed, South San Francisco,CA,USA)
- Anticorpo policlonal de coelho anti-camundongo conjugado com peroxidase (Jackson Immune Research Laboratories, West Grove, PA, USA).
- Taq polimerase e Kit para PCR

4.2 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

- Placas de 96, 48, 24, 12 e 6 poços com fundo em U ou V (Corning Inc., Acton, MA)
- Frascos para cultura de células T150, T75, T25, T12,5 (Corning Inc., Acton, MA)
- Pipetas de 1, 5, 10 e 25 ml (Corning Inc., Acton, MA)
- Ponteiras para pipetas
- Pipetas automáticas (Eppendorf)
- Instrumental cirúrgico
- Imobilizadores plásticos para camundongos (Fisher)
- Gamma scintillation counter (Wallac, Turku, Finland).
- Leitor automático de ELISA (Bio-Rad Lab., Hercules, CA)
- Filme de Raio X (Eastman Kodak Company, Rochester, NY)
- Filme de nitrocellulose (Hybond, Amersham, Arlington heights, IL, USA)
- Membrana de PVDF (Milipore Corporation, Bedford, MA, USA)
- Aparelho para transferência semi-seca de membrana (Bio-Rad, Richmond, CA, USA).
- Citometria de fluxo FACScan Scalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA)
- Citometria de fluxo FACS Vantage SE para separação celular (Becton Dickinson, San Jose, CA)
- Kit Hemocult para a pesquisa de sangue oculto nas fezes (Beckman Coulter, Palo Alto, CA, USA)

- Microscópio invertido (Nikon)
- Microscópio regular (Nikon)
- Microscópio de fluorescência (Nikon)
- Câmera fotográfica digital (Nikon)
- Cabine de fluxo laminar
- Incubadora digital
- Centrífuga
- Microcentrífuga
- Estufa
- Agitador
- Balança
- Termoregulador para PCR
- Leitor ultravioleta
- Sonicador
- Freezer -80°C
- Tanque para congelamento em nitrogênio líquido.

4.3 LINHAGENS TUMORAIS

Todas as linhagens celulares e linfócitos foram cultivadas em meio DMEM completo com 10% de soro fetal bovino, 2nM L-glutamina, aminoácidos não essenciais, penicilina (100unid/ml), estreptomicina (100ug/ml) e 5×10^{-5} M 2-mercaptoetanol.

4.3.1 Linhagem para replicação viral (BSC-1, HeLa)

4.3.1.1 BSC-1

É derivada de tecido renal de macacos verdes africanos. É uma linhagem estabelecida e já bem estudada em laboratório sendo susceptível a infecção replicativa de diversos vírus, incluindo a família poxvírus como o vírus vaccinia. Cresce de maneira aderente, porém quando atinge a densidade de confluência onde uma célula toca outras, diminui o ritmo de divisão, chegando a parar a proliferação, quando ocorre a confluência total, ficando em estado de quiescência, por apresentarem inibição de contato. Quando novamente replaqueadas em baixa densidade voltam a dividir.

4.3.1.2 HeLa

Foi a primeira linhagem de tumor humano estabelecido em cultura de maneira contínua e vem fazendo parte da pesquisa do câncer nos últimos 50 anos. É derivada de um câncer epitelióide cervical agressivo de uma mulher negra de 31 anos. É uma linhagem susceptível a infecção por diversos vírus incluindo adenovirus

e a família poxvírus como o vírus vaccinia. Apresenta fácil replicação “in vitro”, crescendo de maneira aderente. Não apresenta inibição de contato.

4.3.2 Tumor de cólon murino CEA negativo (mc-38)

A linhagem tumoral mc-38 é um adenocarcinoma murino gentilmente fornecido pelo laboratório do Dr Steve Rosemberg (National Cancer Institute, Bethesda, Md).

4.3.3 Tumor de cólon murino CEA positivo (mc-32)

A linhagem tumoral mc-32 é uma linhagem derivada da mc-38 obtida através da transdução do gene humano do CEA, utilizando-se o vetor de expressão retroviral pBNC-(ROBBINS et al. 1991). A linhagem celular foi testada quanto à expressão do CEA usando-se o anticorpo monoclonal de camundongo anti CEA humano COL-1 e um anticorpo secundário fluorescente de caprino anticamundongo IgG para detecção pela citometria de fluxo. O nível de expressão de CEA na superfície celular foi comparável ao naturalmente expresso em linhagens de tumores de cólon humano como GEO e CBS (HORIG et al. 2002). A proteína CEA expressa nestas células, apresentava massa molecular semelhante ao CEA humano de 180 kDa e era como esperado muito glicosilada. A seleção e manutenção da linhagem mc-32 era feita através da adição de gentamicina (G-418) ao meio de cultura. A linhagem mc-32 juntamente com o CEA apresentava o gene que conferia resistência a este antibiótico, sendo resistentes. A linhagem mc-38 não apresentava este gene que conferia resistência não se mantendo viável neste meio.

4.4 VETORES

A produção em escala de uso para as vacinas de todos os vetores descritos abaixo foi feita em nosso laboratório, através da infecção máxima de linhagens BSC-1 ou HeLa. Eram plaqueados 1×10^6 células em baixa densidade em frascos de 250 cm^2 com meio completo. Quando as culturas encontravam-se no auge da proliferação e ainda semiconfluentes, o meio era retirado e substituído por novo meio completo, com 1% de soro fetal bovino com 5 partículas virais por célula. O número de células podia ser presumido pela densidade celular em experimentos prévios onde foram plaqueados o mesmo número de células e contadas após 36 horas (tempo médio para a semi-confluência). O inóculo viral era adicionado em um volume mínimo de 12 ml apenas para cobrir as células em cultura. Este pequeno volume era empregado para se obter um lisado celular com maior concentração de partículas virais por volume. Após 24-36 horas de infecção todas as células em cultura já apresentavam os sinais dos efeitos citopáticos do vírus e iniciavam a lise celular. Todo o meio de cultura era coletado juntamente com as células que eram deslocadas mecanicamente do frasco de cultura. Este volume era lisado por 3 ciclos de congelamento a -80°C seguido de aquecimento a 37°C . O volume era então sonicado 3 vezes por 30 segundos para destruição de debris celulares. O produto final era então titulado para se avaliar a concentração de partículas virais infectivas por volume. Esta titulação era realizada em placas de Petri também com a linhagem BSC-1 semiconfluente conforme descrito previamente. O meio destas culturas era removido sendo substituído por novo meio completo com 1% de soro fetal bovino sendo adicionado o meio com o lisado das células infectadas descrito acima nos títulos de $1/10$ a $1/10^{-10}$ com intervalos de

Log1. Após 24 horas cada placa era avaliada sendo contado o número de unidades placas de células infectadas formadas (PFU) que corresponderiam a uma partícula viral infectiva. Havendo concordância entre as diluições o lisado era titulado e tinha sua concentração de partículas virais infectivas ajustadas para 10^8 pfu por ml ou 10^7 pfu/0,1ml que era a dose padrão empregada para as imunizações.

4.4.1 Vaccinia vírus

O Vaccinia vírus foi gentilmente fornecido pelo Dr. Moss (NIAID- Bethesda-MD). Este é um vírus estável para replicação de genes inseridos de grandes dimensões, resultando em eficiente expressão e processamento pós-traducional para a produção de proteínas exógena (SMITH e MOSS 1983). É um vetor seguro, efetivo (KARZON 1995), estável por longos períodos, podendo ser facilmente produzido e aplicado em grandes populações com baixo custo (HENDERSON e ARITA 1985).

4.4.2 Vaccinia vírus transduzido com o CEA

O vírus Vaccinia recombinante com o CEA humano denominado rVac-CEA, foi produzido por recombinação homóloga do plasmídio pSC-11, contendo o gene do CEA humano no gene Timidina quinase do vírus Vaccinia (KAUFMAN et al. 1991; MACKETT et al. 1984). Foi inserido o cDNA do CEA contendo 2.4 kb da região codificante incluindo ambas as regiões não traduzidas 5'e 3'. O gene do CEA humano foi incorporado de maneira estável ao gene da Timidina quinase e controlado pelo promotor do gene p7.5, de expressão precoce do vírus Vaccinia (KANTOR et al. 1992).

Foi testado também o vetor Vaccinia cepa New York (rVNY). Este vetor atenuado pela inserção de um grande gene exógeno no gene da Timidina quinase do vírus vaccinia causa uma deleção quase total deste gene o que resulta em um vetor menos replicativo.

É interessante notar que após a inserção do gene do CEA nestes dois vetores o rVNY-CEA codificava uma proteína do CEA de 90 kd que não era completamente glicosilada. Já o vetor rVac-CEA codificava proteínas relacionadas ao CEA de 180, 90 e 70 kd (KANTOR et al. 1992). Como o CEA naturalmente expresso nas células tumorais apresenta 180 kd, foi optado trabalhar com o segundo vetor denominado rVac-CEA que gerava produtos que continham todos os domínio imunodominante do CEA capazes de gerar imunidade humoral e celular contra esta proteína.

4.4.3 Vaccinia vírus transduzido com o Lac-Z

O vírus Vaccinia recombinante denominado rVac-Lac-Z foi produzido a partir do mesmo vetor descrito acima, utilizando-se a mesma metodologia sendo o gene Lac-Z inserido no gene da Timidina kinase sob controle do mesmo promotor.

4.5 ANIMAIS

Os animais usados no experimento foram da linhagem C57BL/6 (H-2k^b). Os animais transgênicos CEA, knock-out APC1638 e híbridos Apc/CEA foram produzidos no Biotério do Albert Einstein Cancer Center, NY, USA. Estes animais eram mantidos em gaiolas com filtros e acesso livre a água e comida. Nos experimentos de imunização foram usados animais entre 6 e 8 semanas. Pela

dificuldade de produzir grande número de animais foram usados animais de ambos os sexos que foram igualmente distribuídos nos grupos terapêuticos e controle. Para os experimentos com animais padrão C57BL/6 (H-2k^b), eles foram comprados do Charles River Laboratories (Raleigh, NC), sendo fêmeas com idade entre 6-8 semanas.

4.5.1 Animais transgênicos Apc

4.5.1.1 Apc

Os camundongos Apc foram produzidos para se obter um modelo animal de câncer colo retal semelhante a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP). Estes camundongos foram gerados usando um cassete de expressão da neomicina inserido na posição correspondente ao códon 1638 do gene Apc (FODDE et al. 1994).

A inserção do cassete da neomicina na posição correspondente ao códon 1638 do gene APC resultava na produção de uma proteína APC truncada na posição 1638. Esta inserção foi feita em células tronco embrionárias de camundongos C57Bl6 (H-2k^b). O mRNA transcrito do gene APC mutante, quando traduzido produzia uma proteína de aproximadamente 1660 aminoácidos, sendo os primeiros 1638, correspondentes aos codificados pelo gene APC normal. Esta proteína mutante maior que o normal não é estável e conseqüentemente, não funcionante, inativando este gene (YANG et al. 1997).

4.5.1.2 Genotipagem

Como os animais Apc não produziam uma proteína específica estável, sua expressão gênica foi mensurada pela avaliação do gene Apc mutante no DNA

genômico dos animais. Os animais quando completavam 2 semanas eram identificados com amputação podálica dirigida e tinham um pequeno fragmento da cauda ressecada. O dedo juntamente com o fragmento da cauda eram digeridos enzimaticamente com a solução 1 por uma noite a 56°C. A seguir era extraído o DNA genômico com Fenol/Clorofórmio e precipitado com Etanol. A concentração de DNA era medida em espectrofotômetro e normalizada para 1mg/ml sendo congelada a -80°C em água bi-destilada. Era então procedido a reação de PCR padrão para a detecção do gene APC mutante. Para cada reação eram utilizados os seguintes reagentes:

Solução Taq Master	10 µl
Solução tampão B	5 µl
DNTP	4 µl
Primer 1638 A	3,0µl
Primer 1638 B	1,5 µl
Primer 1638 C	1,5 µl
Taq Polimerase	0,5 µl
Água	25,5 µl
Amostra de DNA	1 µl

Eram feitos 30 ciclos com o seguinte esquema:

94°C		Temperatura de início
94°C	1'	Desnaturação
58°C	45"	Anelamento
72°C	30"	Extensão
72°C	7'	Extensão final
4°C	~	Conservação

Eram usados 3 primers, sendo um deles compartilhados pelos demais. O primer A, 5' TGCCAGCACAGAATAGGCTG 3' juntamente com o segundo primer

B, 5' TGGAAGGATTGGAGCTACCG 3' gerava um produto de 300 pares de base que correspondia a um alelo do gene Apc selvagem. O primer C, 5' GTTGTCATCCAGGTCTGGTG 3' juntamente com o primer A gerava um produto de 400 pares de base nos animais Apc positivos que correspondia ao gene Apc mutado e codificava a proteína instável.

4.5.1.3 Pólipos

Os animais eram randomicamente sacrificados aos dois, quatro, seis e oito meses. A cavidade abdominal era aberta por uma laparotomia mediana e todo o intestino era retirado. Era seccionado o esôfago 3 mm acima da cárdia e o reto ao nível da flexura peritoneal. Era então seccionado todo o meso de maneira a ressecar todo o trato gastrointestinal. Era então feito uma lavagem abundante da luz intestinal com solução salina até a completa eliminação de fezes e restos alimentares. O trato gastrointestinal era aberto longitudinalmente em toda a sua extensão e fixado em anteparo plástico. Era então procedido o exame macroscópico com microscópio de dissecação com aumento de 2 a 8 vezes. Toda lesão evidenciada era localizada, tendo como referência a distância em mm do esôfago (lesões gástricas), do bulbo duodenal (lesões do intestino delgado) e do ceco (lesões coloretais). Depois de localizadas, as lesões eram descritas em relação ao seu aspecto macroscópico e ressecadas para exame histopatológico.

4.5.1.4 Histologia

O exame anatomopatológico era realizado por patologista veterinário de maneira cega. Os tecidos eram inicialmente fixados em formol tamponado, embebido em parafina e corados com Hematoxilina e Eosina ou imuno-histoquímica com anticorpos monoclonais anti-CEA conforme indicado.

4.5.2 Animais transgênicos CEA

4.5.2.1 Genotipagem

Os animais eram confirmados como CEA após o PCR padrão, conforme descrito acima para os animais Apc com os primers específicos para o CEA. Para cada reação eram utilizados os seguintes reagentes:

Solução Taq Máster	10 µl
Solução tampão B	5 µl
DNTP	4 µl
Primer Long 1	1,5 µl
Primer Long 2	1,5 µl
Taq Polimerase	0,25 µl
Água	28,75 µl

Foram usados os seguintes *primers*: Long 1- 5' CAT TTC CCC CTC ATA CAC C 3'

Long 2-5' TGT TCC CAT CAA TCA GCC 3'

Era usado o mesmo ciclo de esquema usado para amplificar o gene Apc.

leite em pó magro em TBS. Finalmente a membrana era exposta com anticorpo monoclonal de caprino antimouse IgG conjugado com peroxidase em 3% de albumina bovina, TBS e Tween 20 por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação. A seguir, era revelado com substrato SuperSignal e exposto ao filme de raios-X Biomax.

A linhagem humana de tumor de cólon CEA positivo GEO gentilmente fornecida pela Dra. Judith Kantor, NIH, Bethesda, MD, foi usada como controle positivo pela alta expressão desta proteína.

4.5.3 Animais híbridos Apc/CEA

4.5.3.1 Genotipagem

A expressão gênica dos animais possivelmente Apc/CEA era feita conforme descrito previamente para os animais CEA e Apc. Era coletado e extraído DNA genômico durante a amputação podálica para a identificação e corte de 3 mm de cauda. Eram então processadas duas reações de PCR de cada animal, uma para o CEA e outra para o Apc. Eram selecionados os animais duplamente positivos. Foi também tentado simplificar a caracterização, através de uma única reação de PCR com os 5 primers (2 do CEA e 3 do Apc). Apesar de ter tido alguns resultados satisfatórios esta reação não se mostrou confiável, optando-se pelas 2 reações individuais.

4.5.3.2 Imunohistoquímica (Pólipos-CEA)

Uma etapa importante da caracterização morfofuncional deste modelo de animal híbrido era definir a relação entre os pólipos e a presença do CEA. Foi realizada a imunohistoquímica de pólipos hiperplásicos, adenomatosos, e

adenocarcinomas, com tecidos desparafinizados, previamente classificados histologicamente. Foi utilizado o anticorpo monoclonal COL-1 contra o CEA e soro controle de camundongos. Para a reação foi utilizada o Kit *DAKO animal research peroxidase*. A reação de 3.3 diaminobenzidina foi amplificada com tetróxido de ósmio a 0,2%.

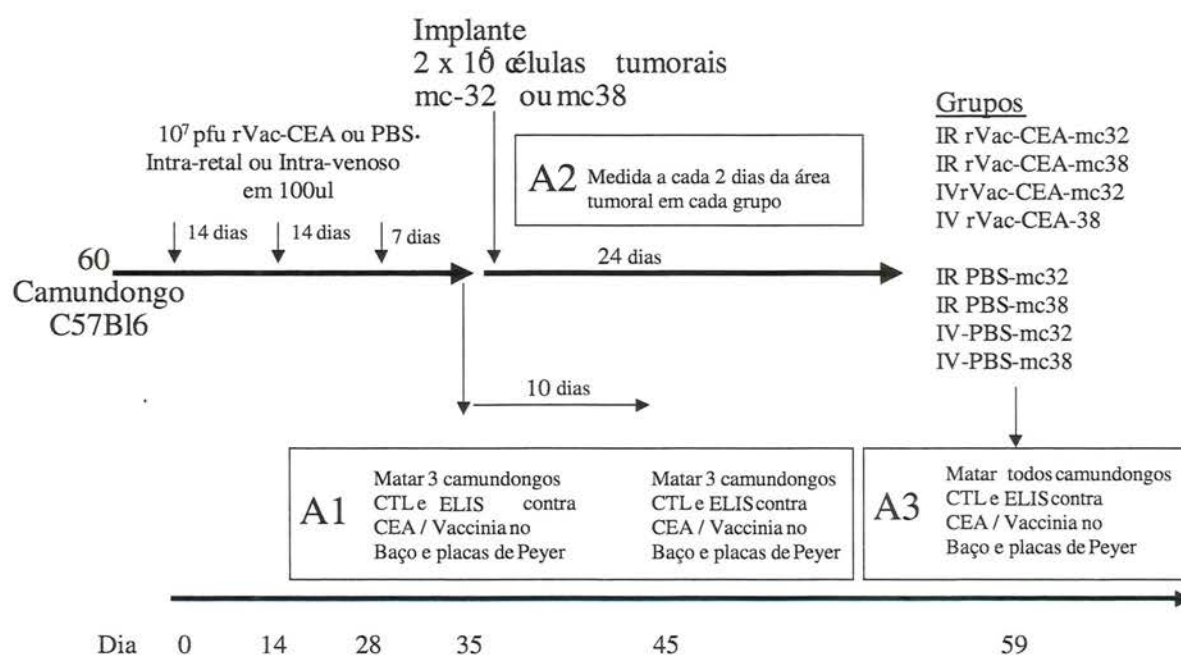
4.6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Todos os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Albert Einstein Cancer Center e seguiram todas as normas éticas de pesquisas com animais.

Experimento A:

A.1-Este primeiro experimento visava avaliar a capacidade do esquema de imunização em gerar resposta imunológica contra o CEA. Esta resposta foi inicialmente avaliada no 7º e 17º dia após a 3ª dose da vacina contendo 10^7 pfu de rVac-CEA que foi administrado por via intravenosa ou intra-retal. A avaliação imunológica foi feita mensurando-se os anticorpos contra o CEA, medindo a citotoxicidade de linfócitos contra as células CEA positivas e a proliferação destas células em presença do CEA em diversas apresentações. Foram coletados linfócitos do Baço (sistêmico) e das Placas de Peyer (mucoso) para se compararem às respostas imunológicas nestes dois órgãos que representariam, respectivamente o sistema imunológico sistêmico e mucoso.

Experimento A



O objetivo desta etapa foi determinar se a presença de tumores inibia a resposta imunológica ao CEA. Avaliou-se se havia alguma diferença de resposta entre os animais que receberam tumores CEA positivo e negativo bem como o tipo e grau de resposta tardia à imunização.

Nesta etapa pôde-se avaliar se os animais imunizados com 10^7 pfu de rVac-CEA apresentavam alguma resposta específica contra o CEA no 7^o dia após a última imunização e se esta resposta persistiu até o 17^o dia. Pôde-se comparar a resposta imunológica sistêmica (baço) e mucosa (placas de Peyer) após a imunização intra-retal e intravenosa. Para se ter certeza de que a resposta é decorrente da vacinação, para cada grupo tratado com rVac-CEA, havia um grupo controle tratado no mesmo dia com a mesma metodologia, que recebeu apenas solução salina tamponada.

A.2-Um grupo de animais também recebeu o implante subcutâneo de 2×10^5 células tumorais CEA + (mc-32) ou CEA - (mc-38) no 7º dia após a última imunização(terceira dose). O tumor implantado foi medido a cada 2 dias.

Com este experimento pôde-se fazer a correlação entre a resposta imunológica ao CEA e se esta induziria proteção a tumores CEA positivo. Para se ter a certeza de que esta proteção é realmente CEA dependente para cada grupo tratado, houve um grupo controle que recebeu o implante do mesmo número de células tumorais de mesma linhagem, porém CEA negativa. Também se pôde comparar o grau de proteção induzida por imunização intravenosa e intra-retal a tumores implantados no subcutâneo.

A.3-No 24º dia após o implante tumoral, todos os animais foram sacrificados e foi avaliada a resposta imunológica contra o CEA.

Experimento B

O experimento A foi capaz de mostrar a indução de antigenicidade contra o CEA nos animais imunizados com o rVac-CEA, comparando-se com o controle que recebeu solução salina. Porém, esta resposta poderia ser decorrente de algum antígeno viral ou induzido pela infecção viral e não pela presença do CEA, sendo, portanto vaccinia específica e não CEA específica. Para se certificar deste resultado, o experimento anterior foi repetido seguindo a mesma metodologia do experimento A, mas com um grupo controle diferente e maior número de animais. O grupo controle recebeu uma imunização com o mesmo inóculo e volume viral dos grupos terapêuticos, porém o vírus foi transduzido com um gene irrelevante, o LacZ no lugar do CEA.

Todos os experimentos **B1, B2, B3, B4 e B5** foram conduzidos simultaneamente com os mesmos reagentes, doses e lote de vaccinia.

No experimento B1 os animais receberam rVac-CEA **intravenoso**.

No experimento B2 os animais receberam rVac-CEA **intra-retal**.

No experimento B3 os animais receberam rVac-LacZ **intravenoso**.

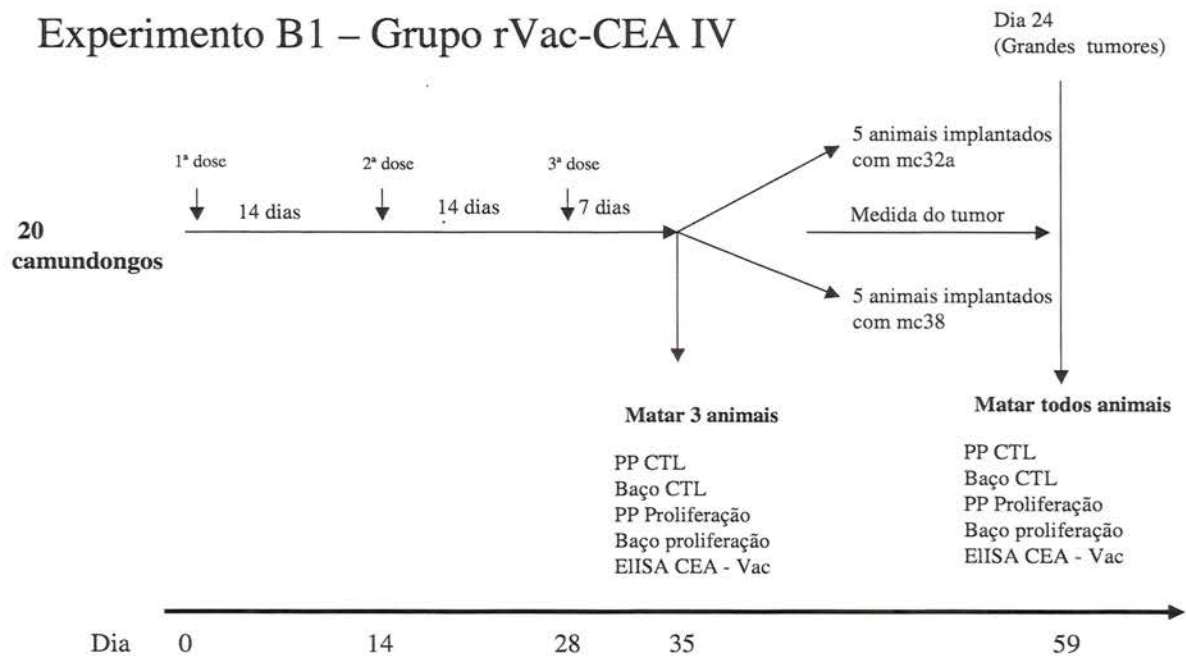
No experimento B4 os animais receberam rVac-LacZ **intra-retal**.

Neste experimento pôde ser esclarecido se as respostas imunológicas contra o CEA e a proteção tumoral foram realmente dependentes da presença do CEA no vetor viral.

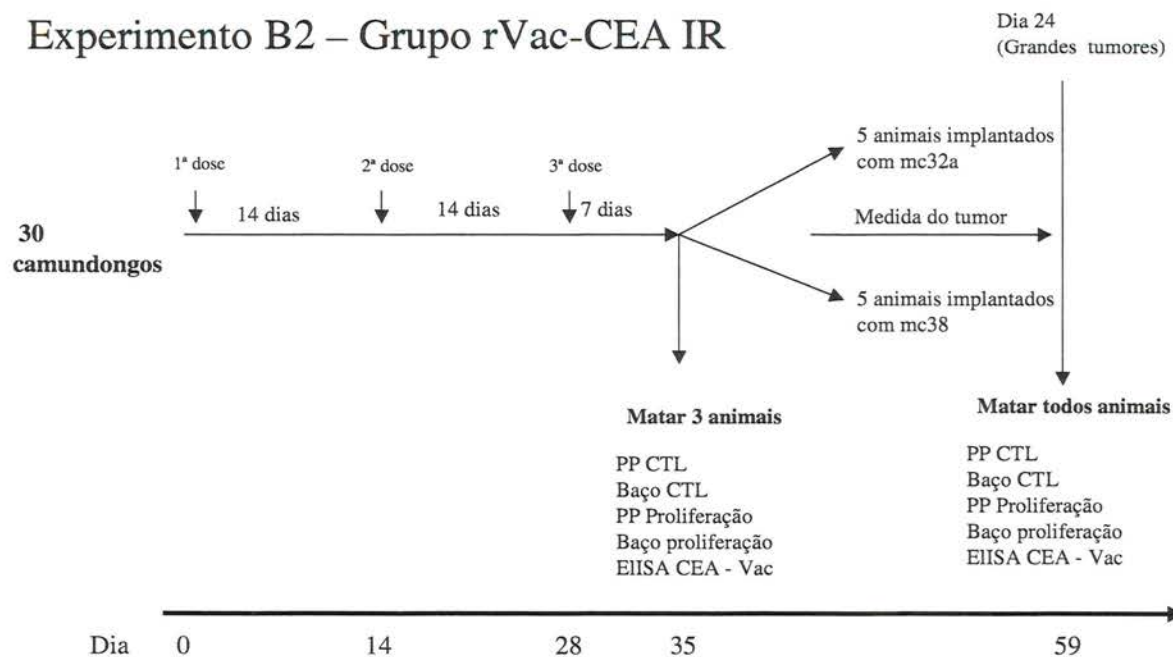
B.5-Também foi feito um experimento paralelo para se quantificar e qualificar a disseminação viral após a imunização intra-retal e intravenosa. Um grupo de animais recebeu uma dose de 10^7 pfu de rVac-CEA por via intra-retal ou intravenosa. Após 12 e 24 horas, 2, 4, e 6 dias foram sacrificados 3 animais em cada grupo. Estes animais foram imediatamente necropsiados sendo coletados amostras de sangue, baço, ovário e placas de Peyer. Foi então quantificado o número de partículas virais em cada órgão e em cada tempo, comparando-se a via intra-retal com a intravenosa.

Um dos objetivos deste experimento foi justificar a resposta obtida após a imunização intra-retal e intravenosa. Uma das mais importantes questões seria saber onde se processa a resposta imunológica ao se obter uma resposta sistêmica após a imunização intra-retal. Seria decorrente da disseminação sistêmica do vírus ou consequência da imunização nas placas de Peyer. Nesta segunda possibilidade, o vírus seria retido nestes órgãos linfáticos onde infectaria células dendríticas que passariam a apresentar o CEA como imunógeno. Todo este processo liberaria

linfócitos e células dendríticas, imunizando todo o organismo contra o CEA. O mesmo se aplica para uma possível resposta mucosa após imunização sistêmica. Ainda não está definido se ocorre disseminação sistêmica após imunização intra-retal e se ocorre disseminação mucosa após imunização venosa.

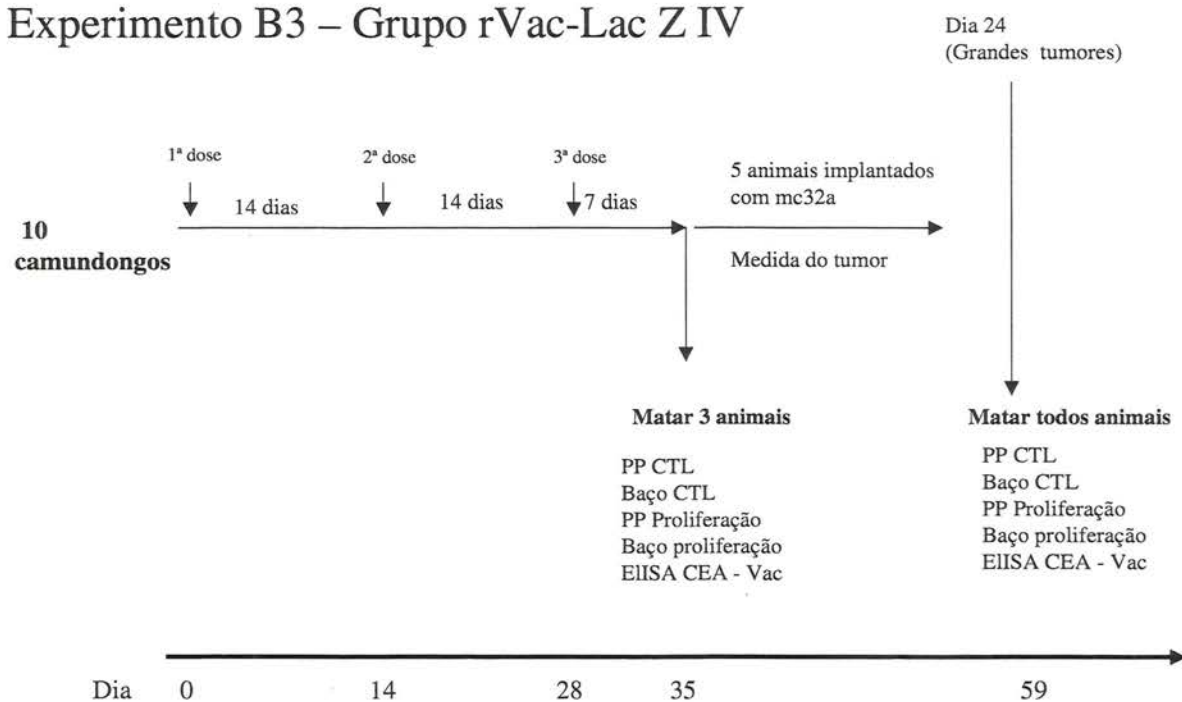


Experimento B2 – Grupo rVac-CEA IR

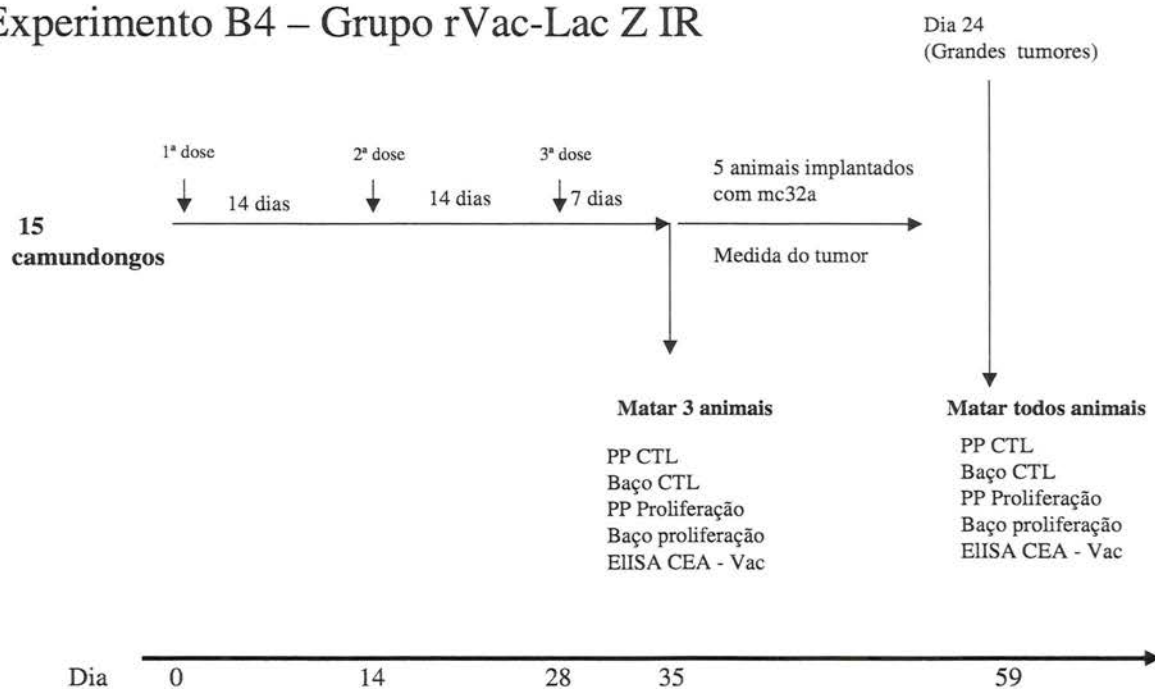


Todos os resultados anteriores poderiam ser questionados com o seguinte argumento. Camundongos não possuem o CEA ou nenhuma proteína e molécula homóloga. Quando se implantam tumores murinos transduzidos com o CEA humano nestes animais, o CEA passa ser uma proteína completamente exógena. Um antígeno único presente apenas nas células tumorais, portanto, como dito anteriormente, é mais fácil induzir resposta imunológica contra antígenos tumorais exclusivos e completamente exógenos. Neste contexto, todas as células imunológicas efetoras imunizadas contra o CEA, só reconheceriam esta proteína nas células tumorais que seriam, conseqüentemente, o único alvo de uma resposta imunológica contra o CEA.

Experimento B3 – Grupo rVac-Lac Z IV



Experimento B4 – Grupo rVac-Lac Z IR



Experimento B5



Para esclarecer esta importante questão descrita no parágrafo anterior, passamos a trabalhar com dois modelos de camundongos, um transgênico e outro Knock-out.

O primeiro era o camundongo transduzido com o CEA humano. Estes animais apresentavam o CEA em uma biodistribuição espaço-temporal idêntica a humana. Apresentavam o CEA no colón, intestinos, estômago e traquéia na vida embrionária e presença quase insignificante durante a vida adulta e foram denominados camundongos CEA.

Como estes animais nasceram com o CEA, deveriam ser tolerantes a ele ou menos capazes de apresentar uma resposta imunológica contra esta proteína.

O outro modelo de animal foi o camundongo Knock-out Apc 1638. Trata-se de modelo animal que desenvolve pólipos espontâneos do trato digestivo a partir dos 2 meses de vida com evolução de pólipos displásicos para adenomas e finalmente adenocarcinomas invasivos por volta do 8º mês. Estes animais foram denominados camundongos Apc.

Em nosso laboratório, por cruzamento dos dois camundongos acima, obtivemos um novo modelo animal transgênico, o camundongo Apc/CEA. Com este modelo, a etapa mais complexa e importante foi sua caracterização imunológica antes do mesmo começar a ser estudado nos projetos de imunoterapia.

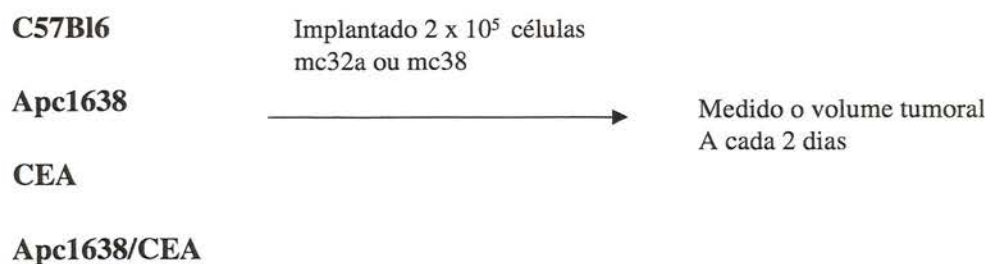
Experimento C

C - Foram 4 grupos de camundongos: o camundongo normal C56Bl6, knock-out Apc 1638, o transgênico CEA e o híbrido Apc/CEA. Cada grupo de animal recebeu um implante de 2×10^5 células tumorais no subcutâneo dos tumores usados anteriormente o CEA +, mc-32 ou do CEA -, mc-38.

