



**MARIANA ARAÚJO ALVES MARTINS DA SILVA**

Licenciada em Biologia Celular e Molecular

**IMPACTO DE ANTIGÉNIOS GLICOSÍDICOS NA  
IMUNOTERAPIA APLICADA EM CANCRO DE  
BEXIGA**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Professora Doutora Paula Alexandra Quintela Videira,  
Professora Auxiliar Convidada - Faculdade de Ciências  
Médicas da UNL

Júri:

Presidente: Doutor José Paulo Nunes de Sousa Sampaio

Arguente: Doutora Maria Angelina de Sá Palma

Vogal: Doutora Paula Alexandra Quintela Videira



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Novembro 2011

## IMPACTO DE ANTIGÉNIOS GLICOSÍDICOS NA IMUNOTERAPIA APLICADA EM CANCRO DE BEXIGA

Copyright Mariana Araújo Alves Martins da Silva, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

***PÁGINAS INICIAIS:***

***AGRADECIMENTOS***

***RESUMOS***

***ÍNDICES***



## **Agradecimentos**

Ao apresentar o presente trabalho, não posso deixar de expressar o meu agradecimento:

- Ao Departamento de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas, por me receber no seu laboratório;
- À Professora Doutora Paula Videira, pela oportunidade oferecida, por acreditar no meu potencial, pela amizade e pelo apoio no âmbito desta dissertação;
- Ao mestre Paulo Severino, pelos bons conselhos, disponibilidade, paciência, amizade e ajuda constantes e valiosos no decorrer da tese;
- À Doutora Guadalupe e à mestre Mylène Carrascal, pela disponibilidade, amizade e ajuda prestadas no decorrer da tese;
- À Doutora Zélia e ao Dr. Hélio Crespo pela amizade e disponibilidade manifestadas;
- Aos restantes membros do Departamento de Imunologia, em especial à Dra. Manuela Correia pela amizade e ajuda, à Dra. Catarina Martins pelos ensinamentos de Citometria de Fluxo, à Dra. Teresa Veríssimo, pela amizade, à D. Glória, D. Luísa, D. Idalina e D. Amélia, pela simpatia e disponibilidade. À D. Elisabete e D. Filomena, pela boa disposição e companhia;
- À minha família, que esteve sempre presente, em especial aos meus pais, Rufino e Maria Cecília, por todo o amor incondicional. Á minha avó Júlia, por me alegrar e acarinhar todos os fins-de-semana, à minha prima Andreia, por ser minha “irmã” e à Teresa pelo carinho e dedicação. Ao Cláudio, por tudo;
- Aos meus amigos, pelo companheirismo e amizade, em especial à Joana Almeida, que foi a minha grande companheira de laboratório, à Francisca Sousa, Luísa Pena, Carolina Pitta, Mariana Beça, Guilherme Oliveira e Filipe Amarante, por nunca deixarem de me apoiar neste sonho e por serem os meus grandes amigos.



## **Resumo**

O cancro de bexiga não-músculo-invasivo é a neoplasia do tracto urinário mais frequente. A imunoterapia com bacillus Calmette-Guérin (BCG) constitui a terapia de eleição para esta patologia. Uma vez que o cancro está associado à alteração da glicosilação, o objectivo deste trabalho consistiu em avaliar o efeito de antigénios tumorais glicosídicos em células de cancro de bexiga nos mecanismos de actuação de BCG e na modulação da resposta imune. Para isso, a expressão de antigénios sialilados e/ou fucosilados, assim como das glicosiltransferases envolvidas nas suas sínteses, foi analisada em diferentes linhas celulares de cancro de bexiga. Depois de analisado o perfil glicosídico, foram realizados ensaios de internalização e citotoxicidade celular. Verificou-se que a linha celular MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub>, que expressa a sialiltransferase ST6GalNAc-I, e consequentemente o antigénio sialil-Tn (sTn), apresenta uma maior capacidade para internalizar BCG do que o respectivo controlo. Comparando as percentagens de internalização obtidas para as diferentes linhas celulares e os respectivos efeitos citotóxicos, os nossos resultados indicam que a indução de morte das células de cancro de bexiga por BCG é paralela à capacidade destas células para internalizarem BCG. Foi também demonstrado, através de ensaios de internalização com diferentes estirpes de BCG, que o processo de internalização e de susceptibilidade é dependente da estirpe de BCG. Finalmente, investigámos se o antigénio sTn nas células tumorais afecta a interacção/reconhecimento pelas células dendríticas (DCs). Observou-se que as DCs induzem a proliferação das células tumorais de uma forma independente do sTn. Verificou-se, através da análise da expressão de moléculas apresentadoras de antigénio, que o sTn parece induzir a repressão do processo de maturação das DCs e influencia o processo de fagocitose das células tumorais por estas. Conclui-se que o sTn modela a imunoterapia aplicada em cancro de bexiga, influenciando o mecanismo de acção do BCG e suprimindo a imunogenicidade das DCs.

## **Palavras-chaves:**

Cancro de bexiga não-músculo-invasivo – bacillus Calmette Guérin (BCG) – glicosilação - antigénio sialil-Tn (sTn) - Células Dendríticas (DCs)





## **Abstract**

Nonmuscle-invasive bladder cancer is the most frequent neoplasm of the urinary tract. Bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy is the treatment of choice of this disease. Since cancer is associated with glycosylation alterations, the aim of this work was to evaluate the effect of carbohydrate tumor antigens, expressed by bladder cancer cells, in the mechanisms of action of BCG and modulation of the immune response. For this, the expression of sialylated and/or fucosylated antigens and the involved glycosyltransferases was analysed in different bladder cancer cells lines. After analysing the glycoside profile, internalization and cytotoxic assays were performed. We have demonstrated that bladder cancer cell line  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ , overexpressing ST6GalNAc-I sialyltransferase and, consequently, sialyl-Tn (sTn) antigen, has improved capacity to internalize BCG than the respective negative control  $MCR_{pLenti.transd}$ . Comparing the percentages of BCG internalization obtained for the different cells lines and the respective cytotoxic effects, our results indicate that the induction of bladder cancer cell killing by BCG parallels the ability of these cells to internalize BCG. We also demonstrated, by performing internalization assays with different strains of BCG, that the internalization process and the susceptibility are dependent on the strain of BCG. Finally, we investigated whether the sTn antigen in tumor cells affects the interaction / recognition of dendritic cells (DCs). We observed that DCs induce the proliferation of tumor cells independently of sTn antigen. It was found, by analyzing the expression of antigen-presenting molecules, that sTn appears to induce the suppression of the maturation process of DCs and influences the process of phagocytosis of tumor cells by DCs. We conclude that sTn models immunotherapy applied in the bladder cancer by influencing the mechanism of action of BCG and suppressing the immunogenicity of DCs.

## **Keywords:**

Nonmuscle-invasive bladder cancer - bacillus Calmette Guérin (BCG) – glycosylation - sialyl-Tn (sTn) - Dendritic cells (DCs)



**O desenvolvimento deste trabalho deu origem aos posters seguintes:**

Paulo Severino, Mylène Carrascal, Mariana Silva, M. Guadalupe Cabral, Helena Gouveia, M Correia, H. Crespo, LL Santos, F. Dall'Olio, Paula A. Videira. 2011. **“Immunity in bladder cancer is influenced by sialylated antigens”**- Gordon Research Conference 2011, Barga, Itália.

Mariana Silva, Paulo Severino, Mylène Carrascal, M. Guadalupe Cabral, H. Crespo, LL Santos, F. Dall'Olio, Paula A. Videira. 2011. **“Sialylation affects BCG-mechanism of action in Bladder Cancer”** - Glycosciences in the international year of Chemistry, Applications to human health and disease, Lisboa.

Mylène Carrascal; Paulo Severino; Mariana Silva; M. Guadalupe Cabral; Helena Gouveia; Dall'Olio F.; Paula Videira . 2011. **“Immune tolerance to cancer cells: the role of sialyl-Tn antigens”**; Glycosciences in the international year of Chemistry, Applications to human health and disease, Lisboa.



## *Índice da dissertação*

1	Introdução	1
1.1	Glicosilação	1
1.1.1	Glicoproteínas	2
1.1.1.1	O-glicosilação	2
1.1.2	Ácidos siálicos	3
1.1.3	Alterações da glicosilação no cancro	5
1.1.3.1	Super-expressão dos antigénios Thomsen Friedenreich em cancro	5
1.1.3.2	Super-expressão dos antigénios Lewis em cancro	7
1.2	Cancro de bexiga	8
1.2.1	Etiologia e factores de risco	8
1.2.2	Sintomas e diagnóstico	9
1.2.3	Classificação patológica e estadiamento	9
1.2.4	Tratamento	10
1.3.	Imunoterapia para tumores superficiais de cancro de bexiga	11
1.3.1	Imunoterapia BCG	11
1.3.1.1	História do BCG e cancro de bexiga	11
1.3.1.2	Mecanismo de acção do BCG	12
1.3.1.2.1	Adesão e internalização do BCG pelas células tumorais do urotélio	12
1.3.1.2.2	Efeito citotóxico do BCG sobre as células tumorais	13
1.3.1.2.3	Resposta imunológica desencadeada pelo BCG	14
1.3.2	Imunoterapia com vacinas baseadas em células dendríticas	16
1.3.2.1	A biologia das células dendríticas	17
1.3.2.2	A importância das células dendríticas na actividade anti-tumoral	18
1.3.2.3	Células dendríticas como vectores na imunoterapia contra o cancro	19
1.4	Introdução ao tema da tese	21
2	Materiais e Métodos	23
2.1	Cultura e manutenção das linhas celulares de cancro de bexiga	23
2.2	Obtenção de células dendríticas derivadas de monócitos humanos	24

2.3	Técnicas -----	25
2.3.1	Citometria de fluxo -----	25
2.3.2	Reacção de polimerização em cadeia em tempo real quantitativo (RT-PCR) -	26
2.4	Caracterização glicosídica das linhas celulares de cancro de bexiga -----	27
2.4.1	Análise da expressão genética por RT-PCR -----	27
2.4.1.1	Extracção de RNA e transcrição reversa para DNA complementar (cDNA) --	27
2.4.1.2	PCR em tempo real -----	28
2.4.2	Análise fenotípica por citometria de fluxo -----	29
2.4.2.1	Marcação com anticorpos e lectinas das células tratadas ou não enzimaticamente	29
2.5	Avaliação da internalização de BCG e consequente susceptibilidade das linhas tumorais -----	30
2.5.1	Avaliação da internalização de BCG-RIVM pelas células MCR, por citometria de fluxo -----	30
2.5.1.1	Obtenção de BCG em células isoladas e marcação com fluorescência -----	30
2.5.1.2	Ensaio de internalização de BCG-RIVM pelas células MCR -----	31
2.5.2	Avaliação dos efeitos da interacção do BCG-Pasteur-GFP com as células tumorais de bexiga por citometria de fluxo -----	32
2.5.2.1	Cultura do BCG-Pasteur-GFP -----	32
2.5.2.2	Optimização dos ensaios de internalização utilizando a estirpe BCG-Pasteur-GFP -----	32
2.5.2.3	Avaliação, por citometria de fluxo da susceptibilidade de células de cancro de bexiga à presença do BCG-Pasteur -----	33
2.6	Avaliação da interacção das DCs com as células tumorais MCR: proliferação celular das MCR, estado de maturação e capacidade fagocítica das DCs -----	34
2.7	Análise estatística -----	35
3.	Resultados -----	37
3.1	Caracterização do perfil glicosídico das linhas celulares de cancro de bexiga	37
3.1.1	Análise da expressão de mRNA de glicosiltransferases em linhas celulares de cancro de bexiga humanas, por RT-PCR -----	37
3.1.2.	Análise fenotípica das linhas celulares de cancro de bexiga humanas -----	41
3.2	Influência das estruturas glicosídicas na resposta das linhas celulares de cancro de bexiga ao BCG -----	42
3.2.1	Internalização de BCG pelas diferentes linhas de cancro de bexiga -----	42
3.2.1.1	Estirpe RIVM é mais internalizada pelas células que expressam o antigénio sTn do que pelas células que são negativas para este antigénio -----	42
3.2.1.2	Células de cancro de bexiga apresentam baixa taxa de internalização da estirpe BCG-Pasteur-GFP -----	43
3.2.2	Estirpe BCG-Pasteur-GFP não induz citotoxicidade celular significativa nas linhas tumorais de bexiga testadas -----	44
3.3	Análise do papel da expressão do antigénio sTn por células tumorais na resposta imunológica das células dendríticas -----	46
3.3.1	Presença das células dendríticas aumenta a taxa de proliferação das células tumorais MCR, independentemente da presença do antigénio sTn -----	46

3.3.2	Presença do antígeno sTn influencia estado de maturação das DCs	-----	48
3.3.3	Células que expressam sTn são mais fagocitadas pelas DCs	-----	50
4	Discussão	-----	53
4.1	Caracterização glicosídica das linhas tumorais de bexiga	-----	53
4.2.	Complexidade da terapêutica BCG em tratamento de cancro de bexiga: importância da estirpe de BCG e origem genética do tumor	-----	57
4.2.1	Presença do antígeno sTn influencia a capacidade de internalização de BCG- RIVM pelas células tumorais MCR	-----	57
4.2.2	Capacidade de internalização e indução de citotoxicidade por BCG é dependente da estirpe e linha tumoral	-----	59
4.3	Influência dos antígenos Thomsen-Friedenreich na modulação do sistema imunitário	-----	63
4.3.1	A presença das DCs favorece a proliferação das células tumorais, de uma forma independente do antígeno glicosídico sTn	-----	64
4.3.2	Presença do antígeno sTn influencia estado de maturação das DCs	-----	65
4.3.3	As células que expressam sTn são mais fagocitadas pelas DCs do que as células negativas para este antígeno	-----	66
4.4	Perspectivas futuras	-----	67
4.5	Conclusões gerais	-----	68
	Bibliografia	-----	69





## *Índice de figuras*

Figura 1.1	Classes de glicoconjugados expressos nas células humanas.	1
Figura 1.2	Vias de biossíntese dos <i>O</i> -glicanos	3
Figura 1.3	Os ácidos N-acetilneuramínico (Neu5A) e 2-ceto-3-desoxi-d-glicero-d-galactononónico (Kdn) constituem os dois ácidos siálicos primários, diferindo apenas no carbono 5. Todos os outros ácidos siálicos são derivados metabólicos destes dois ácidos	4
Figura 1.4	Diversidade estrutural dos ácidos siálicos, representada pelas substituições possíveis de ocorrer nos resíduos R	4
Figura 1.5	A glicosilação incompleta dos <i>O</i> -glicanos nas células tumorais, resulta no aumento de expressão dos antígenos Thomsen-Friedenreich	6
Figura 1.6	Formação dos antígenos tumorais sLe <sup>x</sup> e sLe <sup>a</sup>	8
Figura 1.7	Diagrama representativo das Fases T de cancro de bexiga de acordo com a classificação TNM	10
Figura 1.8	A exposição das células tumorais ao BCG tem um efeito directo na biologia destas células, induzindo a paragem do ciclo celular na fase G1, a morte celular associada à libertação da proteína necrótica HMGB1 e a morte celular por apoptose. A indução da apoptose é desencadeada pela activação das vias extrínseca (activação da caspase 8) e intrínseca (activação da cathepsina B, libertação do citocromo c e activação da pro-caspase 9), produção de óxido nítrico e diminuição da actividade da telomerase. O BCG pode ainda estimular a actividade de migração das células tumorais, como consequência da secreção de VEGF por estas	14
Figura 1.9	Em resposta ao estímulo do BCG, as células uroteliais produzem um número limitado de citocinas, que são responsáveis pelo recrutamento de monócitos e neutrófilos para o urotélio. Estas células vão secretar citocinas e quimiocinas adicionais, levando ao recrutamento e activação de várias populações linfocitárias. O BCG presente no urotélio é fagocitado pelas APCs, e os antígenos micobacterianos resultantes da digestão são, depois, reconhecidos pelos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> . Este reconhecimento vai induzir a resposta Th1, provocando a migração para o urotélio de populações citotóxicas capazes de matar as células tumorais: linfócitos T CD8 <sup>+</sup> , as células NK, LAK, MAK e BAK	16
Figura 1.10	Linhagens celulares de DCs. Os progenitores das DCs (progenitores hematopoiéticos CD34 <sup>+</sup> ) originam os precursores mielóides e linfóides. Os monócitos, após activação, diferenciam-se em DCs CD11c <sup>+</sup> que por sua vez originam três subpopulações celulares: células de Langerhans, células intersticiais e macrófagos	17
Figura 1.11	Estados funcionais das DCs: No seu estado imaturo, as DCs são altamente eficazes no processo de captura antigénica. Na presença de estímulos as DCs imaturas são estimuladas a maturarem, através da activação dos receptores de reconhecimento padrão (RRP, receptors recognition pattern), nos quais se incluem os receptores Toll-like (TLRs), ou via activação de membros dos inflamossomas. Este processo de maturação envolve a estimulação da expressão de moléculas co-estimulatórias, a produção de citocinas pró-inflamatórias e o aumento de expressão do receptor CCR7	18

- Imunoterapia com células dendríticas: Os precursores de DCs são isolados a partir do doente (1). A incubação dos precursores com citocinas (2), induz a sua diferenciação em DCs imaturas. Segue-se a indução da maturação das DCs (3) através de estímulos de maturação. A activação das DCs com antígenos tumorais do doente (4) é efectuada antes ou depois do processo de maturação. As DCs maduras e activadas são injectadas de novo no doente (5), migrando para os tecidos linfóides onde vão activar as células T (6). As células T activadas saem dos tecidos linfáticos para o local do tumor (7), onde inibem o crescimento tumoral (8)
- Figura 1.12 20
- Representação da centrifugação (700 rpm, 3 minutos) realizada para separar o BCG-RIVM em células isoladas (a) dos agregados de BCG (b). a) e b) Suspensão celular de BCG-FITC fotografada com um microscópio de fluorescência, utilizando a objectiva 40x e um conjunto de filtros adequados para detecção de fluoresceína.
- Figura 2.1 31
- Análise dos níveis de mRNA dos genes das fucosiltransferases (a), -3sialiltransferases (b) e  $\alpha$ 2-6 sialiltransferases (c) nas linhas celulares MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub>, MCR<sub>pLenti.transd</sub>, HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub> e HT1376<sub>pLenti.transd</sub>, por RT-PCR (n=6). Valores estatisticamente significativos: \* significa que p<0,05; \*\* significa que p<0,01
- Figura 3.1 39
- Quantidade relativa de expressão genética de fucosiltransferases (a) e sialiltransferases (b) das células MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> em relação às MCR<sub>pLenti.transd</sub> (RQ=1). Valores acima ou abaixo de 1 correspondem, respectivamente, a aumento ou diminuição da expressão nas células MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> (n=6). Valores estatisticamente significativos: \* significa que p <0,05; \*\*\*significa que p <0,0001
- Figura 3.2 40
- Quantidade relativa de expressão genética de fucosiltransferases (a) e sialiltransferases (b) entre células HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub> e HT1376<sub>pLenti.transd</sub>. (RQ=1) Valores acima ou abaixo de 1 correspondem, respectivamente, a aumento ou diminuição da expressão, nas células HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub>, relativamente às células HT1376<sub>pLenti.transd</sub> (n=6). Valores estatisticamente significativos: \* significa que p<0,05; \*\* significa que p<0,01
- Figura 3.3 40
- Análise, por citometria de fluxo, da percentagem de células tumorais MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> e MCR<sub>pLenti.transd</sub> que internalizaram BCG-RIVM (n=2)
- Figura 3.4 43
- Análise, por citometria de fluxo, da percentagem de internalização de BCG-Pasteur-GFP pelas diferentes linhas tumorais de cancro de bexiga: MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> (n=4), MCR<sub>pLenti.transd</sub> (n=4), HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub> (n=4), HT1376<sub>pLenti.transd</sub> (n=4), T-24 (n=12) e 5637 (n=4). Valores estatisticamente significativos: \* significa que p <0,05
- Figura 3.5 44
- Análise, por citometria de fluxo, da percentagem de células vivas, apoptóticas e necróticas das linhas celulares MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> (a), MCR<sub>pLenti.transd</sub> (b) e T-24 (c), após 24 h de cultura na presença ou ausência de BCG-Pasteur-GFP (n=3). O método utilizado, para avaliar o eventual efeito citotóxico do BCG nas linhas celulares, foi a marcação dupla com Anexina V e 7-ADD
- Figura 3.6 45
- Análise do Índice de proliferação (IP) das células tumorais MCR na ausência ou presença das DCs, após um período de co-cultura de 24 (a), 48 (b) e 72 (c) h (n=3). O IP corresponde a uma medida do aumento do número de células em cultura ao longo do tempo. Valores estatisticamente significativos: \* significa que p<0,05
- Figura 3.7 47

Figura 3.8 Análise do MFI para a marcação com o anticorpo anti-HLA-DR das DCs que estiveram em co-cultura com as células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e  $MCR_{pLenti.transd}$  por períodos de 24, 48 e 72 h (n=3). A análise do MFI permitiu inferir à cerca do estado de maturação das DCs, uma vez que quanto maior for a expressão de HLA-DR, maior o estado de maturação das DCs 49

Figura 3.9 Análise, por citometria de fluxo, da percentagem de DCs que fagocitaram células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e  $MCR_{pLenti.transd}$  (n=3). A avaliação da percentagem foi feita com base na marcação dupla positiva para o anti-HLA-DR, que marca só DCs, e para o CFSE, uma vez que as células MCR tinham sido, previamente, marcadas com este corante. Valores estatisticamente significativos: \* significa que  $p < 0,05$  51



### *Índice de tabelas*

Tabela 1.1	Classificação TNM de cancro de bexiga 2010	9
Tabela 1.2	Correlação entre o grau de diferenciação e percentagem de BCG internalizado por diferentes linhas celulares	13
Tabela 2.1	Identificação do ensaio para cada um dos genes analisados	28
Tabela 3.1	Análise da marcação com lectinas e anticorpos das linhas tumorais de bexiga tratadas ou não com sialidase, por citometria de fluxo	41



### *Índice dos anexos*

Anexo I	Expressão das sialiltransferases no uretério normal de doentes com cancro de bexiga	1
Anexo II	Constituição de soluções tampão utilizadas neste trabalho	3
Anexo III	Tabela representativa com os valores da intensidade da fluorescência média	5
Anexo IV	Exemplo da análise da expressão do antigénio sLe <sup>x</sup> nas células 5637	7
Anexo V	Cultura BCG-Pasteur-GFP	9
Anexo VI	Sumário submetido para o Congresso “Gordon Research Conference 2011”	11
Anexo VII	Sumário submetido para o congresso “Glycosciences in the international year of Chemistry, Applications to human health and disease” “Sialylation affects BCG-mechanism of action in Bladder Cancer	13
Anexo VIII	Sumário submetido para o congresso “Glycosciences in the international year of Chemistry, Applications to human health and disease” “Immune tolerance to cancer cells: the role of sialyl-Tn antigens”	15





### *Abreviaturas e siglas*

- 7-ADD - 7-amino-actinomicina D
- AP1 - Activator protein 1
- APC - Aloficocianina
- APCs - Células apresentadoras de antígenos
- BAK - BCG activated Killer cells
- BCG - Bacillus Calmette-Guérin
- C/EBP - CCAAT-enhancer-binding proteins
- C1GalT-1 -  $\beta$ 1-3N-galactosiltransferase
- C2GnT-1/3 -  $\beta$ 1-6 N-acetilglucosaminiltransferase
- C2GnT-2 -  $\beta$ 1N-acetilglucosaminatransferase
- C3GnT -  $\beta$ 1-3N-acetilglucosaminatransferase
- CB - Cancro da Bexiga
- CCT - Carcinoma de Células de Transição
- CEA - Antígeno carcino-embriogénico
- CFDA-SE - Carboxi-fluoresceína diacetato succinimidil éster
- CFSE - Carboxi-fluoresceína succinimidil éster
- Cis - Carcinoma in situ
- CLRs - Receptores Lectinas tipo C
- CMP-Neu5Ac - N-acetilneuramínico citidina monofosfato
- DCs - Células Dendríticas
- DC-SIGN - DC-specific ICAM-3 grabbing non-integrin
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- FAP - Proteína de ligação à fibronectina
- FITC - Fluoresceína isotiocianato
- FN - Fibronectina
- FSc - Direcção longitudinal
- FucT - Fucosiltransferases
- GAGs - Glicosaminoglicanos
- Gal - Galactose
- GalNAc - N-acetilgalactosamina
- GFP - Proteína verde fluorescente
- GlcNAc - N-acetilglucosamina
- GM-CSF - Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
- HLA - Antígenos leucocitários humanos
- HMGB1 - High-mobility group protein B1
- IL - Interleucina
- int- DCs - DCs intersticiais
- IP - Índice de proliferação
- LAK - Lymphokine-activated killer cells
- Lcs - Células de Langerhans
- Le - Lewis
- LPS - Lipopolissacárido
- MAA - Maackia amurensis

MAK - BCG-induced macrophage cytotoxicity  
 MCH-II - Complexo maior de histocompatibilidade classe II  
 mDCs - Células dendríticas mielóides  
 MFI - Intensidade de Fluorescência Média  
 Neu5A - N-acetilneuramínico  
 NF- $\kappa$ B - Nuclear factor kappa  $\beta$   
 NK - Células natural Killers  
 OSGE - Endopeptidase de *O*-sialoglicoproteínas  
 PCR - Reacção em cadeia de polimerase  
 pDCs - DCs plasmacitóides  
 PNA - Peanut agglutinin lectin  
 ppGalNAcTs - N-acetilgalactosaminiltransferase  
 RE - Retículo Endoplasmático  
 RT-PCR - Reacção de polimerização em cadeia em tempo real  
 RTU-V - Ressecção trans-uretral  
 Sias - Ácidos siálicos  
 Siglecs - Sialic acid-binding Ig-like lectins  
 sLe<sup>x</sup> - Antígeno Sialil-Le<sup>x</sup>  
 sLe<sup>a</sup> - Antígeno sialil-Le<sup>a</sup>  
 SNA - Sambucus nigra  
 SSc - Direcção transversal  
 sT - Antígenos sialil-T  
 sTn - Antígeno sialil-Tn  
 T sintase -  $\beta$ 1-3N-galactosiltransferase  
 TAC - Tomografia Axial Computorizada  
 UFC - Unidades formadoras de colónias  
 $\beta$ 3/4 GalT -  $\beta$ 3/4N-acetilgalactosiltransferase  
 $\beta$ 3/4 GnT -  $\beta$ 3/4acetilglucosaminiltransferase

***DISSERTAÇÃO***

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Glicosilação

A glicosilação constitui um dos fenómenos de modificação pós-traducional de proteínas mais comum. Este processo consiste na ligação covalente de um ou mais glicanos, constituídos por monossacarídeos, a uma proteína, lípido, hidrato de carbono ou a outro componente orgânico, formando um glicoconjugado (Varki *et al.*, 2009 e Reis *et al.*, 2010). Os glicoconjugados encontram-se envolvidos em vários processos fisiológicos e patológicos, nomeadamente nos processos de diferenciação, migração e sinalização celular, interações hospedeiro-patógeno e processos de invasão tumoral e metastização (Campbell e Yarema, 2005 e Reis *et al.*, 2010).

As classes de glicanos que se encontram nas células eucarióticas são definidas com base na natureza da ligação do glicano à molécula alvo (proteína ou lípido), formando, desta forma, diferentes glicoconjugados (Fig.1.1). Assim, os glicoconjugados podem ser classificados em proteoglicanos, glicoesfingolípidos, proteínas ligadas a glicofosfatidilinositol e glicoproteínas (Varki *et al.*, 2009 e Li e Richards, 2010).

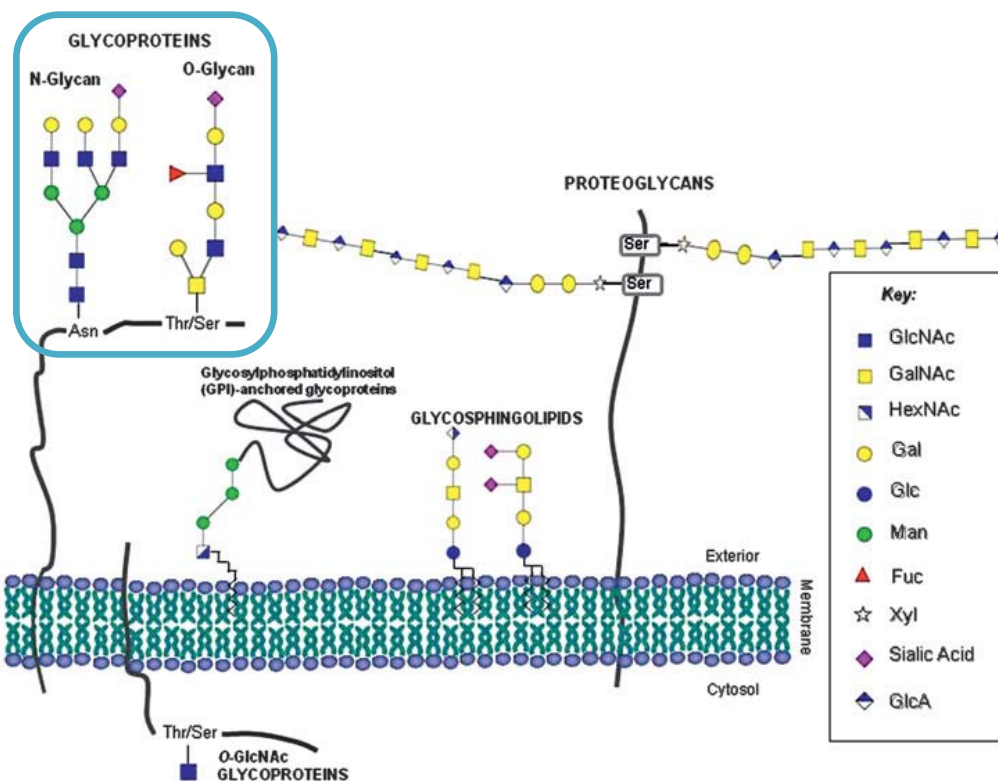


Figura 1.1- Classes de glicoconjugados expressos nas células humanas (adaptada de Reis *et al.*, 2010).

Os proteoglicanos são proteínas altamente glicosiladas, cuja unidade básica é constituída por um centro proteico ligado covalentemente a uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs). Esta ligação envolve um trissacarídeo, constituído por duas galactoses e uma xilose, ligado a um resíduo de

serina constituinte da sequência aminoacídica. Os glicoesfingolípídeos ou glicolípídeos resultam da associação de um glicano a um lípido, em que a ligação se estabelece através de um resíduo de uma molécula de galactose ou de glucose do oligossacarídeo ao grupo primário terminal do hidroxilo de uma ceramida (composta por uma esfingosina e um ácido gordo). As proteínas ancoradas a glicofosfatidilinositol são glicoconjugados em que a proteína se encontra associada à bicamada lípidica através de um grupo de fosfatidilinositol. As glicoproteínas são definidas como sendo glicoconjugados nos quais uma ou mais cadeias oligossacarídicas se encontra covalentemente ligada a uma proteína (Ohyama, 2008, Varki *et al.*, 2009 e Reis *et al.*, 2010).

### 1.1.1 Glicoproteínas

Existem dois tipos de glicanos associados a glicoproteínas, com base no tipo de ligação: os *N*-glicanos e os *O*-glicanos. Ambos os tipos de glicosilação podem existir em simultâneo na mesma proteína e na mesma célula. Um *N*-glicano consiste num oligossacarídeo ligado covalentemente ao átomo de azoto do resíduo de asparagina no contexto de uma sequência aminoacídica do tipo Asn-X-Ser/Thr (sendo X qualquer aminoácido excepto a prolina). Um *O*-glicano consiste num oligossacarídeo ligado covalentemente ao átomo de oxigénio de um resíduo de serina ou treonina de uma sequência aminoacídica. O processo de *N*-glicosilação requer a produção de um oligossacárido precursor que é transferido em bloco de um lípido dador, o dolicol, para os resíduos de asparagina das proteínas recém-sintetizadas no Retículo Endoplasmático (RE). Após esta transferência verificam-se ciclos de adição e remoção de glucose no RE, podendo ocorrer depois a adição de resíduos sacarídicos terminais no Aparelho de Golgi (Taniguchi *et al.*, 2008, Varki *et al.*, 2009 e Li e Richards, 2010).

#### 1.1.1.1 *O*-glicosilação

Ao contrário da *N*-glicosilação, no processo de *O*-glicosilação a adição de açúcares ocorre de forma sequencial no Aparelho de Golgi (Fig. 1.2). Este processo é iniciado pela adição de uma *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) a um resíduo de serina ou treonina da sequência aminoacídica, formando o antigénio Tn. Esta reacção é catalisada pelo polipéptido *N*-acetilgalactosaminiltransferase (ppGalNAcTs), a partir do dador UDP-GalNAc. Após a formação do antigénio Tn, este pode ser sialilado pela acção das  $\alpha$ 2-6 sialiltransferases ST6GalNAc-I/II, originando o antigénio sialil-Tn (sTn) e terminando o processo de adição de açúcares ou mais frequentemente pode ser alongado, originando outros *O*-glicanos. Assim, a transferência de uma galactose (Gal) para o antigénio Tn leva à formação do antigénio T (ou core 1). Esta reacção é catalisada pela core 1  $\beta$ 1-3N-galactosiltransferase (T sintase ou C1GalT-1) presente na maioria dos tecidos, enquanto que, a acção da core 3  $\beta$ 1-3N-acetilglucosaminiltransferase (C3GnT) sobre o antigénio Tn leva à formação do core 3, presente apenas na mucosa epitelial do tracto gastrointestinal e respiratório e nas glândulas salivares. Também o antigénio T pode ser sialilado, sendo esta reacção catalisada pelas sialiltransferases  $\alpha$ 2-3 ST3Gal-I/II/IV ou  $\alpha$ 2-6 ST6GalNAc-II/III/IV formando os antigénios sialil-T (sT) ou disialil-T

respectivamente. Se não ocorrer a formação do antígeno sialil-T, o antígeno T pode ser alongado pela adição de uma N-acetilglucosamina (GlcNAc) pela  $\beta$ 1-6 N-acetilglucosaminiltransferase (C2GnT-1/3), presente em células epiteliais e hematopoiéticas, formando o core 2. Se não acontecer a sialilação ou a adição de Galactose, o core 3 pode ser alongado pela core 2/4  $\beta$ 1N-acetilglucosaminiltransferase (C2GnT-2), dando origem ao core 4. Estas estruturas core-O-glicanos, especialmente as estruturas core 2, podem ser estendidos por N-  $\beta$ 3/4acetilglucosaminiltransferase ( $\beta$ 3/4 GnT) e  $\beta$ 3/4N-acetilgalactosiltransferase ( $\beta$ 3/4 GalT), conduzindo à formação das cadeias oligossacarídicas tipo 1 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc-R), e tipo 2 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R) (Varki *et al.*, 2009, Cazet *et al.*, 2010 e Reis *et al.*, 2010).

