

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS EM CÉLULAS DE MACRÓFAGO J77A.4. FRENTE AO TRATAMENTO COM *MYCOBACTERIUM BOVIS* BCG RECOMBINANTE

MAYARA YASMIN DA SILVA¹; CAMILA BONEMANN BENDER²
FERNANDA SEVERO SABEDRA SOUSA³; BRUNA SILVEIRA PACHECO⁴;
TIAGO VIEIRA COLARES⁵; FABIANA KÖMMLING SEIXAS⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – mayarayds22@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – camilabbender@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – nandinha_sousa4@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – pacheco.sbruna@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – collares.t@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – seixas.fk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O sistema imune pode ser dividido em dois grupos principais, o sistema imune inato e o adaptativo, e ambos atuam com o objetivo de manter a homeostase do organismo (VAROL et al., 2015). As defesas do organismo podem ser acionadas diante de variados eventos, como infecções patogênicas, resposta a alergias, inflamações e surgimento de células cancerígenas (XIA, 2021; ZHANG; ZHANG, 2020).

Assim sendo, as células cancerígenas são caracterizadas pelo seu crescimento e proliferação celular descontrolados. Para não serem destruídas, elas modulam os mecanismos de regulação do sistema imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011; ZHANG; ZHANG, 2020). O aumento na expressão de certas rotas, o impedimento do reconhecimento pelas células T efetoras e o recrutamento de células e moléculas imunossupressoras para o microambiente tumoral são alguns exemplos dessa modulação (ZHANG; ZHANG, 2020).

Neste sentido, a imunoterapia no tratamento do câncer promove a erradicação do tumor via componentes do sistema imune ao mesmo tempo que reduz os efeitos colaterais observados em outras terapias (RILEY et al., 2019). Atualmente, há diferentes abordagens de imunoterapias, como a inibição de *checkpoints* e engenharia de microrganismos, células e anticorpos. Porém, apesar dos benefícios, há uma vacância na previsibilidade da eficácia clínica dos tratamentos imunoterápicos, além de uma taxa de resposta limitada e, em certos casos, a indução de resposta autoimune, fazendo com que tecidos saudáveis sejam afetados (RILEY et al., 2019; ZHANG; ZHANG, 2020). Assim, novas abordagens mais direcionadas e seguras se mostram promissoras.

O Bacillus Calmette-Guérin (BCG) é uma cepa atenuada de *M. bovis* utilizada para a vacinação contra tuberculose (TB) há décadas. O potencial adjuvante da resposta imune humoral e celular do BCG é bem consolidado. Sabe-se hoje que ele atua promovendo a morte celular por apoptose e autofagia, aumentando a expressão do complexo de histocompatibilidade de classe II e recrutando células imunes (como *natural killers* (NK), macrófagos e neutrófilos) são exemplos disso (VAROL et al., 2015; ZHANG; ZHANG et al., 2020). O estímulo à produção de células NK e monócitos mediado pelo BCG está associado à imunidade treinada, onde as células citadas desempenham características de memória, e acredita-se ter relação com a atividade de defesa imune da bactéria a longo prazo (NETEA; CREVEL, 2014; NETEA et al., 2020).

Com base nisso, o potencial imunoterápico do BCG vem sendo cada vez mais explorado. O uso da cepa como padrão-ouro na imunoterapia do câncer de bexiga não-músculo invasivo (CBNMI) e câncer de pele melanoma em estágio III reforça o este interesse. Dentre as muitas opções, uma abordagem interessante é a construção de cepas recombinantes expressando antígenos imunogênicos próprios ou heterólogos, visando estimular a secreção de citocinas ou células do sistema imune inato. Neste sentido, o presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da cepa recombinante BCG Pasteur/CP09720 em células de macrófagos, analisando seu potencial imunoterápico.

2. METODOLOGIA

2.1 Cultivo de *Mycobacterium bovis* BCG

As cepas de *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur e Pasteur/CP09720 foram cultivadas em meio 7H9 Middlebrook (Difco, BD, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de ácido oleico, albumina, complexo de dextrose (OADC - Difco), 0,2% de glicerol e 0,05% de Tween 80 (Sigma) ou em meio ágar base 7H10 Middlebrook (Difco, BD, São Paulo, Brazil) com 10% de OADC e 0,2% de glicerol. Quando necessário, 25 µg/ml do antibiótico canamicina foram adicionadas. *Escherichia coli* ToP10 e BL21 (DE3) cresceram em meio Luria-Bertani com Ampicilina (100mg/mL) ou Canamicina (25 µg/mL) quando necessário.

2.2 Cultivo das células de macrófago J77A.4.

As linhagens foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células foram cultivadas em meio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil) e suplementadas com 10% de Soro Fetal Bovino. As células cresceram sob atmosfera controlada a 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂. Os experimentos foram realizados após as células atingirem o estágio de subconfluência (<90%).