O objetivo deste experimento foi saber qual seria o comportamento do tumor nestes 4 modelos experimentais. Como usamos 2 tumores com a única diferença de serem CEA + ou CEA-, poderíamos avaliar como a presença do CEA nos tumores implantados influenciaria seu desenvolvimento. Também pudemos avaliar nos animais transgênicos como a presença do CEA em cada modelo animal poderia afetar a evolução dos tumores implantados com relação a serem CEA positivos ou negativos.

Experimento C

10 animais cada grupo

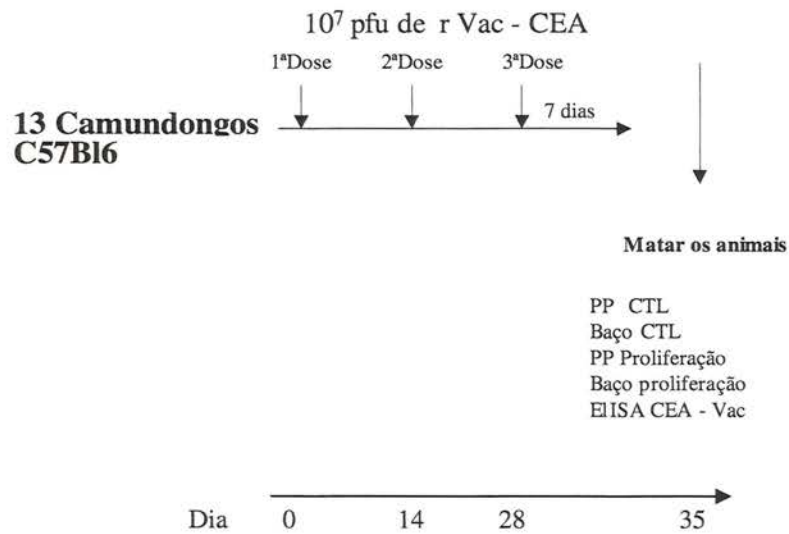


Experimento D

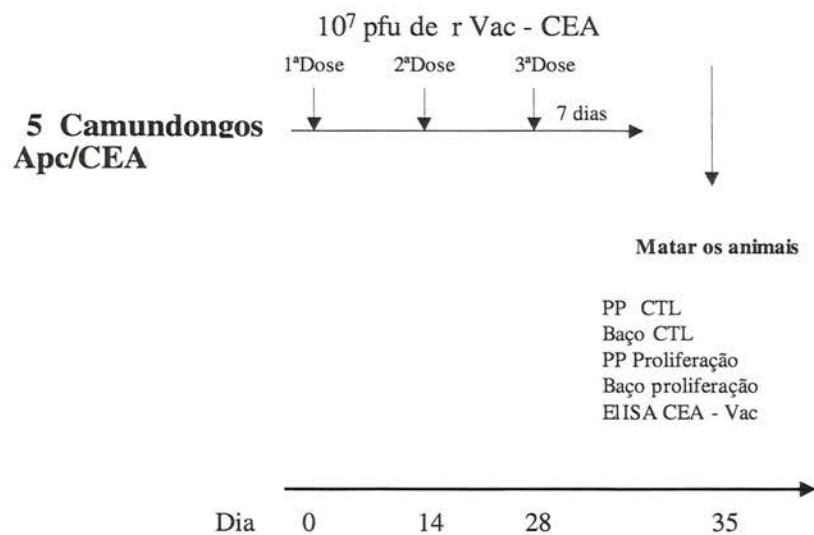
D - Neste experimento usamos os camundongos C57B16 e Apc/CEA. Cada grupo foi imunizado com 3 doses de 1×10^7 pfu de rVac-CEA endovenoso. Os animais foram sacrificados 7 dias após a terceira dose. Foi avaliada a produção de anticorpos contra o CEA e vaccinia. Foram também avaliadas a citotoxicidade e proliferação de linfócitos em resposta ao CEA no baço, resposta sistêmica e sistema imunológico mucoso nas placas de Peyer.

O objetivo desta etapa foi avaliar a resposta à imunização com o CEA nestes dois modelos animais. O experimento D1 utilizou animais C57B16, e o experimento D2 animais Apc/CEA.

Experimento D1– Animais C57B16



Experimento D2– Animais Apc/CEA



4.6.1 Imunização venosa

Para a imunização eram usados frascos dos vetores virais previamente produzidos, titulados e congelados a -80°C com a concentração de 1×10^8 pfu/ml. Para haver uma homogeneização da quantidade de partículas virais em todo o volume, o frasco era submetido a 3 ciclos de aquecimento a 37°C e congelamento a -80°C , seguido de 20 segundos de sonicação. A seguir, eram mantidos em gelo e imediatamente encaminhados para o biotério onde era realizada a imunização. Para a imunização intravenosa, a gaiola era aberta em fluxo laminar e os animais mantidos sob lâmpada de aquecimento para vasodilatação periférica de vasos da cauda por 5 a 10 minutos. A seguir, os animais eram imobilizados em contentores de acrílico próprios. O conteúdo viral era aspirado em seringas de 1 ml com agulha 13 x 3,5 Gauge sendo injetados $100\mu\text{l}$ ou 1×10^7 pfu em cada animal. O volume era injetado na veia caudal lateral sendo desprezados os animais em que a injeção fosse tecnicamente imperfeita.

4.6.2 Imunização mucosa (intra-retal)

Para a imunização intra-retal, a solução com o vetor era previamente processada, utilizando-se o mesmo método da imunização venosa. Os animais eram inicialmente manipulados para eliminarem 2 a 3 pelets fecais esvaziando o reto e a seguir, imobilizados, conforme descrito acima. O conteúdo era aspirado em seringa de 1 ml conectada a sonda umbilical de nelatom de 2 mm de diâmetro. Eram eliminadas as bolhas do interior da sonda. A mesma era introduzida delicadamente via ano-retal por 2 a 3 cm, no momento em que era feita a inoculação de $100\mu\text{l}$ ou 1×10^7 pfu em cada animal. Os animais eram observados por cerca de 30 segundos para

se detectar a defecação da vacina inoculada. Em caso negativo era liberado na gaiola. Em casos de eliminação do líquido ou catéter sujo de sangue que poderia indicar perfuração intestinal, os animais eram desprezados.

4.7 IMPLANTE TUMORAL

O implante tumoral era feito na região lombar direita. No dia anterior ao implante, os animais eram submetidos à ampla tricotomia, incluindo região lombar direita, flanco direito e hemi-abdome direito. Este procedimento era feito no dia anterior, para se evitar possíveis escoriações decorrentes da tricotomia e que pudessem desencadear processos infecciosos ou inflamatórios influenciando no crescimento tumoral. A tricotomia era feita com aparelho elétrico próprio e os animais traumatizados eram descartados.

Dois dias antes do implante, as linhagens tumorais a serem implantadas eram testadas por citometria de fluxo quanto à expressão dos antígenos de interesse. A seguir, plaqueadas em uma densidade para que obtivéssemos uma cultura semiconfluente no dia do implante. Isto evitaria que se formassem aglomerados celulares difíceis de dissociar. Estes aglomerados celulares tornam o número de células tumorais implantadas impreciso.

Para o preparo das células o meio de cultura era aspirado, o frasco era lavado 1 vez com solução salina tamponada para remoção de debris e células não aderentes. As células aderidas eram liberadas do frasco com solução de Tripsina –EDTA a 5% com agitação contínua por 5 minutos. A seguir, eram lavadas e centrifugadas em

solução salina por 2 vezes. Eram contadas em hemocítômetro, aproveitando-se apenas as soluções com viabilidade celular superior a 90%.

Era então preparadas em seringas de 1 ml, contendo 1 ml de células suspensas em solução salina na concentração de 1×10^6 células/ml, identificando-se a linhagem tumoral em cada seringa. As seringas eram mantidas em gelo e imediatamente levadas ao biotério onde eram feitos os implantes. As seringas eram mantidas em posição horizontal no gelo. Evitava-se, assim, que o tempo afetasse a viabilidade e induzisse a decantação de células tumorais na parte inferior e conseqüentemente, o número de células implantadas. A seringa era agitada antes de cada implante. O implante do primeiro ao último animal era feito em um intervalo menor do que 20 minutos.

Os animais previamente preparados e selecionados na noite anterior eram imobilizados em caixa acrílica de contenção, sendo feito a anti-sepsia da região lombar direita com álcool 70%. Cada animal recebia o implante no subcutâneo de 200ul compreendendo 2×10^5 células. Eram usadas agulhas 13 x 3,5 Gauge, que eram totalmente tunelizadas no subcutâneo, evitando-se o refluxo de células tumorais. Não eram feitas compressão ou massagem local, liberando os animais a seguir.

4.8 MENSURAÇÃO TUMORAL

A mensuração tumoral era feita a cada 2 dias e iniciava-se no sexto dia após o implante tumoral. Cada animal previamente identificado com amputação de dedos, era imobilizado e o tumor era medido com paquímetro de precisão de 0,1 mm. Eram considerado o maior diâmetro e o diâmetro perpendicular a este.

4.9 MEDIDA DA CITOTOXICIDADE PELA LIBERAÇÃO DE CROMO⁵¹

A medida da citotoxicidade de linfócitos do baço e das placas de Peyer era feita através do teste padrão de 6 horas da liberação do cromo radioativo. O número de células alvo era de 3000 por poço sendo usadas as seguintes proporções entre efetores e alvos: 12,5/1, 25/1, 50/1, 100/1. Depois de processadas e contadas as células alvo eram colocadas em meio completo com 1% de soro e 200 uCi de cromo⁵¹ radioativo ($\text{Na}_2[^{51}\text{Cr}]\text{O}_4$) em agitador a 37°C por 60 minutos. Após esta etapa as células alvo eram lavadas por 3 vezes com meio completo para eliminação da radioatividade livre fora das células. A seguir, eram plaqueadas em placas de 96 poços com fundo em U. Eram, então, adicionadas às células efetoras repetindo-se cada condição em 3 poços. A placa era centrifugada a 200 rpm por 1 minuto para favorecer o contato célula-célula e a seguir, colocadas na incubadora a 37°C com 5% de CO₂ por 6 horas. Em cada placa, 3 poços de cada célula alvo eram completados com meio completo sem células efetoras para se mensurar a liberação espontânea de radioatividade. Outros 3 poços de cada célula alvo eram completados com 100ul de Tritom X-100 a 2% para lise celular completa e mensuração da radioatividade total. Após as 6 horas de incubação a placa era centrifugada a 1200 rpm por 7 minutos. Era colhido 50µl de cada poço, transferidos para placa própria de leitura juntamente com 150ul de líquido de cintilografia. A solução era homogeneizada e lida em contador de cintilação gama. A porcentagem de citotoxicidade específica era avaliada pela seguinte fórmula;

% lise específica= ($\frac{\text{medida do poço-liberação espontânea}}{\text{liberação total-espontânea}}$) x 100.

4.9.1 Processamento das células efetoras

4.9.1.1 Coleta de linfócitos do Baço

Os animais eram sacrificados por asfixia em câmara saturada de CO₂. Era feita anti-sepsia de toda a parede abdominal com álcool 70%. Era feita laparotomia mediana ampla com prolongamentos laterais no tronco e pelve. Era fixada lateralmente toda a pele com pelos voltados para o suporte inferior de maneira asséptica deixando o peritônio íntegro. Era feita nova anti-sepsia e em seguida aberto o peritônio. Antes do processamento do baço todo o conteúdo abdominal era rebatido lateralmente, expondo a veia cava inferior onde era coletado sangue para processamento de plasma. A seguir, o baço era ressecado e colocado em frasco estéril com solução salina tamponada gelada.

O baço era então macerado, usando-se duas lâminas de vidro por cerca de 5 minutos para liberar o conteúdo celular do tecido conjuntivo. A suspensão de células obtidas por dispersão mecânica era filtrada em tela de nylon de 0,45 mm. O conteúdo era centrifugado e ressuspendido em solução de amônia para lise de eritrócitos por 7 minutos, tendo sido desprezado o sobrenadante. Era então lavado por 3 vezes em solução salina. O pellet era ressuspendido em meio completo sendo feita a contagem de linfócitos em hemocitometro.

4.9.1.2 Coleta de linfócitos das Placas de Peyer

Após o sacrifício dos animais, coleta do sangue e retirada do baço, o intestino foi seccionado ao nível do duodeno sendo liberado do meso até o reto distal, onde era seccionado novamente. Todo intestino foi então irrigado em toda a sua luz com 30 ml de PBS gelado para eliminação de todo o conteúdo intestinal. Foram tomadas precauções para se evitar que houvesse contaminação da serosa intestinal. Após a limpeza, o mesmo foi colocado em placa de Petri com solução salina gelada. O intestino foi examinado cuidadosamente sendo identificados a olho nu as placas de Peyer na serosa. O aspecto é de micronodulações agrupadas de 1 a 3 mm de diâmetro, de aspecto esbranquiçado e protundindo nitidamente no relevo da serosa. Após a identificação, as placas de Peyer foram seccionadas com tesoura estéril englobando serosa, placa de Peyer e submucosa, evitando-se soluções de continuidade com a mucosa para diminuir o risco de contaminação. As placas de Peyer foram coletadas em placas de Petri com solução salina tamponada estéril gelada. Eram seccionadas mecanicamente e colocadas em meio completo com solução enzimática (300U/ml de colagenase VIII) onde ficavam em movimento por 20 minutos em temperatura de 37° C. A suspensão de células foi filtrada em filtro de 0,45 mm, centrifugada e lavada em PBS por 3 vezes e suspensa em meio completo. Foram então contados os linfócitos viáveis em hemocitômetro através de exclusão com Azul de Trypan.

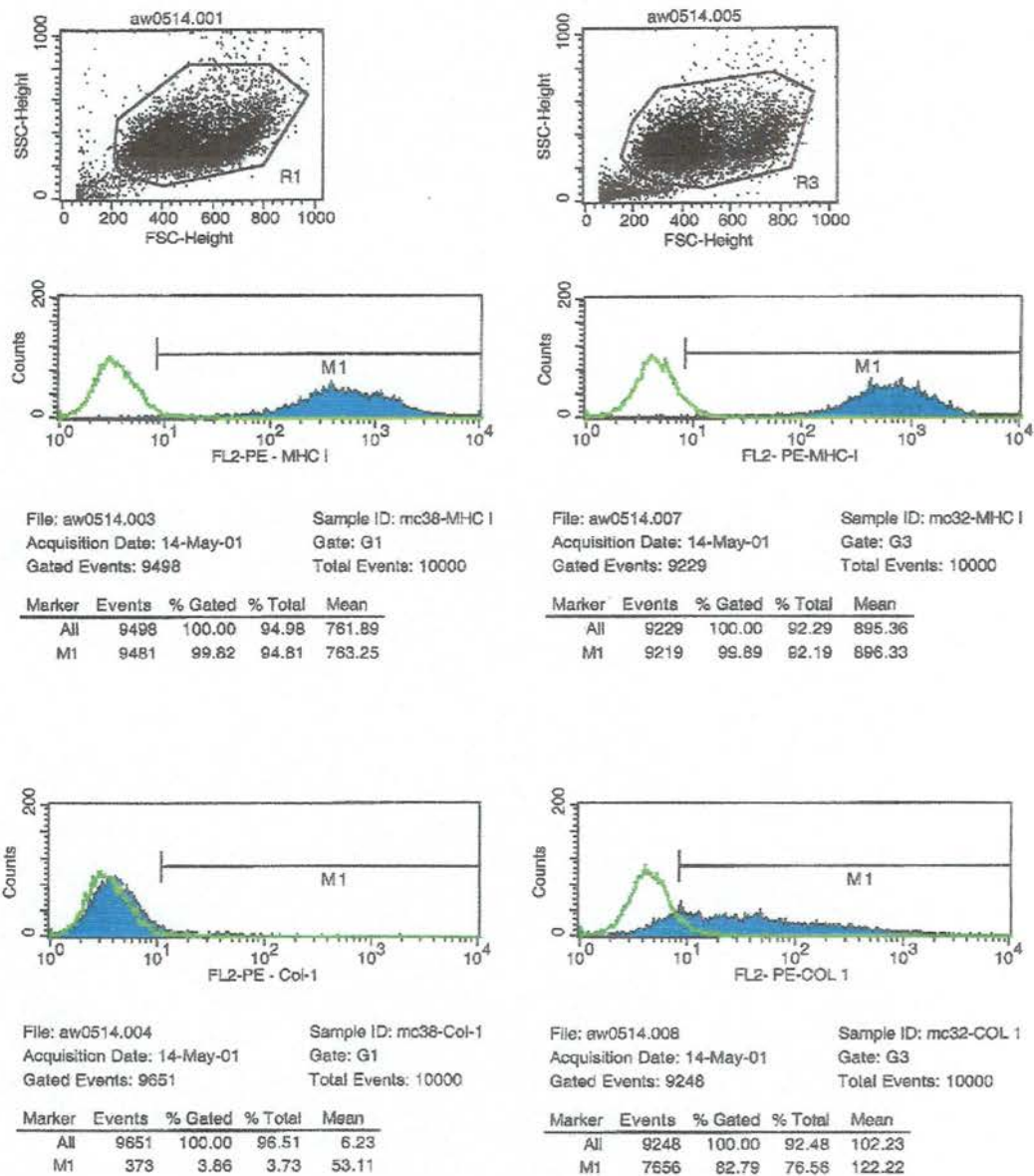


Figura 5 - Citometria de fluxo das linhagens celulares mc-38 (colunas a esquerda) e mc-32 (colunas a direita). Os dois gráficos superiores mostram as populações celulares consideradas para a contagem. Os gráficos abaixo mostram a presença de moléculas MHC classe I presente em 94% das células mc-38 e 92% das células mc-32. O gráfico inferior quantifica a presença do CEA na superfície celular sendo de 3% nas células mc-38 e de 76% nas células mc-32.

4.9.2 Processamento das células alvo

4.9.2.1 mc-38

A linhagem tumoral mc-38 era plaqueada de maneira a estar semiconfluyente no dia da coleta. Era usada solução de tripsina-EDTA, conforme descrito até termos uma solução com células livres. Uma amostra de 150.000 células era dividida em três frascos para a avaliação de expressão de MHC-I e CEA por citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos monoclonais contra CEA (COL-1) e contra o MHC classe I (BBL-7). Só eram usadas culturas com menos de 5% de células expressando o CEA e mais de 80% MHC classe I positiva conforme a Figura 5.

4.9.2.2 mc-32

Para a linhagem mc-32 era usada a mesma metodologia descrita acima. Considerava-se adequados as amostras com mais de 90% expressando o MHC classe I e mais de 75% expressando o CEA, conforme mostra a Figura 5.

4.9.2.3 mc-38 expressando antígenos do vírus vaccinia

Para se certificar da eficiência da imunização e resposta contra o vírus, utilizamos uma célula alvo que não apresentasse novos antígenos e fosse CEA negativo. Mantivemos a linhagem mc-38 que foi infectada com o vírus vaccinia não transduzido com o CEA. Foram realizados diversos experimentos piloto com o objetivo de se definir o número de partículas virais por célula tumoral e o tempo de infecção. O grande fator limitante deste experimento é o fato do vírus ser também citolítico e o teste da liberação do ^{51}Cr durar mais de 6 horas. Se usássemos um baixo número de vírus por um curto período de tempo a taxa de infecção seria baixa e

poucas células expressariam os antígenos virais sendo alvo para linfócitos ativados contra o vírus. Em contrapartida, se usássemos uma grande carga viral por um longo período, muitas células iriam ser lisadas espontaneamente, liberando o ^{51}Cr gerando uma alta liberação espontânea de ^{51}Cr com um alto “background” que tornariam os resultados inconclusivos. Dentro desta pequena janela experimental, infectamos as células tumorais com 2 partículas virais para cada célula em meio incompleto com 1% de soro fetal bovino pelo período de 1 hora com uma fina camada líquida cobrindo as células a 70% de confluência. A seguir, era adicionado meio para se chegar a 10% de soro fetal bovino e incubado entre 14 e 18 horas. As células eram então liberadas e incorporadas com ^{51}Cr , de acordo com o exposto previamente para se avaliar a citotoxicidade gerada contra antígenos virais puros.

4.10 DOSAGEM DE ANTICORPOS

O soro dos animais sacrificados foi coletado e armazenado a -80°C para análise de anticorpos contra o alvo apropriado através de ELISA. No dia da mensuração, o soro era descongelado e diluído em PBS com 0,1% de Albumina bovina nas diluições de 1:5 a 1:1000.

4.10.1 Anticorpos contra o CEA

Microplacas de 96 poços foram revestidas com 200 ng/poço de CEA purificado. Cada poço foi bloqueado por uma noite com 200ul de PBS com 5% de Albumina bovina. O soro em suas várias diluições foi adicionado aos poços em triplicatas e incubados por 1 hora. As placas foram lavadas 5 vezes com solução

tampão de PBS, contendo 1% Albumina bovina, e os anticorpos aderidos as placas eram detectados com Anticorpo secundário conjugados com peroxidase de rábano, produzido em ovinos contra IgG de camundongos. Após 1 hora de incubação as placas eram lavadas 10 vezes com PBS e Tween a 0.1% e a reatividade detectada pela adição do cromógeno o-fenilenodiamina (OPD) por 15 minutos. A leitura era feita com leitor de ELISA, usando-se filtro de 450nm para medir-se a absorbância.

4.10.2 Anticorpos contra Vaccinia

A mensuração dos anticorpos contra o vírus vaccinia foi feita seguindo-se a mesma metodologia acima e cada poço foi revestido com 10^7 partículas virais. A imunização dos animais era feita com partículas virais produzidas em linhagem celular BSC-1 e as partículas virais para a ELISA eram produzidas em linhagem HeLa. Esta precaução foi empregada para evitar-se que possíveis restos celulares de BSC-1 inoculados nos animais, pudessem induzir anticorpos contra esta linhagem celular, e posteriormente se ligar a placa amplificando artificialmente a quantidade de anticorpos.

4.11 MEDIDA DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS

Para a medida da proliferação em resposta a antígenos específicos os esplenócitos ou placas de Peyer foram incubados em placas com 96 poços de fundo plano com a densidade de 2×10^5 células por poço. Para a estimulação foi adicionado no dia 0, em triplicata para cada amostra os seguintes imunógenos: 2.5 µg/ml de Conavalina A (Coa -Sigma), 0.5 e 2 µg/ml de proteína ovoalbumina, 0.5 e 2

$\mu\text{g/ml}$ de proteína CEA (Sigma), lisados e corpos apoptóticos de linhagem celular mc38, lisados e corpos apoptóticos de linhagem celular mc32(CEA), peptídeo CEA CAP-M8(CEA₅₂₆₋₅₃₃) e ausência de estimulação. Os corpos apoptóticos foram obtidos após 3 dias de cultura das linhagens celulares sem qualquer adição de soro e os lisados após 3 ciclos de congelamento a -80°C e aquecimento a 37°C das linhagens celulares. A proliferação foi medida após 5 dias de incubação a 37°C com a adição de [^3H]timidina($1\mu\text{Ci/poço}$; Amersham) durante as últimas 18 h. As células foram coletadas e a proliferação medida pela incorporação da timidina radioativa por cintilografia (Wallac).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS TRANSGÊNICOS

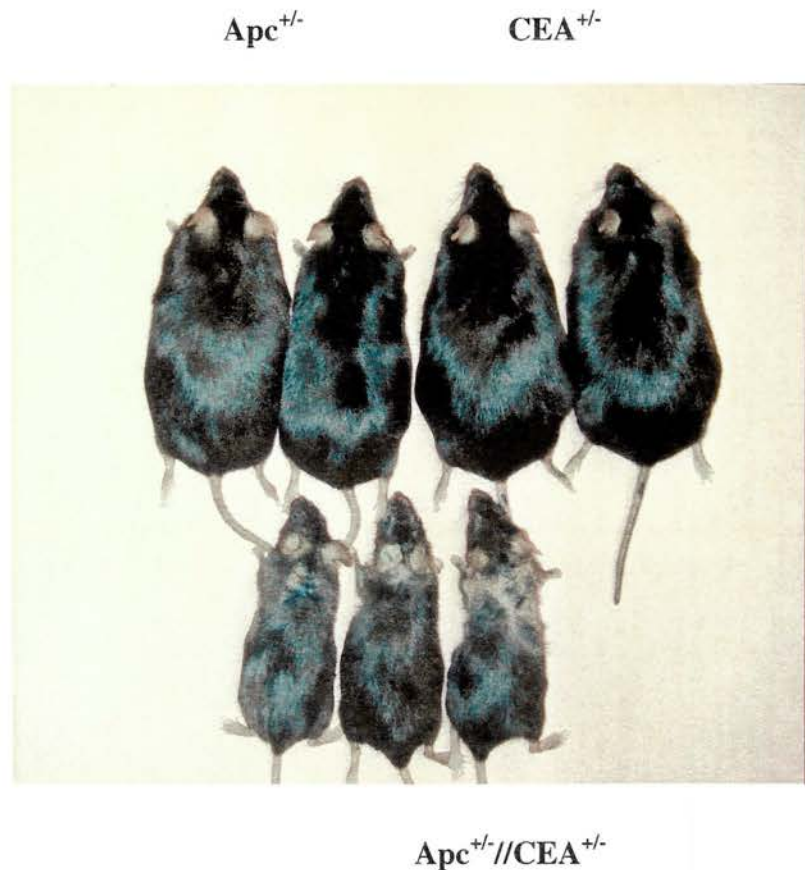


Figura 6 - Fotografia de animais adultos entre 10 e 12 meses das linhagens Knock-Out APC, dois superiores à esquerda, transgênico CEA, dois superiores à direita e híbrido Apc/CEA, três animais inferiores. A fotografia mostra que na mesma idade os animais Apc/CEA apresentam-se em pior estado geral.

Os animais transgênicos com o CEA humano não apresentavam alterações fenotípicas conforme mostrado na Figura 6. Nesta figura os animais são adultos com idade aproximada entre 10 e 12 meses. Nesta idade os animais Apc podem ainda não apresentar grandes alterações, apesar de já apresentarem pólipos gastro-intestinais,

muitos já com degeneração para adenocarcinoma invasivo. Os tumores nestes animais não metastatizam e os animais só apresentam sintomas quando os tumores começam a obstruir o trato digestivo, impedindo a ingestão e absorção de nutrientes. Os animais Apc/CEA já apresentavam sinais de envelhecimento precoce já nesta idade mesmo sem sinais de tumores obstrutivos do sistema digestivo.

5.1.1 Genotipagem

A caracterização genotípica dos animais transgênicos era feita pela reação de PCR. A Figura 7 mostra 6 animais que foram duplamente testados para o CEA e Apc. Os animais CEA positivos apresentavam um produto de 100 pares de base durante a reação de PCR, produto que não aparece nos animais CEA negativos. Para a caracterização dos animais Apc, a reação de PCR era realizada com 3 primers que produziam 2 produtos. Um dos produtos de 300 pares de base esta presente em todos os animais e representa o homólogo normal do gene Apc. O outro produto de 400 pares de base representa o gene Apc truncado só presente nos animais Apc positivos com a mutação induzida deste gene.

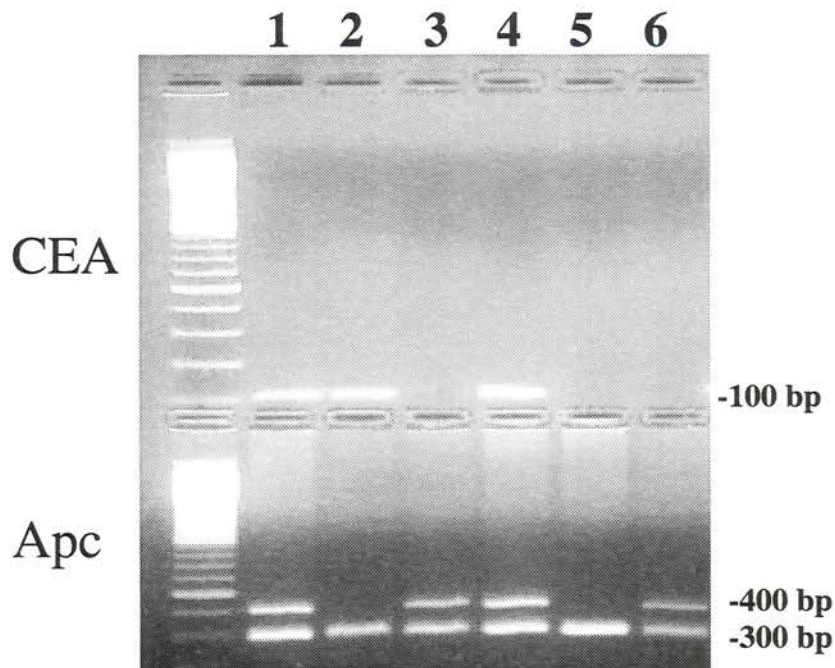
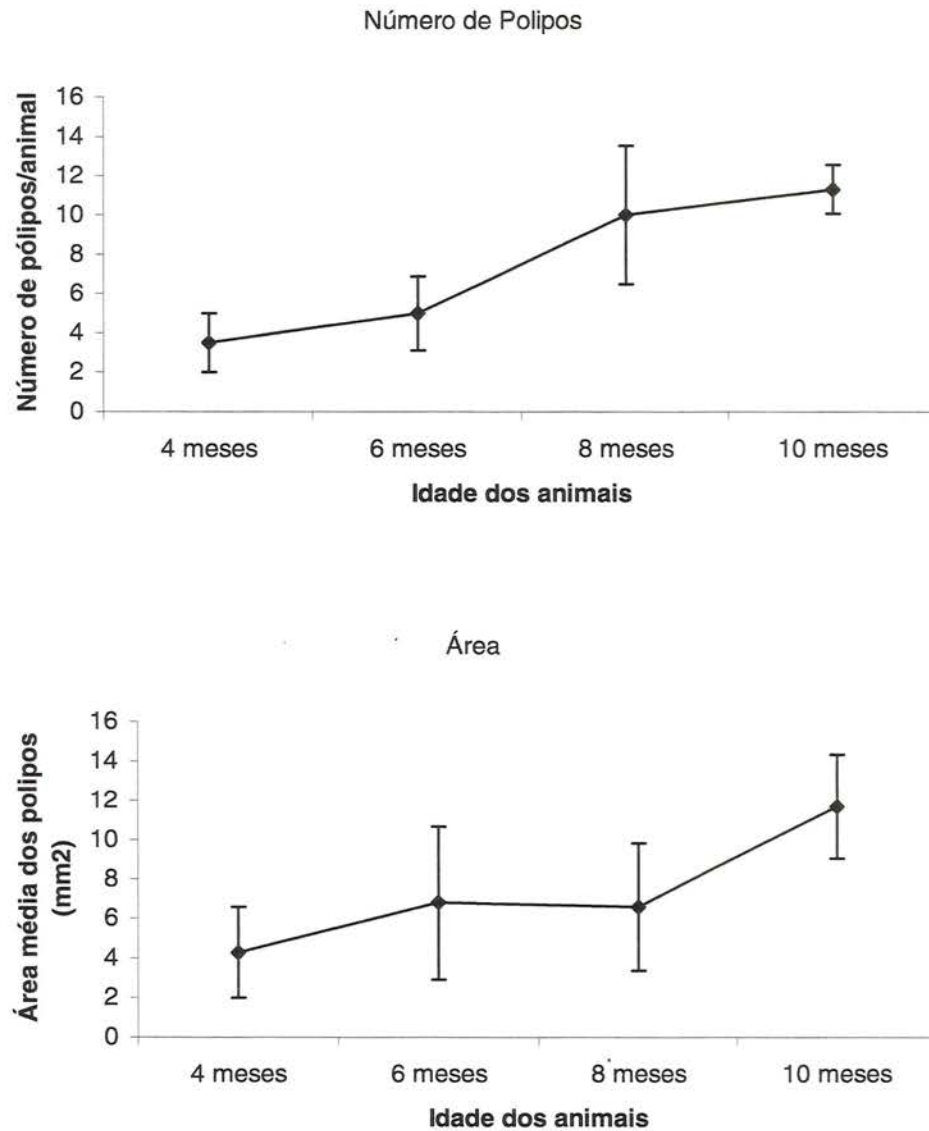


Figura 7 - Eletroforese de produto de PCR de seis animais testados 2 vezes. Na parte superior os animais CEA + apresentam um produto de 100bp e na inferior os animais Apc + apresentam bandas de 400 (alelo mutado) e 300 bp (alelo normal). Os animais de número 1, 2 e 4 são CEA +. Os animais de número 1, 3, 4 e 6 são Apc positivos sendo os animais 1 e 4 duplo transgênicos Apc/CEA.

5.1.2 Apc – Pólipos.

Os camundongos Apc1638 acumulam pólipos à medida que envelhecem. Estes animais foram randomicamente analisados a cada 2 meses e o número de pólipos foi contado e medido individualmente. Com o aumento da idade ocorria um aumento do número de pólipos e do tamanho destes. Conforme mostrado na Figura 8, os camundongos apresentavam poucos pólipos aos 2 meses, número que aumenta 5 vezes após os 10 meses. O mesmo ocorre com a área média dos pólipos em função da idade.



n = 6 animais.

Figura 8 - Gráficos de animais Apc + mostrando o aumento proporcional do número (gráfico superior) e tamanho (gráfico inferior) dos pólipos do trato gastrointestinal com o aumento da idade. Barras mostram o desvio padrão da média.

5.1.3 Apc – Histologia.

Os camundongos apresentaram tumores do estômago ao reto. O aspecto macroscópico variou de tumores sésseis com base larga a polipóides na forma pediculada. A parte periférica mostrou-se sempre elevada em relação ao plano

mucoso. A parte central mostrou-se elevada ou ulcerada, sendo coberta por material necrótico. Os tumores pediculados foram mais raros e formavam uma massa polipóide em protusão para o lúmen. Os tipos histológicos variavam de pólipos hiperplásicos, pólipos adenomatosos, adenomas, adenocarcinomas “in situ” e adenocarcinoma invasor. Os adenomas eram principalmente tubulares ou tubulovilosos e a minoria era vilosa. Os adenocarcinomas apresentavam maior diâmetro do que as demais lesões benignas. Os carcinomas invasores eram bem diferenciados e com baixa infiltração linfocitária. As células apresentavam aumento do núcleo, pleomorfismo e perda da polaridade.

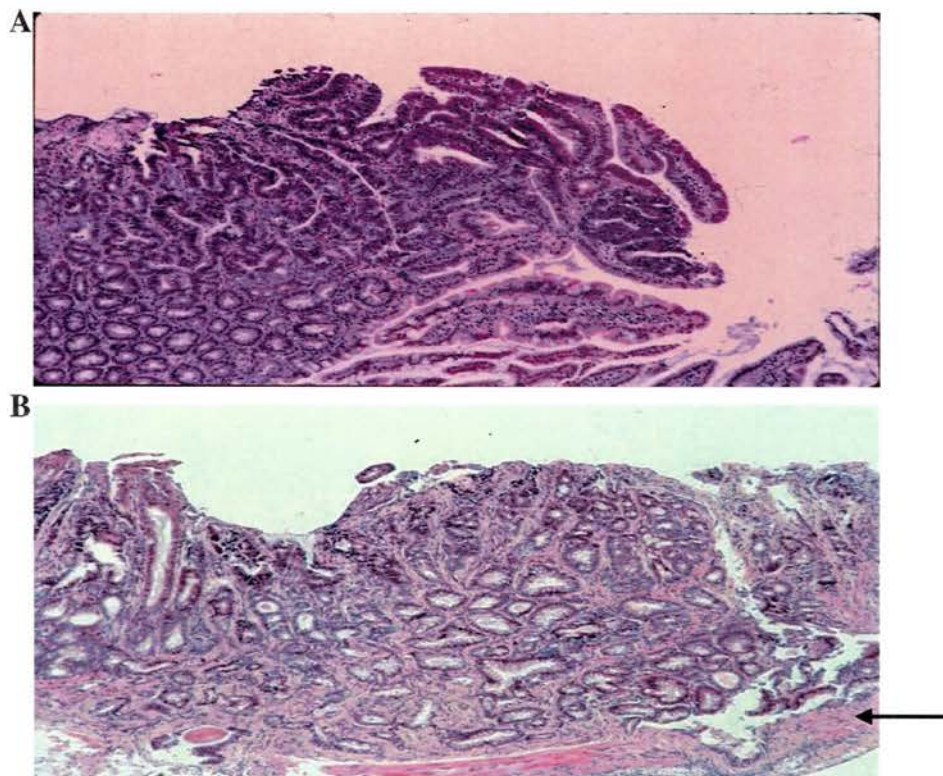


Figura 9 - Micrografia representando a análise histopatológica (Hematoxilina - Eosina) de lesões polipóides no cólon de animais APC+. Na figura A vemos um adenoma em um animal de 4 meses e na figura B um adenocarcinoma, invadindo a camada muscular (seta) em um animal de 8 meses.

Todas as áreas suspeitas a macroscopia eram encaminhadas para exame microscópico como mostrado na Figura 9. Existiam áreas focais de displasia sem a presença de pólipos ou ulcerações.

