



MARIA ANA GONÇALVES REIS

Licenciada em Biologia Molecular e Genética

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS PARA TRATAMENTO DO CANCRO DA MAMA

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

Orientador: Professora Doutora Paula Videira, Professora
Auxiliar Convidada – Faculdade de Ciências Médicas da UNL

Co-orientadores: PhD Carlos Novo, Investigador Auxiliar –
Instituto de Higiene e Medicina Tropical da UNL

Dra Mylène Carrascal, Aluna de Doutoramento - Faculdade de
Ciências Médicas da UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Novembro 2014

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS PARA TRATAMENTO DO CANCRO DA MAMA

Copyright Maria Ana Gonçalves Reis, 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

RESUMO

ABSTRACT

ÍNDICES

Nota Prévía: Esta tese foi escrita em português com o acordo ortográfico de 1990.

Agradecimentos

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

- Y Ao grupo de Glicoinmunologia do CEDOC da Faculdade de Ciências Médicas, por me receber no seu laboratório;
- Y À Professora Doutora Paula Videira, pela oportunidade oferecida e apoio no âmbito desta dissertação e ao Professor Doutor Carlos Novo por toda a ajuda e por todos os ensinamentos sobre a tecnologia de hibridoma;
- Y À Mylène Carrascal por toda a ajuda preciosa e constante, pelos bons conselhos, disponibilidade, paciência e amizade no decorrer da tese;
- Y À Doutora Guadalupe Cabral e à Doutora Zélia Silva, pela disponibilidade, amizade, ajuda e bons conselhos e ao doutorando Hélio Crespo pelo apoio durante o trabalho;
- Y Ao Doutor Dário Ligeiro pelos ensinamentos de microscopia confocal e ao Doutor José Ramalho por toda a disponibilidade com a criação da nova linha celular;
- Y Ao grupo do Departamento de Imunologia, em especial à Doutora Catarina, à D. Filomena, à D. Glória e à D. Luísa por toda a simpatia e ajuda quando necessário;
- Y Às colegas e amigas de laboratório Inês Iria, Graça Marques, Marília Pereira, Mariana Silva e Diana Sousa por toda a ajuda, boa disposição e por todos os momentos de animação, dentro e fora do laboratório;
- Y A toda a minha família que esteve sempre presente e me apoiou. Em especial, aos meus pais Ana Maria e José e aos meus maninhos José Nuno, Sofia e Manuel por todo o apoio e amor constante;
- Y Aos meus avós Maria Alice e Alfredo por todas as “lições de vida” e pela presença incondicional em todos os momentos da minha vida. À tia Luísa pela pessoa fantástica que é e por todos os “mimos”;
- Y A todos os meus amigos que me deram sempre força no decorrer do trabalho, em especial às amigas de longa data Raquel Esteves, Catarina Subtil, Margarida Albuquerque, Rita Silva, Luísa Figueiredo, Ana Xavier e Marta Costa.

Resumo

A terapia anti-cancro baseada em anticorpos monoclonais tem vindo a ser atractiva na medida em que os anticorpos têm a capacidade de reconhecer especificamente antigénios alvo associados a cancro e de serem reconhecidos por células do sistema imunitário. Um dos antigénios que tem vindo a ser estudado é o glicano sialil-Tn (STn), presente na maioria dos carcinomas humanos e aproximadamente em 30% dos casos de cancro da mama.

O objectivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de novos anticorpos terapêuticos contra STn. Especificamente, foi estudada a imunogenicidade de diferentes antigénios baseados em STn na produção desses anticorpos. Através da análise dos soros, verificou-se uma resposta imune com produção de anticorpos pelos murganhos imunizados, em separado, com mucina¹ decorada com STn, mucinas de origem animal STn⁺ e lisados celulares STn⁺. Contrariamente, a imunização com STn associado a treonina ou poliacrilamida não desencadeou nenhuma resposta imunológica. Assim, percebeu-se que o STn é muito pouco imunogénico, e que a imunogenicidade deste depende do seu acoplamento a proteínas (mucinas) e da densidade do glicano a decorar as mesmas. Os sobrenadantes da cultura dos hibridomas obtidos pela fusão celular foram analisados por citometria de fluxo. Embora, se esperasse obter hibridomas produtores de anticorpos anti-STn, isto não se verificou. Uma das hipóteses levantadas está relacionada com a tolerância imunológica induzida por este antigénio, tal como verificado anteriormente pelo nosso e outros grupos de investigação. Assim, novas imunizações estão a ser realizadas com alterações relevantes no protocolo.

A segunda parte deste trabalho consistiu na criação (transdução lentiviral) e análise (citometria de fluxo e RT-PCR) da linha celular fluorescente MCF-7/GFP STn⁺, que permitirá analisar o mecanismo de acção dos anticorpos anti-STn futuramente produzidos.

A realização deste trabalho permitiu otimizar diversas técnicas e passos-chave importantes para o desenvolvimento de anticorpos terapêuticos anti-STn para cancro da mama ou outros cancros que expressem STn.

Palavras-chave:

sialil-Tn, ST6GalNAc-I, anticorpos anti-STn, antigénios baseados em STn, cancro da mama

Abstract

Anti-cancer therapy based on monoclonal antibodies has been attractive to the extent that the antibodies have the ability to recognize specifically target antigens associated with cancer and recognized by cells of the immune system. One of the antigens that has been studied is the glycan sialyl-Tn (STn), present in most human carcinomas and approximately 30% of breast cancer cases.

The overall aim of this work was the development of novel therapeutic antibodies against STn. Specifically, has been studied the immunogenic potential of different STn-based antigens in the production of these antibodies. Through analysis of mice's serum, it was found an immune response with antibody production by immunized mice, separately, with STn decorated mucin1, mucins of animal origin consisting of STn and STn⁺ cell lysates. In contrast, immunization with the STn associated with threonine or polyacrylamide did not trigger any immune response. Thus, it was noticed that the STn is poorly immunogenic, and the immunogenicity of this depends on your coupling of proteins (mucins) and density of the glycan decorating the same. The supernatants of culture of hybridoma obtained by cell fusion process were analyzed by flow cytometry. Although, it was expected to obtain hybridomas with the ability to secrete anti-STn antibodies, this was not the case. One of the assumptions is related to immune tolerance induced by this antigen, as verified previously by our and other research groups. Thus, new immunizations are being conducted with relevant amendments to the protocol.

The second part of this work consisted in the creation (lentiviral transduction) and analysis (flow cytometry and RT-PCR) of fluorescent cell line MCF-7/ GFP STn⁺, which will make it possible to analyze the mechanism of action of antibodies anti-STn produced in the future.

The realization of this work made it possible to optimize various techniques and key steps that are important for the development of therapeutic antibodies anti-STn for breast cancer or other cancers that express STn.

Keywords:

sialyl-Tn, ST6GalNAc-I, antibodies anti-STn, STn-based antigens, breast cancer

O trabalho desenvolvido até ao momento deu origem a:

- **Dois posters:**

Maria Reis, Mylène Carrascal, Carlos Novo, Paula Videira. “Generation of Antibodies for the Treatment of Breast Cancer” – EMBO Workshop on Glycobiology and glycochemistry: Applications to human health and disease, Lisboa (26 a 30 Maio 2014).

Maria Reis, Mylène Carrascal, Carlos Novo, Paula Videira. “Generation of Antibodies for the Treatment of Breast Cancer” – Glyco-T, Porto (18 a 21 Junho 2014).

- **Uma apresentação oral:**

Maria Reis, Mylène Carrascal, Carlos Novo, Paula Videira. “Produção de anticorpos para o tratamento do cancro da mama” – III Jornadas Intercalares das Dissertações anuais dos Mestrados dos Departamentos de Química e de Ciências da Vida da FCT/UNL. Lisboa, Portugal (6 Fevereiro 2014).

Índice da dissertação

1	Introdução	1
1.1	Cancro da mama	1
1.1.1	Factores de risco	1
1.1.2	Sinais, sintomas e diagnóstico	1
1.1.3	Estadiamento e classificação molecular	2
1.1.4	Tratamento	4
1.2	Glicosilação	4
1.2.1	Glicoproteínas	5
1.2.1.1	O-glicosilação	6
1.2.2	Ácidos siálicos	7
1.2.2.1	Sialidades e sialiltransferases	7
1.2.3	Alterações da glicosilação no cancro	8
1.2.3.1	O antigénio sialil-Tn (STn)	9
1.2.3.1.1	Estrutura e biossíntese do antigénio STn	9
1.2.3.1.2	Antigénio associado a tumor	10
1.2.3.1.3	Detecção de STn no soro e valor do prognóstico de STn em cancro	10
1.2.3.2	Glicoproteína mucina 1	11
1.3	Sistema imunológico	12
1.3.1	Imunidade inata	12
1.3.2	Imunidade adquirida ou adaptativa	12
1.3.2.1	Anticorpos	13
1.3.2.1.1	Anticorpos monoclonais	14
1.3.2.1.1.1	Produção de anticorpos in vitro	16
1.3.3	Imunoterapia contra o cancro	16
1.3.3.1	Imunoterapia para cancro da mama	18
1.3.3.1.1	<i>Theratope</i> : imunoterapia dirigida STn	18
1.3.3.1.2	Anticorpos monoclonais anti-STn	19
1.3.3.2	Engenharia de anticorpos: anticorpos biespecíficos	20
1.4	Introdução ao tema da tese	21
2	Materiais e Métodos	23
2.1	Cultura e manutenção das linhas celulares	23
2.2	Produção de anticorpos monoclonais por tecnologia de hibridoma	23
2.2.1	Cultura e manutenção dos hibridomas	25
2.3	Técnicas laboratoriais	25

2.3.1	Citometria de Fluxo	25
2.3.2	<i>Western blot</i>	26
2.3.3	Microscopia Confocal	26
2.3.4	ELISA.....	27
2.3.5	Reacção de polimerização em cadeia em tempo real quantitativo (RT-PCR).....	27
2.4	Caracterização glicosídica das linhas celulares de cancro da mama	28
2.5	Seleção positiva de células STn⁺ por microesferas magnéticas	29
2.6	Avaliação da tecnologia de hibridoma para produção de anticorpos anti-STn	29
2.6.1	Análise da reactividade dos soros dos murganhos imunizados e dos sobrenadantes da cultura dos hibridomas por citometria de fluxo	30
2.6.1.1	Análise do tipo imunoglobulinas produzidas nos murganhos imunizados	31
2.6.2	Análise da reactividade dos soros dos murganhos imunizados por <i>Western blot</i>	31
2.6.3	Análise da reactividade do soro do murganho imunizado, por microscopia confocal	32
2.6.4	Análise da reactividade do soro do murganho imunizado e de um sobrenadante da cultura de hibridoma pela técnica de ELISA indirecta.....	33
2.7	Criação de um novo modelo celular a expressar o antígeno sialil-Tn	33
2.7.1	Transformação bacteriana.....	34
2.7.2	Extracção, quantificação e avaliação da integridade do DNA plasmídico	34
2.7.3	Transdução lentiviral numa linha de cancro da mama.....	35
2.7.4	Avaliação da transdução da construção pLenti6/st6galnac-I na linha MCF-7/GFP.....	35
2.7.4.1	Análise fenotípica por citometria de fluxo.....	35
2.7.4.2	Análise da expressão genética, por RT-PCR.....	36
3	Resultados	37
3.1	Caracterização fenotípica das linhas celulares de cancro da mama.....	37
3.2	Avaliação do efeito imunogénico de diferentes antígenos baseados em STn.....	38
3.2.1	Análise do efeito imunogénico de STn associado a treonina e a poliacrilamida	39
3.2.2	Avaliação da imunogenicidade do antígeno MUC1-STn para produção de anticorpos anti-STn	39
3.2.3	Avaliação do papel imunogénico dos antígenos BSM e OSM para produção de anticorpos anti-STn	42
3.2.3.1	Estudo da resposta imunológica humoral do murganho imunizado com BSM.....	43
3.2.3.2	Estudo da resposta imunológica humoral do murganho imunizado com OSM	44
3.2.3.2.1	Análise da reactividade do soro do murganho imunizado com OSM, por <i>Western blot</i>	46
3.2.3.2.2	Análise da reactividade do soro do murganho imunizado com OSM, por microscopia confocal	49
3.2.4	Análise do efeito imunogénico de lisados celulares tumorais STn ⁺ na produção de anticorpos anti-STn	51

3.2.5	Estudo da reactividade do soro do murganho imunizado, por citometria de fluxo e <i>Western blot</i>	51
3.2.5.1	Análise da reactividade do sobrenadante da cultura dos hibridomas, por citometria de fluxo e ELISA indirecta.....	54
3.3	Caracterização no novo modelo celular MCF-7/GFP STn⁺.....	56
3.3.1	DNA plasmídico (pDNA) pLenti6/V5-D-TOPO	57
3.3.2	Análise fenotípica da linha celular MCF-7/GFP STn ⁺ , por citometria de fluxo.....	58
3.3.3	Análise genética da linha celular MCF-7/GFP STn ⁺ , por RT-PCR.....	58
4	Discussão.....	59
4.1	Caracterização fenotípica das linhas celulares de cancro da mama.....	59
4.2	Murganho imunizado com a quimera MUC1-STn induziu tolerância imunológica	61
4.3	Mucinas de origem animal como antigénios: OSM é mais imunogénico que BSM	62
4.4	Lisados celulares STn ⁺ como antigénios para produção de anticorpos anti-STn.....	65
4.5	Optimização da técnica de ELISA indirecta para análise de sobrenadantes anti-STn	67
4.6	Desenvolvimento de uma linha celular de cancro da mama a expressar STn	67
4.7	Perspectivas futuras	68
4.8	Conclusões gerais.....	69
	Bibliografia	71

Índice de figuras

Figura 1.1	Glicanos livres ou presentes em glicoconjugados secretados ou de membrana	5
Figura 1.2	Passos iniciais da via de biossíntese dos O-glicanos	6
Figura 1.3	Estrutura do ácido <i>N</i> -acetilneuramínico (Neu5Ac)	7
Figura 1.4	Vias de biossíntese de O-glicanos em células de mama normais e células de cancro da mama	9
Figura 1.5	Antigénio sialil-Tn	9
Figura 1.6	Representação da mucina 1 normal e alterada glicosidicamente	11
Figura 1.7	Tecnologia de hibridoma para produção de anticorpos monoclonais	16
Figura 1.8	Imagem representativa da ligação do anticorpo biespecífico (a) e anticorpo biespecífico trifuncional (b) entre uma célula tumoral STn ⁺ e células efectoras.	20
Figura 3.1	Análise do soro do murganho imunizado com MUC1-STn contra a linha MDA-MB-231 STn ⁺ , tratada (verde) ou não com sialidase (roxo) e da expressão de STn detectada com o anticorpo TKH2 (rosa) nas células não tratadas (a), por citometria de fluxo. Análise da expressão de STn contra a linha MDA-MB-231 STn ⁺ , tratada (azul) ou não com sialidase (rosa) (b), por citometria de fluxo. A cinzento encontra-se representado o controlo negativo de marcação, ou seja, células apenas marcadas com anticorpo secundário.	39
Figura 3.2	Análise do tipo de imunoglobulinas presentes no soro do murganho imunizado com MUC1-STn contra a linha celular MDA-MB-231 STn ⁺ : imunoglobulina do tipo Ig (laranja) (a), do isotipo IgM (azul claro) e do isotipo IgG (verde claro) (b), por citometria de fluxo. A cinzento está representado o controlo negativo de marcação do tipo Ig (a), a azul escuro o controlo negativo de marcação IgM e a verde escuro o controlo negativo de marcação IgG (b).	40
Figura 3.3	Análise do soro do murganho imunizado com MUC1-STn, obtido da amostra de sangue recolhida no dia da fusão celular, contra a linha celular MDA-MB-231 STn ⁺ (a) tratada (verde) ou não com sialidase (roxo) e contra a linha celular MCR STn ⁺ (b) não tratada (roxo), por citometria de fluxo. A rosa encontra-se marcado o controlo positivo de marcação anti-STn nas células não tratadas e a cinzento o controlo negativo de marcação das células marcadas apenas com o anticorpo secundário.	41
Figura 3.4	Análise da reactividade e do tipo de imunoglobulinas presentes no soro do murganho após a 1 ^a (amarelo), 2 ^a (laranja) e 3 ^a (castanho) imunização com MUC1-STn contra a linha celular MDA-MB-231 STn ⁺ : imunoglobulina do tipo Ig (a), do isotipo IgG (b) e do isotipo IgM (c), por citometria de fluxo. A cinzento encontra-se representado o controlo negativo correspondente a cada marcação.	42
Figura 3.5	Análise da reactividade e do tipo de imunoglobulinas presentes no soro do murganho antes da 1 ^a imunização (amarelo), após a 1 ^a imunização (laranja), 2 ^a (castanho) e 3 ^a (vermelho) imunização com BSM contra a linha celular MDA-MB-231 STn ⁺ : imunoglobulina do tipo Ig (a), do isotipo IgG (b) e do isotipo IgM (c), por citometria de fluxo. A cinzento encontra-se representado o controlo negativo correspondente a cada marcação.	43
Figura 3.6	Análise do soro do murganho imunizado com OSM, contra a linha celular MDA-MB-231 STn ⁺ (a) tratada (verde) ou não com sialidase (roxo) e contra a linha celular MCR STn ⁺ (b) não tratada (roxo), por citometria de fluxo. A rosa encontra-se marcado o controlo positivo de marcação anti-STn nas células não tratadas e a cinzento o controlo negativo de marcação das células marcadas apenas com o anticorpo secundário.	44
Figura 3.7	Análise do tipo de imunoglobulinas presentes no soro do murganho imunizado com OSM contra a linha celular MDA-MB-231 STn ⁺ : imunoglobulina do tipo Ig (laranja) (a), do isotipo IgM (azul) e do isotipo IgG (verde claro) (b), por citometria de fluxo. A cinzento está representado o controlo negativo de marcação do tipo Ig (a), a azul escuro o controlo negativo de marcação IgM e a verde escuro o controlo negativo de marcação IgG (b).	45
Figura 3.8	Análise do soro do murganho imunizado com OSM, obtido da amostra de sangue recolhida no dia da fusão celular, contra a linha celular MDA-MB-231 STn ⁺ (a) tratada (verde) ou não com sialidase (roxo) e contra a linha celular MCR STn ⁺ (b) tratada (verde) ou não tratada (roxo), por citometria de fluxo. A rosa encontra-se marcado o controlo positivo de marcação anti-STn das células não tratadas e a cinzento o controlo negativo de marcação das células marcadas apenas com o anticorpo secundário.	45
Figura 3.9	Análise por <i>Western blot</i> das proteínas STn ⁺ presentes nos lisados proteicos da linha celular MDA-MB-231 STn ⁺ e da linha MCR STn ⁺ (a), e lisados proteicos da linha MCR STn ⁺ tratada ou não com sialidase (b), com marcação com o soro do murganho imunizado com OSM.	46
Figura 3.10	Análise por <i>Western blot</i> das proteínas STn ⁺ presentes nos lisados proteicos da	47

	linha celular MDA-MB-231 STn ⁺ tratada ou não com sialidase. Primeira marcação com o soro do murganho imunizado com OSM e segunda marcação com o controlo positivo de marcação anti-STn TKH2.	
Figura 3.11	Análise por <i>Western blot</i> das proteínas STn ⁺ presentes na amostra MUC1-STn tratada ou não com sialidase e marcada com o controlo positivo de marcação TKH2. Análise das amostras MUC1-STn e BSM, ambas tratadas ou não enzimaticamente, marcadas com o soro do murganho imunizado com OSM.	48
Figura 3.12	Imagens de microscopia confocal das células da linha celular MDA-MB-231 STn ⁺ marcadas com o anticorpo positivo de marcação anti-STn (TKH2) ou com o soro do murganho imunizado com OSM. A vermelho encontra-se marcado o núcleo das células com TO-PRO3.	49
Figura 3.13	Imagens de microscopia confocal das células da linha celular MCF-7 STn ⁺ marcadas com o anticorpo positivo de marcação anti-STn (TKH2) ou com o soro do murganho imunizado com OSM. A vermelho encontra-se marcado o núcleo das células com TO-PRO3.	50
Figura 3.14	Imagens de microscopia confocal das células da linha celular MCR STn ⁺ e MCR CN marcadas com o anticorpo positivo de marcação anti-STn (TKH2) ou com o soro do murganho imunizado com OSM. A vermelho encontra-se marcado o núcleo das células com TO-PRO3.	51
Figura 3.15	Análise do soro do murganho imunizado com lisados celulares STn ⁺ contra a linha MDA-MB-231 STn ⁺ , tratada (verde) ou não com sialidase (roxo) e da expressão de STn com o anticorpo TKH2 (rosa) nas células não tratadas (a), por citometria de fluxo. A cinzento encontra-se representado o controlo negativo de marcação, ou seja, células apenas marcadas com anticorpo secundário.	52
Figura 3.16	Análise do soro do murganho imunizado com lisados celulares STn ⁺ , obtido da amostra de sangue recolhida no dia da fusão, contra a linha celular MCR STn ⁺ tratada (verde) ou não com sialidase (roxo), por citometria de fluxo. A rosa encontra-se marcado o controlo positivo de marcação anti-STn das células não tratadas e a cinzento o controlo negativo de marcação das células marcadas apenas com o anticorpo secundário.	52
Figura 3.17	Análise por <i>Western blot</i> das proteínas STn ⁺ presentes nos lisados proteicos da linha celular MDA-MB-231 STn ⁺ , MDA-MB-231 WT e da linha MCF-7 STn ⁺ , tratada ou não com sialidase, com marcação com o soro do murganho imunizado com lisados celulares STn ⁺ .	53
Figura 3.18	Análise por <i>Western blot</i> das proteínas STn ⁺ presentes nas amostras MUC1-STn e BSM, ambas tratadas ou não enzimaticamente, marcadas com o soro do murganho imunizado com lisados celulares STn ⁺ .	54
Figura 3.19	Análise da positividade dos sobrenadantes (preto) do hibridoma 2D6 contra a linha celular MCR STn ⁺ (a) e do hibridoma 2B4 contra a linha celular linha MDA-MB-231 STn ⁺ (b), obtidos após o processo de fusão celular. A rosa encontra-se marcado o controlo positivo de marcação anti-STn TKH2 e a cinzento o controlo negativo de marcação das células marcadas apenas com o anticorpo secundário.	54
Figura 3.20	Análise da positividade do sobrenadante do hibridoma 3B1 (preto), obtido após o processo de fusão celular, contra a linha celular MDA-MB-231 STn ⁺ (a). Análise da especificidade do sobrenadante 3B1 contra a linha celular MDA-MB-231 STn ⁺ (b), tratada (azul) ou não (preto) com sialidase. A rosa encontra-se marcado o controlo positivo de marcação anti-STn TKH2 e a cinzento o controlo negativo de marcação das células marcadas apenas com o anticorpo secundário.	55
Figura 3.21	Análise da reactividade do anticorpo anti-STn TKH2 (1:50) contra diferentes concentrações de BSM colocadas a revestir os poços de uma placa de ELISA.	56
Figura 3.22	Confirmação da integridade do pDNA pLenti6/V5-D-TOPO, por electroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v), 80V, 1h	57