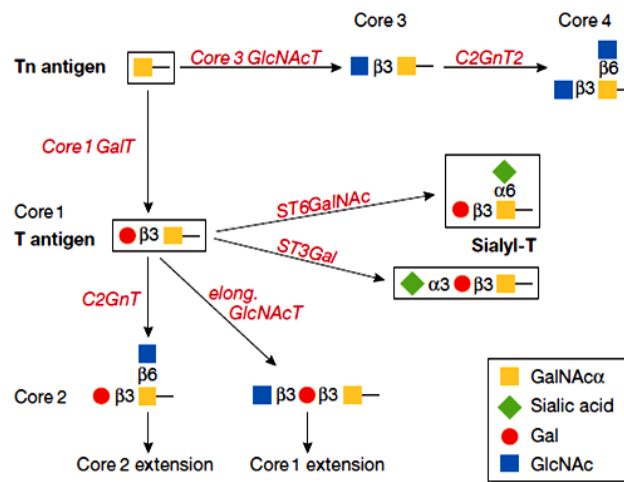


Figura 1.2-Vias de biossíntese dos O-glicanos (Brockhausen, 2006)

Existem muitas vias pelas quais os O-glicanos podem ser alongados e processados, sendo que a adição de resíduos terminais a estas estruturas, nomeadamente a adição de ácido siálico, fucose e/ou sulfato, pode muitas vezes determinar a função biológica, assim como, as propriedades de reconhecimento dos glicanos modificados (Varki *et al.*, 2009).

### 1.1.2 Ácidos siálicos

Os ácidos siálicos (Sias) constituem uma grande família de monossacáridos terminais, nos quais se incluem o ácido N-acetilneuramínico (Neu5A) e os seus derivados, que se encontram tipicamente ligados a glicoconjugados expressos na superfície celular de tecidos animais e de alguns microrganismos (Fig.1.3) (Varki *et al.*, 2009). Os ácidos siálicos estão envolvidos num grande número de funções celulares, tanto em processos fisiológicos como patológicos, nomeadamente na regulação do sistema imunitário, desencadeamento de infecções e progressão de certas doenças (Varki e Varki, 2007).

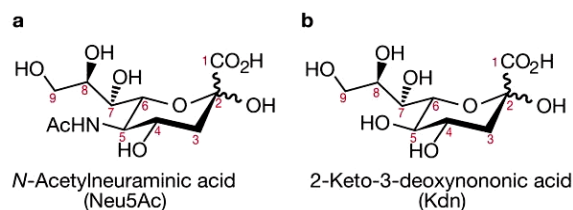


Figura 1.3- Os ácidos N-acetilneuramínico (Neu5A) e 2-ceto-3-desoxi-d-glicero-d-galactononónico (Kdn) constituem os dois ácidos siálicos primários, diferindo apenas no carbono 5. Todos os outros ácidos siálicos são derivados metabólicos destes dois ácidos (Varki *et al.*, 2009).

Estes açúcares de carga negativa partilham uma constituição base de nove átomos de carbono e apresentam uma elevada diversidade estrutural (Fig.1.4). As diferentes ligações que se podem formar entre o átomo de carbono na posição 2 (C-2) dos Sias e os glicanos subjacentes, em conjunto com os vários tipos de substituições nas posições 4, 5, 7, 8 e 9 são responsáveis por esta diversidade elevada dos Sias (Varki *et al.*, 2009 e Chen e Varki, 2010).

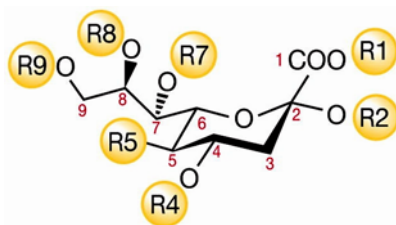


Figura 1.4 Diversidade estrutural dos ácidos siálicos, representada pelas substituições possíveis de ocorrer nos resíduos R (Varki *et al.*, 2009).

A adição de ácido siálico a glicoconjugados é mediada por uma família de enzimas, designadas por sialiltransferases. Estas enzimas transferem o ácido siálico a partir de um substrato dador, o ácido N-acetilneuramínico citidina monofosfato (CMP-Neu5Ac), para as posições terminais das cadeias oligossacarídicas das glicoconjugados e dependendo da sua natureza podem catalisar diferentes ligações, nomeadamente ligações  $\alpha$ 2-3 ou  $\alpha$ 2-6 para o resíduo de  $\beta$ -D-galactose (Gal), ligações  $\alpha$ 2-6 para os resíduos de  $\beta$ -D-N-acetilgalactosamina (GalNAc) ou  $\beta$ -D-N-acetilglucosamina (GlcNAc) e ainda ligações  $\alpha$ 2-8 para outros resíduos de ácido siálico em gangliosídeos ou ácidos polisiálicos (Harduin-Lepers *et al.*, 2001 e Buschiazzo e Alzari, 2008). Estas enzimas constituem uma família de mais de 20 glicosiltransferases diferentes, normalmente, associadas à membrana do Aparelho de Golgi, sendo que os genes que as codificam são expressos diferencialmente, dependendo do tecido e tipo de célula e regulados diferencialmente ao longo dos vários estádios do desenvolvimento (Paulson *et al.*, 1989 e Harduin-Lepers *et al.*, 2001). A importância das sialiltransferases no desenvolvimento de carcinomas é relevante por diversas razões. Em primeiro lugar, os ácidos siálicos podem prevenir interações célula-a-célula através de efeitos repulsivos não específicos de carga, em segundo as estruturas sialiladas podem interagir especificamente com moléculas adesivas (selectinas, siglecs e galectinas), em terceiro a adição do ácido siálico pode mascarar as estruturas sacarídicas subjacentes,

evitando, assim, o reconhecimento destas por outras moléculas da família das lectinas e, por último, os elementos reguladores dos genes que codificam para as sialiltransferases podem constituir alvos de vias de sinalização específicas, sendo que a activação ou o aumento de expressão de uma determinada sialiltransferase pode indicar que uma determinada via foi activada (Dall'Olio e Chiricolo, 2001 e Schauer, 2009).

### **1.1.3 Alterações da glicosilação no cancro**

A alteração da glicosilação constitui uma das primeiras etapas no processo de invasão e metastização tumoral, sendo por isso considerada como uma modificação “quasi- universal” nas células tumorais (Reis *et al.*, 2010).

#### **1.1.3.1 Super-expressão dos antígenos Thomsen Friedenreich em cancro**

Uma das modificações da glicosilação associadas ao desenvolvimento tumoral mais importante consiste na glicosilação incompleta de *O*-glicanos, levando à formação de oligossacáridos truncados e, consequentemente, ao aumento da expressão dos antígenos Thomsen Friedenreich (antígenos T e Tn e as suas formas sialiladas sT e sTn) (Fig.1.5). A expressão dos antígenos T e Tn não é frequente nos tecidos normais e, por isso, a presença destas estruturas na superfície das células tumorais poderá levar ao desencadeamento de uma resposta imunitária no doente (Varki *et al.*, 2009). Esta alteração no processo de glicosilação é consequência da desregulação da expressão de glicosiltransferases, nomeadamente o aumento da expressão da sialiltransferase ST6GalNAc-I e diminuição da T sintase (C1GalT-1), o que se traduz no aumento de expressão dos antígenos sTn e Tn, e a diminuição da expressão da C3GnT e aumento da sialiltransferase ST3Gal-I, que se traduz no aumento dos antígenos T e sT nas células tumorais (Brockhausen, 2006, Yu, 2007 e Varki *et al.*, 2009). Recentemente, a descoberta de uma mutação no gene que codifica para a chaperona Cosmc, que auxilia na aquisição da conformação tridimensional nativa da enzima T sintase, está também implicada na acumulação dos antígenos Tn e sTn à superfície das células tumorais (Ju, *et al.*, 2008). Outro dos mecanismos que também está envolvido na alteração da expressão do antígeno sTn baseia-se no nível de *O*-acetilação do resíduo de ácido siálico. Em cancro do cólon, a actividade da enzima ST6GalNAc-I é idêntica em tecidos normais e tumorais, no entanto o antígeno sTn é apenas detectado em tecidos tumorais. A diferença na detecção deste antígeno nos tecidos normais e tumorais é explicada pela *O*-acetilação do sTn, que é frequente em células normais da mucosa do colón, o que evita o reconhecimento destes antígenos por anticorpos monoclonais anti-sTn, e reduzida em tecidos tumorais (Dall'Olio e Chiricolo, 2001, Vazquez-Martin *et al.*, 2004 e Varki *et al.*, 2009). Por fim, o aumento do transportador de UDP-Galactose está também implicado na indução da expressão do antígeno T nas células tumorais (Varki *et al.*, 2009).



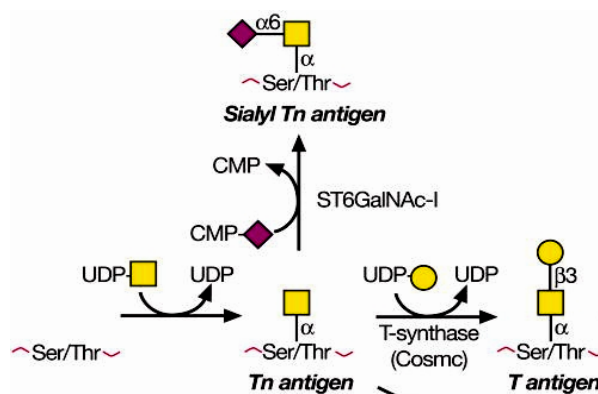


Figura 1.5- A glicosilação incompleta dos *O*-glicanos nas células tumorais, resulta no aumento de expressão dos antígenos Thomsen-Friedenreich e nas suas formas sialiladas (adaptada de Varki *et al.*, 2009).

Os antígenos Tn e T são expressos em cerca de 90% dos carcinomas humanos (Yu, 2007), incluindo cancro do colón (Yuan *et al.*, 1986), mama (Desai *et al.*, 1995 e Kumar *et al.*, 2005), bexiga (Coon *et al.*, 1982 e Limas e Lange 1986), próstata (Janssen *et al.*, 1996 e Zhang *et al.*, 1997), ovário (Ghazizadeh *et al.*, 1990), fígado (Cao *et al.*, 1996) e estômago (Sotozono *et al.*, 1994 e Baldus *et al.*, 2001). Na maioria destes casos, o aumento destes antígenos correlaciona-se com a progressão tumoral e metastização, uma vez que a expressão do antígeno T também medeia o reconhecimento e a atracagem das células tumorais às células endoteliais que expressam galectina 3 (revisto em Dall'Olio e Chiricolo, 2001 e Yu, 2007).

Como já foi referido anteriormente, as estruturas sialiladas como os antígenos sTn e sT desempenham um papel crucial no desenvolvimento e progressão de tumores ao modelarem as interações célula-a-célula e célula-matrix. Estes antígenos podem mediar o reconhecimento de estruturas glicosídicas expressas em células tumorais por moléculas receptoras do tipo Lectinas presentes em células endoteliais e/ou ainda prevenir o reconhecimento de células tumorais por células do sistema imunitário protegendo células metastáticas em circulação na corrente sanguínea da sua destruição. (Pinho *et al.*, 2007) A expressão aberrante do antígeno sTn já foi descrita em diversos tipos de cancro epiteliais, nomeadamente em cancro de mama (Schmitt *et al.*, 1995, Soares *et al.*, 1996 e Julien e Delannoy, 2003), gástrico (Imada *et al.*, 1999, Takano *et al.*, 2000, Nakagoe *et al.*, 2002 e Julien e Delannoy, 2003), pancreático (Julien e Delannoy, 2003), colorectal (Nakagoe *et al.*, 2001 e Julien e Delannoy, 2003), ovárico (Julien e Delannoy, 2003) e em lesões pré-malignas do tracto gastrointestinal (David *et al.*, 1992, Itzkowitz *et al.*, 1992 e Karlen *et al.*, 1998), estando relacionada a um mau prognóstico (Leivonen *et al.*, 2001 e Pinho *et al.*, 2007).

Em suma, os antígenos Tn e T e as suas formas sialiladas sTn e sT são marcadores de tumores pouco diferenciados, sendo a sua expressão correlacionada com tumores invasivos e altamente proliferativos, assim como, a um mau prognóstico (Julien e Delannoy, 2003, Brockhausen, 2006 e Yu, 2007) e a uma baixa resposta à quimioterapia (Miles *et al.*, 1994).

### 1.1.3.2 Super-expressão dos antígenos Lewis em cancro

Os antígenos de Lewis (Le) constituem um conjunto de estruturas sacarídicas terminais estruturalmente e biossinteticamente relacionadas que são comuns a diferentes classes de glicanos, nomeadamente *N*-glicanos, *O*-glicanos e glicolípidos (Varki *et al.*, 2009). Estes antígenos resultam de modificações nas cadeias oligossacarídicas tipo 1 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc-R) e tipo 2 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R), através da adição de resíduos de fucose e ácido siálico, sendo que os antígenos Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup> e sialil-Le<sup>a</sup> (sLe<sup>a</sup>) derivam de modificações na cadeia tipo 1, enquanto que os antígenos Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup> e sialil-Le<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>) resultam da adição de resíduos de fucose e ácido siálico na cadeia tipo 2 (Cazet *et al.*, 2010). A formação do antígeno Le<sup>a</sup> é originada através da  $\alpha$ 1-4 fucosilação do resíduo de GlcNAc da cadeia oligossacarídica tipo 1, catalisada pela FucT-III. Por outro lado, a acção das  $\alpha$ 1-3 fucosiltransferases FucT-IV/VI/IX, que catalisam a transferência de um resíduo de fucose para o resíduo de GlcNAc da cadeia tipo 2, leva à formação do antígeno Le<sup>x</sup>. As  $\alpha$ 1-2 fucosiltransferases FucT-I e II são responsáveis pela formação dos antígenos Le<sup>b</sup> e Le<sup>y</sup> ao transferirem uma fucose para o resíduo de galactose do antígeno Le<sup>a</sup> e Le<sup>x</sup>, respectivamente. Por sua vez, as formas sialiladas destes antígenos são originadas através da acção de  $\alpha$ 2-3 sialiltransferases, ST3Gal-III e ST3Gal-IV/VI, que transferem ácido siálico para os resíduos de galactose das cadeias oligossacarídicas tipo 1 e tipo 2, levando à formação dos antígenos sLe<sup>a</sup> e sLe<sup>x</sup>, respectivamente. Neste caso, o processo de  $\alpha$ 1-3/4 fucosilação ocorre apenas após a sialilação dos resíduos de galactose das cadeias oligossacarídicas (Dall'Olio e Chiricolo, 2001, Varki *et al.*, 2009 e Cazet *et al.*, 2010).

Os antígenos Lewis, nomeadamente os antígenos sLe<sup>x</sup> e sLe<sup>a</sup>, são frequentemente sobre-expressos em vários tipos de carcinomas (mama, pulmão, cólon, gástrico, etc), sendo que esta expressão se encontra correlacionada com a progressão tumoral, metastização e mau prognóstico (Dall'Olio e Chiricolo, 2001, Ugorski e Laskowska, 2002 e Reis *et al.*, 2010). A alteração da expressão destas estruturas sialo-fucosiladas no processo de transformação neoplásica resulta da desregulação das glicosiltransferases envolvidas na síntese dos antígenos sLe<sup>x</sup> e sLe<sup>a</sup> (Fig. 1.6), tais como as  $\alpha$ 2-3 sialiltransferases e  $\alpha$ 1-3/4 fucosiltransferases, e as  $\beta$ 3/4N-acetilgalactosaminiltransferases envolvidas no alongamento das cadeias oligossacarídicas tipo 1 e tipo 2 (Dall'Olio e Chiricolo, 2001, Brockhausen, 2006 e Reis *et al.*, 2010).

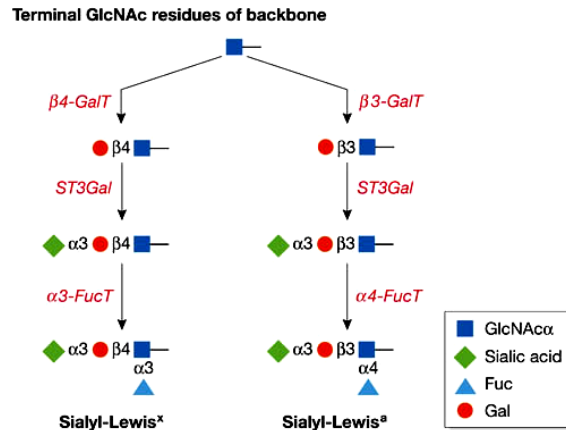


Figura 1.6- Formação dos antígenos tumorais sLe<sup>x</sup> e sLe<sup>a</sup> (Brockhausen, 2006).

A expressão dos oligossacáridos sLe<sup>x</sup> e sLe<sup>a</sup> à superfície de vários tipos de células tumorais está envolvida na adesão destas células às moléculas de adesão expressas pelo endotélio (P e E-selectinas). Estas células malignas utilizam a mesma estratégia de migração celular que os leucócitos, que também expressam estruturas sialofucosiladas, facilitando assim o estabelecimento da disseminação hematológica e a metastização. Assim, percebe-se que as células tumorais que expressam estes antígenos adquirem uma vantagem na sua sobrevivência, uma vez que apresentam ligandos de selectinas que medeiam interações com as superfícies endoteliais (Ugorski e Laskowska, 2002, Varki *et al.*, 2009 e Cazet *et al.*, 2010).

## 1.2 Cancro de bexiga

O Cancro de Bexiga (CB) constitui a malignidade mais comum do tracto urinário (Babjuk *et al.*, 2011). Este tumor é o quarto tumor com maior incidência no sexo masculino e a nona causa de morte devido a cancro neste sexo. No sexo feminino este tumor é menos frequente, constituindo o oitavo tumor com maior incidência entre as mulheres, sendo a proporção entre homens e mulheres de aproximadamente 3:1 (Alexandroff and James, 2000).

### 1.2.1 Etiologia e factores de risco

Os factores de risco associados ao desenvolvimento e progressão deste tipo de cancro são múltiplos e o tabagismo é o principal, sendo responsável por cerca de um terço dos carcinomas vesicais. Tal como noutros tipos de cancro, a idade constitui um factor de risco, verificando-se que a ocorrência de CB é superior em idosos. O CB foi também o primeiro cancro a ser relacionado com certos trabalhos e ocupações, uma vez que sua incidência é superior em certas indústrias (automóvel, vestuário, petrolífera, entre outras), em resultado da exposição a determinados químicos com actividade carcinogénica. O consumo de certos fármacos, como a ciclofosfamida e analgésicos contendo fenacetina, bem como, a ingestão de água com elevados níveis de arsénio estão também associados ao

risco de desenvolvimento de tumores vesicais. (Alexandroff e James, 2000, Pinto e Martins da Silva, 2007, Jacobs *et al.*, 2010 e Lokeshwar *et al.*, 2011).

### 1.2.2 Sintomas e diagnóstico

O CB pode ser detectado acidentalmente ou devido aos sintomas apresentados pelo doente. O sintoma mais comum é a hematúria verificando-se em mais de 85% dos doentes. Este sintoma pode surgir isolado ou acompanhado de outros sintomas, tais como ardor miccional, aumento da frequência miccional, lombalgias, dores abdominais e edema dos membros inferiores. Numa abordagem inicial, a citoscopia e a ecografia vesical constituem os exames habitualmente utilizados para diagnóstico. No entanto, por vezes torna-se necessário o recurso a exames mais especializados, como uma Tomografia Axial Computorizada (TAC), para uma melhor caracterização do tumor ou esclarecimento de dúvidas que possam existir após a ecografia (Pinto e Martins da Silva, 2007 e Jacobs *et al.*, 2010).

### 1.2.3 Classificação patológica e estadiamento

Os tumores podem ser divididos em diferentes estadios, dependendo do nível de invasão histológica destes. O estadiamento em cancro é designado por TNM (*tumor, node, metastasis*), e tem em consideração a profundidade que o tumor atingiu através da parede da bexiga (T), se existem células tumorais nos nódulos linfáticos (N) e se houve disseminação para outras partes do corpo (M) (Tab.1.1) (Jacobs *et al.*, 2010, Babjuk *et al.*, 2011 e Lokeshwar *et al.*, 2011).

Tabela 1.1 - Classificação TNM de cancro de bexiga 2010 (Lokeshwar, *et al.*, 2011)

<b>Primary tumor (T)</b>	
TX	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
Ta	Noninvasive papillary carcinoma
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor invades subepithelial connective tissue
T2	Tumor invades muscularis propria
pT2a	Tumor invades superficial muscularis propria (inner half)
pT2b	Tumor invades deep muscularis propria (outer half)
T3	Tumor invades perivesical tissue
pT3a	Microscopically
pT3b	Macroscopically (extravesical mass)
T4	Tumor invades any of the following: prostatic stroma, seminal vesicles, uterus, vagina, pelvic wall, abdominal wall
T4a	Tumor invades prostatic stroma, uterus, vagina
T4b	Tumor invades pelvic wall, abdominal wall
<b>Regional lymph nodes (N)</b>	
NX	Lymph nodes cannot be assessed
N0	No lymph node metastasis
N1	Single regional lymph node metastasis in the true pelvis (hypogastric, obturator, external iliac, or presacral lymph node)
N2	Multiple regional lymph node metastasis in the true pelvis (hypogastric, obturator, external iliac, or presacral lymph node)
N3	Lymph node metastasis to the common iliac lymph nodes
<b>Distant metastasis (M)</b>	
M0	No distant metastasis
M1	Distant metastasis

O tipo histológico mais comum dos tumores de bexiga (em 90% dos casos) é o carcinoma das células de transição (CCT) ou carcinoma do urotélio, em que o tumor surge a partir da camada interna da bexiga, o urotélio vesical, distinguindo-se do urotélio normal por ter um aumento do número de camadas celulares (Pinto e Martins da Silva, 2007, MacVicar, 2008 e Jacobs *et al.*, 2010).

Cerca de 70-80% dos tumores do urotélio são tumores não-músculo invasivos ou superficiais. Estes abrangem os carcinomas limitados à mucosa, como o carcinoma *in situ* (Cis ou Tis) e o carcinoma papilar não invasivo (Ta), e os tumores do estadio T1 que têm origem no urotélio mas penetram a membrana basal até à lâmina própria. Os restantes 20% são considerados tumores invasivos, por envolverem pelo menos uma camada muscular, e nestes incluem-se os T2 que invadem a camada muscular, os T3 que se estendem até ao tecido perivesical e os carcinomas T4 que invadem órgãos tais como: próstata, útero, vagina, parede pélvica, parede abdominal (Fig. 1.7) (Pinto e Martins da Silva, 2007, Jacobs *et al.*, 2010 e Lokeshwar, *et al.*, 2011).

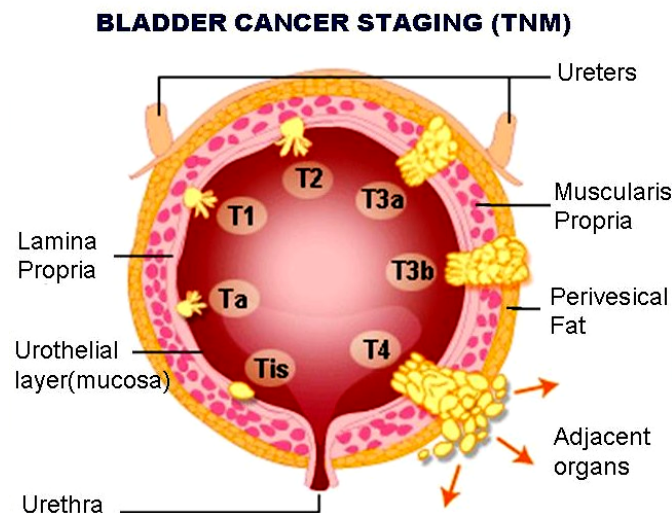


Figura 1.7- Diagrama representativo das Fases T de cancro de bexiga de acordo com a classificação TNM

Para além do estadio, o grau também constitui um importante parâmetro a considerar na avaliação do prognóstico e das estratégias de tratamento. O grau de um tumor é determinado de acordo com uma avaliação do nível de diferenciação das células tumorais numa amostra biológica, quando visualizadas ao microscópio. Neste sistema de classificação os tumores que apresentam um elevado grau correspondem aos que exibem uma menor diferenciação celular, e por isso, crescem mais rapidamente e tendem a disseminar-se mais que os tumores de menor grau, cujas células apresentam maior diferenciação (Jacobs *et al.*, 2010 e Babjuk *et al.*, 2011).

#### 1.2.4 Tratamento

Após diagnóstico, os doentes com cancro de bexiga são submetidos a uma cirurgia designada por ressecção trans-uretral (RTU-V). Esta cirurgia endoscópica baseia-se na ablação parcial ou total do

tumor, constituindo, por isso, uma ferramenta terapêutica, mas também possibilita a realização de um diagnóstico e prognóstico mais robusto, uma vez que o tecido retirado é posteriormente analisado, permitindo a caracterização do tumor. Numa primeira abordagem, nas horas subsequentes à RTU-V deve ser aplicada uma instilação quimioterapêutica intravesical única, sendo que as estratégias terapêuticas subsequentes são definidas de acordo com o estadió e grau do tumor. Em casos de tumor superficial a RTU-V poderá ser suficiente no tratamento. No entanto, em caso de risco intermédio de recidiva os doentes devem ser sujeitos a quimioterapia contínua intravesical (mitocina C, epirrubicina) de manutenção, enquanto que para os doentes que apresentem um elevado risco de recidiva (lesões Ta, e T1 de grau elevado, CIS e recidivas frequentes) está preconizada a imunoterapia intravesical com bacillus Calmette-Guérin (BCG). Se o tumor é invasivo, geralmente adopta-se uma abordagem mais agressiva, nomeadamente uma cistectomia radical (remoção total da bexiga). Em situações em que o tumor se encontra no estadió T4 o tratamento habitualmente escolhido é a quimioterapia e/ou a radioterapia sistémica (Pinto e Martins da Silva, 2007, Jacobs *et al.*, 2010 e Babjuk *et al.*, 2011).

### **1.3 Imunoterapia para tumores superficiais de cancro de bexiga**

#### **1.3.1. Imunoterapia BCG**

##### **1.3.1.1 História do BCG e cancro de bexiga**

O bacillus Calmette Guérin constitui a terapia intravesical mais comum utilizada no tratamento de carcinomas uroteliais não-músculo invasivos. O BCG é uma sub-estirpe atenuada de *Mycobacterium bovis*, desenvolvida entre 1908 e 1921 por Calmette e Guerin, com o intuito de gerar uma vacina contra a tuberculose humana. A noção de que a tuberculose poderia ter algum efeito anti-tumoral começou a desenvolver-se no início do século XX, quando Pearl reportou uma baixa frequência de cancro em doentes com tuberculose, no entanto, o uso do BCG como terapêutica anti-tumoral apenas se iniciou nos anos cinquenta para alguns tipos de neoplasias (leucemia, cancro colorectal, de pulmão e melanoma), por Llyod Old. Foi no ano de 1976 que Álvaro Morales procedeu à primeira instilação intravesical de BCG com o intuito de tratar cancro de bexiga superficial, e desde essa altura a imunoterapia com BCG para cancro de bexiga superficial sofreu poucas modificações. Este procedimento terapêutico inicia-se uma a três semanas após a realização da RTU-V e consiste numa instilação intravesical semanal, durante seis semanas, de cerca de 81 mg de BCG liofilizado, reconstituído em 50 mL de solução salina. Após as seis semanas de tratamento pode-se optar por prosseguir com uma terapêutica de manutenção, que dependerá do grau e estadió do tumor (Brandau e Suttman, 2007, Herr e Morales, 2008 e Kresowik e Griffith, 2009).

### 1.3.1.2 Mecanismo de acção do BCG

#### 1.3.1.2.1 Adesão e internalização do BCG pelas células tumorais do urotélio

O mecanismo de acção da imunoterapia intravesical com BCG ainda não é completamente conhecido. No entanto, é claro que induz uma resposta imunitária local caracterizada pelo influxo e infiltração massiva de células inflamatórias (nomeadamente neutrófilos e macrófagos) para a mucosa e lúmen da bexiga, que resulta na produção de várias citocinas e no desenvolvimento de uma resposta celular robusta (Lockyer e Gillatt, 2001 Kresowik e Griffith, 2009).

Uma condição essencial para que esta terapia seja bem sucedida é a de o sistema imunitário do doente não se encontrar comprometido, como demonstrado por Ratliff em 1987 ao descobrir que ratos sem timo não desenvolviam uma resposta anti-tumoral mediante uma instilação de BCG (Ratliff *et al.*, 1987). Igualmente, a depleção de células T CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> em ratinhos saudáveis inibia a actividade anti-tumoral mediada pelo BCG (Ratliff *et al.*, 1993). Outro factor essencial, no sucesso desta imunoterapia, resulta do facto de a bexiga constituir um compartimento confinado, o que permite que a concentração de BCG se mantenha elevada permitindo, assim, uma activação continuada e mais duradoura do sistema imunitário (Higuchi *et al.*, 2009 e Videira *et al.*, 2009).

A interacção do BCG com o endotélio urotelial constitui o primeiro passo no processo de desenvolvimento da resposta anti-tumoral. Assim, após a instilação de BCG, este acumula-se perto da parede da bexiga, permitindo o estabelecimento de contactos de natureza não-específica e específica com as células uroteliais. O lúmen da bexiga encontra-se coberto por uma camada de glicosaminoglicanos hidrofílicos e altamente sulfatados (GAGs), que protegem a bexiga de patogénios e compostos tóxicos. Tanto a camada de GAGs como a parede celular do BCG são carregadas negativamente, o que permite que o BCG se acumule sem aderir especificamente à parede celular da bexiga (Bevers *et al.*, 2004). Para além destas interacções, estabelecem-se também mecanismos específicos essenciais na adesão e internalização de BCG pelas células tumorais do urotélio. Alguns estudos prévios sugerem que estes mecanismos são mediados pela fibronectina (FN) que actua como ponte ao ligar-se tanto às integrinas expressas pelas células do urotélio (receptores  $\alpha 5\beta 1$ ) como às proteínas de ligação à fibronectina (FAPs) presentes no BCG (Zhao *et al.*, 2000). Nestes estudos, o pré-tratamento das células da linha tumoral de bexiga T-24 com anticorpos anti-receptor  $\alpha 5\beta 1$  e anti-FN comprometeu o processo de adesão e internalização do BCG por estas células. (Kavoussi *et al.*, 1990, Kuroda *et al.*, 1993, Bevers *et al.*, 2004 e Pook *et al.*, 2007). No entanto, é preciso realçar que noutros estudos *in vitro*, a adição de anticorpos anti-FN não inibiu o processo de internalização, o que sugere que a FN não apresenta um papel capital no processo de internalização e que, possivelmente, a internalização do BCG é mediada por moléculas adicionais co-expressas com a FN (Schneider *et al.*, 1994 e Bevers *et al.*, 2000). Estudos de internalização *in vitro* demonstram ainda que o processo de internalização é dependente da dose de BCG e do tempo de incubação, assim como do estado de

diferenciação das células tumorais. Boer e os co-autores demonstraram que a capacidade fagocítica das células tumorais depende do grau destas, ou seja, células pouco diferenciadas (grau elevado) apresentam uma taxa de internalização superior quando comparadas com as células que apresentam um estado de diferenciação maior (Tab. 1.2) (De Boer *et al.*, 1996).

Tabela 1.2 - Correlação entre o grau de diferenciação e percentagem de BCG internalizado por diferentes linhas celulares (De Boer *et al.*, 1996).

*Internalization of BCG by a Series of Human Bladder Tumor Cell Lines Varying in Differentiation Grade<sup>a</sup>*

Cell line	Differentiation grade	BCG Internalization (%)
T24	Poorly	68
J82	Poorly	51
TCC-SUP	Poorly	34
BT-B	Poorly	0
SBC2	Well	0
SBC7	Well	2
RT4	Well	0

<sup>a</sup>Internalization was expressed as percentage of internalizing cells (FL1<sup>+</sup>/FL2<sup>-</sup>) after 4 h of incubation with BCG and subsequent FACS analysis.

Após o processo de internalização pelas células tumorais de grau elevado, o BCG é processado e degradado, sendo que as glicoproteínas e lipoproteínas resultantes do processamento são transportadas para a superfície celular. Todo este processo induz alterações fenotípicas nas células tumorais que, consequentemente vão interferir em vários aspectos, nomeadamente na modulação do sistema imunitário e no aumento da vulnerabilidade das células tumorais (Bever *et al.*, 2004).

### 1.3.1.2.2 Efeito citotóxico do BCG sobre as células tumorais

As alterações fenotípicas das células tumorais provocadas pela internalização do BCG encontram-se sumariadas na Figura 1.8 e incluem a paragem do ciclo celular e a indução da apoptose e necrose, originando directamente danos citostáticos e citotóxicos nas células tumorais de bexiga. Apesar dos mecanismos anti-proliferativos que o BCG exerce sobre as células tumorais permanecerem por esclarecer, existem alguns estudos elucidativos sobre este tema. Chen *et al.* reportaram que a interacção do BCG com as células uroteliais malignas provoca a activação de múltiplas vias de sinalização intracelular, nomeadamente as vias que envolvem os factores de transcrição NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa  $\beta$* ), AP1 (*activator protein 1*) e C/EBP (*CCAAT-enhancer-binding proteins*). Esta activação vai contribuir para a transcrição de genes precoces, incluindo os genes que codificam para o inibidor da cinase dependente de ciclina p21 e da interleucina 6 (IL-6), levando à paragem do ciclo celular na fase G1 e à indução do processo necrótico nas células uroteliais malignas (Chen *et al.*, 2009). A activação destas vias promove, também, a libertação de várias proteínas intracelulares para o espaço extracelular, nomeadamente da proteína necrótica HMGB1 (*High-mobility group protein B1*). Esta proteína actua como uma quimiocina potente atraindo especificamente para o urotélio populações celulares do sistema imunitário e desempenha, também, funções ao nível da regulação da diferenciação das células imunitárias (Chen *et al.*, 2009 e See *et al.*, 2009). A indução do processo



apoptótico foi, também, apontada como um dos efeitos resultantes da exposição das células tumorais uroteliais ao BCG. A indução da morte celular programada pela presença de BCG, segundo alguns estudos, resulta da activação das óxido nítrico sintetases (*Nitric oxide synthase*- iNOS e eNOS), provocando a produção de óxido nítrico nas células tumorais (Jansson *et al.*, 1998, Morcos *et al.*, 2001, Mitropoulos *et al.*, 2005 e Hosseini *et al.*, 2006). Outros estudos implicam o envolvimento da hidrolase lisossomal catepsina B que, quando activada leva à activação da proteína pró-apoptótica BID (Sandes *et al.*, 2007), enquanto outros estudos sugerem o envolvimento da inibição da actividade da telomerase nas células tumorais, levando ao encurtamento dos telómeros (Saitoh *et al.*, 2002). Apesar dos mecanismos citotóxicos que o BCG pode desencadear no carcinoma das células de transição (CCT), o tratamento com BCG pode também resultar na estimulação da metastização, através da secreção do factor de crescimento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*- VEGF) pelas células tumorais (Ping *et al.*, 2010).