5.1.4 CEA - Genotipagem

Os animais CEA positivos apresentavam a amplificação de um produto de 100 pares de bases conforme mostrado na Figura 2. Estes resultados mostravam apenas a presença de ao menos uma cópia do gene do CEA no genoma animal. Os animais originais receberam de 8 a 19 cópias deste gene no pró-núcleo masculino do blastócito. Este é um processo onde não se pode determinar com exatidão onde este gene será integrado e se o mesmo vai ser transcrito de maneira correta. A avaliação do correto posicionamento desta cópia em um Éxon e sua expressão foi mostrada pela reação de Western-Blot que mostra a correta expressão protéica deste gene.

5.1.5 CEA - Expressão protéica

A expressão do gene do CEA transfectado nos animais foi avaliada pela reação de Western-Blot. Conforme previamente descrito em métodos, foi avaliada a expressão protéica no pulmão, fígado, baço, estômago, intestino, cólon e rim de acordo com a Figura 10.

Foi detectada pequena presença da proteína CEA no estômago e intestino e alta expressão no cólon. Estes resultados são consistentes com a expressão em humanos. Também apresentava a massa molecular aproximada de 180 kDa que é o peso molecular do CEA em humanos.

Esta mesma reação foi realizada em animais C57Bl6 e Apc sendo negativa sem detecção do CEA ou proteína homóloga em nenhum órgão ou tecido estudado. Como controle positivo foi utilizada uma linhagem humana com alta expressão do CEA denominada GEO, conforme mostrado na Figura 5. Apesar de não ser um exame quantitativo, a quantidade protéica por órgão foi normalizada e, portanto poderia ser aferido que a quantidade de CEA expressa no cólon seria maior do que no estômago e no intestino delgado.

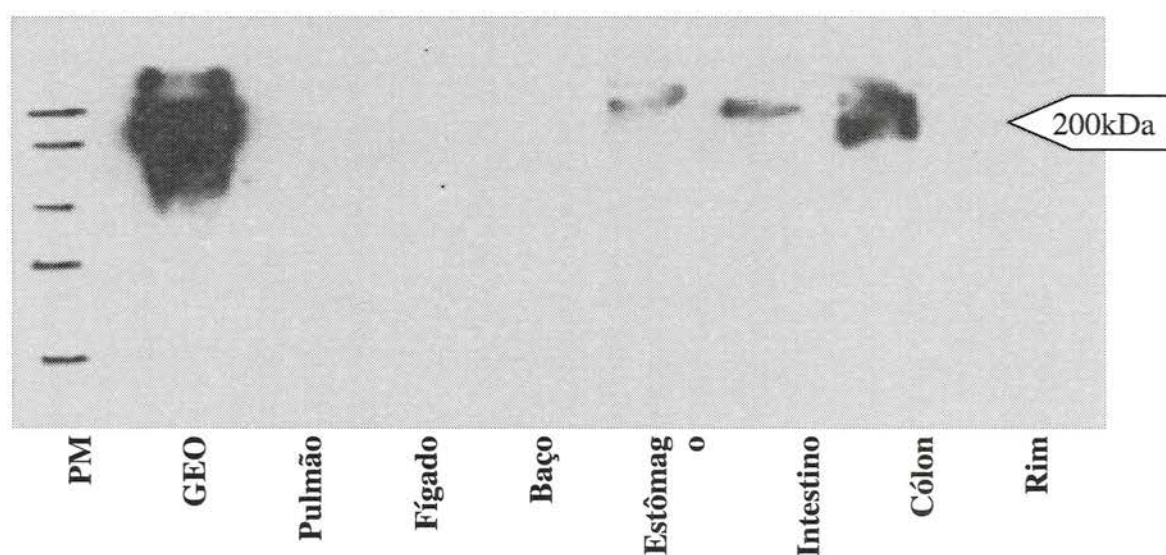


Figura 10 - Extratos protéicos da linhagem GEO do pulmão, fígado, baço, estômago, intestino, cólon e rim de animais CEA+ foram separados em gel de poliacrilamida SDS, transferidos para membrana PVDF e expostos a anticorpos anti-CEA e revelados com anticorpos secundários. Observam-se bandas de ~180 kDa de massa molecular nos extratos do estômago, intestino delgado e cólon bem como na linhagem de células CEA positivas GEO. Note que há relativamente mais CEA expresso no cólon do que no estômago e intestino.

5.1.6 Fenótipo - Animais Apc/CEA

Os animais duplos transgênicos Apc/CEA apresentam varias alterações fenotípicas decorrentes da expressão do gene do CEA e da inativação de um alelo do Apc. Muitas destas são também compartilhadas com os animais Apc ou CEA. A Figura 11 mostra animais destes fenótipos próximos do limite de sua longevidade quando as alterações macroscópicas são mais exuberantes.

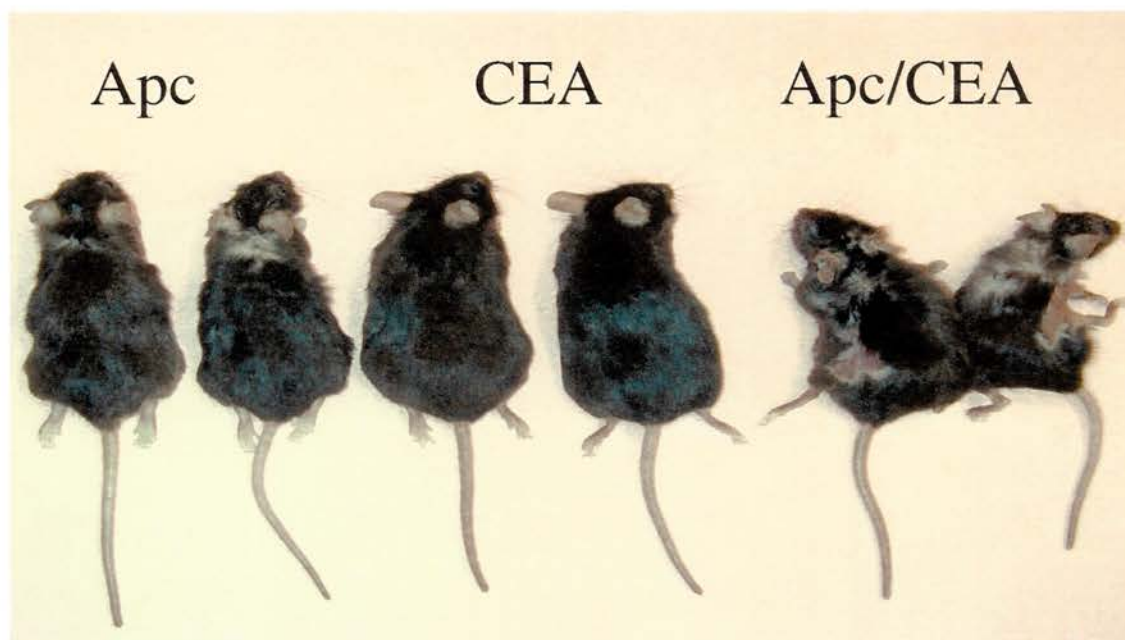


Figura 11 - Fotografia de animais transgênicos Apc, CEA e Apc/CEA no limite de sua longevidade com mais de 18 meses. Os animais CEA, centro não apresentam alterações macroscópicas. Os animais APC à esquerda apresentam-se desnutridos e caquéticos em decorrência de múltiplos pólipos gastro-intestinais e tumores. Estas alterações são mais exuberantes nos animais APC/CEA, à direita, possivelmente por serem duplo transgênicos.

Conforme mostrado na Tabela 1, a prevalência dos pólipos aumenta com o aumento da idade dos animais. Aos 2 meses nenhum animal apresenta pólipos sendo que estes estão presentes em 100% dos animais aos 8 meses. As alterações pré-

malignas como displasia e adenomas acometem mais de 50% dos animais após o 6 mês. A transformação para a forma maligna e invasora de adenocarcinoma não ocorre em todos os animais e apenas 50% deles apresentaram lesões malignas aos 8 meses. Esta imprevisibilidade de transformação de pólipos em adenocarcinomas é semelhante à encontrada em humanos com pólipos que evoluem para transformação maligna.

Tabela 1 - Tabela mostrando a porcentagem de animais Apc/CEA com pólipos, displasia ou adenoma e adenocarcinoma nas idades de 2, 4, 6 e 8 meses.

Idade em Meses	Pólipos	Displasia / adenoma	Adenocarcinoma
2	0	0	0
4	20%	0	0
6	80%	50%	0
8	100%	60%	50%

n = 6 animais por grupo.

Os animais também foram avaliados quanto à presença de CEA nas fezes e no soro conforme mostrado na Tabela 2. Nenhum animal C57Bl6 ou Apc apresentaram nenhum sinal de CEA. Os animais CEA positivos apresentavam CEA detectável nas fezes desde os 2 meses e estes valores não aumentavam com o avanço da idade. Já a presença de CEA no soro começou a ser detectada após os 4 meses, aparentemente ocorria um aumento destes valores com o aumento da idade. Devido ao pequeno número de animais estes dados não puderam ser submetidos à análise estatística.

A presença de sangue oculto nas fezes ocorria em todos os animais Apc positivos desde os 2 meses de idade conforme mostrado na Figura 8. Isso ocorria antes mesmo destes animais apresentarem qualquer tipo de alteração histológica conforme mostrado na Figura 9. Uma das hipóteses seria a presença de colite ou

micro-ulcerações da mucosa com soluções de continuidade, porém, estas hipóteses não foram confirmadas.

Tabela 2 - Tabela mostrando animais C57Bl6, CEA e Apc/CEA aos 2, 4, 6 e 8 meses e sua relação com a presença de CEA nas fezes, no soro e sangue oculo nas fezes.

Idade (meses)	No animal	<i>Apc</i> Genotipo	CEA Genotipo	CEA fezes ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of proteína)	CEA Soro ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Sangue Oculito Fezes
2	1117	+/+	-/-	Neg.	Neg.	-
	1110	+/+	-/-	Neg.	Neg.	-
	1115	+/-	+/-	26.4	Neg.	+
	1116	+/-	+/-	3.0	Neg.	+
4	1010	+/+	-/-	Neg.	Neg.	-
	1011	+/+	-/-	Neg.	Neg.	-
	1014	+/-	+/-	ND	2.35	+
	1016	+/-	+/-	8.0	4.66	+
6	313	+/+	-/-	Neg.	Neg.	-
	316	+/+	-/-	Neg.	Neg.	-
	312	+/-	+/-	16.8	14.2	+
	314	+/-	+/-	1.0	ND	+
8	25	+/-	+/-	0.5	ND*	+
	47	+/-	+/-	0.8	23.6	+

5.1.7 Apc/CEA - Genotipagem

A avaliação da expressão gênica dos animais Apc/CEA foi realizada conforme descrito para os animais CEA e Apc em duas reações de PCR separadas. Foram considerados APC/CEA os animais positivos em ambas as reações, conforme previamente demonstrado na Figura 7, com dois animais duplamente positivos.

5.1.8 Apc/CEA - Imuno-histoquímica (Pólipos/CEA)

O exame histológico dos animais Apc/CEA foi feito com a imuno-histoquímica utilizando-se anticorpo monoclonal contra o CEA. A Figura 12 mostra que da mesma maneira que ocorre em humanos, o tecido degenerado de aspecto polipóide apresenta-se com maior expressão da proteína CEA.

**Tecido
Normal**
▶

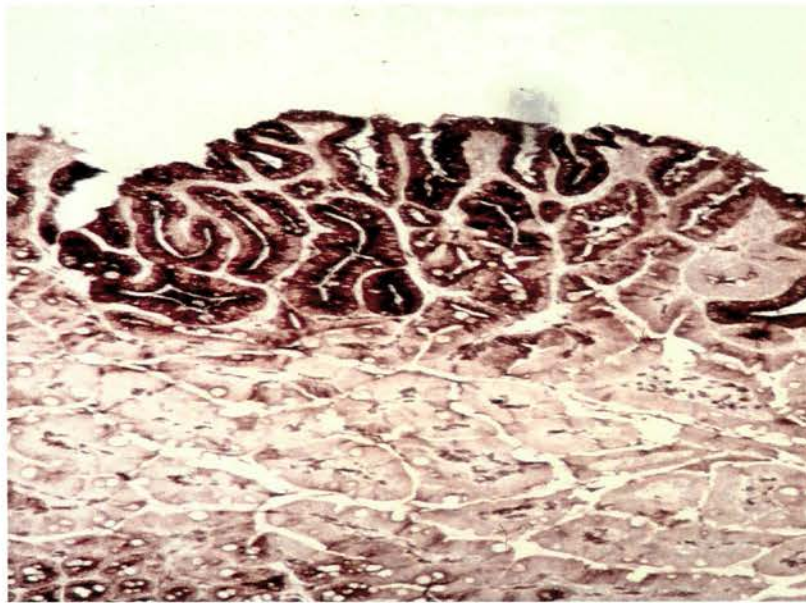
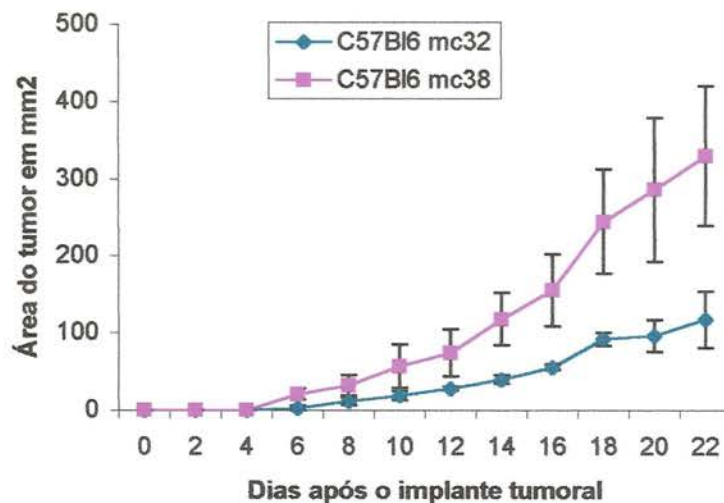


Figura 12 - Fotografia de exame imuno-histoquímico contra o CEA em pólipo adenomatoso de animal Apc/CEA. A região com alteração polipóide adenomatosa apresenta intensa coloração para o CEA. O tecido com aspecto normal adjacente apresenta-se também positivo, mas com baixa intensidade.

Este achado tem uma maior relevância a este modelo animal porque também apresenta o antígeno CEA expresso de maneira fisiológica no tecido colônico normal adjacente, conforme mostrado na Figura 9. Neste modelo o CEA não é um antígeno tumoral único e, como também ocorre na maioria dos tumores do trato digestivo humano, está superexpresso no tecido neoplásico e presente em outros tecidos.

5.2 EVOLUÇÃO DOS TUMORES IMPLANTADOS NOS ANIMAIS C57BL6 NÃO IMUNIZADOS

Quando se comparam as duas linhagens tumorais em uma mesma linhagem de animais, verifica-se que o tumor mc-38 apresenta um crescimento mais acelerado em relação ao mc-32, conforme mostrado na Figura 13. Este fato também é observado *in-vitro*. Quando plaqueados o mesmo número de células tumorais mc-38 ou mc-32 em dois frascos, a primeira cultura se torna confluyente em um tempo mais curto (dados não mostrados), sugerindo que o tempo de duplicação de mc-38 seja menor do que o tempo de duplicação de mc-32.



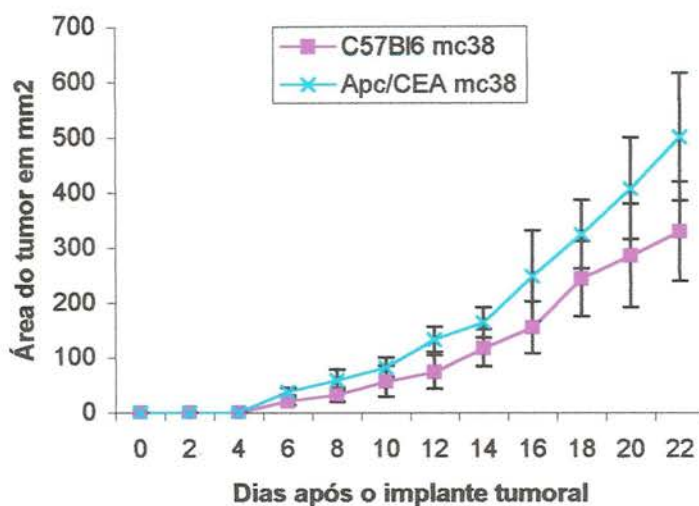
n = 10 animais por grupo.

Figura 13 - Maior crescimento do tumor mc-38 em comparação ao tumor mc-32 nos animais C57Bl6. Foram implantados 2×10^5 células de cada linhagem tumoral no flanco, de animais C57Bl6. O tumor era medido a cada 2 dias. Barras mostram o desvio padrão da média.

5.3 EVOLUÇÃO COMPARATIVA DOS TUMORES IMPLANTADOS NOS ANIMAIS C57BL6, Apc, CEA E Apc/CEA.

Quando o mesmo número de células tumorais mc-38, CEA negativo, foi implantado de maneira comparativa em camundongos Apc/CEA e C57Bl6, este cresceu de maneira mais rápida nos camundongos Apc/CEA. Porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa em nenhum tempo desde o implante, conforme mostrado na Figura 14.

O mesmo se observou quando este tumor foi implantado nos camundongos Apc ou CEA (dados não mostrados). Nestes animais também o crescimento deste tumor CEA negativo foi ainda mais próximo do crescimento nos animais C57Bl6. Existem relatos de que possam existir uma facilitação para o crescimento tumoral em animais transgênicos (TILLI e FURTH 2003). Esta facilitação poderia ser ainda maior nos animais duplamente manipulados geneticamente, transgênicos para o CEA humano e Knock-out para o Apc como o Apc/CEA. Mesmo assim não evidenciamos diferenças de evolução tumoral estatisticamente significativas para tumores CEA negativos.

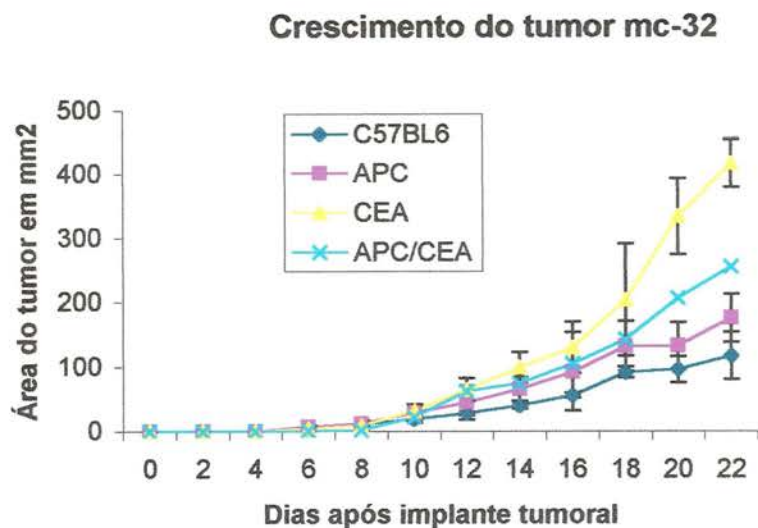


n = 5 animais por grupo.

Figura 14 - Crescimento comparável do tumor mc-38 nos animais C57Bl6 e Apc/CEA. Foram implantados 2×10^5 células de cada linhagem tumoral no flanco, sendo o tumor medido a cada 2 dias. A curva de crescimento para os animais Apc e CEA localizava-se entre as duas mostradas. (Dados não mostrados). Barras mostram o desvio padrão da média.

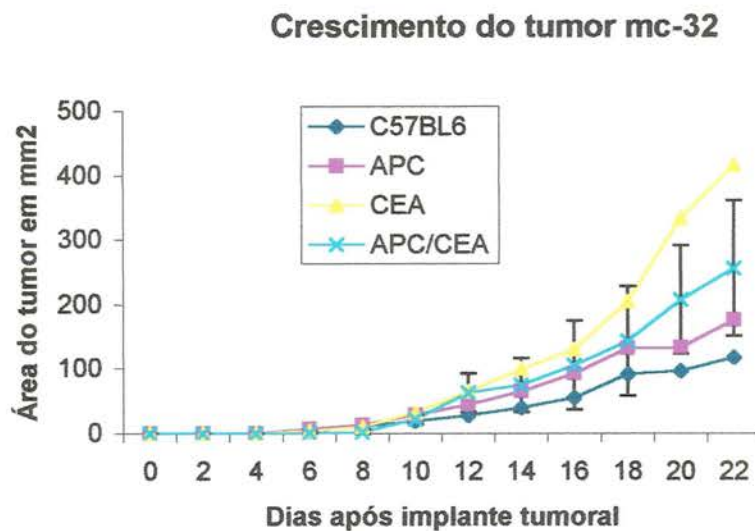
Quando o tumor implantado foi o mc-32, CEA positivo, a diferença de crescimento nos dois grupos de animais foi maior, conforme mostrado na Figura 15. Os animais C57Bl6 apresentaram os menores tumores em todos os tempos. Quando se comparou o tamanho dos tumores após o 20º dia do implante, os animais CEA apresentavam os maiores tumores. Esta diferença foi estatisticamente significativa quando comparamos com todos os grupos.

A



n = 5 animais por grupo.

B

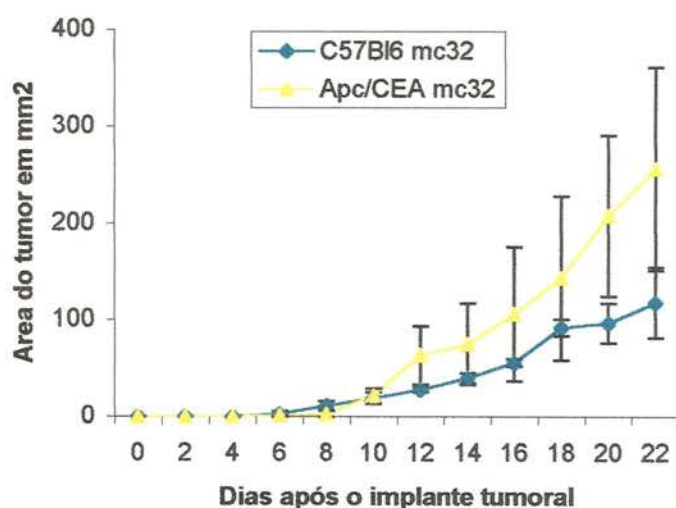


n = 5 animais por grupo.

Figura 15 - Evolução do tumor mc-32 implantado nos animais C57Bl6, Apc, CEA e Apc/CEA. Os gráficos A e B são idênticos com exceção do desvio padrão da média que foi mostrados em dois gráficos para serem melhor visualizados.

No grupo de animais Apc/CEA, houve uma grande diferença individual dos resultados, gerando um altíssimo desvio padrão conforme visto em detalhe na Figura 15B. Isso fez com que este grupo não apresentasse variação de crescimento tumoral estatisticamente significativa, quando comparado com os demais. Mesmo assim, conforme pode ser visto na Figura 15, os animais Apc e CEA apresentavam tamanhos tumorais diferentes.

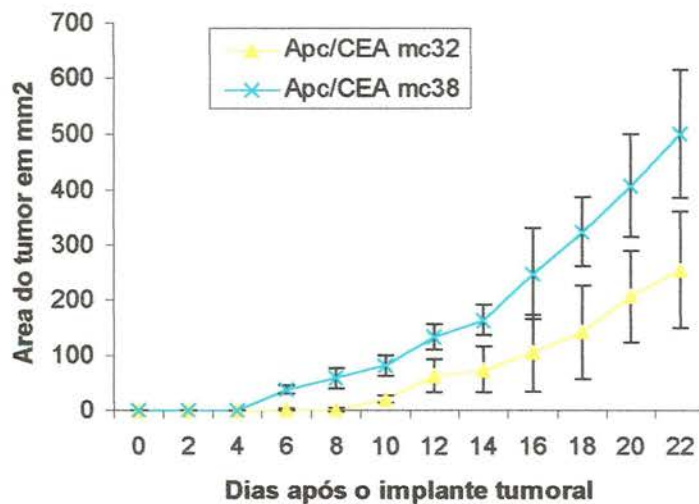
Os camundongos CEA já expressam o CEA desde a fase embrionária, já sendo tolerantes contra este antígeno e, parece haver uma quebra parcial desta tolerância nos animais Apc/CEA, gerando alguma resposta que torna os tumores menores do que nos camundongos Apc e comparáveis com animais não transgênicos e conseqüentemente não tolerantes, conforme mostrado na Figura 16.



n = 5 animais por grupo.

Figura 16 - Crescimento comparável do tumor mc-32 nos animais C57Bl6 e híbridos Apc/CEA. Foram implantados 2×10^5 células de cada linhagem tumoral no flanco, sendo o tumor medido a cada 2 dias. Barras mostram o desvio padrão da média.

Da mesma maneira como mostrado na Figura 13 para os animais C57BL6, nos animais transgênicos Apc/CEA também foi observado um maior crescimento do tumor mc-38 quando comparado com o mc-32, conforme mostrado na Figura 17. Ao compararmos o tamanho absoluto dos tumores no mesmo tempo nos animais Apc/CEA e C57Bl6, observamos o aumento do tamanho do tumor nos animais transgênicos, independente da linhagem tumoral implantada.

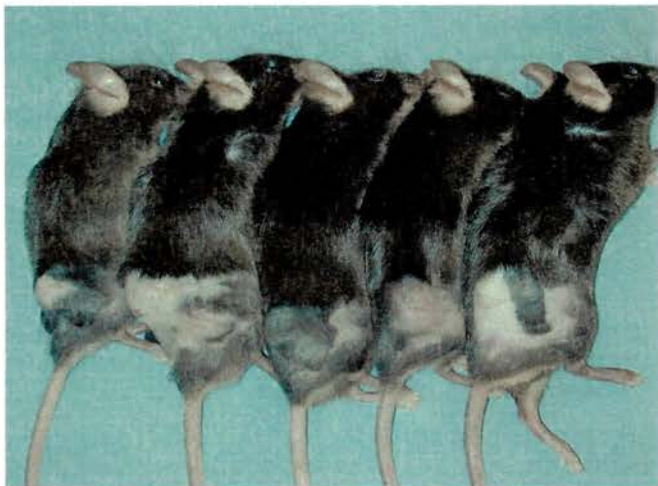


n = 5 animais por grupo.

Figura 17 - Maior crescimento do tumor mc-38 em comparação ao tumor mc-32 nos animais Apc/CEA. Foram implantados 2×10^5 células de cada linhagem tumoral no flanco, sendo o tumor medido a cada 2 dias. Barras mostram o desvio padrão da média.

Como o tumor era implantado na região lombar direita no subcutâneo, a mensuração era facilmente obtida de maneira precisa conforme pode ser evidenciado na Figura 18 que mostra grupos de animais C57Bl6, Apc, CEA e Apc/CEA com o tumor ainda *in loco*.

A) C57Bl6



B) Apc



C) CEA



D) Apc/CEA

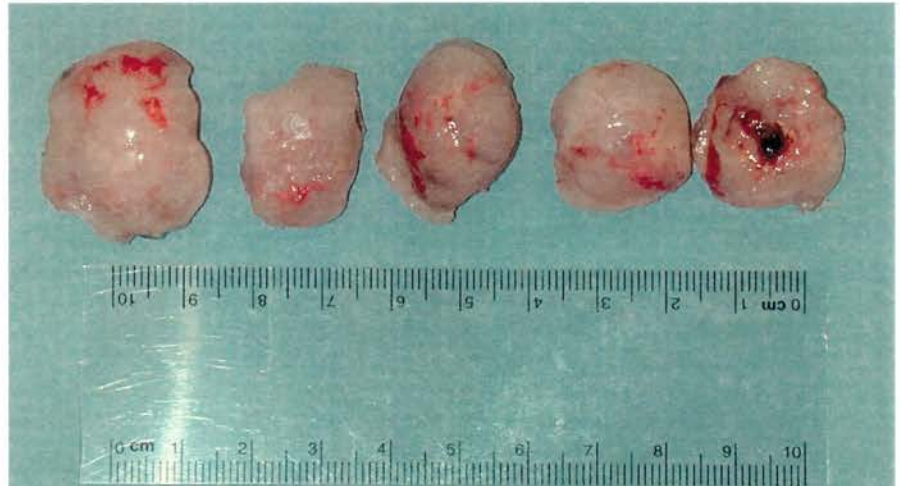


Figura 18 - Animais no 22º dia após o implante tumoral de 2×10^5 células do tumor mc-32(CEA +) no flanco direito. As fotografias A,B,C, e D mostram animais das linhagens C57Bl6, APC, CEA e Apc/CEA, respectivamente.

As Figuras 19 mostram massas tumorais após a ressecção dos mesmos para mostrar que a medida do tumor “in vivo” realmente correspondia ao volume tumoral.

Este cresce de maneira semi-capsulada sem invadir tecidos adjacentes, formando uma massa sólida única.

CEA



CEA/Apc



Apc



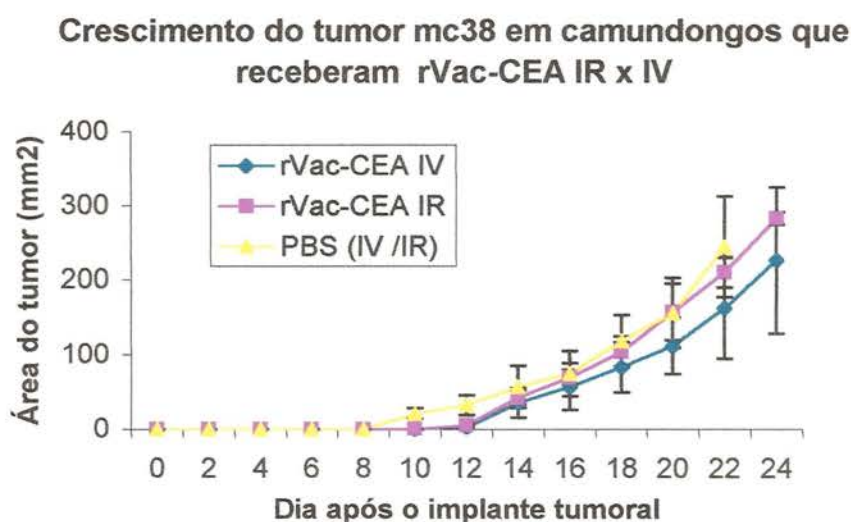
C57Bl6



Figura 19 - Fotografia dos tumores ressecados dos animais mostrados na Figura 18, no 22º dia após o implante tumoral de 2×10^5 células do tumor mc-32(CEA +) no flanco direito. As fotografias mostram animais das quatro linhagens estudadas, conforme legenda à esquerda.

5.4 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL NOS ANIMAIS IMUNIZADOS EM COMPARAÇÃO AO GRUPO CONTROLE IMUNIZADO COM SOLUÇÃO SALINA PBS.

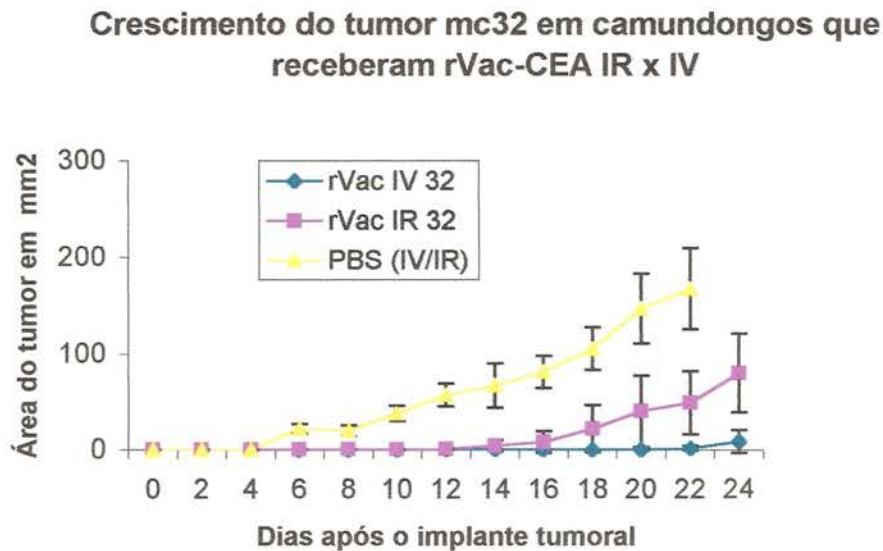
Nos animais C57Bl6 que foram imunizados com 3 doses do vetor rVac-CEA ou PBS por via IR ou IV, não houve nenhum tipo de proteção para o implante do tumor mc-38, conforme mostrado na Figura 20. Como esperado, independente do vetor empregado na imunização ou da rota, todos apresentaram tumores de tamanhos comparáveis, quando este não apresentava o CEA. Este resultado foi importante para deixar claro que o vetor vaccinia com o CEA não conferia nenhum tipo de proteção para tumores CEA negativo sendo seus resultados comparáveis com o PBS.



n = 6 animais por grupo.

Figura 20 - Imunização com o vetor Vaccinia recombinante com o CEA ou PBS, por via intra-retal ou venosa, não protege contra o implante de tumores CEA negativos. Os animais foram imunizados com 3 doses de rVac-CEA ou PBS, EV ou IR e a seguir, receberam o implante de 2×10^5 células do tumor mc-38 no flanco. Barras mostram o desvio padrão da média.

Quando os animais foram imunizados com PBS por via IR ou EV não houve nenhum tipo de proteção para o implante de tumores mc-32, conforme mostrado na Figura 21 da mesma maneira como ocorreu com o tumor mc-38, conforme mostrado na Figura 20.



n = 6 animais por grupo.

Figura 21 - Imunização com o vetor Vaccinia recombinante com o CEA, por via intra-retal ou venosa, protege contra o implante de tumores CEA positivos. Os animais foram imunizados com 3 doses de rVac-CEA ou PBS, EV ou IR e a seguir, receberam o implante de 2×10^5 células do tumor mc-32 no flanco. Barras mostram o desvio padrão da média.

5.5 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO TUMORAL NOS ANIMAIS IMUNIZADOS EM COMPARAÇÃO AO GRUPO CONTROLE IMUNIZADO COM O VETOR VACCINIA RECOMBINANTE COM LAC-Z.

Conforme descrito em métodos, os experimentos anteriores mostrados nas Figuras 20 e 21 tiveram como grupo controle animais imunizados com solução salina PBS. Especificamente os resultados da Figura 21 mostraram que os animais imunizados com rVac-CEA apresentavam alguma proteção imunológica, pois desenvolveram menores tumores. Porém, esta proteção poderia estar relacionada a alguma resposta induzida pelo vírus vaccinia e não diretamente relacionada à presença do CEA neste vetor.

Para esclarecer esta dúvida, conforme descrito anteriormente, este experimento foi repetido com maior número de animais, tendo como tratamento para o grupo controle o mesmo vetor vaccinia, porém recombinante com o gene Lac-Z.

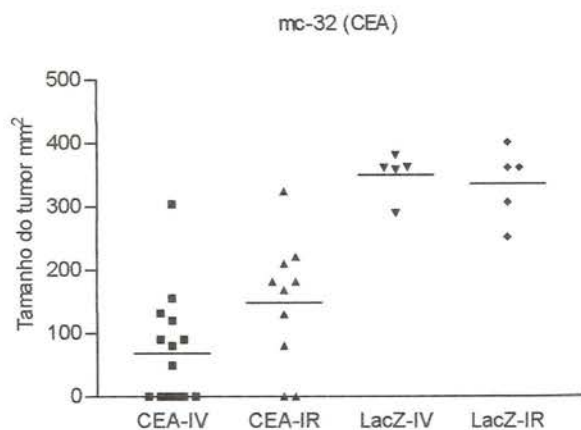
Animais C57Bl6 foram imunizados com o vírus vaccinia recombinante com o CEA por via EV ou IR; como controle, animais foram imunizados com o mesmo vírus, porém apresentando gene do Lac-Z no lugar do CEA por via IR ou IV. No 7º dia após a 3ª dose da imunização foi feito o implante tumoral de células mc-32 (CEA+) e mc-38 (CEA-). Os implantes tumorais eram medidos a cada dois dias e mostraram que quando implantado o tumor CEA+, os animais que receberam a imunização com o vírus vaccinia transduzido com CEA por via EV apresentavam os menores tumores sendo que 6 animais estavam livres de crescimento tumoral conforme mostrado na Figura 22A. O grupo de animais que recebeu a mesma

imunização por via Intra-retal apresentou dois animais livres de tumores e proteção relativa quando comparado com os grupos controles imunizados com o vaccinia Lac-Z. Os animais imunizados com o vírus vaccinia recombinante com o lac-Z apresentaram o mesmo tamanho tumoral independente da via de imunização. O tamanho dos tumores no 22º dia após o implante tumoral não foi estatisticamente diferente entre os grupos imunizados com o vírus vaccinia-CEA por via retal ou venosa, $p > 0,05$. Porém, quando comparados com o grupo controle, o grupo vacinado com o vetor rVac-CEA apresentou tumores estatisticamente menores com $p < 0,05$.