Índice de tabelas

Tabela 1.1	Classificação TNM do cancro da mama 2010	3
Tabela 1.2	Principais características das cinco classes de imunoglobulinas	14
Tabela 1.3	Anticorpos monoclonais aprovados para terapia de cancro	15
Tabela 1.4	Anticorpos monoclonais anti-STn mais usados	19
Tabela 2.1	Antígenos baseados em STn e respectiva massa utilizada por imunização nos murganhos Balb/c	24
Tabela 3.1	Análise da marcação com lectinas e anticorpos das linhas celulares de cancro da mama tratadas ou não com sialidase, por citometria de fluxo	37

Índice dos anexos

Anexo I	Plasmídeo pLenti6/V5-D-TOPO utilizado na transdução da linha celular MCF-7/GFP	2
Anexo II	Constituição de soluções utilizadas neste trabalho	4
Anexo III	Sumário submetido para o congresso “Glyco-T 2014”	6
Anexo IV	Sumário submetido para o Workshop da EMBO 2014 “Glycobiology & glycochemistry: Applications to human health and disease”	8

Abreviaturas e siglas

ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
bsAb	Anticorpo biespecífico
BSM	<i>Bovine submaxillary mucin</i>
CDC	citotoxicidade dependente do complemento
CDRs	regiões determinantes da complementaridade
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
epCAM	Molécula de adesão celular epitelial
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
Fc	<i>Fragment cristallizable</i>
FITC	Fluoresceína isotiocianato
Gal	galactose
GalNac	<i>N</i> -acetilgalactosamina
GFP	Proteína verde fluorescente
GlcNac	<i>N</i> -acetilglucosamina
HCl	ácido clorídrico
HER2	receptor-2 para o factor de crescimento epidérmico humano
HRP	<i>enzyme horseradish peroxidase</i>
Ig	imunoglobulina
IHQ	imunohistoquímica
IL	interleucina
KLH	<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
LB	<i>Luria-Bertani</i>
MAA	<i>Maackia amurensis</i>
mAb	Anticorpo monoclonal
MAC	Complexo de ataque à membrana
MCF-7	Michigan Cancer Foundation - 7
MFI	Intensidade de Fluorescência Média
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
MUC1	Mucina 1
Neu5Ac	ácido <i>N</i> -acetilneuramínico
NK	<i>Natural Killer</i>
OSM	<i>Ovine submaxillary mucin</i>
PAA	Poliacrilamida
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reacção em cadeia de polimerase
PE	ficoeritrina

PEG	polietilenoglicol
PEI	<i>Polyethylenimine</i>
PNA	<i>Peanut agglutinin lectin</i>
ppGalNAcTs	polipéptido <i>N</i> -acetilgalactosaminiltransferase
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RE	receptor de estrogénio
RP	receptor de progesterona
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reacção de polimerização em cadeia em tempo real
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNA	<i>Sambucus nigra</i>
STn	Antigénio sialil-Tn
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
Thr	treonina
triAb	Anticorpo biespecífico trifuncional
UDP	uridina difosfato

Dissertação

1 Introdução

1.1 Cancro da mama

O cancro da mama consiste na proliferação maligna das células epiteliais que revestem os ductos e lóbulos da mama. Actualmente, a neoplasia epitelial maligna da mama representa a causa de cancro mais comum em mulheres (excluindo o cancro de pele), sendo a proporção entre homens e mulheres de 1:150 (Hortobagyi et al., 2005; Longo et al., 2010). Em 2013, nos Estados Unidos surgiram aproximadamente 232340 novos casos de cancro da mama em mulheres e 2240 novos casos em homens, sendo o número de mortes de 39620 e 410, respectivamente (dados do *National Cancer Institute* - <http://www.cancer.gov>). Em Portugal, anualmente são detectados cerca de 4500 novos casos de cancro da mama e 1500 mulheres morrem com esta doença (dados da Liga Portuguesa Contra o Cancro - www.ligacontracancro.pt).

1.1.1 Factores de risco

Embora não seja conhecida uma causa específica associada ao aparecimento do cancro da mama, tem sido demonstrado que algumas mulheres apresentam um risco elevado para o aparecimento deste tipo de neoplasia, o que se pensa estar associado a determinados factores de risco (factores que aumentam a probabilidade de uma pessoa desenvolver uma doença) (Liga Portuguesa Contra o Cancro). A idade e o sexo feminino são considerados os principais factores de risco, com taxas de incidência que aumentam rapidamente entre os 35 e 39 anos de idade (Benson et al., 2009). A idade da primeira menstruação, da primeira gravidez e da menopausa representam três fases de risco na vida de uma mulher com um grande impacto na incidência do cancro da mama. Factores hereditários, sejam eles familiares ou genéticos, como mutações nos genes *BRCA 1* e *BRCA 2*, e factores endócrinos exógenos, como a substituição de estrogénio pós-menopausa, contribuem também para o aparecimento da doença. Mulheres com hiperplasia atípica (ductal ou lobular) e história familiar positiva são mais susceptíveis para desenvolverem cancro da mama. O papel da dieta na etiologia neste tipo de cancro é ainda controverso, no entanto o aumento da ingestão de calorias, o consumo de álcool e o ganho de peso estão relacionados com o aumento do risco de aparecimento da doença (Lenhard et al., 2001; Longo et al., 2010).

Apesar de já terem sido identificados e descritos estes factores de risco, não mais de 10% dos casos de cancro da mama estão associados a prédisposições genéticas (Longo et al., 2010) e, apenas um quarto dos casos de cancro da mama considerados esporádicos (a grande maioria) foram associados a algum factor de risco (Benson et al., 2009).

1.1.2 Sinais, sintomas e diagnóstico

De longe, o sinal físico mais comum de cancro na mama é a presença de uma massa que quase sempre é indolor. A retracção dos mamilos bem como alterações ao nível da pele e contorno da mama representam outros sinais e sintomas que sugerem a realização de diagnóstico. Regra geral,

todos os casos de cancro da mama são diagnosticados por biópsia de um nódulo detectado por mamografia ou palpação. A realização de um auto-exame mensal bem como exames anuais à mama realizados por um profissional de saúde e a realização de mamografias regulares são os alicerces para a detecção precoce do cancro da mama, oferecendo a oportunidade de detectar condições pré-malignas e cancros de pequenas dimensões tratáveis (*National Cancer Institute*) (Longo et al., 2010).

Para além disso, podem ser realizados testes laboratoriais específicos como o teste dos receptores hormonais (estrogénio e progesterona) e a pesquisa da sobreexpressão do receptor-2 para o factor de crescimento epidérmico humano (HER2) existente na superfície das células tumorais. Os níveis de proteínas do receptor de estrogénio (RE) e do receptor de progesterona (RP) podem ser determinados, por técnicas de imunohistoquímica (IHQ), em tecidos tumorais primários, ajudando não só na previsão de uma resposta para manipulação hormonal em doença metastática mas também nas implicações do prognóstico para tumor primário. O HER2 tem sido um dos factores de prognóstico mais investigado, uma vez que doentes com tumores a sobreexpressar HER2 têm um elevado risco de recorrência e morte. Adicionalmente, evidências sugerem que tumores a sobreexpressar HER2 são mais resistentes a regimes de quimioterapia e mais sensíveis a antraciclinas. A disponibilidade de anticorpos monoclonais terapêuticos contra HER2, como é o caso do trastuzumab que inibe o crescimento de linhas de células tumorais que expressam em elevados níveis este antigénio, justifica a importância de determinar este marcador (Lenhard et al., 2001).

1.1.3 Estadiamento e classificação molecular

A determinação do estadiamento é realizada de forma a que as terapias sejam seleccionadas com base na categoria e prognóstico do cancro identificado. O sistema de estadiamento da *American Joint Committee On Cancer Staging and End Results Reporting* utiliza a classificação TNM (do inglês *primary tumor, regional nodes, metastasis*) (Tabela 1.1) em que o tumor primário é avaliado com base no tamanho e desenvolvimento na pele e estruturas subjacentes, e os nódulos linfáticos regionais classificados de acordo com a probabilidade de conterem metástases (Lenhard et al., 2001; Longo et al., 2010).

Tabela 1.1 - Classificação TNM do cancro da mama 2010 (adaptada de Longo et al., 2010).

Tumor primário (T)			
T0	Sem evidência de tumor primário		
TIS	Carcinoma <i>in situ</i>		
T1	Tumor ≤2 cm		
T1a	Tumor >0,1 cm mas ≤0,5 cm		
T1b	Tumor >0,5 cm mas ≤1 cm		
T1c	Tumor >1 cm mas ≤2 cm		
T2	Tumor >2 cm mas ≤5 cm		
T3	Tumor >5 cm		
T4	Extensão à parede torácica, inflamação, lesões satélite, ulcerações		
Nódulo linfático regional (N)			
PNO(I-)	Ausência histológica de metástases nos nódulos linfáticos regionais, IHQ negativo		
PNO(I+)	Ausência histológica de metástases nos nódulos linfáticos regionais, IHQ positivo, nenhum agregado de IHQ >0,2 mm		
PNO(mol-)	Ausência histológica de metástases nos nódulos linfáticos regionais, análise molecular negativa (RT-PCR)		
PNO(mol+)	Ausência histológica de metástases nos nódulos linfáticos regionais, análise molecular positiva (RT-PCR)		
PN1	Metástases em 1 a 3 nódulos linfáticos axilares, ou em nódulos mamários internos com doença microscópica detectada pela dissecação do nódulo linfático sentinela		
PN1 ml	Micrometástases (>0,2 mm; nenhum > 2mm)		
PN1 a	Metástases em 1 a 3 nódulos linfáticos axilares		
PN1 b	Metástases nos nódulos mamários internos com doença microscópica detectada pela dissecação do nódulo linfático sentinela		
PN1 c	Metástases em 1 a 3 nódulos linfáticos axilares e em nódulos linfáticos mamários internos, com doença microscópica detectada pela dissecação do nódulo linfático sentinela		
PN2	Metástases em 4 a 9 nódulos linfáticos axilares, ou em nódulos linfáticos mamários internos aparentes, na ausência de nódulos linfáticos axilares metastáticos		
PN3	Metástases em 10 ou mais nódulos linfáticos axilares, ou em nódulos linfáticos infraclaviculares ou em nódulos linfáticos mamários internos clinicamente aparentes na presença de um ou mais nódulos linfáticos axilares positivos; ou em mais do que três nódulos linfáticos axilares		
Metástases à distância (M)			
MO	Ausência de metástases à distância		
M1	Metástases à distância		
Grupo de estadiamento			
Estadio 0	TIS	N0	M0
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio IIA	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estadio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Estadio IIIB	T4	Qualquer N	M0
	Qualquer T	N3	M0
Estadio IIIC	Qualquer T	N3	M0
Estadio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Com base na classificação molecular, o cancro da mama pode ser dividido em quatro subtipos principais que se diferenciam pelo seu perfil de expressão genética e fenotípica e que são úteis na caracterização clínica. Estes quatro subtipos correspondem a:

- tumores luminais A em que a maioria é RE⁺, RP⁺, HER⁻ e de baixo grau histológico;
- tumores luminais B, os quais são RE⁺, RP^{+/-}, HER^{+/-} e frequentemente de elevado grau histológico;
- tumores HER2⁺ mas RE⁻ e RP⁻ de elevado grau histológico e, por último,
- tumores do subtipo basal de alto grau histológico também designados por triplos negativos uma vez que são RE⁻, RP⁻ e HER⁻, sendo que a maioria das mulheres portadoras da mutação *BRCA1* têm

tumores deste subtipo (De Abreu et al., 2014; Orphanos and Kountourakis, 2012; Sotiriou and Pusztai, 2009).

1.1.4 Tratamento

O factor mais importante na escolha do tratamento para o cancro da mama reside no estadio da doença. No tratamento para cancro no estadio I e II, regra geral recorre-se a cirurgia (conservadora ou mastectomia), seguida de radioterapia à mama. O cancro da mama de estadio III caracteriza-se por ser uma fase avançada do tumor local, sem aparentes metástases distantes. Neste caso, o tratamento geralmente passa por quimioterapia sistémica neoadjuvante de forma a diminuir o tamanho do tumor local e aumentar a sensibilidade do cancro ao tratamento por mastectomia ou excisão parcial e radioterapia. Por último, em doentes com cancro da mama metastático ou de estadio IV, cujo diagnóstico foi realizado em fase tardia, recorre-se a terapia sistémica adjuvante (quimioterapia e/ou hormonoterapia), de forma a prolongar a sobrevivência do doente. Neste caso, como tratamento recorrente tem sido eficaz o uso de agentes citotóxicos e endócrinos, radioterapia local e sistémica e terapia anti-factor de crescimento para reduzir o tamanho do tumor e minimizar os sintomas (Lenhard et al., 2001).

Em doentes com um baixo risco de rápida progressão ou graves complicações, pode recorrer-se em primeiro lugar à terapia hormonal, uma vez que a resposta ao tratamento pode ser variável e prolongada no tempo. Aproximadamente 60% das mulheres com tumores RE⁺ respondem à terapia hormonal, resultando numa diminuição do volume do tumor ou em períodos de estabilidade. As metástases no osso constituem o local mais comum de progressão do cancro da mama (Lenhard et al., 2001).

Desde os últimos 15 anos que a terapia baseada em anticorpos direccionados para cancro tem sido estabelecida e, actualmente é considerada uma das estratégias melhor sucedidas e importantes para o tratamento de doentes com tumores sólidos. Terapias dirigidas, como por exemplo, anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a antigénios alvo nas células malignas, têm a capacidade de bloquear a proliferação do tumor, antagonizando vias imunológicas importantes na sobrevivência imunológica do cancro (Scott et al., 2012). Estes antigénios alvo podem ser, por exemplo, glicanos que resultam de um mecanismo de glicosilação aberrante e se encontram na superfície das células tumorais.

1.2 Glicosilação

A glicosilação constitui uma das modificações pós-traducionais mais frequentes e importantes que ocorre ao nível das proteínas, podendo afectar a conformação, estabilidade e funcionalidade das mesmas. Este processo caracteriza-se pela ligação covalente de um hidrato de carbono ou glicano à estrutura de uma proteína, lípido, glicano ou outro composto orgânico, formando diferentes glicoconjugados (como glicoproteínas e glicolípidos) (Figura 1.1) (Reis et al., 2010; Varki et al., 2009).

Os glicoconjugados estão envolvidos em diversos processos biológicos como biologia do desenvolvimento, resposta imune, processo inflamatório, proliferação celular e apoptose. Para além disso, participam em fenómenos de diferenciação, migração e sinalização celular, assim como em interacções hospedeiro-patógeno, invasão tumoral e metastização (Campbell and Yarema, 2005; Cazet et al., 2010a; Li et al., 2010; Moremen et al., 2012).

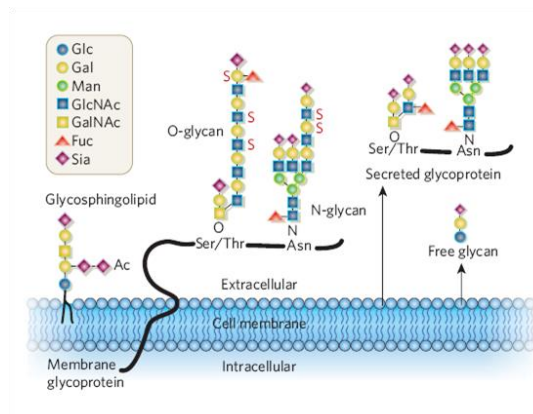


Figura 1.1 Glicanos livres ou presentes em glicoconjugados secretados ou de membrana (Varki, 2007).

1.2.1 Glicoproteínas

A presença de potenciais locais de glicosilação na estrutura das proteínas, bem como a presença ou ausência de enzimas específicas no retículo endoplasmático e complexo de Golgi constituem os elementos chave que determinam a natureza e extensão da glicosilação de uma dada proteína. Assim, existem dois grandes tipos de glicanos associados a glicoproteínas, os *N*-glicanos e os *O*-glicanos (Figura 1.1), que podem existir em simultâneo numa mesma proteína e numa mesma célula (Reis et al., 2010; van Kooyk and Rabinovich, 2008).

A maioria dos *N*-glicanos expressos pelas células humanas caracteriza-se pela ligação covalente de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) a um azoto de um resíduo de asparagina pertencente à sequência aminoácida Asn-X-(Ser/Thr) de uma proteína, onde X pode ser qualquer aminoácido excepto prolina. A biossíntese deste glicano inicia-se no retículo endoplasmático com a transferência de um resíduo de GlcNAc, a partir do precursor uridina difosfato *N*-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), para um lípido intermediário denominado dolicol. De seguida, ocorre a formação de uma estrutura em bloco, designada por dolicol pirofosfato *N*-acetilglucosamina, que será adicionada à proteína que está a ser sintetizada e translocada através da membrana do retículo endoplasmático, após a adição de mais 13 açúcares à sua estrutura. O *N*-glicano já ligado à proteína é subsequentemente remodelado no retículo endoplasmático e complexo de Golgi (Varki et al., 2009).

Um *O*-glicano define-se pela ligação covalente de um monossacárido ao grupo hidroxilo de uma serina ou treonina de uma proteína. Contrariamente à fase de síntese de um *N*-glicano, a biossíntese de um *O*-glicano ocorre de forma sequencial no complexo de Golgi não necessitando de um lípido intermediário durante o seu processo (Varki et al., 2009).

As glicosiltransferases são enzimas geralmente ligadas à membrana, que catalisam a transferência do monossacárido de nucleótidos de açúcar (molécula dadora) para uma molécula aceitadora, estabelecendo ligações glicosídicas. O nível de expressão destas enzimas, bem como especificidade para o substrato e localização nos compartimentos do complexo de Golgi, são responsáveis pelo padrão de glicanos expressos numa determinada célula ou transportados por uma dada glicoproteína. Para além disso, uma vez que diferentes enzimas podem competir para uma mesma estrutura glicosídica aceitadora, a expressão relativa e actividade destas enzimas são decisivas para as estruturas de glicanos expressos em cada célula (Ju et al., 2013; Paulson and Colley, 1989).

1.2.1.1 O-glicosilação

A frequência da O-glicosilação em glicoproteínas é elevada, principalmente em mucinas secretadas ou ligadas à membrana que são ricas em serina e treonina. Nas mucinas, os O-glicanos estão ligados através de resíduo de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc). A biossíntese dos O-glicanos é um processo sequencial que ocorre no complexo de Golgi, através da acção de diversas glicosiltransferases (Reis et al., 2010).

A primeira reacção da via da O-glicosilação é catalisada pelo polipéptido *N*-acetilgalactosaminiltransferase (ppGalNAcTs) que transfere o monossacárido GalNAc de nucleótidos de açúcar, nomeadamente uridina difosfato *N*-acetilgalactosamina (UDP-GalNAc), para um resíduo de serina ou treonina da sequência aminoacídica, formando o antígeno Tn. Em condições normais, o antígeno Tn constitui uma estrutura imatura sendo sempre modificado ou alongado, levando ao aparecimento de outras estruturas (Figura 1.2). A modificação mais frequente é a adição de um resíduo de galactose ao antígeno Tn, formando o antígeno T ou estrutura core 1 da via da O-glicosilação que sofre posterior extensão dando origem a outras estruturas glicosídicas (Cazet et al., 2010a).