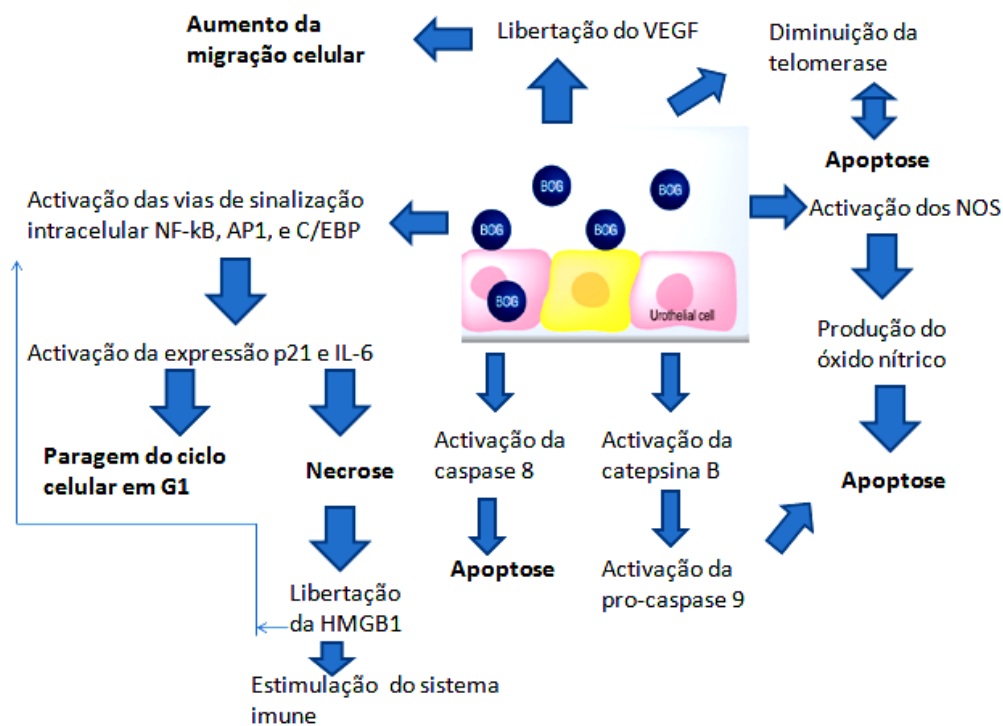


Figura 1.8- A exposição das células tumorais ao BCG tem um efeito directo na biologia destas células, induzindo a paragem do ciclo celular na fase G1, a morte celular associada à libertação da proteína necrótica HMGB1 e a morte celular por apoptose. A indução da apoptose é desencadeada pela activação das vias extrínseca (activação da caspase 8) e intrínseca (activação da catepsina B, libertação do citocromo *c* e activação da pro-caspase 9), produção de óxido nítrico e diminuição da actividade da telomerase. O BCG pode ainda estimular a actividade de migração das células tumorais, como consequência da secreção de VEGF por estas.

### 1.3.1.2.3 Resposta imunológica desencadeada pelo BCG

Para além das células tumorais, o BCG é também internalizado e processado por células apresentadoras de antígenos profissionais (*Antigen presenting cell*- APCs), nas quais se incluem as células dendríticas, macrófagos e linfócitos B. Após o processo de adesão e internalização do BCG pelas células do urotélio verifica-se a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente IL-1, IL-6, IL-8 e TNF $\alpha$ , desencadeando a activação e mobilização de subpopulações de células do sistema imunitário para o urotélio (Lockyer e Gillatt, 2001 e Kresowik e Griffith, 2009). As primeiras células a responder a este estímulo são os neutrófilos, seguindo-se os monócitos/macrófagos que se infiltram na parede do urotélio. Os neutrófilos e macrófagos produzem citocinas e quimiocinas adicionais atraindo para a bexiga várias populações linfocitárias, nomeadamente os linfócitos T CD4<sup>+</sup>. O BCG é então fagocitado e processado pelas APCs, que se encontram no local, e os antígenos resultantes do processamento vão ser expressos à superfície das APCs e apresentados aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, no contexto do complexo maior de histocompatibilidade classe II (*Major Histocompatibility Complex*- MHC-II). Isto resulta no desenvolvimento da resposta celular Th1. Esta resposta é essencial para a destruição tumoral e é caracterizada pela secreção das citocinas IL-2, IL-12, INF- $\gamma$  e TNF- $\beta$  que, por sua vez, permitem o recrutamento e a maturação de células citotóxicas efectoras: linfócitos T CD8<sup>+</sup>, células citotóxicas activadas por BCG (*BCG-activated killer cells* - BAKs), linfócitos citotóxicos activados (*lymphokine-activated killer cells* - LAK), macrófagos citotóxicos activados por BCG (*BCG-induced macrophage cytotoxicity* - MAK) e as células NK (*Natural Killers cells*) que são naturalmente citotóxicas, completando-se, assim, a última etapa na erradicação do tumor (Fig. 1.9) (Patard *et al.*, 1998, Prescott *et al.*, 2000, Bevers *et al.*, 2004 e Kresowik e Griffith, 2009). A acção citotóxica das NK, BAK e LAK é mediada por proteínas contidas em grânulos (perforinas e granzimas) que quando são libertadas, induzem a apoptose das células tumorais (Brandau *et al.*, 2001 e Brandau *et al.*, 2007), enquanto que a acção citotóxica dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> é mediada através das vias FasL ou perforina (Brandau *et al.*, 2000). Os mecanismos envolvidos na morte das células tumorais desencadeados pelos MAK são múltiplos, incluindo o contacto directo e a libertação de factores solúveis citotóxicos (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e NO) (Luo e Knudson, 2010). Para além da secreção das citocinas, os neutrófilos secretam, também, o ligando indutor da apoptose TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*), provocando directamente a morte das células tumorais (Ludwig *et al.*, 2004, Simons *et al.*, 2007 Simons *et al.*, 2008 e Rosevear *et al.*, 2009).

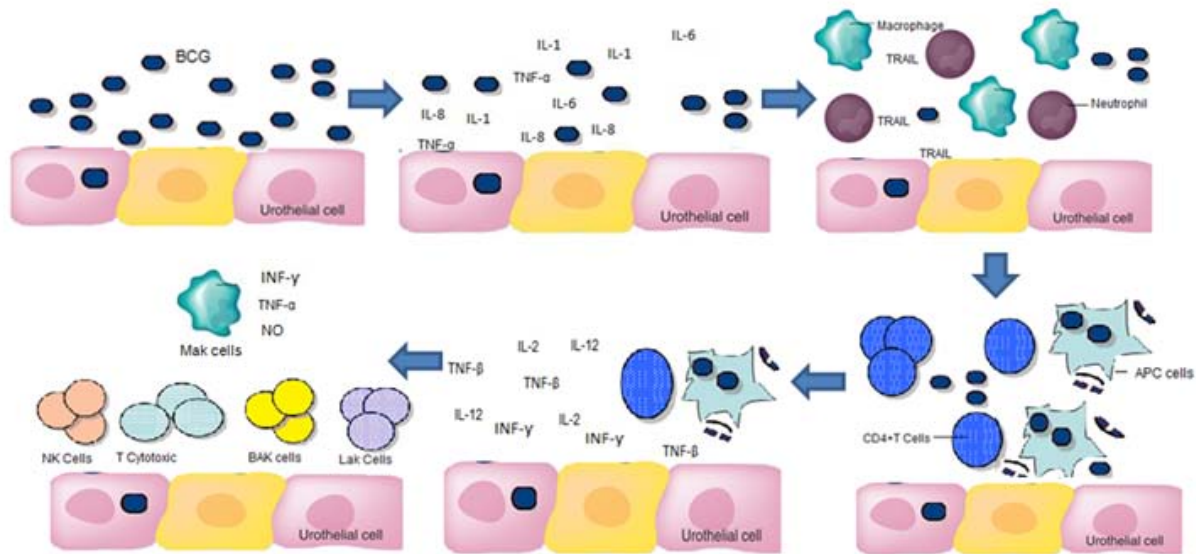


Figura 1.9- Em resposta ao estímulo do BCG, as células uroteliais produzem um número limitado de citocinas, que são responsáveis pelo recrutamento de monócitos e neutrófilos para o urotélio. Estas células vão secretar citocinas e quimiocinas adicionais, levando ao recrutamento e activação de várias populações linfocitárias. O BCG presente no urotélio é fagocitado pelas APCs e os antígenos micobacterianos resultantes da digestão são, depois, reconhecidos pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Este reconhecimento vai induzir a resposta Th1, provocando a migração para o urotélio de populações citotóxicas capazes de matar as células tumorais: linfócitos T CD8<sup>+</sup>, NK, LAK, MAK e BAK.

Apesar do sucesso deste tratamento, a instilação intravesical de BCG, que apesar de atenuado, é um organismo vivo e viável, pode resultar num largo espectro de efeitos secundários (cistites, disúria, hematúria, febre baixa, sepsis etc) (Jacobs *et al.*, 2010). Embora os tratamentos intravesiculares e endoscópicos disponíveis sejam responsáveis por uma percentagem de sucesso relativamente alta, cerca de 50% a 70% dos casos de tumores vesicais não-músculo invasivos irão constituir casos de recidiva, sendo que destes, é esperado que cerca de 10 a 30 % progridam para tumores invasivos (Jacobs *et al.*, 2010). Dados os factos apresentados, torna-se crucial tanto a optimização da aplicação desta terapia, como o estudo de imunoterapias complementares alternativas à imunoterapia com BCG.

### 1.3.2. Imunoterapia com vacinas baseadas em células dendríticas

As células dendríticas (*Dendritic cells*- DCs) são células apresentadoras de antígenos especializadas na iniciação e regulação da resposta imunológica. Estas células existem potencialmente em todos os tecidos, onde capturam antígenos e migram para os órgãos linfóides secundários e activam as células T virgem (*naive T cell*). Devido a esta capacidade imunoregulatória, a vacinação com DCs estimuladas com antígenos tumorais tem sido explorada como modalidade de tratamento para cancro.

### 1.3.2.1. A biologia das células dendríticas

As DCs constituem uma população de leucócitos com uma elevada heterogeneidade estrutural e funcional, variando na sua origem celular, localização anatómica, capacidade funcional, estado de maturação, activação e resposta imunológica (Lin *et al*, 2006).

As DCs humanas podem ser divididas em duas grandes linhagens celulares: a linhagem Mielóide e a linhagem Linfóide (fig. 1.10). As DCs mielóides (mDCs) são caracterizadas pela expressão dos antígenos de diferenciação CD11c (*cluster of differentiation* -CD). Nesta população de células são, também, incluídas as células de Langerhans (Lcs) que são encontradas na epiderme e as DCs intersticiais (int-DCs) que são encontradas em todos os outros tecidos. As DCs linfóides originam as DCs plasmacitóides (pDCs) que são encontradas no sangue e tecidos linfóides e são caracterizadas pela expressão de CD123. Estas duas subpopulações de DCs são funcionalmente distintas, as pDCs são responsáveis pela produção de interferão tipo I em resposta a infecções microbianas e virais, desempenhando funções anti-tumorais através da estimulação da resposta imunológica inata e adaptativa. As mDCs expressam CD11b e, após activação, secretam IL-12, tendo um papel activo na indução da proliferação das células T CD4<sup>+</sup> e na supressão do crescimento celular neoplásico (Paczesny *et al*, 2003, Ballestrero *et al*, 2008 e Sabado e Bhardwaj, 2010).

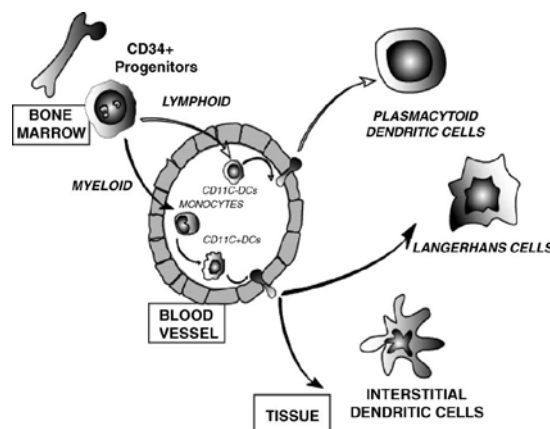


Figura 1.10- Linhagens celulares de DCs. Os progenitores das DCs (progenitores hematopoiéticos CD34<sup>+</sup>) originam os precursores mielóides e linfóides. Os monócitos, após activação, diferenciam-se em DCs CD11c<sup>+</sup> que por sua vez originam três subpopulações celulares: células de Langerhans, células intersticiais e macrófagos (Paczesny *et al*, 2003).

As DCs são as células apresentadoras de antígenos por excelência, apresentando uma capacidade única de iniciação da resposta imunológica primária. Uma característica particular destas células é a de compreenderem um processo de diferenciação, dependendo do ambiente químico em que se encontram (Fig. 1.11). Os seus precursores hematopoiéticos circulam no sangue periférico penetrando posteriormente nos tecidos periféricos, onde originam as DCs imaturas. No seu estado imaturo, as DCs são caracterizadas por apresentarem uma grande capacidade de captura e processamento de antígenos bem como uma baixa expressão de moléculas de apresentação na sua superfície celular. Nos tecidos

periféricos, as DCs imaturas encontram-se continuamente a “vigiar” o microambiente e, na presença de antígenos ou outros sinais de perigo, ocorre a produção de citocinas inflamatórias, resultando, por sua vez, no recrutamento de mais DCs para o local de inflamação. Após o reconhecimento antigénico, as DCs capturam os antígenos detectados, por fagocitose, macropinocitose ou endocitose, seguindo-se o processamento antigénico em pequenos fragmentos que vão ser expressos na superfície das DCs via MHC-II. Neste processo, as DCs imaturas diferenciam-se em DCs maduras, caracterizadas por uma capacidade endocítica reduzida e uma elevada expressão de moléculas de apresentação MHC e de co-estimulação (CD40, CD80 e CD86) e pelo aumento de expressão do receptor CCR7. Após o processo de diferenciação, as DCs maduras migram para os tecidos linfáticos, onde ocorrem os contactos com as células T e B, iniciando a resposta imunológica primária (Sabado e Bhardwaj, 2010 e Lin *et al*, 2006).

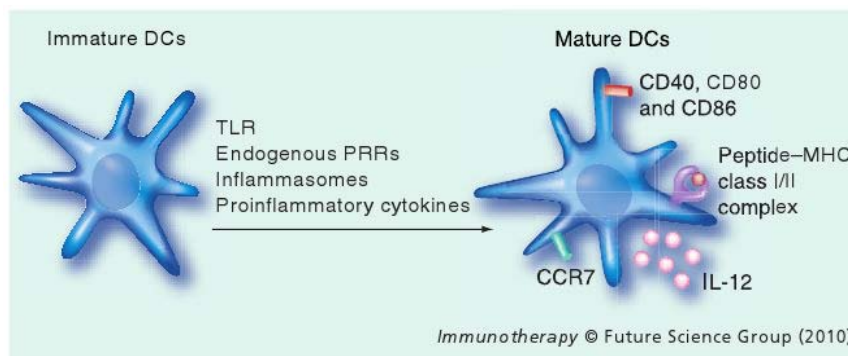


Figura 1.11- Estados funcionais das DCs: No seu estado imaturo, as DCs são altamente eficazes no processo de captura antigénica. Na presença de estímulos as DCs imaturas são estimuladas a maturarem, através da activação dos receptores de reconhecimento padrão (*Receptors recognition pattern- RRP*), nos quais se incluem os receptores Toll-like (TLRs), ou via activação de membros dos inflamosomas. Este processo de maturação envolve a estimulação da expressão de moléculas co-estimulatórias, a produção de citocinas pró-inflamatórias e o aumento de expressão do receptor CCR7 (Sabado e Bhardwaj, 2010).

### 1.3.2.2. A importância das células dendríticas na actividade anti-tumoral

O conceito de vigilância imunológica anti-tumoral foi inicialmente introduzido por Thomas e Burnett, defendendo que o sistema imunitário tem a capacidade de identificar as células tumorais como antigenicamente “estranhas” relativamente às células normais, permitindo, assim, desencadear mecanismos efectores conducentes à eliminação destas (Maia e Cardoso, 2007).

As células dendríticas constituem um dos componentes efectores do sistema imunitário envolvidos na eliminação de células tumorais. Estas células desempenham um papel fundamental na regulação da activação das células T e B, assim como das células inatas NK e NKT e, conseqüentemente, da secreção de citocinas por estes efectores. No entanto, são muitos os casos em que o sistema imunitário não desenvolve uma resposta efectiva contra as células tumorais (Apetoh *et al*, 2011). Muitos estudos já demonstraram que uma insuficiência na resposta das células dendríticas constitui um dos factores

que levam ao escape dos tumores à resposta imunitária. Esta falha na actividade das DCs é muitas vezes causada por factores segregados pelos tumores, que possuem actividade imunossupressora, afectando o processo de maturação e diferenciação das DCs. O estado de maturação das DCs constitui, por isso, um ponto-chave na iniciação da resposta imunitária anti-tumoral. No seu estado imaturo, as DCs apresentam uma baixa expressão de moléculas MHC e co-estimulatórias, não havendo, por isso, activação das células efectoras T. Não obstante, as DCs imaturas podem ainda internalizar as células tumorais apoptóticas e promover a activação dos linfócitos T reguladores (Treg) que exercem uma actividade imunossupressora, conduzindo a uma tolerância imunológica e, conseqüentemente, a uma não concretização de resposta anti-tumoral efectiva (Lin *et al.*, 2006, Melief, 2008 e Sabado e Bhardwaj, 2010). Ao contrário das DCs imaturas, as DCs no seu estado maturo desempenham um papel crítico na iniciação das respostas imunitárias anti-tumorais inata e adaptativa e, por isso, o uso de DCs como potenciais candidatas na imunoterapia para cancro tornou-se uma opção lógica (Kalinski e Okada, 2010).

### **1.3.2.3 Células dendríticas como vectores na imunoterapia contra o cancro**

Este conceito terapêutico relativamente recente foi já aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento de cancro da próstata avançado (Dawson, 2010 e Jähnisch *et al.*, 2010), prevendo-se que, futuramente, a sua aplicação aumente consideravelmente. A abordagem mais comum utilizada na expansão de DCs *ex vivo*, em imunoterapia anti-cancro, consiste na diferenciação a partir de precursores como monócitos, que são isolados do doente. Os monócitos (CD14<sup>+</sup> MHC II<sup>-</sup>) são cultivados durante vários dias na presença de interleucina 4 (IL-4) e GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) de forma a diferenciarem-se em DCs imaturas (DCs CD14<sup>-</sup> MHC II<sup>++</sup>). As DCs imaturas são, posteriormente, estimuladas tornando-se maduras, ao serem cultivadas durante 1-2 dias na presença de estímulos de maturação. O estímulo de maturação mais comum em imunoterapia consiste numa mistura de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e PGE<sub>2</sub>) que induzem o aumento de expressão das moléculas de MHC I e II, CD40, CD80 e CD86 nas DCs, consistente com o fenótipo de maturação, e a expressão do receptor CCR7, necessário para a migração das DCs para os tecidos linfáticos. Para além destas citocinas, também podem ser utilizados como estímulos de maturação antagonistas dos receptores Toll-like (TLR) ou ligandos do CD40, embora estas abordagens não sejam tão eficazes como a referida anteriormente. A estimulação das DCs com os antígenos tumorais pode ser efectuada antes ou depois do processo de maturação das DCs. Os antígenos tumorais podem ser péptidos/ proteínas tumorais ou células tumorais irradiadas do doente. Estes antígenos, após internalização e processamento, são apresentados via MHC I ou II. Outra abordagem de estimulação das DCs consiste na utilização de vectores bacterianos ou virais ou na transfecção de mRNA, contendo os genes que codificam para os antígenos tumorais. As DCs activadas são, então, administradas no doente intradermicamente, subcutaneamente ou intravenosamente migrando, posteriormente, para os nódulos linfáticos, onde vão estimular os

linfócitos T do doente e assim permitir a erradicação das células tumorais (figura 1.12). As DCs podem também ser propagadas *ex vivo* a partir de progenitores hematopoiéticos CD34<sup>+</sup> ou isoladas directamente a partir das DCs circulante no sangue, mas nenhuma das alternativas é tão utilizada como a expansão de DCs a partir de monócitos. (Adams *et al.*, 2002 e Sabado e Bhardwaj, 2010).

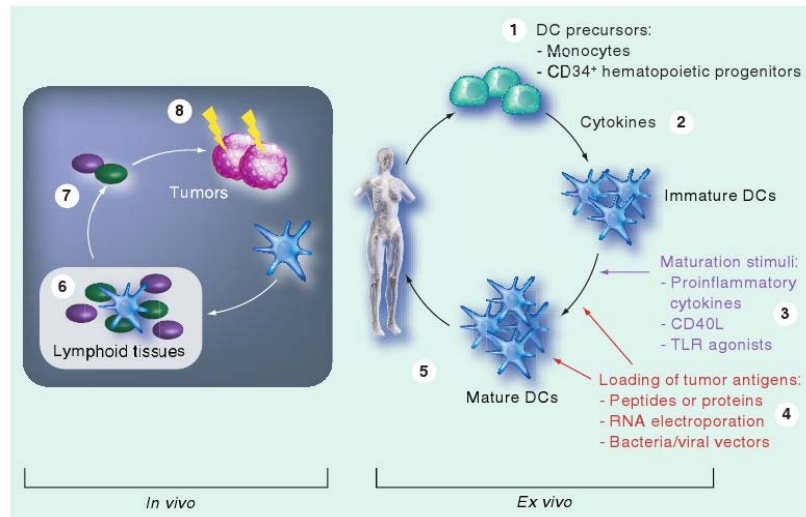


Figura 1.12- Imunoterapia com células dendríticas: Os precursores de DCs são isolados a partir do doente (1). A incubação dos precursores com citocinas (2), induz a sua diferenciação em DCs imaturas. Segue-se a indução da maturação das DCs (3) através de estímulos de maturação. A activação das DCs com antígenos tumorais do doente (4) é efectuada antes ou depois do processo de maturação. As DCs maduras e activadas são injectadas de novo no doente (5), migrando para os tecidos linfóides onde vão activar as células T (6). As células T activadas saem dos tecidos linfáticos para o local do tumor (7), onde inibem o crescimento tumoral (8) (Sabado e Bhardwaj, 2010).

Este tipo de imunoterapia para cancro já foi explorado em vários ensaios clínicos, em doentes com diferentes tipos de tumores, incluindo cancro de mama, mieloma múltiplo, cancro da próstata, carcinoma celular renal, melanoma maligno, cancro colorectal e cancro do pulmão (Paczesny *et al.*, 2003), tendo sido obtidos resultados animadores para esta abordagem, uma vez que a imunoterapia contra cancro com DCs é efectiva para alguns doentes com um mínimo de efeitos colaterais (Ballestrero *et al.*, 2008 e Gao *et al.*, 2008).

## 1.4 Introdução ao Tema da tese

Apesar dos recentes avanços terapêuticos, os tumores não músculo-invasivos de bexiga apresentam uma elevada taxa de recorrência e progressão tumoral (Jacobs *et al.*, 2010). O bacillus Calmette-Guérin (BCG) é a terapia intravesical mais utilizada. Contudo, o seu mecanismo de acção nas células tumorais uroteliais ainda não é totalmente conhecido e pouco se sabe sobre os factores individuais que influenciam a resposta a esta terapêutica. Assim, torna-se crucial, por um lado, otimizar a aplicação desta terapia, como por outro, testar terapias complementares como a imunoterapia com células dendríticas (DCs).

A alteração da glicosilação constitui uma das primeiras etapas no processo de invasão e metastização tumoral (Reis *et al.*, 2010). Em particular, a expressão das estruturas sialiladas de Thomsen-Friedenreich tem implicações biológicas profundas, influenciando as interacções célula-célula e célula-matriz extracelular, o que, consequentemente interferirá com a progressão tumoral, metastização, resposta imunitária, interacção patogénico-hospedeiro e resposta à terapia (Reis *et al.*, 2010). A expressão aberrante dos antígenos Thomsen-Friedenreich sialilados ocorre em células de cancro de bexiga, assim como a expressão aberrante das respectivas sialiltransferases que catalisam a transferência do ácido siálico para estas estruturas glicosídicas (Videira *et al.*, 2007 e Videira *et al.*, 2009). Por outro lado, um estudo preliminar do grupo sugere que os doentes que respondem à terapêutica BCG apresentam uma expressão superior de sialiltransferases comparativamente aos doentes não respondedores (Videira, P. A., dados não publicados- ver anexo I).

Esta dissertação teve como objectivo perceber se as alterações glicosídicas associadas a cancro de bexiga interferem com a eficácia das terapias BCG e baseada em DCs. Para o efeito, o perfil glicosídico de diferentes linhas celulares de cancro de bexiga foi inicialmente caracterizado, quer a nível transcricional por quantificação de mRNA das glicosiltransferases envolvidas na adição de açúcares terminais, quer fenotipicamente por identificação dos marcadores de superfície por citometria de fluxo. Após feita a caracterização das linhas celulares, procedeu-se aos ensaios de internalização e citotoxicidade celular com BCG. Utilizaram-se duas estirpes de BCG, a estirpe comercial RIVM e a Pasteur, sendo que a última foi previamente modificada de modo a expressar a proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein* - GFP). A avaliação da internalização e citotoxicidade celular induzida por BCG foi realizada por citometria de fluxo. Para além da avaliação do papel de glicanos sialilados nas células tumorais de bexiga na resposta destas à presença do BCG, pretendeu-se também estudar o tipo de resposta imunológica desencadeada pelas DCs na presença destas estruturas, mais especificamente na presença do antígeno sialil-Tn (sTn). Para isso foram utilizadas as linhas de cancro de bexiga MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> e MCR<sub>pLenti.transd</sub>. A linha MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> sobreexpressa a enzima ST6GalNAc-I e, consequentemente tem uma grande expressão de antígenos sTn, enquanto que a linha MCR<sub>pLenti.transd</sub> não expressa esta enzima, nem antígeno sTn. Neste âmbito foi estudado o efeito



da presença de DCs na proliferação das células tumorais  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e  $MCR_{pLenti.transd}$ , assim como a influência dos antígenos tumorais sTn e Tn no estado de maturação e capacidade fagocítica das DCs.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Cultura e manutenção das linhas celulares de cancro de bexiga

No decorrer desta tese, utilizaram-se as linhas celulares de cancro de bexiga MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub>, MCR<sub>pLenti.transd</sub>, HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub>, HT1376<sub>pLenti.transd</sub>, T-24 e 5637. Estas linhas são aderentes a superfícies plásticas polarizadas, multiplicando-se eficazmente em frascos de cultura simples (Nunc Brand Products), numa estufa com atmosfera humedecida a 37° C e a 5% de CO<sub>2</sub>.

As linhas celulares MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> e MCR<sub>pLenti.transd</sub> e HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub> e HT1376<sub>pLenti.transd</sub> são variantes das linhas celulares MCR e HT1376, respectivamente. Estas linhas foram, anteriormente, modificadas geneticamente, através da transdução com plasmídeos contendo ou não cDNAs das sialiltransferases humanas ST6GalNAc-I e ST3Gal-I, utilizando-se o sistema de expressão lentiviral comercial pLenti6/V5-D-TOPO. Assim, as linhas celulares MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> e HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub> expressam as enzimas ST6GalNAc-I e ST3Gal-I respectivamente, e têm uma alta expressão dos antigénios sialil-Tn (sTn) e sialil-T (sT), respectivamente (Amado, 2007). Como controlo, as linhas celulares MCR e HT1376 foram também transduzidas com o lentivirus pLenti6/V5-D-TOPO sem inserção de cDNA, originando as linhas MCR<sub>pLenti.transd</sub> e HT1376<sub>pLenti.transd</sub>, respectivamente (Amado, 2007).

As linhas celulares MCR, HT1376 e T-24 foram desenvolvidas a partir de carcinomas de células de transição (CCT) de grau III, de um homem de 51 anos (Fabbri *et al.*, 2005), de uma mulher de 58 anos (Rasheed *et al.*, 1977) e de uma mulher de 81 anos (Bubenic *et al.*, 1973), respectivamente. Já a linha celular 5637 foi estabelecida a partir de um carcinoma de bexiga, de grau II, de um homem de 68 anos (Fogh J, 1978).

As linhas celulares de cancro de bexiga foram cultivadas em meio de cultura DMEM completo, consistindo de meio DMEM simples de alta concentração de glucose (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich), 2 mM de L-glutamina (Gibco/Invitrogen) e 100 µg/mL de Penicilina/Estreptomicina. Os meios de cultura das linhas celulares de cancro de bexiga foram renovados a cada dois dias, procedendo-se à remoção das células dos respectivos frascos de cultura aquando de uma confluência celular de cerca de 75% a 80%, utilizando Tripsina-EDTA (Gibco) e passagem para novos frascos de cultura.

As linhas celulares foram também armazenadas em criotubos a -80° C e em azoto líquido, em meio de congelação que consiste em meio de cultura simples, suplementado com 20% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck).

## 2.2 Obtenção de células dendríticas (DCs) derivadas de monócitos humanos

As células dendríticas utilizadas no decorrer desta tese foram obtidas através da diferenciação de monócitos humanos, obtidos a partir de concentrados leuco-plaquetários (*buffy coats*) de doadores saudáveis, fornecidos pelo Instituto Português do Sangue.

Numa primeira fase, procedeu-se à separação das células mononucleares, que consiste numa fracção celular composta maioritariamente de monócitos e linfócitos, através de centrifugações em gradiente de densidade. Para isso, o concentrado leuco-plaquetário foi diluído em Tampão Fosfato Salino 1x (*Phosphate buffered saline*- PBS; ver anexo II) numa proporção de 2:3 e centrifugado a 2500 rpm durante 10 min, para remoção das plaquetas e eritrócitos. Após a centrifugação, o anel da interfase (concentrado leucocitário) foi removido e transferido para um novo tubo, onde foi diluído 3x em PBS 1x. O concentrado diluído foi depois adicionado lentamente sobre 6 mL da mistura Ficoll-Hypaque (Biochrom AG) e sujeito a uma centrifugação a 2500 rpm durante 20 min, num rotor oscilante e sem sistema de travagem. Esta mistura de Ficoll-Hypaque possui uma densidade superior à das células mononucleares e inferior aos glóbulos vermelhos e granulócitos, permitindo, assim, uma separação por diferença de densidades. Como resultado da centrifugação, obteve-se um anel das células mononucleares na interfase, entre o plasma na fase superior e os eritrócitos e granulócitos em Ficoll-Hypaque na fase inferior. O anel resultante foi depois transferido para um novo tubo de vidro, resuspendido em PBS 1x e sujeito a duas centrifugações sucessivas, a primeira a 1400 rpm durante 10 min e a segunda a 800 rpm durante 5 min, para remover os granulócitos restantes, plaquetas e resíduos de Ficoll-Hypaque. Nesta fase, o sedimento celular resultante foi ressuspendido em 10 mL de PBS 1x, tendo-se retirado uma pequena amostra para determinar a densidade celular no contador hematológico, seguindo-se uma centrifugação a 1200 rpm durante 10 min. De acordo com a densidade celular obtida, ressusponderam-se as células em 80 µL de tampão *Beads* frio (solução usada no protocolo de separação de células utilizando micro-esferas magnéticas; ver Anexo II) e 20 µL de micro-esferas magnéticas anti-CD14 (Miltenyi Biotec) por cada  $3 \times 10^7$  células. As micro-esferas magnéticas anti-CD14 reconhecem apenas os monócitos, uma vez que estes expressam na sua superfície o marcador CD14.

As células foram incubadas com as micro-esferas durante 15-20 min a 4° C, sendo de seguida lavadas com tampão *Beads* frio e centrifugadas a 1200 rpm durante 10 min. O sedimento celular resultante foi ressuspendido em 500 µL de tampão *Beads* frio por cada  $10 \times 10^7$  de células. O isolamento dos monócitos foi efectuado nesta fase do procedimento, em que a suspensão celular foi passada por uma coluna de selecção positiva LS (Miltenyi Biotec) montada num MidiMACS Separator (Miltenyi Biotec). O MidiMACS Separator exerce um campo magnético, promovendo a retenção na coluna dos monócitos ligados às esferas magnéticas anti-CD14. De seguida, a coluna foi lavada três vezes com 3 mL de tampão *Beads* frio sendo desprezada a fracção negativa. A fracção CD14 positiva retida na

coluna foi recuperada por eluição com 5 mL de solução tampão *Beads*, após desmontar a coluna do campo magnético. De seguida, após contagem dos monócitos obtidos, procedeu-se a nova centrifugação de 10 min a 1200 rpm. Os monócitos foram ressuspensos em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 µg/mL de Penicilina/Estreptomicina, 1% de aminoácidos não-essenciais (Gibco/Invitrogen), 1% de piruvato de sódio (Gibco/Invitrogen), 50 µM 2-mercaptoetanol (Gibco/Invitrogen) e 1000 U/mL de Interleucina-4 (IL-4) (R&D Systems) e de GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) (R&D Systems). Os monócitos ressuspensos foram distribuídos em placas de 24 poços (Greiner Bio-one) numa densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL. As culturas foram mantidas durante seis dias numa estufa a 37°C e com uma atmosfera humedecida com 5% de CO<sub>2</sub>, sendo que o meio de cultura foi renovado de dois em dois dias, retirando metade do volume de cada poço gentilmente (dado que os monócitos se depositam mas não são aderentes) e adicionando a mesma quantidade de meio de cultura fresco com IL-4 e GM-CSF nas quantidades descritas anteriormente. Ao fim dos seis dias de cultura, os monócitos originaram as células dendríticas imaturas.

## 2.3 Técnicas

### 2.3.1 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite analisar múltiplos parâmetros de partículas ou células em suspensão (de 0,5 µm a 40 µm de diâmetro), de forma individual dentro de populações heterogêneas. A análise de vários parâmetros para cada célula é conseguida pelo citómetro de fluxo com base num fluxo laminar que promove a passagem das células uma a uma, através de um feixe de luz. A passagem de células provoca, então, a dispersão dos fotões tanto na direcção longitudinal (*Forward Scatter- FSc*), como na direcção transversal (*Side Scatter- SSc*). A intensidade da luz é, depois, quantificada por um detector e convertida em voltagem, sendo a magnitude do pulso de voltagem da dispersão longitudinal proporcional ao tamanho da célula e a dispersão transversal proporcional à complexidade e granularidade relativa da célula. Outro dos parâmetros informativos fornecido pelo citómetro corresponde à Intensidade da Fluorescência Média (*Mean fluorescence intensity- MFI*). O uso de compostos fluorescentes, como anticorpos marcados com fluoróforos, constitui um dos meios mais comuns para estudar a complexidade antigénica celular e o MFI corresponde à estimativa da quantidade de anticorpo que se ligam especificamente na superfície celular (Ormerod, 2008).

Os dados resultantes são transferidos para um computador e representados graficamente.

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

### 2.3.2 Reacção de polimerização em cadeia em tempo real quantitativo (RT-PCR)

A transcrição reversa combinada com a reacção de polimerização em cadeia em tempo real (*Real time PCR*- RT-PCR) constitui uma técnica eficaz para analisar e quantificar a expressão de um determinado gene. Esta metodologia é altamente sensível e precisa, uma vez que permite que os processos de amplificação e detecção sejam realizados numa única etapa, produzindo resultados de quantificação rápidos e fiáveis (revisto em Wong e Medrano, 2005).

Esta técnica distingue-se do PCR tradicional pela utilização de fluorocromos que, quando excitados emitem um sinal proporcional à quantidade de produto de PCR formado. Neste trabalho, a tecnologia utilizada foi a TaqMan, que consiste na utilização de sondas hidrolizáveis conjugadas a um fluorocromo *quencher* e a outro *repórter*. Enquanto a sonda está intacta, o fluorocromo *quencher* absorve a fluorescência do *repórter*. No entanto, durante a reacção de amplificação, a sonda é degradada pela actividade 5'-3' exonuclease da Taq polimerase, resultando na libertação de fluorescência do fluorocromo repórter, que é detectada pelo aparelho. Assim, em cada ciclo de PCR, a emissão de fluorescência vai aumentando exponencial e proporcionalmente ao produto formado (Velden *et al.*, 2003 e Wong e Medrano, 2005).