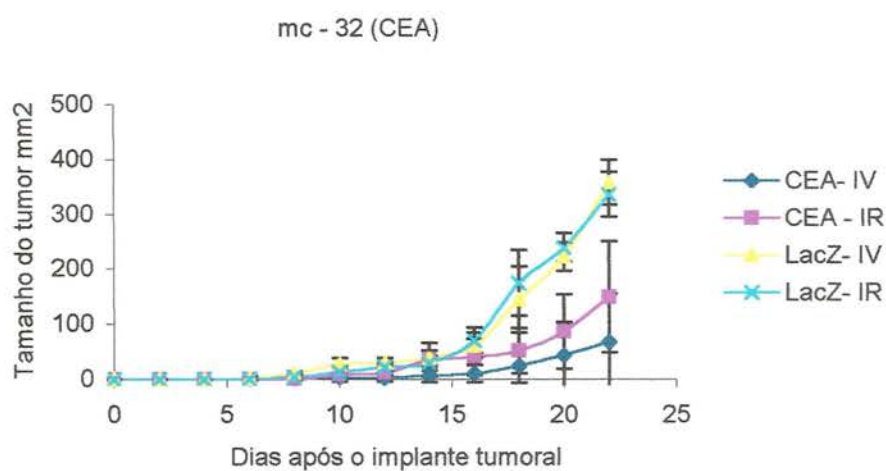
Quando foi implantado o tumor mc-38, CEA-, não se observou nenhuma diferença estatística quanto ao tamanho dos tumores em nenhum dos grupos, independente da imunização com rVac-Lac-Z ou rVac-CEA por via retal ou venosa, conforme mostrado na Figura 23. Isto mostra que a proteção ao implante tumoral era dependente da presença do gene do CEA no vetor e que esta proteção só era específica para tumores CEA positivos. Próximo do 12º dia pós-implante (DPI) a totalidade dos animais apresentavam tumores macroscópicos conforme mostrado na Figura 18.

Os animais imunizados com o vírus rVac-CEA por via EV apresentaram uma grande proteção com 50% dos animais livres de tumor e os que não foram protegidos apresentaram tumores com menor área e crescimento mais lento conforme mostrado na Figura 22. Para os animais imunizados com este mesmo vetor, por via IR, a proteção foi menor, mas também estatisticamente significativa quando comparada com o grupo imunizado com o PBS. Comparando-se com o grupo PBS o p para o grupo rVac-CEA por via intra-retal foi $< 0,05$ e para a via intravenosa foi $< 0,01$ através do teste de t de student.

A



B



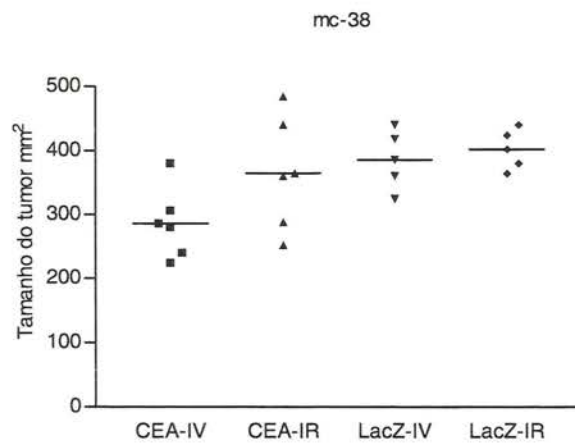
n = 15 animais no grupo rVac-CEA-IV.

n = 10 animais no grupo rVac-CEA-IR.

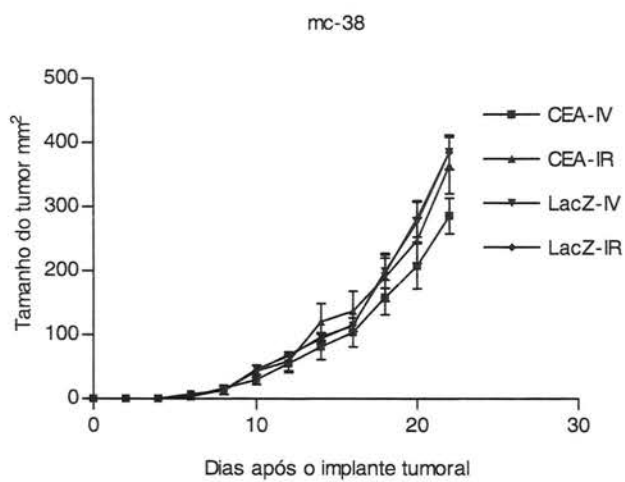
n = 5 animais no grupo rVac-Lac-Z- IR ou IV.

Figura 22 - Gráficos mostrando o crescimento do tumor mc-32, CEA + em camundongos imunizados com o vetor rVac-CEA ou rVac-lac-Z por via retal ou venosa. A figura A mostra a área dos tumores após o 22^o DPI e a figura B mostra o crescimento progressivo nos 22 dias . Barras mostram o desvio padrão da média.

A



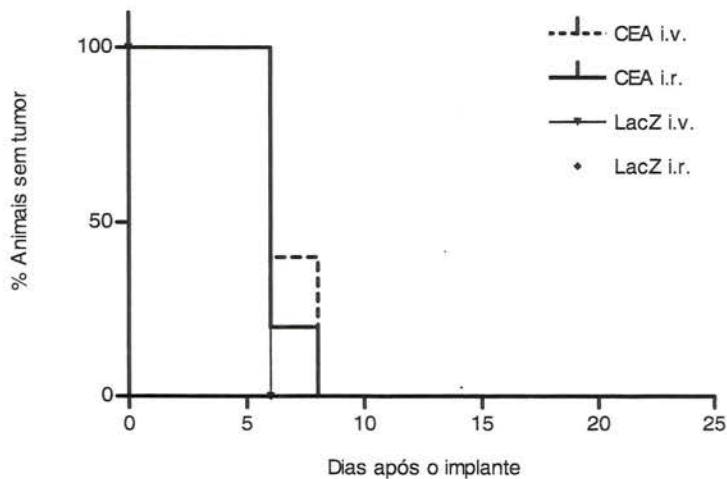
B



n = 6 animais por grupo.

Figura 23 - Gráficos mostrando o crescimento do tumor mc-38, CEA - em camundongos imunizados com o vetor rVac-CEA ou rVac-lac-Z por via retal ou venosa. A figura A mostra a área dos tumores após o 22^o DPI e a figura B mostra o crescimento progressivo nos 22 dias. Barras mostram o desvio padrão da média.

Os grupos de animais que receberam a vacina rVac-CEA ou rVac-Lac-Z por via venosa ou intra-retal e foram implantados com o tumor mc-38 não apresentaram nenhum animal curado ou aumento da sobrevida, conforme mostrados na Figura 24.

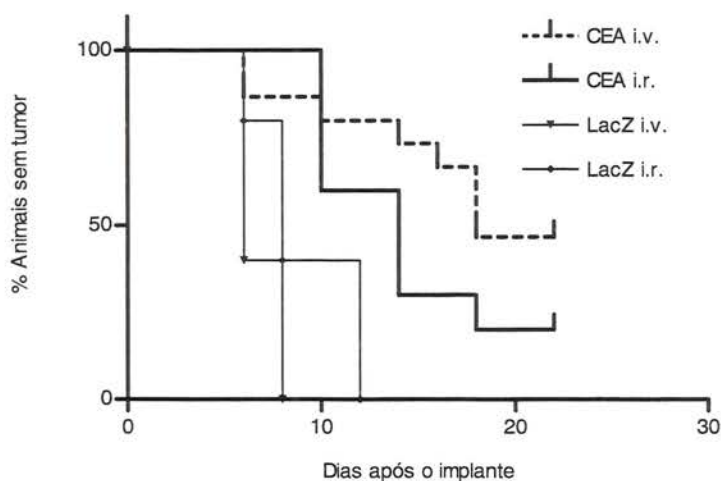


n = 6 animais por grupo.

Figura 24 - Curva de Kaplan-Meier com a análise da sobrevida livre de tumor até o 22º dia em animais imunizados de acordo com a legenda e transplantados com a linhagem mc-38 (CEA-).

Os animais que receberam a imunização com rVac-CEA por via venosa apresentaram mais de 35% de animais livres de tumor no 22º DPI. O grupo que recebeu a mesma imunização por via retal apresentou 20% de animais livres de tumor, conforme mostrado na Figura 25.

Não houve nenhum tipo de proteção para os animais imunizados com o rVac-Lac-Z por qualquer via, implantados com o tumor mc-32, conforme mostrado na Figura 25.



n = 15 animais no grupo rVac-CEA-IV.

n = 10 animais no grupo rVac-CEA-IR.

n = 5 animais no grupo rVac-Lac-Z- IR ou IV.

Figura 25 - Curva de Kaplan-Meier mostrando a evolução até o dia 22 dos animais imunizados de acordo com a legenda. Estes animais receberam o implante do tumor CEA+, mc-32.

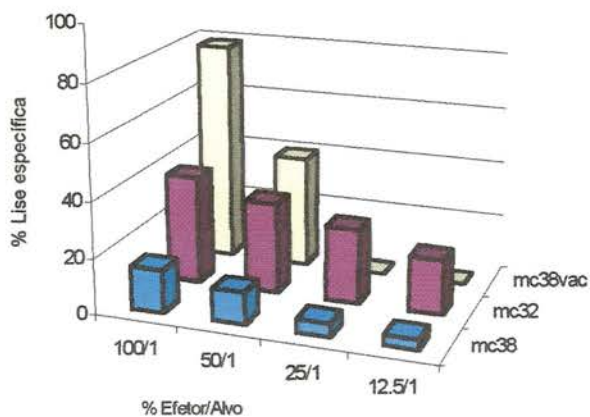
5.6 RESPOSTA IMUNOLÓGICA (CTL) NOS ANIMAIS IMUNIZADOS ANTES DO IMPLANTE TUMORAL

Os animais imunizados com o vetor rVac-CEA quando sacrificados tiveram o baço e as placas de Peyer removidos para a coleta de linfócitos. Estes linfócitos que representavam a resposta imunológica sistêmica e mucosa foram avaliados quanto a sua citotoxicidade contra tumores CEA positivos e negativos, respectivamente, mc-32 e mc-38. Também foram avaliadas suas citotoxicidades contra o vírus vaccinia. Para esta avaliação precisávamos de um alvo vaccinia específico. A linhagem mc-38 foi infectada com o vírus vaccinia simples conforme descrito em materiais e métodos e foi designada mc-38vac.

Esta avaliação da resposta imunológica, conforme descrita em métodos, foi realizada em dois tempos distintos. As Figuras de número 26 a 30 mostram os resultados de animais que foram sacrificados 7 dias após a terceira imunização e antes do implante tumoral.

As Figuras de número 31 a 35 mostram resultados de animais que também receberam as 3 doses de imunização, receberam o implante tumoral no 10^o dia após a terceira dose e foram sacrificados no 22^o dia após o implante tumoral, 32^o dia após a terceira dose de imunização. Merece ser mencionado que nos primeiros experimentos os animais que receberam o implante de tumores CEA positivo ou negativo foram processados de maneira distinta. Empregou-se esta metodologia para avaliar se a presença de tumores com o CEA ou não poderia otimizar ou inibir a resposta imunológica contra o CEA. Foi evidenciado que a presença do CEA no tumor implantado não afetava a resposta imunológica e que esta era decorrente apenas do tipo e via de imunização empregada (dados não mostrados).

Antes da apresentação dos resultados deve ser novamente comentado que o vírus vaccinia é muito imunogênico. Sempre que este vetor foi empregado como veículo carreador de gene, a resposta imunológica induzida contra os antígenos virais era mais forte do que a gerada contra o gene inserido neste vetor. A Figura 26 mostra que a citotoxicidade de linfócitos extraídos do baço (esplenócitos) de animais imunizados com rVac-CEA, por via endovenosa, foi de quase 80% contra um alvo que expressava unicamente antígenos virais (mc-38vac), de quase 40% contra alvo CEA positivo. Apresentou uma citotoxicidade basal próximo de 15% para o alvo controle CEA negativo, mc-38, em uma proporção de 100 células efetoras para uma célula alvo.



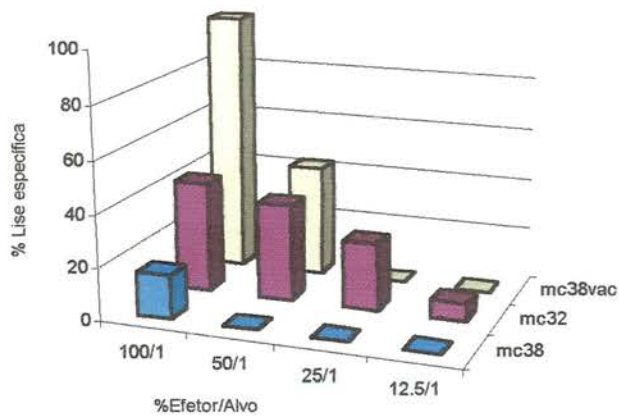
n = 3 animais por grupo.

Figura 26 - Citotoxicidade específica de esplenócitos de animais imunizados com o rVac-CEA por via endovenosa. O eixo x mostra a proporção entre células efetoras/célula alvo, o eixo Y mostra a citotoxicidade ou lise específica e o eixo Z os diferentes alvos celulares.

A Figura 27 também mostra o efeito citotóxico de esplenócitos de animais imunizados com rVac-CEA, porém, por via intra-retal. Pode-se evidenciar que a resposta imunológica sistêmica mensurada no baço após imunização intra-retal ou intravenosa é muito semelhante. Mantendo-se a mesma proporção de 100 células efetoras para uma alvo, temos próximo de 100% contra os antígenos virais por via IR quando comparados a 79% por via EV. O mesmo ocorre na resposta contra um alvo CEA positivo, a citotoxicidade foi de 42% para a imunização IR e de 38% para a imunização EV.

Pelos resultados mostrados nas Figuras 26 e 27, poderíamos concluir que, a resposta imunológica no baço medida através da citotoxicidade de linfócitos T é a mesma após uma imunização realizada por via endovenosa ou intra-retal. Isto não

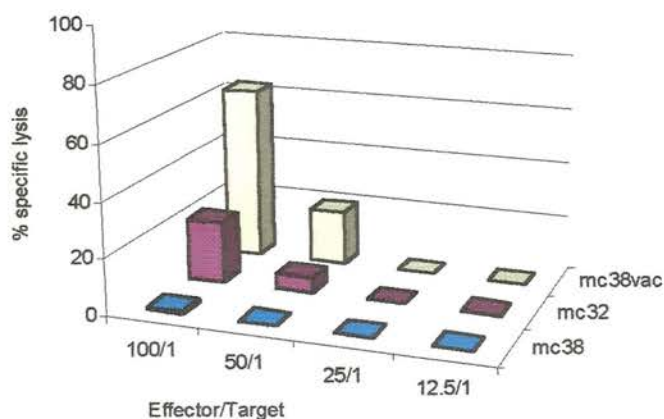
significa necessariamente que as duas vias de imunização devam apresentar o mesmo tipo de proteção. Isso foi mostrado na Figura 22 onde os resultados apresentam um maior grau de proteção para tumores CEA positivos após imunização por via venosa quando comparado com a via retal.



n = 3 animais por grupo.

Figura 27 - Citotoxicidade específica de esplenócitos de animais imunizados com o rVac-CEA por via intra-retal. O eixo x mostra a proporção entre células efectoras/célula alvo, o eixo Y mostra a citotoxicidade ou lise específica e o eixo Z os diferentes alvos celulares.

Também foi avaliada a citotoxicidade de linfócitos do sistema mucoso. As células efectoras foram obtidas das placas de Peyer dos animais imunizados com o vetor rVac-CEA por via venosa e retal. A Figura 28 mostra que a citotoxicidade aferida no sistema mucoso após imunização sistêmica é menor do que a obtida no baço após a imunização pela mesma via (Figura 26) e por via intra-retal (Figura 27). A citotoxicidade contra o alvo mc-38vac foi de 63%, contra o mc-32 foi de 22% e de 0% contra o mc-38.

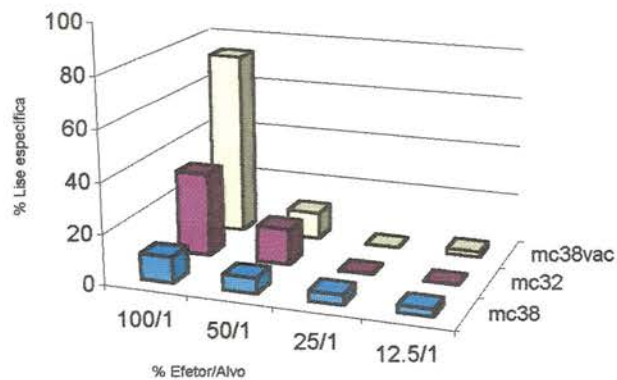


n = 3 animais por grupo.

Figura 28 - Citotoxicidade de linfócitos das placas de Peyer em animais imunizados com o rVac-CEA por via endovenosa. O eixo x mostra a proporção entre células efetoras/célula alvo, o eixo Y mostra a citotoxicidade ou lise específica e o eixo Z os diferentes alvos celulares.

A Figura 29 mostra a citotoxicidade avaliada nas placas de Peyer após imunização intra-retal com o vetor rVac-CEA. Estes resultados também foram inferiores aos obtidos no baço após imunização endovenosa ou intra-retal. Quando se comparam os resultados da Figura 28 com os da Figura 29, observa-se que a resposta citotóxica dos linfócitos das placas de Peyer de animais imunizados por via IR foi maior contra todos os alvos com a imunização por via intra-retal. Merece ser mencionado que nas concentrações de 12,5 e 25 células efetoras contra o alvo mc-38-Vac, não se detecta nenhuma citotoxicidade. Este resultado pode dar a impressão de que existiria um número mínimo de células efetoras para lisar a célula mc-38

infectada pela vírus vaccinia, mas isso não pode ser confirmado e também não se repetiu nos experimentos semelhantes.



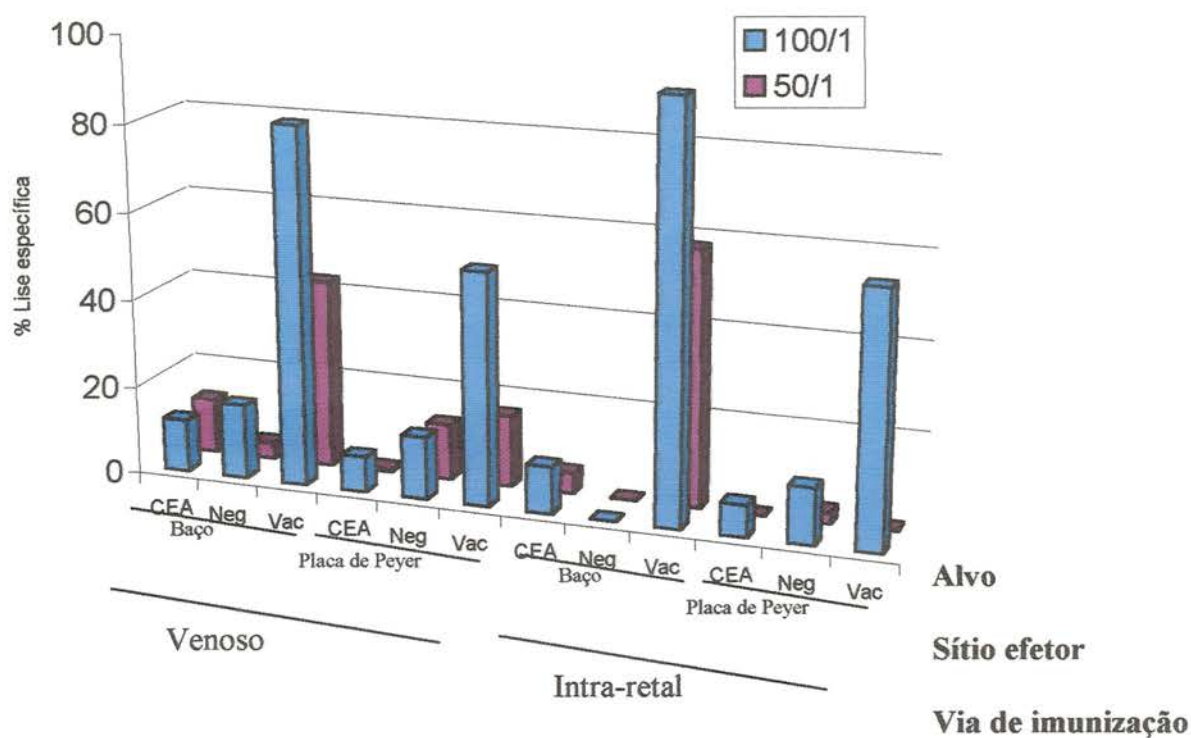
n = 3 animais por grupo.

Figura 29 - Citotoxicidade de linfócitos das placas de Peyer em animais imunizados com rVac-CEA por via intra-retal. O eixo x mostra a proporção entre células efetoras/célula alvo, o eixo Y mostra a citotoxicidade ou lise específica e o eixo Z os diferentes alvos celulares.

Um grupo controle de animais foi imunizado da mesma maneira do que relatado acima, porém o vetor foi o rVac-LacZ. A Figura 30 mostra um resumo comparativo de todos estes resultados. Como pode ser visto, as maiores citotoxicidades observadas foram contra o alvo mc-38vac no baço após imunização EV ou IR, seguidas pela resposta nas placas de Peyer contra este mesmo alvo, também independente da imunização ter sido EV ou IR.

A resposta contra o alvo CEA+, mc-32, foi a mesma do que contra o alvo controle CEA-, mc-38, no baço e nas placas de Peyer após imunização por via endovenosa ou intra-retal. Estes resultados mostram que não houve nenhum tipo de resposta inespecífica e que só observamos citotoxicidade contra alvos CEA+ após imunização com vetores que carregam este gene. Estes resultados corroboram os

obtidos com o vetor rVac-CEA, mostrando que a citotoxicidade no baço e placas de Peyer após imunização EV ou IR são semelhantes mesmo não tendo correlação com o grau de proteção contra tumores CEA positivos implantados.



n = 3 animais por grupo.

Figura 30 - Resumo do experimento, mostrando a citotoxicidade no baço e placas de Peyer em animais imunizados com o vetor controle rVac-Lacz, por via retal ou venosa, de acordo com os alvos CEA(mc-32), Neg (mc-38), Vac (mc38Vac) no 7º dia após o implante tumoral. O gráfico mostra a citotoxicidade com 100 e 50 células efetoras para cada célula alvo respectivamente em azul e vermelho.

5.7 RESPOSTA IMUNOLÓGICA (CTL) NOS ANIMAIS IMUNIZADOS APÓS O IMPLANTE TUMORAL

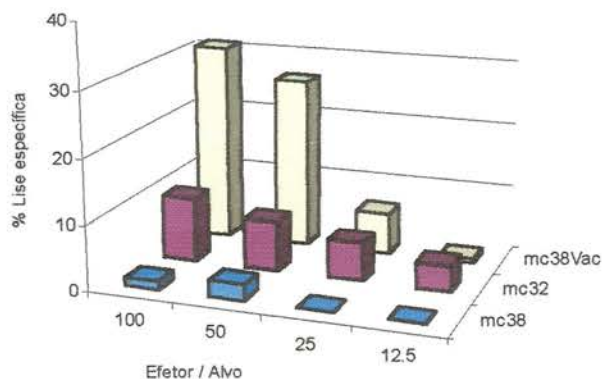
Os resultados mostrados nas próximas figuras mostram a citotoxicidade sistêmica e mucosa contra alvos que expressam o CEA, antígenos virais e controle negativo, conforme mostrado anteriormente. A diferença é que nestes experimentos a citotoxicidade foi medida no 22º dia após o implante tumoral CEA positivo ou negativo e os resultados foram comparáveis, mostrando que a presença do CEA no tumor implantado não afeta a citotoxicidade contra esta proteína. Estes resultados bem como os anteriores foram repetidos e confirmados em 3 experimentos individuais. Como não houve nenhuma diferença de citotoxicidade em relação ao implante tumoral ser CEA negativo ou não, os resultados foram mostrados de maneira conjunta.

A citotoxicidade obtida tardiamente nestes experimentos é menor do que a obtida nos experimentos anteriores. Isto se deve porque já teriam transcorridos 32 dias desde a última imunização e também porque a maioria dos animais evoluiu com tumores volumosos e todas as complicações compatíveis com a síndrome de caquexia tumoral. Esta diferença é mais nítida comparando a citotoxicidade específica máxima. Nos experimentos anteriores ao implante tumoral a citotoxicidade máxima medida foi de 100%, nestes foi de no máximo 32%. Para tanto o eixo Y que nos experimentos anteriores tinha o valor máximo de citotoxicidade de 100%, nos resultados seguintes foi até o valor máximo de 40% para possibilitar uma melhor visualização de cada gráfico.

A Figura 31 mostra que no baço após imunização por via venosa ainda se pôde medir uma citotoxicidade específica contra antígenos virais de 30% e contra o

CEA de 9% na proporção de 100 células efectoras para um alvo. Estes mesmos resultados medidos precocemente antes do implante tumoral e apenas 7 dias após a última dose de imunização foram, respectivamente, de 79 e 38%, conforme foi demonstrado na Figura de número 26.

Também a citotoxicidade inespecífica contra o alvo controle negativo (mc-38) caiu de 15% para 1,4%. Isso poderia ter ocorrido em virtude dos animais, neste último experimento, já estarem com tumores avançados, desnutridos e possivelmente imunossuprimidos.

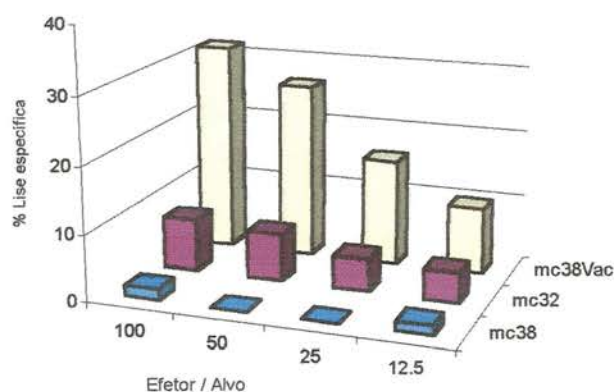


n = 5 animais por grupo.

Figura 31 - Citotoxicidade específica de esplenócitos de animais imunizados com o rVac-CEA, por via endovenosa, no 22º dia após o implante tumoral. O eixo x mostra a proporção entre células efectoras/célula alvo, o eixo Y mostra a citotoxicidade ou lise específica e o eixo Z os diferentes alvos celulares.

Nos resultados mostrados na Figura 32, vemos que a citotoxicidade medida no baço após a imunização intra-retal também diminui muito contra todos os alvos em comparação com os resultados mostrados na Figura 27. Esta redução é

proporcionalmente maior do que a observada no baço tardiamente após a imunização endovenosa mostrada na Figura 31. De alguma maneira a imunização intra-retal foi menos eficiente do que a venosa em gerar memória imunológica. Ou então, os animais que receberam a imunização intra-retal apresentavam maiores tumores e, conseqüentemente, maior imunossupressão diminuindo a eficácia da resposta imunológica.

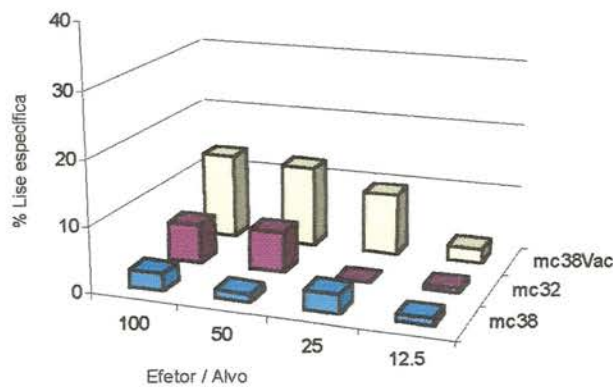


n = 5 animais por grupo.

Figura 32 - Citotoxicidade específica de esplenócitos de animais imunizados com o rVac-CEA, por via intra-retal, no 22º dia após o implante tumoral. O eixo x mostra a proporção entre células efectoras/célula alvo, o eixo Y mostra a citotoxicidade ou lise específica e o eixo Z os diferentes alvos celulares.

A Figura 33 mostra a redução de citotoxicidade mais significativa de todo o experimento. A citotoxicidade medida tardiamente nas placas de Peyer após a imunização endovenosa foi de 13% contra o alvo com antígenos virais, de apenas 6% contra o CEA e de 2,7% para o controle negativo. Os resultados são muito menores do que os mensurados precocemente e mostrados na Figura 28, que foram,

respectivamente, de 63%, 22% e 0%. Estes resultados poderiam ser um indicativo que as placas de Peyer e o sistema imunológico mucoso são capazes de processar uma resposta imunológica após imunização sistêmica, mas são menos capazes de manter uma memória imunológica nestes sítios.

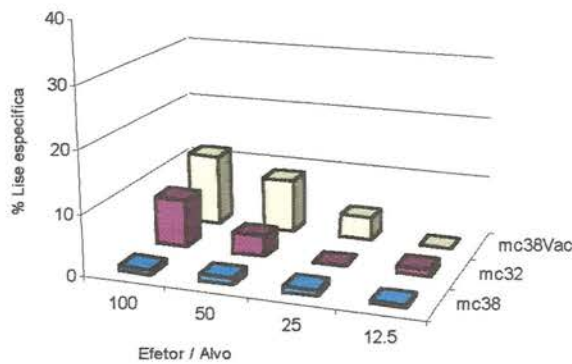


n = 5 animais por grupo.

Figura 33 - Citotoxicidade de linfócitos das placas de Peyer em animais imunizados por via endovenosa no 22º dia após o implante tumoral. O eixo x mostra a proporção entre células efetoras/célula alvo, o eixo Y mostra a citotoxicidade ou lise específica e o eixo Z os diferentes alvos celulares.

A resposta imunológica tardia nas placas de Peyer após a imunização intrarretal mostrada na Figura 34 foi semelhante à observada no mesmo sítio após imunização endovenosa, conforme mostrado na Figura 33. Todos os resultados tardios, obtidos com células das placas de Peyer foram proporcionalmente menores do que os tardios observados com células do baço. Isso mais uma vez reforça a possibilidade do sistema imunológico mucoso representado pelas placas de Peyer, ser um sítio de ativação de respostas imunológicas rápidas porém, menos eficientes para

manter uma memória imunológica. Estes resultados serão abordados com maiores detalhes na discussão.



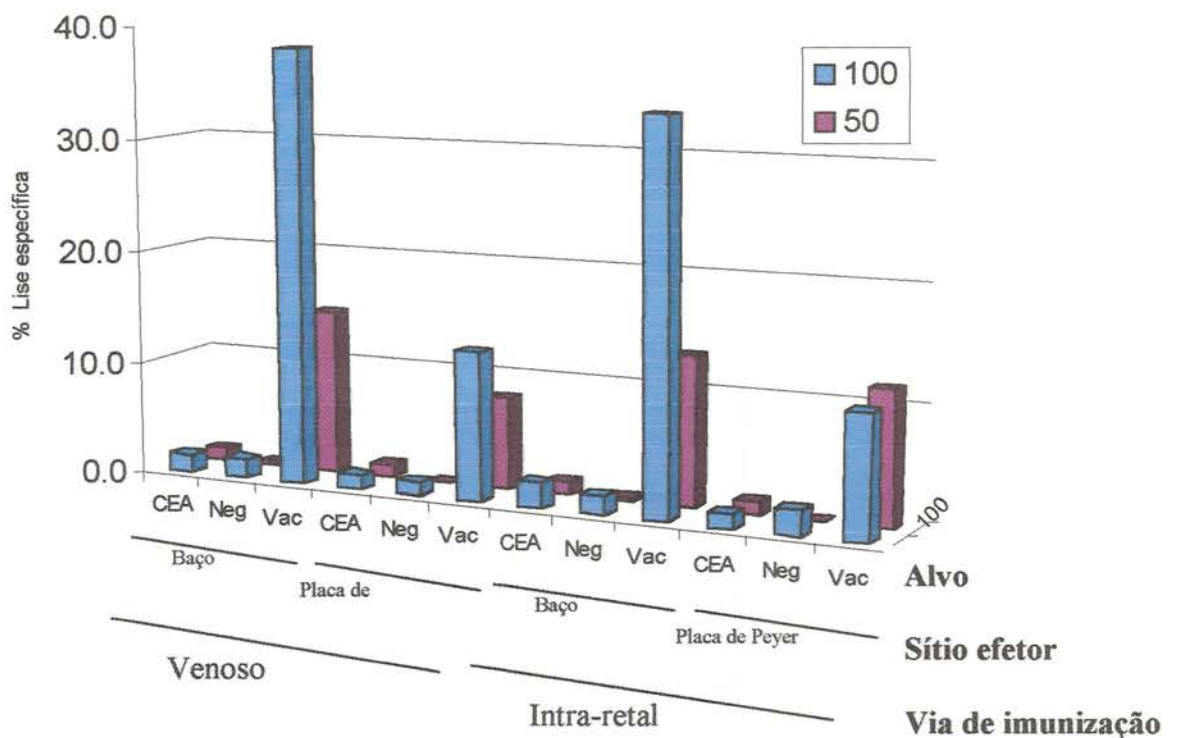
n = 5 animais por grupo.

Figura 34 - Citotoxicidade de linfócitos das placas de Peyer em animais imunizados, por via intra-retal, no 22º dia após o implante tumoral. O eixo x mostra a proporção entre células efectoras/célula alvo, o eixo Y mostra a citotoxicidade ou lise específica e o eixo Z os diferentes alvos celulares.

A mensuração da citotoxicidade tardia, após o implante tumoral, seguiu a mesma metodologia empregada para os experimentos anteriores, que mediram a resposta imunológica precoce. Também tivemos um grupo experimental que foi imunizado com o vetor rVac-lacZ, por via endovenosa ou intra-retal.

Conforme mostrado na Figura 35, estes animais não apresentaram nenhuma resposta citotóxica contra alvos CEA positivos como foi observado na resposta precoce demonstrada na Figura 30. A resposta tardia para o alvo controle negativo também foi insignificante. Assim como se observou tardiamente nos animais imunizados com o vetor rVac-CEA, a resposta citotóxica no baço foi sempre maior

do que a observada nas placas de Peyer independente da imunização ter sido feita por via endovenosa ou intra-retal.



n = 5 animais por grupo.

Figura 35 - Resumo do experimento, mostrando a citotoxicidade no baço e placas de Peyer em animais imunizados com o vetor controle rVac-LacZ por via retal ou venosa de acordo com os alvos CEA(mc-32), Neg(mc-38), Vac(mc-38vac) no 22º dia após o implante tumoral. O gráfico mostra a citotoxicidade com 100 e 50 células efectoras para cada célula alvo, respectivamente em azul e vermelho.

5.8 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O CEA E ANTÍGENOS VIRAIS

A presença de anticorpos também foi medida em uma fase precoce 7 dias após a 3ª dose de imunização, antes do implante tumoral e tardiamente após o implante tumoral, 22 dias após a 3ª imunização. Quanto à presença ou não do CEA no tumor implantado, não houve diferença na produção de anticorpos.

Os animais apresentaram quantidades próximas de anticorpos contra o CEA e antígenos virais, quando avaliados precocemente e tardiamente (dados não mostrados). Sendo assim nos experimentos seguintes o soro dos animais pós-imunização e pós-implante tumoral foi processado em um pool de animais. Não foram avaliados os diversos isotipos de anticorpos.

Para a mensuração de anticorpos contra antígenos virais não relacionados ao CEA a placa de detecção foi recoberta com lisados celulares com mais de 10^8 partículas virais por ml. Este lote de vírus para detecção foi produzido conforme descrito em métodos em células HeLa. O lisado para as imunizações foi produzido em células BSC-1. Foi tomada esta precaução, porque durante a imunização o inóculo viral apresentava quantidade significativa de células BSC-1 lisadas. Estes antígenos celulares poderiam gerar anticorpos anti-BSC-1. Na reação de quantificação de anticorpos tínhamos partículas virais com lisado de células HeLa de maneira que estes possíveis anticorpos anti-BSC-1 não foram mensurados, magnificando de maneira inespecífica o resultado.

Conforme mostrado na Figura 36B, a quantidade de anticorpos contra os antígenos do vírus vaccinia presentes nos soros de animais vacinados com o vetor

rVac-CEA ou rVac-LacZ foi semelhante e independente da via endovenosa ou intra-retal. Estes resultados são comparados na mesma figura com o grupo controle que não recebeu nenhum tipo de imunização e que mostra a quantidade de anticorpos inespecíficos que foram mensurados.