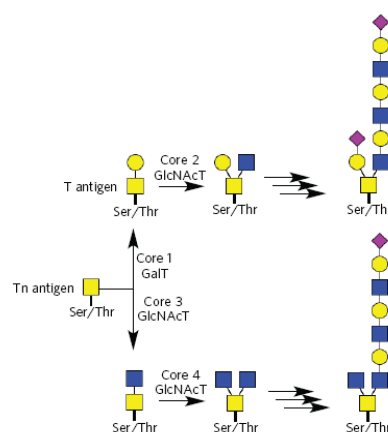


Figura 1.2 Passos iniciais da via de biossíntese dos O-glicanos (Wolfert and Boons, 2013).

Os O-glicanos são os principais componentes da camada mucosa intestinal que cobre o epitélio gastrointestinal e protege o tecido mucosal de potenciais patogénicos perigosos. Este tipo de glicanos desempenha funções importantes em diversos processos biológicos como transdução de sinal,

interacções célula-célula, angiogénese, resposta imune e homeostase (Ju et al., 2011; van Kooyk and Rabinovich, 2008).

Os antígenos Tn, T e sialil Tn (adição de ácido siálico ao antígeno Tn) são considerados antígenos associados a tumores ou TACA (do inglês *Tumor Associated Carbohydrate Antigens*), localizados na superfície de células tumorais e sendo considerados potentes alvos para tratamento do cancro (Cazet et al., 2010a; Rabu et al., 2012).

1.2.2 Ácidos siálicos

Os ácidos siálicos representam uma família de açúcares que possuem uma estrutura de nove átomos de carbonos e que são tipicamente encontrados nas posições terminais de diversas classes de glicanos secretados ou localizados na superfície das células. Esta família compreende mais de 50 compostos com uma grande diversidade estrutural, sendo o ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) (Figura 1.3), o mais predominante em células de mamíferos (Crespo et al., 2013; Schultz et al., 2012; Varki, 2007).

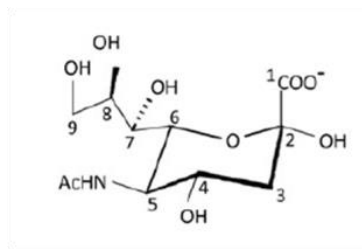


Figura 1.3 Estrutura do ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) (Schultz et al., 2012).

Estes açúcares ácidos estão presentes em vertebrados e invertebrados “superiores” mediando ou modulando diversos mecanismos normais e patológicos. Em virtude da sua carga negativa, os ácidos siálicos possuem diversos papéis estruturais e moduladores como a ligação e o transporte de moléculas positivas bem como a atracção e repulsão de células e moléculas. Para além disso, a biologia da sua estrutura permite que, por um lado mascarem locais de reconhecimento e, por outro, representem um alvo biológico servindo como possíveis locais de ligação para patogénicos, toxinas e outros receptores proteicos (Angata and Varki, 2002; Schauer, 2000).

1.2.2.1 Sialidades e sialiltransferases

Uma das modificações dos glicanos que está associada ao cancro é a sialilação das glicoproteínas. Resultados experimentais obtidos a partir de amostras de tecido de doentes, bem como de modelos animais com cancro e de estudos baseados em cultura de células, sugerem que alterações no processo de sialilação estão na base de um fenótipo celular metastático. A sialilação é regulada por diversas enzimas, incluindo enzimas que controlam a síntese e disponibilidade do substrato dador, o ácido siálico activado (o ácido *N*-acetilneuramínico citidina monofosfato), enzimas que normalmente

adicionam o ácido siálico durante a biossíntese da glicoproteína, designadas por sialiltransferases, e enzimas que geralmente clivam o ácido siálico durante a degradação das glicoproteínas, denominadas por sialidasas ou neuraminidasas. Regra geral, estas enzimas residem no interior de compartimentos intracelulares, com a maioria das sialiltransferases localizadas no complexo de Golgi e muitas das sialidasas localizadas nos lisossomas ou endossomas. Em situações de cancro, já foi observada a actividade aberrante de ambas as enzimas, observando-se níveis de sialilação mais elevados em células tumorais (Schultz et al., 2012).

As sialiltransferases constituem uma família de, pelo menos, 20 enzimas que diferem consoante o tipo de tecido e o tipo de ligação que estabelecem com o resíduo de ácido siálico. Algumas sialiltransferases adicionam o ácido siálico a uma galactose (Gal) através de uma ligação α 2-3, como é o caso da sialiltransferase ST3Gal-I, ao passo que outras adicionam o ácido siálico com uma ligação α 2-6 a uma galactose, como é o caso das sialiltransferases ST6Gal-I e ST6Gal-II, ou a GalNAc, como as sialiltransferases ST6GalNAc (Dall'Olio and Chiricolo, 2001; Schultz et al., 2012). Em simultâneo com a expressão aberrante das sialiltransferases, certas sialidasas são também afectadas em situações de cancro, embora pouco se saiba sobre o papel tumorigénico desta família de enzimas.

Em células tumorais, observa-se frequentemente um aumento da sialilação com ligação do tipo α 2-6, geralmente atribuída à sobreexpressão da sialiltransferase ST6Gal-I envolvida principalmente no processo de sialilação em *N*-glicanos ou a membros da família da sialiltransferase ST6GalNAc responsáveis pela sialilação de *O*-glicanos e glicolípidos (Schultz et al., 2012; Varki and Varki, 2007). Já foi demonstrado que uma modificação do padrão de *O*-glicosilação induzida pelo padrão de expressão de ST6GalNAc-I é suficiente para aumentar a tumorigenicidade de linhas celulares de cancro da mama (Julien et al., 2006). Este enriquecimento selectivo dos resíduos de ácido siálico α 2-6 nas células tumorais é significativo na medida em que a sialilação α 2-6 pode provocar efeitos biológicos muito distintos em comparação com a sialilação α 2-3. Segundo a literatura, a sialilação tem potencial para influenciar o comportamento de células tumorais a diferentes níveis como por exemplo na regulação da conformação, agregação ou retenção à superfície da célula de uma dada glicoproteína, a modulação das interações em *cis* ou *trans* entre dois receptores de superfície distintos, e na formação de ligandos para glicoproteínas envolvidas no controlo das interações célula-célula e célula-matriz (Schultz et al., 2012).

1.2.3 Alterações da glicosilação no cancro

Alterações na glicosilação constituem uma modificação quasi-universal no cancro, resultando na perda de adesão celular, um evento associado ao aumento da invasão celular dos tumores primários para locais mais distantes (metastização). Também tem sido correlacionado o potencial metastático de algumas células tumorais com o aumento da sialilação de glicoproteínas. Assim, uma das modificações mais comuns consiste na expressão de *O*-glicanos truncados na superfície das células (Figura 1.4), como o antigénio pan-carcinoma sialil-Tn (STn) (Cazet et al., 2010b; Reis et al., 2010).

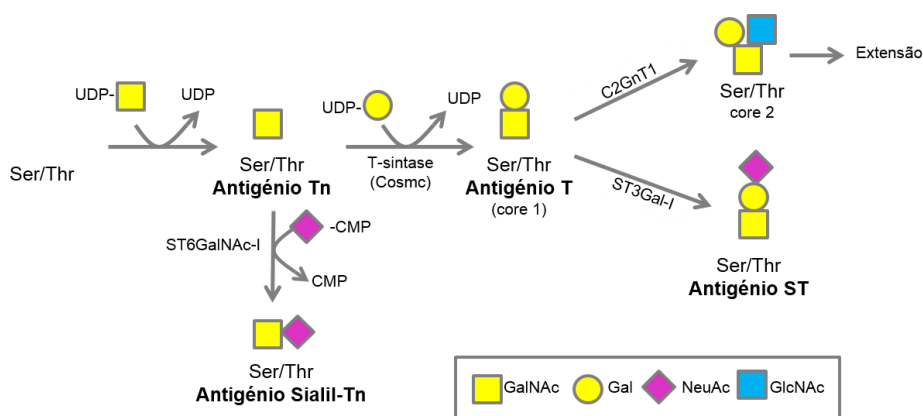


Figura 1.4 Vias de biossíntese de O-glicanos em células de mama normais e células de cancro da mama.

1.2.3.1 O antígeno sialil-Tn (STn)

1.2.3.1.1 Estrutura e biossíntese do antígeno STn

O antígeno STn ou sialil Thomsen-nouvelle, também designado como CD175s, é um antígeno hidrato de carbono associado a tumores, descoberto no início dos anos 80 (Kurosaka et al., 1983) e expresso em mais de 80% dos carcinomas humanos (Cao et al., 1996). Em meados dos anos 90, foi reconhecido o valor deste glicano como marcador de diagnóstico e subsequente prognóstico em cancro, sendo portanto considerado um bom alvo em imunoterapia para cancro da mama. O STn é um pequeno O-glicano sialilado (Figura 1.5), cuja estrutura consiste num dissacárido formado por um resíduo de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) com ligação α -O a um resíduo de serina ou treonina, contendo um resíduo de ácido siálico (Neu5Ac em humanos) ligado no carbono 6 (Julien et al., 2012).

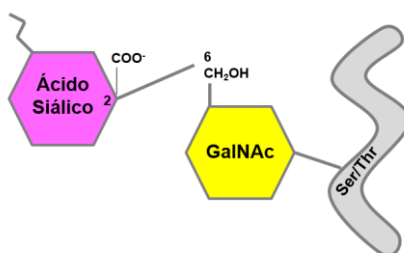


Figura 1.5 Antígeno sialil-Tn.

Durante o processo de O-glicosilação, a sialilação do antígeno Tn vai impedir a extensão normal da cadeia dos O-glicanos levando à formação do produto STn cuja estrutura não pode ser alongada, bloqueando a biossíntese de qualquer outra estrutura glicosídica (Schultz et al., 2012). A expressão de STn depende essencialmente da actividade da sialiltransferase ST6GalNAc-I, podendo ser promovida pela fraca expressão ou actividade de enzimas que competem com outras sialiltransferases para a síntese da estrutura dos O-glicanos. Uma vez que GalNAc é necessário para a transferência do ácido siálico para formar a estrutura STn, a actividade da GalNAc-transferase é também crucial para a expressão deste glicano. Em cancro da mama já foi confirmando o papel

crucial da enzima ST6GalNAc-I na biossíntese do antígeno STn. Verificou-se que a sobreexpressão desta enzima é capaz de competir com a biossíntese da estrutura dos O-glicanos, como foi demonstrado na linha celular de cancro da mama MDA-MB-231, onde a expressão estável de ST6GalNAc-I converteu 22% das estruturas core 1 de O-glicanos transportados pela proteína mucina1 em STn (Julien et al., 2006; Marcos et al., 2011; Sewell et al., 2006).

Por fim, um outro factor descrito como responsável pelo aparecimento do STn são as mutações somáticas no gene *COSMC*, que codifica para uma chaperona molecular necessária para a correcta conformação e actividade da T-sintase, enzima responsável pela síntese do core 1 da via da O-glicosilação (Figura 1.4) (Ju et al., 2014).

1.2.3.1.2 Antígeno associado a tumor

O antígeno STn desempenha um papel importante no fenótipo das células de carcinoma, alterando por completo diversos processos relacionados com a malignidade da doença. A expressão do STn é capaz de modular, por si só um fenótipo maligno, induzindo um comportamento celular mais agressivo, como a diminuição da agregação célula-célula e o aumento da adesão à matriz extracelular, migração e invasão (Pinho et al., 2007). Este antígeno é detectado em diversos tipos de cancro epiteliais, com elevada frequência no carcinoma do pâncreas, ovário, colo-rectal e pulmão, embora esteja praticamente ausente em tecidos adultos normais e fetais. A expressão deste glicano está associada a um mau prognóstico, a uma baixa sobrevivência dos doentes e a uma baixa resposta à quimioterapia adjuvante com ciclofosfamida (Julien et al., 2012; Kinney et al., 1997; Miles et al., 1994; Schultz et al., 2012).

O STn é considerado um bom marcador tumoral e muito útil em diagnóstico, uma vez que a sua sobreexpressão ocorre nos estadios precoces da carcinogénese. Os dados existentes sugerem que o efeito da expressão de STn na invasão das células tumorais poderá ser um fenómeno específico do órgão. No entanto, caracterização *in vitro* através de engenharia de linhas celulares de cancro da mama demonstraram que a expressão de STn induziu uma diminuição na adesão, diminuição da agregação e um aumento na motilidade celular, tudo consistente com o aumento da invasão tumoral (Julien et al., 2012).

1.2.3.1.3 Detecção de STn no soro e valor do prognóstico de STn em cancro

A detecção de marcadores tumorais no soro é um método simples, sensível e não invasivo para diagnóstico ou pós-cirurgia para seguir os doentes com cancro. A presença do antígeno STn no soro ocorre devido à secreção da O-glicoproteína que o transporta ou devido à disseminação das células tumorais para a corrente sanguínea. Esta massa tumoral é normalmente encontrada em cancros de estadio avançado, os quais normalmente apresentam um mau prognóstico. A detecção de STn no soro tem uma maior utilidade para prognóstico do que para fins de diagnóstico e é usualmente considerado como um marcador de mau prognóstico (Julien et al., 2012).

No carcinoma da mama, a sobreexpressão de STn está correlacionada com o RE⁻, que são considerados mais agressivos do que os do tipo RE⁺, e com a expressão de HER2⁺. A associação entre STn e HER2 poderá contribuir para a capacidade das células de cancro crescerem e invadirem, levando a um pior prognóstico. De uma forma geral, a expressão de STn está associada com um resultado adverso no prognóstico, no entanto se STn exerce alguma função biológica para promover o desenvolvimento do tumor, isto ocorre através de vários mecanismos que dependem de cada tipo ou sub-tipo de tumor (Julien et al., 2012; Soares et al., 1996).

1.2.3.2 Glicoproteína mucina 1

A expressão STn em tumores é heterogênea, com proporções de células positivas para STn variando entre 5% a 100%. Este fenómeno é consistente com a origem do tumor e, em cancro da mama, a heterogeneidade deste glicano está relacionada como a expressão da(s) proteína(s) que o transporta. Assim, a expressão de STn pode ser regulada no tumor, via regulação do(s) seu(s) portador(es), como por exemplo a glicoproteína mucina 1 (MUC1) em humanos (Julien et al., 2012).

A MUC1, também designada por CA15-3, é uma proteína de elevada massa molecular normalmente expressa na superfície luminal das células epiteliais e que tem um papel na adesão e sinalização celular. Esta glicoproteína tem vindo a ser testada como um alvo terapêutico em mais de 60 ensaios clínicos uma vez que é sobreexpressa de forma aberrante em muitos carcinomas, incluindo o da mama, sendo portanto considerada um bom alvo para imunoterapia (Croce et al., 2003; Duffy et al., 2000; Kimura and Finn, 2013; Lavrsen et al., 2013).

A glicoproteína MUC1 possui um domínio C terminal que inclui a parte transmembranar e intracelular da proteína, e um domínio N terminal ou extracelular onde está localizada uma região que contém 25-125 repetições de uma sequência de 20 aminoácidos, com cada repetição contendo 3 a 5 O-glicanos (Figura 1.6). Tem sido proposto que o domínio C terminal tem importantes efeitos na sinalização em cancro e sobrevivência enquanto a região VNTR possui diversas características estruturais e funcionais (Madsen et al., 2013).

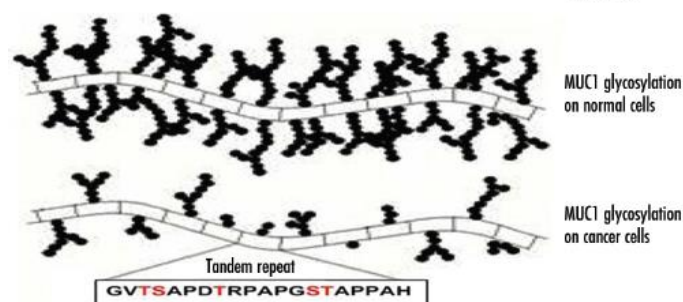


Figura 1.6 Representação da mucina 1 normal e alterada glicosidicamente (Singh and Bandyopadhyay, 2007)

Através do ensaio da CA15-3, a MUC1 aberrantemente glicosilada pode ser detectada uma vez que esta glicoproteína é produzida pelas células de cancro e libertada na circulação. Um valor de

concentração de CA15-3 elevado tem sido útil na avaliação de prognóstico em cancro da mama de estadio inicial e monitorização da evolução da doença, incluindo monitorização dos doentes com doença metastática durante a terapia (Reis et al., 2010). Para além disso, estudos recentes sugerem um novo método com elevado potencial para detecção de cancro da mama com base nesta glicoproteína (Armon-Omer et al., 2014).

1.3 Sistema imunológico

A imunidade pode ser definida como o somatório de todos os mecanismos de defesa de que o organismo humano dispõe para protecção das agressões que o ameaçam como são, entre outras, as doenças infecciosas (Arosa et al., 2012b). As células e moléculas responsáveis pela imunidade constituem o sistema imunológico e a resposta colectiva e coordenada destes componentes à introdução de substâncias estranhas no organismo é designada de resposta imune (Abbas et al., 2012b). O sistema imunológico é constituído pela imunidade inata e imunidade adaptativa ou adquirida contribuindo ambas para a protecção do organismo (Goldsby et al., 2007).

1.3.1 Imunidade inata

A imunidade inata, também designada por imunidade natural ou nativa, encontra-se de alguma forma em todos os organismos multicelulares e constitui a primeira linha de defesa do sistema imunológico. Inclui mecanismos de defesa celulares e moleculares predispostos para a ocorrência de infecções de forma a preveni-las ou eliminá-las nas primeiras horas (Goldsby et al., 2007). Estes mecanismos são específicos para estruturas comuns a grupos de microrganismos relacionados, não sendo capazes de distinguir pequenas diferenças entre eles. Os principais componentes da imunidade inata são as barreiras químicas e físicas, como a pele e químicos anti-microbianos (muco) produzidos nas superfícies epiteliais; as células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos); células dendríticas e células *Natural Killer* (NK); proteínas do sangue, incluindo membros do sistema do complemento e outros mediadores de inflamação e, por fim, proteínas designadas de citocinas que regulam e coordenam muitas das actividades das células deste tipo de imunidade não específica. A fagocitose representa um dos principais mecanismos de suporte da imunidade inata e consiste no processo pelo qual material particulado é ingerido pelas células fagocíticas sendo posteriormente destruído ou neutralizado (Abbas et al., 2012b; Arosa et al., 2012b).

1.3.2 Imunidade adquirida ou adaptativa

A imunidade adquirida ou adaptativa representa a segunda linha de defesa do organismo, estando apenas presente em organismos vertebrados. Depende da imunidade inata e inicia-se poucos dias após o início das infecções de forma a eliminá-las quando estas escapam à primeira linha de defesa e persistem. Os principais componentes da imunidade adquirida são as células B e T e os anticorpos produzidos pelas células B. Este tipo de imunidade é capaz de reconhecer e eliminar selectivamente

microrganismos ou moléculas como antígenos estranhos de forma específica (especificidade antigénica), sendo os anticorpos capazes de distinguir entre duas moléculas proteicas que diferem em apenas um aminoácido. Uma consequência importante da resposta imune adaptativa é a memória imunológica. Desta forma, se um mesmo patógeno ou outro relacionado invadir o organismo, células de memória fornecem meios para que o sistema imunológico adaptativo exerça um ataque rápido e eficiente ao patógeno invasor (Goldsby et al., 2007).

Existem dois tipos de respostas imunes adaptativas, a imunidade humoral e a imunidade mediada por células ou imunidade celular. A imunidade humoral é mediada por moléculas presentes no sangue e secreções de mucosa, designadas por anticorpos, que são produzidas por células B (também designadas por linfócitos B). Este tipo de imunidade constitui o principal mecanismo de defesa contra microrganismos extracelulares e toxinas por eles produzidos uma vez que anticorpos secretados conseguem ligar-se a estes microrganismos e toxinas auxiliando na sua eliminação. Os anticorpos são eles próprios especializados e podem activar diferentes mecanismos efectores como por exemplo, promover a ingestão de microrganismos por fagócitos ligando-se a eles e desencadeando a libertação de mediadores inflamatórios a partir das células. A imunidade mediada por células é mediada pelas células T (ou linfócitos T) que promovem a destruição de microrganismos intracelulares, como vírus e algumas bactérias, que sobrevivem e proliferam no interior de fagócitos e de outras células hospedeiras onde estão inacessíveis aos anticorpos em circulação (Abbas et al., 2012b).