Neste trabalho, foi utilizado o método de quantificação relativa que se baseia na comparação da expressão entre um gene alvo e um gene/grupo de genes de referência. A expressão relativa de cada gene em estudo foi analisada de acordo com o modelo desenvolvido por Livak e Schmittgen, também designado por método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak e Schmittgen, 2001). Este modelo matemático assume que as eficiências das reacções de amplificação dos genes alvo e referência (controlo endógeno) sejam aproximadamente iguais, ou seja que a eficiência da reacção de amplificação seja aproximadamente de 100%. Este método comparativo para quantificação relativa utiliza a seguinte fórmula aritmética:

$$\text{Quantidade relativa (RQ)} = 2^{-\Delta\Delta C_T},$$

sendo, simplifcadamente:

$$RQ = \frac{\text{expressão de um gene alvo na amostra em estudo}}{\text{expressão de um gene alvo na amostra calibradora}}$$

em que  $C_T$ , ciclo limiar (*threshold cycle*), corresponde ao ciclo no qual é detectado o primeiro aumento significativo da fluorescência emitido pela sonda,  $\Delta C_T$  corresponde à variação entre o valor de  $C_T$  para a amplificação de um gene na amostra em estudo e o valor de  $C_T$  para a amplificação de um controlo endógeno. Assim,  $\Delta\Delta C_T$  corresponde à variação entre o valor de  $\Delta C_T$  da amostra em estudo e o valor de  $\Delta C_T$  da amostra calibradora (Livak e Schmittgen, 2001).

Para qualquer um dos métodos de quantificação, são necessários controlos endógenos para normalizar a variação da expressão genética entre as várias amostras, uma vez que o material genético obtido a partir de diferentes indivíduos varia ao nível da quantidade e integridade de mRNA. Geralmente os genes que são expressos constitutivamente, como os genes que codificam para a  $\beta$ -actina e para a enzima desidrogenase gliceraldeído 3-fosfato (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase -GAPDH*), são utilizados para fazer esta normalização (revisto em Wong e Medrano, 2005).

## **2.4 Caracterização glicosídica das linhas celulares de cancro de bexiga**

As linhas celulares de cancro de bexiga MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub>, MCR<sub>pLenti.transd</sub>, HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub>, HT1376<sub>pLenti.transd</sub>, T-24 e 5637 foram caracterizadas quanto ao seu perfil glicosídico, pela quantificação de mRNA de glicosiltransferases e pela detecção da expressão de antigénios glicosídicos na superfície celular, por citometria de fluxo.

### **2.4.1 Análise da expressão genética por RT-PCR**

#### **2.4.1.1 Extracção de RNA e transcrição reversa para DNA complementar (cDNA)**

Após descongelamento dos sedimentos celulares das células em estudo, procedeu-se à extracção de RNA e à sua posterior conversão para DNA complementar (cDNA).

Para a extracção de RNA utilizou-se o sistema comercial GenElute<sup>TM</sup> Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma), tendo-se seguido as instruções e utilizado as soluções fornecidas pelo fabricante. As concentrações de RNA obtido foram determinadas por espectrofotometria num UV-1700 PharmaSpec (Shimadzu, Duisburg, Alemanha). Para tal, o estado de pureza das amostras foi analisado através da relação das leituras a 260 nm e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ), sendo que valores abaixo de 1,8 ou acima de 2,0 indicam contaminação com proteína. As concentrações das amostras de RNA foram determinadas recorrendo à seguinte relação: uma unidade de absorvância (Abs) a 260 nm corresponde a 44  $\mu$ g de RNA por mL.

A reacção da conversão do RNA em cDNA foi efectuada com base na estratégia de oligonucleótidos iniciadores (*primers*) aleatórios que se hibridam a diversas regiões do RNA permitindo a sua posterior transcrição por acção da transcriptase reversa. Para tal, usou-se o sistema comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Sinteticamente foi efectuada uma mistura de 50  $\mu$ L por reacção, contendo 10  $\mu$ L de oligonucleótidos iniciadores aleatórios, 4  $\mu$ L de nucleótidos livres, 5  $\mu$ L de transcriptase reversa, 10  $\mu$ L de solução tampão e 21  $\mu$ L de água ultra pura. Esta mistura foi adicionada às amostras de RNA numa proporção de 1:1.

### 2.4.1.2 PCR em tempo real (RT-PCR)

O PCR em tempo real foi realizado numa 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Cada reacção de PCR foi realizada num volume de 10 µL, tendo sido utilizada a TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Assim, para cada reacção, adicionou-se 5 µL de TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1,8 µL de cDNA e 1,2 µl de água. Seleccionou-se um conjunto de sondas TaqMan e oligonucleótidos iniciadores para os genes de interesse (Tabela 2.1.) (Applied Biosystems), pipetou-se 2 µl de cada sonda para uma microplaca de 96 poços (Fast Optical 96-Well Reaction) e, em seguida, 8 µl da mistura contendo o cDNA. Depois de selada, a placa foi centrifugada a 2000 rpm durante 5 min. As condições cíclicas térmicas aplicadas foram, respectivamente, um ciclo de 20 seg a 95° C para a activação da polimerase, seguido de 40 ciclos de 3 seg a 95° C para a desnaturação do DNA em cadeia dupla e por último um ciclo de 30 seg a 60° C para a hibridação dos oligonucleótidos iniciadores e polimerização das novas cadeias de DNA.

Tabela 2.1- Identificação do ensaio para cada um dos genes analisados

Nome do Gene	Identificação do ensaio*
FUT1	Hs00355741_m1
FUT3	Hs00356857_m1
FUT4	Hs01106466_s1
FUT6	Hs00173404_m1
FUT7	Hs00237083_m1
FUT9	Hs00276003_m1
POFUT1	Hs01566665_m1
POFUT2	Hs00209536_m1
ST3GAL1	Hs00161688_m1
ST3GAL2	Hs00199480_m1
ST3GAL3	Hs00196718_m1
ST3GAL4	Hs00272170_m1
ST3GAL5	Hs00187405_m1
ST3GAL6	Hs00196086_m1
ST6GAL1	Hs00174599_m1
ST6GALNAC1	Hs00300842_m1
ST6GALNAC2	Hs00197670_m1
ST6GALNAC3	Hs00541761_m1
ST6GALNAC4	Hs00205241_m1
ST6GALNAC5	Hs00229612_m1
ST6GALNAC6	Hs00203739_m1

\* O prefixo “Hs”, abreviatura de *Homo sapiens*, designa a espécie para a qual o ensaio foi formulado. O sufixo “m1” indica um ensaio cuja sonda e oligonucleótidos iniciadores foram desenhados sobre uma junção exão-exão, não detectando DNA genómico enquanto que o sufixo “s1” indica um ensaio cuja sonda e oligonucleótidos iniciadores foram desenhados sobre um único exão, podendo detectar DNA genómico.

De forma a excluir a ocorrência de contaminações nas reacções de amplificação foram efectuadas em paralelo reacções controlo negativo. Cada reacção de PCR em tempo real foi realizada em duplicado.

Para normalizar o valor do sinal de cada amostra, de forma a que as variações de RNA entre as amostras resultem exclusivamente de uma variação biológica real, foi utilizado como controlo endógeno o gene constitutivo da  $\beta$ -actina. A análise dos valores de expressão genética dos genes testados foi efectuada aplicando-se o método de Livak e Schmittgen ou  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e assumindo que a

eficiência da reacção de amplificação foi de aproximadamente 100%, de acordo com a validação dos ensaios realizada pelo fabricante.

#### **2.4.2 Análise fenotípica por Citometria de fluxo**

Para uma análise fenotípica das estruturas glicosídicas expressas à superfície das linhas celulares de tumor de bexiga, testadas anteriormente ao nível da expressão genética, estas células foram avaliadas por citometria de fluxo, após tratamento com enzimas específicas e/ou marcação com determinados anticorpos e/ou lectinas. As enzimas utilizadas neste procedimento foram a sialidase de *Clostridium perfringens* (Roche Diagnostics), uma exoglicosidase que cliva ácidos siálicos terminais  $\alpha 2-3$ ,  $\alpha 2-6$  e  $\alpha 2-8$  ligados *N*-glicanos ou *O*-glicanos, e a endopeptidase de *O*-sialoglicoproteínas (*O*-sialoglycoprotein endopeptidase- OSGE), que cliva péptidos com *O*-glicanos sialilados. Os anticorpos utilizados estão na forma de sobrenadantes de hibridomas (oferta do Professor Celso Reis, IPATIMUP, Porto), nomeadamente os clones de hibridoma TKH2 (anti-sTn), FH6 (anti-sLe<sup>x</sup>), HB80 (anti-sLe<sup>a</sup>) e CA3F4 (anti-Le<sup>a</sup>). As lectinas utilizadas neste procedimento foram a *Peanut agglutinin lectin* (PNA), que exhibe afinidade de ligação para o antigénio T (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr), a *Sambucus nigra* (SNA) com especificidade de ligação para ácido siálico ligado a galactose numa ligação  $\alpha 2-6$  (Neu5Ac $\alpha 2-6$ Gal(NAc)-R) e a *Maackia amurensis* (MAA) que reconhece ligações ácido siálico  $\alpha 2-3$ Gal (Neu5Ac $\alpha 2-3$ Gal-R). Estas lectinas são marcadas com fluoresceína isotiocianato (*Fluorescein isothiocyanate* –FITC; Invitrogen), de modo a exibirem fluorescência, podendo assim ser utilizadas nos protocolos de citometria.

##### **2.4.2.1 Marcação com anticorpos e lectinas das células tratadas ou não enzimaticamente**

As linhas celulares de cancro de bexiga foram ressuspensas em meio DMEM simples e tratadas com 20 mU/mL de sialidase por cada  $5 \times 10^6$  células/mL, durante 90 min a 37°C na estufa de CO<sub>2</sub> ou ressuspensas em meio DMEM com 5% de soro e tratadas com 20  $\mu$ L de enzima OSGE (4mg/mL), por cada  $5 \times 10^6$  células/mL, durante 120 min a 37°C na estufa de CO<sub>2</sub>. Após os tratamentos enzimáticos, as células foram lavadas e centrifugadas a 2000 rpm durante 5 min e os sedimentos celulares resultantes foram ressuspensos em PBS 1x, tendo-se seguido a incubação das células tratadas com os anticorpos ou lectinas.

As linhas celulares de cancro de bexiga, tratadas ou não com as enzimas, referidas anteriormente, foram ressuspensas em PBS 1x, numa densidade de  $2 \times 10^6$  células/mL. As suspensões celulares das várias linhas foram divididas e distribuídas por tubos de citometria, para se proceder à marcação com os anticorpos monoclonais e lectinas específicas. Nomeadamente, por cada 100  $\mu$ L de reacção de marcação utilizou-se 20  $\mu$ L do anticorpo anti-sTn, 7,5  $\mu$ L de anticorpo anti-sLe<sup>x</sup>, 100  $\mu$ L de anticorpo anti-sLe<sup>a</sup> e 20  $\mu$ L de anticorpo anti-Le<sup>a</sup>, de acordo com optimização prévia no laboratório. As células foram posteriormente sujeitas à marcação com 10  $\mu$ L de anticorpo secundário policlonal fluorescente anti-Ig-FITC (1:10; Dako), durante 15 min no escuro. Como controlo, procedeu-se também à



marcação das células apenas com o anticorpo secundário. Na marcação com as lectinas, utilizou-se 5  $\mu$ L de lectina PNA-FITC (1mg/mL; Eylabs), 4  $\mu$ L de lectina SNA-FITC (0,25 mg/mL; Sigma), e 2,5  $\mu$ L de lectina MAA-FITC (2 mg/mL; Eylabs). O período de incubação foi de 30 min e 15 min para os anticorpos e lectinas, respectivamente, a 4°C. Após os períodos de incubação, as diferentes células foram lavadas de modo a remover o excesso de anticorpo/lectina e, por fim, ressuspensas em cerca de 200  $\mu$ L de FACS FLOW. A expressão das estruturas glicosídicas foi analisada por citometria de fluxo, utilizando o programa de aquisição CellQuest (Becton Dickinson).

A expressão do antígeno sTn foi analisada periodicamente nas linhas celulares MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> e MCR<sub>pLenti.transd</sub>, como forma de controlo de eventuais reversões de fenótipo e/ou contaminações transversais entre linhas celulares, por citometria de fluxo, segundo o procedimento acima referido.

## **2.5 Avaliação da internalização de BCG e consequente susceptibilidade das linhas tumorais de bexiga**

Após feita a caracterização do perfil glicosídico das diferentes linhas tumorais de bexiga utilizadas nesta tese, procedeu-se à avaliação da internalização do bacillus Calmette Guérin (BCG) por estas linhas, assim como, eventuais efeitos citotóxicos directos causados pela interacção de BCG com as células tumorais.

### **2.5.1 Avaliação da internalização de BCG-RIVM pelas células MCR por citometria de fluxo**

Numa primeira fase deste trabalho, realizaram-se ensaios de internalização utilizando a estirpe de BCG comercial RIVM (Medac, Alemanha) e as linhas celulares MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> e MCR<sub>pLenti.transd</sub>, de modo a analisar o efeito do antígeno sTn na internalização de BCG pelas células tumorais. Para isso, a estirpe comercial foi marcada com FITC, permitindo a avaliação da internalização por citometria de fluxo.

#### **2.5.1.1 Obtenção de BCG em células isoladas e marcação com fluorescência**

A marcação de BCG-RIVM com fluoresceína foi baseada no protocolo descrito por Boer *et al* (De Boer *et al.*, 1996), tendo sofrido apenas algumas adaptações. Em resumo, cerca de  $1.0 \times 10^8$  de unidades formadoras de colónias (UFC) de BCG foram ressuspensas em 10 mL de meio DMEM simples num tubo de 15 mL. De seguida, a suspensão foi sujeita a uma centrifugação a 700 rpm durante 3 min, de forma a eliminar os agregados de BCG e detritos bacterianos. Desta centrifugação, são utilizados apenas os 6 mL superiores, que contêm apenas o BCG em células isoladas, uma vez que a presença de agregados de BCG pode inibir a internalização deste pelas células tumorais.

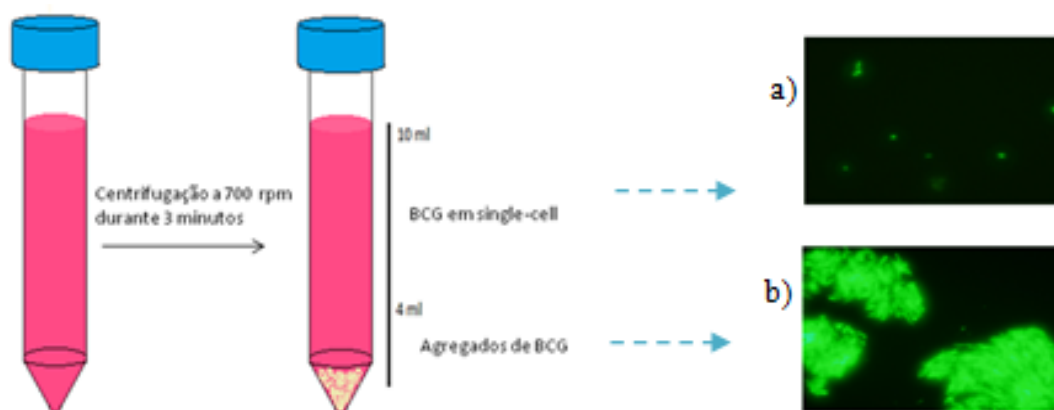


Figura 2.1- Representação da centrifugação (700 rpm, 3 min) realizada para separar o BCG-RIVM em células isoladas (a) dos agregados de BCG (b). a) e b) Suspensão celular de BCG-FITC fotografada com um microscópio de fluorescência, utilizando a objectiva 40x e um conjunto de filtros adequados para detecção de fluoresceína.

Os 6 mL resultantes da primeira centrifugação foram então divididos por microtubos de 1,5 mL e depois sujeitos a uma segunda centrifugação de 5 min a 12.500 rpm. O sobrenadante foi descartado, permitindo a remoção dos excipientes que se encontravam na preparação comercial. Nesta fase, procedeu-se à determinação da densidade bacteriana através da medição da absorvância a 420 nm, de acordo com a seguinte fórmula:  $Abs_{420nm} = 0,15$  é equivalente a  $10^8$  micobacterias/mL, como descrito por Schoning (Schoning *et al*, 1990). De acordo com a densidade obtida, o BCG-RIVM foi incubado com FITC, numa proporção de 10  $\mu$ g de FITC por  $1 \times 10^8$  BCG, durante 30-60 min no escuro em 1 mL de tampão  $Na_2CO_3$  (50mM,  $pH \approx 10.4$ ). Após o período de incubação, o BCG-RIVM foi lavado três vezes em PBS 1x com 0,05% de Tween 80 (Sigma) e centrifugado a 13.000 rpm durante 10 min, para remover o excesso de FITC.

### 2.5.1.2 Ensaios de internalização de BCG-RIVM pelas células MCR

Num primeiro passo, as células de cancro de bexiga  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e  $MCR_{pLenti.transd}$  foram cultivadas em meio de cultura DMEM completo, em poços de uma placa de 24 poços ( $0,2 \times 10^6$ /poço) e incubadas durante 24 h a  $37^\circ C$ , para estabilização das linhas celulares aos poços. Após a incubação, o meio de cultura dos poços foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x. Após as lavagens, foi adicionado meio de cultura DMEM completo sem antibióticos, já contendo BCG ressuscitado ( $2 \times 10^6$  BCG /poço), a cada um dos poços. As placas foram incubadas a  $37^\circ C$  na estufa. Após 24 h de incubação, as células foram lavadas quatro vezes com meio DMEM completo, a fim de remover BCG extracelular, seguido de duas lavagens com PBS 1x. Após as lavagens, as células foram tripsinizadas e recolhidas para tubos de 15 mL e centrifugadas a 1200 rpm durante 5 min duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e as células depositadas foram ressuscitadas em FACS FLOW e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados obtidos foram analisados através do programa Paint-a-Gate 3.0.2 PPC (Becton Dickinson).

## **2.5.2 Avaliação da interacção do BCG-Pasteur-GFP com as células tumorais de bexiga por Citometria de fluxo**

Como referido anteriormente, o procedimento de marcação do BCG-RIVM com FITC envolve a realização de uma centrifugação para remoção dos agregados de BCG. Esta centrifugação resultou sempre numa quantidade de BCG perdida (BCG em agregados) muito significativa. Tendo em consideração este factor e a limitação da disponibilidade do BCG-RIVM, o grupo optou por cultivar a estirpe BCG-Pasteur-GFP, que foi previamente modificada geneticamente de modo a expressar a proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein - GFP*) (Luo *et al.*, 1996), permitindo assim uma avaliação sem necessidade de marcação de BCG com FITC e assegurando uma suspensão livre de bactérias não viáveis e de detritos bacterianos.

### **2.5.2.1 Cultura do BCG-Pasteur-GFP**

O BCG-Pasteur-GFP (gentilmente cedido pelo Prof. Yi Luo, Harvard Medical School, Boston) foi cultivado em 25 mL de meio Middlebrook 7H9 (quiliban) suplementado com 0,22% de glicerol, 0,05% de Tween 80 (sigma), 10% de meio ADC (sigma) e 30 µg/mL de Kanamicina num erlenmeyer de 100 mL. O erlenmeyer foi incubado num agitador a 37°C e com uma rotação de 250 rpm durante aproximadamente uma semana. Durante todos os dias de cultura foi retirada uma pequena amostra de BCG-Pasteur-GFP para medir a absorvância a 600 nm da suspensão bacteriana, a fim de se fazer uma estimativa das unidades formadoras de colónias (UFC) através da seguinte fórmula:  $Ab_{600nm} = 0,125$  equivale a  $4 \times 10^6$  UFC/ mL. Quando a absorvância a 600 nm atingia aproximadamente 1 unidade de absorvância, a cultura de BCG-Pasteur-GFP era dividida, continuando a crescer com uma absorvância de partida de aproximadamente 0,1 ou armazenada em meio de cultura Middlebrook 7H9 com 20% de glicerol, em criotubos a -80° C.

Após o ciclo completo de cultura e antes da realização dos ensaios de internalização e citotoxicidade foram retiradas, do meio líquido de cultura, pequenas amostras com uma ansa de repicagem estéril para placas de gelose de sangue. As placas foram incubadas 24-48 h a 37° C e a presença de microrganismos contaminantes foi avaliada pela análise do aspecto morfológico das colónias formadas.

### **2.5.2.2 Optimização dos ensaios de internalização utilizando a estirpe BCG-Pasteur-GFP**

Nesta parte do trabalho, pretendeu-se estudar a influência do perfil glicosídico das diferentes linhas tumorais de bexiga analisadas ( $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e  $MCR_{pLenti.transd}$ ,  $HT1376_{pLenti.ST3G1}$ ,  $HT1376_{pLenti.transd}$ , T-24 e 5637) na internalização da estirpe BCG-Pasteur-GFP. Para isso, os ensaios de internalização foram realizados como descrito anteriormente na secção 2.4.1.2. No entanto, as percentagens de internalização obtidas nestes ensaios foram demasiado baixas e, por isso, no sentido de perceber se os resultados obtidos se deviam a alguma falha experimental, foram efectuados vários ensaios de

internalização, variando várias condições, nomeadamente os períodos de exposição ao BCG (2 h, 4 h, 6 h, 10 h, 16 h e 24 h), a dose de BCG (10 UFC BCG/célula; 20 UFC BCG/célula e 40 UFC BCG/célula), as densidades celulares aplicadas nos poços ( $0,1 \times 10^6$  células/poço,  $0,2 \times 10^6$  células/poço e  $0,3 \times 10^6$ ), métodos de remoção das células dos poços (tripsina e/ou solução de EDTA 15 mM em PBS 1x), presença/ ausência de agregados de BCG na co-cultura, entre outros.

### **2.5.2.3 Avaliação da susceptibilidade de células de cancro de bexiga à presença do BCG-Pasteur por Citometria de fluxo**

Para avaliar o efeito citotóxico causado pela exposição das células tumorais de bexiga ao BCG-Pasteur-GFP, utilizou-se a proteína Anexina V e o corante 7-amino-actinomicina D (7-AAD). A Anexina V é uma proteína que interage fortemente e especificamente com a fosfatidilserina (*Phosphatidylserine* - PS), um componente fosfolípido da membrana plasmática, constituindo um método efectivo na detecção da apoptose precoce. Este método baseia-se no facto de nos primeiros eventos de apoptose ocorrer uma perda de assimetria da membrana plasmática, verificando-se a translocação da PS da camada interna da membrana para a camada externa da membrana, permitindo assim a ligação da Anexina V (revisto em van Engeland *et al.*, 1998). O 7-AAD é um corante fluorescente que se liga selectivamente ao DNA, permitindo a discriminação das células mortas das células vivas, uma vez que, durante o processo apoptótico a membrana plasmática vai sendo progressivamente alterada, tornando-se permeável ao corante. Este corante permite identificar as células apoptóticas tardias e necróticas, uma vez que, no caso destas células, a membrana plasmática encontra-se danificada sendo permeável ao corante, já no caso das células apoptóticas precoce a integridade membranar permanece inalterada, sendo, por isso, impermeável ao corante (Lecoeur *et al.*, 2002). Assim, a Anexina V consegue identificar células apoptóticas desde um estado muito precoce de apoptose, enquanto o 7-AAD só identifica células num estado mais tardio de morte celular.

As células de cancro de bexiga ( $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e  $MCR_{pLenti.transd}$ , HT1376 $_{pLenti.ST3G1}$ , HT1376 $_{pLenti.transd}$ , T-24 e 5637) foram colocadas em meio de cultura DMEM completo ( $0,15 \times 10^6$  células/mL) em placas de 12 poços e incubadas durante 24 h a 37° C. Após o período de incubação, o meio de cultura dos poços foi retirado e estes foram lavados duas vezes com PBS 1x. Foi adicionado meio de cultura DMEM completo sem antibióticos e com uma proporção de BCG de 50 UFC/célula aos poços contendo as células aderidas. As placas foram incubadas a 37° C na estufa. Após 24 h de incubação, ambos os sobrenadantes e as respectivas células (retiradas por tripsinização com a solução Tripsina+EDTA 1x) foram recolhidos para tubos e centrifugados a 2000 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi desprezado e as células depositadas foram ressuspensas em 185 µL de tampão de ligação da Anexina V 1x (BD 30 Biosciences). De seguida, as células foram marcadas com 5 µL de Anexina V-APC (BD Biosciences) e 10 µL de solução 7 -AAD (Sigma-Aldrich) e incubadas durante 15 min no escuro à temperatura ambiente. Após a marcação, foram adicionados 200 µL do tampão de

ligação da Anexina V 1x em cada tubo e estes foram analisados por Citometria de Fluxo. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa Paint-a-Gate.

## **2.6 Avaliação da interacção das DCs com as células tumorais MCR: Proliferação celular das MCR, estado de maturação e capacidade fagocítica das DCs**

Numa primeira fase, as células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e  $MCR_{pLenti.transd}$  foram marcadas com o corante fluorescente éster succinimidil carboxi-fluoresceína (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*- CFSE, Invitrogen). Este corante é um derivado fluorescente do éster diacetato de succinimidil carboxi-fluoresceína (*Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*- CFDA-SE), que devido aos seus grupos de acetato é altamente permeável à membrana celular. O CFDA-SE ao atravessar a membrana celular é hidrolisado por esterases intracelulares no citoplasma, que removem os grupos acetatos, sendo convertido em CFSE. O CFSE ganha fluorescência e perde a capacidade de atravessar a membrana ficando retido no meio intracelular. Aproximadamente por um período de 24 h após a marcação, o CFSE vai perdendo intensidade independentemente da proliferação, mas após este período, a diluição do corante é proporcional à divisão celular, ou seja a intensidade da fluorescência do CFSE vai sendo reduzida para metade após cada divisão celular, podendo assim ser utilizado para estudar a proliferação celular (Parish, 1999).

Para isso, as células foram ressuspensas em meio DMEM simples numa densidade de  $1 \times 10^6$  células/mL e incubadas com  $1 \mu\text{l/mL}$  de CFSE durante 10 min a  $37^\circ \text{C}$ . Após o período de incubação, a reacção de marcação foi parada, adicionando-se DMEM simples gelado (5x o volume que estava no tubo), seguindo-se uma incubação no gelo durante 5 min. Após este período, as células foram sujeitas a duas lavagens e colocadas em meio de cultura DMEM completo ( $0,1 \times 10^6$  células/mL) numa placa de 24 poços. A placa foi deixada a  $37^\circ \text{C}$  na estufa durante 24 h, de modo a que as células aderissem ao poço e a fluorescência do CFSE estabilizasse. Após as 24 h, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados duas vezes com PBS 1x. Entretanto, as DCs obtidas através do procedimento descrito anteriormente na secção 2.2, foram removidas dos poços, lavadas com PBS 1x e centrifugadas a 1200 rpm durante 10 min. O sedimento celular obtido foi ressuspensado em meio DMEM completo e as DCs foram adicionadas aos poços, que continham as MCR, numa proporção de 5 DCs por cada MCR, num volume de 1 mL por poço, de acordo com optimização prévia realizada no laboratório. A placa foi incubada na estufa a  $37^\circ \text{C}$  por períodos de 24, 48 e 72 h. Após os períodos de incubação, as co-culturas foram recolhidas dos poços, lavadas duas vezes com PBS 1x e centrifugadas a 1200 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas com anticorpo anti-HLA-DR marcado com Alofococianina (*Allophycocyanin*- APC; Biolegend), durante 15 min no escuro. Após o período de marcação, procedeu-se à lavagem e centrifugação das células a 1200 rpm durante 10 min. As células foram ressuspensas em 37% paraformaldeído e armazenadas a  $4^\circ \text{C}$  até análise por citometria de fluxo. Os anticorpos anti-HLA-DR reagem com os antígenos leucocitários humanos

DR (*Human leukocyte antigens*- HLA), que correspondem a uma classe de moléculas MHC-II humanas. Assim, a marcação das DCs com estes anticorpos permitiu avaliar o estado de maturação das DCs através da análise da intensidade de fluorescência Média (MFI), uma vez que quanto maior for o estado de maturação das DCs, maior será a expressão de moléculas HLA-DR o que traduzirá num maior valor de MFI. Por outro lado, esta marcação permitiu também distinguir as células dendríticas das células tumorais, uma vez que as últimas não expressam moléculas MHC-II. Após aquisição, os dados obtidos foram analisados através dos programas Paint-a-Gate e CellQuest, sendo que a análise da proliferação das células tumorais MCR foi avaliada pelo software ModFit LT 3.2. Este software fornece o índice de proliferação (IP), que corresponde ao número médio de células que foi originado por uma única célula da população parental.

## **2.7 Análise estatística**

A análise estatística dos dados obtidos experimentalmente foi realizada pelo software GraphPad Prism 5 (Windows). O Teste de t-Student foi utilizado para analisar as diferenças estatísticas dos dados, considerando-se que valores de  $p < 0,05$  são estatisticamente significativos (\* significa que o valor  $p$  é inferior a 0,05; \*\* que o  $p$  é inferior a 0,01 e \*\*\* que o  $p$  é inferior a 0,0001).



### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Caracterização do perfil glicosídico das linhas celulares de cancro de bexiga

O principal objectivo deste trabalho consistiu em estudar de que forma os antigénios glicosídicos tumorais associados às células tumorais de bexiga modulam a resposta à terapêutica com bacillus Calmette Guérin (BCG) e de que forma influenciam a interacção com células imunológicas, nomeadamente com as células dendríticas (*Dendritic cells*- DCs). Para isso, as várias linhas celulares de cancro de bexiga utilizadas no decorrer desta tese, foram caracterizadas ao nível transcricional e fenotípico. A nível transcricional, analisou-se a expressão de glicosiltransferases, mais concretamente sialiltransferases e fucosiltransferases envolvidas essencialmente na adição de açúcares em posições terminais de estruturas glicosídicas, por PCR em tempo real. A nível fenotípico analisou-se a expressão das estruturas glicosídicas por citometria de fluxo.

##### 3.1.1 Análise da expressão de mRNA de glicosiltransferases em linhas celulares de cancro de bexiga humanas, por RT-PCR

Para analisar a expressão de certas fucosiltransferases e sialiltransferases, associadas à síntese dos oligossacáridos tumorais Lewis e dos antigénios sialil-Tn (sTn) e sialil-T(sT), analisaram-se os seus níveis de mRNA em diferentes linhas tumorais de bexiga. De forma a melhor comparar as várias linhas celulares consideraram-se, também, as razões de expressão relativa entre as linhas, traduzida pelo valor de RQ.

Os níveis de expressão dos genes que codificam para as fucosiltransferases FucT-I, FucT-III, FucT-IV, FucT-VI, FucT-VII, FucT-IX, PoFuT-I e PoFuT-II e sialiltransferases ST3Gal-I, ST3Gal-II, ST3Gal-III, ST3Gal-IV, ST3Gal-V, ST3Gal-VI, ST6Gal-I, ST6GalNAc-I, ST6GalNAc-II, ST6GalNAc-III, ST6GalNAc-IV, ST6GalNAc-V e ST6GalNAc-VI nas diferentes linhas tumorais de bexiga analisadas, podem ser observados na figura 3.1.

Numa primeira fase, optou-se por analisar a expressão genética das células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ ,  $MCR_{pLenti.transd}$ ,  $HT1376_{pLenti.ST3G1}$ ,  $HT1376_{pLenti.transd}$ , uma vez que a análise da expressão genética destas linhas transduzidas permitiu verificar as implicações das alterações de uma só enzima na biossíntese de outras estruturas glicosídicas.

As fucosiltransferases analisadas nas quatro linhas tumorais estudadas apresentam, de um modo geral, níveis de expressão de mRNA bastante reduzidos quando comparadas com o gene do controlo endógeno (com valores médios entre 0,001 e 31 moléculas de mRNA por cada 1000 moléculas de mRNA de  $\beta$ -actina, ou seja, entre 0,001 e 31‰). De um modo geral, a expressão de cada fucosiltransferase não difere significativamente entre as diferentes linhas celulares analisadas, excepto a fucosiltransferase FucT-III, que apresenta diferenças significativas de expressão entre as linhas



MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> e HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub> ( $0,145 \pm 0,140$  e  $4,661 \pm 0,356$ ;  $p < 0,01$ ) e entre as MCR<sub>pLenti.transd</sub> e HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub> ( $0,031 \pm 0,019$  e  $4,661 \pm 0,356$ ;  $p < 0,01$ ). Relativamente à expressão das sialiltransferases, verificou-se, de um modo geral, que as  $\alpha 2-6$  sialiltransferases (valores médios entre 2,762 e 28%) apresentam níveis de expressão médios superiores às  $\alpha 2-3$  sialiltransferases (valores médios entre 0,099 e 29%), verificando-se também que a expressão das diferentes  $\alpha 2-6$  sialiltransferases entre si, assim como entre as diferentes linhas, é mais constante comparativamente à expressão das seis  $\alpha 2-3$  sialiltransferases. As diferenças de expressão das  $\alpha 2-3$  sialiltransferases entre as diferentes linhas analisadas não são, de um modo geral, significativas; no entanto, verificou-se que a sialiltransferase ST3Gal-IV é expressa significativamente mais ( $p < 0,05$ ) nas células MCR<sub>pLenti.transd</sub> ( $1,095 \pm 0,303$ ) comparativamente às células HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub> ( $0,7524 \pm 0,252$ ). Apesar de estatisticamente não ser significativo, os níveis de expressão da ST3Gal-V nas linhas MCR comparativamente às HT1376 são bastante superiores (aproximadamente 158 vezes superior). A expressão das várias  $\alpha 2-6$  sialiltransferases estudadas não difere significativamente nas quatro linhas analisadas, no entanto é de referir que as sialiltransferases ST6GalNAc-IV e ST6GalNAc-VI são expressas, respectivamente, cerca de 3 e 5 vezes mais nas linhas MCR comparativamente às linhas HT1376 e a sialiltransferase ST6GalNAc-III é expressa 3 vezes mais nas linhas HT1376 comparativamente às linhas MCR. O gene ST6Gal-I não é expresso nas células HT1376.

Tal como esperado, a expressão dos genes das sialiltransferases ST3Gal-I e ST6GalNAc-I nas linhas HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub> ( $283,2 \pm 171,6$ ) e MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> ( $5720 \pm 2313$ ) respectivamente, é bastante elevada, uma vez que estas células foram transduzidas com cDNA codificante precisamente para aquelas enzimas.