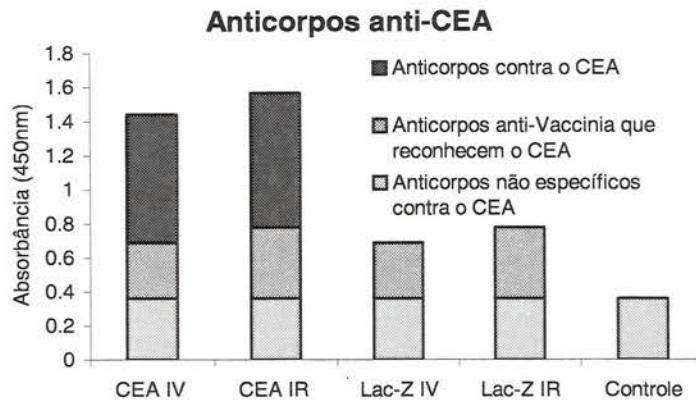
A Figura 36A mostra a reatividade dos anticorpos presentes no soro dos animais imunizados com o CEA bem como o controle adequado. Na coluna do grupo controle à direita do gráfico, estes animais mesmo sem nunca terem tido exposição ao CEA humano, apresentaram uma absorvância de 0,361. Este número foi subtraído de todos os demais por representar reatividade inespecífica de anticorpos presentes no soro que se ligaram ao CEA (parte inferior e mais clara de cada coluna). Os dois grupos controle seguintes referem-se a animais que foram imunizados com rVAC-LacZ por via endovenosa ou intra-retal. Estes animais apresentaram uma absorvância adicional contra o CEA de 0,32 e 0,41, respectivamente. Como estes animais também nunca foram expostos ao CEA pudemos concluir que, se trata de uma reatividade inespecífica. Duas possibilidades poderiam explicar isso, a reatividade cruzada de anticorpos contra vaccinia, que reconhecem o CEA, ou o vírus vaccinia que poderia estimular, inespecificamente, a produção de anticorpos que reconheceriam o CEA. Foram também subtraídos e representam a parte de cor intermediária nas duas colunas à esquerda.

Os dois últimos grupos das colunas à esquerda foram os animais imunizados com o vetor rVac-CEA por via endovenosa ou intra-retal. Pudemos considerar que apenas a parte superior de cada barra poderia ser realmente considerada como quantidade de anticorpos contra o CEA. Em cada barra foi subtraída a quantidade referente aos anticorpos inespecíficos mensurados no grupo controle bem como os

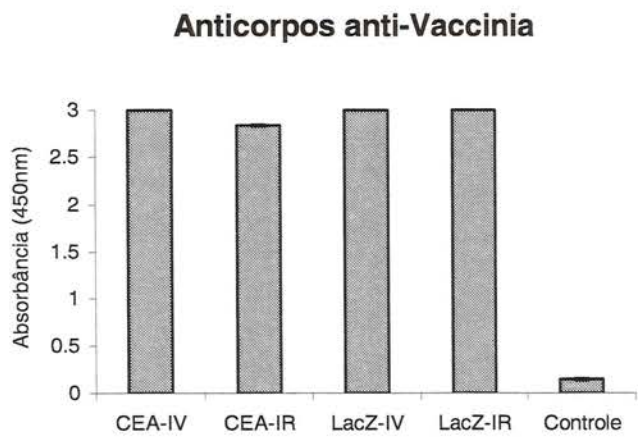
anticorpos específicos contra o vírus vaccinia, que de maneira inespecífica, reconheceram e se ligaram ao CEA. Pôde-se mostrar que os animais imunizados com rVac-CEA por via endovenosa apresentavam absorvância de 0,754 e os por via intraretal apresentavam uma absorvância praticamente idêntica de 0,787, conforme demonstrado na Figura 33A.

A partir dos resultados mostrados na fig. 36A, poderíamos estimar a concentração média de anticorpos contra CEA presentes no soro dos animais imunizados. Utilizamos o anticorpo monoclonal anti-CEA Col-1, com o qual fizemos uma curva de calibração para reatividade deste anticorpo frente a uma quantidade fixa de antígeno, variando a concentração do anticorpo monoclonal. Assumindo a reatividade específica contra CEA obtida no experimento anterior (imunização IV= 0.754 – X; imunização IR= 0.787 – Y), e considerando a afinidade de Col-1, pudemos estimar que a concentração sérica destes anticorpos reativos ao CEA foi de 9,782 $\mu\text{g/ml}$, após imunização endovenosa e de 10,393 $\mu\text{g/ml}$, após imunização intraretal.

A



B



n = 3 animais por grupo.

Figura 36 - Produção de anticorpos contra o CEA, figura A e o vírus vaccinia, figura B, em animais imunizados por via intra-retal ou venosa com o vírus vaccinia Lac-Z ou vaccinia CEA.

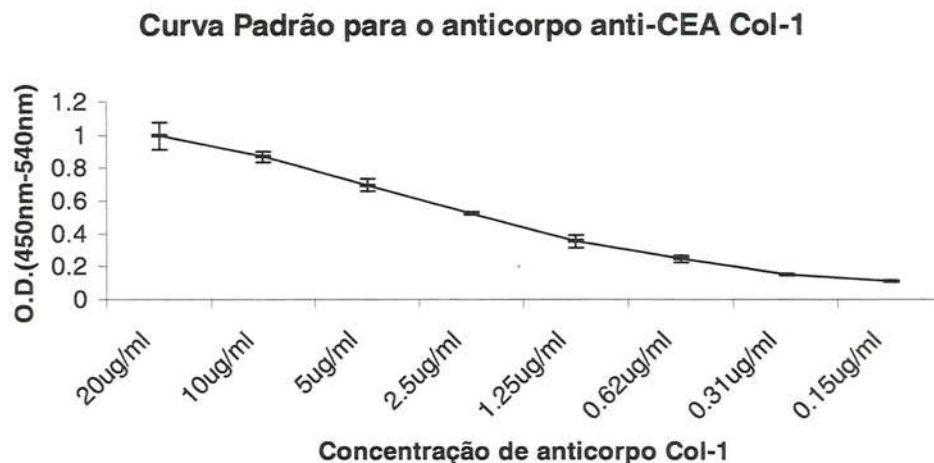


Figura 37 - Curva padrão de absorvância para o anticorpo monoclonal anti-CEA Col-1.

5.9 PROLIFERAÇÃO LINFOCITARIA APÓS IMUNIZAÇÃO

A resposta proliferativa contra o CEA também foi medida em 2 tempos da mesma maneira que a mensuração de citotoxicidade. Não foi feita medida de proliferação contra o vírus vaccinia, porque este é citolítico e durante um procedimento de 5 dias de duração iria infectar e lisar todas as células. Também não dispusemos de antígenos purificados do vírus vaccinia para serem utilizados como imunógenos.

A proliferação de linfócitos foi avaliada frente a três formas de apresentação de CEA: (1) peptídeo CAP- M8 (correspondente aos aminoácidos 526-533 do CEA humano) de apresentação restrita a H-2^b (halotipo de C57Bl6) (KASS et al. 1999); (2) Proteína recombinante CEA ultrapura; (3) lisado de mc-32, linhagem de camundongo que expressa CEA. As Figuras 38A, C e E mostram os resultados

obtidos, avaliando linfócitos do baço de animais imunizados, porém não desafiados pelo implante tumoral de mc-32. As Figuras 38B, D e F mostram os resultados de animais imunizados e desafiados com o implante tumoral (22^o dia após o implante).

Conforme mostrado na Figura 38, não houve um padrão de aumento ou diminuição da resposta proliferativa, considerando-se os 3 imunógenos. Com a estimulação com o peptídeo pudemos observar uma proliferação linfocitária semelhante antes e após o implante tumoral. Este grupo também apresentou uma pequena população de linfócitos de animais que foram imunizados com o vetor rVac-LAC-Z por via EV e IR e que proliferaram na presença deste peptídeo.

As Figuras C e D mostram que a proteína CEA ultrapura não é eficiente para se estimular a proliferação de linfócitos. Foram empregadas 8 concentrações (dados não mostrados) diferentes desta proteína e a concentração mais satisfatória mostrou ser a de 2 µg/ml. Mesmo assim as contagens obtidas foram pouco acima do estimulado com a proteína controle ovoalbumina na mesma concentração.

O terceiro imunógeno empregado foi um lisado celular da linhagem mc-32, largamente empregada neste projeto e com alta expressão de CEA. Utilizando-se este imunógeno não obtivemos populações de linfócitos de animais imunizados com rVac-LacZ que proliferaram. Também, pelo pequeno número de animais não foi possível fazer uma análise estatística para avaliar principalmente no grupo imunizado com rVac-CEA endovenoso se realmente ocorreu uma diminuição da proliferação no grupo avaliado após o implante tumoral.

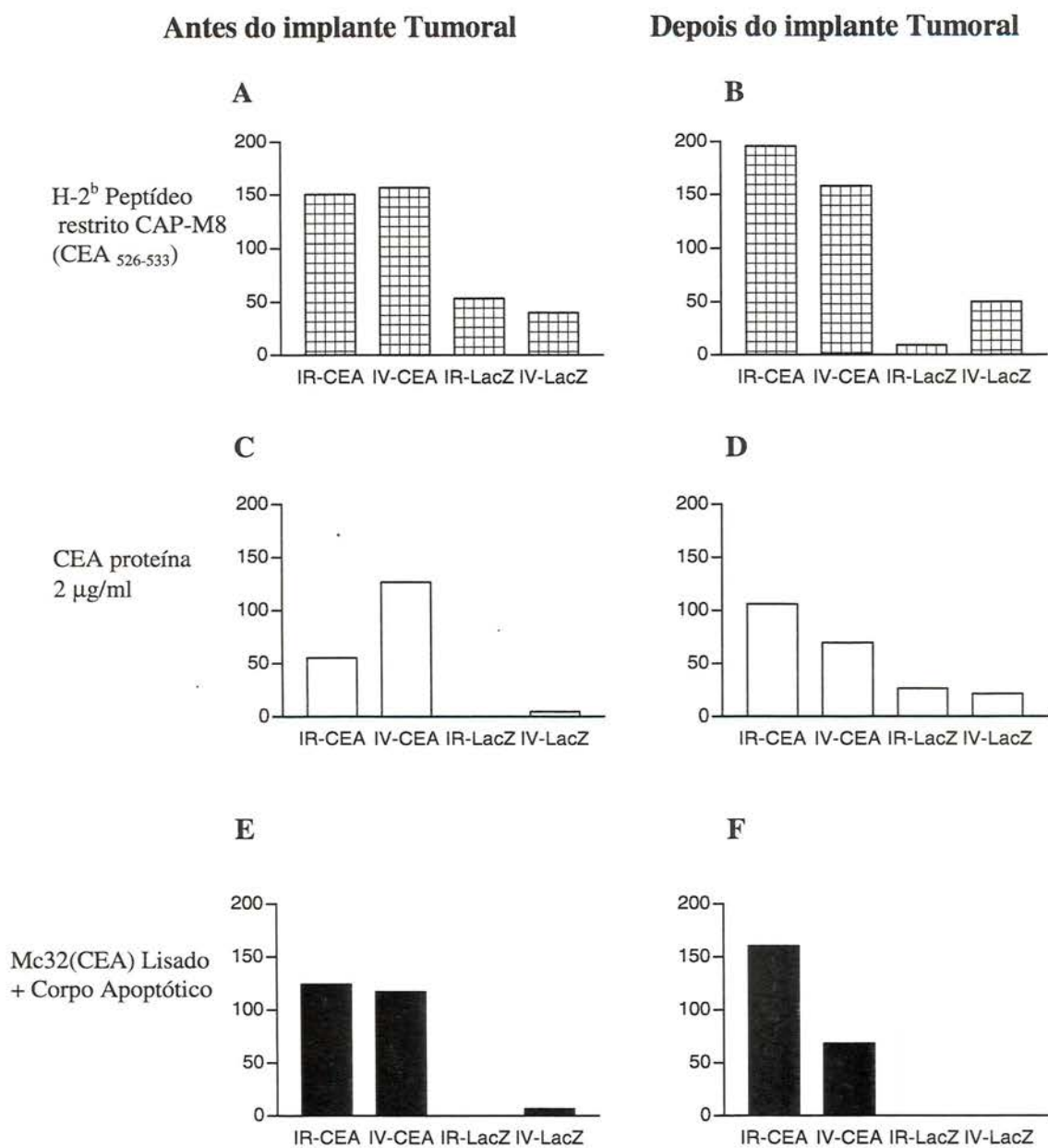


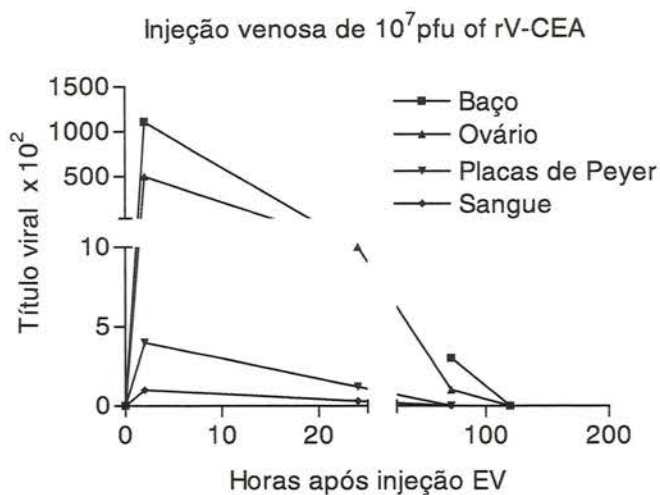
Figura 38 - Proliferação de esplenócitos após imunização venosa ou retal com vaccinia Lac-Z ou vaccinia CEA com os seguintes imunógenos, A e B (peptídeo imunodominante do CEA), C e D (proteína do CEA) e E e F (Lisado com corpos apoptóticos de mc-32). Os gráficos da coluna da esquerda mostram os resultados antes do implante tumoral e os da direita após, no 22^o DPI. O eixo Y mostra a porcentagem de proliferação acima do controle. Cada grupo com 3 animais.

5.10 QUANTIFICAÇÃO DA DISSEMINAÇÃO VIRAL SISTÊMICA APÓS IMUNIZAÇÃO VENOSA E INTRA-RETAL ATRAVÉS DA TITULAÇÃO VIRAL

Um dos objetivos deste projeto foi o de avaliar e quantificar a resposta imunológica sistêmica e mucosa após a imunização endovenosa e intra-retal. Conforme mostrado anteriormente, conseguimos quantificar esta resposta sistêmica e mucosa após a imunização endovenosa e intra-retal.

Uma etapa importante para ajudar a esclarecer esta compartimentalização da resposta imunológica seria a quantificação e avaliação da disseminação viral após a imunização endovenosa e intra-retal.

A Figura 39 mostra que 2 horas após a imunização endovenosa com 10^7 pfu do vetor rVac-CEA, a maior parte dos vírus deixaram a circulação sistêmica. Duas horas após a imunização pudemos detectar 1616 partículas virais sendo 1110 no baço, 500 nos ovário, 4 nas placas de Peyer e apenas 1 no sangue. Após 24 horas pudemos detectar apenas 28,5 partículas virais formadoras de placa sendo 17 no baço, 10 no ovário, 1,2 nas placas de Peyer e 0,3 no sangue. Após 72 horas foram detectados apenas 3 partículas no baço e uma no ovário. É importante ser mencionado que ao contrário do que afirmado em muitos artigos, pode-se detectar a presença viral no sistema imunológico mucoso (placas de Peyer) após imunização sistêmica endovenosa. Sendo assim, como o vírus carregava o gene do CEA, este poderia iniciar uma resposta imunológica mucosa contra este vetor, mesmo após imunização por via sistêmica, independente do fluxo de células apresentadoras de antígenos ou efectoras.

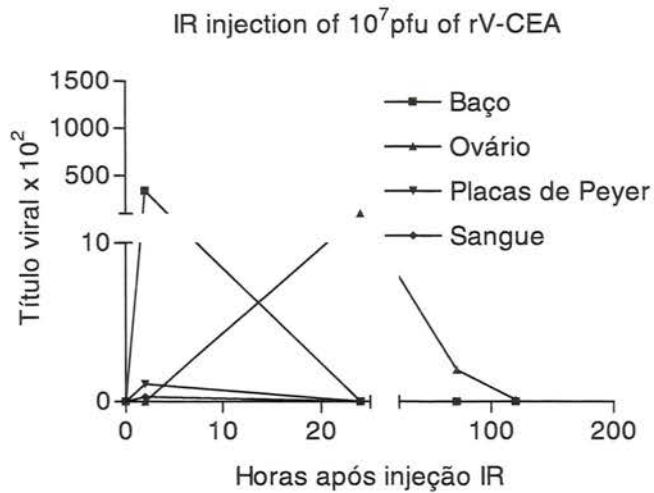


n = 4 animais por grupo.

Figura 39 - Gráfico mostrando a disseminação viral após a injeção endovenosa de 10^7 pfu do vetor rVac-CEA. O eixo Y mostra o número de partículas virais por ml de tecido. O eixo X mostra o tempo após a inoculação. Foram avaliados os títulos no baço, ovário, placas de Peyer e sangue.

A Figura 40 mostra a distribuição viral e sua quantificação após a imunização com o mesmo vetor por via intra-retal. A principal diferença detectada é que a quantidade de partículas virais detectadas foi bem menor do que a detectada na imunização endovenosa. Conforme mostrado na Figura 40, após 24 horas pudemos detectar apenas 345,1 partículas virais ao contrário da imunização endovenosa onde foram detectadas mais 1600 pfu, conforme mostrado na Figura 39. Destas, 340 foram no baço, duas no ovário e 1,1 nas placas de Peyer. Não foram detectadas partículas virais no sangue em nenhum tempo. Isto pode ter ocorrido porque o vírus inoculado intra-retal em sua maioria não atravessou a barreira mucosa, ficou retido nas células colônicas, foi neutralizado por anticorpos nas secreções mucosas, entre outras possibilidades (ver discussão). Também, o clareamento viral foi muito mais rápido

do que após a injeção endovenosa. Após 24 horas da imunização, apenas 0,1 pfu foram identificadas no ovário.



n = 4 animais por grupo.

Figura 40 - Gráfico mostrando a disseminação viral após a injeção intra-retal de 10^7 pfu do vetor rVac-CEA. O eixo Y mostra o número de partículas virais por ml de tecido. O eixo X mostra o tempo após a inoculação. Foram avaliados os títulos no baço, ovário, placas de Peyer e sangue.

5.11 RESPOSTA IMUNOLÓGICA (CTL) NOS ANIMAIS TRANSGÊNICOS IMUNIZADOS

A caracterização do tipo de resposta imunológica em cada grupo de animais é uma etapa importante para quantificar o tipo de tolerância ao CEA. Conforme descrito anteriormente, e detalhado em vários artigos, os animais transgênicos CEA já nasceram com este antígeno sendo o CEA um auto antígeno mesmo não sendo expresso no timo durante a embriogênese. Isso foi parcialmente comparado, conforme a Figura 15A que mostra que os tumores CEA positivos crescem de

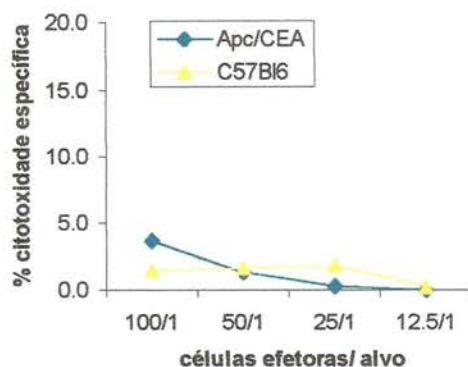
maneira mais rápida nos animais CEA. Sendo assim, uma das hipóteses decorrentes é a descrição destes animais como incapazes de iniciar e manter uma resposta citotóxica contra o CEA (KASS et al. 1999).

Já os animais knock-out Apc, não apresentam nenhuma relação com o CEA, portanto, não deveriam apresentar nenhuma restrição específica quanto a iniciar e manter uma resposta imunológica contra esta proteína. Isso também pôde ser parcialmente demonstrado na Figura 15A, vê-se que o desenvolvimento de um tumor CEA positivo implantado nestes animais foi semelhante à evolução observada nos animais C57Bl6.

Portanto, nas Figuras de número 41 a 43 é comparada a citotoxicidade contra o CEA em linfócitos isolados de baço de animais C57Bl6 e Apc/CEA após imunização endovenosa aos 2 e 9 meses de idade. Os animais foram estudados em duas idades diferentes como jovens e adultos. O objetivo foi avaliar a possível interação do CEA com sistema imunológico nos animais Apc/CEA.

De acordo com a Figura 41, nenhum dos animais C57Bl6 ou Apc apresentou nenhum tipo de resposta imunológica contra uma célula alvo CEA negativa, mc-38. Resultados semelhantes já foram demonstrados nos experimentos anteriores, mostrando que animais imunizados com o vetor rVac-CEA só apresentam algum grau de proteção apenas contra tumores CEA positivos e nenhuma proteção contra o mc-38.

Animais com 2 meses- mc38

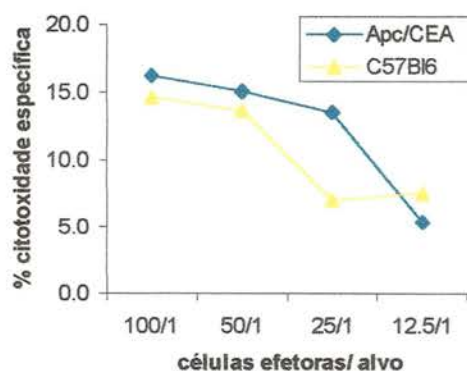


n = 3 animais por grupo.

Figura 41 - Citotoxicidade sistêmica contra alvo CEA negativo em animais de 2 meses de idade imunizados por via venosa com rVac-CEA.

A Figura 42 mostra que também aos dois meses, tanto os animais C57Bl6 como os Apc/CEA geram citotoxicidade sistêmica contra o CEA após a imunização endovenosa com rVac-CEA e que esta resposta citotóxica foi comparável entre as duas linhagens de animais.

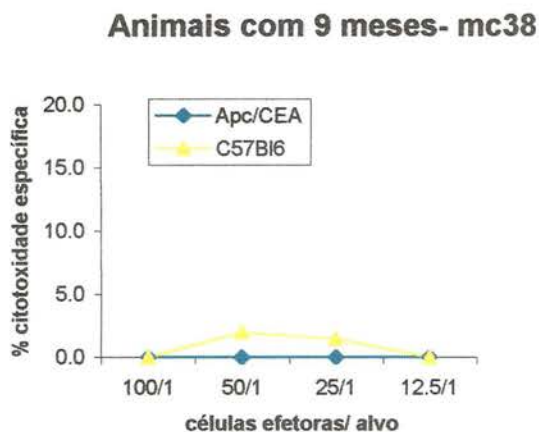
Animais com 2 meses- mc32



n = 3 animais por grupo.

Figura 42 - Citotoxicidade sistêmica contra alvo CEA positivo em animais de 2 meses de idade imunizados por via venosa com rVac-CEA.

A Figura 43 mostra que também aos 9 meses, conforme mostrado na Figura 41, ambas as linhagens, animais quando imunizados com rVac-CEA, não geram nenhum tipo de resposta citotóxica no baço contra tumores CEA negativos como o mc-38.



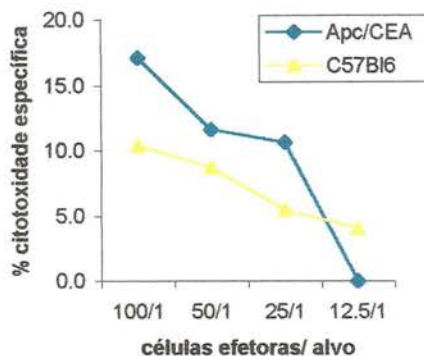
n = 3 animais por grupo.

Figura 43 - Citotoxicidade sistêmica contra alvo CEA negativo em animais de 9 meses de idade imunizados por via venosa com rVac-CEA.

A Figura 44 mostra que aos 9 meses, tanto os animais C57Bl6 como os Apc/CEA depois de imunizados com rVac-CEA por via endovenosa, foram capazes de gerar citotoxicidade contra o CEA no baço da mesma maneira que aos 2 meses, conforme mostrado na Figura 42. Os animais Apc/CEA apresentaram uma maior citotoxicidade específica nas proporções de 100, 50 e 25 células efectoras para cada célula alvo. Este resultado não pode ser confirmado para validação estatística em virtude do pequeno número de animais utilizado neste experimento. Como será apresentado na discussão, uma das explicações possíveis para estes resultados seria a possibilidade de ocorrer uma imunização inicial parcial contra o CEA nos pólipos

destes animais e a imunização com o vetor rVac-CEA funcionar também como um reforço adjuvante para estes linfócitos já imunizados.

Animais com 9 meses- mc32



n = 3 animais por grupo.

Figura 44 - Citotoxicidade sistêmica contra alvo CEA positivo em animais de 9 meses de idade imunizados por via venosa com rVac-CEA.

Neste experimento também foram obtidos linfócitos das placas de Peyer e soro dos dois grupos animais. Além da avaliação da citotoxicidade dos esplenócitos, conforme mostrado nas figuras acima, foram também avaliadas a citotoxicidade dos linfócitos das placas de Peyer contra os mesmos alvos, a proliferação linfocitária e a capacidade de produção de anticorpos contra o CEA.

O grande fator limitante em todos os experimentos que utilizavam os animais transgênicos era o pequeno número de animais disponíveis para cada experimento. Em nosso projeto, nossas limitações ainda eram maiores, porque estávamos trabalhando principalmente com animais híbridos transgênicos para o CEA e knock-out para o Apc.

Em virtude destas limitações técnicas a dosagem de anticorpos, proliferação e medida de citotoxicidade dos linfócitos das placas de Peyer não apresentaram resultados conclusivos ou mesmo com qualidade técnica para serem apresentados neste projeto.

6 DISCUSSÃO

6.1. MODELOS ANIMAIS TRANSGÊNICOS CEA, KNOCK-OUT APC E HÍBRIDO APC/CEA

O modelo apresentado e caracterizado neste projeto, o camundongo híbrido Apc/CEA (HORIG et al. 2001) é uma ferramenta importante para o melhor conhecimento da imunologia dos tumores bem como o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o câncer de cólon. Uma etapa essencial para o desenvolvimento de uma vacina com atividade oncológica é a avaliação de sua eficácia em um modelo animal. Isto já é feito há várias décadas, mas a grande maioria dos resultados em experimentos animais não se repete em protocolos clínicos experimentais em humanos (GURA et al. 1997). Existem várias explicações para estas incompatibilidades de resultados entre animais e humanos, principalmente quando são aplicados tratamentos que visam a imunização contra antígenos tumorais (FINN e LOTZE 2001). Uma das mais importantes é que muitos destes modelos animais não apresentam tumores espontâneos, sendo os mesmos implantados cirurgicamente ou induzidos por agentes carcinóides (PAULSEN et al. 1999).

A cada dia, descobrimos mais informações sobre as complexas interações tumor/hospedeiro. Estas interações podem ser locais no microambiente tumoral ou sistêmicas. Um fato importante é ilustrado, por exemplo, quando um tumor passa a apresentar antígenos relevantes para a ativação do sistema imunológico, como é preconizado que ocorre nos casos de tumores com regressão espontânea. Ou, quando, após anos de comportamento menos agressivo, o tumor adquire um fenótipo agressivo e indolente e com grande potencial de disseminação à distância. Isso ilustra

como pequenas variações neste ambiente podem alterar completamente a relação entre os elementos do microambiente tumoral, ora dificultando, ora favorecendo o crescimento tumoral (MATZINGER 1994; ZINKERNAGEL 2000a; RUITER et al. 2002).

Apc

Diversas linhagens de animais transgênicos ou “knock-out” tem sido pesquisadas e desenvolvidas para tornar os modelos animais mais próximos da situação humana (HEYER et al. 1999). Um dos processos iniciais de carcinogênese mais bem caracterizados são os casos de mutações somáticas do gene Apc que levam ao aparecimento de múltiplos pólipos adenomatosos do intestino. Estes, freqüentemente, se degeneram em adenocarcinomas invasivos e metastáticos após uma séria de mutações subseqüentes do processo de carcinogênese, que envolvem múltiplos outros genes como os envolvidos na via *e-Caderina/ b-Catenina* (MIYOSHI et al. 1992; BALMAIN 2001; TUCKER et al. 2003). O primeiro modelo animal com desenvolvimento de pólipos seguidos de adenocarcinomas no trato digestivo foi o camundongo *Min*. Estes animais apresentam uma mutação não sense no códon 850 inativando um alelo do gene Apc. Uma grande limitação deste modelo animal era que os tumores desenvolviam de maneira precoce e agressiva, levando os animais a morte sempre em menos de 150 dias (MOSER et al. 1992), com sobrevida média de poucos meses (THOMPSON et al. 1997). Trabalhamos com o modelo “knock-out” Apc 1638 no Albert Einstein Cancer Center (FODDE et al. 1994). Estes animais apresentavam uma mutação no Éxon 15 do gene Apc murino, o mesmo local onde ocorreu a mutação em humanos com polipose colônica familiar (MIYOSHI et

al. 1992; FODDE et al. 2001). Os animais Apc1638 e Min apresentam muitas semelhanças como a presença de múltiplas lesões polipóides no trato digestivo que evoluem de lesões benignas para adenocarcinomas. As principais diferenças são que os animais Apc podem sobreviver até 2 anos conforme mostrado neste projeto. Ao contrário dos animais Min, os animais Apc produzem uma proteína Apc normal não truncada, mas aparentemente muito instável.

Estas duas diferenças são muito importantes porque a carcinogênese é um processo de múltiplas etapas. Os tumores de cólon são um excelente modelo para se estudarem todas as etapas deste processo e se intervir em diversas fases. Para tanto seria necessário um animal com uma longa sobrevida, que possibilitasse que uma intervenção terapêutica imunológica tivesse tempo de gerar seus efeitos e apresentasse resultados.

Apesar da geração dos animais Apc ter sido muito bem descrita, incluindo várias de suas características genéticas e moleculares, os mesmos ainda não estavam bem caracterizados quanto ao seu fenótipo.

Conforme mencionado anteriormente, estes animais apresentam lesões no trato gastrointestinal com uma evolução gradual de pólipos hiperplásicos para adenomas, adenocarcinomas locais e finalmente invasivos. Estes pólipos apareciam antes dos 4 meses de idade. O número de pólipos, bem como o seu tamanho, aumentaram entre os 4 e 6 meses. É interessante ser mencionado que entre os 6 e 8 meses o número de pólipos continua aumentando, mas o seu tamanho médio permanece o mesmo. Uma das explicações plausíveis é que nesta fase os pólipos já teriam atingido seu tamanho máximo como lesões pré-malignas. Como o número de pólipos continuava aumentando e os mais antigos não estavam mais crescendo,

ocorria uma estabilização do tamanho médio dos pólipos. O inverso ocorreu após os 8 meses de idade. Nesta fase, o número de pólipos médio por animal para de aumentar, não se observando o aparecimento de novos e pequenos pólipos. Como os pólipos já existentes continuaram crescendo, ocorre um aumento progressivo do tamanho médio dos pólipos por animal. Também nesta fase, muitos dos pólipos com alterações histológicas benignas ou pré-malignas se tornaram malignos. Isto permitiu que estas lesões se tornassem autônomas, desencadeando angiogênese funcional e atingindo maiores dimensões, que contribuíram para o aumento do tamanho médio das lesões por animal. Estas hipóteses estão em acordo com os resultados de DeVRIES et al. (2001), mostrando que os tumores maiores e mais agressivos apresentam uma maior atividade angiogênica (GIMBRONE et al. 1972; FOLKMAN 1975).

A pesquisa de sangue oculto nas fezes destes animais apresentou resultados significativos. Todos os animais Apc/CEA positivos apresentavam sangue oculto nas fezes desde a idade de 2 meses. Deve ser mencionado que nesta época, estes animais ainda não apresentavam alterações histológicas decorrentes da inativação do gene Apc, que pudessem justificar estas alterações. Não existem relatos conclusivos sobre a presença de sangue oculto nas fezes nos animais Apc (YANG et al. 1997). Não foi possível esclarecer a origem deste sangue. Presume-se que, previamente a formação de pólipos, possa ocorrer soluções de continuidade na mucosa gerando sangramentos microscópicos, fato este que não foi pesquisado ou confirmado em nosso projeto. Também, a desregulação da expressão do CEA humano nestes animais poderia alterar o processo de *anoikes* fazendo com que um incorreto posicionamento de cada tipo celular nas criptas intestinais pudesse gerar microscópicas soluções de

continuidade na mucosa que levariam a micro-hemorragias. Caso este resultado se confirme em uma grande série de animais, a pesquisa de sangue oculto nas fezes poderia ser um rápido, simples e barato teste para a identificação dos animais Apc e possivelmente até os Apc/CEA positivos. Apesar de descrito também em pacientes com FAP, a presença de sangue oculto nas fezes não está diretamente relacionada com degeneração maligna (SU et al. 1972). Apesar destas discussões especulativas acima, ainda não está claro qual o papel do gene do CEA nos animais Apc/CEA ou mesmo se este sangramento se deve exclusivamente ao gene Apc.

CEA

Outra prerrogativa essencial para um modelo animal ser usado para o estudo de imunoterapias para o câncer é a presença de um antígeno relevante (BOON e van der BRUGGEN 1996). A pesquisa e desenvolvimento destas novas abordagens terapêuticas oncológicas são complexas. Envolvem grandes investimentos financeiros e, freqüentemente são pesquisas de longa duração e com múltiplas etapas seqüenciais. Logicamente, o objetivo final é o desenvolvimento de uma nova metodologia efetiva para ser aplicada em humanos. Para tanto, quando mais próximo da situação humana for o modelo animal, mais promissora serão as chances destes resultados serem aplicados numa situação humana, de maneira mais rápida e a um menor custo. O emprego de antígenos humanos em modelos animais e o desenvolvimento de modelos com sistema imunológico humanizado, tornam os resultados mais relevantes. Também, é interessante utilizar um antígeno que apresente uma maior expressão em diversos tumores humanos. O CEA é o antígeno oncofetal mais freqüentemente superexpresso e encontrado em praticamente todos os tumores colo retais (THOMPSON e ZIMMERMAN 1988; THOMPSON et al.

1993). Esta proteína é altamente glicosilada com vários sítios distintos de exposição e faz parte da super família das imunoglobulinas. Mesmo sem que os camundongos apresentassem qualquer tipo de molécula comparável ao CEA, pudemos detectar uma proporção significativa de anticorpos inespecíficos que se ligou à proteína do CEA ultrapura.

Foi detectada a presença de CEA nas fezes nos animais CEA positivos, já aos 2 meses, antes mesmo da presença de qualquer alteração histopatológica. Isso mostra que da mesma maneira que em humanos o CEA está presente no epitélio colônico. Estes epitélios são continuamente renovados, e esta renovação gera o desprendimento de células do trato gastrointestinal, liberando o CEA no intestino. Este pode passar a ser avaliado como “metabólito constitutivo da dieta” sendo gerado tolerância imunológica contra esta proteína (THOMPSON et al. 1991; STROBEL e MOWAT 1998; VEZYS et al. 2000). Nestes animais transgênicos para o CEA humano, este antígeno também poderia ser apresentado no trato gastrointestinal de maneira fisiológica, sem nenhum processo inflamatório ou co-estimulação, de acordo com o discutido acima. Isto pode ser evidenciado no estudo histopatológico dos animais CEA neste experimento, onde não foram evidenciadas nenhuma alteração histopatológica durante toda sua vida, apenas o CEA estava expresso de maneira fisiológica em alguns tecidos. Em nenhum trabalho com estes animais, o CEA pôde ser detectado no timo e, portanto não existe nenhuma razão para que estes animais fossem incapazes de estabelecer uma resposta imunológica contra o CEA, baseados nos estudos de deleção central para seleção de repertório e não tolerância induzida (CLARKE et al. 1998). Não são todos os auto-antígenos que são expressos no timo, e mesmo com uma extensiva deleção negativa baseada na indução de

apoptose por superestimulação, numerosos clones de linfócitos auto-reativos podem ser exportados para a periferia (HUANG e MACPHERSON 2001; GOLDSCHNEIDER e CONE 2003). A deleção tímica fetal através da seleção negativa de células com imunogenicidade contra antígenos do CEA neste modelo é pouco provável, e mesmo que ocorra deveria estar limitada a linfócitos T de alta afinidade (BOUNEAUD et al. 2000; SPRENT e KISHIMOTO 2001). Portanto, como pudemos observar neste projeto, os animais CEA positivos devem ser tolerantes ao CEA por indução de tolerância periférica a partir do trato gastrointestinal (NAGLER-ANDERSON 2001). Apesar destes animais não serem capazes de produzir anticorpos contra o CEA, se corretamente estimulados podem apresentar uma resposta citotóxica contra esta proteína conforme mostramos em concordância com outros trabalhos (CONRY et al. 1994). Um dado que reforça esta teoria de superexposição do trato gastrointestinal ao CEA foi mostrado por CLARKE em 1998 e confirmado neste trabalho, ao demonstrar que os animais CEA positivos apresentam valores de CEA fecal 100 vezes superiores ao encontrado em humanos.

Apc/CEA

Os animais Apc/CEA apresentam todas as alterações histopatológicas dos animais Apc bem como a expressão de CEA humano com a mesma distribuição espaço temporal que é observada em pacientes. Um dos objetivos deste projeto foi estabelecer e quantificar neste modelo as inter-relações do antígeno CEA com as alterações histopatológicas desencadeadas pela inativação do gene Apc.

A primeira etapa, antes mesmo de qualquer caracterização funcional foi qualificar a expressão do CEA para termos padrões para compararmos este modelo

animal com os demais. Os animais Apc/CEA apresentavam sinais de envelhecimento precoce quando comparados com os animais Apc ou CEA, mas estas alterações não afetaram de maneira significativa sua sobrevida. Ao contrário dos animais Apc Min/CEA (THOMPSON et al. 1997) que continuavam a apresentar curta sobrevida, comparável a dos animais Min, nosso modelo Apc/CEA apresentava longa sobrevida com frequência superior a 1 ano, podendo atingir até a 18 meses, conforme descrito neste trabalho.