1.3.2.1 Anticorpos

Os anticorpos são proteínas glicosiladas em circulação produzidas nos vertebrados em resposta à exposição de estruturas estranhas chamadas de antígenos. São capazes de reconhecer uma vasta gama de estruturas antigénicas, demonstrando uma grande capacidade de discriminação entre diferentes antígenos, ligando-se fortemente a eles. Os anticorpos estando presentes em circulação, tecidos e superfícies mucosas têm a capacidade de neutralizar toxinas e prevenir a entrada e disseminação de patogénicos e eliminação de microrganismos (Abbas et al., 2012a).

Os anticorpos são compostos por três unidades funcionais, dois fragmentos Fab (do inglês *Fragment antigen binding*) de ligação ao antígeno localizados na região variável (V) ou porção N-terminal e um fragmento Fc (do inglês *Fragment crystallizable*) constante localizado na região constante (C) ou porção C-terminal. Cada Fab é constituído pela associação de uma cadeia leve e de uma cadeia pesada de imunoglobulina e, cada região variável possui três regiões hipervariáveis, também designadas por regiões determinantes da complementaridade (CDRs), que correspondem às ansas da proteína que contactam com o antígeno e conferem especificidade para o mesmo. O fragmento Fc resulta da associação de duas cadeias pesadas e constitui o domínio effector das imunoglobulinas responsável por condicionar as características de algumas respostas imunológicas por parte do hospedeiro. Com base na sequência das suas cadeias pesadas, os anticorpos podem ser

subdivididos em cinco classes ou isotipos (IgM, IgG, IgD, IgA e IgE) que se caracterizam por perfis funcionais distintos (Tabela 1.2) (Vacchelli et al., 2013).

Tabela 1.2 – Principais características das cinco classes de imunoglobulinas (adaptado de Arosa et al., 2012a)

Características representativas de cada isotipo de imunoglobulinas	
IgM	<ul style="list-style-type: none"> • Forma membranar é a mais comum. • Pode ser expressa por células B imaturas (mais comum), maduras, de memória e plasmócitos. • Plasmócitos secretam IgM na forma pentamérica (activador importante do sistema do complemento). • Tem a mesma especificidade de ligação ao antígeno que o isotipo IgD.
IgD	<ul style="list-style-type: none"> • Expressa em todas as células B <i>naïve</i>. Após maturação, a maioria das células B perde a expressão de IgD. • Função de activação do receptor da célula B (BCR) mais eficiente que IgM.
IgG	<ul style="list-style-type: none"> • Classe mais abundante no soro (cerca de 75% das imunoglobulinas totais). Grande estabilidade no soro, com um período de semivida de 3 semanas. • IgG de elevada afinidade para o antígeno são responsáveis pela resposta imunológica humoral. • Nos humanos existem 4 subclasses de IgG: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. As IgG1 e IgG3 ligam-se com elevada afinidade aos receptores Fc das células fagocíticas.
IgA	<ul style="list-style-type: none"> • Principal isotipo das secreções (leite materno, saliva, lágrimas, etc). • Nas secreções apresenta forma dimérica. • Nos humanos existem duas subclasses de IgA: IgA1 e IgA2. A IgA2 constitui a primeira linha de defesa contra agentes patogénicos que entram no organismo pelas mucosas. • No soro, representa cerca de 10-15% da concentração total de Ig's.
IgE	<ul style="list-style-type: none"> • Produzida principalmente por plasmócitos dos pulmões e da pele. • Isotipo menos abundante e com um menor tempo de semivida no soro. • Associada a alergias.

Tem sido mostrado que anticorpos que têm como alvo antígenos glicosídicos e glicopéptidos relacionados com tumores têm a capacidade de eliminar células tumorais em circulação. Estes anticorpos podem mediar a eliminação de células tumorais por citotoxicidade dependente do complemento (CDC) e/ou por citotoxicidade dependente de anticorpo e mediada por células (ADCC), realizada por células NK e macrófagos (Buskas et al., 2009).

A CDC envolve a ligação de anticorpos a antígenos presentes na superfície de células tumorais e a activação do sistema do complemento. A acção sequencial dos componentes das vias do complemento, levam à formação do complexo de ataque à membrana (MAC) que forma poros na membrana celular das células tumorais, resultando na perda da integridade membranar das mesmas, e por conseguinte, na lise celular (Rogers et al., 2014; Zhou et al., 2008). A ADCC constitui um mecanismo pelo qual anticorpos específicos para um antígeno direccionam as células efectoras do sistema imunitário para células tumorais que expressem esse antígeno de forma a eliminá-las. Os anticorpos ligam-se ao antígeno presente na superfície das células tumorais e, através da sua porção Fc, ligam-se ao receptor Fc das células efectoras. Consequentemente, as células efectoras são activadas e desencadeiam as suas funções, como por exemplo as células NK que libertam citocinas e quimiocinas, inibindo a proliferação das células tumorais (Iannello and Ahmad, 2005).

1.3.2.1.1 Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais (mAbs) têm vindo a ser considerados uma classe importante de fármacos de estrutura proteica para tratamento do cancro e outras doenças, tendo sido já aprovados mais de

20 mAbs pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) (Tabela 1.3) (Thakur and Lum, 2010; Weiner et al., 2009). O grande impacto dos mAbs em investigação médica, diagnóstico e aplicações clínicas deriva, na maior parte, da sua capacidade de se ligarem selectivamente e com elevada afinidade a um antígeno e, por outro lado, da sua relativa e elevada estabilidade *in vitro* e *in vivo*. A tecnologia de mAbs tem gerado ou melhorado consideravelmente inúmeras aplicações em diagnóstico. Para além disso, os mAbs têm tido sucesso na sua utilização *in vivo* com intuito terapêutico, em modelos animais de doença ou doentes em (i) neutralizar factores em circulação, (ii) activar mecanismos efectores imunes contra populações celulares características de doenças, (iii) antagonizar cascatas moleculares ou moléculas específicas de doenças, (iv) na reacção cruzada com receptores da membrana e activação posterior de vias de sinalização terapêuticas e, por último, (v) no transporte de toxinas ou drogas em lipossomas para a proximidade de células alvo (Vacchelli et al., 2013).

Tabela 1.3 - Anticorpos monoclonais aprovados para terapia de cancro (Vacchelli et al., 2013).

mAb	Alvo	Aprovado	Indicação
Alemtuzumab	CD52	2001	Leucemia linfóide crónica
Bevacizumab	VEGF	2004	Cancro colo-rectal, mama, renal e pulmão
Catumaxomab	CD3 e EpCAM	2009	Ascite maligna em doentes com cancro EpCAM ⁺
Cetuximab	EGFR	2004	Cancro colo-rectal
Gemtuzumab	CD33	2000	Leucemia Mielóide Aguda
Ibritumomab tiuxetan	CD20	2002	Linfoma não Hodgkin
Ipilimumab	CTLA-4	2011	Melanoma
Panitumumab	EGFR	2006	Cancro colo-rectal
Ofatumumab	CD20	2009	Leucemia linfóide crónica
Rituximab	CD20	1997	Linfoma não Hodgkin
Tositumomab	CD20	2003	Linfoma não Hodgkin
Trastuzumab	HER2	1998	Cancro da mama

Os mAbs têm muitas aplicações práticas não só em investigação mas também em diagnóstico e terapia médica, sendo as mais comuns a identificação de marcadores fenotípicos únicos para tipos celulares particulares, o imunodiagnóstico, a detecção de tumores usando mAbs específicos de tumores, terapia e análise funcional de moléculas secretadas ou localizadas na superfície das células (Abbas et al., 2012a). Actualmente, sabe-se que existem pelo menos seis classes de mAbs relevantes para terapia de cancro: (i) mAbs que inibem directamente cascatas de pró-sobrevivência de células tumorais, (ii) mAbs que interferem com a interacção estroma-tumor, inibindo indirectamente o crescimento tumoral, (iii) mAbs que se ligam a antígenos expressos na superfície de células tumorais e funcionam por ligação selectiva induzindo mecanismos efectores imunes como por exemplo ADCC, (iv) mAbs biespecíficos (trifuncionais) que se ligam a dois antígenos diferentes, sendo capaz de estabelecer funções efectoras imunes, (v) imunoconjugados e por último, (vi) mAbs imunoestimulatórios que facilitam o desenvolvimento de uma resposta imune específica de tumor

através da interação entre sistema imunológico e células de cancro e vias de sinalização que essa interação estabelece (Vacchelli et al., 2013).

1.3.2.1.1.1 Produção de anticorpos *in vitro*

Em 1975, Köhler and Milstein desenvolveram um método de isolamento de mAbs a partir de células de hibridoma. Eles demonstraram que a tecnologia de fusão de células pode ser usada para produzir híbridos entre células de mieloma e células produtoras de anticorpos, as células B (Figura 1.7) (Yamada, 2011). A base da tecnologia de hibridoma consiste na imortalização de células B que naturalmente têm a capacidade de produzir anticorpos com determinada especificidade mas com características de crescimento limitado *in vitro*. Desta forma, as células B são fundidas com células de uma linha de células tumorais não produtoras de anticorpos mas com crescimento contínuo, as células de mieloma. Assim, os híbridos resultantes do processo de fusão celular continuam a secretar anticorpos e ganham a imortalidade da célula tumoral original. Na prática, imunizando murganhos com um determinado antígeno, obtém-se células B produtoras de anticorpos com a especificidade seleccionada e que, ao fundir-se com as células de mieloma, vão originar hibridomas sendo cada um deles produtor de anticorpos rigorosamente iguais e com igual especificidade para um só dos epítomos do antígeno. Cada hibridoma isolado vai multiplicar-se, assegurando a produção de um determinado mAb (Arosa et al., 2012d; Schonherr and Houwink, 1984).

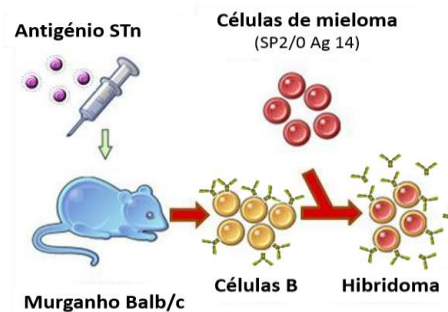


Figura 1.7 Tecnologia de hibridoma para produção de anticorpos monoclonais.

Em suma, recorrendo à tecnologia de hibridomas, é possível obter mAbs, homogêneos, da mesma classe e com a mesma especificidade, produzidos por hibridomas que são células estáveis que se reproduzem em cultura, com carácter de continuidade ilimitada, isto é, com características de “imortalidade” assegurando uma produção fácil e praticamente ilimitada de mAbs (Arosa et al., 2012d).

1.3.3 Imunoterapia contra o cancro

A exploração do sistema imunitário do próprio doente de forma a combater a doença é designada por imunoterapia. Esta tem sido considerada uma abordagem atraente, especialmente para controlar o aumento do crescimento do tumor, oferecendo o potencial de aumentar os efeitos de tratamentos

convencionais, como radioterapia ou quimioterapia pós-operatória, sem aumentar substancialmente a toxicidade (Julien et al., 2012). A imunoterapia anti-tumoral tem como princípio a utilização de componentes ou mecanismos do sistema imunológico para eliminar ou neutralizar células tumorais e/ou factores que facilitem a sobrevivência e proliferação do tumor. Actualmente, existem diversas abordagens imunoterapêuticas direccionadas para o cancro que têm vindo a ser aprovadas para uso em humanos, como citocinas (por exemplo IL-2), que são capazes de modular a função dos leucócitos, e mAbs, que reconhecem antígenos tumorais desencadeando, a partir daí, uma resposta imune específica contra as células que os expressam (Arosa et al., 2012c; Julien et al., 2012).

A imunoterapia para o tratamento do cancro humano poderá recorrer essencialmente a duas estratégias. Uma das estratégias tira partido da imunidade celular adquirida, como por exemplo a vacinação tumoral e a transferência adoptiva de leucócitos. A outra estratégia utiliza a imunidade humoral adquirida baseando-se na capacidade das células B produzirem anticorpos que reconheçam especificamente antígenos tumorais, levando a respostas que medeiam ou activam diversos mecanismos que podem levar à eliminação ou inactivação das células tumorais (Arosa et al., 2012c).

A vacinação ou imunização consiste numa abordagem imunoterapêutica promissora que tem vindo a ser avaliada para tratamento em diferentes tipos de tumor, tendo como alvo diferentes antígenos com o intuito de não só aumentar as respostas imunes anti-tumorais, mas também desenvolver memória imunológica, produzindo protecção de longo-termo durante muitos anos. Os efeitos colaterais associados com a imunização são leves em comparação com os tratamentos citotóxicos convencionais. No entanto, ao contrário dos antígenos microbianos, os antígenos associados a tumores podem ser considerados auto-antígenos e o uso de vacinas pode facilmente resultar num aumento da actividade de células imunes auto-reactivas e respostas auto-imunes. Assim, a escolha de antígenos alvo correctos é essencial para o sucesso da vacinação tumoral (Julien et al., 2012). Assim, as vacinas tumorais têm como objectivo mobilizar as células do sistema imunológico e estimular e/ou amplificar respostas imunes que reconheçam especificamente o tumor, mediando a sua eliminação. Idealmente, este tipo de estratégia deve resultar na activação de células T auxiliares CD4⁺ (linfócitos Th), que irão facilitar a resposta antitumoral, e células T citotóxicas CD8⁺, que irão eliminar as células malignas (Arosa et al., 2012c).

A aplicação de mAbs contra TACA tem sido outra abordagem importante para o tratamento do cancro metastático. A principal estratégia consiste em combinar os anticorpos com drogas ou toxinas. O objectivo é ter anticorpos que transportem selectivamente agentes tóxicos para o local ou locais tumorais. Para além desta abordagem com anticorpos conjugados a moléculas, alguns anticorpos podem por si só exercer efeitos terapêuticos, que podem ser atribuídos a mecanismos de lise das células tumorais dependente do complemento, interacções com células efectoras a partir de anticorpos dependentes de citotoxicidade ou através de efeitos imunoregulatórios, como a indução de respostas anti-idiotípicas ou o desencadear de vias de transdução de sinal em células tumorais (Lenhard et al., 2001).

1.3.3.1 Imunoterapia para cancro da mama

Apesar de décadas de pesquisa e da existência de provas evidentes a favor das vacinas para cancro anti-TACA, nunca nenhuma delas alcançou a prática clínica. Um método possível de melhoria passa por uma melhor selecção dos doentes mais susceptíveis ao tratamento projectado. Como os TACAs são expressos em grupos distintos de doentes, com base em técnicas imunohistologia ou perfil de expressão genética, é possível a personalização do tratamento de acordo com a expressão de putativos alvos. Outra forma é a construção de vacinas direccionadas para múltiplos epítomos de forma a cobrir uma maior variedade de alvos encontrados em diferentes populações de doentes e possivelmente desencadear uma resposta multi-antigénica em cada um dos doentes (Cazet et al., 2010a).

1.3.3.1.1 *Theratope*: imunoterapia dirigida STn

A descoberta do antigénio STn como um bom marcador tumoral e o facto de células epiteliais de indivíduos adultos normais não expressarem este glicano, torna-o num antigénio interessante para imunização. Até ao momento, algumas estratégias têm sido desenvolvidas como vacinas anti-STn, como por exemplo a vacina *Theratope*, que tem vindo a ser estudada em ensaios clínicos (Miles et al., 2011). A vacina *Theratope* consiste na construção sintética do dissacárido STn conjugado com uma proteína imunoestimulatória, a KLH (do inglês *Keyhole Limpet Hemocyanin*), desenhada pela companhia de biotecnologia Biomira (Ragupathi et al., 1999).

A vacina *Theratope* foi inicialmente desenhada com o intuito de combater o cancro da mama metastático. Estudos realizados em murganhos demonstraram que a imunização com *Theratope* resultou num atraso do desenvolvimento tumoral e que este efeito é estritamente dependente da presença de STn nas células tumorais. Os resultados comprovaram que os glicanos presentes no *Theratope* podem efectivamente produzir protecção tumoral contra células cancerígenas que expressem STn e que esta protecção é estritamente dependente da indução de anticorpos reactivos contra STn. Para além disso, foi verificado que muitas proteínas transportadoras de STn também interferem com vários mecanismos envolvidos no desenvolvimento tumoral (Julien et al., 2009). Assim, a conjugação química de STn com outros transportadores proteicos ou peptídicos, pode provavelmente melhorar a activação dependente de células T, levando a melhores respostas anti-tumorais. Em comparação com linhas celulares com expressão ausente ou baixa da STn, células de cancro que expressem o antigénio STn tendem a inibir a maturação de células dendríticas e por conseguinte a subsequente activação de células T, sugerindo que células cancerígenas expressando STn são propícias a causar tolerância imunológica (Carrascal et al., 2014).

Em 1996, nos ensaios clínicos de fase II, verificou-se que a imunoterapia com *Theratope* foi bem tolerada por mulheres vacinadas com este tipo de terapia, apresentando um baixo nível de toxicidade (Miles et al., 1996). Doentes que receberam a vacina *Theratope* apresentaram uma melhoria significativa na sobrevivência de aproximadamente doze meses e desenvolveram respostas imunes humorais anti-STn. Estes resultados sugerem a relevância deste glicano como antigénio específico

de tumor e a segurança da vacina, uma vez que não induziu resposta imunológica contra auto-antígenos. A eficácia da vacina foi testada em combinação com quimioterapia e observou-se que *Theratope* tem a capacidade de estimular uma resposta imune, que não é afectada pela quimioterapia, e que a maior parte dos doentes conduz à produção de anticorpos do tipo IgG. Apesar dos resultados positivos na fase II, a vacina não obteve aprovação nos ensaios clínicos de fase III. Provavelmente, a explicação mais plausível para a falha de *Theratope* nestes ensaios reside no facto de que a população de doentes não ter sido avaliada para a expressão de STn na fase de inscrição. Assim, qualquer benefício da vacina foi possivelmente mascarado devido à expressão heterogénea de STn nos doentes (Holmberg and Sandmaier, 2004; Julien et al., 2012).

Apesar de a imunoterapia STn ter sido sempre testada como uma terapia adjuvante no pós-operatório (Ibrahim et al., 2013), em conjunto com hormonoterapia ou quimioterapia, de forma a melhorar a sobrevivência e diminuir a recidiva, dados recentes da literatura sugerem que uma vacina antitumoral poderá ser mais eficientemente utilizada com intuito profilático, em vez de uma maneira terapêutica (Gray et al., 2010).

1.3.3.1.2 Anticorpos monoclonais anti-STn

Muitos anticorpos anti-STn têm vindo a ser desenvolvidos desde os anos 80 (Tabela 1.4). Estes possuem diferenças não só a nível dos haptenos ou imunogéneos que os constituem mas também na afinidade para o antígeno STn. Estas diferenças devem ser, possivelmente, a explicação mais plausível para os resultados contraditórios de diversos estudos que reportam a expressão de STn (Julien et al., 2012). Para além disso, a especificidade destes anticorpos ainda não é clara, uma vez que para além de se ligarem a STn podem reconhecer outros glicanos. Assim sendo, são necessários anticorpos com uma maior especificidade para o glicano STn (Reddish et al., 1997).

Tabela 1.4 - Anticorpos monoclonais anti-STn mais usados (Julien et al., 2012).

mAb	Imunogénio	Isotipo	Especificidade	Referência
B72.3	Fracção de membrana de cancro da mama metastático	IgG1 Murganho	STn em <i>cluster</i> ligado a serina. Reacção cruzada com <i>clusters</i> de Tn.	(Nutti et al., 1982; Reddish et al., 1997)
MLS102	Células de cancro do cólon LS180	IgG Murganho	STn em <i>cluster</i> , independentemente da ligação à estrutura do péptido	(Ching et al., 1993; Kurosaka et al., 1988)
TKH2	OSM (do inglês <i>Ovine Submaxillary Mucin</i>)	IgG Murganho	STn monomérico ou em <i>cluster</i>	(Kjeldsen et al., 1988; Ogata et al., 1998; Zhang et al., 1995)
HB-STn1 / 3F1	OSM	IgG1 Murganho	STn ligado a serina ou treonina.	(Terasawa et al., 1996)

Os mAbs anti-STn mais frequentemente utilizados em investigações de cancro da mama são o B72.3, o TKH2 e HB-STn1. O B72.3 reconhece epítomos da glicoproteína-72 (outra mucina associada a

tumores humanos) contendo STn, parecendo ser específico para *clusters* de STn mas também de Tn. Em contraste, o TKH2 reage mais fortemente para STn monomérico ou trimérico do que B72.3 (Cazet et al., 2010a; Ju et al., 2013).