2.3 Análise de PCR em tempo real

Para analisar o potencial da nova construção de BCG recombinante de estimular macrófagos, foram utilizadas células da linhagem J77A.4 (macrófago murino). As células foram cultivadas em placas de seis poços em uma densidade de 5×10^5 células/poço. Decorridas 24 horas após o cultivo, o BCG foi adicionado nos poços a uma concentração de 50:1 (BCG/células). Após 24 horas do tratamento, o RNA foi isolado usando o reagente TRIzol® (Invitrogen™, Carlsbad, USA). Posteriormente, o cDNA foi obtido usando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA) conforme o protocolo do fabricante. As reações de PCR em Tempo Real (qPCR) foram realizadas no equipamento Stratagene Mx3005P Real-Time PCR System (Agilent Technologies), utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, UK). O gene GAPDH foi utilizado como normalizador e os genes imunes da interleucina (IL) 6, IL-10 e IL-12 foram avaliados. A IL-6 e a IL-12 estão associadas a ativação das respostas imune e sistêmica e recrutamento de células do sistema imune foram analisadas. Ainda, a IL-10, a qual está relacionada com a resistência ao BCG por induzir a reprogramação tumoral, também foi analisada neste estudo.

2.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do software Graphpad Prism 8 utilizando uma via de ANOVA. Foi utilizado o pós-teste de Bonferroni. Assim sendo, o $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, a nova cepa BCG Pasteur/CP09720 foi construída e o seu efeito em células de macrófago murino foi analisado com base na indução da expressão de genes imunes. Os experimentos consistiram em analisar a expressão em três grupos: um grupo controle e dois grupos tratados. Um dos cultivos foi tratado com a cepa recombinante BCG Pasteur/CP09720, enquanto o outro foi tratado com a cepa controle BCG Pasteur.

Quando células de macrófagos dos grupos tratados são comparadas com o grupo controle, os tratamentos mostraram maior expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-12. Sendo a expressão do grupo tratado com Pasteur/CP09720 superior ao tratado com BCG Pasteur. Por outro lado, a menor expressão da IL-10 nos mesmos grupos indica que genes imunossupressores não são induzidos.

O aumento na expressão de macrófagos modula a progressão do tumor por meio de processos angiogênicos, fibrocísticos e de imunovigilância, permitindo que assumam papéis anti e pró-tumorais (VAROL et al., 2015; ZHANG; ZHANG, 2020). A ação antitumoral dessas células pode ser explicada por promover a inflamação do microambiente tumoral ao recrutar células T. Para isso, os macrófagos expressam CD86 e IL-12 e ativam vias de indução de fibrose (INGERSOLL, 2018; BENITEZ, 2020; PETTENATI; SFAKIANOS et al., 2021). Por outro lado, os macrófagos associados ao tumor (TAMs) estão relacionados com a maior recorrência do tumor e imunossupressão de células T (ZHANG; ZHANG, 2020; SFAKIANOS et al., 2021).

Na imunoterapia com BCG, a expressão de células T é essencial para a indução da resposta imune, uma vez que quando essas células estão ausentes, as propriedades adjuvantes do sistema imune não são observadas mesmo após o tratamento com BCG (PETTENATI; INGERSOLL, 2018).

4. CONCLUSÕES

Neste experimento, uma nova cepa de BCG recombinante foi construída a partir da tecnologia do DNA recombinante, a BCG Pasteur/CP09720. Com base nos resultados obtidos, a expressão do antígeno heterólogo CP09720 pela cepa de BCG Pasteur promoveu a resposta imune em células de macrófagos, aumentando a expressão de citocinas pró-inflamatórias, embasando o potencial imunoterápico e antitumoral dessa construção. Os resultados ainda abrem espaço para que novas análises e estudos pré-clínicos possam ser conduzidos, visando obter dados mais esclarecedores sobre o comportamento e mecanismos envolvidos no tratamento com a nova cepa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENITEZ, M. L. R. et al. Mycobacterium bovis BCG in metastatic melanoma therapy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 19, p. 7903–7916, ago. 2019.

BENITEZ, M. L. R. Avaliação de novas terapias in vitro contra o melanoma e câncer de bexiga. 2020. 141 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next Generation. **Cell**, [S.L.], v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

NETEA, M. G.; CREVEL, R. V. BCG-induced protection: Effects on innate immune memory. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 6, p. 512–517, dez. 2014.

NETEA, M. G. et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 375–388, mar. 2020.

PETTENATI, C.; INGERSOLL, M. A. Mechanisms of BCG immunotherapy and its outlook for bladder cancer. **Nature Reviews Urology**, v. 15, n. 10, p. 615–625, jul. 2018.

RILEY, R. S. et al. Delivery technologies for cancer immunotherapy. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 18, n. 3, p. 175–196, mar. 2019.

SFAKIANOS, J. P. et al. Bacillus Calmette-Guerin (BCG): Its fight against pathogens and cancer. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 39, n. 2, p. 121–129, fev. 2021.

VAROL, C. et al. Macrophages: Development and Tissue Specialization. **Annual Review of Immunology**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 643–675, mar. 2015.

XIA, L. et al. The cancer metabolic reprogramming and immune response. **Molecular Cancer**, v. 20, n. 1, fev. 2021.

ZHANG, Y.; ZHANG, Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. **Cellular & Molecular Immunology**, [S.L.], v. 17, n. 8, p. 1–15, jul. 2020.