O número, o desenvolvimento e a progressão das alterações histológicas dos pólipos gastro-intestinais nos animais Apc/CEA foi comparável aos dos animais Apc (dados não mostrados).

A expressão do CEA era maior nos tecidos do trato gastrointestinal com alterações histológicas polipóides, conforme descrito neste trabalho. Não foram realizados ensaios de radio-imunoensaios para se fazer uma quantificação precisa do CEA nos diversos tecidos micro-dissecados com várias alterações histológicas. Estes ensaios poderiam gerar resultados com significância estatística, mas apresentam complexa padronização técnica que incluem de técnicas de micro-disseção a composição heterogênea de cada tecido bem como a conformação e grau de glicosilação do CEA em cada tipo histológico. Existem diversos outros fatores que nos impedem de corretamente quantificar o CEA nestes tecidos (SCREATON et al. 2000). Estas limitações se devem em parte a falta de padronização metodológica entre as técnicas para se quantificar a coloração de exames de imuno-histoquímica e, relacionar estas intensidades de coloração com a correta expressão protéica. O CEA também é uma molécula muito glicosilada e, conforme descrito previamente, membro da super família das imunoglobulinas o que a torna uma molécula com

múltiplos sítios de exposições antigênicas (HORIG et al. 2000b; HUARTE et al. 2002). Os camundongos não apresentam nenhuma molécula homóloga ao CEA do ponto de vista funcional ou estrutural, mas os mesmos apresentam antígenos que de maneira inespecífica podem ser reconhecidos por anticorpos monoclonais contra o CEA humano (MURARO et al. 1985). E por último, a expressão do CEA nestes animais transgênicos pode gerar proteínas de diversas massas moleculares, glicosilação e conformação, sendo estas alterações ainda mais significativas nos tecidos histologicamente alterados com alta expressão do CEA como os pólipos neste modelo *Apc/CEA*. Independente de todas estas restrições nosso trabalho pôde mostrar que a expressão do CEA estava aumentada nos pólipos e, que com o aumento da degeneração histológica e malignização destas lesões, ocorria um aumento da expressão do CEA. O CEA é uma proteína com grande expressão embrionária e como ocorre com os tumores humanos, estes com frequência superexpressam proteínas embrionárias (SHIVLEY e BEATTY 1985). Não era certo de que isto ocorreria com este modelo tendo em vista que o gene do CEA humano foi transduzido nestes animais, não sendo teoricamente uma proteína constitutiva dos mesmos. O que pôde ser demonstrado é que à medida que os processos de carcinogênese decorrente da deleção do gene *Apc* progridem, ocorre uma maior expressão do CEA nestes tecidos com alterações histológicas mais avançadas. Estes resultados também foram descritos no modelo animal similar o também híbrido *Apc Min/CEA* (THOMPSON et al. 1997). Neste trabalho, os animais *Apc/CEA* quando comparados com animais *Apc*, *CEA* e *C57Bl6*, de mesma idade, mostravam-se com sinais mais evidentes de envelhecimento e mesmo desnutrição quando mais velhos. Uma das hipóteses não confirmadas, mas que merece ser discutida seria de que a

interação da inativação do gene *Apc* oncosupressor com o CEA relacionado com a *anoikes*, pudesse promover um maior número de pólipos ou mesmo alterações histológicas mais agressivas. Nestes animais idosos poderiam também exibir algum grau de enterite e colite CEA relacionados. Todos estes fatores isolados ou de maneira sinérgica poderiam contribuir para uma síndrome de má-absorção e todos os sinais e sintomas decorrentes deste estado. Apesar destas hipóteses não terem sido pesquisadas e conseqüentemente comprovadas, foi sempre constatado que os animais *Apc*/CEA encontravam-se mais debilitados que os demais.

Estes animais *Apc*/CEA apresentavam CEA no soro após os 4 meses de idade, antes do descrito para os animais CEA. Também não fomos capazes de detectar a presença espontânea de anticorpos contra este antígeno. Nesta época os animais já apresentavam alterações histológicas. Possivelmente, nestes pólipos que são tecidos desorganizados, ocorria áreas de necrose com liberação de CEA que chegava até a circulação sistêmica. A diferença é que a expressão do CEA nos pólipos e adenomas é completamente desregulada (SCHOLZEL et al. 2000), possibilitando aos animais *Apc*/CEA exposição a esta proteína de maneira distinta à que ocorre com os animais CEA.

Estes resultados discutidos acima tornaram os animais *Apc*/CEA um modelo apropriado para se avaliar agentes de vacinação e protocolos de imunização contra tumores CEA positivos. As implicações desta superexpressão do CEA nos pólipos e sua influência quanto a tolerância a antígenos tumorais será discutida oportunamente.

6.2. IMUNIZAÇÃO COM O VETOR rVac-CEA

Antes de se avaliar a resposta de tumores implantados a diferentes protocolos de imunização, deve-se obter o crescimento padrão destes tumores em animais não imunizados. Esta etapa, em qualquer experimento que avalie novas abordagens imunoterápicas para o câncer, é importante porque os resultados entre os diversos artigos publicados não são comparáveis, e às vezes chegam a ser conflitantes (KAUFMAN et al. 1991; KANTOR et al. 1993; WHITE et al. 2000). O mesmo se aplica para vacinas profiláticas, terapêuticas e a validação de modelos transgênicos, conforme descrito por FINN e FORNI (2002). Esta é uma das grandes limitações para se validarem os resultados de protocolos experimentais em humanos (HAMILTON et al. 1994; TSANG et al. 1997; MARSHALL et al. 2000). Em humanos não temos como quantificar a resposta em um grupo controle não tratado por questões claramente éticas.

O tumor empregado como alvo para a resposta imunológica anti CEA gerada com os esquemas de imunização foi a linhagem mc-32 (CEA positiva), conforme descrito previamente. Esta linhagem é derivada de um tumor de cólon murino CEA negativo designada mc-38 (ROBBINS et al. 1991). Em nossos experimentos ficou demonstrado que a linhagem mc-38 apresentava maior índice de proliferação tanto “in vitro” quanto “in vivo”. Esta diferença nunca foi bem esclarecida, mas de alguma maneira o processo de transdução do CEA nesta linhagem tumoral desencadeou como efeito colateral algum déficit de replicação. Apesar desta maior taxa de proliferação da linhagem mc-38 atingindo tumores de maior volume, não foram observadas outras alterações que pudessem afetar os resultados dos experimentos,

como maior disseminação, agressividade com invasão local ou o estabelecimento de metástases à distância. Quando implantado em animais não transgênicos ou Apc/CEA a linhagem mc-38 apresentava o mesmo padrão de crescimento. O mesmo não pode ser dito para os tumores mc-32. Estes apresentavam crescimento mais agressivo nos animais CEA positivos em comparação com os demais Apc, Apc/CEA e C57Bl6. Estes resultados estão de acordo com o publicado por outros autores que mostram que os animais CEA transgênicos parecem ser tolerantes contra este antígeno.

Nos animais Apc e C57Bl6, o CEA era um antígeno expresso unicamente no tumor implantado. Era um antígeno único, novo para um sistema imunológico que ainda não tinha tido contato com esta proteína, e certamente não tolerante. Era também um antígeno introduzido cirurgicamente (punção), presente em um tecido manipulado pelo implante tumoral e certamente com resposta inflamatória local. Neste contexto, seria de se esperar que o sistema imunológico destes animais fosse capaz de iniciar e manter uma resposta contra o CEA, um antígeno completamente exógeno, apenas expresso em um tumor implantado artificialmente (CONRY et al. 1994; HODGE 1996; GREINER et al. 2002).

Já o modelo Apc/CEA deveria ser tolerante ao CEA de maneira comparável ao animal CEA. Conforme mostrado por HORIG et al. (2001), estes animais são apenas parcialmente tolerantes ao CEA.

Em todos os experimentos a imunização visava a geração de uma resposta imunológica contra o CEA e que esta resposta fosse capaz de reconhecer e destruir células tumorais CEA positivas. Existem várias opções comprovadamente eficazes para se alcançar este objetivo como o emprego de proteínas, fragmentos de DNA,

células apresentadoras de antígenos e vetores carreadores de genes (HENDERSON e ARITA 1995; KARZON 1995; CHEN et al. 2000; JENNE et al. 2001; Le POOLE et al. 2002).

Para este objetivo, gerar antigenicidade contra o CEA e destruição de células tumorais CEA positivas, mediada por células do sistema imunológico, foi empregado o vetor vaccinia. O emprego deste vetor viral como carreador de genes para a geração de resposta imunológica apresenta diversas vantagens apresentadas neste trabalho na revisão da literatura. Inicialmente os animais não imunizados tiveram o seu crescimento tumoral padronizado para podermos comparar a evolução tumoral em animais imunizados pela via convencional endovenosa. Estas mesmas padronizações foram empregadas para termos um critério de comparação com a inovadora via de imunização intra-retal proposta neste projeto.

6.3. IMUNIZAÇÃO ENDOVENOSA E INTRA-RETAL

A imunização endovenosa com vetor rVac-CEA não mostrou nenhum tipo de proteção quando foram implantados tumores CEA negativos. Esta pode parecer uma conclusão óbvia que não precisaria ser comprovada experimentalmente, mas não é. Desde os relatos das pesquisas iniciais de COLEY apresentados em 1908 na Reunião da Associação Médica Americana, são descritos resultados de regressão de tumores após estimulação completamente inespecíficas (COLEY 1911; SPORN 1996). Estes resultados foram comparáveis com a imunização apenas com solução salina, deixando evidente que a imunização com o vetor rVac-CEA não gera nenhum tipo de proteção inespecífica para tumores CEA negativos. Todos os experimentos foram realizados de maneira profilática, ou seja, os animais recebiam as 3 doses de

imunização e a seguir eram desafiados com o implante de tumores CEA positivos ou negativos. O ideal seria a realização de imunizações terapêuticas por se aproximar mais da real situação humana onde com raras exceções, não podemos prever o aparecimento de tumores (SRIVASTAVA 2000). O grande limitante para estes experimentos terapêuticos era o fato de o tumor apresentar um crescimento rápido, atingindo grandes proporções aos 20 dias após implante. Sendo assim, qualquer tratamento, baseado na imunoterapia não teria tempo suficiente para gerar uma resposta imunológica efetiva. Felizmente esta situação não é a que ocorre em humanos. O processo de carcinogênese é longo, freqüentemente são necessários anos para que se desenvolva um tumor com células plenamente capazes de invadir e metastatizar.

Nos experimentos deste projeto, bem como na maioria dos experimentos com tumores implantados em animais, as células tumorais são de linhagens imortalizadas, selecionadas em cultura em que quase 100% das células implantadas encontram-se plenamente capacitadas para a replicação imediata. Em um tumor humano muito proliferativo, menos de 20% das células tumorais encontram-se em replicação simultaneamente. Isto faz com que uma resposta em um modelo com quase 100% das células em replicação seja mais difícil do que seria em um tumor humano. Neste contexto, seria possível que diversas novas opções terapêuticas, que tem se mostrado pouco ou parcialmente efetivas nestes modelos animais pudessem ser mais promissoras e eficazes em humanos. Esta é certamente uma afirmação polêmica e muito difícil de ser confirmada por questões éticas. Uma alternativa seria o desenvolvimento e emprego de modelos animais com tumores espontâneos cada vez mais próximos da situação humana.

Uma possível aplicação para modalidades de imunização profilática para pacientes com câncer colo retal seria para pacientes com polipose colônica familiar (KINZLER et al. 1996). Estes pacientes identificados na adolescência evoluem em 100% dos casos com câncer do intestino grosso e uma imunização que prevenisse a degeneração dos pólipos adenomatosos para adenocarcinomas poderia ser interessante. É importante ser mencionado que qualquer abordagem imunológica para pacientes com síndromes genéticas proliferativas como esta seriam capazes de destruir apenas as células que apresentam os alvos passíveis de imunização. Ainda não está claro, se uma imunização contra o CEA, nestes pacientes, inibiria o crescimento e desenvolvimento de todos os pólipos, ou se selecionaria para a permanência de pólipos CEA negativos, que poderiam continuar crescendo, causando complicações obstrutivas, sangramentos e mesmo degeneração para adenocarcinomas CEA negativos.

Mesmo assim, os animais que foram imunizados com rVac-CEA por via endovenosa apresentaram uma significativa redução do tamanho médio de seus tumores, quando comparados com os animais imunizados com o vetor controle rVac-LacZ. Mais de 35% destes animais ficaram protegidos não desenvolvendo tumores.

É importante ser mencionado que o implante tumoral era de 10 milhões de células tumorais em um volume de 200 microlitros. Deste total de células implantadas, pudemos detectar que cerca de 80% expressavam o CEA em quantidade suficiente para ser mensurada por citometria de fluxo, conforme descrito previamente em métodos. Sendo assim, era também inoculada uma porcentagem significativa de células, em que não fomos capazes de detectar a presença do CEA. Mesmo assim mais de 35% dos animais não desenvolveram tumores tendo destruindo as células

tumorais implantadas. Existem duas explicações que poderiam justificar estes achados: A primeira é que mesmo o CEA sendo detectado em menos de 80% das células implantadas, ele estava presente em 100% das mesmas, tornando todas as células tumorais implantadas candidatas a lise pela reatividade anti-CEA desencadeada pela imunização. O que poderia justificar esta hipótese é o fato de que juntamente com o gene do CEA humano estas células também receberam um gene que conferia resistência a neomicina(G-418). Antes de cada experimento, estas células eram mantidas em cultura com o G-418 de maneira que as células que não apresentassem o CEA, também não poderiam apresentar a resistência a este produto, e conseqüentemente, não replicariam e morreriam. Pode ter ocorrido que durante este longo tempo em que esta linhagem vinha sendo mantida em cultura com múltiplas seleções genéticas com o G-418, tenha ocorrido alguma mutação, e que durante a replicação algumas células poderiam ter perdido ou inativado o gene, que codificava a produção do CEA e mantido o que conferia a resistência a neomicina.

Neste contexto estaríamos também implantando nos animais células CEA negativa. Sendo assim como poderia ter ocorrido a destruição também das células CEA negativas. Uma explicação possível para se justificar o não desenvolvimento do tumor nestes animais poderia ser uma grande resposta inflamatória no local do implante. Como foi mostrado estes animais apresentavam significativa citotoxicidade sistêmica contra o CEA. Poderia ocorrer no local do implante tumoral, o desenvolvimento de uma intensa e poderosa resposta citotóxica contra estas células CEA positivas. Isto poderia mobilizar outros efetores inespecíficos como macrófagos, e linfócitos NK e NKT além da liberação de perforinas e mediadores da resposta inflamatória aguda que poderiam desencadear a lise de células próximas não

necessariamente alvo de citotoxicidade (SMYTH e GODFREY 2000; FAUNCE et al. 2001). Estes poderiam indiretamente induzir a destruição também das células tumorais CEA negativas, deixando estes animais livres de tumores (DARCY et al. 2000).

O mesmo raciocínio poderia ser empregado de maneira inversa para os demais 65% dos animais imunizados com rVac-CEA endovenoso. Estes demonstraram significativa citotoxicidade e proliferação contra o CEA e mesmo assim, desenvolveram tumores após o implante de tumores CEA positivos. Poderia ocorrer de a resposta imunológica para o CEA gerada ter sido realmente efetiva e destruído todas as células tumorais CEA positivas. Desta maneira, o tumor que cresceu nestes animais deveria ser CEA negativo. Foi feita a imuno-histoquímica contra o CEA para estes animais imunizados que desenvolveram tumores e infelizmente não foi conclusiva (dados não mostrados). Estes tumores apresentavam grandes áreas de necrose, com extensos segmentos mal perfundidos na região central, áreas de proliferação nas bordas e processos inflamatórios mal distribuídos. Estas áreas a imuno-histoquímica apresentava grande coloração, possivelmente de maneira inespecífica pelo CEA, não podendo ser concluído se estes tumores eram realmente CEA positivos ou negativos. Também foi tentado realizar a digestão enzimática destes tumores e aplicados a citometria de fluxo com dupla coloração para PI e anticorpo COL-1 contra o CEA para se avaliar a expressão deste antígeno nas células viáveis. Também estes experimentos não foram conclusivos com grandes limitações técnicas (dados não mostrados).

Os animais que receberam a imunização por via intra-retal também apresentaram algum grau de proteção, porém, de magnitude inferior ao obtido com a

imunização endovenosa. Uma das explicações poderia ser o fato de que uma porcentagem significativa do inoculo viral pode ter ficado retido na luz intestinal não tendo nenhum efeito terapêutico. As rotas de imunização, por via mucosa, estão sendo muito avaliadas atualmente, em virtude da epidemia pelo HIV, que tem esta via como uma de suas principais portas de entrada em seus hospedeiros (FINERTY et al. 2000; AMARA et al. 2001). Apesar de amplamente estudadas, as vias de imunização mucosa são mais empregadas para vacinas contra agentes infecciosos e mesmo assim a comparação de resultados entre os autores e entre estas diversas vias é inconclusiva (EGGERT et al. 1999; EO et al. 2001; EXTERNEST et al. 2000). Apenas 20% dos animais imunizados com o vetor rVac-CEA por via intra-retal ficaram protegidos e não desenvolveram tumores. O tamanho dos tumores dos animais que o desenvolveram foi estatisticamente menor do que o grupo tratado com rVac-LacZ por via IR e também estatisticamente maiores que os animais tratados por via endovenosa. Estes resultados mostram que, para um tumor implantado no subcutâneo a via de imunização intra-retal pode ser empregada para gerar uma resposta imunológica sistêmica e que esta resposta é de menor eficácia do que a obtida com a mesma imunização por via endovenosa.

A imunização intra-retal foi feita com o mesmo volume empregado com a imunização endovenosa. Na imunização EV conforme descrito, pode-se ter a certeza de que a totalidade do volume injetado atingiu a circulação sistêmica. Para a imunização intra-retal, o máximo de precisão que pudemos obter foi que o conteúdo foi injetado dentro da luz do reto e que não foi evacuado nos 30 segundos seguintes. A quantificação do volume que emulsificou com o conteúdo fecal e permaneceu na luz intestinal ou mesmo foi evacuada posteriormente antes de ser absorvido não pôde

ser avaliado. Também pode ocorrer uma significativa neutralização do vetor ainda na luz intestinal por anticorpos IgA neutralizantes de maneira específica. Outra opção seria o fato de grande parte das partículas virais poderem infectar enterócitos longe de sítios processadores de resposta imunológica. Todos estes fatores poderiam ter influenciado a imunização intra-retal em comparação com a endovenosa, gerando menor grau de proteção, apesar da citotoxicidade gerada contra o CEA pelas duas ter sido comparável.

Estes resultados de proteção foram obtidos para um tumor implantado no subcutâneo destes animais. Nestes experimentos, não temos como quantificar ou qualificar a resposta caso este tumor estivesse no trato gastrointestinal. Foram tentados experimentos onde as células tumorais foram implantadas de maneira ortotópica na parede intestinal durante laparotomia com micro-agulhas. Estes procedimentos se mostraram de imediato pouco factíveis e de difícil reprodução, porque havia refluxo das células implantadas através do orifício de injeção, com contaminação da cavidade peritoneal e estabelecimento de carcinomatose peritoneal. Também, em virtude do pequeno volume implantado de 10 microlitros, ocorria uma grande imprecisão no número de células tumorais implantadas o que tornariam os resultados obtidos pouco confiáveis.

6.4. COMPARTIMENTALIZAÇÃO DO SISTEMA IMUNOLÓGICO

Existem muitas polêmicas a respeito da compartimentalização do sistema imunológico entre mucoso e sistêmico e as implicações sobre esta possível divisão. A minoria destes resultados tem se tornado consenso e cada novo trabalho publicado

aumenta a dúvida sobre este complexo sistema (REGNAULT et al. 1996; KIM et al. 1997; BELYAKOV et al. 1998b; CZERKINSKY et al. 1999; ARSTILA et al. 2000; KOGA et al. 2000; ALPAN et al. 2001; HASHI et al. 2001; LILLARD et al. 2001; YAMANAKA et al. 2001; ROCHA-ZAVALETA et al. 2002).

Trabalho clássico de BELYAKOV et al. (1999) mostrou que a imunização com vetor vaccinia recombinante com o gene HIV gp160 por via endovenosa ou intra-retal conferia proteção sistêmica contra o HIV com alta produção de anticorpos e citotoxicidade contra este vírus. Este mesmo trabalho mostrou que as respostas imunológicas sistêmica e mucosa eram semelhantes após a imunização intra-retal, mas que após a imunização endovenosa não se obtinha resposta mucosa e, que os sítios indutores mucosos permaneciam virgens após esta imunização sistêmica. Baseados nestes resultados, apresentou-se a hipótese de que a via de imunização mucosa poderia ser empregada de maneira autônoma para se amplificar uma resposta sistêmica. Estes resultados estão de acordo com os consagrados trabalhos de vacinas contra a poliomielite, baseados na vacina Sabin e Salk. Também se hipotetizou que esta via poderia ser usada como alternativa para o emprego de vetores contra o qual já existem altos títulos de anticorpos neutralizantes tornando os mesmos inefetivos como agentes carreadores de genes tumorais para imunização sistêmica. Isso teria aplicações práticas para pacientes previamente imunizados contra a varíola como ocorreu até 1971 em que se empregava como agente de imunização o vírus vaccinia. Estes pacientes já apresentam altos títulos de anticorpos neutralizantes contra o vírus vaccinia. Atualmente a varíola já esta erradicada de nosso planeta e estes pacientes estão na faixa etária mais acometida por tumores. Estes indivíduos poderiam se beneficiar de imunoterapias, baseadas neste vírus como plataforma de entrega de

genes se não tivessem tantos anticorpos neutralizantes anti-vaccinia. Caso realmente o sistema imunológico mucoso destes pacientes ainda fosse virgem em relação a este vetor, o vírus vaccinia recombinante poderia ser utilizado para imunização.

Os resultados que obtivemos neste projeto contradizem parcialmente o preconizado por BELYAKOV (1998a, 1998b). Após a imunização intra-retal obtivemos resultados semelhantes aos descritos previamente. Esta imunização foi capaz de gerar citotoxicidade sistêmica (baço) e mucosa (placas de Peyer) contra antígenos virais(vaccinia) e contra a proteína(CEA) codificada pelos genes exógenos que o mesmo carregava. Esta via de imunização também foi capaz de gerar anticorpos sistêmicos contra estes mesmos antígenos, conforme mostrado em resultados.

A incompatibilidade de resultados foi que a nossa imunização endovenosa com o vetor rVac-CEA além de desencadear potente resposta citotóxica sistêmica e produção de anticorpos foi também capaz de desencadear citotoxicidade, avaliada em linfócitos do sistema imunológico mucoso (placas de Peyer). Sendo assim, o sistema imunológico mucoso não poderia ser considerado um santuário imunológico em relação a vetores aplicados por via endovenosa. Existem algumas explicações que podem explicar esta aparente discrepância de resultados. Em primeiro lugar, nos resultados descritos por Belyakov mencionados acima, foram avaliadas a resposta imunológica contra os antígenos que o vetor carregava. Estes de alguma maneira poderiam ser menos capazes de iniciar e manter uma resposta imunológica no sistema mucoso (HOUGHTON 1994; ZINKERNAGEL 2000b; GROSENBACH- et al. 2001). Estes resultados ocorrem com frequência em experimentos que visam gerar uma resposta imunológica contra antígenos do HIV, conforme avaliado por

BELYAKOV et al. (1998a). Existem trabalhos com protocolos de imunização que mostram proteção induzida contra a inoculação sistêmica do vírus sendo que esta mesma imunização não protegeu os animais contra a inoculação mucosa (FINERTY et al. 2000; EGAN et al. 2000). Em nosso experimento trabalhamos com o CEA como gene de interesse e foi claramente demonstrado que, após imunização endovenosa era possível mensurar citotoxicidade contra células CEA + em linfócitos das placas de Peyer do sistema mucoso. O mesmo foi observado para os antígenos virais. Após a imunização endovenosa foi detectada a presença de citotoxicidade contra os antígenos virais não apenas no baço, mas também nas placas de Peyer.

A mensuração da citotoxicidade contra o CEA sistêmica e mucosa não são completamente compatíveis com os resultados de proteção a tumores CEA positivos discutidos anteriormente. A citotoxicidade contra o CEA no baço e nas placas de Peyer após imunização endovenosa ou intra-retal foi muito semelhante em todos os experimentos. O mesmo se aplica à produção de anticorpos contra o CEA que foi semelhante nas duas vias de imunização. É consenso de que a maioria das respostas imunológicas contra tumores são predominantemente citotóxicas, e que, a produção ou presença de anticorpos desempenham papel secundário neste processo. A proteção contra tumores CEA positivos foi melhor no grupo de animais que recebeu a imunização por via endovenosa e seria esperado que este grupo apresentasse maior citotoxicidade sistêmica contra o CEA o que não foi observado. Existem diversas explicações para isto. Em primeiro lugar, o teste de citotoxicidade por liberação de cromo radioativo realizado “in vitro” tenta otimizar ao máximo as condições para que os linfócitos reconheçam e destruam as células que apresentam os antígenos contra os quais foram imunizados. Neste contexto, todas as células alvo apresentam

o antígeno de interesse e são alvos de fato para estes linfócitos. O mesmo não ocorre “in vivo” onde existem células com diversas expressões de CEA em suas membranas. Sendo assim, muitos linfócitos com maior afinidade contra esta proteína poderiam se perder ao reconhecerem células normais com baixa expressão de CEA. Como existe enorme número de células normais que apresentam o CEA e um relativo pequeno número de linfócitos gerados para destruir as células tumorais, qualquer perda de células efetoras, que não migrem para o tumor, poderia diminuir o efeito terapêutico citotóxico sem, contudo, gerar respostas auto-ímmunes com significância clínica ou histológica. Estes resultados foram claramente mostrados por ALEXANDER-MILER et al. (1996). A afinidade dos linfócitos gerados nos vários protocolos de imunoterapia é assunto que ganha maior importância a cada dia (GERVOIS et al. 1996; BOUSSO et al. 1999; YEE et al. 1999; ZEH III et al. 1999; CORDANO et al. 2002). Possivelmente muitos linfócitos ativados contra o CEA na imunização intra-retal migraram para o trato gastrointestinal não sendo conseqüentemente capazes de localizar e destruir um tumor CEA positivo implantado no subcutâneo.

Ainda não é consenso sobre qual deve ser o tipo de célula T gerado durante os diversos protocolos de imunoterapia. Os linfócitos de baixa afinidade contra os antígenos tumorais só reconhecem e destroem células com altas expressões destes antígenos. São menos eficazes para a lise celular, mas também tem menor probabilidade de desencadear reações auto-ímmunes (ECHCHAKIR et al. 2002; OH et al. 2003). Já as células com alta afinidade irão destruir células com pequena expressão destes antígenos, mesmo as normais. Estas células teriam alta eficiência para destruir células CEA + independentemente de sua concentração. Mesmo com o

maior risco de doenças auto-imunes a preferência tem se voltado para as últimas. Deve ser lembrado que os protocolos clínicos experimentais de vacinas para pacientes oncológicos estão sendo aplicados em sua maioria para pacientes que já falharam às demais terapias existentes e conseqüentemente tem pequena expectativa de vida (McANEMY et al. 1996; REICHERT e PAQUETTE 2002). Nestes casos quanto maior a eficiência da imunização em gerar células efectoras capazes de reconhecer e destruir células tumorais, maior será a chance de controle do câncer mesmo que isto implique no risco de desenvolvimento de doenças auto-imunes. Em nossos experimentos com os animais transgênicos com o CEA e híbrido Apc/CEA, nunca fomos capazes de detectar nenhuma alteração clínica ou histológica compatível com alguma resposta auto-imune contra o CEA em tecidos saudáveis. Estes resultados estão de acordo com diversos outros trabalhos em animais e humanos (LONG et al. 1999; VON MEHREN et al. 2000; ZHU et al. 2000; XIANG et al. 2001a; NIETHAMMER et al. 2001; ULLENHAG et al. 2002).

Uma consideração importante que merece ser discutida é como se processa uma resposta imunológica clássica e quais as possíveis interações que ocorreram neste projeto. Não existe dúvida de que as células dendríticas apresentam papel central como apresentadoras de antígenos para a geração de linfócitos citotóxicos. A imunização com vetores virais, carregando genes de antígenos tumorais como a empregada neste projeto, podem apresentar duas vias distintas de gerar uma resposta imunológica. A primeira é que o vírus infecte uma célula dendrítica, e nesta célula haja a transcrição do gene do antígeno tumoral. Transcrição, tradução e processamento de maneira que peptídeos desta proteína sejam apresentados por moléculas MHC em um contexto de imunogenicidade por esta célula dendrítica

(SMITH e MOSS 1983; TARTAGLIA et al. 1992; SODEIK e KRIJNSE-LOCKER 2002). A segunda e mais provável é que o vírus gere uma infecção local onde é inoculado e infecte diversos tipos celulares. Estas células infectadas poderiam secretar o CEA ou mesmo promover a sua liberação, após sua lise induzida pelo vírus de maneira que as células dendríticas que migrem para este sítio de infecção pudessem processar o CEA e apresentá-lo em uma modalidade chamada apresentação cruzada (CARBONE et al. 1990, 1998). O CEA sendo apresentado juntamente com antígenos virais seria apresentado em um contexto de “perigo”, descrito como *danger signal* (AUSTYN 1999; ANDERSON et al. 2001). Também neste segundo cenário poderia ocorrer a migração do CEA, juntamente com antígenos virais para órgãos linfóides organizados onde esta resposta também pudesse ser processada (ALTERS et al. 1998; HELMICH e DUTTON 2001; RONCAROLO et al. 2001). Após esta etapa inicial de imunização das células dendríticas estas desencadeariam o processo de apresentação antigênica e a geração de linfócitos citotóxicos contra o CEA.

Como discutimos previamente, fomos capazes de detectar resposta imunológica mucosa após imunização venosa e resposta sistêmica após imunização mucosa, mas não ficou claro onde esta resposta se processa. Fazendo uma ampla revisão da literatura publicada sobre o assunto, evidencia-se que não existe consenso sobre esta dúvida (SPAHN et al. 2001). O principal fator limitante é a atual falta de metodologias que possibilitem determinar onde ocorre a imunização e qual o tipo de célula que migra (WENINGER et al. 2001). Um dos cenários é que após a imunização endovenosa, células dendríticas, apresentando o CEA migrassem para as placas de Peyer. Assim apresentariam este antígeno no sistema imunológico mucoso.

Outro cenário é que estas células dendríticas ficassem restritas ao sistema imunológico sistêmico e apenas linfócitos já imunizados contra o CEA migrassem para o sistema mucoso, gerando citotoxicidade contra este antígeno neste local. Existe, também, a possibilidade de uma completa compartimentalização entre o sistema imunológico mucoso e sistêmico sem nenhum fluxo regular de informações antigênicas entre os dois, o que é pouco provável, já que o próprio antígeno pode “migrar” (BELL et al. 2001).

Antes mesmo de definir como se processa a resposta imunológica entre estes dois compartimentos imunológicos este projeto quantificou e qualificou a disseminação do vírus vaccinia após inoculação endovenosa e intra-retal. Como seria esperado, logo após a inoculação endovenosa detectamos altos títulos do vírus no baço e no ovário que decaem progressivamente. A alta presença no ovário pode estar relacionada com seu alto teor de lipídios e ser parcialmente um santuário imunológico onde a maioria da replicação viral poderia ocorrer (BACHMANN et al. 1997; KARUPIAH et al. 1990). Também detectamos o vírus no sangue após 2 horas. O mais importante é que o vírus também foi detectado nas placas de Peyer do sistema mucoso. Sendo assim, após a imunização sistêmica com o vetor rVac-CEA por via venosa também ocorre a infecção viral do sistema mucoso onde este vetor pode iniciar, manter e amplificar esta resposta imunológica sistêmica.

Resultado semelhante ocorreu após a imunização intra-retal. Foram detectados menores títulos virais, pois conforme discutido previamente, possivelmente apenas uma parte do inóculo viral realmente consegue atravessar a barreira mucosa. O vírus foi imediatamente detectado no baço, mas em nenhum momento foi detectado de maneira significativa no sangue. Isto poderia ser

explicado, caso a imunização intra-retal fosse mais eficiente do que a endovenosa em produzir anticorpos neutralizantes em um tempo de horas. Neste contexto, as partículas virais e células infectadas seriam opsonizadas, retidas no baço sendo retiradas da circulação. Ao contrário do esperado, não foram detectados grandes títulos do vírus nas placas de Peyer após imunização intra-retal. Existem algumas explicações que poderiam justificar estes achados. A primeira é que sendo o trato gastrointestinal a nossa maior porta de entrada é também o órgão com maior concentração de patógenos. Neste contexto conforme abordado previamente, deve apresentar a maior permissividade possível para os antígenos da dieta ao mesmo tempo em que deve ser intransponível para os patógenos que podem ameaçar nossa integridade.

O trato gastrointestinal é nosso maior órgão linfóide por concentrar a nossa maior quantidade de tecidos linfóides e células efectoras. Neste projeto, avaliamos apenas as placas de Peyer para mensurarmos a resposta imunológica mucosa. Existem diversos outros sítios imunológicos organizados como os linfócitos intra-epiteliais, tecido linfóide associado à mucosa (MALT) e os linfonodos mesentéricos que também participam das respostas imunológicas mucosas e poderiam estar retendo, destruindo ou amplificando estes vetores virais (MULLER et al. 2000). Outro aspecto interessante é que nos animais que receberam a imunização por via intra-retal, observou-se um aumento do número de partículas virais no ovário, a partir da segunda hora após a imunização que persistiu na 12^a hora. Atingiu seu máximo na 24^a hora, caindo após este tempo e só desaparecendo no 5^o dia após a imunização.

Um resultado interessante deste projeto foi a comparação entre a resposta imunológica citotóxica e humoral precoce e tardia. Conforme apresentado em resultados, a quantidade de anticorpos mensurados em uma fase logo após a imunização e tardiamente após o implante tumoral foi a mesma. Isto necessariamente não significa que a proporção entre os diversos isotipos de anticorpos tenha se mantido já que não fizemos a análise dos isotipos de anticorpos contra o CEA (ULLENHAG et al. 2002).

Um dos objetivos deste projeto foi avaliar se a presença ou não do CEA, nos tumores implantados, poderia causar algum impacto na resposta imunológica mensurada nestes animais. Esta hipótese foi aventada porque o tumor poderia funcionar como um tecido indutor de tolerância periférica contra antígenos tumorais, incluindo o CEA por apresentar este antígeno em um contexto sem co-estimulação (SCHREURS et al. 2000; HOWLAND et al. 2000; DOAN et al. 2000; OHLEN et al. 2001) ou mesmo o oposto. Fizemos alguns experimentos pilotos neste projeto com animais Knock-out para células B. Estes animais, quando implantados com tumores, apresentavam um crescimento mais lento do que quando comparados com animais de mesma estirpe e que apresentavam células B (dados não mostrados). Estes resultados indicavam para a direção em que as células B estariam implicadas no processo de indução de tolerância contra antígenos tumorais e facilitação do crescimento de tumores (BENNET et al. 1998; QIN et al. 1998; BARBERA-GUILLEM et al. 1999; HOYNE et al. 2000). Os resultados deste projeto piloto, no que se refere ao estudo dos processos de determinação de tolerância, não foram aqui apresentados, porque estão sendo usados num protocolo experimental. Neste protocolo pesquisa-se a importância das células B neste processo, bem como as células regulatórias

CD25+CD4+ que a cada dia ganham maior importância como mediadores e efetoras dos mecanismos de tolerância imunológica (TAKAHASHI et al. 2000).

Conforme descrito em métodos, após as 3 doses de imunização por via endovenosa ou intra-retal, os animais de cada um destes grupos eram divididos em dois grupos, que recebiam o implante de tumores CEA positivos ou negativos. No 22º dia após o implante tumoral estes animais foram sacrificados sendo seus órgãos e tecidos processados de maneira separada para se avaliar as diversas respostas imunológicas mensurada neste projetos. Estes experimentos foram repetidos por três vezes, e em nenhum momento, foi evidenciado se a presença ou não do CEA nos tumores implantados influenciou a citotoxicidade, proliferação de linfócitos ou produção de anticorpos quantificados nos experimentos. Este foi o motivo porque todos estes resultados foram apresentados de maneira única independente do tumor implantado ser CEA positivo ou negativo, conforme mostrado em resultados. O mesmo foi mostrado para a resposta proliferativa dos linfócitos contra várias formas do CEA. Independente da via de imunização a resposta proliferativa foi a mesma no baço. A avaliação da capacidade proliferativa dos linfócitos das placas de Peyer não foi possível de ser mensurada por limitações técnicas e também porque é descrito que estes linfócitos apresentam intrinsecamente uma baixa capacidade proliferativa (SIDO et al. 2000). Para cada animal sacrificado eram identificadas e ressecadas de 6 a 22 placas de Peyer. Independente da quantidade de placas de Peyer processadas, o número de linfócitos processados e coletados a partir do baço era cerca de 100 vezes superior ao número de linfócitos coletados das placas de Peyer. Isso limitava muito a disponibilidade dos últimos para a repetição e confirmação dos resultados. Existem duas explicações para este fato. Em primeiro lugar, o volume do baço mesmo após a

lise dos eritrócitos é muito maior do que o volume de todas as placas de Peyer juntas de cada animal.