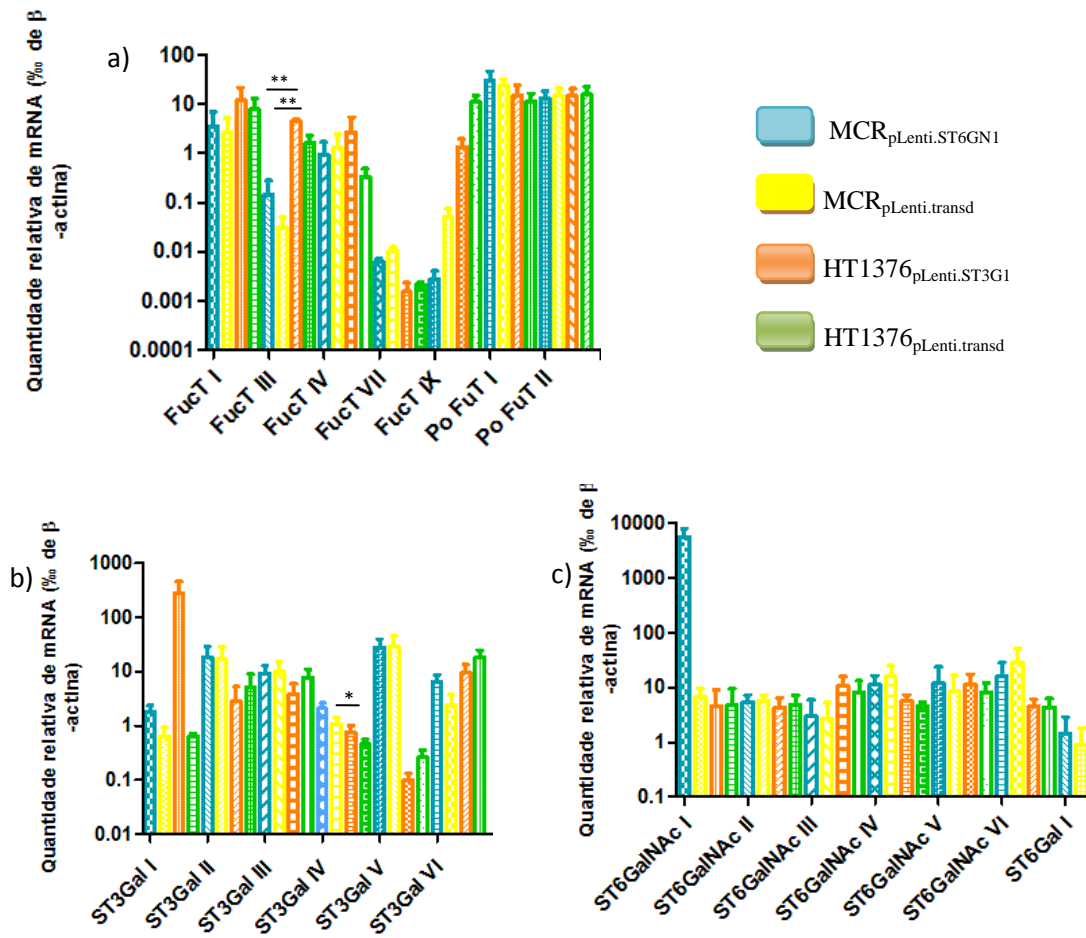


Figura 3.1- Análise dos níveis de mRNA dos genes das fucosiltransferases (a),  $\alpha$ 2-3sialiltransferases (b) e  $\alpha$ 2-6 sialiltransferases (c) nas linhas celulares  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ ,  $MCR_{pLenti.transd}$ ,  $HT1376_{pLenti.ST3G1}$  e  $HT1376_{pLenti.transd}$ , por RT-PCR (n=6). Valores estatisticamente significativos: \* significa que  $p < 0,05$ ; \*\* significa que  $p < 0,01$ .

De forma a verificar se a transdução das células MCR e HT1376 com o cDNA das sialiltransferases ST6GalNAc-I e ST3Gal-I, respectivamente, afectou a expressão genética das restantes glicosiltransferases, calculou-se a expressão relativa (RQ) das fucosiltransferases e sialiltransferases nas células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e  $HT1376_{pLenti.ST3G1}$ , utilizando como amostras calibradoras (RQ=1) as respectivas variantes celulares controlo  $MCR_{pLenti.transd}$  e  $HT1376_{pLenti.transd}$  (Fig. 3.2 e 3.3). Assim, no caso de haver um aumento ou diminuição da expressão das glicosiltransferases nas células transduzidas com o cDNA das sialiltransferases relativamente às células controlo, o valor de RQ irá ser maior ou menor do que 1, respectivamente.

De um modo geral, não foram observadas diferenças significativas na expressão genética das fucosiltransferases e das sialiltransferases entre as células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e as células  $MCR_{pLenti.transd}$  (valores de RQ aproximadamente iguais a 1), com excepção das fucosiltransferases FucT-III ( $p < 0,05$ ) e FucT-IX ( $p < 0,001$ ), sendo o respectivo valor médio de RQ para a FucT-III de  $0,261 \pm 0,101$  e para a FucT-IX de  $0,065 \pm 0,024$ .

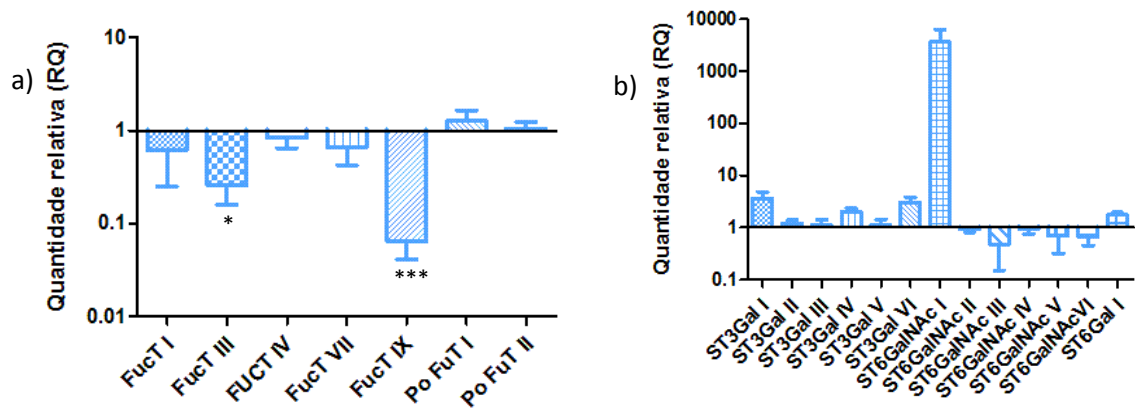


Figura 3.2- Quantidade relativa de expressão genética de fucosiltransferases (a) e sialiltransferases (b) das células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  em relação às  $MCR_{pLenti.transd}$  ( $RQ=1$ ). Valores acima ou abaixo de 1 correspondem, respectivamente, a aumento ou diminuição da expressão nas células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  ( $n=6$ ). Valores estatisticamente significativos: \* significa que  $p < 0,05$ ; \*\*\*significa que  $p < 0,0001$ .

No caso da análise da expressão genética das fucosiltransferases entre as células  $HT1376_{pLenti.ST3G1}$  e as células  $HT1376_{pLenti.transd}$ , verificaram-se diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) para as fucosiltransferases FucT-IX e PoFut-II, sendo os valores médios de RQ de respectivamente  $0,173 \pm 0,085$  e  $0,917 \pm 0,014$  para as células  $HT1376_{pLenti.ST3G1}$ . Relativamente à expressão das outras fucosiltransferases em estudo, não foram observadas diferenças significativas entre as células  $HT1376_{pLenti.ST3G1}$  e as células  $HT1376_{pLenti.transd}$ . Na análise da expressão relativa para as sialiltransferases entre estas células, verificaram-se diferenças significativas dos valores de RQ médio para as sialiltransferases ST3Gal-II ( $0,366 \pm 0,134$ ;  $p < 0.05$ ), ST3Gal-III ( $0,418 \pm 0,097$ ;  $p < 0.05$ ) e ST3Gal-V ( $0,382 \pm 0,058$ ;  $p < 0.01$ ).

Como é possível verificar pelas figuras 3.2 e 3.3, o valor de RQ das sialiltransferases ST6GalNAc-I e ST3Gal-I nas respectivas células transduzidas ( $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e  $HT1376_{pLenti.ST3G1}$ ) é muito superior a 1. Dados os elevados valores de expressão destas enzimas nas células transduzidas e a elevada variação entre estas, as diferenças estatísticas entre as linhas transduzidas e as respectivas variantes celulares controlo não são significativas, reflectindo um artefacto.

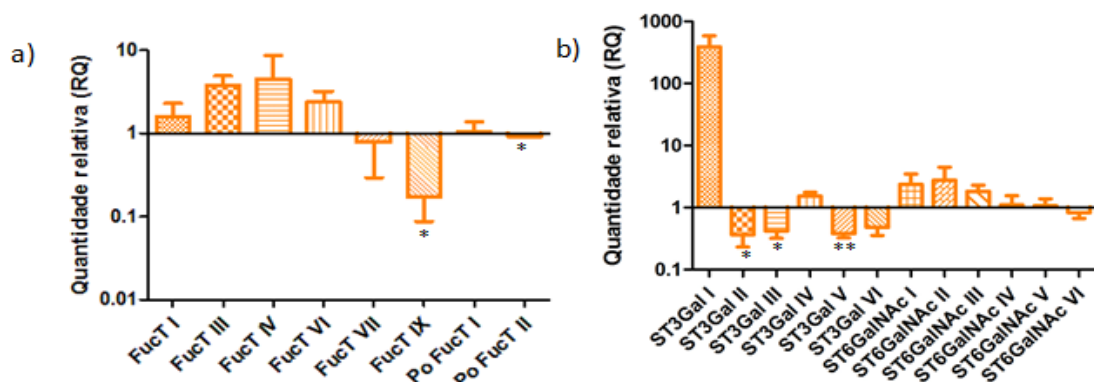


Figura 3.3- Quantidade relativa de expressão genética de fucosiltransferases (a) e sialiltransferases (b) entre células  $HT1376_{pLenti.ST3G1}$  e  $HT1376_{pLenti.transd}$ . ( $RQ=1$ ) Valores acima ou abaixo de 1 correspondem, respectivamente, a aumento ou diminuição da expressão nas células  $HT1376_{pLenti.ST3G1}$ , relativamente às células  $HT1376_{pLenti.transd}$  ( $n=6$ ). Valores estatisticamente significativos: \* significa que  $p < 0,05$ ; \*\* significa que  $p < 0,01$ .

As diferenças de expressão observadas entre as diferentes linhas celulares poderão estar relacionadas com alterações na expressão de estruturas glicosídicas superficiais nas células, como será discutido posteriormente na secção 4.1.

### 3.1.3 Análise fenotípica das linhas celulares de cancro de bexiga humanas

Após a análise da expressão genética das glicosiltransferases, procedeu-se à análise fenotípica das estruturas oligossacáridas por citometria de fluxo. Para isso, como já foi referido na secção dos Materiais e Métodos, as diferentes linhas celulares foram marcadas com diferentes lectinas e/ou anticorpos, tendo sido previamente tratadas ou não com as enzimas sialidase e endopeptidase de *O*-sialoglicoproteínas (*O*-sialoglycoprotein endopeptidase- OSGE). Os resultados obtidos nos ensaios de citometria de fluxo encontram-se sumariados na tabela seguinte (Tabela 3.1).

Tabela 3.1-Análise da marcação com lectinas e anticorpos das linhas tumorais de bexiga tratadas ou não com sialidase, por citometria de fluxo

	MCR <sub>pLenti.ST6GN1</sub>		MCR <sub>pLenti.transd</sub>		HT1376 <sub>pLenti.ST3GI</sub>		HT1376 <sub>pLenti.transd</sub>		5637		T-24	
	Intensidade	% Células positivas	Intensidade	% Células positivas	Intensidade	% Células positivas	Intensidade	% Células positivas	Intensidade	% Células positivas	Intensidade	% Células positivas
PNA	+/++	86/14	++	>95	+	>95	++	>95	+	>95	+	>95
*PNA	+/+++	75/25	+++	>95	+++	>95	++	>95	+++	>95	+++	>95
SNA	++	>95	+/++	45/19	+	22	+	60	+	>95	+	16
*SNA	+	>95	+/++	79/21	+	44	+	50	+	>95	+/++	94/6
MAA	++	>95	++	>95	+	>95	++	>95	++	>95	++	>95
*MAA	++	>95	++	>95	+	30	+	>95	++	>95	++	>95
TKH2 (sTn)	++	>95	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA
*TKH2 (sTn)	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA
SH1 (sLe <sup>x</sup> )	+	6	+	12	+	20	+/++	50/14	+/++	36/20	+	44
*SH1 (sLe <sup>x</sup> )	+	8	+	11	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA
HB80 (sLe <sup>a</sup> )	+	8	-	NA	-	NA	-	NA	+	8	-	NA
*HB80 (sLe <sup>a</sup> )	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA	+	11	-	NA
CA3F4 (Le <sup>a</sup> )	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA	+/++	28/13	-	NA
*CA3F4 (Le <sup>a</sup> )	-	NA	-	NA	-	NA	-	NA	+/++	33/32	-	NA

-, marcação negativa; +, marcação positiva fraca; ++, marcação positiva moderada; +++, marcação positiva forte; /, marcação com duas ou mais populações; NA, não aplicável; \* tratamento prévio com sialidase.

A marcação com a lectina PNA foi utilizada para avaliar a expressão do antígeno T nas diferentes linhas celulares, uma vez que esta reconhece estruturas Galβ1-3GalNAcα1-Ser/Thr. De acordo com esta marcação verificou-se que o antígeno T é expresso de forma baixa ou moderada em todas as

linhas celulares de cancro de bexiga analisadas. Para verificar se as linhas analisadas expressavam também o antigénio sialil-T (sT), as células foram tratadas previamente com sialidase, permitindo a remoção da maioria dos ácidos siálicos presentes à superfície das células. Após este tratamento, a marcação com PNA aumentou fortemente para todas as linhas celulares, confirmando a presença de antigénios sT, excepto para as células controlo HT1376<sub>pLenti.transd</sub>. A expressão de estruturas terminais NeuAc $\alpha$ 2-6Gal(NAc) e NeuAc $\alpha$ 2-3Gal foi determinada pela marcação com as lectinas SNA e MAA, respectivamente. A SNA e MAA marcam fraca ou moderadamente em todas as linhas celulares, sendo que o tratamento prévio com sialidase diminui esta marcação, com excepção para a linha celular T-24 para ambas as lectinas e 5637 para a SNA. Nenhuma das linhas tumorais de bexiga expressa o antigénio sialil-Tn (sTn), excepto a linha celular MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub>, que foi transduzida com cDNA codificante para a sialiltransferase ST6GalNAc-I. Todas as linhas celulares expressam o antigénio sialil-Le<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>) de forma fraca ou moderada. O antigénio sialil-Le<sup>a</sup> (sLe<sup>a</sup>) é expresso apenas (expressão baixa) nas linhas MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> e 5637 e a sua forma não sialilada Le<sup>a</sup> é expressa apenas na linha celular 5637. Algumas das linhas celulares foram previamente tratadas com a endopeptidase OSGE para tentar inferir se os antigénios Lewis sialilados (sLe<sup>x</sup> e sLe<sup>a</sup>) se encontravam em *O*-glicanos. Pela observação da diminuição dos valores da Intensidade Média de Fluorescência (MFI) para a marcação com o anticorpo anti-sLe<sup>x</sup> nas linhas 5637 e T-24, após tratamento com esta endopeptidase, conclui-se que algumas destas estruturas estão em *O*-glicanos (dados não apresentados, ver anexo III).

Os resultados obtidos nesta parte do trabalho sugerem a existência de uma elevada diversidade de estruturas glicosídicas entre as diferentes linhas celulares de cancro de bexiga analisadas.

### **3.2 Influência das estruturas glicosídicas na resposta das linhas celulares de cancro de bexiga ao BCG**

Após a caracterização do perfil glicosídico das diferentes linhas tumorais de bexiga, pretendeu-se estudar a influência das estruturas glicosídicas tumorais expressas por estas células nos processos de internalização e indução de citotoxicidade causada pelo bacillus Calmette Guérin (BCG).

#### **3.2.1 Internalização de BCG pelas diferentes linhas celulares de cancro de bexiga**

##### **3.2.1.1 Estirpe RIVM é mais internalizada pelas células que expressam o antigénio sTn do que pelas células que são negativas para este antigénio**

Nesta parte do trabalho realizaram-se ensaios de internalização utilizando a estirpe BCG-RIVM, uma vez ter sido demonstrado em estudos anteriores do grupo uma maior capacidade de internalização de BCG-RIVM inactivado (100° C durante 2 h) pela linha tumoral MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> relativamente às células controlo MCR<sub>pLenti.transd</sub> (dados não apresentados).

No seguimento destes resultados e uma vez que, aquando de uma instilação intravesical as micobactérias encontram-se viáveis, o passo seguinte mais lógico foi repetir os ensaios de internalização para as mesmas linhas celulares utilizando BCG viável. Assim, procedeu-se à realização de ensaios de internalização utilizando a estirpe RIVM viável e verificou-se que, após o período das 24 h de exposição, as células tumorais  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  apresentam uma maior taxa de internalização de BCG relativamente às células controlo  $MCR_{pLenti.transd}$  (fig. 3.4). Em média, a percentagem de células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  que internalizaram BCG foi de  $20,55\% \pm 3,115$  enquanto que a percentagem para as células  $MCR_{pLenti.transd}$  foi de  $5,970\% \pm 3,150$ .

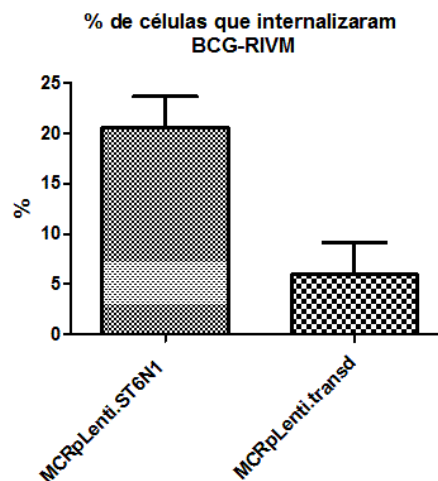


Figura 3.4- Análise por citometria de fluxo da percentagem de células tumorais  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e  $MCR_{pLenti.transd}$  que internalizaram BCG-RIVM (n=2).

É importante referir também que foram observadas diferenças na morfologia das células MCR, por visualização num microscópio óptico invertido, aquando da exposição destas células à presença do BCG-RIVM. Assim, as células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  que foram incubadas com BCG durante 24 h exibiam, na sua maioria, morfologia arredondada e encontravam-se individualizadas e desaderidas, apresentando portanto um aspecto típico apoptótico. Ao contrário das  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ , as células controlo  $MCR_{pLenti.transd}$  infectadas com BCG não apresentaram qualquer alteração da sua morfologia após as 24 h de exposição ao BCG-RIVM (dados não apresentados).

Estes resultados, em conjunto com os resultados obtidos utilizando BCG inativado, sugerem que o antigénio sTn favorece o reconhecimento, adesão e internalização de BCG-RIVM pelas células MCR que expressem este antigénio glicosídico.

### 3.2.1.2 Linhas celulares de cancro de bexiga apresentam baixa taxa de internalização da estirpe BCG-Pasteur-GFP

Após a realização dos ensaios de internalização com a estirpe RIVM, estes ensaios foram repetidos utilizando a estirpe BCG-Pasteur-GFP. No entanto, as percentagens de internalização pelas células MCR utilizando esta estirpe foram muito baixas ( $\approx 2\%$ ). Deste modo, foram realizados outros ensaios

de internalização com a estirpe BCG-Pasteur-GFP, utilizando outras linhas tumorais de bexiga, nomeadamente a linha T-24 que está descrita na literatura para ensaios de internalização de BCG (De Boer *et al.*, 1996). No entanto, as percentagens de internalização mantiveram-se muito baixas (fig.3.5). Em média, as percentagens de internalização de BCG-Pasteur-GFP foram de  $1,593\% \pm 0,132$  para as células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ , de  $1,438\% \pm 0,274$  para as  $MCR_{pLenti.transd}$ , de  $1,825\% \pm 0,195$  para as células  $HT1376_{pLenti.ST3G1}$ , de  $0,9500 \pm 0,111$  para as células  $HT1376_{pLenti.transd}$ , de  $2,274\% \pm 0,227$  para as T-24 e de  $1,190\% \pm 0,161$  para as 5637.

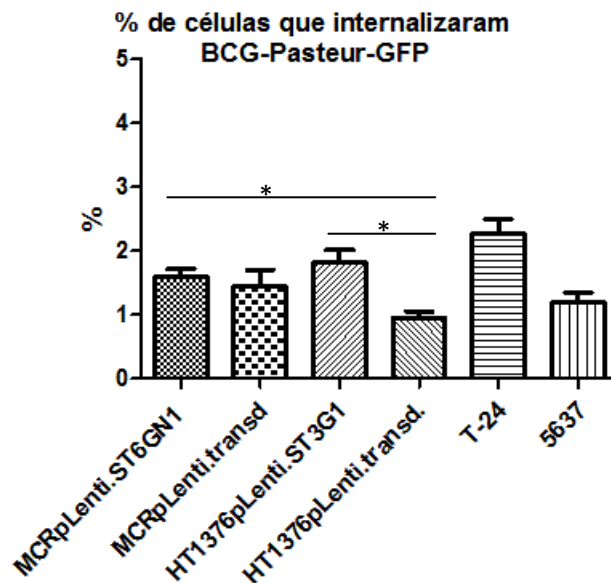


Figura 3.5- Análise por citometria de fluxo da percentagem de internalização de BCG-Pasteur-GFP pelas diferentes linhas tumorais de cancro de bexiga:  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  (n=4),  $MCR_{pLenti.transd}$  (n=4),  $HT1376_{pLenti.ST3G1}$  (n=4),  $HT1376_{pLenti.transd}$  (n=4), T-24 (n=12) e 5637 (n=4). Valores estatisticamente significativos: \* significa que  $p < 0,05$ .

Apesar das percentagens de internalização de BCG-Pasteur-GFP serem bastante baixas, verificaram-se diferenças entre as várias linhas, nomeadamente diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nas percentagens de internalização entre as linhas  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e  $HT1376_{pLenti.transd}$  e entre as linhas  $HT1376_{pLenti.ST3G1}$  e  $HT1376_{pLenti.transd}$ . Esta observação pode sugerir que, de facto, a presença de estruturas glicosídicas à superfície das células tumorais pode influenciar o processo de internalização de BCG pelas células tumorais.

Os resultados obtidos nesta parte do trabalho sugerem também que a estirpe BCG-Pasteur-GFP é pouco internalizada pelas linhas tumorais em estudo.

### 3.2.2 Estirpe BCG-Pasteur-GFP não induz citotoxicidade celular significativa nas linhas tumorais de bexiga testadas

De modo a verificar se a indução de efeitos citotóxicos pelo BCG requeria a sua internalização pelas células tumorais ou se bastava apenas o contacto directo entre a micobactéria e as linhas tumorais, foram realizados ensaios de avaliação de apoptose, incubando-se as diferentes linhas tumorais de

bexiga com BCG, numa proporção de 50 UFC de BCG/célula e por um período de 24 h. Para avaliar o estado de apoptose e necrose das linhas tumorais, fez-se uma marcação dupla com Anexina V e 7-amino-actinomicina D (7-ADD) e analisou-se em seguida por citometria de fluxo. Após o período das 24 h de incubação, a análise dos dados demonstrou que nenhuma das linhas tumorais foi susceptível à presença de BCG (fig. 3.6).

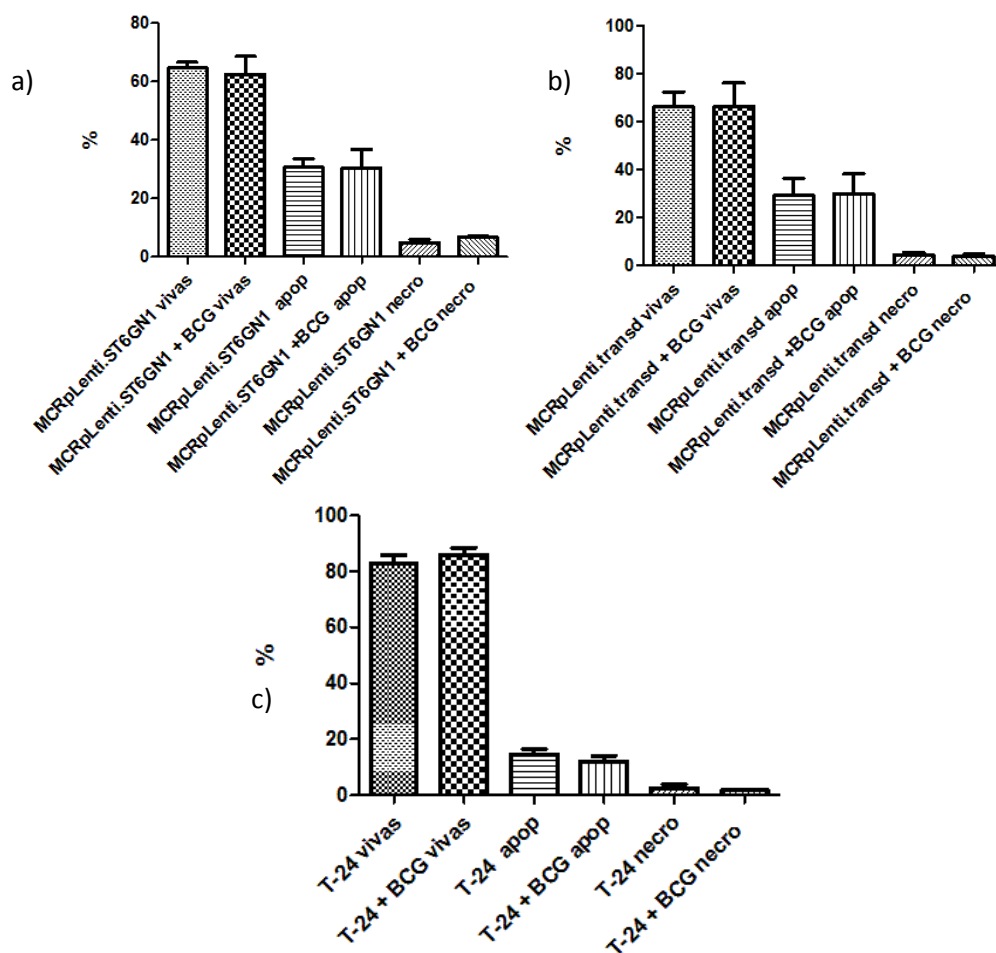


Figura 3.6- Análise por citometria de fluxo da percentagem de células vivas, apoptóticas e necróticas das linhas celulares MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> (a), MCR<sub>pLenti.transd</sub> (b) e T-24 (c), após 24 h de cultura na presença ou ausência de BCG-Pasteur-GFP (n=3). O método utilizado para avaliar o eventual efeito citotóxico do BCG nas linhas celulares foi a marcação dupla com Anexina V e 7-ADD.

Após as 24 h de incubação, as células transduzidas MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> que não estiveram expostas à presença de BCG apresentavam percentagens de células vivas de 64,64% ± 1,998, de células apoptóticas de 30,76% ± 2,898 e de células necróticas de 4,933% ± 1,128. Resultados idênticos foram obtidos para as células MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> que foram incubadas na presença de BCG, tendo sido as percentagens de células vivas de 62,55% ± 6,082, de células apoptóticas de 30,32% ± 6,550 e de células necróticas de 6,803% ± 0,4605. Para as células controlo MCR<sub>pLenti.transd</sub> não expostas ao BCG as percentagens de células vivas foram de 66,32% ± 6,391, de células apoptóticas de 29,44% ± 7,101 e de células necróticas de 4,697% ± 0,879; enquanto as células controlo incubadas na presença de BCG



apresentaram percentagens de células vivas de  $66,51\% \pm 9,767$ , de células apoptóticas de  $30,04\% \pm 8,428$ , e de células necróticas de  $3,797\% \pm 1,069$ . Ainda que o efeito de citotoxicidade seja baixo, parece haver um ligeiro aumento da susceptibilidade da linha celular  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  na presença de BCG-Pasteur-GFP.

Como ensaio controlo e para verificar se a baixa citotoxicidade estaria relacionada com a estirpe BCG utilizada, analisaram-se as células T-24. Neste caso, para as células que não foram expostas à acção do BCG-Pasteur verificaram-se percentagens de células vivas de  $82,69\% \pm 3,095$ , de células apoptóticas de  $14,71\% \pm 1,775$  e de células necróticas de  $2,615\% \pm 1,325$ , enquanto que para as células T-24 incubadas durante 24 h com BCG verificaram-se percentagens de células vivas de  $85,98\% \pm 2,400$ , de células apoptóticas de  $12,19\% \pm 1,940$  e de células necróticas de  $1,690\% \pm 0,3200$ . Estes ensaios foram repetidos para as linhas 5637,  $HT1376_{pLenti.ST3G1}$  e  $HT1376_{pLenti.transd}$ ; no entanto a percentagem de células apoptóticas, quer nos ensaios controlo quer nas células incubadas na presença de BCG, foi aproximadamente de 50%, o que impediu a validação dos ensaios. Contudo é importante referir que, nestes ensaios também se verificou que as percentagens de células vivas e apoptóticas eram idênticas tanto na presença como na ausência de BCG-Pasteur (dados não apresentados).

Estes resultados sugerem que para haver indução de apoptose é necessário que as células tumorais uroteliais internalizem BCG.

### **3.3 Análise do papel da expressão do antígeno sTn por células tumorais na resposta imunológica das células dendríticas**

Como já foi referido anteriormente, o antígeno sTn desempenha um papel crucial nas interacções celulares (revisto em Cazet *et al.*, 2010). A expressão aberrante deste antígeno glicosídico já foi descrita em vários tipos de cancro epitelial e sabe-se que a sua presença afecta o reconhecimento das células tumorais pelo sistema imunitário (Julien *et al.*, 2006). Assim, nesta parte do trabalho pretendeu-se estudar o efeito do antígeno sTn na modulação do sistema imunitário. Mais especificamente, avaliou-se o efeito do antígeno sTn na proliferação das células tumorais na presença e na ausência de células dendríticas (DCs) e ainda a influência deste antígeno na indução da maturação das DCs e na capacidade fagocítica destas. Para este estudo, utilizaram-se as linhas celulares de cancro de bexiga  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ , e  $MCR_{pLenti.transd}$ .

#### **3.3.1 Presença das células dendríticas aumenta a taxa de proliferação das células tumorais MCR, independentemente da presença do antígeno sTn**

Para avaliar o efeito da presença das DCs na proliferação das células tumorais MCR, recorreu-se à avaliação do índice de proliferação (IP) das MCR na ausência e na presença das DCs. O IP corresponde ao número médio de células que foi originado por uma única célula da população parental e é determinado pelo software ModFit LT 3.2.

Ao longo dos três períodos de co-cultura (24, 48 e 72 h) foi possível observar que há uma tendência para as células tumorais MCR em co-cultura com as DCs proliferarem mais comparativamente com as células MCR que foram cultivadas isoladamente (Figura 3.7). Apesar de esta diferença não ser, na maioria dos casos, significativa ( $p > 0,05$ ) há que ressaltar o facto de nos três ensaios realizados esta tendência se observar sempre. É de salientar também que no período de 24 h, o valor de IP das células controlo  $MCR_{pLenti.transd}$  na presença das DCs é significativamente superior ( $p < 0,05$ ) ao IP destas células cultivadas isoladamente. Para além deste facto, foi possível verificar que, ao longo dos três períodos de co-cultura, e independentemente das células estarem em co-cultura com as DCs, há também uma tendência para as células que expressam o antigénio sTn proliferarem mais do que as células que não expressam este antigénio glicosídico. Assim, no período de 24 h observou-se que o valor de IP para as células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  na presença das DCs é significativamente superior ( $p < 0,05$ ) ao valor de IP verificado para as células controlo  $MCR_{pLenti.transd}$  na presença das DCs. No período de 48 h verificou-se que os valores de IPs obtidos para as  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  cultivadas isoladamente e na presença das DCs são significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) aos valores de IPs para as  $MCR_{pLenti.transd}$  cultivadas nas mesmas condições (Fig.3.7).

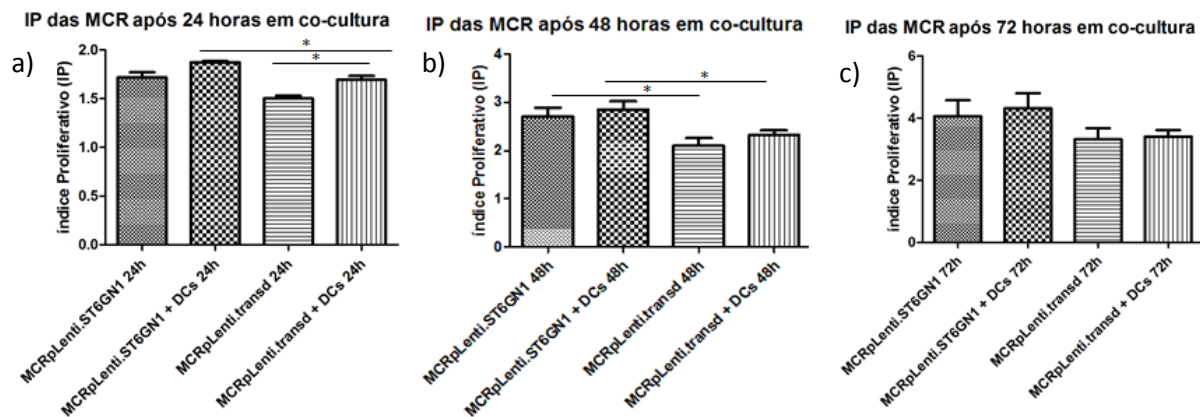


Figura 3.7- Análise do Índice de proliferação (IP) das células tumorais MCR na ausência ou presença das DCs, após um período de co-cultura de 24 (a), 48 (b) e 72 (c) h (n=3). IP corresponde a uma medida do aumento do número de células em cultura ao longo do tempo. Valores estatisticamente significativos: \* significa que  $p < 0,05$ .

No período de 24 h verificou-se que, em média, o valor de IP para as  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  na ausência das DCs foi de  $1,717 \pm 0,055$ , enquanto que o valor de IP para as  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  em co-cultura com as DCs foi de  $1,873 \pm 0,013$ . Para o mesmo período de incubação, a média dos valores de IP para as  $MCR_{pLenti.transd}$  isoladas foi de  $1,503 \pm 0,027$  e cultivadas na presença de DCs foi de  $1,697 \pm 0,037$ . No período das 48 h verificou-se que, em média, o IP das  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  na ausência das DCs foi de  $2,700 \pm 0,189$ , enquanto que o valor de IP para as  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  em co-cultura com as DCs foi de  $2,853 \pm 0,169$ . Para o mesmo período de incubação a média de valores de IP para as  $MCR_{pLenti.transd}$  foi de  $2,100 \pm 0,155$  e para estas células na presença de DCs foi de  $2,320 \pm 0,098$ . No período de co-

cultura de 72 h verificou-se que o valor de IP médio para as  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  na ausência das DCs foi de  $4,063 \pm 0,515$ , enquanto que para as  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  em co-cultura com as DCs foi de  $4,320 \pm 0,484$ . Para o mesmo período de incubação, a média de valores de IP para as  $MCR_{pLenti.transd}$  foi de  $3,323 \pm 0,356$  e para as mesmas cultivadas na presença de DCs foi de  $3,407 \pm 0,213$ .

Como já foi referido anteriormente, um dos factos possíveis de verificar foi que, na ausência das DCs as células que expressam o antígeno sTn apresentam um IP superior nos três períodos de incubação relativamente às células controlo, que não expressam este antígeno. Assim, para determinar se a influência das DCs na estimulação da proliferação das células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  era potenciada pela presença do antígeno sTn efectuou-se uma subtracção de modo a eliminar a vantagem proliferativa das células que expressam o antígeno sTn:

$$(IP\ MCR + DCs) - IP\ MCR$$

Esta subtracção foi feita para todos os tempos de incubação e para os três ensaios efectuados, tendo-se verificado que não havia diferenças significativas entre os valores obtidos para células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e as células  $MCR_{pLenti.transd}$ , sugerindo assim que o antígeno sTn não potencia a capacidade das DCs na estimulação da proliferação das MCR (Dados não apresentados).

É importante referir que a variabilidade observada entre os ensaios pode ser explicada, provavelmente, pelo facto de as DCs serem provenientes de doadores diferentes, influenciando assim as taxas de proliferação das células MCR diferentemente.