1.3.3.2 Engenharia de anticorpos: anticorpos biespecíficos

Os anticorpos biespecíficos (bsAbs) constituem ferramentas promissoras para a eliminação de células tumorais disseminadas (Jager et al., 2009; Peipp and Valerius, 2002). Ao contrário dos mAbs, os bsAbs não ocorrem naturalmente no corpo humano e devem ser produzidos recorrendo a tecnologias de DNA recombinante ou fusão de células. Estas técnicas tornam possível a combinação de múltiplas especificidades humorais numa única molécula, mantendo a especificidade, e a função, de cada um dos componentes que contribuem para a molécula num todo. Num sentido mais geral, o termo anticorpo biespecífico refere-se a uma classe de construções em que dois locais de ligação específicos para o antígeno derivados de dois anticorpos estão alinhados dentro de uma molécula. No contexto de imunoterapia tumoral, um “braço” do bsAb é específico para um epítopo na superfície de uma célula tumoral (“braço” de ligação ao alvo), como o STn, enquanto o outro “braço” é específico para uma molécula na superfície de uma célula efectora imunológica (“braço” de ligação ao efector) (Figura 1.8 a). As células efectoras recrutadas pelos bsAbs podem ser, por exemplo, células T caso os bsAbs reconheçam o complexo CD3 ou as células NK se reconhecerem o CD56. Estes anticorpos têm a capacidade de se ligar ao complexo CD3 presente em todas as subpopulações de células T fornecendo o primeiro sinal de activação das mesmas mas, uma vez que são desprovidos da região de Ig Fc, não fornecem sinais adicionais para a produção de, por exemplo, citocinas e outras moléculas co-estimulatórias expressas por células apresentadoras de antígeno em condições normais (Choi et al., 2011; Fanger et al., 1990). Assim, os bsAbs estabelecem uma ligação eficaz entre efectores celulares e humorais redireccionando e aproveitando o potencial citotóxico das células T para lisar células tumorais de uma forma não restrita ao MHC (Thakur and Lum, 2010).

Os bsAbs apresentam no geral duas grandes vantagens. Uma delas reside no potencial destes anticorpos redireccionarem e, em simultâneo, activarem células efectoras presentes no local do tumor contra as células tumorais, maximizando a sua lise e minimizando a citotoxicidade não específica em torno das células e tecidos saudáveis (Choi et al., 2011). A outra vantagem está relacionada com o seu pequeno tamanho que permite uma penetração mais eficiente no tumor (Chames et al., 2009).

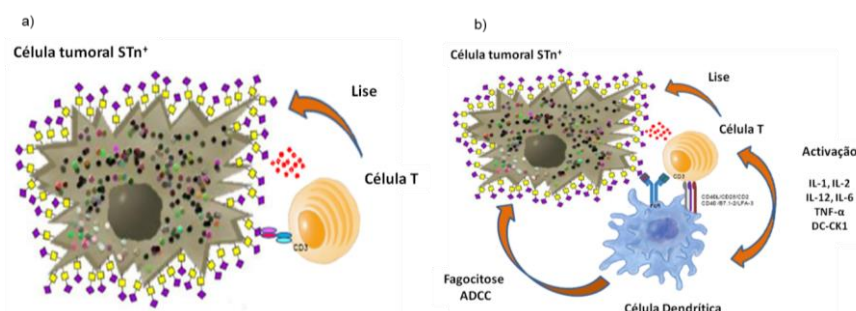


Figura 1.8 Imagem representativa da ligação do anticorpo biespecífico (a) e anticorpo biespecífico trifuncional (b) entre uma célula tumoral STn⁺ e células efectoras.

Actualmente, através de engenharia de anticorpos é possível construir um outro tipo de bsAb possuindo uma região Fc intacta apropriada, tornando-se desse modo possível o recrutamento adicional de células acessórias imunológicas levando à formação de um "complexo tri-celular" (Figura 1.8 b) (Zeidler et al., 1999). Este tipo de anticorpos designa-se por anticorpos biespecíficos trifuncionais (triAbs) e são capazes de desencadear diversos sinais necessários para a activação de células T. Não obstante, prevê-se que células apresentadoras de antigénio recrutadas após a interacção Fc-FcR sejam capazes de fagocitar e processar antigénios derivados de células tumorais lisadas e subsequentemente apresentar péptidos imunogénicos às células T (Zeidler et al., 2000).

Os triAbs são produzidos a partir de uma linha celular quadroma preparada pela fusão de duas linhas celulares de hibridoma, uma produz um anticorpo de murganho específico para o tumor e outra produz um anticorpo de rato específico para a célula T. Estes triAbs são caracterizados como trifuncionais uma vez que têm a capacidade de se ligar às células alvo (através de um Fab), às células T (através de um segundo Fab) e ainda a células acessórias do sistema imunológico como neutrófilos, macrófagos, células NK e células dendríticas através da porção Fc quimérica (Chames et al., 2009).

A única limitação destas moléculas é a sua natureza não humana, que limita as doses e o número de injeções que podem ser administradas aos doentes. No entanto, Catumaxomab, um anti-EpCAM x anti-CD3, demonstrou recentemente a sua eficácia e segurança em ensaios clínicos de fase II e III contra ascite maligna, demonstrando o grande potencial destas moléculas para terapia de cancro (Chames et al., 2009; Thakur and Lum, 2010; Zeidler et al., 2000). Para cancro da mama metastático, tem sido estudado um novo triAbs anti-HER2 x anti-CD3, o Ertumaxomab. Este anticorpo demonstrou ser eficaz como terapia antitumoral em ensaios clínicos de fase I, embora com alguns efeitos secundários nos doentes (Kiewe et al., 2006). Já foi comprovado que o tratamento de doentes com triAbs pode induzir respostas anti-tumorais de longa duração, além da destruição directa eficiente de células tumorais, abrindo assim novas opções terapêuticas para o tratamento do cancro (Eissler et al., 2012; Ruf and Lindhofer, 2001).

1.4 Introdução ao tema da tese

Actualmente, o cancro de mama constitui uma das principais causas de morte em todo o mundo, com uma grande incidência na população do sexo feminino. Terapias convencionais tendem a falhar na eliminação de células tumorais residuais e na prevenção da recorrência e metastização do tumor. Desta forma, é fundamental desenvolver novas estratégias terapêuticas.

O desenvolvimento de abordagens imunoterapêuticas baseadas em anticorpos permitem por um lado conferir uma significativa especificidade às abordagens terapêuticas. Por outro lado, a abordagem com anticorpos permite a manipulação do sistema imunológico no sentido da erradicação de células tumorais. Assim, o uso de anticorpos tem vindo a ser demonstrada como uma estratégia eficiente,

com efeitos secundários mínimos e uma terapia com elevada especificidade, eficácia de longa duração e baixa toxicidade.

Esta dissertação teve como objectivo geral desenvolver um novo anticorpo terapêutico específico para tratamento do cancro da mama, cuja actuação consiste em direccionar especificamente as células imunitárias do doente contra as células tumorais. Este anticorpo irá reconhecer especificamente as células tumorais via antigénio sialil-Tn (STn). O STn é um pequeno O-glicano que resulta de modificações no mecanismo de glicosilação celular, na maioria devido à expressão aberrante da sialiltransferase ST6GalNAc-I. Este biomarcador tumoral constitui um bom alvo terapêutico uma vez que é expresso na maioria dos carcinomas humanos e não se encontra presente em células normais. Em cancro da mama, o STn é expresso por 25-35% dos casos. De uma forma geral, o STn está associado a um mau prognóstico, a uma sobrevivência global reduzida dos doentes e a uma resposta à quimioterapia inexistente. Para além disso, estudos recentes demonstraram que as células tumorais STn⁺ exercem uma actividade imunossupressora induzindo tolerância (Carrascal et al., 2014). Assim, prevê-se que as células tumorais STn⁺ muito dificilmente serão mortas pelas células imunitárias, a não ser que sejam usadas estratégias para ultrapassar este factor.

Um dos objectivos específicos desta dissertação foi o de desenvolver e validar anticorpos monoclonais anti-STn. Durante o decorrer do trabalho, foi avaliada a eficácia de diferentes antigénios baseados em STn para a produção dos anticorpos de interesse. A reactividade do soro de murganhos da estirpe Balb/c imunizados com antigénios naturais ou sintéticos enriquecidos em STn foi analisado por citometria de fluxo e microscopia confocal contra linhas celulares de cancro de mama e bexiga a expressar STn, bem como por *Western blot* utilizando lisados proteicos das linhas STn⁺ e moléculas STn⁺, e ELISA no qual foi usado a molécula natural BSM (STn⁺). Nos casos de positividade, recorreu-se à tecnologia de hibridoma para produzir os anticorpos anti-STn. Esta tecnologia baseia-se na fusão de células do baço do murganho imunizado, que produz anticorpos anti-STn, com células tumorais de mieloma com capacidade de proliferação infinita. Os sobrenadantes das células híbridas obtidas foram também testados de forma a detectar a presença de anticorpos específicos para STn.

Um outro objectivo específico desta dissertação foi criar um novo modelo celular do cancro da mama, fluorescente que expressa STn. Este modelo celular servirá de ferramenta útil no futuro, como por exemplo, na avaliação *in vivo* da eficácia dos anticorpos anti-STn produzidos. Para tal, procedeu-se à transdução lentiviral da linha celular MCF-7/GFP originando a linha MCF-7/GFP STn⁺. A eficácia da transdução foi analisada posteriormente por citometria de fluxo e RT-PCR.

A obtenção dos anticorpos monoclonais anti-STn, bem como do modelo celular desenvolvido, representam passos cruciais para o desenvolvimento de anticorpos terapêuticos direccionados para cancro da mama, que poderão ser eficientemente aplicados no futuro na prática clínica. Uma vez que este antigénio é expresso por outros tipos de cancro, prevê-se que os anticorpos anti-STn possam vir também a ser utilizados em abordagens terapêuticas contra outro tipo de cancros.

2 Materiais e Métodos

2.1 Cultura e manutenção das linhas celulares

Durante a realização do trabalho de tese, foram utilizadas como modelo de estudo as linhas de cancro da mama MDA-MB-231 e MCF-7 e a linha de cancro da bexiga MCR. Estas células são aderentes a superfícies plásticas polarizadas, multiplicando-se eficazmente em frascos de cultura simples, numa estufa com atmosfera humedecida a 37° C e a 5% de CO₂.

A linha celular MDA-MB-231, inicialmente obtida de um derrame pleural de uma mulher com um adenocarcinoma de mama (Cailleau et al., 1974), foi transfectada com o plasmídeo pRc-CMV com inserção do cDNA do gene que codifica a enzima ST6GalNAc-I, originando a linha celular MDA-MB-231 STn⁺ (Julien et al., 2001). De igual forma, a linha MFC-7, também desenvolvida e estabelecida de um derrame pleural de uma mulher com um adenocarcinoma de mama (Soule et al., 1973), foi transfectada com o mesmo plasmídeo originando a linha celular MFC-7 STn⁺ (Julien et al., 2001). Como controlo, foram usadas as linhas celulares MDA-MB-231 *WT* e MCF-7 *WT*. A linha celular MCR, desenvolvida a partir de uma lesão metastática subcutânea de um homem de 51 anos diagnosticado com cancro de bexiga transicional de grau III (Fabbri et al., 2005), foi transduzida com o vector lentiviral, pLenti6/V5-D-TOPO (ver anexo I), no qual foi inserido o cDNA do gene humano que codifica a enzima ST6GalNAc-I, originando a linha celular MCRpLenti.ST6GN1 (MCR STn⁺). Em paralelo, a mesma linha foi também transduzida com o lentivírus pLenti6/V5-D-TOPO sem inserção de cDNA, originando a linha celular MCRpLenti.transd (MCR CN) (Ferreira et al., 2013). Assim, as três linhas celulares geneticamente modificadas sobreexpressam a enzima ST6GalNAc-I e apresentam uma elevada expressão do antigénio sialil-Tn (STn) na sua superfície (Ferreira et al., 2013; Julien et al., 2001).

Tanto as linhas celulares de cancro de bexiga como as de cancro da mama foram cultivadas em meio de cultura DMEM completo constituído por meio DMEM simples (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 (Gibco/Invitrogen). No caso da linha celular MCF-7, para além dos suplementos adicionados ao meio DMEM anterior, o meio de cultura foi sempre suplementado com 1 µL/mL de insulina (Sigma-Aldrich). Regra geral, o meio de cultura destas linhas celulares foi renovado a cada dois dias e as células foram desaderidas com Tripsina-EDTA (Gibco/Invitrogen), aquando de uma confluência celular de cerca de 75% a 80%, e passadas para novos frascos a cada 4-5 dias. Para além da sua manutenção, estas linhas celulares foram também armazenadas a -80° C e em azoto líquido em meio de congelação, que consiste em meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 20% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck).

2.2 Produção de anticorpos monoclonais por tecnologia de hibridoma

Regra geral, quando se pretende produzir anticorpos recorre-se a uma metodologia clássica, a tecnologia de hibridoma. Sendo o objectivo final deste trabalho obter anticorpos contra STn, foram utilizados seis antigénios baseados em STn para imunização: MUC1-STn, que consiste na

glicoproteína mucina 1 modificada para ser maioritariamente decorada com glicanos STn; poliacrilamida (PAA) conjugada com STn (ofertas da Professora Joy Burchell, King's College Londres), lisados da linha celular de cancro da mama MDA-MB-231 positivos para STn, treonina (Thr) conjugada com STn (oferta de *Consortium for Functional Glycomics*) e duas mucinas naturais ricas em STn provenientes de animais, a OSM (do inglês *Ovine submaxillary mucin*) (Accurate Surgical & Scientific Corporation) e BSM (do inglês *Bovine submaxillary mucin*) (Merck). Os antígenos emulsionados em adjuvante de Freund incompleto (na proporção de 1:1) foram inoculados intraperitonealmente, em separado, em murganhos fêmea da estirpe Balb/c com 4-5 semanas. Os animais receberam 3 injeções consecutivas, com um volume final de 200 µL por imunização, a intervalos de 1 ou 2 semanas com os antígenos STn nas condições descritas na tabela 2.1. Foi feito um reforço final, 3 dias antes da realização da fusão celular.

Tabela 2.1- Antígenos baseados em STn e respectiva massa utilizada por imunização nos murganhos Balb/c

Antígenos STn	Massa (µg)
STn-Thr	5
PAA-STn	5
MUC1-STn	10 e 20
BSM	20
OSM	10 e 20
Lisados celulares tumorais STn ⁺	200

Foram recolhidas amostras de sangue após cada inoculação de antígeno para obtenção de soro do murganho e determinação da presença de anticorpos anti-STn, por citometria de fluxo usando células STn⁺, bem como no dia da realização da fusão para posterior análise dos anticorpos anti-STn presentes. O soro, obtido por coagulação do sangue, contém todas as proteínas presentes no plasma sanguíneo com excepção dos factores de coagulação presentes no sangue (Abbas et al., 2012a).

Após análise da reactividade dos soros por citometria de fluxo, os murganhos anteriormente imunizados foram sacrificados e o baço removido. Os esplenócitos do murganho e as células de mieloma Sp2/0 Ag14 foram fundidas utilizando 50% PEG 4000/DMSO como agente fusogénico de acordo com o seguinte protocolo: sobre o *pellet* celular contendo os esplenócitos e as células de mieloma foram adicionados 0,8 mL de PEG/DMSO durante 1 min. Após 1 min em repouso, foi adicionado 1 mL de DMEM durante 1 min seguido de 20 mL durante aproximadamente 5 min. Após remoção do sobrenadante por centrifugação ($290 \times g$ durante 5 min), o produto resultante da fusão foi ressuspenso em meio DMEM completo contendo 1×10^{-4} M hipoxantina, 4×10^{-7} M aminopterina e $1,6 \times 10^{-5}$ M timidina (meio de selecção HAT) que apenas permite o crescimento das células híbridas produzidas. A suspensão celular assim obtida foi distribuída em micro-placas de titulação de 96 poços e incubada numa estufa com atmosfera humedecida a 37°C e 5% de CO₂.

A selecção dos hibridomas formados das restantes células, presentes inicialmente no *pellet* celular resultante da fusão promovida pelo PEG por cultura *in vitro* em meio HAT, deve-se a que i) os esplenócitos que não fundiram ou fundiram entre si morrem devido às suas características de células normais; ii) as células de mieloma que não fundiram ou que fundiram entre si, possuindo uma mutação no gene *HGPRT* (do inglês *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*) que impede a sua expressão e, desse modo, impede a utilização da via secundária (ou de novo) de síntese do DNA, não sobrevivem neste meio de selecção devido à aminopterina presente, que bloqueia a via de síntese principal; iii) apenas as células híbridas conseguem proliferar uma vez que herdaram a actividade da enzima *HGPRT* das células do baço do murganho e desse modo utilizam a via secundária para a síntese de DNA (Szybalski, 1992).

2.2.1 Cultura e manutenção dos hibridomas

Os hibridomas que cresceram nos poços das microplacas de 96 poços foram transferidos para microplacas de 24 poços, e posteriormente para frascos de cultura. Após atingirem confluência nos frascos de cultura, as células de hibridomas foram removidas por raspagem e transferidas para frascos de cultura de maior capacidade (Nunc Brand Products). O crescimento foi sempre efectuado numa estufa com atmosfera humedecida a 37°C e a 5% de CO₂. As células foram cultivadas e mantidas em meio de cultura RPMI completo que consiste em meio base RPMI simples (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich), 2 mM de L-glutamina (Gibco/Invitrogen), 100 µg/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco/Invitrogen), 1% de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich) e 1% de aminoácidos não-essenciais (Sigma-Aldrich). Regra geral, o meio de cultura destes hibridomas foi renovado a cada dois dias e as células foram desaderidas com Tripsina-EDTA (Gibco/Invitrogen) ou por raspagem, aquando de uma confluência celular de cerca de 75% a 80%, e passadas para novos frascos a cada 4-5 dias. O sobrenadante das culturas dos hibridomas foram obtidos por centrifugação e a presença de anticorpos anti-STn determinada por citometria de fluxo ou pela técnica de ELISA indirecta. As células foram armazenadas a -80°C e em azoto líquido em meio de congelação, que consiste em meio RPMI (Sigma-Aldrich) suplementado com 20% de soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck).

2.3 Técnicas laboratoriais

2.3.1 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite avaliar as propriedades de partículas individuais à medida que estas passam através de um feixe de laser. Quando uma amostra em suspensão é injectada num citómetro de fluxo, as células ou partículas são distribuídas aleatoriamente num espaço tridimensional e são ordenadas numa corrente única de partículas. Quando as células passam através do laser, a luz pode ser refractada (*Side scatter- SSc*) ou dispersa em todas as direcções (*Forward scatter- FSc*). A luz que é dispersa na mesma direcção que a luz do laser é quantificada por

um detector que converte a intensidade da luz em voltagem sendo que a magnitude do pulso da voltagem é proporcional ao tamanho das células. A luz que é refractada é focada num sistema de lentes e colectada por um detector localizado a 90° em relação ao trajecto do laser, fornecendo informação sobre a complexidade estrutural e granularidade das células. Um dos métodos mais comuns para estudar características celulares em citometria envolve o uso de moléculas fluorescentes, como anticorpos marcados com fluoróforos, que se ligam a moléculas específicas na superfície ou interior das células permitindo determinar a intensidade de fluorescência média (*Mean Fluorescence Intensity*- MFI) (Ormerod 2008).

O citómetro utilizado no decorrer do ano de tese foi o *Attune® Acoustic Focusing Cytometer* (Applied Biosystems) constituído pela combinação de um laser azul (488nm) e de um laser vermelho (638nm) que permitem o uso de seis fluorescências diferentes na análise. O laser azul detecta quatro fluorescências sendo elas BL1 (verde), BL2 (laranja), BL3 (vermelho) e BL4 (vermelho) e o laser vermelho detecta as outras duas RL1 (vermelho claro) e RL2 (vermelho escuro) (Life Technologies Corporation, 2012). Os resultados obtidos foram analisados através do programa *Attune Cytometric Software v1.2.5*.

2.3.2 Western blot

Western blot é uma importante técnica usada em biologia celular e molecular que permite a separação e identificação de proteínas de diferentes amostras, como tecidos ou células. Nesta técnica, uma mistura de proteínas é separada com base na sua massa molecular em gel de electroforese e, posteriormente, as proteínas que migraram são transferidas para uma membrana. A membrana é depois incubada e marcada com anticorpos específicos para a proteína de interesse. Os anticorpos que não se ligam à membrana são removidos por lavagem deixando apenas os anticorpos ligados à proteína de interesse. Para detecção destes anticorpos é geralmente utilizado um segundo anticorpo conjugado com uma enzima, normalmente HRP (do inglês *enzyme horseradish peroxidase*) ou fosfatase alcalina. A ligação destes anticorpos é detectada por um método de quimioluminescência devido à presença de um substrato pela enzima conjugada, possibilitando a revelação da membrana, por exemplo, em filme fotográfico. Como os anticorpos apenas se ligam à proteína de interesse, apenas as bandas específicas correspondentes a estas proteínas devem ser visíveis na membrana ou filme fotográfico consoante a técnica de revelação utilizada. A espessura da banda corresponde à quantidade de proteína e, em alguns casos, é possível identificar qual a proteína a que o anticorpo se ligou quando existem estudos anteriores em que se menciona a massa molecular da mesma (Mahmood and Yang, 2012).