Em segundo lugar, conforme descrito em materiais e métodos, o processamento para a coleta dos linfócitos do baço é muito mais simples e menos traumático para estas células. É feita apenas a liberação mecânica sempre em temperaturas próximas de 4°C para preservar ao máximo a viabilidade e funcionalidade destes linfócitos. Ao contrário, no processamento e coleta dos linfócitos a partir das placas de Peyer, após liberação mecânica os mesmos ficavam por quase 1 hora em uma solução com enzimas proteolíticas em uma temperatura de 37°C sem nenhum aporte de nutrientes ou proteção metabólica. Estes processos geravam uma grande proporção de linfócitos do sistema mucoso inviáveis e a ativação de processos de necrose, conforme pôde ser avaliado em todos os experimentos com corantes vitais como o azul de Trypan. Considera-se, também, que muitos dos linfócitos, que se mostravam viáveis a esta coloração, poderiam estar em processos iniciais de apoptose. Isso pôde ser comprovado em outros experimentos, usando-se a Anexina-V, que na citometria de fluxo detectava células viáveis em processo inicial de apoptose. E por último, após esta grande manipulação, muitos dos linfócitos das placas de Peyer mesmo se mantendo viáveis e não apoptóticos já poderiam ter comprometidos suas capacidades de proliferar e gerar citotoxicidade contra os antígenos contra os quais foram imunizados de maneira irreversível.

O resultado que chama a atenção quanto à quantificação da citotoxicidade tardia após a imunização endovenosa ou intra-retal é que a memória imunológica contra o CEA é praticamente insignificante tanto no baço quanto nas placas de Peyer de animais imunizados por qualquer uma das 2 vias de imunização estudadas. Já a

resposta imunológica tardia avaliada pela citotoxicidade contra os antígenos virais pode ser detectada no baço, que apresentava acima de 30% de lise específica contra o alvo mc-38-VAC. O mesmo não pode ser observado nas placas de Peyer. Conforme discutido previamente, a resposta citotóxica tanto mucosa quanto sistêmica contra todos os alvos após a imunização EV ou IR foi muito semelhante.

Possivelmente a resposta imunológica citotóxica tardia no sistema imunológico mucoso estava ausente, porque esta deveria ser a nossa porta de entrada, capaz de iniciar respostas imunológicas rápidas e precisas (NAGLER-ANDERSON 2001). Continuamente passam pelo trato gastrointestinal uma infinita quantidade de antígenos e patógenos diferentes. O mais provável é que o sistema imunológico mucoso inicie a resposta imunológica e ative o sistema imunológico sistêmico. Este deveria processar e gerar grande parte das células efectoras e também, manter a memória imunológica para uma nova ativação rápida e precisa contra novas ameaças para a integridade do indivíduo (AUSTYN 1999). Um dos objetivos da imunização mucosa seria gerar uma rápida e potente resposta sistêmica contra antígenos tumorais que carregados em vetores virais poderiam ser interpretados como antígenos de patógenos invasores. Com isto poderíamos induzir estimulações periódicas contra estes antígenos através de novas imunizações mucosas por diversas rotas.

Se formos capazes de induzir uma resposta imunológica capaz destruir pequenos implantes tumorais mesmo que seja inefetiva para grandes tumores, já seria uma grande vitória. Estes últimos poderiam ser tratados com cirurgia, radioterapia ou quimioterapia como apresentado anteriormente. É a capacidade de metastatizar e estabelecer micrometástases, um dos principais fatores intrínsecos ao tumor que determina o prognóstico do paciente (LIEFERS et al. 1998) e são estas pequenas

lesões metastáticas os alvos mais passíveis de destruição por abordagens imunoterápicas.

6.5. TOLERÂNCIA A ANTÍGENOS TUMORAIS

Os conhecimentos adquiridos na última década têm um grande potencial para mudar de maneira radical muitos conceitos já fundamentados sobre a maneira como diagnosticamos e tratamos várias doenças. A oncologia deverá ser um dos campos a sofrer grandes alterações, principalmente pela influência da biologia molecular e da imunoterapia aplicada a tumores (POLAND et al. 2002). Neste projeto além de abordarmos várias rotas e esquemas para se induzir uma resposta imunológica contra o câncer, pesquisamos também a mecanismos que poderiam estar relacionados com a tolerância contra antígenos tumorais.

Este é um assunto de grande relevância e que foi muito negligenciado até recentemente. Antes de se tentar induzir uma resposta imunológica contra algum antígeno, tumoral ou não, deve-se avaliar se o hospedeiro já é tolerante contra este antígeno (ANDERSON et al. 2001). Em caso afirmativo, uma dos principais objetivos seria quebrar esta tolerância antes de se obter uma resposta imunológica efetora, processos estes que ocorrem de maneira sinérgica. A tolerância à antígenos tumorais pode ser humoral ou celular (BOWNE et al. 1999). Conforme mostrado, os animais CEA que nasceram com esta proteína foram incapazes de produzir anticorpos e apresentavam uma citotoxicidade reduzida contra esta proteína. Isto ficou mais evidente nos experimentos de implantes tumorais. Quando foi implantado o tumor CEA negativo, mc-38, o crescimento nesta linhagem animal foi semelhante

ao observado nos animais C57Bl6, Apc e Apc/CEA. Quando implantado o tumor CEA positivo, mc-32, estes animais transgênicos para o CEA humano apresentaram tumores com crescimento muito mais agressivos do que os demais. Estes achados são descritos e confirmados por outros autores, que também detectaram, que estes animais eram tolerantes ao CEA (THOMPSON et al. 2000; SCHMITZ et al. 2002). Entretanto, conforme também pudemos constatar, esta tolerância pôde ser quebrada e estes animais podem desenvolver citotoxicidade e produzir anticorpos contra o CEA. Porém estas respostas imunológicas são em magnitudes menores do que as obtidas em animais não tolerantes contra esta proteína, da mesma maneira que ocorre em humanos que são inicialmente tolerantes contra este auto-antígeno (McLAUGHLIN et al. 1996; RAS et al. 1997; NOLAN et al. 1999; MIZOBATA et al. 2000). Como discutido anteriormente, existem diversas hipóteses concorrentes para explicar os mecanismos de tolerância. Um dos poucos consensos a este respeito é que a mesma pode ser inata ou adquirida. No caso dos animais CEA, esta tolerância é inata já que os animais nascem com este antígenos e o expressam desde a vida fetal. Conforme confirmado por outros autores, esta proteína não foi detectada no timo destes animais transgênicos adultos (EADES-PERNER et al. 1994). Isto não poderia afastar a possibilidade de indução de tolerância central neste órgão, durante a fase de embriogênese, já que não pesquisamos a presença do CEA, neste órgão, em fetos.

O nosso modelo Apc/CEA pelo seu “background” de ser transgênico para o CEA apresenta os mesmos mecanismos imunológicos de processamento e apresentação desta proteína que o observado nos animais CEA por também já nascerem com este antígeno (RIDGE et al. 1996). Conforme mostramos em resultados, eles apresentam a mesma biodistribuição órgão temporal que a

distribuição do CEA em humanos. Era esperado que estes animais apresentassem a mesma tolerância a esta proteína que ocorria nos animais CEA. Porém, nos experimentos de implantes tumorais CEA positivos mostrados em resultados, pudemos comprovar que o crescimento destes tumores, nestes animais híbridos, era comparável ao observado nos animais C57Bl6, ou seja, estes animais não são tolerantes ao CEA ou se eram, se tornaram parcialmente tolerantes a esta proteína. Como a principal diferença entre os animais CEA e os Apc/CEA é a presença da deleção do gene Apc no segundo, voltamos nossa atenção para avaliar como a interação do Apc com o CEA poderia influir na possível quebra de tolerância contra o CEA.

Quando o tumor mc-32 foi implantado nos animais Apc/CEA, o primeiro resultado que nos chamou a atenção, foi a grande variação da área do tumor implantado nos animais de mesma linhagem e que receberam o implante do mesmo número de células tumorais. Estes resultados, mostrados na Figura 48, foram repetidos e confirmados. No 22º dia após o implante tumoral, tínhamos animais com tumores variando de 140 a 374 mm² conforme mostrado. Quando este mesmo tumor foi implantado nos animais C57Bl6, Apc e CEA não houve esta grande variação entre os animais, conforme mostrado nas Figuras 45, 46, 47, respectivamente.

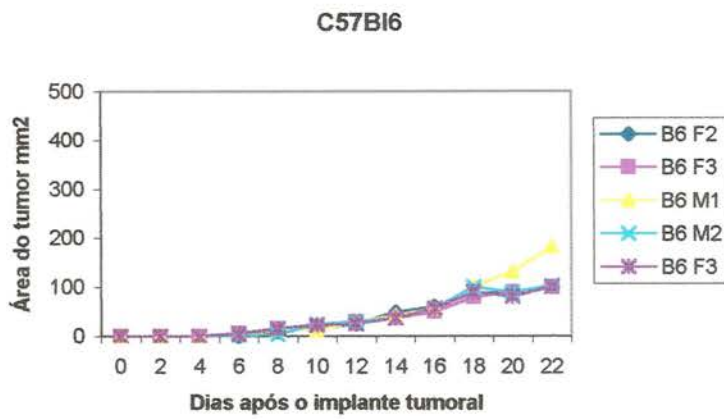


Figura 45 - Evolução por animal C57Bl6 da área do tumor implantado mc-32 mostrada individualmente.

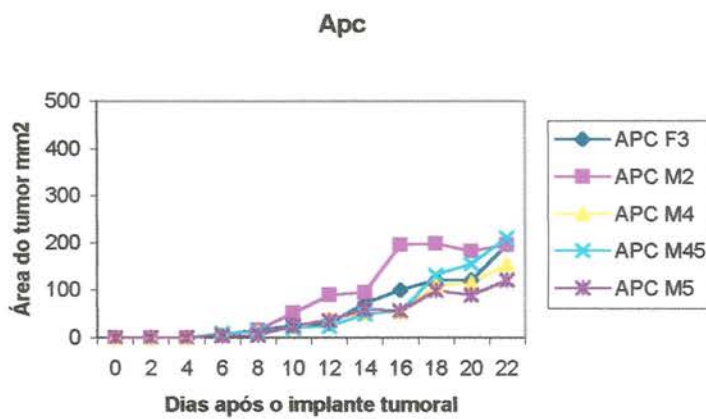


Figura 46 - Evolução por animal Apc da área do tumor implantado mc-32 mostrada individualmente.

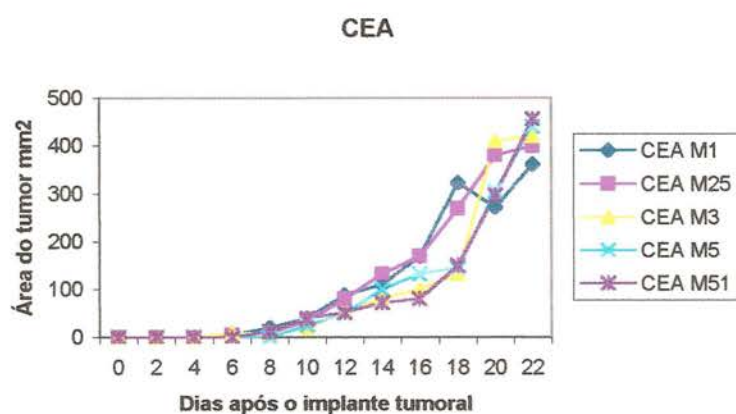


Figura 47 - Evolução por animal CEA da área do tumor implantado mc-32 mostrada individualmente.

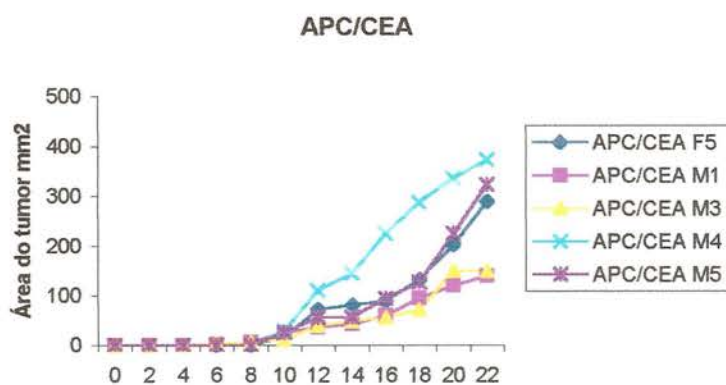


Figura 48 - Evolução por animal Apc/CEA da área do tumor implantado mc-32 mostrada individualmente.

Ocorreu também um pequeno desvio padrão neste mesmo experimento quando o tumor implantado foi o mc-38 nos animais Apc/CEA. Porém, este foi um pequeno grupo controle de apenas 3 animais. Destes 3 animais, os camundongos 1 e

2 tiveram evolução tumoral praticamente idênticas, conforme mostrado na Figura 49, apenas o animal 3 apresentou padrão de crescimento diferente, gerando este desvio padrão.

Nestes experimentos, os animais não receberam nenhum tipo de tratamento, assim concluímos que o único fator que poderia estar influenciando esta grande variação de resultados poderia ser a tolerância ou imunogenicidade contra o CEA presente nestes animais Apc/CEA no momento do implante. Partindo-se do princípio que por já ser um procedimento consagrado, não ocorreram problemas técnicos na injeção tumoral.

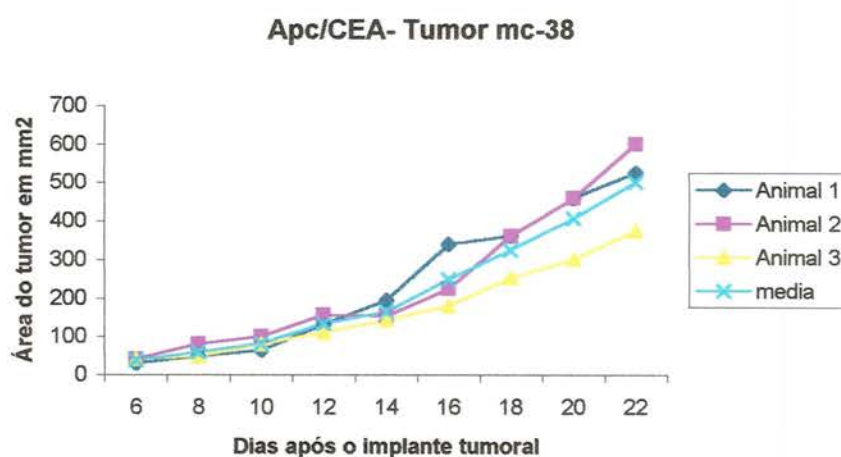


Figura 49 - Evolução por animal Apc/CEA da área do tumor implantado mc-38 mostrada individualmente.

Os resultados acima foram repetidos e confirmados, conforme a Figura 50 que mostra novamente crescimentos variáveis quando o tumor mc-32 foi implantado em animais Apc/CEA.

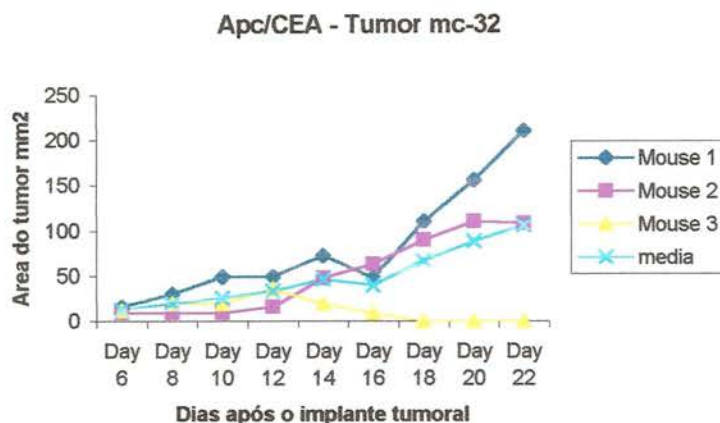


Figura 50 - Evolução por animal Apc/CEA da área do tumor implantado mc-32 mostrada individualmente.

Estes experimentos foram apresentados de forma individualizada neste tópico, porque mesmo não tendo valor estatístico, esta variação de crescimento de tumores CEA positivos merece ser discutida. Infelizmente, o número de animais híbridos Apc/CEA produzidos não era suficiente para atender a todos os experimentos de maneira adequada. Estes animais, conforme exaustivamente apresentado são híbridos transgênicos para o CEA e Knock-out para o Apc o que justificaria ainda mais as dificuldades técnicas/ operacionais para a sua produção. Eles só podem ser obtidos do cruzamento de animais CEA com animais Apc e estes, também são utilizados em experimentos, não podendo ser exclusivamente destinados para acasalamento e produção de animais Apc/CEA.

Conforme mostrado na Figura 48 e 50 em oito animais Apc/CEA, foram observados três padrões distintos de evolução de tumores. Um grupo apresentava maiores tumores comparáveis com os animais CEA que são tolerantes. Um grupo apresentava menores tumores comparáveis aos animais C57Bl6 não tolerantes a este

antígeno. O terceiro grupo apresentava uma evolução tumoral intermediária a estes dois grupos como se fossem parcialmente tolerantes ao CEA.

Conforme foi mostrado na Tabela 1 em resultados, não existe homogeneidade com assincronia quanto à expressão fenotípica do gene Apc nos animais Apc/CEA. Aos 4 meses 20% destes apresentam pólipos, e aos seis meses, este número sobe para 80%. Aos 6 meses 50% apresentam adenomas ou displasias e 0% adenocarcinoma. Aos 8 meses 50% já apresentavam adenocarcinomas. O mesmo pôde ser observado quanto à expressão fenotípica do CEA nos animais Apc/CEA mostrados na Tabela 2. Aos 2 meses a quantidade de CEA no soro variou de 3 a 26,4 µg/ml e aos 6 meses de 1 a 16,8µg/ml.

Todas estas variações individuais certamente foram influenciadas por quando e como o CEA de cada animal foi processado e apresentado pelo sistema imunológico. Este processamento pode gerar uma maior imunogenicidade, não influir, ou mesmo intensificar a tolerância contra o CEA, gerando anergia (GUY-GRAND et al. 1986; TSANG et al. 1997; BOWNE et al. 1999; VEZYS et al. 2000; KALERGIS et al. 2001).

O tecido neoplásico benigno tipo adenoma ou maligno tipo adenocarcinoma apresentam em comum uma maior proliferação. Esta pode ou não ser acompanhada de angiogênese eficiente o suficiente para manter este tecido tumoral proliferativo viável. Quando isto não ocorre, partes do tumor apresentam hipóxia, necrose com diferentes graus de inflamação. Estas interações tumor/hospedeiro podem definir a capacidade invasiva do primeiro e a capacidade deste último em responder a este (RUITER et al. 2002). A maioria dos tumores apresenta áreas de grande proliferação ao lado de áreas de isquemia e necrose. Conforme descrito anteriormente, neste

projeto, o tecido neoplásico apresenta uma maior expressão do CEA. Nestas áreas de isquemia tumoral pode ocorrer indução de apoptose tumoral bem como necrose. Não existe consenso sobre se o lisado tumoral ou os corpos apoptóticos são mais eficientes em induzir tolerância ou resposta imunológica (RONCHETTI et al. 1999; HOFFMANN et al. 2000).

O que podemos inferir deste modelo é que tanto nos corpos apoptóticos como nos lisados de tumores CEA positivos pode ocorrer a superexpressão do CEA (GOLD et al. 1965). Este antígeno pode ser processado localmente por células dendríticas, macrófagos, células M e linfócitos que podem infiltrar o tumor (HUANG et al. 2000). O CEA pode também ser absorvido, transportado para órgãos imunológicos efetores como placas de Peyer e linfonodos mesentéricos ou mesmo ganhar a circulação sistêmica. Nossos resultados não nos permitem avaliar qual foi a via preferencial. Algumas destas rotas e subtipos de efetores imunológicos podem induzir imunogenicidade ao CEA, tolerância ou mesmo não influir neste processo (XIANG et al. 2001a; SONODA et al. 2001; KIRK et al. 2001; IEZZI et al. 2001). Podemos supor que estes poderiam ter sido um dos mecanismos que influíram para os diversos padrões de evolução dos tumores CEA positivos implantados nestes animais Apc/CEA.

Os animais Apc/CEA apresentavam uma malignização progressiva de suas lesões gastro-intestinais onde ocorria a superexpressão do CEA. Seria esperado que animais mais jovens apresentassem um grau de tolerância ao CEA diferente dos animais adultos. Esta diferença imunológica sistêmica, se existente, não foi significativa o suficiente para ser mensurada. Então foi comparado um grupo de animais adultos jovens com dois meses com um grupo de animais idosos com 9

meses. Os animais Apc/CEA foram comparados com um grupo de animais C57Bl6. O objetivo foi avaliar se a resposta imunológica ao CEA após imunização venosa com rVac-CEA, era semelhante entre estas duas linhagens e se podiam ser comparados quando jovens e idosos (SKORNICK et al. 1990; KOGA et al. 2000; KAMATH et al. 2000; THOREUX et al. 2000; HOSHI et al. 2001).

Conforme mostrado em resultados, após a imunização EV com rVac-CEA ambas as linhagens de animais tanto jovens quanto idosos não apresentou nenhuma resposta citotóxica contra o alvo CEA negativo, mc-38. Estes resultados estão em concordância com vários outros descritos neste trabalho.

Os animais jovens Apc/CEA e C57Bl6 apresentaram a mesma citotoxicidade contra um alvo CEA positivos. Já aos nove meses, os animais Apc/CEA aparentemente apresentavam maior citotoxicidade contra o CEA nas proporções de 100, 50 e 25 células efetoras para cada célula alvo. Uma das explicações para este fato poderia ser que o CEA expresso nos tumores espontâneos do trato digestivo destes animais poderia de alguma maneira, iniciar uma resposta antigênica contra o CEA que foi posteriormente amplificada durante a vacinação. Conforme descrito anteriormente, estes resultados não foram submetidos à análise estatística pelo pequeno número de animais em cada grupo, mas foram repetidos e confirmados. Os resultados de citotoxicidade que medem a percentagem de lise específica são freqüentemente apresentados sem uma análise estatística por várias limitações inerentes ao método e a forma como os resultados são quantificados (MUDERS et al. 2003).

Os vários esquemas e vias de imunização podem desencadear imunogenicidade como é o objetivo da maioria, bem como tolerância e anergia que

pode ser o efeito esperado para as vacinas desensibilizadoras. As vacinas com objetivos de gerar imunogenicidade também podem apresentar o indesejado efeito de desencadear tolerância contra os antígenos contra os quais deveria gerar imunização. O resultado depende não apenas da via empregada, mas principalmente do tipo de célula envolvida no processamento antigênico e a presença de co-estimulação (GUY-GRAND et al. 1978; LITTON et al. 1999; MAINI et al. 1999; SALLUSTO et al. 1999; WHITE et al. 2000; IWASAKI e KELSALL 2001; LAZAVECCHIA et al. 2001).

Este trabalho mostrou que o vetor vaccinia recombinante com o CEA humano é capaz de desencadear uma resposta imunológica específica contra este antígeno, que foi capaz de proteger os animais contra tumores CEA positivos. Existem diversos outros vetores da família do vírus vaccinia, os poxvírus, que também podem desempenhar esta função com eficácia (KLENERMAN e ZINKERNAGEL 1998; AMIN et al. 2000; MULLEN e TANABE 2002). A combinação de vários vetores recombinantes para o mesmo gene é uma opção também aparentemente muito promissora (MACKETT et al. 1984; HODGE et al. 1997; RAJAGOPALAN e LONG 2000).

O mesmo vetor vaccinia também pode apresentar efeitos indesejáveis como inibir a maturação de células dendríticas, induzir lise precoce de células apresentadoras de antígenos e estimular a produção e secreção de substâncias imunossupressoras (ENGELMAYER et al. 1999; SMITH et al. 1999; FAUNCE et al. 2001). Neste trabalho não foi quantificado o quanto estes efeitos deletérios do vírus vaccinia poderiam ter influído no resultado de cada experimento. Continuamente são descritos vários novos agentes que podem interagir com os

processos de carcinogênese e indiretamente influir nos resultados das imunizações oncológicas e que não estavam no escopo deste projeto (KADO et al. 2001).

Mesmo sendo considerado um antígeno fracamente imunogênico, o CEA mostrou, nestes experimentos, que pode ser usado como antígeno para imunizar animais contra tumores CEA positivos. Estes resultados podem ter o potencial de serem extrapolados para protocolos clínicos em humanos agregando alguns resultados promissores como via de imunização e doses (HORIG et al. 2000b). Isto não impede que se empreguem também outros antígenos que poderiam ser utilizados de maneira sinérgica ou isolada (ZAREMBA et al. 1997; RENKVIST et al. 2001; KEOGH et al. 2001). Outras vias e vetores também poderiam ser empregados de maneira sinérgica para amplificar respostas imunológicas antitumorais como as apresentadas neste trabalho (MALOY et al. 2001; CHEN et al. 2001; KAMMERER et al. 2001). O mais importante é a geração de linfócitos capazes de reconhecer e destruir as células tumorais (LITTON et al. 1999; HANSON et al. 2000).

Finalizando gostaríamos de mencionar que vários outros experimentos foram conduzidos durante este projeto e que não foram aqui apresentados. Muitos destes experimentos poderiam apresentar respostas para a maioria das dúvidas que ainda persistem, mas por dificuldade técnicas ou resultados pouco confiáveis, não foram discutidos neste trabalho. Entre os mais importantes poderíamos mencionar os apresentados abaixo.

O primeiro e mais importante seria a imunização intra-retal com o vetor rVac-CEA em animais *Apc/CEA* ainda jovens e o acompanhamento dos mesmos para se avaliar se haveria a formação de pólipos. Poderia ser medido caso houvesse pólipos, se estes, foram CEA positivos ou negativos e se esta imunização seria capaz de

impedir a degeneração para adenocarcinomas. Estes experimento foi realizado com 6 animais que receberam 3 doses de rVac-CEA por via IR aos dois meses. Estes animais foram acompanhados até os 8 meses quando foram sacrificados. Todo o trato digestivo foi examinado quanto à presença de lesões histopatológicas e a quantificação do CEA nas mesmas. Também foi avaliada a citotoxicidade, proliferação e anticorpos contra o CEA conforme descrito nos experimentos anteriores.

Este experimento seria a união dos dois projetos apresentados nesta tese. A aplicação da imunização intra-retal no modelo animal híbrido Apc/CEA, aqui apresentado e caracterizado. Infelizmente os resultados obtidos foram inconclusivos e impossíveis de serem discutidos ou apresentados nos resultados. Uma das maiores limitações deste projeto foi a nossa incapacidade de gerar número de animais Apc, CEA e Apc/CEA em quantidade suficiente para atender a demanda dos experimentos. Outra grande limitação foi que o modelo animal Apc/CEA apresentou uma grande heterogeneidade de resultados em vários parâmetros avaliados. Isto mimetiza o que ocorre na situação humana onde dificilmente um paciente pode ser precisamente comparado a outro. Certamente estas limitações não tornam este modelo animal menos útil ou os resultados aqui apresentados menos importantes. A grande similaridade deste modelo com a situação humana o torna ainda mais atraente e interessante, já que estes animais, produzidos em grande escala, poderão servir de base para a avaliação de novas abordagens terapêuticas para o câncer do trato gastrointestinal, incluindo a via de imunização intra-retal.

7 CONCLUSÕES

1. A via de imunização intra-retal com o vetor rVac-CEA mostrou-se capaz de gerar resposta imunológica com citotoxicidade no sistema imunológico mucoso e sistêmico contra o CEA e antígenos virais.
2. A via de imunização intra-retal com vetor rVac-CEA foi capaz de gerar resposta proliferativa de linfócitos do baço contra o CEA bem como a produção de anticorpos contra este antígeno.
3. Mesmo existindo uma compartimentalização do sistema imunológico, uma imunização sistêmica mostra resposta no sistema mucoso, assim como uma imunização intra-retal mostra resposta no sistema imunológico sistêmico.
4. O vetor rVac-CEA após administração endovenosa ou intra-retal pode ser resgatado no sangue, ovários, baço e placas de Peyer, mostrando que não existiu compartimentalização para a disseminação deste vírus.
5. A imunização com o vetor rVac-CEA por via endovenosa e intra-retal foi capaz de proteger parcial ou completamente estes animais contra tumores CEA positivos sendo esta proteção de maior magnitude após a imunização endovenosa para tumores implantados no subcutâneo.
6. Foi gerado e apresentado um modelo híbrido transgênico para o CEA humano e “knock-out” para o gene Apc murino denominado Apc/CEA 1638. Este modelo apresentava o desenvolvimento de lesões pré-malignas no trato gastrointestinal que evoluíam para adenomas e adenocarcinomas invasivos. Estes animais apresentavam expressão de CEA em tecidos saudáveis e uma

maior expressão deste nos tecidos degenerados. Esta expressão aumentava nestes tecidos com o aumento da malignidade. A expressão de CEA, neste modelo, segue a mesma distribuição órgão temporal observada em humanos. Os animais Apc/CEA apresentavam maior sobrevida do que outros modelos animais semelhantes.

7. Estes animais eram parcialmente tolerantes ao CEA e esta tolerância podia ser quebrada, sendo possível induzir resposta celular contra o CEA nestes animais, após a imunização IR e EV com o vetor rVac-CEA.
8. Mesmo o CEA, sendo uma proteína pouco imunogênica, pode ser empregada para se imunizar animais e gerar resposta citotóxica contra tumores CEA positivos.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alexander-Miller MA, Leggatt GR, Berzofsky JA. Seletive expansion of high-or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996; 93: 4102-7.

Alpan O, Rudomen G, Matzinger P. The role of dendritic cells, B cells, and M cells in Gut-oriented immune response. **J Immunol** 2001; 166:4843-52.

Alters S, Gadea JR, Sorich M, O'Donoghue G, Talib S, Philip R. Dendritic cells pulsed with CEA peptide induce CEA-specific CTL with restricted TCR repertoire. **J Immunother** 1998; 21:17-26.

Amara RR, Villinger F, Altman JD, et al. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. **Science** 2001; 292:69-74.

Amin S, Robins RA, Maxwell-Armstrong CA, Scholfield JH, Durrant LG. Vaccine-induced apoptosis: a novel clinical trial end point? **Cancer Res** 2000; 4:3132-6.

Anderson CC, Carroll MJ, Gallucci S, Ridge JP, Cheever AW, Matzinger P. Testing time, ignorance and danger based models of tolerance. **J Immunol** 2001; 166:3663-71.

Arstila T, Arstila TP, Calbo S, et al. Identical T cell clones are located with the mouse gut epithelium and lamina propria and circulate in the thoracic duct lymph. **J Exp Med** 2000; 191:823-34.

Austyn JM. Death, destruction, danger and dendritic cells. **Nat Medicine** 1999; 5:1232-3.

Baars A, Buter J, Pinedo HM. Making use of the primary tumour. **Bioessays** 2003; 25:79-86.

Bachmann MF, Kundig TM, Hengartner H, Zinkernagel RM. Protection against immunopathological consequences of a viral infection by activated but not resting cytotoxic T cells: T cell memory without "memory T cells? " **Proc Natl Acad Sci U S A** 1997; 94:640-5.

Balmain A. Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. **Nat Rev Cancer** 2001; 1:77-86.

Barbera-Guillem E, Nelsom MB, Barr B, et al. B lymphocyte pathology in human colorectal cancer. Experimental and clinical therapeutic effects of partial B cell depletion. **Cancer Immunol Immunother** 1999; 48:541-9.

Bell SJ, Righy R, English N, et al. Migration and maturation of human colonic dendritic cells. **J Immunol** 2001; 166:4958-67.

Belyakov I, Derby MA, Ahlers JD, et al. Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccinia challenge. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998a; 95:1709-14.

Belyakov I, Wyatt LS, Ahlers JD, et al. Induction of a mucosal cytotoxic T-lymphocyte response by intrarectal immunization with a replication-deficient recombinant vaccinia virus expressing human immunodeficiency virus 89.6 envelope protein. **J Virol** 1998b; 72:8264-72.

Belyakov I, Moss B, Strober W, Berzofsky JA. Mucosal vaccination overcomes the barrier to recombinant vaccinia immunization caused by preexisting poxvirus immunity. **Proc Natl Acad Sci** 1999; 96:4512-7.

Bennet SRM, Carbone FR, Toy T, Miller JFAP, Heath W. B cells directly tolerize CD8-T cells. **J Exp Med** 1998; 188:1977-83.

Berzofsky JA, Ahlers JD, Belyakov IM. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. **Nat Rev Immunol** 2001; 1:209-19.

Boon T, Van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. **J Exp Med** 1996; 183:725-9.

Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. **Immunity** 2000; 13:829-40.

Bousso P, Levraud JP, Kourilsky P, Abastado JP. The composition of a primary T cell response is largely determined by the timing of recruitment of individual T cell clones. **J Exp Med** 1999; 190:1591-600.

Bowne WB, Srinivasan R, Wolchok JD, et al. Coupling and uncoupling of tumor immunity and autoimmunity. **J Exp Med** 1999; 190:1717-22.

Buzzoni R, Bonadonna G, Valagussa P, et al. Adjuvant chemotherapy with doxorubicin plus cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in the treatment of resectable breast cancer with more than three positive axillary nodes. **J Clin Oncol** 1991;9:2134.

Carbone FR, Bevan MJ. Class I restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigens in vivo. **J Exp Med** 1990; 171:377-87.

Carbone FR, Kurts C, Bennett SRM, Miller JFPA, Heath WR. Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. **Immunol Today** 1998; 19:368-73.

Chen Y, Song K, Eck SL, Chen Y. An intra-Peyer's patch gene transfer model for studying mucosal tolerance: Distinct roles of B7 and IL-12 in mucosal T cell tolerance. **J Immunol** 2000; 165:3145-53.

Chen CH, Wang TL, Ji H, et al. Recombinant DNA vaccines protect against tumors that are resistant to recombinant vaccinia vaccines containing the same gene. **Gene Ther** 2001; 8:128-38.

Clark MA, Jepson MA. Intestinal M cells and their role in bacterial infection. **Int J Med Microbiol** 2003; 293:17-39.

Clark SRM. The critical role of CD40/CD40L in the CD4-dependent generation of CD8+ T cell immunity. **J Leukoc Biol** 2000; 67:607-14.

Clarke P, Mann J, Simpson JF, Richard-Dickson K, Primus FJ. Mice transgenic for human carcinoembryonic antigen as a model for immunotherapy, **Cancer Res** 1998; 58:1469-77.

Coley WB. A report of recent cases of inoperable sarcoma successfully treated with mixed toxins of erysipelas and *Bacillus prodigiosus*. **Surg Gynecol Obstet** 1911; 13:174-90.

Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. **Clin Orthop** 1991; (262):3-11.

Conry R, Lo Buglio A, Kantor J, et al. Immune response to a carcinoembryonic antigen polynucleotide vaccine. **Cancer Res** 1994; 54:1164-8.

Cordano TA, Visser KE, Tirion FH, Schumacher TNM, Kruisbeek AM. Can the low-avidity self-specific T cell repertoire be exploited for tumor rejection? **J Immunol** 2002; 168:651-60.

Czerkinsky C, Anjuere F, McGhee JR, et al. Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. **Immunol Rev** 1999; 170:197-222.

Darcy PK, Haynes NM, Snook MB, et al. Redirected perforin-dependent lysis of colon carcinoma by ex vivo genetically engineered CTL. **J Immunol** 2000; 164:3705-12.

DeVita VT. The influence of information on drug resistance on protocol design: the Harry Kaplan Memorial Lecture given at the Fourth International conference on malignant Lymphoma. June 6-9, 1990, Lugano, Switzerland. **Ann Oncol** 1991; 2:93.

Devries AF, Griebel J, Kremser C, et al. Tumor microcirculation evaluated by magnetic resonance imaging predicts therapy outcome for primary rectal carcinoma. **Cancer Res** 2001; 61:2513-6.

Doan T, Herd KA, Lambert PF, Fernando GJP, Street MD, Tindle RW. Peripheral tolerance to human papillomavirus E7 oncoprotein occurs by cross-tolerization, is largely th-2-independent, and is broken by dendritic cell immunization. **Cancer Res** 2000; 60:2810-5.

Eades-Perner AM, Van der Putten H, Hirth A, et al. Mice transgenic for the human carcinoembryonic antigen gene maintain its spatiotemporal expression pattern. **Cancer Res** 1994; 54:4167-76.

Eades-Perner AM, Zimmermann W. Carcinoembryonic antigen-transgenic mice: a model for tumor immunotherapy. **Tumor Biol** 1995; 16:56-61.

Echchakir H, Dorothee G, Vergnon I, Menez J, Chouaib S, Mami-Chouaib F. Cytotoxic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen display similar HLA tetramer binding but distinct functional avidity and tissue distribution. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99:9358-63.

Egan RM, Yorkey C, Black R, et al. In vivo behavior of peptide-specific T cells during mucosal tolerance induction: Antigen introduced through the mucosa of the conjunctiva elicits prolonged antigen-specific T cell priming followed by anergy. **J Immunol** 2000; 164: 4543-50.

Eggert AA, Schreurs MW, Boerman OC, et al. Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration. **Cancer Res** 1999; 59:3340-5.

Engelmayer J, Larsson M, Subklewe M, et al. Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. **J Immunol** 1999; 163:6762-8.

Engleman EG. Dendritic cell-based cancer immunotherapy. **Semin Oncol**. 2003; 30(3 suppl 8):23-9.