### 3.3.2. Presença do antígeno sTn influencia estado de maturação das DCs

Como já foi referido anteriormente na secção dos Materiais e Métodos, no final dos períodos de incubação, as DCs foram analisadas relativamente à expressão de HLA-DR por citometria de fluxo. Os antígenos leucocitários humanos (*Human leukocyte antigens*- HLA) são expressos constitutivamente nas células dendríticas humanas, verificando-se que a expressão destas moléculas aumenta com o estado de maturação das DCs. Assim, através da avaliação dos valores de MFI obtidos para a marcação com anti-HLA-DR nas DCs é possível analisar o estado de maturação destas células ao longo do tempo.

Uma observação que foi possível verificar no decorrer destes ensaios foi a de que o valor de MFI para a expressão de HLA-DR nas DCs, quando cultivadas sozinhas, é inferior aos valores de MFI das DCs que estiveram em co-cultura com as células tumorais MCR, verificando-se assim que o estado de maturação das DCs é induzido pelo contacto com as células tumorais MCR (dados não apresentados).

Verificou-se também que as DCs em contacto com as células controlo  $MCR_{pLenti.transd}$  tendem a apresentar um fenótipo mais maturo comparativamente com as DCs em contacto com as células transduzidas  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ , com excepção para o período de incubação de 72 h (figura 3.8). Esta

observação, que sugere um efeito retardador da maturação das DCs despoletado pelo antigénio sTn, também já tinha sido sugerida por estudos anteriores do grupo (Carrascal, 2010). Assim, as DCs que estiveram em contacto com as células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  durante o período de 24 h apresentaram em média um valor de MFI de  $189,4 \pm 39,37$ , enquanto que as DCs que permaneceram em co-cultura com as células controlo  $MCR_{pLenti.transd}$ , durante o mesmo período de tempo, apresentaram um valor médio de MFI de  $223,7 \pm 71,10$ . No período de incubação das 48 h, o valor de MFI obtido para as DCs que estiveram em co-cultura com as células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  foi de  $177,4 \pm 46,28$  e para as DCs que estiveram em co-cultura com as células controlo  $MCR_{pLenti.transd}$  foi de  $243,6 \pm 66,63$ . Já para as DCs que estiveram em co-cultura com as duas variantes MCR no período das 72 h, a diferença entre os valores de MFI foi menos acentuada (DCs em contacto com as  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ : MFI de  $374,4 \pm 112,9$ ; DCs em contacto com as  $MCR_{pLenti.transd}$ : MFI de  $355,8 \pm 99,08$ ).

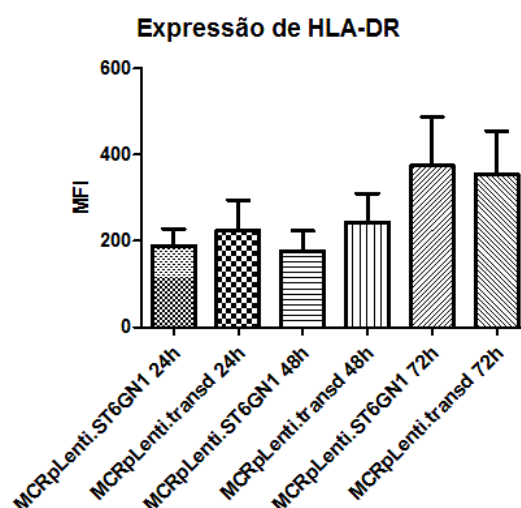


Figura 3.8- Análise dos valores de MFI obtidos, resultantes da marcação com o anticorpo anti-HLA-DR para DCs que estiveram em co-cultura com as células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e  $MCR_{pLenti.transd}$  por períodos de 24, 48 e 72 h (n=3). A análise do MFI permitiu inferir acerca do estado de maturação das DCs, uma vez que quanto maior for a expressão de HLA-DR, maior o estado de maturação das DCs.

Verificou-se ainda que existe uma tendência para as DCs que estão em co-cultura com as linhas tumorais MCR adquirirem um fenótipo cada vez mais maturo com a passagem do tempo, ou seja, as DCs que estiveram as 72 h em contacto com as células MCR apresentam maior expressão de moléculas HLA-DR relativamente às DCs que estiveram apenas 24 h em contacto com as MCR. Esta tendência, no entanto, é revertida quando comparamos o valor de MFI das DCs que estiveram em contacto com as  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  durante as 24 h ( $189,4 \pm 39,37$ ), com o valor de MFI das DCs que estiveram em contacto com estas células durante as 48 h ( $177,4 \pm 46,28$ ). Esta observação pode estar relacionada com o ciclo de reciclagem das moléculas MHC-II à superfície das células tumorais MCR.

Apesar dos resultados obtidos não serem significativos ( $p > 0,05$ ), as diferenças observadas foram contínuas no decorrer dos três ensaios realizados, sugerindo assim, que o antígeno sTn tende a retardar a maturação das DCs.

### 3.3.3 Células que expressam sTn são mais fagocitadas pelas DCs

A avaliação da percentagem de DCs que fagocitaram células tumorais MCR foi analisada através da marcação dupla com o anticorpo anti-HLA-DR e com o corante éster succinimidil carboxi-fluoresceína (CFSE). Assim, as DCs que marcam positivamente para o anti- HLA-DR e que passam também a marcar positivamente para o corante CFSE metabolizado, correspondem às DCs que fagocitaram MCR, uma vez que estas últimas foram previamente marcadas com CFSE.

Em média, a percentagem de DCs que fagocitaram  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  durante o período de incubação de 24 h foi de  $1,177\% \pm 0,2537$ , enquanto que, a percentagem de DCs que fagocitaram  $MCR_{pLenti.transd}$  no mesmo período foi de  $0,8400\% \pm 0,1217$ . Para o período de incubação de 48 h, a percentagem de DCs que adquiriu fluorescência do CFSE por internalização das células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  foi de  $2,940\% \pm 1,205$ , enquanto para as células  $MCR_{pLenti.transd}$  foi de  $1,493\% \pm 0,5485$ . Ao contrário das diferenças anteriormente referidas que não foram significativas ( $p > 0,05$ ), no período das 72 h verificou-se uma diferença significativa ( $p=0,0298$ ) entre a percentagem de DCs que fagocitaram as células transduzidas  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  ( $4,353\% \pm 1,493$ ) e a percentagem de DCs que fagocitaram as células controlo  $MCR_{pLenti.transd}$  ( $3,067\% \pm 1,279$ ).

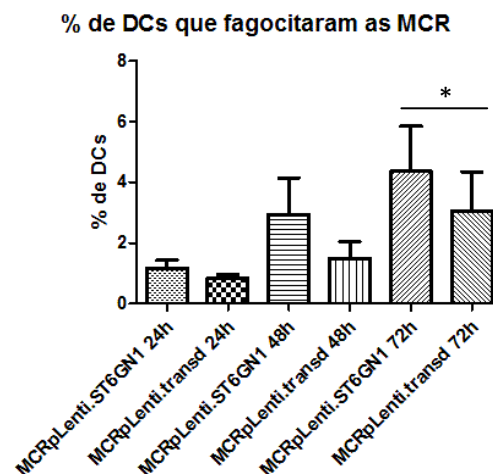


Figura 3.9- Análise por citometria de fluxo da percentagem de DCs que fagocitaram células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e  $MCR_{pLenti.transd}$  ( $n=3$ ). A avaliação da percentagem foi feita com base na marcação dupla positiva para o anti-HLA-DR, que marca só DCs, e para o CFSE, uma vez que as células MCR tinham sido previamente marcadas com este corante. Valores estatisticamente significativos: \* significa que  $p < 0,05$ .

Como é possível verificar, as percentagens de DCs que fagocitaram células MCR representam valores muito baixos. Estas percentagens correspondem, provavelmente, a DCs que fagocitaram células

tumorais MCR que entraram em processo apoptótico ou necrótico ou mesmo células que estavam em divisão celular, uma vez que, as células MCR vivas são demasiado grandes para serem fagocitadas por DCs.

A partir destes resultados, podemos afirmar que existe uma tendência para as DCs apresentarem uma capacidade fagocítica superior na presença de células tumorais que expressam o sTn comparativamente às DCs cultivadas na presença de células controlo negativas para o sTn. Uma vez mais, estes resultados são concordantes com resultados prévios do grupo (Carrascal, 2010).



## 4. Discussão

A transformação neoplásica das células humanas está associada a várias alterações genéticas e epigenéticas, que resultam na expressão de antígenos glicosídicos associados a tumores. A alteração do processo de glicosilação provoca muitas alterações na biologia tumoral, nomeadamente, na diferenciação e crescimento celular, funções imunitárias, propriedades de adesão e potencial metastático (revisto em Cazet *et al.*, 2010).

Desta forma torna-se crucial, por um lado, tentar estabelecer uma correlação entre o perfil glicosídico das células tumorais e o seu potencial metastático, e por outro lado, uma correlação entre o perfil glicosídico das células tumorais e a probabilidade de resposta à terapia utilizada.

### 4.1 Caracterização glicosídica das linhas tumorais de bexiga

Uma grande parte das alterações glicosídicas que ocorrem durante a carcinogénese resulta da alteração da expressão de fucosiltransferases e sialiltransferases, levando à formação de estruturas glicosídicas tumorais, como os antígenos Lewis e Thomsen-Friedenreich e as suas formas sialiladas (revisto em Cazet *et al.*, 2010). No entanto, a correlação entre a expressão destes antígenos fucosilados e sialilados e a expressão de mRNA das enzimas envolvidas na biossíntese destas estruturas ainda não foi completamente elucidada em cancro de bexiga. Neste sentido, várias linhas tumorais de cancro de bexiga foram analisadas, quer ao nível da expressão de mRNA para algumas enzimas envolvidas na biossíntese destas estruturas glicosídicas por RT-PCR, quer fenotipicamente por citometria de fluxo.

Relativamente às células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e às respectivas células controlo  $MCR_{pLenti.transd}$ , a diferença fenotípica mais óbvia é a expressão do antígeno sTn nas células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ , causada pela expressão aumentada da sialiltransferase ST6GalNAc-I nestas células. Nas células  $MCR_{pLenti.transd}$  a expressão de mRNA da sialiltransferase ST6GalNAc-I é muito baixa, o que se correlaciona com a ausência de expressão dos antígenos sTn nestas células. Através dos resultados obtidos nos estudos de análise fenotípica por citometria de fluxo, verificou-se também que as células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  apresentam uma expressão inferior de antígenos T e sT, comparativamente às células  $MCR_{pLenti.transd}$ . Estes resultados são fáceis de perceber, uma vez que, a indução da expressão da enzima ST6GalNAc-I nas células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  leva à formação do antígeno sTn, impedindo, por competição, a adição do resíduo de galactose ao antígeno Tn pela C1GalT-1, o que levaria à formação do antígeno T. Uma vez que há diminuição da formação de antígenos T nas células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  há conseqüentemente também uma diminuição de antígenos sT, uma vez que, não há substrato suficiente para as sialiltransferases ST3Gal-I/II/IV actuarem. Relativamente às estruturas fucosiladas, as células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e as células controlo  $MCR_{pLenti.transd}$  apresentam uma baixa expressão de antígenos sLe<sup>x</sup>, como é possível verificar pelos resultados obtidos nos ensaios de análise fenotípica e corroborado pela baixa expressão de mRNA das fucosiltransferases FucT-III-VII e das sialiltransferases ST3Gal-IV/VI, que se encontram envolvidas na biossíntese deste antígeno. O



antigénio sLe<sup>a</sup> apresenta uma expressão relativamente baixa nas células MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub>, não sendo expresso nas células MCR<sub>pLenti.transd</sub> e o antigénio Le<sup>a</sup> não é expresso em nenhuma das linhas MCR. Esta baixa ou ausência de expressão dos antigénios Lewis tipo 1 pode ser explicada pela baixa expressão de mRNA da FucT-III nestas células, uma vez que esta enzima é a única fucosiltransferase que apresenta também actividade  $\alpha$ 1-4, sendo responsável pela biossíntese destes antigénios fucosilados. A baixa expressão de mRNA da  $\alpha$ 2-3 sialiltransferase ST3Gal-III poderá também estar correlacionada com a baixa expressão do antigénio sLe<sup>a</sup>, uma vez que esta sialiltransferase é responsável pela sialilação dos antigénios Lewis tipo 1 (revisto em Moriwaki e Miyoshi, 2010).

Como foi referido, o antigénio sLe<sup>a</sup> é pouco expresso nas células MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub>, ao contrário do que se verifica para as células controlo MCR<sub>pLenti.transd</sub>, que não expressam de todo este antigénio. No entanto, a expressão relativa da FucT-III é significativamente superior nas células controlo MCR<sub>pLenti.transd</sub> comparativamente com as células transduzidas MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub>, verificando-se então, para estes antigénios glicosídios estudados por citometria, que esta variação na expressão de mRNA não apresenta expressão fenotípica. Outra observação possível de retirar da análise dos dados é a de que as células MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> apresentam uma maior expressão de estruturas que possuem o dissacarídeo terminal Neu5Ac $\alpha$ 2-6-Gal, comparativamente às células controlo MCR<sub>pLenti.transd</sub>, uma vez que, apresentam maior marcação para a lectina SNA. Esta diferença pode ser explicada pelo presumível aumento da sialilação em  $\alpha$ 2-6 e diminuição da sialilação em  $\alpha$ 2-3, causada pela expressão da ST6GalNAc-I nas células MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub>. De facto, a ST6GalNAc-I também pode catalisar a sialilação do antigénio T, competindo com a enzima ST3Gal-I e levando à formação do antigénio sialil-6T (Julien *et al.*, 2006). Esta explicação também justificaria o facto de a marcação com a lectina MAA estar diminuída nas células transduzidas MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub> comparativamente às células controlo MCR<sub>pLenti.transd</sub> (ver anexo III).

As células HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub>, como seria de esperar, apresentam uma expressão genética elevada da sialiltransferase ST3Gal-I e, conseqüentemente, do antigénio sT, contrariamente às células controlo HT1376<sub>pLenti.transd</sub> que não expressam este antigénio. Também neste caso, verifica-se a alteração da expressão do antigénio T entre as duas linhas HT1376. No caso das células HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub>, a maioria dos antigénios T são sialilados pela ST3Gal-I, enquanto que, nas células HT1376<sub>pLenti.transd</sub>, estes antigénios não são sujeitos à acção desta  $\alpha$ 2-3 sialiltransferase, mantendo-se no estado não sialilado. Para além dos antigénios T e sT, as células HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub> e HT1376<sub>pLenti.transd</sub> diferem na expressão dos antigénios sLe<sup>x</sup>, sendo que as células HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub> apresentam uma expressão baixa enquanto que as células controlo HT1376<sub>pLenti.transd</sub> apresentam uma expressão moderada destes antigénios. Os dados obtidos da análise genética das fucosiltransferases envolvidas na biossíntese deste antigénio, não coincidem com os dados obtidos fenotipicamente, uma vez que, as FucT-III/IV e VI são mais expressas nas células HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub> comparativamente às células controlo HT1376<sub>pLenti.transd</sub>, embora esta variação não seja estatisticamente significativa. No entanto, analisando o nível de expressão da FucT-VII, que também está envolvida na biossíntese do sLe<sup>x</sup>, este apresenta-se

ligeiramente aumentado nas células controlo HT1376<sub>pLenti.transd</sub>, o que poderá estar correlacionado com a diferença de expressão do sLe<sup>x</sup>, nas duas variantes da HT1376. As estruturas fucosiladas sLe<sup>a</sup> e Le<sup>a</sup> não são expressas em nenhuma das variantes das células HT1376, assim como o antigénio sTn, o que se correlaciona com a baixa expressão genética das glicosiltransferases envolvidas na biossíntese destas estruturas. A baixa marcação com a lectina SNA nas células HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub> e HT1376<sub>pLenti.transd</sub> pode estar relacionada com a ausência de expressão da sialiltransferase ST6Gal-I (enzima que transfere resíduos de ácido siálico numa ligação  $\alpha$ 2-6 para resíduos de galactose terminais de dissacarídeos tipo 2) e com a baixa expressão das restantes  $\alpha$ 2-6 sialiltransferases (revisto em Harduin-Lepers *et al.*, 2001).

Foi também possível verificar nos ensaios de análise da expressão de mRNA, que a FucT-III, enzima que também se encontra envolvida na biossíntese dos antigénios sLe<sup>x</sup>, se encontra significativamente mais expressa nas células HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub>, comparativamente com as células MCR. De facto as células HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub> apresentam uma expressão ligeiramente superior de antigénios sLe<sup>x</sup> relativamente às células MCR. Neste contexto, também é importante referir que a expressão de mRNA da fucosiltransferase FucT-IX, envolvida na biossíntese do Le<sup>x</sup>, encontra-se significativamente aumentada nas células controlo HT1376<sub>pLenti.transd</sub> e MCR<sub>pLenti.transd</sub> comparativamente às células transduzidas HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub> e MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub>, respectivamente. Embora, fenotipicamente não hajam dados que corroborem a hipótese, a partir desta observação podemos sugerir que, possivelmente, as células controlo HT1376<sub>pLenti.transd</sub> e MCR<sub>pLenti.transd</sub> apresentam uma maior expressão de antigénio Le<sup>x</sup> relativamente às células transduzidas correspondentes. É importante salientar ainda que o nível de expressão da enzima ST3Gal-V nas duas linhas celulares MCR, apesar de não ser estatisticamente significativo, se encontra aumentado relativamente às duas linhas celulares HT1376. Esta observação pode sugerir um aumento de estruturas G<sub>M3</sub> nas células MCR relativamente às HT1376, uma vez que a ST3Gal-V transfere resíduos de ácido siálico, por ligação  $\alpha$ 2-3, para unidades de lactosilceramidas, levando, por sua vez, à formação de gangliosideos G<sub>M3</sub> (revisto em Harduin-Lepers *et al.*, 2001).

Para além das fucosiltransferases e sialiltransferases envolvidas na biossíntese dos antigénios Lewis e dos antigénios sTn e sT, outras glicosiltransferases, cujo aumento de expressão está correlacionado com o desenvolvimento e progressão tumoral, foram também analisadas ao nível da expressão de mRNA, nomeadamente as *O*-fucosiltransferases de proteínas I e II (*Protein O-fucosyltransferases I e II*- Pofut-I e Pofut-II, respectivamente). As Pofut-I e Pofut-II são responsáveis pela transferência de um resíduo de fucose por *O*-ligação para resíduos dos aminoácidos serina ou treonina nas repetições EGF (*epidermal growth factor-like repeats*) do receptor Notch e nas repetições da trombospondina (*thrombospondin type 1 repeats*) das pepetidasas ADAMTS (*A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs*), respectivamente (revisto em Moriwaki e Miyoshi, 2010). A análise da expressão relativa da Pofut-II revelou que a expressão de mRNA desta fucosiltransferase é significativamente maior nas células controlo HT1376<sub>pLenti.transd</sub> comparativamente às células

HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub>, podendo sugerir uma vantagem na sobrevivência nas células controlo HT1376<sub>pLenti.transd</sub> comparativamente às células transduzidas HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub>, uma vez que a *O*-fucosilação das ADAMTS está correlacionada com progressão tumoral (revisto em Moriwaki e Miyoshi, 2010).

As células T-24 e as células 5637 apresentam uma baixa expressão dos antígenos T e uma elevada expressão dos antígenos sT. As células T-24 apresentam uma expressão baixa de antígenos sLe<sup>x</sup>, ao contrário das células 5637, que expressam moderadamente este antígeno. As células 5637 expressam também os antígenos Lewis sLe<sup>a</sup> e Le<sup>a</sup>, já as células T-24 não expressam estas estruturas glicosídicas. Nenhuma destas células expressa o antígeno sTn. Um dado informativo, resultante destes ensaios, foi a confirmação da presença de estruturas terminais sLe<sup>x</sup> em *O*-glicanos nas células 5637 e T-24, uma vez que, o tratamento prévio destas células com a endopeptidase OSGE resultou numa diminuição da marcação para o anticorpo anti-sLe<sup>x</sup>. Outro facto observado relativamente ao antígeno sLe<sup>x</sup> é o desta estrutura glicosídica, bem como o antígeno Le<sup>a</sup>, mostrar uma expressão heterogénea nas células, isto é, dentro da mesma linha celular este antígeno apresenta diferentes níveis de expressão, resultando em diferentes populações (ver anexo IV).

Os resultados obtidos para a marcação com a lectina SNA nas células T-24 e 5637, previamente tratadas com sialidase, não correspondem ao esperado, uma vez que se verifica um aumento do MFI comparativamente às células que não foram tratadas com esta glicosidase. Um aspecto a ter em conta é a promiscuidade das lectinas, estas proteínas embora possuam especificidade de ligação para determinadas estruturas glicosídicas, apresentam também afinidade para outras estruturas. No caso da SNA, esta lectina para além da especificidade de ligação para ácido siálico ligado em  $\alpha$ 2-6 a uma galactose exhibe também afinidade em menor escala para resíduos de galactose e lactose. Assim, após o tratamento com a sialidase é possível que a lectina SNA reconheça diferentes estruturas glicosídicas, que não as estruturas terminais Neu5Ac $\alpha$ 2-6-Gal. Para complementar estes resultados de caracterização glicosídica nas linhas T-24 e 5637, prevê-se a realização de um estudo de análise da expressão genética idêntico ao que foi feito para as linhas MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub>, MCR<sub>pLenti.transd</sub>, HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub> e HT1376<sub>pLenti.transd</sub>, a fim de correlacionar-se os dados fenotípicos com os dados de expressão genética.

Como principal conclusão a tirar da caracterização glicosídica das diferentes linhas celulares analisadas, foi a de que o aumento da expressão das ST6GalNAc-I e ST3Gal-I não só induz a expressão dos antígenos glicosídicos sTn e sT na superfície celular, respectivamente, como também resulta na modificação da expressão de outras estruturas glicosiladas. Assim, o aumento da expressão de certas glicosiltransferases em células que não as expressam naturalmente induz a alteração do padrão glicosídico geral ao nível da superfície celular, resultante de modificações na expressão de outras glicosiltransferases. Este fenómeno já foi observado por outros autores (Julien *et al.*, 2006).

Outra conclusão obtida foi a de que a linha celular 5637 (grau II) apresenta aparentemente uma maior complexidade glicosídica, observando-se uma maior diversidade de expressão de estruturas glicosídicas comparativamente às restantes linhas celulares testadas (grau III).

#### **4.2 Complexidade da terapêutica BCG em tratamento de cancro de bexiga: importância da estirpe de BCG e origem genética do tumor**

O cancro não-músculo invasivo de bexiga constitui a neoplasia do tracto urinário mais comum e a instilação intravesical de bacillus Calmette Guérin (BCG) é a terapia padrão para o tratamento deste tipo de neoplasia. O mecanismo de acção desta micobactéria atenuada é bastante complexo e pouco conhecido, no entanto sabe-se que envolve a indução de citotoxicidade directa das células tumorais e a iniciação de uma resposta imunológica celular e humoral (revisto em Kresowik e Griffith, 2009).

Uma das características do tecido tumoral é a alteração da expressão de certas glicosiltransferases, nomeadamente de sialiltransferases. De facto, estudos anteriores do grupo demonstraram que a expressão de certas sialiltransferases está aumentada em tecidos neoplásicos de doentes com cancro de bexiga relativamente ao urotélio normal (Videira *et al.*, 2009). A expressão anormal de estruturas glicosídicas sialiladas na superfície tumoral pode influenciar a capacidade de adesão e internalização de BCG pelas células tumorais. Estudos recentes sugerem que as micobactérias reconhecem estruturas sialiladas humanas. Ribeiro-Resende e co-autores demonstram que uma classe de glicolípidos sialilados, os gangliosídios, está envolvida na adesão e internalização da *Micobacterium leprae* por células Schwann (Ribeiro-Resende *et al.*, 2010). Por outro lado, estudos anteriores do presente grupo em biopsias de doentes com cancro de bexiga, demonstram que existe uma tendência para as sialiltransferases serem mais expressas em doentes respondedores à terapêutica BCG comparativamente aos não-respondedores (dados não apresentados- ver anexo I).

De acordo com os dados referidos, nesta parte do trabalho pretendeu-se estabelecer uma correlação entre o perfil glicosídico das linhas tumorais de bexiga estudadas com a sua capacidade de internalizar BCG e a susceptibilidade aos efeitos anti-tumorais causados por esta micobactéria. Para isso, foram utilizadas as linhas tumorais MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub>, MCR<sub>pLenti.transd</sub>, HT1367<sub>pLenti.ST3G1</sub>, HT1367<sub>pLenti.transd</sub>, T-24 e 5637. As estirpes de BCG utilizadas neste trabalho foram as RIVM e Pasteur.

##### **4.2.1 Presença do antigénio sTn influencia a capacidade de internalização de BCG-RIVM pelas células tumorais MCR**

Os resultados obtidos nesta parte do trabalho sugerem que as células tumorais que expressam o antigénio sTn apresentam uma maior capacidade para internalizar BCG-RIVM comparativamente às células que não expressam este antigénio.

Estes resultados podem ser interpretados com base nas presumíveis proteínas membranares portadoras do antígeno sTn nas células MCR. Este antígeno está, por exemplo, associado à mucina MUC1 em células de cancro de mama, pancreático e de cólon (Julien *et al.*, 2005), ao CD44 em células de cancro de cólon (Singh *et al.*, 2001) e à subunidade  $\beta 1$  da integrina  $\alpha 5\beta 1$  em células de carcinoma mamário em ratos (Clement *et al.*, 2004). Os principais portadores do antígeno sTn na linha celular  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  ainda não foram identificados, no entanto, pode-se considerar como um forte candidato a subunidade  $\beta 1$  da integrina  $\alpha 5\beta 1$ . Como já foi referido na introdução, a ligação de BCG às células uroteliais requer a participação das integrinas  $\alpha 5\beta 1$ . As integrinas  $\alpha 5\beta 1$  constituem os principais receptores da fibronectina e encontram-se envolvidas em várias vias de sinalização celular, nomeadamente de crescimento, sobrevivência e diferenciação celular. Kuroda e co-autores verificaram que a adesão e internalização de BCG pelas células tumorais é mediada pelas integrinas  $\alpha 5\beta 1$  (Kuroda *et al.*, 1993), Pook e co-autores demonstraram que linhas de cancro de bexiga com diferentes níveis de expressão de  $\alpha 5\beta 1$ , apre sentavam diferentes capacidades para internalizar BCG (Pook *et al.*, 2007), enquanto que Chen e co-autores observaram que o BCG activa vias de sinalização que envolvem os factores de transcrição AP1, NF $\kappa$ B e C/EBP, através de ligações cruzadas das integrinas  $\alpha 5\beta 1$  expressas à superfície das células tumorais uroteliais (Chen *et al.*, 2007). Clement e co-autores demonstraram que a presença do antígeno sTn nas integrinas  $\alpha 5\beta 1$  em células de carcinoma mamário de rato, transfectadas com a sialiltransferase ST6GalNAc-I, interrompe a sinalização celular mediada por estas integrinas, causando alterações fenotípicas e morfológicas nas células transfectadas (Clement *et al.*, 2004).

Com base nos factos aqui reportados, uma das hipóteses que pode explicar os resultados obtidos é a de que o aumento da expressão de ST6GalNAc-I nas células MCR resulta na expressão de antígenos sTn associados às integrinas  $\alpha 5\beta 1$ , facilitando a interacção destas células com o BCG e traduzindo-se no aumento da adesão e da capacidade de internalização de BCG pelas células tumorais  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  comparativamente com as células controlo  $MCR_{pLenti.transd}$ . No entanto, para provar esta hipótese será necessária a realização de ensaios adicionais de forma a verificar se o antígeno sTn está realmente associado à subunidade  $\beta 1$  da integrina  $\alpha 5\beta 1$  nas células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ .

Outra observação que foi possível verificar nestes ensaios, foi a de que as células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e as células  $MCR_{pLenti.transd}$  expostas ao BCG-RIVM apresentavam diferenças morfológicas entre si. Assim, as células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  apresentavam uma morfologia esférica, encontravam-se separadas umas das outras e aparentavam ter perdido por completo a adesão à base dos poços. Todas estas alterações morfológicas são características da apoptose (Taylor *et al.*, 2008). Contrariamente às células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ , as células controlo  $MCR_{pLenti.transd}$  não aparentavam ter sofrido alterações morfológicas, quando comparadas às células  $MCR_{pLenti.transd}$  que não foram expostas ao BCG-RIVM.

Apesar dos resultados obtidos serem bastante animadores e entusiásticos, o trabalho com esta estirpe comercial viável trouxe algumas complicações, uma vez que, como referido na secção 2.5.1 dos Materiais e Métodos, no procedimento da marcação de BCG-RIVM com FITC é necessária a realização de uma centrifugação para remover os agregados de BCG e obter apenas BCG em células isoladas. Na realização desta centrifugação, a quantidade de BCG perdida (BCG em agregados) foi sempre muito significativa, sendo que a quantidade de BCG em células isoladas presente numa preparação de BCG comercial serviu apenas para três ensaios. Tendo em consideração este factor, optou-se por cultivar uma outra estirpe de BCG (BCG-Pasteur), que foi modificada de modo a expressar GFP. A escolha desta estirpe de BCG deveu-se, sobretudo, aos benefícios inerentes à expressão da proteína fluorescente GFP, uma vez que esta é uniforme e consistente, permitindo uma análise quantitativa, confiável e precisa para a internalização de BCG pelas células tumorais. Paralelamente o GFP é bastante estável e o seu sinal de fluorescência é altamente resistente à fotodegradação. A expressão da fluorescência de GFP é observável mesmo após a fixação das células e as propriedades espectrais do GFP são semelhantes às do FITC, o que permite a visualização do organismo utilizando um microscópio de fluorescência (ver anexo V) e fazer uma análise quantitativa com o citómetro de fluxo (Luo *et al.*, 1996). Esta opção permitiu assim a análise da internalização de BCG sem passos de marcação com FITC e sem passos de centrifugação com perdas significativas de BCG.

#### **4.2.2 Capacidade de internalização e indução de citotoxicidade por BCG é dependente da estirpe e linha tumoral**

Os resultados obtidos com a estirpe BCG-Pasteur-GFP sugerem que esta estirpe é pouco internalizada pelas linhas celulares de cancro de bexiga estudadas, não induzindo apoptose nestas. Estes resultados podem ser interpretados tendo em consideração dois factores essenciais: as linhas de cancro de bexiga usadas e a estirpe de BCG utilizada, uma vez que, de acordo com estudos prévios, a percentagem de internalização de BCG por células de tumor de bexiga depende da linha celular e da estirpe utilizada. Das 6 linhas tumorais de bexiga testadas neste trabalho ( $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ ,  $MCR_{pLenti.transd}$ ,  $HT1367_{pLenti.ST3G1}$ ,  $HT1367_{pLenti.transd}$ , T-24 e 5637), apenas a linha T-24 tem sido amplamente utilizada, como modelo celular humano de cancro de bexiga em estudos de internalização e de citotoxicidade celular induzida por BCG. Assim, podemos tentar estabelecer um paralelismo entre os resultados obtidos para esta linha celular neste trabalho, com outros estudos efectuados em que tenha sido utilizada a linha T-24. Relativamente à linha T-24, De Boer reportou uma percentagem máxima de internalização de 67% para a estirpe de BCG Connaught (De Boer *et al.*, 1996) enquanto que, Kuroda e co-autores reportaram uma percentagem de internalização máxima de cerca de 10% para a estirpe Pasteur (Kuroda *et al.*, 1993). Estes estudos demonstram a importância da estirpe de BCG, uma vez que a percentagem de células T-24 que internaliza BCG é dependente da estirpe utilizada. Esta variabilidade pode ser explicada pela diversidade genética apresentada pelas diferentes estirpes de

BCG. Como já foi referido na introdução, durante 13 anos Calmette e Guérin efectuaram passagens seriadas da estirpe de *Mycobacterium bovis* em glicerol, monitorizando a perda de virulência. Uma vez que, a segurança tinha sido assegurada, a estirpe obtida foi disseminada por vários laboratórios mundiais. Após esta distribuição, a estirpe ancestral de BCG foi mantida através de várias passagens, originando diferentes estirpes de BCG, conhecidas como estirpes filhas, que foram perdendo progressivamente diferentes conteúdos genéticos, o que afectou o seu repertório antigénico, composição lípidica e, conseqüentemente, a sua eficácia em induzir uma resposta imunitária (Behr e Small, 1999 e Castillo-Rodal *et al.*, 2006). As estirpes filhas estão divididas em duas classificações: as estirpes primitivas e as estirpes tardias, sendo que as últimas são caracterizadas por um grande número de deleções comparativamente às primeiras. As estirpes primitivas são divididas em dois grupos, o DU2-I e o DU2-II,  $\Delta$ int, e as estirpes tardias dividem-se no grupo DU2-III,  $\Delta$ int, e no grupo DU2-IV,  $\Delta$ int (Tice, Frappier, Connaught, RIVM, Fhippps e Pasteur). Tanto a estirpe Connaught, RIVM e Pasteur pertencem ao grupo DU2-IV,  $\Delta$ int, no entanto, a estirpe Pasteur sofreu um maior número de passagens comparativamente a todas as estirpes deste grupo e possui uma duplicação (DU-1) que lhe é restrita (Brosch *et al.*, 2007). Estes factores resultam em diferenças na expressão de proteínas de superfície entre estas estirpes de BCG, o que, conseqüentemente, vai induzir diferentes repostas por parte das células tumorais.

Para além da linha utilizada, podemos também tentar estabelecer uma correlação entre os resultados obtidos nesta tese e outros estudos prévios de internalização em que foi utilizada a estirpe Pasteur. Luo e co-autores descreveram uma percentagem máxima de internalização de 16% para a linha tumoral MB49 (linha celular de cancro de bexiga murina) (Luo *et al.*, 1996), enquanto que, Becich e os co-autores mostraram que a capacidade de internalização de BCG-Pasteur era inferior nas células T-24 comparativamente às células MB49 (Becich *et al.*, 1991 e Luo *et al.*, 1996). Neste caso, estes estudos demonstraram que as diferenças nas percentagens de internalização se deviam à utilização de diferentes linhas celulares de cancro de bexiga. Estas diferenças entre as percentagens de BCG-Pasteur internalizado pelas duas linhas celulares apresentadas nestes dois estudos, podem ser atribuídas às diferentes origens de cada uma das linhas. Assim, células com diferentes origens genéticas, podem, eventualmente, possuir diferentes quantidades de receptores de ligação ao BCG, nomeadamente integrinas  $\alpha 5\beta 1$ , e, conseqüentemente, diferentes capacidades de adesão e internalização de BCG.