2.3.3 Microscopia Confocal

A microscopia confocal é a única de muitas tecnologias disponíveis que permite a captura de secções ópticas de amostras fluorescentes. A principal vantagem deste tipo de microscopia reside na verdadeira resolução óptica tridimensional da estrutura da amostra que pode ser observada e

reconstruída a partir de uma série de secções ópticas a diferentes profundidades. Assim, é possível realizar o estudo da estrutura e função das células usando, por exemplo, reagentes imunofluorescentes. Um microscópio confocal permite a visualização de moléculas fluorescentes num único plano de foco, criando desse modo uma imagem em secção transversal muito mais precisa. Em qualquer instante durante a produção da imagem confocal, apenas uma pequena parte isolada da amostra é iluminada com luz excitatória de um feixe de laser focalizado, que rapidamente se movimenta para diferentes pontos no plano focal da amostra. Isto é conseguido devido à presença de um orifício, designado por *pinhole*, que bloqueia a luz proveniente de objectos localizados fora do plano focal e que permite a passagem da luz do plano focal de forma a atingir o detector (Smith, 2008). As imagens desses pontos são registados por uma câmara de vídeo e armazenadas num computador, e a imagem composta é exibida na tela do computador.

O microscópio confocal utilizado para observar as lâminas produzidas como descrito na secção 2.6.3 foi um Leica TCS SP2 AOBS, no qual se utilizou a objectiva de imersão a óleo 40x e os filtros de laser de 488nm e 633nm para excitar FITC (do inglês *Fluorescein isothiocyanate*) e Alexa Fluor 633, respectivamente. As imagens adquiridas foram processadas computacionalmente, utilizando o *software* Advanced Fluorescence Lite 2.1.0 build 4316 (Leica Microsystem).

2.3.4 ELISA

A técnica de ELISA (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) representa um ensaio bioquímico que se baseia no uso de anticorpos e na mudança de cor mediada por enzimas para detecção e quantificação de antigénios específicos ou anticorpos de uma dada amostra. Têm sido implementados diversos tipos de ELISA que diferem em passos básicos de protocolo. A metodologia da ELISA indirecta foi a escolhida para este trabalho uma vez que se pretendeu analisar a especificidade dos anticorpos presentes no soro de murganhos ou no sobrenadante da cultura dos hibridomas. Nesta variante de ELISA, um antigénio específico adere aos poços de uma microplaca e, posteriormente, é usada uma solução que não reaja com as proteínas aderidas de forma a bloquear as áreas do poço não revestidas com o antigénio. Após lavagem, é adicionado o anticorpo primário e/ou uma dada amostra a analisar que se liga especificamente ao antigénio e, depois de uma outra lavagem, é adicionado o anticorpo secundário conjugado com uma enzima. Por fim, é introduzido o substrato da enzima utilizada de forma a quantificar os anticorpos presentes através do método colorimétrico, sendo medido por um leitor de placas (Amersham Biosciences) (Gan and Patel, 2013).

2.3.5 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 (RT-PCR) representa um método sensível, eficiente, rápido e reprodutível que permite analisar e quantificar a expressão de um determinado gene. Ao contrário do PCR tradicional, esta técnica permite a combinação do processo de amplificação e de detecção num único passo. O PCR em tempo real baseia-se na 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 ou ensaio nuclease 5', que consiste na utilização de sondas hidrolisáveis 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 (Wong and 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 de referência (controlo endógeno) expresso constitutivamente. A expressão relativa do gene em estudo foi analisada de acordo com o modelo matemático desenvolvido por Livak e Schmittgen, designado por método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001). Este modelo assume que as eficiências das reacções de amplificação dos genes alvo e referência 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:

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

em que C_T , ciclo limiar (*threshold cycle*), corresponde ao ciclo no qual é detectado o primeiro aumento significativo da fluorescência emitido pela sonda, e ΔC_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 ΔC_T da amostra em estudo e o valor de ΔC_T da amostra calibradora (Livak and Schmittgen, 2001). O PCR em tempo real foi realizado numa 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

2.4 Caracterização glicosídica das linhas celulares de cancro da mama

As linhas celulares de cancro da mama MDA-MB-231 WT, MDA-MB-231 STn⁺, MCF-7 WT e MCF-7 STn⁺ foram ressuspensas em meio DMEM simples e tratadas com 5 mU/mL de sialidase por cada $1,5 \times 10^6$ células/mL, durante 90 min a 37°C na estufa de CO₂. Após o tratamento enzimático, as células foram lavadas e centrifugadas a $290 \times g$ durante 5 min e os sedimentos celulares resultantes foram ressuspensos em Tampão Fosfato Salino 1× (*Phosphate buffered saline*- PBS; ver anexo II), divididos por microtubos de 1,5 mL ($0,3 \times 10^6$ células/tubo) e incubados com os anticorpos e lectinas de interesse. Por cada 50 µL de reacção de marcação utilizou-se 10 µL do anticorpo anti-STn TKH2, 10 µL do anticorpo anti-Tn 5F4, 10 µL do anticorpo anti-MUC1 VU-2-G7, 5 µL de lectina PNA (*Peanut agglutinin*) marcada com FITC (2mg/mL; Sigma-Aldrich), 2,5 µL de lectina SNA (*Sambucus nigra*) marcada com FITC (2 mg/mL; Vector labs), e 2,5 µL de lectina MAA (*Maackia amurensis*) marcada com FITC (2 mg/mL; Vector labs). As células foram incubadas a 4°C durante 30 min no caso da marcação com os anticorpos e 15 min para a marcação com as lectinas. No caso da marcação com

os anticorpos, as células foram lavadas, marcadas com 5 μ L de anticorpo secundário policlonal fluorescente anti-Ig-FITC (1:10; Dako) e incubadas durante 15 min no escuro. Como controlo negativo de marcação, foram também marcadas células apenas com o anticorpo secundário. Por fim, todas as células foram lavadas e ressuspensas em 1 mL de PBS 1 \times , procedendo-se à análise por citometria de fluxo. Os anticorpos TKH2, 5F4 e VU-2-G7 utilizados estavam sob a forma de sobrenadantes de hibridoma e foram oferecidos pelo Professor Doutor Celso Reis, IPATIMUP, Porto.

2.5 Seleção positiva de células STn⁺ por microesferas magnéticas

De forma a isolar a população STn⁺ das linhas tumorais MCF-7 e MCR que contém o cDNA codificante para a sialiltransferase ST6GalNAc-I, procedeu-se a uma selecção positiva destas células com microesferas magnéticas. Assim, as células foram desaderidas dos frascos de cultura por acção da tripsina, lavadas em PBS 1 \times e centrifugadas a 290 $\times g$ durante 5 min. De seguida, as células (15 $\times 10^6$ células) foram ressuspensas em 300 μ L PBS 1 \times e marcadas com 60 μ L do anticorpo anti-STn TKH2, durante meia hora à temperatura ambiente. Após o período de incubação, as células foram lavadas e incubadas com 6 μ L de anticorpo secundário fluorescente anti-IgG marcado com PE (do inglês *Phycoerythrin*) (Sigma-Aldrich), durante 15 min à temperatura ambiente no escuro. Terminado este tempo, as células foram lavadas com PBS 1 \times e ressuspensas em 120 μ L de tampão *Beads* frio (ver anexo II), e 45 μ L de microesferas magnéticas anti-PE (Miltenyi Biotec) durante 15-20 min a 4°C. Após o tempo de incubação com as microesferas, as células foram ressuspensas em 2 mL de tampão *Beads* frio e passadas por uma coluna de selecção positiva LS (Miltenyi Biotec), previamente lavada com 3 mL de tampão *Beads* frio, montada num *MidiMACS Separator* (Miltenyi Biotec). O *MidiMACS Separator* exerce um campo magnético, promovendo a retenção na coluna das células ligadas às esferas magnéticas anti-PE-STn. De seguida, a coluna foi lavada três vezes com 3 mL de tampão *Beads* frio, sendo desprezada a fracção negativa, e desmontada do campo magnético. A fracção STn⁺ retida na coluna foi obtida por eluição com 5 mL tampão *Beads* frio, as células foram contadas e centrifugadas a 290 $\times g$ durante 10 min. Por fim, as células foram ressuspensas e colocadas em cultura em meio DMEM completo numa estufa com atmosfera humedecida a 37°C e a 5% de CO₂. Cerca de 4-5 dias após o dia de selecção foi analisada a expressão de STn nas linhas tumorais, por citometria de fluxo.

2.6 Avaliação da tecnologia de hibridoma para produção de anticorpos anti-STn

A eficiência da tecnologia de hibridoma para produção de anticorpos que reconheçam sialil-Tn foi avaliada com base na análise dos soros dos murganhos imunizados com os diferentes antígenos baseados em STn por citometria de fluxo, *Western blot*, microscopia confocal e ELISA indirecta e dos sobrenadantes da cultura dos hibridomas por citometria de fluxo e ELISA indirecta.

2.6.1 Análise da reactividade dos soros dos murganhos imunizados e dos sobrenadantes da cultura dos hibridomas por citometria de fluxo

Numa primeira fase, foi analisado o soro dos murganhos imunizados com os antigénios mencionados na secção 2.2, contra a linha celular MDA-MB-231 STn⁺ e/ou MCF-7 STn⁺ e/ou MCR STn⁺. O sangue foi incubado durante duas horas a 4°C e centrifugado a 4000×g durante 15 min a 4°C. As células (0,3 × 10⁶ células/tubo) foram lavadas em PBS 1×, centrifugadas a 290×g durante 2 min e ressuspendidas em PBS 1×. De seguida procedeu-se à marcação com o anticorpo monoclonal anti-STn TKH2 (1:5) controlo positivo e, numa outra suspensão celular com a mesma quantidade de células, com o soro do murganho (1:5), durante 30 min a 4°C. Após o período de incubação da primeira marcação, as células foram lavadas, marcadas com 5 µL de anticorpo secundário policlonal fluorescente anti-Ig-FITC (1:10; Dako) e incubadas durante 15 min no escuro. Como controlo negativo de marcação, foram também marcadas células apenas com o anticorpo secundário. Por fim, as células foram lavadas e ressuspendidas em 1 mL de PBS 1×, procedendo-se à análise por citometria de fluxo.

Para análise dos sobrenadantes da cultura dos hibridomas, as células das linhas anteriormente referidas foram lavadas com PBS 1×, centrifugadas a 290 × g durante 2 min e ressuspendidas em PBS 1×. As suspensões celulares (0,3 × 10⁶ células/tubo) foram marcadas com o anticorpo controlo positivo TKH2 e, em simultâneo, foi adicionado a mesma densidade de células a 300 µL de cada um dos sobrenadantes a analisar e deixou-se a incubar durante 40 min a 4°C. Terminado este tempo, as células foram lavadas com PBS 1×, e todos os microtubos de 1,5 mL foram centrifugados a 290 × g durante 2 min e ressuspendidas em PBS 1×. Posteriormente, todas as células foram marcadas com 5 µL de anticorpo secundário policlonal fluorescente anti-Ig-FITC (1:10; Dako) e incubadas durante 15 min no escuro. Como controlo negativo de marcação foram marcadas células apenas com o anticorpo secundário. Por fim, as células foram lavadas, ressuspendidas em 1mL de PBS 1× e analisadas no citómetro de fluxo.

De forma a confirmar a especificidade dos anticorpos presentes nos soros dos murganhos e nos sobrenadantes, foi sempre realizado um ensaio em paralelo com as linhas celulares tumorais em estudo tratadas com uma enzima específica, a sialidase de *Clostridium perfringens* (Roche Diagnostics). Esta enzima é responsável pela hidrólise de estruturas sialiladas como na hidrólise da ligação α2-6 e α2-3. Regra geral, as células (1 × 10⁶ células/mL) foram ressuspendidas em meio DMEM simples, tratadas com 10 µL/mL de uma solução a 5 U/µL de sialidase e incubadas durante 90 min a 37°C na estufa de CO₂. Após o tratamento enzimático, as células de ambas as linhas foram lavadas com PBS 1× e centrifugadas a 290 × g durante 2 min. Os sedimentos celulares resultantes foram ressuspendidos em PBS 1× e incubados com os mesmos anticorpos e sobrenadantes que as células sem tratamento. Durante os processos de marcação foi utilizado como controlo negativo linhas celulares que não expressam STn, nomeadamente a linha MDA-MB-231 WT, MCF-7 WT e MCR CN.

2.6.1.1 Análise do tipo imunoglobulinas produzidas nos murganhos imunizados

Pela técnica de citometria de fluxo foi também analisado o tipo de imunoglobulinas presente nos soros dos murganhos imunizados com os antígenos OSM, BSM e MUC1-STn. As células da linha MDA-MB-231 STn⁺ foram lavadas em PBS 1×, centrifugadas a 290 × *g* durante 2 min e ressuspendidas em PBS 1×. O protocolo de marcação que se seguiu foi igual ao mencionado no início da secção 2.6.1 à excepção da marcação com os anticorpos secundários em que se utilizou 5 µL de anticorpo secundário policlonal fluorescente anti-Ig-FITC (1:10; Dako), 2 µL de anticorpo secundário fluorescente anti-IgM-PE (abcam) e 2 µL de anticorpo secundário fluorescente anti-IgG-PE (Sigma-Aldrich). Como controlo negativo de marcação foram marcadas células apenas com cada um dos anticorpos secundários.

2.6.2 Análise da reactividade dos soros dos murganhos imunizados por *Western blot*

De forma a comprovar alguns resultados obtidos por citometria de fluxo, foi analisado o soro do murganho imunizado com OSM e o soro do murganho imunizado com lisados celulares da linha MDA-MB-231 STn⁺ por *Western blot*. Como amostras para correr no gel foram utilizados lisados celulares das linhas celulares MDA-MB-231 STn⁺, MCF-7 STn⁺ e MCR STn⁺ bem como a quimera MUC1-STn e a mucina de origem animal BSM.

Como controlo todas as amostras foram submetidas a tratamento enzimático com sialidase *Clostridium perfringens* (Roche Diagnostics). As células das linhas celulares foram ressuspendidas em meio DMEM simples e tratadas com 100 µL/mL de uma solução a 1 U/µL de sialidase durante 90 min a 37°C na estufa de CO₂. A quimera MUC1-STn (5 µg) foi tratada com 10 µL de sialidase em tampão fosfato de sódio com pH= 6 e a BSM (10 µg) foi tratada com 50 µL de sialidase no mesmo tampão durante o período da noite a 37°C. Nas amostras não tratadas a sialidase foi substituída por PBS 1×. Terminado o período de incubação, as células das três linhas celulares positivas para STn foram ressuspendidas em 100 µL de uma solução de lise (ver anexo II) e lisadas mecanicamente por sonicação. Com o intuito de saber a quantidade de proteína a colocar nos poços do gel de poliacrilamida, cada uma das amostras foi quantificada segundo o protocolo recomendado pelo *kit Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific). As amostras MUC1-STn e BSM foram quantificadas com o corante azul brilhante de *coomassie* (VWR). Após o tratamento enzimático, os lisados celulares e as amostras foram precipitados em acetona (cinco vezes mais que o volume total utilizado no tratamento) e incubados durante 1h a -20°C, sendo depois centrifugados a 14000 × *g* durante 30 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os microtubos de 1,5 mL deixados abertos à temperatura ambiente até ficarem totalmente secos no seu interior. As amostras foram ressuspendidas em *loading buffer* 1× (nzytech) e fervidas durante 7 min de forma a desnaturar a proteína.

Foi preparado um gel de poliacrilamida a 8% com um volume de 12 mL do *resolving gel* (ver anexo II) e 10 mL do *stacking gel* (ver anexo II) no *Multiple Gel Caster* (Amersham Biosciences). Após solidificação do gel, este foi colocado no sistema de electroforese de *SDS-Page* (Amersham

Biosciences) em tampão de corrida (ver anexo II) e as amostras e os marcadores de massa molecular foram carregadas nos poços. Inicialmente o gel foi corrido a uma baixa voltagem (100V) para as amostras correrem no gel *stacking gel*, sendo esta depois aumentada (150V) para separação das proteínas da amostra até ao final do *resolving gel*, por visualização do corante azul de bromofenol presente no *loading buffer*. De seguida foi preparada a cassette do sistema de transferência (Bio-RAD) do gel para a membrana. Na cassette foram colocados dois cartões (Advantec) embebidos em TBS (do inglês *Tris-buffered saline*) 1× (ver anexo II) com tween 0,1% e, entre eles, foi colocado o gel em contacto com a membrana PVDF (Bio-RAD), activada anteriormente com metanol (VWR) durante 5 min. A cassette foi colocada no sistema juntamente com o tampão de transferência (ver anexo II) e, na fonte, foi seleccionado o tempo de 90 min e uma amperagem de 0,40A. Terminada a transferência, a membrana foi bloqueada com leite a 10% durante uma 1h com agitação. Posteriormente, a membrana foi marcada com o anticorpo TKH2 (1:10) ou com o soro do murganho imunizado com OSM (1:50) ou com o soro do murganho imunizado com os lisados da linha MDA-MB-231 STn⁺ (1:30), diluídos em TBS 1× com Tween 0,1%, durante o período da noite a 4° C. Na manhã seguinte, a membrana foi lavada três vezes durante 5 min com TBS 1× com Tween 0,1%. De seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário policlonal anti-mouse Ig (1:2500; BD biosciences) durante uma hora, com agitação à temperatura ambiente. Terminado o período de incubação, a membrana foi lavada duas vezes com TBS 1× com Tween 0,1% e uma última vez com TBS 1× sem Tween, durante 5 min cada. Por fim, é adicionado uma mistura de dois reagentes (1:1) de detecção para *Western blot* (Lumi-Light Western Blotting Substrate; Roche) de forma a cobrir toda a superfície da membrana, durante 1 min. O excesso de líquido foi removido e a membrana inserida numa mica no interior de uma *cassete*. Na sala escura, foi colocado um filme fotográfico (GE Healthcare) sobre a membrana durante aproximadamente 1 min. O filme foi depois mergulhado na solução de revelação (Kodak), lavado com água destilada, passado no fixador (Kodak) e lavado com água destilada.

2.6.3 Análise da reactividade do soro do murganho imunizado, por microscopia confocal

As linhas celulares MDA-MB-231 STn⁺, MCF-7 STn⁺, MCR STn⁺ e MCR CN foram cultivadas em meio de cultura DMEM completo, em poços de uma placa de 12 poços ($0,4 \times 10^6$ células/mL) e incubadas na estufa de CO₂ a 37°C durante 24 horas de forma a aderir às lamelas anteriormente colocadas nesses poços da placa. Terminado o período de incubação, o meio de cultura foi retirado dos poços e estes foram lavados, três vezes, com PBS 1x durante 5 min cada. Para fixar as células, foi adicionado aos poços uma solução de paraformaldeído 3,7% (Sigma-Aldrich) e a placa foi incubada 10 min à temperatura ambiente. De seguida, os poços foram lavados, três vezes, com PBS 1× durante 5 min cada. As células fixadas foram permeabilizadas com uma solução Triton 0,1% (Sigma-Aldrich) em PBS 1× durante 20 min. Os poços foram lavados, três vezes, com PBS 1× durante 5 min. As células foram incubadas à temperatura ambiente com uma solução de 1% BSA (Sigma-Aldrich) em PBS 1× durante 30 min, para evitar marcação inespecífica. De seguida, os poços

foram lavados, três vezes, com PBS 1× durante 5 min. Após este tratamento, as células foram incubadas com 25 µL do anticorpo controlo anti-STn TKH2 (1:2) ou com soro do murganho OSM (7 µL soro: 50 µL PBS 1×), durante 1h30 à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, os poços foram lavados, três vezes, com PBS 1× durante 5 min e foi adicionado o anticorpo policlonal anti-Ig-FITC (Dako) diluído 100× durante 1h no escuro à temperatura ambiente. Como controlo negativo de marcação foram utilizadas células de ambas as linhas marcadas apenas com o anticorpo secundário. Por fim, os poços foram lavados, três vezes, com PBS 1× durante 5 min cada. O núcleo das células foi marcado com o corante TO-PRO3-Iodide (Invitrogen) diluído 300× (1 µL corante / 300 µL PBS 1×), durante 15 min no escuro. Os poços foram lavados, três vezes, com PBS 1× durante 5 min. As lamelas foram retiradas do fundo dos poços e colocadas corretamente na lâmina com o meio de montagem *Mowiol/Dabco* (Sigma) e, mais tarde, observadas no microscópio confocal.