Eo SK, Gierynska M, Kamar AA, Rouse BT. Prime-Boost immunization with DNA vaccine: mucosal route of administration changes the rules. **J Immunol** 2001; 166:5473-9.

Externest D, Meckelein B, Schmidt MA, Frey A. Correlation between antibody immune response at different mucosal effector sites are controlled by antigen type and dosage. **Infect Immun** 2000; 68:3830-9.

Farstad IN, Halstensen TS, Fausa O, Brandtzaeg P. Heterogeneity of M-cell-associated B and T cells in human Peyer's patches. **Immunology** 1994; 83:457-64.

Faunce DE, Sonoda KH, Stein-Streilein J. MIP-2 recruits NKT cells to the spleen during tolerance induction. **J Immunol** 2001; 166:313-21.

Ficari F, Cama A, Valanzano R, et al. APC gene mutations and colorectal adenomatosis in familial adenomatous polyposis. **Br J Cancer** 2000; 82:348-53.

Fidler IJ. Critical determinants of metastasis. **Semin Cancer Biol** 2002; 12:89-96.

Finerty S, Stokes CR, Gruffydd-Jones TJ, et al. Mucosal immunization with experimental feline immunodeficiency virus (FIV) vaccines induces both antibody and T cell responses but does not protect against rectal FIV challenge. **Vaccine** 2000; 18:3254-65.

Finn OJ, Forni G. Prophylactic cancer vaccines. **Curr Opin Immunol** 2002; 14:172-7.

Finn OJ, Lotze MT. A decade in the life of tumor immunology. **Clin Cancer Res** 2001; 7(3 suppl):759s-60s.

Fodde R, Edelmann W, Yang K, et al. A targeted chain-termination mutation in the mouse APC gene result in multiple intestinal tumors. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994; 91:8969-73.

Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. **Nat Rev Cancer** 2001; 1:55-67.

Folkman. Tumor angiogenesis: a possible control point in tumor growth. **Ann Intern Med** 1975; 82:96-100.

Fong L, Brockstedt D, Benike C, Wu L, Engleman EG. Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. **J Immunol** 2001; 166:4254-9.

Foon KA, John WJ, Chakraborty M, Das R, Teitelbaum A, Garrison J, Kashala O, Chatterjee SK, Bhattacharya-Chatterjee M. Clinical and immune responses in resected colon cancer patients treated with anti-idiotypic monoclonal antibody vaccine that mimics the carcinoembryonic antigen. **J Clin Oncol**. 1999;17:2889-5.

Foon KA, John WJ, Chakraborty M, et al. Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins. **Proc Natl Acad Sci** 2001; 98:3310-5.

Fujihashi K, Dohi T, Rennert PD, Yamamoto M, Koga T, Kiyono H, McGhee JR. Peyer's patches are required for oral tolerance to proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 2001; 98(6), 3310-3315.

Gangopadhyay A, Bajenova O, Kelly TM, Thomas P. Purification and analysis of an 80Kda carcinoembryonic antigen-binding protein from Kupffer cells. **Arch Biochem Biophys** 1996; 328:151-7.

Gervois N, Guilloux Y, Elisabeth D, Jotereau F. Suboptimal activation of melanoma infiltrating lymphocytes (TIL) due to low avidity of TCR/MHC-tumor peptide interactions. **J Exp Med** 1996; 183:2403-7.

Gimbrone MA Jr, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. **J Exp Med** 1972; 136:261-76.

Giovagnoli MR, Giarnieri E, Midiri G, Tesoriere A, Ferraro S, Vecchione A. Intratumoral heterogeneity in colorectal carcinoma: trucut sampling for DNA ploidy analysis. **Anticancer Res** 1999; 19:4577-80.

Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. **J Exp Med** 1965; 121:439-62.

Goldenberg DM, Sharkey RM, Primus FJ. Carcinoembryonic antigen in histopathology: immunoperoxidase staining of conventional tissue sections. **J Natl Cancer Inst** 1976; 57:11-22.

Goldschneider I, Cone RE. A central role for peripheral dendritic cells in the induction of acquired thymic tolerance. **Trends Immunol** 2003; 24:77-81.



Greiner JW, Zeytin H, Anver MR, Schlom J. Vaccine based therapy directed against carcinoembryonic antigen demonstrates antitumor activity on spontaneous intestinal tumors in the absence of autoimmunity. **Cancer Res** 2002; 62:6944-51.

Grosenbach DW, Barrientos JC, Schlom J, Hodge JW. Synergy of vaccine strategies to amplify antigen-specific immune responses and antitumor effects. **Cancer Res** 2001; 61:4497-505.

Guadagni F, Roselli M, Cosimelli M, et al. Quantitative analysis of CEA expression in colorectal adenocarcinoma and serum: lack of correlation. **Int J Cancer** 1997; 72:949-54.

Gura T. Cancer models-systems for identifying new drugs are often faulty. **Science** 1997; 278:1041-2.

Guy-Grand D, Griscelli C, Vassalli P. The mouse gut T lymphocyte, a novel type of T cell. **J Exp Med** 1978; 148:1661-77.

Guy-Grand D, Vassalli P. Gut injury in mouse graft-versus-host reaction. **J Clin Invest** 1986; 77:1584-95.

Hamann D, Ross MTL, Van Lier RAW. Faces and phases of human CD-8+ T-cell development. **Immunol Today** 1999; 20:177-80.

Hamilton JM, Chen AP, Nguyen B, et al. Phase I study of recombinant vaccinia virus that express human carcinoembryonic antigen in adult patients with adenocarcinomas [Abstract]. **Proc Am Soc Clin Oncol** 1994; 13:295.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Haneberg B, Kendal D, Amerogen HM, Apter FM, Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Induction of specific immunoglobulin A in the small intestine, colon-rectum, and vagina measured by a new method for collection of secretions from local mucosal surfaces. **Infect Immun** 1994; 62:15-23.

Hanson HL, Donermeyer DL, Ikeda H, et al. Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy. **Immunity** 2000; 13:265-76.

Hasegawa T, Isobe K, Nakashima I, Shimokata K. Quantitative analysis of antigen for the induction of tolerance in carcinoembryonic antigen transgenic mice. **Immunology** 1992; 77:577-81.

Hashi H, Yoshiro H, Honda K, et al. Compartmentalization of Peyer's patch before lymphocyte entry. **J Immunol** 2001; 166:3702-9.

Helmich BK, Dutton RW. The role of adoptively transferred CD8 T cells and host cells in the control of the growth of the EG7 thymoma: factors that determine the relative effectiveness and homing properties of Tc1 and Tc2 effectors. **J Immunol** 2001; 166:6500-8.

Henderson DA, Arita I. Utilization of vaccine in the global eradication of smallpox. In: Quinna GV, editor. **Vaccinia viruses as vectors for vaccine antigens**. New York: Elsevier; 1995. p.231-6.

Hensley ML, Schuchter LM, Lindley C, et al. American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants. **J Clin Oncol** 1999; 17:3333-55.

Heyer J, Yang K, Lipkin M, Edelman W, Kucherlapati R. Mouse models for colorectal cancer. **Oncogene** 1999; 18:5325-33.

Hill GJ. Historic milestones in cancer surgery. **Semin Oncol** 1979; 6:409.

Hodge JW. Carcinoembryonic antigen as a target for cancer vaccines. **Cancer Immunol Immunother** 1996; 43:127-34.

Hodge JW, Grosenbach DW, Schlom J. Vector-based delivery of tumor-associated antigens and T-cell co-stimulatory molecules in the induction of immune response and anti-tumor immunity. **Cancer Detect Prev** 2002; 26:275-91.

Hodge JW, McLaughlin JP, Kantor JA, Schlom J. Diversified prime and boost protocols using recombinant vaccinia virus and recombinant non-replicating avian pox virus to enhance T-cell immunity and antitumor response. **Vaccine** 1997; 15:759-68.

Hoffmann TK, Meidenbauer N, Dworacki G, Kanaya H, Whiteside TL. Generation of tumor-specific T lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. **Cancer Res** 2000; 60:3442-549.

Holt PG, Haining S, Nelson DJ, Sedgwick JD. Origin and steady-state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of conducting airways. **J Immunol** 1994; 153:256-61.

Hopkins S, Krahenbuhl JP, Schodel F, et al. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine induces local immunity by four different routes of immunization. **Infect Immunol** 1995; 63:3279-86.

Horig H, Lee DS, Conkright W, et al. Phase I clinical trial of a recombinant canarypoxvirus (ALVAC) vaccine expressing human carcinoembryonic antigen and the B7.1 co-stimulatory molecule. **Cancer Immunol Immunother** 2000a; 49:504-14.

Horig H, Medina FA, Conkright WA, Kaufman HL. Strategies for cancer therapy using carcinoembryonic antigen vaccines. **Expert Rev Mol Med**. [serial on-line]

2000b; 19 April. [24 screens] Available from: < URL: <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/0000168Xh.htm>> [2003 Oct 3]

Horig H, Wainstein A, Long L, et al. A new mouse model for evaluating the immunotherapy of human colorectal cancer. **Cancer Res** 2001; 61:8520-6. Hoshi H, Horie K, Tanaka K, et al. Patterns of age-dependent changes in the number of lymph follicles and germinal centres in somatic and mesenteric lymph nodes in growing C57Bl/6 mice. **J Anat** 2001; 198:189-205.

Houghton AN. Cancer antigens: immune recognition of self and altered self. **J Exp Med** 1994; 180:1-4.

Howland KC, Ausubel LJ, London CA, Abbas AK. The roles of CD28 and CD40 ligand in T cell activation and tolerance. **J Immunol** 2000; 164:4465-70.

Hoyne GF, Dallman MJ, Lamb JR. T-cell regulation of peripheral tolerance and immunity: the potential role for notch signaling. **Immunology** 2000; 100:281-8.

Huang EH, Kaufman HL. CEA-based vaccines. **Expert Rev Vaccines** 2002; 1:49-63.

Huang FP, MacPherson GG. Continuing education of the immune system-dendritic cells, immune regulation and tolerance. **Curr Mol Med** 2001; 1:457-68.

Huang FP, Platt N, Wykes M, et al. A discrete subpopulation of dendritic cells transport apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. **J Exp Med** 2000; 191:435-43.

Huarte E, Sarobe P, Lu J, et al. Enhancing immunogenicity of a CTL epitope from carcinoembryonic antigen by selective amino acid replacements. **Clin Cancer Res** 2002; 8:2336-44.

- Iezzi G, Scheidegger D, Lanzavecchia A. Migration and function of antigen-primed nonpolarized T lymphocytes in vivo. **J Exp Med** 2001; 193:987-93.
- Iwasaki A, Kelsall BL. Unique functions of CD11b+, CD8+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. **J Immunol** 2001; 166:4884-90.
- Jackson RJ, Fujihashi K, Xu-Amano J, Kiyono H, Elson CO, McGhee JR. Optimizing oral vaccines: induction of systemic and mucosal B-Cell antibody response to tetanus toxoid by the use of cholera toxin as an adjuvant. **Infect Immunol** 1993; 61:4272-9.
- Jenne L, Thumann P, Steinkasserer A. Interaction of large DNA viruses with dendritic cells. **Immunobiology** 2001; 204:639-48.
- Jothy S. Characterization of monoclonal antibodies to carcinoembryonic antigen with increased tumor specificity. **Lab Invest** 1986; 54:108-17.
- Jump RL, Levine AD. Murine Peyer's patches favor development of an IL-10-secreting, regulatory T cell population. **J Immunol** 2002; 168:6113-9.
- Kado S, Uchida K, Funabashi H, et al. Intestinal microflora are necessary for development of spontaneous adenocarcinoma of the large intestine in T-Cell receptor *B* chain and p53 double-knockout mice. **Cancer Res** 2001; 61: 2395-8.
- Kaiserlian D, Vidal K, Revillard JP. Murine enterocytes can present soluble antigen to specific class II-restricted CD8+T cells. **Eur J Immunol** 1989; 19:1513-6.
- Kalergis AM, Boucheron N, Doucey MA, et al. Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. **Nat Immunol** 2001; 2:229-34.

Kamath AT, Pooley J, O'Keeffe MAO, et al. The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. **J Immunol** 2000; 165:6762-70.

Kammerer R, Stober D, Singer BB, Obrink B, Reimann J. Carcinoembryonic Antigen-related cell adhesion molecule on murine dendritic cell is a potent regulator of T cell stimulation. **J Immunol** 2001; 166: 6537-44.

Kantor J, Abrams S, Irvine K, Snoy P, Kaufman H, Schlom J. Specific immunotherapy using a recombinant Vaccinia virus expressing human carcinoembryonic antigen. **Ann NY Acad Sci** 1993; 690:370-3.

Kantor J, Irvine K, Abrans S, Kaufman H, DiPietro J, Schlom J. Antitumor Activity and immune responses induced by a recombinant carcinoembryonic antigen-vaccinia virus vaccine. **J Natl Cancer Inst** 1992; 84:1084-91.

Kao H, Amoscato AA, Ciborowski P, Finn OJ. A new strategy for tumor antigen Discovery based on in vitro priming of naive T cells with dendritic cells. **Clin Cancer Res** 2001; 7(3 Suppl):773s-80s.

Karupiah G, Coupar B, Ramshaw I, Boyle D, Blanden R, Andrew M. Vaccinia virus-mediated damage of murine ovaries and protection by virus-expressed interleukin-2. **Immunol Cell Biol** 1990; 68:325-33.

Karzon DT. Considerations of safety, efficacy, and potential applications of Vaccinia vectors for immunoprophylaxis: an alternative approach for control of human diseases for which vaccines are available. In: Quinna GV, editor. **Vaccinia viruses as vectors for vaccine antigens**. New York: Elsevier; 1995. p.231-6.

Kass E, Schlom J, Thompson J, Guadagni F, Graziano P, Greiner JW. Induction of protective host immunity to Carcinoembryonic Antigen (CEA), a self antigen in

CEA transgenic mice, by immunizing with a recombinant vaccinia-CEA virus. **Cancer Res** 1999; 59:676-83.

Kaufman H, Schlom J, Kantor J. A recombinant vaccinia virus expressing human carcinoembryonic antigen (CEA). **Int J Cancer** 1991; 48:900-7.

Kayser S, Watermann I, Rentzsch C, Weinschenk T, Wallwiener D, Guckel B. Tumor-associated antigen profiling in breast and ovarian cancer: mRNA, protein or T cell recognition? **J Cancer Res Clin Oncol** 2003; Jun 26 [Epub ahead of print].

Keogh E, Fikes J, Southwood S, Celis E, Chesnut R, Sette A. Identification of new epitopes from four different tumor-associated antigens: recognition of naturally processed epitopes correlates with HLA-A*0201-binding affinity. **J Immunol** 2001; 167:787-96.

Kim SK, Reed DS, Heath WR, Carbone F, Lefrancois L. Activation and migration of CD8 T cells in the intestinal mucosa. **J Immunol** 1997; 159:4295-306.

Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. **Cell** 1996; 87:159-70.

Kirk CJ, Hartigan-O'Connor D, Nickoloff BJ, et al. T Cell-dependent antitumor immunity mediated by secondary lymphoid tissue chemokine: augmentation of dendritic cell-based immunotherapy. **Cancer Res** 2001; 61:2062-70.

Klenerman P, Zinkernagel RM. Original antigenic sin impairs cytotoxic T lymphocyte responses to viruses bearing variant epitopes. **Nature** 1998; 394:482-5.

Koga T, McGhee JR, Kato H, Kato R, Kiyono H, Fujihashi K. Evidence for early aging in the mucosal immune system. **J Immunol** 2000; 165:5352-9.

Kraehenbuhl JP, Hopkins SA, Kerneis S, Pringault E. Antigen sampling by epithelial tissues: implication for vaccine design. **Behring Inst Mitt** 1997; (98):24-32.

Lazavecchia A, Sallusto F. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. **Nat Immunol** 2001; 2:487-92.

Le Poole C, Gerberi TMA, Kast WM. Emerging strategies in tumor vaccines. **Curr Opin Oncol** 2002; 14:641-8.

Liang E, Kabcenell AK, Coleman JR, Robson J, Ruffles R, Yazdanian M. Permeability measurement of macromolecules and assessment of mucosal antigen sampling using in vitro converted M cells. **J Pharmacol Toxicol Methods** 2001; 46:93-101.

Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, Van de Velde CJH, et al. Micrometastases and survival in stage II colorectal cancer. **N Engl J Med** 1998; 339:223-8.

Lillard JW, Boyaka PN, Taub DD, McGhee JR. RANTES potentiates antigen-specific mucosal immune responses. **J Immunol** 2001; 166:162-9.

Litton MJ, Dohlsten M, Rosendahl A, et al. The distinct role of CD4+ and CD8+ T cells during the anti-tumour effects of targeted superantigens. **Br J Cancer** 1999; 81:359-66.

Lollini PL, Forni G. Antitumor vaccines: is it possible to prevent a tumor? **Cancer Immunol Immunother** 2002; 51:409-16.

Long L, Glover RT, Kaufman HL. The next generation of vaccines for the treatment of cancer. **Curr Opin Mol Ther** 1999; 1:57-63.

Mackett M, Smith GL, Moss B, General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. **J Virol** 1984; 49:857-864.

Maini MK, Casorati G, Dellabona P, Wack A, Beverley PCL. T-cell clonality in immune responses. **Immunol Today** 1999; 20:262-6.

Maloy KJ, Erdmann I, Basch V, Sierro S, Kramps TA, Zinkernagel RM, Oehen S, Kundig TM. Intralymphatic immunization enhances DNA vaccination. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:3200-3.

Marshall J. Carcinoembryonic antigen-based vaccines. **Semin Oncol** 2003; 30:30-6.

Marshall JL, Hoyer RJ, Toomey MA, et al. Phase I study in cancer patients of a diversified prime and boost vaccination protocol using recombinant vaccinia virus and recombinant nonreplicating avipox virus to elicit anti-carcinoembryonic antigen immune responses. **J Clin Oncol** 2000; 18:3964-73.

Mason D. A very high level of cross reactivity is an essential feature of the T-cell receptor. **Immunol Today** 1998; 19:395-404.

Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. **Annu Rev Immunol** 1994; 12:991-1045.

Mayer L, Panja A, Li Y, et al. Unique features of antigen presentation in the intestine. **Ann NY Acad Sci** 1992; 664:39-46.

McAnemy D, Ryan CA, Beazley RM, Kaufman HL. Result of a phase I trial of a recombinant vaccinia virus that express carcinoembryonic antigen in patients with advanced colorectal cancer. **Ann Surg Oncol** 1996; 3:495-500.

McGhee JR, Mestecky J, Dertzbaugh MT, Elgridge JH, Hirasawa M, Kiyono H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. **Vaccine** 1992; 10:75-88.

McLaughlin JP, Schlom J, Kantor JA, Greiner JW. Improved immunotherapy of a recombinant carcinoembryonic antigen vaccinia vaccine when given in combination with interleukin-2. **Cancer Res** 1996; 56:2361-7.

Mestecky J, Abraham R, Ogra PL. **Handbook of mucosal immunology**. New York: Academic Press; 1994. p.357-71

Minami S, Furui J, Kanematsu T. Role of carcinoembryonic antigen in the progression of colon cancer cells that express carbohydrate antigen. **Cancer Res** 2001; 61:2732-5.

Minenkova O, Pucci A, Pavoni E, et al. Identification of tumor-associated antigens by screening phage-displayed human cDNA libraries with sera from tumor patients. **Int J Cancer** 2003; 106:534-44.

Mizobata S, Tompkins k, Simpson JF, Shyr Y, Primus JF. Induction of cytotoxic T cells and their antitumor activity in mice transgenic for carcinoembryonic antigen. **Cancer Immunol Immunother** 2000; 49:285-95.

Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, et al. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in APC gene. **Hum Mol Genet** 1992; 1:229-33.

Mocellin S, Wang E, Marincola FM. Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. **J Immunother** 2001; 24:392-407.

Mocellin S, Rossi CR, Lise M, Marincola FM. Adjuvant immunotherapy for solid tumors: from promise to clinical application. **Cancer Immunol Immunother** 2002; 51:583-95. Epub 2002 Sep 17.

Moreno-Fieros L, Garcia N, Gutierrez R, Lopez-Revilla R, Vasquez-Padron RI. Intranasal, rectal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* induces compartmentalized serum, intestinal, vaginal and pulmonary immune response in Balb/c mice. **Microbes Infect** 2000; 2:885-90.

Moser AR, Dove WF, Roth KA, Gordon JI. The Min (multiple intestinal neoplasia) mutation: its effects on gut epithelial cell differentiation and interaction with a modifier system. **J Cell Biol** 1992; 116:1517-26.

Moss B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996; 93:11341-8.

Mowat AMI, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. **Immunol Rev** 1997; 156:145-66.

Muders M, Ghoreschi K, Suckfuell M, Zimmermann W, Enders G. Studies on the immunogenicity of hCEA in a transgenic mouse model. **Int J Colorectal Dis** 2003; 19:153-9.

Mullen JT, Tanabe KK. Viral oncolysis. **Oncologist** 2002; 7:106-19.

Muller S, Buhler-Jungo M, Mueller C. Intestinal intraepithelial lymphocytes exert potent protective cytotoxic activity during an acute virus infection. **J Immunol** 2000; 164:1986-94.

Muraro R, Wunderlich D, Thor A, et al. Definition of monoclonal antibodies of a repertoire of epitopes on carcinoembryonic antigen differentially expressed in human colon carcinoma versus normal adult tissues. **Cancer Res** 1985; 45:5769-80.

Nagler-Anderson C. Tolerance and immunity in the intestinal immune system. **Crit Rev Immunol** 2001; 20:103-20.

Nagorsen D, Scheibenbogen C, Schaller G, et al. Differences in T-cell immunity toward tumor-associated antigens in colorectal cancer and breast cancer patients. **Int J Cancer** 2003; 105:221-5.

Nagorsen D, Wang E, Marincola FM, Even J. Transcriptional analysis of tumor-specific T-cell responses in cancer patients. **Crit Rev Immunol** 2002; 22:449-62.

Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl JP. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune response. **Annu Rev immunol** 1996; 14:275-300.

Niethammer AG, Primus FJ, Xiang R, et al. An oral DNA vaccine against human carcinoembryonic antigen (CEA) prevents growth and dissemination of Lewis lung carcinoma in CEA transgenic mice. **Vaccine** 2001; 20:421-9.

Nolan KF, Yun CO, Akamatsu Y, et al. Bypassing immunization: optimized design of "designer T cells" against carcinoembryonic antigen (CEA)-expressing tumors, and lack of suppression by soluble CEA. **Clin Cancer Res** 1999; 5:3928-41.

Obrink B. CEA adhesion molecules: multifunctional proteins with signal-regulatory properties. **Curr Opin Cell Biol** 1997; 9:616-26.

Oh S, Hodge JW, Ahlers JD, Burke DS, Schlom J, Berzofsky JA. Selective induction of high avidity CTL by altering the balance of signals from APC. **J Immunol** 2003; 170:2523-30.

Ohlen C, Kalos M, Hong DJ, Shur AC, Greenberg PD. Expression of a tolerizing tumor antigen in peripheral tissue does not preclude recovery of high-affinity CD8+

T cells or CTL immunotherapy of tumor expressing the antigen. **J Immunol** 2001; 166:2863-70.

Okinawa S, Nakazato HI, Kosahi G. Primary structure of human carcinoembryonic antigen (CEA) deduced from cDNA sequence. **Biochem Biophys Res Commun** 1987; 142:511-8.

Ordones C, Sreaton RA, Ilantzis C, Stanners CP. Human carcinoembryonic antigen functions as general inhibitor of anoikis. **Cancer Res** 2000; 60:3419-24.

Orefice S. Delayed cutaneous hypersensitivity reaction to carcinoembryonic antigen in cancer patients. **Tumori** 1982; 68:473-5.

Paoletti E. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:11349-53.

Pauli C, Munz M, Kieu C, et al. Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. **Cancer Lett** 2003; 193:25-32.

Paulsen JE, Steffensen IL, Andreassen A, Vikse R, Alexander J. Neonatal exposure to the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine via breast milk or directly induces intestinal tumors in multiple intestinal neoplasia mice. **Carcinogenesis (Lond.)** 1999; 20:1277-82.

Platsoucas CD, Fincke JE, Pappas J, et al. Immune responses to human tumors: development of tumor vaccines. **Anticancer Res** 2003; 23:1969-96.

Poland GA, Murray D, Bonnilla-Guerrero R. New vaccine development. **BMJ** 2002; 324:1315-9.

Qin Z, Richter G, Schuler T, Ibe S, Cao X, Blankenstein T. B cell inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. **Nat Med** 1998; 4:627-31.

Rajagopalan S, Long EO. Use of vaccinia virus for functional gene transfer in natural killer cells. **Methods Mol Biol** 2000; 121:265-72.

Ras E, Van der burg SH, Zegveld ST, et al. Identification of potential HLA-A *0201 restricted CTL epitopes derived from the epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) and the carcinoembryonic antigen (CEA). **Hum Immunol** 1997; 53:81-9.

Regnault A, Levraud JP, Lim A, et al. The expansion and selection of T cell receptor $\alpha\beta$ intestinal intraepithelial T cell clones. **Eur J Immunol** 1996; 26:914-21.

Reichert JM, Paquette C. Therapeutic cancer vaccines on trial. **Nat Biotech** 2002; 20: 659-63.

Renkvist N, Casteli C, Robbins PF, Parmiani G. A listing of tumor antigens recognized by T cells. **Cancer Immunol Immunother** 2001; 50:3-15.

Ridge AJP, Fuchs EJ, Matzinger P. Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells. **Science** 1996; 271:1723-6.

Rivoltini L, Carrabba M, Huber V, et al. Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. **Immunol Rev** 2002; 188:97-113.

Robbins PF, Kantor JA, Salgaller M. Transduction and expression of the human carcinoembryonic antigen gene in a murine colon carcinoma cell line. **Cancer Res** 1991; 51:3657-62.

Roncarolo MG, Levings MK, Traversari C. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. **J Exp Med** 2001; 193:F5-F9.

Rocha-Zavaleta L, Alexandre JE, Garcia-Carranca A. Parenteral and oral immunization with a plasmid DNA expressing the human papillomavirus 16-L1 gene induces systemic and mucosal antibodies and cytotoxic T lymphocyte responses. **J Med Virol** 2002; 66:86-95.

Ronchetti A, Rovere P, Giandomenica I, et al. Immunogenicity of apoptotic cells in vivo; role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. **J Immunol** 1999; 163:130-6.

Ruiter D, Bogenriedre T, Elder D, Herlyn M. Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. **Lancet Oncol** 2002; 3:35-43.

Ryan EJ, Daly LM, Mills KH. Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. **Trends Biotechnol** 2001; 19:293-304.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming and chronic inflammation. **J Exp Med** 1999; 189:611-4.

Sansonetti PJ, Phalipon A. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. **Semin Immunol** 1999; 11:193-203.

Schlom J, Hodge JW. The diversity of T-cell co-stimulation in the induction of antitumor immunity. **Immunol Rev** 1999; 170:73-84.

Schmitz J, Reali E, Hodge JW, et al. Identification of an interferon- γ -inducible Carcinoembryonic (CEA) CD8+ T-Cell epitope, which mediates tumor killing in CEA transgenic mice. **Cancer Res** 2002; 62:5058-64.

Scholzel S, Zimmermann W, Schwarzkopf G, Grunert F, Rogaczewski B, Thompson J. Carcinoembryonic antigen family members CEACAM6 and CEACAM7 are

differentially expressed in normal tissues and oppositely deregulated in hyperplastic colorectal polyps and early adenomas. **Am J Pathol** 2000; 156:595-605.

Schreurs MWJ, Eggert AAO, Boer AJ, et al. Dendritic cells break tolerance and induce protective immunity against a melanocyte differentiation antigen in an autologous melanoma model. **Cancer Res** 2000; 60:6995-7001.

Screaton RA, Demarte L, Draber P, Stanners CP. The specificity for the differentiation blocking activity of carcinoembryonic antigens resides in its glycoposphatidyl-inositol anchor. **J Cell Biol** 2000; 150:613-26.

Shanahan F. Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut V. Mechanisms of immunologic sensation of intestinal contents. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2000; 278:G191-6.

Shivley J, Beatty J. CEA related antigens: molecular biological and clinical significance. **Crit Rev Oncol Hematol** 1985; 2:355-99.

Sido B, Braunstein J, Breitzkreutz R, Herfarth C, Meuer SC. Thiol-mediated redox regulation of intestinal lamina propria T lymphocytes. **J Exp Med** 2000; 192:907-12.

Silberman AW. Surgical debulking of tumors. **Surg Gynecol Obstet** 1982; 155:577.

Skornick Y, Topalian S, Rosenberg SA. Comparative studies of the long-term growth of lymphocytes from tumor infiltrates, tumor-draining lymph nodes, and peripheral blood by repeated in vitro stimulation with autologous tumor. **J Biol Response Mod** 1990; 9:431-8.

Smith GL, Moss B. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25000 base pairs of foreign DNA. **Gene** 1983; 25:21-8.

Smith GL, McFadden G. Smallpox: anything to declare?. **Nat Rev Immunol** 2002; 2:521-7.

Smith GL, Symons JA, Alcami A. Immune modulation by proteins secreted from cells infected by vaccinia virus. **Arch Virol Suppl** 1999; 15:111-29.

Smith GL, Vanderplasschen A, Law M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. **J Gen Virol** 2002; 83:2915-31.

Smyth MJ, Godfrey DI. NKT cells and tumor immunity- a double-edged sword. **Nat Immunol** 2000; 1:459-60.

Sodeik B, Krijnse-Locker J. Assembly of vaccinia virus revisited: de novo membrane synthesis or acquisition from the host? **Trends Microbiol** 2002; 10:15-24.

Sonoda KH, Faunce DE, Taniguchi M, Exley M, Balk S, Stein-Streilein J. NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. **J Immunol** 2001; 166:42-50.

Spahn TW, Fontana A, Faria AM, et al. Induction of oral tolerance to cellular immune response in the absence of Peyer's patches. **Eur J Immunol** 2001; 31:1278-87.

Speiser DE, Miranda R, Zakarian A, et al. Self antigens expressed by solid tumors do not efficiently stimulate naïve or activated T cells: implications for immunotherapy. **J Exp Med** 1997; 186:645-53.

Sporn MB. The war on cancer. **Lancet** 1996; 347:1377-81.

Sprent J, Kishimoto H. The thymus and central tolerance. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 2001; 256:609-16.

Srivastava PK. Immunotherapy of human: Lessons from mice. **Nat Immunol** 2000; 1:363-6.

Strobel S, Mowat AM. Immune response to dietary antigens: oral tolerance. **Immunol Today** 1998; 19:173-81.

Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. **Science** 1992; 256:668-70.

Sun HC, Tang ZY. Preventive treatments for recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma: a literature review of randomized control trials. **World J Gastroenterol** 2003; 9:635-40.

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. **J Exp Med** 2000; 192:303-9.

Takei S, Ueno Y, Yoda J, Tamura S, Hotomi M, Fujihara K, Kuki K, Yamanaka N. Roles of beta-catenin overexpression and adenomatous polyposis coli mutation in head and neck cancer. **Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho** 2003;106:692-9.

Tartaglia J, Perkus ME, Taylor J, et al. NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. **Virology** 1992; 188:217-32.

Thompson J, Epting T, Schwarzkopf G, et al. A transgenic mouse line that develops early-onset invasive gastric carcinoma provides a model for carcinoembryonic antigen-target tumor therapy. **Int J Cancer** 2000; 86:863-9.

Thompson J, Grunert F, Zimmermann W. CEA gene family: molecular biology and clinical perspectives. **J Clin Lab Anal** 1991; 5:344-66.

Thompson J, Zimmerman W. The carcinoembryonic antigen gene family: structure, expression and evolution. **Tumor Biol** 1988; 9:63-83.

Thompson J, Moessinger S, Reichardt V, et al. A polymerase-chain-reaction assay for the specific identification of transcripts encoded by individual CEA-gene family members. **Int J Cancer** 1993; 55: 311-9.

Thompson JA, Eades-Perner A, Ditter M, Muller WJ, Zimmermann W. Expression of transgenic carcinoembryonic antigen (CEA) in tumor-prone mice: an animal model for CEA-directed tumor immunotherapy. **Int J Cancer** 1997; 72:197-202.

Thoreux K, Owen RL, Schmucker DL. Intestinal lymphocyte number, migration and antibody secretion in young and old rats. **Immunology** 2000; 101:161-7.

Tibbetts LM, Doremus CM, Tzanakakis GN, Vezerdis MP. Liver metastases with 10 human colon carcinoma cell lines in nude mice and association with carcinoembryonic antigen production. **Cancer** 1993; 71:315-21.

Tilli MT, Furth PA. Conditional mouse models demonstrate oncogene-dependent differences in tumor maintenance and recurrence. **Breast Cancer Res** 2003; 5:202-5.

Tsang K, Zaremba S, Nieroda C, Zhu M, Hamilton M, Schlom J. Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:982-90.

Tsang KY, Zhu M-Z, Nieroda CA, et al. Phenotypic stability of a cytotoxic T-cell line directed against an immunodominant epitope of human carcinoembryonic antigen. **Clin Cancer Res** 1997; 3:2439-49.

Tubiana M. Klaas Breur Medal lecture 1985. The growth and progression of human tumors: implications for management strategy. **Radiother Oncol** 1986; 6:167-84.

Tucker E, Buda A, Janghara B, et al. Abnormalities of the cadherin-catenin complex in chemically-induced colorectal carcinogenesis. **Proc Nutr Soc** 2003; 62:229-36.

Ullenhag GJ, Frodin JE, Strigard K, Mellsted H, Magnusson CG. Induction of IgG subclass response in colorectal carcinoma patients vaccinated with recombinant carcinoembryonic antigen. **Cancer Res** 2002; 62:1364-9.

Valentini AM, Pirrelli M, Renna L, Armentano R, Caruso ML. P53 and Beta-catenin in colorectal cancer progression. **Curr Pharm Des** 2003; 9:1932-6.

Vezyz V, Olson S, Lefrançois L. Expression of intestine-specific antigen reveals novel pathways of CD8 T cell tolerance induction. **Immunity** 2000; 12:505-14.

Von Mehren M, Arlen P, Tsang KY, et al. Pilot study of a dual gene recombinant avipox vaccine containing both carcinoembryonic antigen (CEA) and B7.1 transgenes in patients with recurrent CEA-expressing adenocarcinomas. **Clin Cancer Res** 2000; 6:2219-28.

Wang J, Murakami T, Hakamata Y, et al. Gene gun-mediated oral mucosal transfer of interleukin 12 cDNA coupled with an irradiated melanoma vaccine in a hamster model: successful treatment of oral melanoma and distant skin lesion. **Cancer Gene Ther** 2001; 8:705-12.

Weiner DB, Kim JJ. Cancer vaccines: is the future now? **Expert Rev Vaccines** 2002; 1:257-60.

Weninger W, Crowley MA, Manjunath N, Von Andrian UH. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. **J Exp Med** 2001; 194:953-66.

White SA, LoBuglio AF, Arani RB, et al. Induction of anti-tumor immunity by intrasplenic administration of a carcinoembryonic antigen DNA vaccine. **J Gene Med** 2000; 2:135-40.

Whiteside TL. Tumor-induced death of immune cells: its mechanisms and consequences. **Semin Cancer Biol** 2002; 12:43-50.

Xiang R, Primus FJ, Ruehlmann JM, et al. A dual-function DNA vaccine encoding carcinoembryonic antigen and CD40 ligand trimer induces T-cell mediated protective immunity against colon cancer in carcinoembryonic antigen-transgenic mice. **J Immunol** 2001a; 167:4560-5.

Xiang R, Silletti S, Lode HN, et al. M cell pockets of human Peyer's patches are specialized extensions of germinal centers. **Clin Cancer Res** 2001b; 7(3 suppl):856-64.

Yamanaka T, Straumfors A, Morton H, Fausa O, Brandtzaeg P, Farstad I. M cell pockets of human Peyer's patches are specialized extensions of germinal centers. **Eur J Immunol** 2001; 31:107-17.

Yang K, Edelmann W, Fan K, et al. A mouse model of human familial adenomatous polyposis. **J Exp Zool** 1997; 277:245-54.

Yee C, Savage PA, Lee PP, Davis MM, Greenberg PD. Isolation of high avidity melanoma-reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramers. **J Immunol** 1999; 162: 2227-34.

Zaremba S, Barzaga E, Zhu M, Soares N, Tsang KY, Schlom J. Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen. **Cancer Res** 1997; 57:4570-7.

Zeh III HJ, Perry-Lalley D, Dudley ME, Rosenberg SA, Yang JC. High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. **Immunology** 1999; 162:989-94.

Zhu MZ, Marshall J, Cole D, Schlom J, Tsang KY. Specific cytolytic T-cell response to human CEA from patients immunized with recombinant avipox-CEA vaccine. **Clin Cancer Res** 2000; 6:24-33.

Zimmermann W. Isolation and characterization of cDNA clones encoding the human carcinoembryonic antigen reveal a highly conserved repeating structure. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1987; 84:2960-4.

Zinkernagel RM. Localization dose and time of antigens determine immune reactivity. **Semin Immunol** 2000a, 12:163-71.

Zinkernagel RM. What is missing in immunology to understand immunity? **Nat Immunol** 2000b; 1:181-5.