Segundo os estudos levados a cabo por Kuroda e Becich, era de esperar que a percentagem de células T-24 que internalizaram a estirpe BCG-Pasteur-GFP fosse por volta dos 10%, no entanto, nos nossos ensaios, a percentagem de internalização nunca passou dos 3%. Assim, no sentido de perceber se os resultados obtidos se deviam a alguma falha experimental, foram efectuados vários ensaios de internalização, variando diferentes condições experimentais. Como já foi referido na introdução, o processo de internalização de BCG pelas células tumorais é muito complexo e dependente de múltiplos factores, nomeadamente da dose de BCG (De Boer e tal., 1996), do período de exposição ao

BCG (Becich *et al.*, 1991, De Boer *et al.*, 1996 e Luo *et al.*, 1996) e do grau de diferenciação das células tumorais (De Boer *et al.*, 1996). Assim, para testar a influência de alguma destas variáveis nos nossos ensaios, foram realizados novos ensaios, variando estas condições. Especificamente, foram realizados ensaios de internalização variando os períodos de exposição ao BCG (2 h, 4 h, 6 h, 10 h, 16 h e 24 h), variando as doses de BCG (10 UFC BCG/célula; 20 UFC BCG/célula e 40 UFC BCG/célula) e também variando as concentrações celulares ( $0,1 \times 10^6$  células/poço,  $0,2 \times 10^6$  células/poço e  $0,3 \times 10^6$ ). No entanto, não se verificaram diferenças significativas nas percentagens de internalização. Após termos excluído estes factores, surgiram-nos outras condições, que poderiam estar a interferir com a internalização de BCG pelas células tumorais. Como foi referido, na secção dos Materiais e Métodos, as células antes de serem colocadas nos poços são removidas dos frascos de cultura através da acção da tripsina. Uma das hipóteses colocada foi a de que a acção da tripsina poderia estar a clivar proteínas específicas à superfície das células tumorais, o que consequentemente iria interferir no processo de reconhecimento, adesão e internalização de BCG pelas células tumorais. Para testar esta hipótese realizou-se um ensaio de internalização em que as células tumorais de bexiga foram desaderidas com uma solução de EDTA de 15 mM, mas a percentagem de internalização não variou significativamente tendo sido ainda inferior. Por último, de modo a eliminar a presença de agregados de BCG na cultura, uma vez que estes poderiam interferir no processo de internalização, realizaram-se ensaios em que o BCG foi previamente sonicado, não tendo-se, no entanto, verificado alterações na internalização.

Testadas todas estas condições experimentais e verificado que a percentagem de internalização de BCG-Pasteur-GFP se mantinha sensivelmente por volta dos 3% para a linha T-24, é fortemente sugerido, como causa para a não verificação de internalização, a estirpe de BCG utilizada nestes ensaios. Como já foi referido no início desta discussão, a percentagem de internalização de BCG-Pasteur para células T-24 descrita na literatura por alguns autores é de aproximadamente 10% (Kuroda *et al.*, 1993), no entanto, a estirpe utilizada foi a estirpe Pasteur não modificada para a expressão de GFP. Nos ensaios de internalização realizados neste estudo, a estirpe Pasteur foi previamente modificada geneticamente de modo a expressar GFP. Assim, de alguma forma, esta manipulação genética pode ter provocado alguma diminuição na expressão de proteínas de superfície de BCG, como por exemplo adesinas, importantes na adesão e internalização pelas células tumorais. Para além deste raciocínio, é importante ter em conta outro factor, o número de passagens desta estirpe. Quando uma estirpe bacteriana é cultivada várias vezes ao longo do tempo, tende a sofrer mutações, nomeadamente deleções (Tenover *et al.*, 1995), podendo, portanto, perder material genético. Por esta razão, o número máximo de passagens recomendado para as estirpes de BCG é de 12 passagens (Fine *et al.*, 1999). A estirpe BCG-Pasteur-GFP foi construída em 1996, e foi gentilmente cedida ao grupo pelo Prof. Luo em 2011 e a verdade é que é desconhecido o número de passagens da estirpe, podendo ter sofrido deleções que interfiram com a capacidade de ser internalizada pelas células tumorais T-24.



Estas duas hipóteses explicam a baixa percentagem de internalização de BCG-Pasteur-GFP pelas células tumorais T-24.

Relativamente às restantes linhas estudadas durante este projecto, não existem dados na literatura que nos possam elucidar sobre as percentagens de internalização que seriam esperadas. No entanto, tendo em conta que a capacidade de internalizar BCG está dependente também do grau do tumor, esperando-se que células de grau elevado internalizem mais do que células de grau baixo, as linhas MCR e HT1367 (grau III), tal como a linha T-24, apresentam potencialmente, maior capacidade para internalizar BCG, comparativamente com a linha 5637 (grau II).

Relativamente aos ensaios de citotoxicidade celular, os resultados obtidos demonstraram que para haver indução de apoptose, é necessário que haja internalização e não apenas exposição das células tumorais ao BCG. Apesar de haver estudos que reportaram que para haver aumento da expressão de Fas, um mediador apoptótico, basta, apenas, que haja exposição das células tumorais ao BCG, não sendo necessária a internalização deste (Luo et al., 1996), a maior parte dos estudos descritos corroboram os resultados obtidos na tese, uma vez que demonstram que, para haver indução de citotoxicidade celular é necessário que haja internalização de BCG (Pook *et al.*, 2007 e Schwarzer *et al.*, 2010). Assim, os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade poderão também ser explicados pelos factos acima referidos. Existem vários estudos que reportam diferentes efeitos citotóxicos e citostáticos causados por diferentes estirpes de BCG (Rajala *et al.*, 1992, Pook *et al.*, 2002, Schwarzer *et al.*, 2010). Rajala e co-autores analisaram cinco estirpes de BCG (Pasteur, Connaught, RIVM, TICE (DU2-IV,  $\Delta$ int) e Evans (DU2-III,  $\Delta$ int)) e verificaram que as diferentes estirpes de BCG inibiam diferentemente o crescimento tumoral (Rajala *et al.*, 1992). Schwarzer e co-autores compararam o efeito de algumas estirpes de BCG na indução da apoptose em diferentes linhas tumorais e verificaram que a estirpe primitiva S4-Jena induzia um efeito citotóxico superior nas células tumorais relativamente à estirpe tardia TICE (Schwarzer *et al.*, 2010).

Como já foi referido, o principal objectivo deste estudo era correlacionar o perfil glicosídico das diferentes linhas tumorais com as suas capacidades de internalização de BCG e, conseqüentemente, com as suas susceptibilidades ao efeito citotóxico de BCG. A observação de diferenças significativas nas percentagens de internalização do BCG-Pasteur entre as diferentes linhas celulares, leva-nos a suspeitar da presença de estruturas glicosídicas à superfície das células tumorais que podem influenciar no processo de internalização de BCG. No entanto, as taxas de internalização das diferentes linhas tumorais foram demasiado baixas, não permitindo estabelecer uma correlação de confiança. Para atingir este objectivo, será necessário realizar novos ensaios com uma estirpe que seja mais susceptível à internalização pelas linhas celulares, como, por exemplo, uma estirpe primitiva como a S4- Jena.

Em suma, os ensaios de internalização e citotoxicidade realizados, tanto para a estirpe RIVM como para a estirpe Pasteur, sugerem que a indução de morte celular das células de cancro de bexiga é paralela à capacidade destas internalizarem BCG e que nem todas as linhas tumorais internalizam ou são susceptíveis a todas as estirpes de BCG. Os resultados obtidos, em conjunto com os outros estudos referidos, são de extrema importância, uma vez que sugerem a relevância de uma eventual avaliação da susceptibilidade dos tumores de bexiga a diferentes estirpes de BCG, antes de se iniciar a terapêutica de BCG.

#### **4.3 Influência dos antígenos Thomsen-Friedenreich na modulação do sistema imunitário**

Apesar da terapêutica BCG ser o tratamento de eleição para tumores superficiais de bexiga, a sua aplicação ainda apresenta muitos aspectos a serem considerados e melhorados. Como foi possível verificar pelos resultados obtidos na secção 3.2, o mecanismo de acção do BCG é extremamente complexo e as condições de aplicação terapêutica são muito específicas. Torna-se, por isso evidente a necessidade da aposta em outras terapias complementares como uma alternativa eficaz contra este problema de saúde pública. A imunoterapia com células dendríticas (DCs) torna-se, cada vez mais, uma hipótese viável como vacinação anti-tumoral, de modo a induzir imunidade anti-tumoral e a regressão da estabilidade tumoral.

As DCs, como células apresentadoras de antígenos profissionais, expressam uma variedade de receptores que reconhecem os antígenos e que são necessários à sua internalização. Duas das classes de receptores mais importantes que se encontram envolvidas no reconhecimento e internalização de estruturas glicosídicas são os receptores Lectinas tipo C (*C-type lectins Receptors- CLR*s) e as Siglecs (*sialic acid-binding Ig-like lectins*). Os CLR's incluem as DC-SIGN (*DC-specific ICAM-3 grabbing non-integrin*), que reconhecem estruturas Lewis não sialiladas, as MR (*Mannose receptor*) que reconhecem resíduos de manose e o MGL (*macrophage Galactose-type lectin*), que reconhece os antígenos Tn (Aarnoudse *et al.*, 2006). Os receptores Siglecs são caracterizados pela sua especificidade de ligação para ácidos siálicos terminais (Aarnoudse *et al.*, 2006). Estes receptores encontram-se geralmente expressos nas DCs imaturas humanas e, em particular, altamente expressos em DCs tolerogénicas.

As alterações no processo de glicosilação que ocorrem durante a transformação maligna podem levar à formação de estruturas tumorais oligossacarídicas, que interactivam com estes receptores expressos à superfície das células dendríticas. Os antígenos Thomsen-Friedenreich Tn e sTn constituem duas das estruturas oligossacarídicas associadas a cancro mais comuns. Estes antígenos glicosídicos tumorais são expressos em mais de 80% dos carcinomas humanos, podendo ser secretados ou expressos à superfície de glicoproteínas, nomeadamente de mucinas, integrinas e CD44 (Pinho *et al.*, 2007). A expressão destes O-glicanos truncados em células tumorais provoca alterações profundas em várias

funções biológicas do sistema imunitário, nomeadamente ao nível da interacção das células dendríticas (DCs).

Assim, nesta parte do trabalho pretendeu-se estudar alguns aspectos da resposta imunológica das DCs na presença destes antígenos glicosídicos (sTn e Tn), nomeadamente na indução da maturação e fagocitose, assim como, a influência das DCs na proliferação das células tumorais que expressam estes antígenos. Para isso, foram utilizadas as linhas tumorais de cancro de bexiga MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub>, que expressa o antígeno sialilado sTn, e a linha controlo MCR<sub>pLenti.transd</sub>.

#### **4.3.1 A presença das DCs favorece a proliferação das células tumorais, de uma forma independente do antígeno glicosídico sTn**

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as células tumorais MCR tendem a proliferar mais na presença de DCs do que na sua ausência e este favorecimento do crescimento tumoral é independente da expressão do antígeno sTn.

Estudos anteriores do grupo demonstraram que a expressão da citocina IL-6 é significativamente superior em co-culturas de DCs e células MCR, comparativamente às culturas simples de células MCR ou DCs (dados não apresentados). A IL-6 é uma citocina multifuncional envolvida em diversos processos fisiológicos cuja expressão elevada já foi associada a múltiplos tumores epiteliais e a um mau prognóstico clínico. Estudos recentes têm reportado o envolvimento desta citocina na activação de várias vias de proliferação e sobrevivência celular, potenciando o crescimento neoplásico (Schafer e Brugge, 2007). Os receptores da IL-6 são constituídos por duas cadeias polipeptídicas, a cadeia gp130 e a cadeia IL-6R, sendo que a ligação da IL-6 ao IL-6R, provoca a dimerização das duas cadeias polipeptídicas receptoras e a activação das vias de sinalização celular subsequentes. No entanto, geralmente as células epiteliais normais não expressam quantidades significativas de IL-6R, sendo que a aquisição da expressão deste receptor deve ocorrer, provavelmente, durante a transformação maligna. Sabe-se que as células dendríticas na presença de células tumorais são fortes produtoras de IL-6 e também secretam uma forma solúvel do receptor IL-6R (Grivennikov e Karin, 2008). A IL-6 e o receptor solúvel IL-6R formam um complexo que, ao associar-se ao receptor gp130 nas células que são negativas para o IL-6R, inicia a cascata de sinalização da proliferação e sobrevivência celular (Mitsuyama *et al.*, 2006). Assim, dependendo do nível de expressão do receptor IL-6R nas células tumorais MCR, a secreção do receptor solúvel IL-6R e da IL-6 pelas DCs e a consequente activação das vias de proliferação e sobrevivência nas células tumorais, pode constituir uma explicação para o facto de que, na presença das DCs, as células tumorais MCR apresentem um índice proliferativo superior. Esta observação é de extrema importância, uma vez que no microambiente tumoral, as células dendríticas interactivam com as células tumorais, podendo, através da produção de factores estimulatórios, induzir a proliferação destas.

No caso em que as células tumorais MCR estavam isoladas em cultura, verificou-se que, ao longo dos três períodos de incubação, as células que expressam o antígeno sTn apresentam um índice proliferativo superior às células MCR que são negativas para este *O*-glicano truncado. Este resultado sugere que a presença do sTn favorece a divisão celular das células tumorais de cancro de bexiga, aumentando a sua tumorigenicidade. Como é sabido, o crescimento celular descontrolado é uma característica fundamental no desenvolvimento tumoral e as vias de glicosilação desempenham um papel crucial na diferenciação e crescimento celular (Gallegos *et al.*, 2010). Estudos recentes têm indicado que linhas celulares tumorais que foram transfectadas com cDNA codificante para a ST6GalNAc-I, de modo a expressar o antígeno sTn, proliferam mais do que os clones que são negativas para o sTn, quando injectadas em ratos com imunodeficiência combinada grave (Julien *et al.*, 2006 e Cazet *et al.*, 2010), corroborando os resultados obtidos neste trabalho. Mungul e co-autores também demonstraram que *O*-glicanos sialilados estimulam o crescimento de células de carcinoma mamário em ratos transgênicos MUC1 (Mungul *et al.*, 2004). Estes estudos também relatam diferenças fenotípicas entre as células sTn positivas e as células sTn negativas, que se reflectem num aumento da capacidade de migração e de adesão nas células que expressam sTn, potenciando a sua capacidade metastática (Julien *et al.*, 2006 e Cazet *et al.*, 2010).

Todas estas observações estão em conformidade com um fenótipo maligno mais agressivo e que geralmente é associado à expressão do antígeno sTn, sugerindo que as alterações fenotípicas e metabólicas, induzidas pela expressão da enzima ST6GalNAc-I, são suficientes para favorecer a tumorigenicidade das células cancerígenas. No entanto, é necessário referir também que existem estudos publicados que contrariam os resultados acima referidos, nos quais se observa uma diminuição das taxas de proliferação de células de cancro de mama transfectadas com cDNA para a ST6GalNAc-I quando comparadas com as células controlo (Clement *et al.*, 2004 e Julien *et al.*, 2005).

#### **4.3.2 Presença do antígeno sTn influencia estado de maturação das DCs**

Como referido anteriormente na introdução, o estado de maturação das DCs é crucial para que estas células possam desempenhar a sua função de iniciação da resposta imunitária anti-tumoral. Neste sentido, um dos factores que foi estudado neste trabalho foi o estado de maturação das DCs na presença de células tumorais que expressam o antígeno sTn e de células controlo que expressam a forma não sialilada, antígeno Tn. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que existe uma tendência para que a presença do antígeno sTn retarde a indução da maturação das DCs. A repressão da expressão de moléculas HLA-DR à superfície das DCs, quando estas estão em contacto com células tumorais que expressam o antígeno glicosídico sTn, pode resultar numa baixa eficiência da activação dos linfócitos T efectores, levando assim a um inadequado funcionamento da resposta imunológica efectora e, conseqüentemente, ao escape tumoral à vigilância imunológica.

Os resultados obtidos estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram que a interação das DCs com certos antígenos tumorais glicosídicos modula a maturação e diferenciação destas. Em 2004, Monti e co-autores reportaram que a glicofoma MUC1-sTn tinha a capacidade de modular o estado de maturação das DCs, mantendo-as num fenótipo tolerogénico e imunossupressor e, para além disso, a glicofoma MUC1-Tn quando em contacto com as DCs parecia não exercer o mesmo efeito imunossupressor (Monti *et al.*, 2004). Foi também descrito que uma glicofoma recombinante da mucina MUC1 associada ao antígeno sT inibe a diferenciação e maturação das DCs, resultando em células com uma função defectiva na apresentação antigénica, ao contrário da MUC1 não glicosilada que não causa a inibição da maturação das DCs (Rughetti *et al.*, 2005). Após Van Gisbergen ter demonstrado que as DCs que expressam DC-SIGN reconhecem o antígeno carcino-embriogénico (*Carcinoembryonic antigen- CEA*), através da ligação aos glicanos  $Le^x/y$  expressos pelas células tumorais colo-rectais e que é a especificidade desta ligação glicosídica que permite que sejam apenas as DCs imaturas a reconhecerem as células tumorais de cancro colo-rectal, Nonaka e co-autores demonstraram que o antígeno CEA inibe a maturação das DCs, mesmo estando estas expostas a lipopolissacárido (LPS – agente indutor do processo de maturação das DCs) (Van Gisbergen *et al.*, 2005 e Nonaka *et al.*, 2008).

Assim, os dados obtidos neste trabalho corroboram a ideia de que os antígenos glicosídicos que são aberrantemente expressos pelas células tumorais, neste caso os antígenos sTn, podem manipular a biologia das DCs ao interagirem com os receptores destas, mantendo-as num estado imaturo e tolerogénico favorecendo a sobrevivência e crescimento do tumor.

#### **4.3.3 As células que expressam sTn são mais fagocitadas pelas DCs do que as células negativas para este antígeno**

Os resultados obtidos nesta parte do trabalho sugerem que as DCs apresentam uma capacidade fagocítica superior na presença de células que expressam o antígeno sTn comparativamente às DCs na presença de células controlo  $MCR_{pLenti.transd}$ . Esta observação sugere que, de alguma forma, a presença do antígeno sTn favorece o processo de fagocitose pelas DCs.

Estes resultados estão de acordo com os factos acima reportados (4.3.2), uma vez que, como já foi referido na introdução, as DCs que se encontram num estado mais imaturo apresentam uma maior capacidade fagocítica e uma maior afinidade de ligação para os antígenos tumorais (Melief, 2008). Os receptores expressos à superfície das DCs que reconhecem estas estruturas glicosídicas desempenham, por isso, um papel muito importante, uma vez que medeiam o processo de fagocitose das células tumorais apoptóticas. Deverá ainda ser tido em conta que os receptores que reconhecem os antígenos glicosídicos presentes nas células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$  e nas células controlo  $MCR_{pLenti.transd}$ , poderão ser expressos de maneira diferente nas DCs. Assim, no caso das células  $MCR_{pLenti.ST6GN1}$ , os receptores que poderão estar a promover o contacto entre as DCs e estas células tumorais são os receptores da família

das Siglecs, uma vez que estes receptores reconhecem estruturas que contêm ácido siálico (Aarnoudse *et al.*, 2006). Nas células controlo MCR<sub>pLenti.transd</sub>, os receptores que provavelmente favorecem o reconhecimento e a ligação das DCs às células tumorais poderão ser os receptores MGL, uma vez que estes exibem grande afinidade para estruturas Tn (Aarnoudse *et al.*, 2006).

Assim, segundo este raciocínio e em conjunto com os resultados obtidos, poder-se-á colocar a hipótese de que as DCs podem expressar mais receptores da família das Siglec do que receptores MGL, favorecendo assim, um maior reconhecimento e internalização dos corpos apoptóticos resultantes da linha celular transduzida MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub>.

No entanto, novos estudos serão necessários para corroborar estas hipóteses e confirmar se, de facto, estes receptores intervêm na ligação das DCs às duas linhas celulares MCR.

#### 4.4 Perspectivas Futuras

Os ensaios realizados no decorrer desta tese permitiram tirar algumas conclusões elucidativas, para que num futuro próximo, possam ser realizados outros estudos mais complexos, de modo a comprovar as hipóteses que foram levantadas ao longo desta dissertação.

Relativamente à caracterização do perfil glicosídico das linhas celulares de cancro de bexiga é necessário que sejam realizados estudos mais aprofundados e completos. Por exemplo, relativamente à expressão genética é crucial que sejam realizados estudos complementares para avaliar a expressão genética de outras glicosiltransferases envolvidas na biossíntese dos *O*-glicanos truncados, particularmente as enzimas envolvidas na biossíntese do antigénio Tn (N-acetilgalactosaminiltransferases, ppGalNAcT) e as enzimas responsáveis pela formação dos core 1 ( $\beta$ 1-3galactosiltransferase, C1GalT-1), 2 ( $\beta$ 1-6 N-acetilglucosaminiltransferase, C2GnT) e 3 ( $\beta$ 1-3 N-acetilglucosaminiltransferase). A análise destas glicosiltransferases é especialmente importante nas células que foram transduzidas, de modo a perceber de que forma a alteração da expressão de determinadas sialiltransferases altera a expressão genética de outras glicosiltransferases. Na mesma linha de pensamento, estudos adicionais de caracterização fenotípica, para as estruturas glicosídicas acima referidas, deverão ser feitos. Tendo em conta a promiscuidade de marcação de algumas lectinas e a indisponibilidade de alguns anticorpos monoclonais, o perfil estrutural glicosídico das células de cancro de bexiga deverá ser confirmado por outras técnicas, tais como espectrometria de massa.

Relativamente aos ensaios que envolveram a internalização de BCG-RIVM pelas células tumorais MCR seria interessante comprovar se o antigénio sTn está associado à subunidade  $\beta$ 1 da  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 e se este medeia o processo de adesão do BCG às células tumorais e, conseqüentemente, o processo de internalização. Estudos comparativos de internalização e citotoxicidade celular, utilizando diferentes estirpes de BCG e diferentes linhas tumorais de bexiga, deverão ser realizados, a fim de elucidarem sobre a importância da variabilidade genética das diferentes estirpes de BCG e das células tumorais na

terapêutica BCG. Os mecanismos que estão subjacentes à indução da reacção imunitária desencadeada por BCG também constituem potenciais alvos para estudos futuros. Assim, seria interessante estudar o nível de expressão de moléculas de apresentação antigénica, de co-estimulação e de adesão, assim como a expressão de citocinas em diferentes linhas celulares com diferentes perfis glicosídicos, após internalização de BCG.

Relativamente aos ensaios em que foi testado o papel do antigénio sTn na modulação do sistema imunológico, estudos adicionais são necessários para determinar quais os receptores que mediam o reconhecimento das células tumorais MCR pelas DCs. Seria também interessante verificar se o antigénio sT induz os mesmos efeitos imuno-modeladores nas células dendríticas causadas pelo antigénio sTn. Para tal será necessário repetir os mesmos ensaios utilizando as células transduzidas HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub> e as respectivas células controlo HT1376<sub>pLenti.transd</sub>.

#### **4.5 Conclusões Gerais**

Este trabalho sugere que a alteração de uma única via de glicosilação pode alterar, de forma mais ou menos significativa, o padrão glicosídico da célula, uma vez que a sobre-expressão das sialiltransferases ST6GalNAc-I e ST3Gal-I nas linhas celulares MCR e HT1376 respectivamente, induz uma remodelação complexa do padrão de glicosilação destas células.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem também que o processo de internalização de BCG é influenciado pela presença de antigénios glicosídicos na superfície celular das células tumorais de bexiga, uma vez que a presença do antigénio sTn parece favorecer a internalização de BCG-RIVM pelas células tumorais. Estes dados sugerem que o conhecimento de certas características genéticas do doente permitirá a elaboração de protocolos terapêuticos mais eficazes, através da definição de uma abordagem terapêutica individualizada. Outro facto demonstrado por este trabalho reporta para a importância da estirpe de BCG que é utilizada na imunoterapia de cancro de bexiga. Os ensaios realizados com a estirpe Pasteur demonstram que nem todas as estirpes de BCG são internalizadas pelas células tumorais urotelais e que o processo de indução de citotoxicidade é dependente da internalização de BCG por estas. Este facto é de extrema relevância, uma vez que a estirpe Pasteur, tal como a estirpe RIVM, é também uma estirpe comercial, implicando que diferentes estirpes comerciais possam ter diferentes efeitos na terapêutica de prevenção à progressão tumoral.

Verificou-se ainda que a presença de células dendríticas parece favorecer a indução da proliferação das células tumorais MCR. Para além deste facto, concluiu-se que o antigénio sTn influencia a resposta imunitária, ao retardar o processo de maturação das DCs e ao promover a capacidade fagocítica destas, induzindo assim um fenótipo mais tolerogénico nas DCs.

## **Bibliografia**

- >Aarnoudse, C.A., Garcia Vallejo ,J.J., Saeland, E. e van Kooyk, Y. 2006. Recognition of tumor glycans by antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol*.18:105-11;
- >Alexandroff, A.B. e James, K. 2000.Immunotherapy of bladder cancer. *In Cancer vaccines and immunotherapy* (P. L. Stern, P. C.L. Beverley e M. W. Carroll.eds), pp 19-46, Cambridge University press, Cambridge;
- >Adams, M., Jasani, B., Colaco, C. e Manson, M.D. Dentric cell approaches to immunotherapy. *In Cancer vaccines and immunotherapy* (P. L. Stern, P. C.L. Beverley e M. W. Carroll.eds), pp 19-46, Cambridge University press, Cambridge;
- >Amado, I. 2007. Sialylated antigens: Modulation of the expression in bladder cancer cell lines and profile analysis of dendritic cells. Tese de Licenciatura. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias;
- >Apetoh, L., Locher, C., Ghiringhelli, F., Kroemer, G.e Zitvogel, L. 2011.Harnessing dendritic cells in cancer. *Semin Immunol*. 23:42-9;
- >Babjuk, M., Oosterlinck, W., Sylvester, R., Kaasinen, E., Böhle, A., Palou-Redorta, J. e Rouprêt M. 2011.EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder, the 2011 Update. *Eur Urol*. 59:997-1008;
- >Baldus, S.E., Zirbes, T.K., Glossmann, J., Fromm, S., Hanisch, F.G., Monig, S.P., Schroder, W., Schneider, P.M., Flucke, U., Karsten, U., Thiele, J., Holscher, A.H. e Dienes, H.P. 2001. Immunoreactivity of monoclonal antibody BW835 represents a marker of progression and prognosis in early gastric cancer. *Oncology* 61:147–155;
- >Ballestrero, A., Boy, D., Moran, .E, Cirmena, G., Brossart, P. e Nencioni, A. 2008. Immunotherapy with dendritic cells for cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 60:173-83;
- >Becich, M.J., Carroll, S.e Ratliff, T.L. 1991.Internalization of bacille Calmette-Guerin by bladder tumor cells. *J Urol*. 145:1316-24;
- >Behr, M.A. e Small, P.M.1999.A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine*.17:915-22;
- >Bettahi, I., Dasgupta, G., Renaudet, O., Chentoufi, A. A., Zhang, X., Carpenter, D., Yoon, S., Dumy, P. e BenMohamed, L. 2009. Antitumor activity of a self-adjuvanting glyco-lipopeptide vaccine bearing B cell, CD4+ and CD8+ T cell epitopes. *Cancer Immunol Immunother* 58: 187–200;
- >Bevers, R.F., de Boer, E.C., Kurth, K.H.e Schamhart, D.H. 2000. BCG internalization in human bladder cancer cell lines, especially with regard to cell surface-expressed fibronectin. *Aktuelle Urol*. 31: 31–34;
- >Bevers, R.F., Kurth, K.H. e Schamhart, D.H. 2004 . Role of urothelial cells in BCG immunotherapy for superficial bladder cancer. *Br J Cancer*. 4:607-12;



- >Brandau, S., Riemensberger, J., Jacobsen, M., Kemp, D., Zhao, W., Zhao, X., Jocham, D. e Ratliff, T.L., Böhle A. 2001. NK cells are essential for effective BCG immunotherapy. *Int J Cancer*. 92:697-702;
- >Brandau S, Suttman H. 2007. Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement. *Biomed Pharmacother*. 6:299-305;
- >Brandau, S., Suttman, H., Riemensberger, J., Seitzer, U., Arnold, J., Durek, C., Jocham, D., Flad, H.D. e Böhle, A. 2000. Perforin-mediated lysis of tumor cells by Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin-activated killer cells. *Clin Cancer Res*. 9:3729-38;
- >Brockhausen, I. 2006. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep*. 6:599-604;
- >Brosch, R., Gordon, S.V., Garnier, T., Eiglmeier, K., Frigui, W., Valenti, P., Dos Santos, S., Duthoy, S., Lacroix, C., Garcia-Pelayo, C., Inwald, J.K., Golby, P., Garcia, J.N., Hewinson, R.G., Behr, M.A., Quail, M.A., Churcher, C., Barrell, B.G., Parkhill, J. e Cole, S.T. 2007. Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104:5596-5601;
- >Bubeník, J., Baresová, M., Viklický, V., Jakoubková, J., Sainerová, H. e Donner J. 1973. Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *Int J Cancer*. 11:765-73;
- >Buschiazzo, A. e Alzari, P.M. 2008. Structural insights into sialic acid enzymology. *Curr Opin Chem Biol*. 5:565-72;
- >Campbell, C. T. e Yarema, K. J. 2005. Large-scale approaches for glycobiology. *Genome Biology* 6: 236;
- >Cao, Y., Stosiek, P., Springer, G.F. e Karsten, U. 1996. Thomsen–Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissue: a systematic and comparative study. *Histochem. Cell Biol*. 106: 97–207;
- >Carrascal, M. 2010. Estudo da resposta imunológica desencadeada por células de cancro de bexiga que expressam antígenos sialil-Tn. Tese de Licenciatura. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa;
- >Castillo-Rodal, A.I., Castañón-Arreola, M., Hernández-Pando, R., Calva, J.J., Sada-Díaz, E. e López-Vidal, Y. 2006. Mycobacterium bovis BCG substrains confer different levels of protection against Mycobacterium tuberculosis infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infect Immun*. 74:1718-24;
- >Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Krzewinski-Recchi, M.-A., Harduin-Lepers, A., Groux-Degroote, S. e Delannoy, P. 2010. Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. *Carbohydrate Research* 345: 1377–1383;
- >Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Burchell, J. e Delannoy, P. 2010. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 3:204;

- >Chen, X. e Varki, A. 2010. Advances in the biology and chemistry of sialic acids. *ACS Chem Biol.* 2:163-76;
- >Chen, F., Zhang, G., Cao, Y., Payne, R e See, W.A. 2007. Bacillus Calmette-Guerin inhibits apoptosis in human urothelial carcinoma cell lines in response to cytotoxic injury. *J Urol.* 1785:2166-70;
- >Chen, F., Zhang, G., Cao, Y., Hessner, M.J.e See,W.A. 2009. MB49 murine urothelial carcinoma: molecular and phenotypic comparison to human cell lines as a model of the direct tumor response to bacillus Calmette-Guerin. *J Urol.* 6:2932-7;
- >Clément, M., Rocher, J., Loirand, G. e Le Pendu J. 2004. Expression of sialyl-Tn epitopes on beta1 integrin alters epithelial cell phenotype, proliferation and haptotaxis. *J Cell Sci.* 117:5059-69;
- >Coon, J.S., Weinstein, R.S. e Summers, J.L. 1982 Blood group precursor T-antigen expression in human urinary bladder carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 77: 692–699;
- >David, L., Nesland, J.M., Clausen, H., Carneiro, F.me Sobrinho-Simoes, M.1992. Simple mucintype carbohydrate antigens (Tn, sialosyl-Tn and T) in gastric mucosa, carcinomas and metastases. *APMIS Suppl* 27:162–72;
- >Dall’Olio, F. e Chiricolo M. 2001. Sialyltransferases in cancer. *Glycoconjugate Journal* 18: 841–850
- Dawson, N. 2010. Immunotherapeutic approaches in prostate cancer: PROVENGE. *Clin Adv Hematol Oncol.*8:419-21;
- >De Boer, E.C., Bevers, R.F., Kurth, K.H. e Schamhart, D.H. 1996. Double fluorescent flow cytometric assessment of bacterial internalization and binding by epithelial cells. *Cytometry.* 4:381-7;
- >Desai, P.R., Ujjainwala, L.H.e Carlstedt, S.C., Springer, G.F. 1995. Anti-Thomsen–Friedenreich (T) antibody-based ELISA and its application to human breast carcinoma detection. *J. Immunol. Methods* 188: 75–85;
- >Fabbri, F., Brigliadori, G., Ulivi, P., Tesei, A., Vannini, I., Rosetti, M., Bravaccini, S., Amadori, D., Bolla, M. e Zoli, W. 2005. Pro-apoptotic effect of a nitric oxide-donating NSAID, NCX 4040, on bladder carcinoma cells. *Apoptosis* 10: 1095-1103;
- >Fine E.M, Carneiro, A.M., Milstien, J. e Clements, J.1999. Issues relating to the use of BCG in immunization programmes. World Health Organization;
- >Fogh, J. 1978. Cultivation, characterization, and identification of human tumor cells with emphasis on kidney, testis, and bladder tumors. *Natl Cancer Inst Monogr.* 49:5-9;
- >Gallegos, B., Pérez-Campos, E., Martinez, R., Leyva, P., Martinez, M., Hernández, R., Pina, S., Hernández, C., Zenteno, E.e Hernández, P. 2010. O-glycosylation expression in fibroadenoma. *Prep Biochem Biotechnol.*40:1-12;
- >Gao, J. Q., Okada, N., Mayumi, T. e Nakagawa, S. 2008. Immune cell recruitment and cell-based system for cancer therapy. *Pharmaceutical Research* 25: 752-768;

- >Ghazizadeh, M., Oguro, T., Sasaki, Y., Aihara, K., Araki, T. e Springer, G.F. 1990. Immunohistochemical and ultrastructural localization of T antigen in ovarian tumors. *Am. J. Clin. Pathol.* 93:315–321;
- >Grivennikov, S. e Karin, M. 2008. Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis? *Cancer Cell.*13:7-9;
- >Harduin-Lepers, A., Krzewinski-Recchi, M.A., Hebbar, M., Samyn-Petit, B., Vallejo-Ruiz, V., Julien, S., Peyrat, J.P.e Delannoy, P. 2001, Sialyltransferases and breast cancer. *In Recent Research Developments in Cancer Vol. 3* (S.G. Pandalai ed). pp 111–126, Transworld Research Network, Kerala;
- >Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M.A., Samyn-Petit, B., Julien, S. e Delannoy, P. 2001. The human sialyltransferase family. *Biochimie.* 8:727-37;
- >Herr, H.W. e Morales, A. 2008. History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *J Urol.* 1:53-6;
- >Higuchi T, Shimizu M, Owaki A, Takahashi M, Shinya E, Nishimura T, Takahashi H. 2009. A possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma: involvement of innate effector cells for the inhibition of tumor growth. *Cancer Immunol Immunother.* 58:1245-55;
- >Hosseini, A., Koskela, L.R., Ehrén, I., Aguilar-Santelises, M., Sirsjö, A. e Wiklund, N.P. 2006. Enhanced formation of nitric oxide in bladder carcinoma in situ and in BCG treated bladder cancer; *Nitric Oxide.*15:337-43;
- >Imada, T., Rino, Y., Hatori, S., Takahashi, M., Amano, T., Kondo, J.e Suda, T. 1999. Sialyl Tn antigen expression is associated with the prognosis of patients with advanced colorectal cancer *Hepatology* 46: 208–214;
- >Itzkowitz, S.H., Bloom, E.J., Lau, T.S. e Kim, Y.S.1993. Mucin associated Tn and sialosyl-Tn antigen expression in colorectal polyps. *Gut* 33:518–23;
- >Jacobs, B.L., Lee, C.T. e Montie, J.E. 2010. Bladder cancer in 2010: how far have we come?. *CA Cancer J Clin.* 4:244-72;
- >Jähnisch, H., Füssel, S., Kiessling, A., Wehner, R., Zastrow, S., Bachmann, M., Rieber, E.P., Wirth, M.P. e Schmitz, M.. 2010. Dendritic cell-based immunotherapy for prostate cancer. *Clin Dev Immunol.*2010:517493;
- >Janssen, T., Petein, M., Van Velthoven, R., Van Leer, P., Fourmarier, M., Vanegas, J.P., Danguy, A., Schulman, C., Pasteels, J.L. e Kiss, R. 1996. Differential histochemical peanut agglutinin stain in benign and malignant human prostate tumors: relationship with prostatic specific antigen immunostain and nuclear DNA content. *Human Pathol.* 27: 1341–1347;
- >Jansson, O.T., Morcos, E., Brundin, L., Lundberg, J.O., Adolfsson, J., Söderhäll, M. e Wiklund, N.P. 1998. The role of nitric oxide in bacillus Calmette-Guérin mediated anti-tumour effects in human bladder cancer. *Br J Cancer.* 5:588-92;