2.6.4 Análise da reactividade do soro do murganho imunizado e de um sobrenadante da cultura de hibridoma pela técnica de ELISA indirecta

Os poços da placa *polysorp* (Nunc) foram revestidos com o antigénio BSM (0,5 µg por poço diluído em 100 µL PBS 1×) e deixados a incubar a 4°C durante o período da noite. De forma a ter um controlo negativo para cada uma das condições descritas a seguir, foi deixado a mesma quantidade de poços sem antigénio (só com PBS). No dia seguinte, foi removido o excesso de antigénio que não se ligou e bloqueou-se com leite a 5% (200 µL/poço) durante 1h à temperatura ambiente. Os poços foram lavados quatro vezes com PBS 1× com Tween 0,1% (250 µL/poço). De seguida, foi adicionado o anticorpo controlo TKH2 (1:50) num poço, o soro do murganho (1:5000) noutra poço e os sobrenadantes da cultura dos hibridomas não diluídos e diluídos (1:2) nos poços previamente planeados, sempre para um volume final de 100 µL por poço, e colocou-se a placa a incubar durante 90 min à temperatura ambiente. Terminado o período de incubação, os poços foram lavados quatro vezes com PBS 1× com Tween 0,1% e foi adicionado o anticorpo secundário policlonal anti-mouse Ig conjugado com HRP (1:1000; BD biosciences), para um volume final de 100µL por poço, durante 1h à temperatura ambiente. Após esta marcação, os poços foram novamente lavados quatro vezes com PBS Tween 0,1%. De seguida, adicionou-se 100 µL por poço do reagente TMB (3,3',5,5'-*Tetramethylbenzidine*) (Sigma-Aldrich) que reagiu com a enzima HRP, levando ao desenvolvimento da cor azul durante aproximadamente 30min. Por fim, adicionou-se 100 µL de HCL (1M) por poço de forma a parar a reacção e se observar o aparecimento da cor amarela nos poços esperados. Dez minutos depois, foi lida a absorvância a 450nm no leitor de placas.

2.7 Criação de um novo modelo celular a expressar o antigénio sialil-Tn

No âmbito do trabalho, foi considerado importante a criação de um novo modelo celular de estudo que fosse fluorescente e expressasse o antigénio STn, de forma a no futuro se desenvolver o estudo dos anticorpos anti-STn produzidos. Para tal, procedeu-se à transdução lentiviral da linha MCF-7/GFP (cellbiolabs), anteriormente transduzida com um lentivírus com o gene que codifica para GFP (do

inglês *Green fluorescent protein*), gentilmente cedida pela Professora Doutora Alexandra Fernandes (FCT/UNL, Lisboa). Foi usado o vector lentiviral pLenti6/V5-D-TOPO (ver anexo I), no qual tinha sido inserido anteriormente o cDNA do gene humano que codifica a enzima ST6GalNAc-I (Ferreira et al., 2013), originando a linha celular MCF-7/GFP STn⁺.

2.7.1 Transformação bacteriana

Numa primeira fase, procedeu-se à transformação de *Escherichia coli Stbl3* competente, cedida pelo Doutor José Ramalho (CEDOC-FCM, Lisboa), com o vector recombinante pLenti6/V5-D-TOPO. A temperatura óptima de crescimento destas bactérias é de 30°C.

As bactérias competentes, armazenadas previamente a -80°C, foram descongeladas em gelo. Num microtubo foi adicionado 100 µL de bactérias e 1 µL do pDNA de interesse e incubou-se esta mistura em gelo durante 30 min, de modo a favorecer a concentração do pDNA perto das membranas celulares. Terminado este período, incubou-se o microtubo num banho termostatizado a 42°C durante 1 min, possibilitando a formação de poros nas membranas bacterianas e, por conseguinte, a entrada do pDNA. De seguida, incubou-se o microtubo em gelo durante 2 min, com o intuito de tornar as membranas novamente selectivas. Finalizado o choque térmico adicionou-se 900 µL de meio *Luria-Bertani* (LB) (para um volume final de 1 mL) ao microtubo e incubou-se a 30°C durante 1 h. Após este tempo de incubação, foi plaqueado 100µL de células transformadas, numa concentração de 100 µg/mL, em placas de *petri* com meio LB sólido suplementado com ampicilina (Bioline) (ver anexo II) e deixou-se a incubar numa estufa a 30°C durante a noite. As restantes células bacterianas já transformadas foram preservadas a -80°C em glicerol numa proporção de 2:3. De modo a obter um elevado número de cópias do pDNA de interesse, as colónias que cresceram nas placas foram recolhidas e inoculadas em meio LB líquido suplementado com ampicilina (ver anexo II) e deixadas a crescer durante o período da noite a 30°C, com uma agitação de 250 rpm numa incubadora de agitação orbital (Medline Scientific Limited). As bactérias resultantes destes crescimentos foram também armazenadas a -80°C em glicerol na proporção já referida.

2.7.2 Extracção, quantificação e avaliação da integridade do DNA plasmídico

As bactérias transformadas (secção 2.7.1) foram crescidas em 50 mL de meio LB suplementado com ampicilina, numa concentração de 100 µg/mL, e deixadas a incubar durante a noite, a 30°C e a 250 rpm. A extracção do pDNA foi executada utilizando o sistema comercial *Midiprep kit* (Quiagen), tendo-se seguido as instruções do fabricante. Terminada a extracção, procedeu-se à quantificação do pDNA obtido com base na leitura no espectrofotómetro (Shimadzu), da absorvância de 260 nm (A260) (pico de absorção dos ácidos nucleicos), recorrendo à relação: uma unidade de A260 corresponde a 50 µg de DNA. De forma a confirmar a integridade do pDNA extraído foi feita uma electroforese em gel de agarose (Bioline) a 0,8% (m/v). O gel de agarose foi preparado em tampão TBE 1× (Tris-Borato-EDTA) (ver anexo II) e após ser fervido adicionou-se brometo de etídeo (Merck) numa concentração final de 0,5 µg/mL. As amostras foram aplicadas contendo um quinto do volume de *loading buffer*

(nzytech) de modo a conferir densidade às amostras e possibilitando a visualização da frente da electroforese.

2.7.3 Transdução lentiviral numa linha de cancro da mama

A produção dos lentivírus pelo processo de transfecção, levada a cabo pelo Doutor José Ramalho, foi concretizada numa linha celular descrita como tendo a capacidade de maximizar a produção de vírus, a linha HEK293FT (Shoji et al., 2014) e recorrendo ao uso do agente transfectante PEI.

A linha celular escolhida para a transdução com a construção pLenti6/st6galnac-I foi a MCF-7/GFP, que foi deixada crescer até atingir uma confluência de 30-50%. O meio de cultura celular foi removido e substituído por meio DMEM completo inoculado com 500 µL de sobrenadante da cultura das células HEK293FT produtoras de vírus e 5 µL de *polybrene* (6 mg/ mL) (Sigma-Aldrich), para um volume final de 5 mL. Os dois frascos foram suavemente agitados e deixados a incubar durante o período da noite numa estufa com atmosfera humedecida a 37° C e a 5% de CO₂.

No dia seguinte, de forma a seleccionar as células transduzidas, foi adicionado o antibiótico de resistência específico do vector lentiviral pLenti6/V5-D-TOPO, a blasticidina. Sem ter sido removido e substituído o meio de cultura, foi adicionado 8 µg/ mL de blasticidina (Sigma-Aldrich) ao frasco das células transduzidas. Como controlo da transdução, adicionou-se blasticidina a células da mesma linha sem terem sido incubadas com vírus. As células foram incubadas novamente na estufa a 37° C e a 5% de CO₂. No caso das células transduzidas, o meio de cultura foi substituído por meio fresco a cada 3-4 dias e, nos 12 dias seguintes, sempre que foi feita uma passagem ou mudança de meio foi adicionado blasticidina ao meio de cultura de forma a manter e seleccionar as células transduzidas. As células não transduzidas usadas como controlo morreram 3-4 dias após a adição do antibiótico ao meio de cultura. As células resistentes ao antibiótico foram mantidas em cultura para posterior análise e foram armazenadas a -80°C. Foi também realizado o processo de selecção positiva por microesferas magnéticas das células STn⁺ desta nova linha celular, conforme descrito na secção 2.5.

2.7.4 Avaliação da transdução da construção pLenti6/st6galnac-I na linha MCF-7/GFP

2.7.4.1 Análise fenotípica por citometria de fluxo

As células da linha MCF-7/GFP transduzidas com a construção pLenti6/st6galnac-I e as células da linha MCF-7/GFP não transduzidas foram ressuspensas em meio DMEM simples e tratadas com 5 mU/mL de sialidase por cada $1,5 \times 10^6$ células/mL, durante 90 min a 37°C na estufa de CO₂. Após o tratamento enzimático, as células foram lavadas em PBS 1× e centrifugadas a $290 \times g$ durante 5 min. Os sedimentos celulares resultantes foram ressuspensos em PBS 1× e divididos por dois microtubos de 1,5 mL ($0,3 \times 10^6$ células/tubo). De seguida procedeu-se à marcação com o anticorpo anti-STn TKH2 (1:5) e com o anticorpo anti-Tn 5F4 (1:2), durante 30 min a 4°C. Terminado o período de incubação, as células foram lavadas com PBS 1×, marcadas com 5 µL de anticorpo secundário fluorescente Alexa Fluor 633 anti-mouse IgG (1:100; Life Technologies) para um volume final de 50

μL e incubadas durante 15 min no escuro. Como controlo negativo da marcação foram também marcadas células apenas com o anticorpo secundário e, em paralelo com todas as marcações, foram utilizadas não tratadas com sialidase. As células foram lavadas e ressuspendidas em 1 mL de PBS 1 \times , procedendo-se à análise por citometria de fluxo. Foram analisadas as células da linha MCF-7/GFP STn⁺, antes e depois do processo de selecção positiva da população STn⁺.

2.7.4.2 Análise da expressão genética, por RT-PCR

Para análise da expressão genética, 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 *NZY Total RNA Isolation Kit* (nzytech), tendo-se seguido as instruções e utilizado as soluções fornecidas pelo fabricante. 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 *NZY Reverse Transcriptase* (nzytech). Sinteticamente foi efectuada uma mistura de 25 μL por reacção, contendo 5 μL de oligonucleótidos iniciadores aleatórios (50 μM), 2 μL de nucleótidos livres (10 mM), 1,25 μL de transcriptase reversa (200 unidades), 5 μL de solução tampão 10 \times e 11,75 μL de água ultra pura. Esta mistura foi adicionada às amostras de RNA numa proporção de 1:1, em microcubos de PCR. A síntese de cDNA foi realizada no termociclador (PTC-100 Programmable Thermal Controller) com o seguinte programa: 10 min a 25°C, 50 min a 50°C e 5 min a 85°C, ficando a 4°C, caso não se retirem logo as amostras.

De seguida, foi realizado o PCR em tempo real. 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), 2 μL de cDNA e 1 μL de água ultra pura. Numa microplaca de 96 poços (Fast Optical 96-Well Reaction, Applied Biosystems) pipetou-se 2 μL da sonda iniciadora para o gene de interesse ST6GalNAc-I, assim como para o gene endógeno β -actina 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. Cada reacção de PCR em tempo real foi realizada em duplicado e em paralelo com reacções com um controlo negativo, ou seja, com o cDNA da linha celular MCF-7/GFP não transduzida. 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 β -actina. A análise dos valores de expressão genética dos genes testados foi efectuada aplicando-se o método $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ e assumindo que a eficiência da reacção de amplificação foi de aproximadamente 100%, de acordo com a validação dos ensaios realizada pelo fabricante.

3 Resultados

3.1 Caracterização fenotípica das linhas celulares de cancro da mama

O objectivo geral desta tese foi o desenvolvimento de novos anticorpos terapêuticos contra o antigénio sialil-Tn (STn) para tratamento do cancro de mama. A primeira parte do trabalho consistiu em estudar o carácter imunogénico de diferentes antigénios baseados em STn tendo como objectivo a produção de anticorpos específicos direccionados para este glicano aberrantemente expresso na maioria dos carcinomas humanos, como o carcinoma da mama.

Durante o decorrer da tese foram utilizadas como modelo de estudo diversas linhas celulares tumorais modificadas geneticamente de forma a apresentar o STn na sua superfície, conforme descrito na secção 2.1 dos Materiais e Métodos. Primeiramente, as linhas celulares de cancro da mama foram caracterizadas fenotipicamente, por citometria de fluxo. Para isso, as células foram tratadas, ou não, com sialidase e marcadas com as lectinas e os anticorpos de interesse. Os resultados obtidos nos ensaios de citometria de fluxo encontram-se sumarizados na tabela seguinte (Tabela 3.1).

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

	MDA-MB-231 WT	MDA-MB-231 STn ⁺	MFC-7 WT	MFC-7 STn ⁺
PNA	+	++	++	+
*PNA	+++	+++	+++	++
SNA	+++	++	+	++
MAA	++	+++	++	++
TKH2 (STn)	-	+++	-	++
*TKH2 (STn)	-	-	-	-
5F4 (Tn)	-	-	-	+
*5F4 (Tn)	-	++	-	++
VU-2-G7 (MUC1)	-	-	+	+

-, marcação negativa; +, marcação positiva fraca; ++, marcação positiva moderada; +++, marcação positiva forte;

* tratamento prévio com sialidase; PNA: *Peanut agglutinin*, SNA: *Sambucus nigra*, MAA: *Maackia amurensis*

A marcação com a lectina PNA foi utilizada para avaliar a expressão do antigénio T, uma vez que exerce uma actividade semelhante ao anticorpo anti-T presente no soro humano e reconhece estruturas Gal β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr. Relativamente a esta marcação, observou-se que as quatro linhas tumorais de mama expressam de forma fraca ou moderada o antigénio T mas, esta marcação

aumentou consideravelmente em células tratadas previamente com sialidase. Assim, a remoção dos ácidos siálicos presentes na superfície das células após tratamento enzimático, que torna o antígeno sialil-T (ST) em T, demonstrou que as linhas tumorais analisadas expressam também antígenos ST. Este efeito também se observou no caso do antígeno STn expresso pelas células, que após tratamento passaram a expressar Tn. No âmbito da marcação com a lectina SNA, que permitiu a detecção de estruturas terminais NeuAc α 2-6Gal(NAc), a marcação foi considerada positiva forte na linha MDA-MB-231 *WT*, positiva moderada nas linhas MDA-MB-231 STn⁺ e MCF-7 STn⁺ e positiva fraca na linha MCF-7 *WT*. A marcação com a lectina MAA, que reconhece preferencialmente estruturas terminais NeuAc α 2-3Gal, foi positiva moderada em todas as linhas excepto na linha MDA-MB-231 STn⁺ que foi positiva forte.

Como esperado, apenas as linhas MDA-MB-231 STn⁺ e MCF-7 STn⁺ expressam o antígeno STn sendo que esta expressão desaparece quase na totalidade nas células tratadas com sialidase. A linha MDA-MB-231 STn⁺ apresentou uma marcação positiva forte enquanto a linha MCF-7 STn⁺ apresentou uma marcação positiva moderada. Apenas a linha MCF-7 STn⁺ expressa fracamente o antígeno Tn, no entanto, como esperado, quando as linhas MCF-7 STn⁺ e MDA-MB-231 STn⁺ foram tratadas com sialidase passaram a apresentar uma expressão positiva moderada para o antígeno Tn. Apenas as linhas MCF-7 *WT* e MCF-7 STn⁺ apresentam a proteína mucina 1 (MUC1) à sua superfície sendo esta marcação positiva fraca. As linhas de cancro de bexiga MCR STn⁺ e MCR CN utilizadas também durante este trabalho já tinham sido anteriormente caracterizadas (Carrascal et al., 2014).

As linhas celulares MCF-7 STn⁺ e MCR STn⁺, ambas modificadas geneticamente de forma a sobreexpressar a sialiltransferase ST6GalNAc-I responsável pela expressão de STn na superfície das células, têm tendência a perder a expressão deste O-glicano aberrante com o passar do tempo. Assim, foi necessário proceder-se ao isolamento imunomagnético das células STn⁺ das duas linhas conforme descrito na secção 2.5 dos Materiais e Métodos. Desta forma, a linha MCF-7 STn⁺ em que só 30% das células apresentava uma expressão de STn⁺ passou a ter 88% das células a expressar STn e a linha MCR STn⁺ que apresentava só 18% das células STn⁺ passou a ter uma população de 85% de células STn⁺. Ao longo do trabalho, a linha MDA-MB-231 STn⁺ apresentou uma expressão de STn entre 80 a 95% variando consoante a confluência das células.

3.2 Avaliação do efeito imunogénico de diferentes antígenos baseados em STn

Neste trabalho recorreu-se à tecnologia de hibridoma com a finalidade de produzir anticorpos monoclonais específicos para STn, um antígeno presente na superfície das células tumorais que por si só é pouco imunogénico e que tem a capacidade de exercer imunossupressão. Assim, murganhos da estirpe Balb/c foram imunizados com diferentes antígenos, naturais ou sintéticos, todos eles conjugados com STn.

3.2.1 Análise do efeito imunogénico de STn associado a treonina e a poliácridamida

Os primeiros antígenos utilizados nas imunizações dos murganhos foram o STn ligado a treonina (Thr), um dos aminoácidos essenciais e um dos componentes das proteínas dos seres vivos, e o glicoconjugado STn-PAA que consiste numa cadeia linear de poliácridamida (PAA) contendo STn. Ambos os antígenos demonstraram não ser imunogénicos não tendo a capacidade de desencadear uma resposta por parte do sistema imunitário, não tendo sido detectado a presença de anticorpos anti-STn no soro dos murganhos imunizados com estes antígenos.

3.2.2 Avaliação da imunogenicidade do antígeno MUC1-STn para produção de anticorpos anti-STn

Sempre com o intuito de produzir anticorpos anti-STn, um novo antígeno obtido por conjugação quimioenzimática do STn na MUC1 humana (Sorensen et al., 2006) foi testado. Numa primeira fase, foi analisada, por citometria de fluxo, a reactividade do soro do murganho obtido após 3 imunizações com 10 µg de MUC1-STn, intercaladas semanalmente, contra a linha celular MDA-MB-231 STn⁺ tratada ou não com sialidase (Fig 3.1). Como é possível observar, o soro do murganho imunizado (Fig 3.1 a) marcou 96% do total das células com um MFI de 9010, em comparação com o controlo positivo de marcação em que 90% das células estão a marcar o antígeno STn com um MFI de 18193. A marcação com o soro do murganho identificou duas populações de células positivas, uma população de 54% com um MFI de 3105 a marcar fracamente e outra população de 42% com um MFI de 16363 a marcar mais fortemente. Nas células tratadas enzimaticamente, a marcação com o soro reduziu substancialmente de um MFI de 9010 para um MFI de 2966.

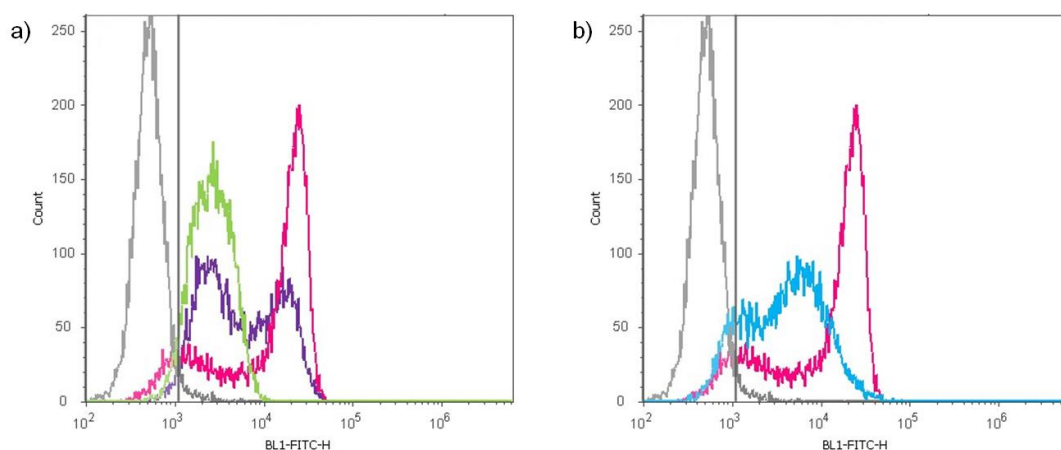


Figura 3.1- Análise do soro do murganho imunizado com MUC1-STn contra a linha MDA-MB-231 STn⁺, tratada (verde) ou não com sialidase (roxo) e da expressão de STn detectada com o anticorpo TKH2 (rosa) nas células não tratadas (a), por citometria de fluxo. Análise da expressão de STn contra a linha MDA-MB-231 STn⁺, tratada (azul) ou não com sialidase (rosa) (b), por citometria de fluxo. A cinzento encontra-se representado o controlo negativo de marcação, ou seja, células apenas marcadas com anticorpo secundário.

Foi ainda possível constatar que apesar da diminuição da marcação de STn (Fig 3.1 b), detectada com o anticorpo controlo TKH2, das células tratadas (MFI 7172) em comparação com a marcação das células não tratadas (MFI de 18193), o tratamento com a sialidase não foi totalmente eficiente visto a redução da marcação não ter sido total. Isto deveu-se à intenção de manter uma elevada viabilidade das células durante o processo de marcação com o anticorpo anti-STn e com o soro do murganho tendo sido, por isso, utilizada uma baixa concentração da enzima. Não obstante, é possível inferir que no soro do murganho existiam anticorpos que reconheciam estruturas sialiladas, visto a marcação com o soro ter reduzido com o tratamento.