- >Julien, S., Adriaenssens, E., Ottenberg, K., Furlan, A., Courtand, G., Vercoutter-Edouart, A. S., Hanisch, F. G., Delannoy, P. e Le Bourhis, X. 2006. ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity. *Glycobiology* 16(1): 54-64;
- >Julien, S. e Delannoy, P. 2003. Sialyl-Tn antigen in Cancer: from Diagnosis to Therapy. *In Recent Research developments in Cancer Vol. 5* (S.G. Pandalai ed). pp 185–199, Transworld Research Network, Kerala;
- >Julien, S., Lagadec, C., Krzewinski-Recchi, M.-A., Courtand, G., Le Bourhis, X. e Delannoy P. 2005. Stable expression of sialyl-Tn antigen in T47-D cells induces a decrease of cell adhesion and an increase of cell migration. *Breast Cancer Research and Treatment* 90: 77–84;
- >Ju, T., Lanneau, G.S., Gautam, T., Wang, Y., Xia, B., Stowell, S.R., Willard, M.T., Wang, W., Xia, J.Y., Zuna, R.E., Laszik, Z., Benbrook, D.M., Hanigan, M.H. e Cummings, R.D. 2008. Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc. *Cancer Res.* 6:1636-46;
- >Kalinski, P. e Okada, H.2010.Polarized dendritic cells as cancer vaccines: directing effector-type T cells to tumors. *Semin Immunol.* 22:173-82;
- >Karlen, P., Young, E., Brostrom, O., Löfberg, R., Tribukait, B., Ost, K., Bodian, C. e Itzkowitz, S. 1998. Sialyl-Tn antigen as a marker of colon cancer risk in ulcerative colitis: relation to dysplasia and DNA aneuploidy. *Gastroenterology* 115:1395–404;
- >Kavoussi, L.R., Brown, E.J., Ritchey, J.K. e Ratliff ,T.L. 1990. Fibronectin-mediated Calmette-Guerin bacillus attachment to murine bladder mucosa. Requirement for the expression of an antitumor response. *J Clin Invest.*1:62-7;
- >Kresowik, T.P. e Griffith, T.S. 2009. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. *Immunotherapy.* 2:281-8;
- >Kumar, S.R., Sauter, E.R., Quinn, T.P. e Deutscher, S.L. 2005.Thomsen–Friedenreich and Tn antigens in nipple fluid: carbohydrate biomarkers for breast cancer detection. *Clin. Cancer Res.*11: 6868–6871;
- >Kuroda, K., Brown, E.J., Telle, W.B., Russell, D.G. e Ratliff, T.L.1993.Characterization of the internalization of bacillus Calmette-Guerin by human bladder tumor cells. *J Clin Invest.* 1:69-76;
- >Lecoeur, H., De Oliveira-Pinto, L.M. e Gougeon, M.L. 2002. Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. *J Immunol Methods.* 265:81-96;
- >Leivonen, M., Nordling, S., Lundin, J., von Boguslawski, K., e Haglund, C. 2001. STn and prognosis in breast cancer.*Oncology.* 61. 299–305;
- >Li, J. e Richards, J.C.2010.Functional glycomics and glycobiology: an overview. *In Functional Glycomics: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology) (J. Li ed). 1ªed. pp:1-8, Humana Press;
- >Limas, C. e Lange P. 1986. T-antigen in normal and neoplastic urothelium. *Cancer* 58: 1236–1245

Lin, K.W., Jacek, T. e Jacek, R. 2006. Dendritic cells heterogeneity and its role in cancer immunity. *J Cancer Res Ther.* 2:35-40;

>Livak, K.J. e Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25:402-8;

>Lokeshwar, V. B., Merseburger, A. S., Hautmann, S. H. 2011. *Bladder Tumors: Molecular Aspects and Clinical Management.* 1<sup>a</sup>ed., Humana Press, New York;

>Lockyer, C.R. e Gillatt, D.A. 2001. BCG immunotherapy for superficial bladder cancer. *J R Soc Med.* 94:119-23;

>Ludwig, A.T., Moore, J.M., Luo, Y., Chen, X., Saltsgaver, N.A., O'Donnell, M.A. e Griffith, T.S. 2004. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: a novel mechanism for Bacillus Calmette-Guérin-induced antitumor activity. *Cancer Res.* 64:3386-90;

>Luo, Y. e Knudson, M.J. 2010. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin-induced macrophage cytotoxicity against bladder cancer cells. *Clin Dev Immunol.* 2010:357591;

>Luo, Y., Szilvasi, A., Chen, X., DeWolf, W.C. e O'Donnell, M.A. 1996. A novel method for monitoring Mycobacterium bovis BCG trafficking with recombinant BCG expressing green fluorescent protein. *Clin Diagn Lab Immunol.* 3:761-8;

>MacVicar D. 2008. *Carcinoma of the Bladder.* 1<sup>a</sup>ed., Cambridge University Press, Cambridge

Miles, D. W., Happerfield, L. C., Smith, P., Gillibrand, R., Bobrow, L. G., Gregory, W. M., e Rubens, R. D. 1994. Expression of sialyl-Tn predicts the effect of adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer. *Br. J. Cancer* 70. 1272–1275;

>Mitropoulos, D., Petsis, D., Kyroudi-Voulgari, A., Kouloukoussa, M., Zervas, A. e Dimopoulos, C. 2005. The effect of intravesical Bacillus Calmette-Guérin instillations on the expression of inducible nitric oxide synthase in humans. *Nitric Oxide.* 13:36-41;

>Mitsuyama, K., Sata, M. e Rose-John, S. 2006. Interleukin-6 trans-signaling in inflammatory bowel disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17:451-61;

>Melief, C.J. 2008. Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity.* 29:372-83;

>Monti, P., Leone, B.E., Zerbi, A., Balzano, G., Cainarca, S., Sordi, V., Pontillo, M., Mercalli, A., Di Carlo, V., Allavena, P. e Piemonti L. 2004. Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL-10<sup>high</sup>IL-12<sup>low</sup> regulatory dendritic cell. *J Immunol.* 2004 Jun 15;172(12):7341-9;

>Morcos, E., Jansson, O.T., Adolfsson, J., Ehrén, I. e Wiklund, N.P. 2001. Bacillus Calmette-Guérin induces long-term local formation of nitric oxide in the bladder via the induction of nitric oxide synthase activity in urothelial cells. *J Urol.* 165:678-82;

>Moriwaki, K. e Miyoshi, E. 2010. Fucosylation and gastrointestinal cancer. *World J Hepatol.* 2:151-61;

>Mungul, A., Cooper, L., Brockhausen, I., Ryder, K., Mandel, U., Clausen, H., Ruggetti, A., Miles, D.W., Taylor-Papadimitriou, J. e Burchell, J.M. 2004. Sialylated core 1 based O-linked glycans

enhance the growth rate of mammary carcinoma cells in MUC1 transgenic mice. *Int J Oncol.* 25:937-43;

>Nakagoe, T., Sawai, T., Tsuji, T., Jibiki, M.A., Nanashima, A., Yamaguchi, H., Yasutake, T., Ayabe, H., Arisawa, K. e Ishikawa, H.2002. Predictive factors for preoperative serum levels of sialyl Lewis(x), sialyl Lewis(a) and sialyl Tn antigens in gastric cancer patients. *Anticancer Res* 22: 451–458

Nakagoe, T., Sawai, T., Tsuji, T., Jibiki, M., Nanashima, A., Yamaguchi, H., Kurosaki, N., Yasutake, T. e Ayabe H. 2001. Circulating sialyl Lewis(x), sialyl Lewis(a), and sialyl Tn antigens in colorectal cancer patients: multivariate analysis of predictive factors for serum antigen levels. *J Gastroenterol* 36: 166–172;

>Nonaka, M., Ma, B. Y., Murai, R., Nakamura, N., Baba, M., Kawasaki, N., Hodohara, K., Asano, S. e Kawasaki, K. 2008. Glycosylation-dependent interactions of C-type lectin DC-SIGN with colorectal tumor-associated Lewis glycans impair the function and differentiation of monocyte-derived dendritic cells. *The Journal of Immunology* 180: 3347-3356;

>Ohyama C. 2008.Glycosylation in bladder cancer. *Int J Clin Oncol.* 4:308-13;

>Ormerod, M. G. 2008. *Flow Cytometry - A Basic Introduction.* De Novo software. <http://flowbook-wiki.denovosoftware.com>;

>Paczesny, S., Ueno, H., Fay, J., Banchemreau, J. e Palucka, A.K. 2003.Dendritic cells as vectors for immunotherapy of cancer. *Semin Cancer Biol.* 13:439-47;

>Palucka, K., Ueno, H., Zurawski, G., Fay, J., Banchemreau, J. 2010.Building on dendritic cell subsets to improve cancer vaccines. *Curr Opin Immunol.* 22:258-63;

>Patard, J.J., Saint, F., Velotti, F., Abbou, C.C. e Chopin, D.K. 1998. Immune response following intravesical bacillus Calmette-Guerin instillations in superficial bladder cancer: a review. *Urol Res.* 26:155-9;

>Parish, C.R. 1999. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol.*77:499-508;

>Paulson, J.C. e Colley, K.J. 1989. Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem.* 30:17615-8;

>Ping, S.Y., Wu, C.L. e Yu, D.S. 2010. Sunitinib can enhance BCG mediated cytotoxicity to transitional cell carcinoma through apoptosis pathway. *Urol Oncol*;

>Pinho, S., Marcos, N. T., Ferreira, B., Carvalho, A. S., Oliveira, M. J., Santos-Silva, F., Harduin-Lepers, A. e Reis, C. A. 2007. Biological significance of cancer-associated sialyl-Tn antigen: >Modulation of malignant phenotype in gastric carcinoma cells. *Cancer Letters* 249: 157–170;

>Pinto, R. A. e Martins da Silva, C. 2007. Tumores da bexiga. *In Urologia em 10 minutos.* (J.S. Dias ed), pp 85-93, Bayer HeathCare, Portugal;

>Pook, S.H., Rahmat, J.N., Esuvaranathan, K. e Mahendran, R. 2007. Internalization of *Mycobacterium bovis*, *Bacillus Calmette Guerin*, by bladder cancer cells is cytotoxic. *Oncol Rep.* 5:1315-20;

- >Prescott, S., Jackson, A.M., Hawkyard, S.J., Alexandroff, A.B. e James, K. 2000. Mechanisms of action of intravesical bacille Calmette-Guérin: local immune mechanisms. *Clin Infect Dis.* 31:S91-3.
- Rajala P, Kaasinen E, Rintala E, Jauhiainen K, Nurmi M, Alfthan O, Lähde M.1992. Cytostatic effect of different strains of Bacillus Calmette-Guérin on human bladder cancer cells in vitro alone and in combination with mitomycin C and interferon-alpha. *Urol Res.* 20:215-7;
- >Rasheed, S., Gardner, M.B., Rongey, R.W., Nelson-Rees, W.A.e Arnstein, P. 1977.Human bladder carcinoma: characterization of two new tumor cell lines and search for tumor viruses.*J Natl Cancer Inst.* 58:881-90;
- >Ratliff, T.L., Gillen, D. e Catalona, W.J. 1987. Requirement of a thymus dependent immune response for BCG-mediated antitumor activity. *J Urol.* 137:155-8;
- >Ratliff, T.L., Ritchey, J.K., Yuan, J.J., Andriole, G.L. e Catalona, W.J. 1993. T-cell subsets required for intravesical BCG immunotherapy for bladder cancer. *J Urol.* 150:1018-23;
- >Reis, C. A., Osorio, H., Silva, L., Gomes, C. e David, L. 2010. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *Journal of Clinical Pathology* 63: 322-329;
- >Ribeiro-Resende, V.T., Ribeiro-Guimarães, M.L., Lemes, R.M., Nascimento, I.C., Alves, L., Mendez-Otero, R., Pessolani, M.C. e Lara, F.A. 2010. Involvement of 9-O-Acetyl GD3 ganglioside in Mycobacterium leprae infection of Schwann cells. *J Biol Chem.*285:34086-96;
- >Robinson, J. 2004. Flow Cytometry. In *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* (G. L. Bowlin; G. Wnek), pp. 630-640, Informa Healthcare;
- >Rosevear, H.M., Lightfoot, A.J., O'Donnell, M.A., Griffith, T.S 2009.The role of neutrophils and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in bacillus Calmette-Guérin (BCG) immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. *Cancer Metastasis Rev.* 28:345-53;
- >Rughetti, A., Pellicciotta, I., Biffoni, M., Bäckström, M., Link, T., Bennet, E. P., Clausen, H., Noll, T., Hansson, G. C., Burchell, J. M., Frati, L., Taylor-Papadimitriou, J. e Nuti, M. 2005. Recombinant tumor-associated MUC1 glycoprotein impairs the differentiation and function of dendritic cells. *The Journal of Immunology* 174: 7764-7772;
- >Sabado RL, Bhardwaj N.2010.Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. *Immunotherapy.* 2:37-56;
- >Saitoh, H., Mori, K., Kudoh, S., Itoh, H., Takahashi, N. e Suzuki, T. 2002. BCG effects on telomerase activity in bladder cancer cell lines. *Int J Clin Oncol.* 3:165-70;
- >Sandes, E., Lodillinsky, C., Cwirenbaum, R., Argüelles, C., Casabé, A. e Eiján, A.M. 2007. Cathepsin B is involved in the apoptosis intrinsic pathway induced by Bacillus Calmette-Guérin in transitional cancer cell lines. *Int J Mol Med.* 6:823-8;
- >Schafer, Z.T. e Brugge, J.S. 2003.IL-6 involvement in epithelial cancers. 117:3660-3;
- >Schauer, R. 2009. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Current Opinion in Structural Biology* 19: 507–514;

- >Schmitt, F.C., Figueiredo, P. e Lacerda, M. 1995. Simple mucin-type carbohydrate antigens (T, sialosyl-T, Tn and sialosyl-Tn) in breast carcinogenesis. *Virchows Arch* 427: 251–258;
- >Schneider, B., Thanhäuser, A., Jocham, D., Loppnow, H., Vollmer, E., Galle, J., Flad, H.D., Ulmer, A.J. e Böhle, A. 1994. Specific binding of bacillus Calmette-Guérin to urothelial tumor cells in vitro. *World J Urol.* 12:337-44;
- >Schöningh, R., Verstijnen, C.P., Kuijper, S. e Kolk AH.1990. Enzyme immunoassay for identification of heat-killed mycobacteria belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complexes and derived from early cultures. *J Clin Microbiol.* 28:708-13;
- >Schwarzer, K., Foerster, M., Steiner, T., Hermann, I.M. e Straube E. 2010. BCG strain S4-Jena: An early BCG strain is capable to reduce the proliferation of bladder cancer cells by induction of apoptosis. *Cancer Cell Int.*10:21;
- >See, W.A., Zhang, G., Chen, F., Cao, Y., Langenstroer, P. e Sandlow, J. 2009. Bacille-Calmette Guèrin induces caspase-independent cell death in urothelial carcinoma cells together with release of the necrosis-associated chemokine high molecular group box protein 1. *BJU Int.* 12:1714-20;
- >Simons, M.P., Nauseef, W.M. e Griffith, T.S. 2007. Neutrophils and TRAIL: insights into BCG immunotherapy for bladder cancer. *Immunol Res.* 39:79-93;
- >Simons, M.P., O'Donnell, M.A. e Griffith, T.S.2008. Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer. *Urol Oncol.*26:341-5;
- >Singh, R., Campbell, B.J., Yu, L.G., Fernig, D.G., Milton, J.D., Goodlad, R.A., FitzGerald, A.J. e
- >Rhodes, J.M.2001. Cell surface-expressed Thomsen-Friedenreich antigen in colon cancer is predominantly carried on high molecular weight splice variants of CD44. *Glycobiology.* 11:587-92
- >Soares, R., Marinho, A. e Schmitt, F.1996. Expression of sialosyl-Tn in breast cancer. Correlation with prognostic parameters. *Pathol Res Pract* 192: 1181–1186;
- >Sotozono, M.A., Okada, Y. e Tsuji, T. 1994. The Thomsen–Friedenreich antigen-related carbohydrate antigens in human gastric intestinal metaplasia and cancer. *J. Histochem. Cytochem.* 42: 1575–1584;
- >Takano, Y., Teranishi, Y., Terashima, S., Motoki, R. e Kawaguchi, T. 2000. Lymph node metastasis-related carbohydrate epitopes of gastric cancer with submucosal invasion. *Surg Today* 30: 1073–1082
- Taniguchi, N., Suzuki, A., Ito, Narimatsu, Y.H., Kawasaki, T. e Hase, S. 2008. *Experimental Glycoscience: Glycobiology.* Springer, Hong Kong;
- >Tanner, M. E. 2005. The enzymes of sialic acid biosynthesis. *Bioorganic Chemistry* 33: 216–228
- Taylor, R.C., Cullen, S.P. e Martin, S.J. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:231-241;
- >Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H. e Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 33:2233-9;



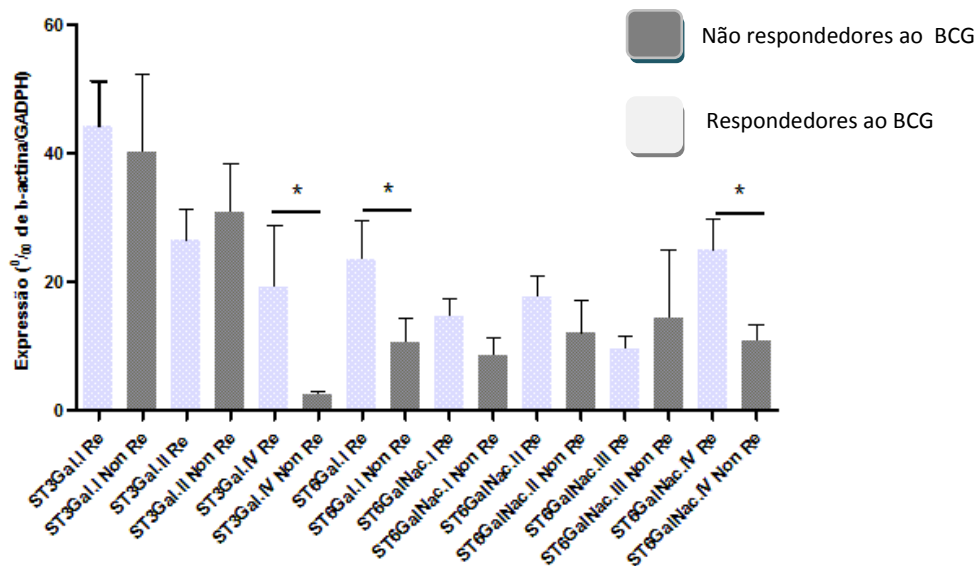
- >Ugorski, M.e Laskowska, A. 2002. Sialyl Lewis(a): a tumor-associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of cancer cells. *Acta Biochim Pol.* 49:303-11;
- > van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B. e Reutelingsperger, C.P. 1998. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.*31:1-9;
- > van der Velden, V.H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J. e van Dongen, J.J.2003. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia.* 17:1013-34;
- > van Gisbergen, K. P., Aarnoudse, C. A., Meijer, G. A., Geijtenbeek, T. B. e van Kooyk, Y. 2005. Dendritic cells recognize tumor-specific glycosylation of carcinoembryonic antigen on colorectal cancer cells through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin. *Cancer Research* 65(13): 5935-5944;
- >Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W. e Etzler, M. E. 2009. *Essentials of Glycobiology*, 2<sup>a</sup>ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York;
- >Varki, N.M., Varki,A. 2007.Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest.* 9:851-7;
- >Vazquez-Martin, C., Cuevas, E., Gil-Martin, E., e Fernandez-Briera, A. 2004. Correlation analysis between tumor-associated antigen sialyl-Tn expression and ST6GalNAc I activity in human colon adenocarcinoma. *Oncology* 67: 159–165;
- > Videira, P. A., Amado, I. F., Correia, M., Calais da Silva, F. M., Calais da Silva, F., Dall’Olio, F., Ligeiro, D. e Trindade, H. 2007. Abnormal glycosylation related to bladder cancer: Assessment of its prognostic Value. *URO* 17;
- >Videira, P.A., Calais, F.M., Correia, M., Ligeiro, D., Crespo, H.J., Calais, F. e Trindade, H. 2009. Efficacy of bacille Calmette-Guérin immunotherapy predicted by expression of antigen-presenting molecules and chemokines. *Urology.* 74:944-50;
- >Wong ML, Medrano JF. 2005.Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.*39:75-85.
- Yu LG. 2007.The oncofetal Thomsen-Friedenreich carbohydrate antigen in cancer progression. *Glycoconj J.* 8:411-20;
- >Yuan, M., Itzkowitz, S.H., Boland, C.R., Kim, Y.D., Tomita, J.T., Palekar, A., Bennington, J.L., Trump, B.F. e Kim, Y.S. 1986. Comparison of T-antigen expression in normal, premalignant, and malignant human colonic tissue using lectin and antibody immunohistochemistry. *Cancer Res.* 46: 4841–4847;
- >Zhang, S., Zhang, H.S., Cordon-Cardo, C., Reuter, V.E., Singhal, A.K., Lloyd, K.O. e Livingston, P.O. 1997. Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: II. Blood group-related antigens. *Int. J. Cancer* 73: 50–56;

>Zhao, W., Schorey, J.S, Bong-Mastek, M., Ritchey, J., Brown, E.J. e Ratliff, T.L. 2000. Role of a bacillus Calmette-Guérin fibronectin attachment protein in BCG-induced antitumor activity. *Int J Cancer*.86:83-8.

***ANEXOS***

## Anexo I

### Expressão das sialiltransferases no urotélio normal de doentes com cancro de bexiga



Comparação da expressão de sialiltransferases no urotélio entre doentes respondedores e não respondedores à terapêutica BCG. Os doentes foram agrupados em doentes respondedores ao BCG (barras cinza, n=43), ou seja, sem recidiva num período mínimo de 12 meses e em doentes não respondedores ao BCG (barras cinzento escuro, n=22). Diferenças significativas: \* corresponde a  $p < 0,05$  (Videira *et al.*, dados não publicados)



## **Anexo II**

### **Constituição de soluções tampão utilizadas neste trabalho**

#### **Solução-tampão de fosfatos (PBS 1x):**

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

#### **Tampão frio utilizado na separação de monócitos:**

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



### Anexo III

Tabela representativa com os valores da Intensidade da Fluorescência Média (MFI) obtidos para a marcação com os anticorpos monoclonais e lectinas específicas, nas linhas celulares tratadas ou não com as enzimas sialidase e endopeptidase *O*-sialoglicoproteína (OSGE).

<b>MCR<sub>pLenti.ST6GN1</sub></b>	<b>PNA</b>	<b>SNA</b>	<b>MAA</b>	<b>sTn</b>	<b>sLe<sup>x</sup></b>	<b>sLe<sup>a</sup></b>	<b>Le<sup>a</sup></b>
sem tratamento	81,57	224,53	359,66	102,55	10,34	13,2	6,43
tratadas com sialidase	817,8	160,3	275,88	26,18	12,11	7	NA
tratadas com OSGE	NA	NA	NA	67,38	NA	NA	NA
<b>MCR<sub>pLenti.transd</sub></b>	<b>PNA</b>	<b>SNA</b>	<b>MAA</b>	<b>sTn</b>	<b>sLe<sup>x</sup></b>	<b>sLe<sup>a</sup></b>	<b>Le<sup>a</sup></b>
sem tratamento	384	151,55	481,86	5,49	14,73	5,95	5,79
tratadas com sialidase	1722	117,68	388	NA	10,46	NA	NA
<b>T-24</b>	<b>PNA</b>	<b>SNA</b>	<b>MAA</b>	<b>sTn</b>	<b>sLe<sup>x</sup></b>	<b>sLe<sup>a</sup></b>	<b>Le<sup>a</sup></b>
sem tratamento	29,08	21,97	498,25	3,1	18,24	2,96	3,14
tratadas com sialidase	2074,14	100,58	592,95	NA	4,38	NA	NA
tratadas com OSGE	26,4	NA	NA	NA	13,72	NA	NA
<b>5637</b>	<b>PNA</b>	<b>SNA</b>	<b>MAA</b>	<b>sTn</b>	<b>sLe<sup>x</sup></b>	<b>sLe<sup>a</sup></b>	<b>Le<sup>a</sup></b>
sem tratamento	47,63	103,85	585,03	5,64	69,35	6,28	56,54
tratadas com sialidase	2372,95	158,37	341,06	NA	5,1	3,9	150,09
tratadas com OSGE	NA	NA	NA	NA	52,81	7	NA
<b>HT1376<sub>pLenti.ST3G1</sub></b>	<b>PNA</b>	<b>SNA</b>	<b>MAA</b>	<b>sTn</b>	<b>sLe<sup>x</sup></b>	<b>sLe<sup>a</sup></b>	<b>Le<sup>a</sup></b>
sem tratamento	103	12,28	155,33	6,1	19,65	6,34	6,6
tratadas com sialidase	2958,87	25,98	54,65	NA	6	NA	NA
<b>HT1376<sub>pLenti.transd</sub></b>	<b>PNA</b>	<b>SNA</b>	<b>MAA</b>	<b>sTn</b>	<b>sLe<sup>x</sup></b>	<b>sLe<sup>a</sup></b>	<b>Le<sup>a</sup></b>
sem tratamento	531,65	59	58	5,44	66,21	5,05	5,64
tratadas com sialidase	519,98	56	50	NA	NA	NA	NA

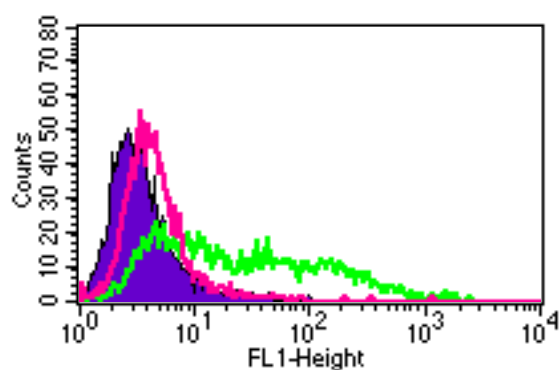
NA-Não aplicável





## Anexo IV

### Exemplo da análise da expressão do antígeno sLe<sup>x</sup> nas células 5637

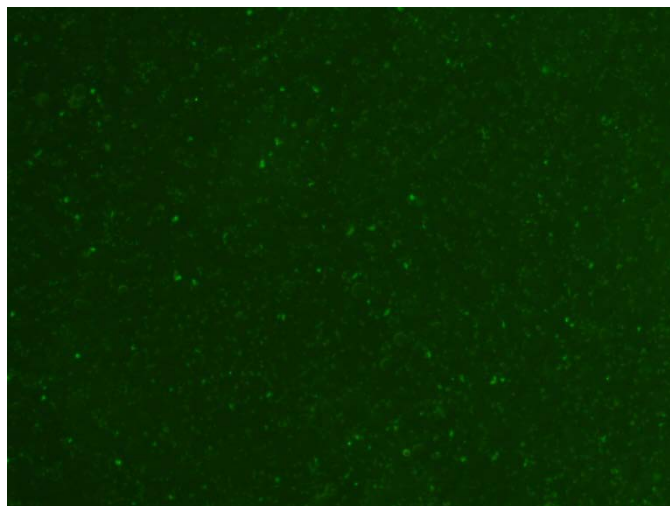


**Exemplo da análise da expressão do antígeno sLe<sup>x</sup> nas células 5637-** Como é possível observar pelo dot plot apresentado, a marcação para o anticorpo anti-sLe<sup>x</sup> (representada pela linha verde) é bastante heterogênea, verificando-se a formação de diferentes picos, correspondentes a populações celulares 5637, com diferentes níveis de expressão de sLe<sup>x</sup>. O tratamento prévio, com sialidase (linha rosa), remove a maioria dos ácidos siálicos terminais presentes nestes antígenos, deixando de haver marcação para o anticorpo anti-sLe<sup>x</sup>; (fundo roxo correspondente ao branco).



## Anexo V

### Cultura BCG-Pasteur-GFP



**Imagem de microscopia de fluorescência representativa da cultura de BCG-Pasteur-GFP-** A estirpe de BCG (Pasteur) utilizada no decorrer, desta tese, expressa a proteína verde fluorescente GFP, sendo que esta expressão se caracteriza por ser uniforme e consistente, permitindo uma análise quantitativa, confiável e precisa para a internalização de BCG pelas células tumorais (ampliação 40x).



**Anexo VI**  
**Sumário submetido para o congresso “Gordon Research Conference 2011”**

**“IMMUNITY IN BLADDER CANCER IS INFLUENCED BY SIALYLATED ANTIGENS”**

PF Severino, MA Carrascal, M. Silva, MG Cabral, H Gouveia, M Correia, H. Crespo, LL Santos, F Dall’Olio, PA Videira

Bladder cancer is becoming a public health problem. Initially present as non-muscle invasive (NMI), this type of cancer has an increasing incidence and a dramatic high relapse rate. Remission of NMI bladder cancer depends on the patient’s immune response and in fact, the best treatment to reduce disease relapse is the instillation of Bacille Calmette-Guérin (BCG) into the bladder to boost anti-cancer immunity.

Cancer cells frequently express increased levels of sialylated glycan structures. However, in bladder cancer, little is known about the occurring glycosylation changes and their influence in cancer progression and tumour immunity.

Our group has been investigating tumour tissue from patients with different stages of bladder cancer for the expression of sialylated antigens and the sialyltransferases that are involved in their biosynthesis. We have also established cell line models to address, the role of two sialyltransferases, the ST3Gal.I and ST6GalNac.I, that are crucial for the expression of the tumour associated antigens, sialyl-T and sialyl-Tn, respectively. In terms of immunogenicity we have investigated the potential of sialylated bladder antigens to affect the immune responses mediated by dendritic cells (DCs, one of the most powerful coordinators of the immune responses) and BCG mechanism of action.

The analysis of patient’s samples revealed significant increased expression of sialyltransferases such as ST3Gal.I and ST6GalNac.I in tumour tissues as compared with urothelium. Interestingly, the pattern of sialyltransferase expression is different between patients that respond to BCG treatment and those that do not. ST3Gal.I and ST6GalNac.I contribution to the biosynthesis of sialyl-T and sialyl-Tn antigens in bladder cancer was corroborated through comprehensive *in vitro* studies.

Because sialyl-Tn antigens are described to have potential immunogenic features affecting tumour cell recognition by the immune system, we addressed its relevance in DC recognition and BCG treatment. We observed that DCs have a tendency to adhere more to cancer cells expressing sialyl-Tn than to control (sialyl-Tn negative cancer cells). However, when in contact with sialyl-Tn cancer cells, DCs show a poorly mature phenotype and have altered expression of tolerogenic and pro-inflammatory cytokines. On the other hand, sialyl-Tn expressing cancer cells have improved capacity to adhere and internalize BCG than control. These results suggest that sialyl-Tn antigen favours the induction of more tolerogenic DC profile, ascribing reduced immunogenicity to the cancer cells. Nevertheless, these cells may be more susceptible to BCG treatment.

Further investigations are in progress to understand the bladder cancer glycome, and in particular, how sialyltransferase expression participates in the oncogenic transformation of the bladder and how sialyl-T and sialyl-Tn antigens can serve as markers to predict patient’s response to immunotherapy.



## **Anexo VII**

### **Sumário submetido para o congresso “Glycosciences in the international year of Chemistry, Applications to human health and disease”**

#### **“SIALYLATION AFFECTS BCG-MECHANISM OF ACTION IN BLADDER CANCER“**

Silva M., Severino P.F., Carrascal M.A., Cabral M.G., Crespo H., Calais F.M., Santos L.L., Dall’Olio F., Videira P.A.

Bladder cancer (BC) is a worldwide health problem. Initially present as non-muscle invasive (NMI), this type of cancer has a propensity to recur and progress to muscle-invasive disease. Intravesical Bacille Calmette-Guérin (BCG) therapy is the treatment of choice of NMI .

Since the expression of sialylated glycans is usually upregulated in cancer cells, we have been investigating the expression of sialylated antigens and the involved sialyltransferases, in tumour-tissue from patients with different stages of NMI-BC. We established cell line models to address the role of ST3Gal.I and ST6GalNac.I-sialyltransferase in the synthesis of the tumour-antigens sialyl-T and sialyl-Tn, respectively, in BC and the effect of sialylated BC-antigens in BCG adhesion, internalization and BCG-induced apoptosis.

The analysis of patient’s samples revealed significant increased expression of sialyltransferases in tumour-tissues when compared with urothelium and between BCG responders and non-responders. We also shown that ST3Gal.I and ST6GalNac.I are crucial for the expression of sialyl-T and sialyl-Tn, respectively, in BC cell lines.

Sialyl-Tn-positive BC cells have improved capacity to adhere and internalize BCG than control BC cells, demonstrating its susceptibility to BCG treatment. Apparently, the modulation of sialic acid cell-surface moieties affects the susceptibility of BC cells to BCG mechanism of action.

Further investigations are in progress to understand how the BC glycome affects BCG mechanism of action and how glycans serve as markers to predict patient’s response to BCG immunotherapy.





**Anexo VIII**  
**Sumário submetido para o congresso “Glycosciences in the international year of Chemistry,  
Applications to human health and disease”**

**“IMMUNE TOLERANCE TO CANCER CELLS: THE ROLE OF SIALYL-TN ANTIGENS”**

Carrascal M. A., Severino P. F., Cabral M. G., Gouveia H., Silva M., Dall’Olio F., Videira P. A

The expression of the tumour-associated carbohydrate antigens – sialyl-Tn (STn) – is usually associated with poor prognosis in different cancers. Dendritic cells (DCs) are able to recognize, capture and process tumour antigens and, if properly matured, activate specific effector T cells to eliminate tumour cells. However, DCs became tolerogenic to cancer cells, residing incompletely mature, with enhanced phagocytic ability and increased secretion of immunosuppressive cytokines.

Because STn antigens affect cell-cell connections, we investigated their potential to affect DC:tumour cell interaction and DC-mediated immune responses.

As STn+ cancer cell models, we used ST6GalNacI-overexpressing bladder cancer cell lines and supported the evidences with ST6GalNacI-overexpressing breast cancer cells. We observed that human monocyte-derived DCs (mo-DCs) have a tendency to adhere more to STn+ cancer cells than to control STn- cells. However, the contact with STn+ cells leads mo-DCs to have significant smaller expression of major histocompatibility complex class II antigen-presenting proteins and co-stimulatory ligands, relatively to control STn- cancer cells. In addition, the expression of tolerogenic and pro-inflammatory cytokines is significantly altered in DCs adhered to STn+ cells, comparatively with STn- cells.

These phenomena seem to require cell: cell contact and  $Ca^{2+}$  medium and are slightly observed when mo-DCs were previously matured with bacterial lipopolysaccharide. Interesting, when apoptotic, STn+ cancer cells seem to be better phagocytosed by mo-DCs than STn-.

Our data suggest that STn antigen ascribe reduced immunogenicity to the cancer cells, favouring the induction of more tolerogenic DC profile. Further investigations are in progress to understand the underlying mechanisms.