De seguida, foi analisar-se o tipo de imunoglobulinas presentes no mesmo soro de forma a entender qual o isotipo predominante produzido em resposta ao antigénio inoculado no animal. Verificou-se que o soro do murganho marcado com um anticorpo secundário policlonal anti-Ig (Fig 3.2 a) marcou 76% das células da linha MDA-MB-231 STn⁺ com um MFI de 6999 e que esta percentagem foi semelhante à marcação com o anticorpo secundário anti-IgM (Fig 3.2 b) que marcou 77% das células embora com um MFI de 2941. Como desejado, a marcação positiva mais forte correspondeu ao soro marcado com o anticorpo secundário anti-IgG (Fig 3.2 b), que marcou 98% das células com um MFI de 190387.

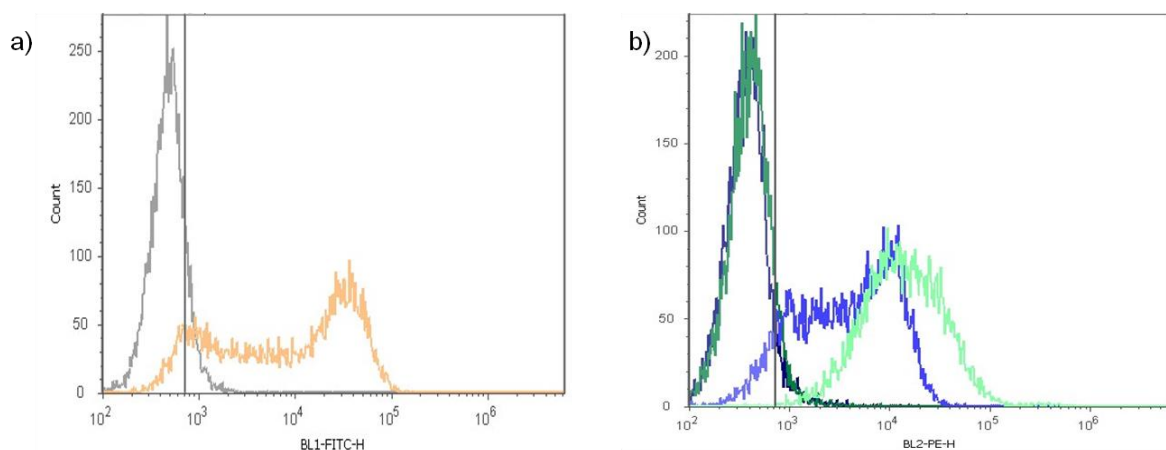


Figura 3.2- Análise do tipo de imunoglobulinas presentes no soro do murganho imunizado com MUC1-STn contra a linha celular MDA-MB-231 STn⁺: imunoglobulina do tipo Ig (laranja) (a), do isotipo IgM (azul claro) e do isotipo IgG (verde claro) (b), por citometria de fluxo. A cinzento está representado o controlo negativo de marcação do tipo Ig (a), a azul escuro o controlo negativo de marcação IgM e a verde escuro o controlo negativo de marcação IgG (b).

Com base nos resultados obtidos, foi decidido proceder-se à fusão celular. Foi analisada a reactividade do soro do murganho recolhido no dia da fusão contra a linha MDA-MB-231 STn⁺ (Fig 3.3 a) e contra a linha MCR STn⁺ (Fig 3.3 b). Observou-se que o soro marcou de forma positiva fraca 31% das células da linha MDA-MB-231 STn⁺, com um MFI de 1442, em comparação com o controlo positivo de marcação que apresentou 65% das células marcadas com um MFI de 2608. A diferença da marcação do soro entre as células tratadas e não tratadas com sialidase não foi significativa, uma vez que o MFI diminuiu de 1442 das células não tratadas para um MFI de 1440 (correspondente a 25%

de células marcadas) das células tratadas. A reactividade do mesmo soro foi analisada contra a linha MCR STn⁺, verificou-se que 41% das células marcaram com o soro com um MFI de 1770. Embora este valor seja superior ao da marcação com a linha celular de cancro da mama, é inferior ao valor de marcação com o controlo de marcação positivo em que 86% das células estão a marcar STn com um MFI de 9161. O mesmo soro foi analisado contra a linha MCR CN negativa para STn⁺, tendo a marcação sido negativa.

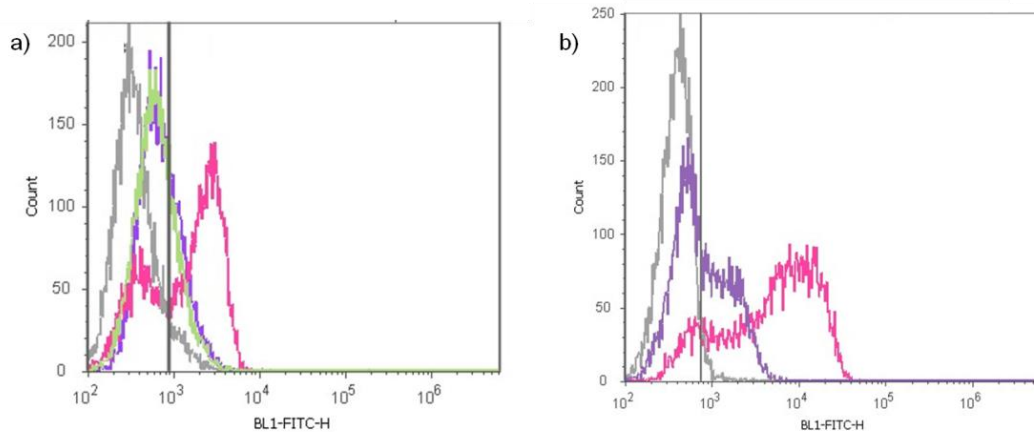


Figura 3.3- Análise do soro do murganho imunizado com MUC1-STn, obtido da amostra de sangue recolhida no dia da fusão celular, contra a linha celular MDA-MB-231 STn⁺ (a) tratada (verde) ou não com sialidase (roxo) e contra a linha celular MCR STn⁺ (b) não tratada (roxo), por citometria de fluxo. A rosa encontra-se marcado o controlo positivo de marcação anti-STn nas células não tratadas e a cinzento o controlo negativo de marcação das células marcadas apenas com o anticorpo secundário.

Assim, inicialmente a reactividade do soro sugeria existirem anticorpos no soro do murganho imunizado com MUC1-STn que reconheçam estruturas sialiladas visto ter ocorrido uma redução da marcação com o tratamento com sialidase. No entanto, a análise do soro no dia da fusão, apresentou uma marcação mais fraca sem grande redução da mesma nas células tratadas enzimaticamente, sugerindo que foi induzida tolerância imunológica ao longo do tempo.

Após a realização da fusão celular, uma parte das células seleccionadas em meio de cultura HAT, foi mantida em meio de cultura RPMI completo até atingir uma confluência de aproximadamente 100%, com o objectivo de obter sobrenadantes com elevada concentração dos anticorpos anti-STn secretados pelos hibridomas. Foram analisados cerca de 100 sobrenadantes contra linhas STn⁺ e STn⁻, mas nenhum marcou positivamente pela técnica de citometria de fluxo.

Perante este resultado, foram iniciadas novas imunizações com o mesmo antigénio mas com uma massa diferente, 20 µg de MUC1-STn por imunização, e com um período de 15 dias entre cada inoculação. Os soros do murganho após a primeira, segunda e terceira imunização foram obtidos a partir de amostras de sangue recolhidas e foram posteriormente analisados quanto à sua reactividade e tipo de imunoglobulinas presentes, por citometria de fluxo (Fig 3.4).

Em relação à análise referente à classe de imunoglobulina (Fig 3.4 a), foi possível observar um aumento da marcação das células marcadas coerente com o número de imunizações, sendo este aumento mais evidente entre a primeira e a segunda imunização. Assim, o soro do murganho após a primeira imunização marcou 92% das células com um MFI de 3754, após a segunda imunização marcou 97% das células com um MFI de 3618 e após a terceira imunização marcou 98% das células com um MFI de 4326. De igual forma, observou-se um ligeiro aumento da produção do isotipo IgG ao longo do tempo (Fig 3.4 b). O soro do murganho após a primeira e segunda imunização marcou 99,5% das células com um MFI de 21868 no primeiro caso e de 52916 no segundo. Após a terceira imunização, o soro marcou 99,7% das células com um MFI correspondente a 57727. No que respeita à análise do isotipo IgM (Fig 3.4 c), verificou-se que ocorreu uma ligeira diminuição da marcação entre a primeira (MFI de 13714 com 71% das células marcadas) e a segunda imunização (MFI de 13172 com 88% das células marcadas), tendo o decréscimo sido mais evidente no soro após a terceira imunização (MFI de 6212 com 65% das células marcadas).

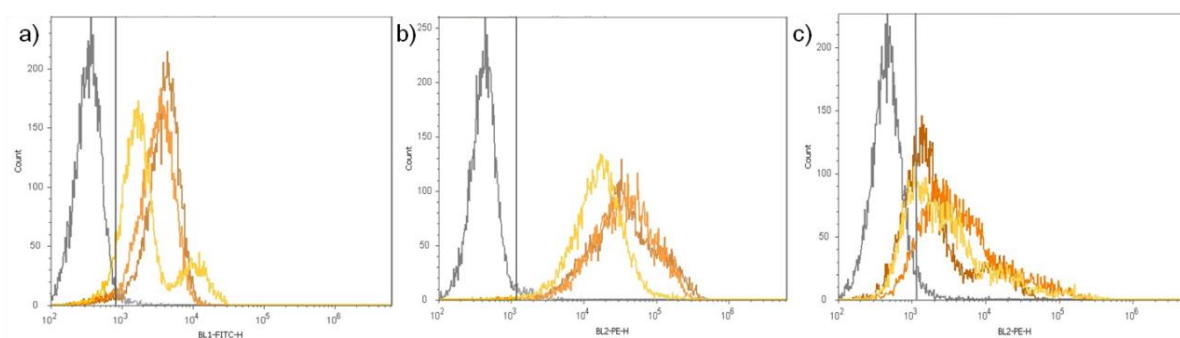


Figura 3.4- Análise da reactividade e do tipo de imunoglobulinas presentes no soro do murganho após a 1^a (amarelo), 2^a (laranja) e 3^a (castanho) imunização com MUC1-STn contra a linha celular MDA-MB-231 STn⁺: imunoglobulina do tipo Ig (a), do isotipo IgG (b) e do isotipo IgM (c), por citometria de fluxo. A cinzento encontra-se representado o controlo negativo correspondente a cada marcação.

Assim, os resultados obtidos demonstram um aumento da produção do isotipo IgG, consistente com o aumento da produção de imunoglobulinas no geral, e consequente diminuição do isotipo IgM, sugerindo a mudança de isotipo de IgM para IgG conforme esperado. No entanto, e apesar da coerência dos resultados, não se avançou para o processo de fusão celular uma vez que o título de anticorpos produzidos não foi considerado suficientemente elevado.

3.2.3 Avaliação do papel imunogénico dos antígenos BSM e OSM para produção de anticorpos anti-STn

Perante a ineficácia da tecnologia de hibridoma usando o antígeno sintético MUC1-STn, dois antígenos naturais de origem animal, BSM (do inglês *Bovine submaxillary mucin*) e OSM (do inglês *Ovine submaxillary mucin*), com uma percentagem de aproximadamente 53% e 94% de STn na sua

constituição em relação ao peso total, respectivamente, foram testados nas imunizações para a produção de anticorpos anti-STn.

3.2.3.1 Estudo da resposta imunológica humoral do murganho imunizado com BSM

Um murganho foi imunizado três vezes com 20 µg de BSM, intercalados quinzenalmente. A reactividade e o tipo de imunoglobulinas de todos os soros recolhidos antes de cada imunização foi analisada contra a linha MDA-MB-231 STn⁺, por citometria de fluxo. Observou-se que, as células apenas marcaram 2% com um MFI de 1712 com o soro controlo (obtido de uma amostra de sangue antes da primeira imunização) marcado com o anticorpo secundário Ig policlonal e que a percentagem de marcação após a primeira, segunda e terceira imunização foram de 36% com um MFI de 1393, 23% com um MFI de 1481 e 19% com um MFI de 1189, respectivamente (Fig 3.5 a). O soro do murganho após a primeira imunização foi o que apresentou uma maior percentagem de células a marcar IgG (82% com um MFI de 59904) em relação ao soro utilizado como controlo (28% com um MFI de 3129). A segunda e a terceira imunização apresentaram valores de marcação mais baixos e semelhantes, sendo eles 64% (MFI de 16141) e 67% (MFI de 21215) respectivamente (Fig 3.5 b). Em relação à produção de IgM, o soro controlo recolhido antes da primeira imunização apresentou uma marcação de 14% (MFI de 3000), tendo-se seguido as percentagens de marcação de 75% (MFI de 6408), 80% (MFI de 19889) e 73% (MFI de 5500) das imunizações seguintes (Fig 3.5 c).

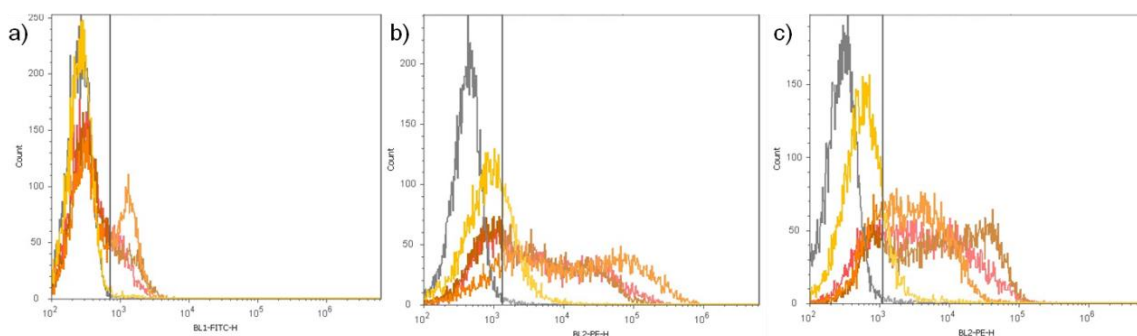


Figura 3.5- Análise da reactividade e do tipo de imunoglobulinas presentes no soro do murgancho antes da 1ª imunização (amarelo), após a 1ª imunização (laranja), 2ª (castanho) e 3ª (vermelho) imunização com BSM contra a linha celular MDA-MB-231 STn⁺: imunoglobulina do tipo Ig (a), do isotipo IgG (b) e do isotipo IgM (c), por citometria de fluxo. A cinzento encontra-se representado o controlo negativo correspondente a cada marcação.

Em suma, a marcação dos soros do murgancho imunizado com BSM foi positiva mas muito fraca e diminuiu ao longo do tempo indicando o desenvolvimento de tolerância imunológica contra o antígeno utilizado. Com base nestes resultados, não se avançou para o processo de fusão celular.

3.2.3.2 Estudo da resposta imunológica humoral do murganho imunizado com OSM

Um outro murganho foi imunizado três vezes com 10 µg do antígeno OSM, com intervalos semanais. Após a terceira imunização, a reactividade do soro foi analisada contra as linhas celulares MDA-MB-231 STn⁺, tratada ou não com sialidase, MDA-MB-231 WT, MCR STn⁺ e MCR CN, por citometria de fluxo. Verificou-se que o soro marcou 52% das células da linha MDA-MB-231 STn⁺ (Fig 3.6 a) com um MFI de 4119, em comparação com o controlo positivo de marcação anti-STn TKH2 que marcou 65% das células e apresentou um MFI de 2608. Nas células tratadas enzimaticamente, ocorreu uma diminuição da marcação com o soro de 52% para 14% (com um MFI de 1570) e da marcação com o anticorpo controlo TKH2 de 65% para 50% (com um MFI de 2627). Para além disso, observou-se que o soro marcou 88% das células da linha MCR STn⁺ (Fig 3.6 b) com um MFI de 19810, em comparação com o controlo positivo de marcação que marcou igualmente 88% das células mas com um MFI de 8385. O mesmo soro não demonstrou ser reactivo contra as linhas MDA-MB-231 WT e MCR CN negativas para STn.

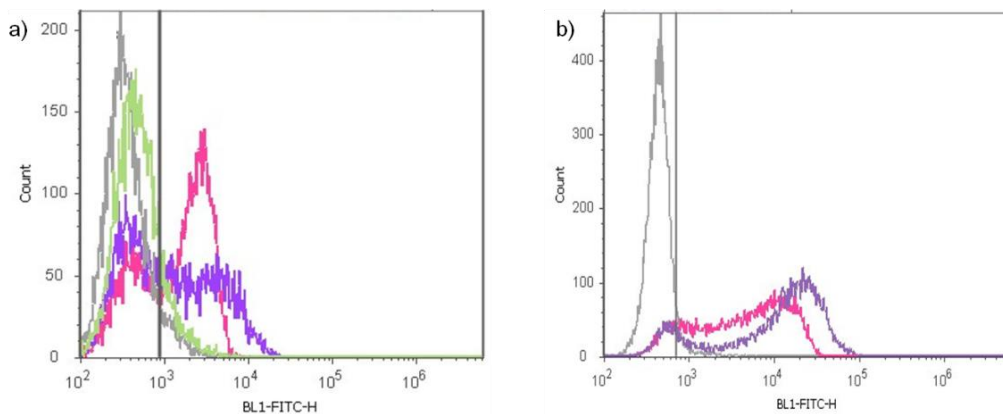


Figura 3.6- Análise do soro do murganho imunizado com OSM, contra a linha celular MDA-MB-231 STn⁺ (a) tratada (verde) ou não com sialidase (roxo) e contra a linha celular MCR STn⁺ (b) não tratada (roxo), por citometria de fluxo. A rosa encontra-se marcado o controlo positivo de marcação anti-STn nas células não tratadas e a cinzento o controlo negativo de marcação das células marcadas apenas com o anticorpo secundário.

De seguida, foi avaliado o tipo de imunoglobulinas presente no soro, na presença das células da linha MDA-MB-231 STn⁺. Constatou-se que no soro existiam 90% das células (com um MFI de 21211) a serem detectadas por anticorpos (Fig 3.7 a) e que os anticorpos presentes detectados com o anticorpo secundário anti-IgG (Fig 3.7 b) marcaram 98% das células (com um MFI de 190387) e que os detectados com o anticorpo secundário anti-IgM marcaram 77% das células (com um MFI de 2941).

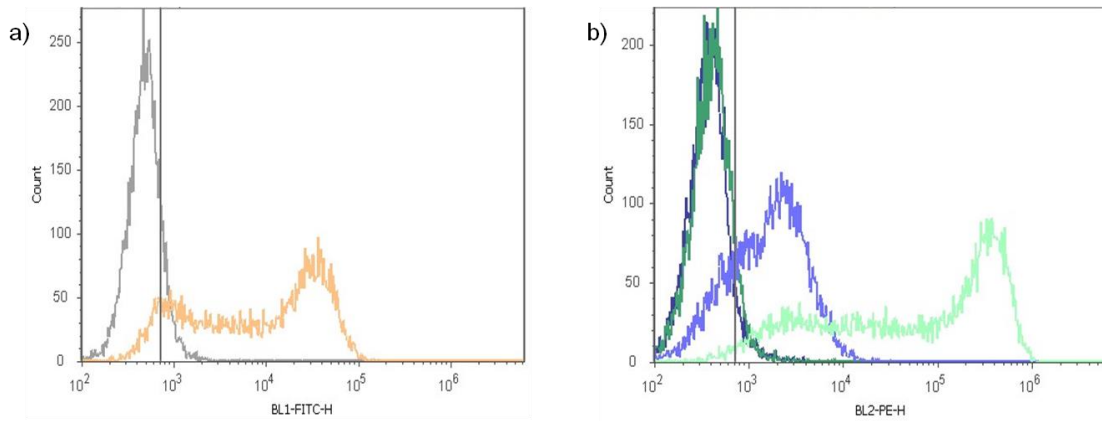


Figura 3.7- Análise do tipo de imunoglobulinas presentes no soro do murganho imunizado com OSM contra a linha celular MDA-MB-231 STn⁺: imunoglobulina do tipo Ig (laranja) (a), do isotipo IgM (azul) e do isotipo IgG (verde claro) (b), por citometria de fluxo. A cinzento está representado o controlo negativo de marcação do tipo Ig (a), a azul escuro o controlo negativo de marcação IgM e a verde escuro o controlo negativo de marcação IgG (b).

Estes resultados sugerem uma grande probabilidade de estarem a ser produzidos anticorpos anti-STn no murganho imunizado com OSM. Assim, foi dada uma imunização extra de 20 µg de OSM e, 3 dias depois, foi realizada a fusão celular. O soro do murganho sacrificado foi obtido a partir de uma amostra de sangue e analisado. Primeiramente, o soro foi analisado por citometria de fluxo contra as linhas celulares MDA-MB-231 STn⁺ e MCR STn⁺, ambas tratadas ou não com sialidase. Verificou-se que, o soro marcou 47% das células da linha MDA-MB-231 STn⁺ com um MFI de 4101 (Fig 3.8 a), comparativamente ao controlo positivo de marcação com TKH2 que marcou 63% com um MFI de 7928. Nas células tratadas enzimaticamente, embora a percentagem de marcação com o soro só tenha diminuído de 47% para 42%, a redução do MFI de 4101 para 1870 foi considerada significativa.

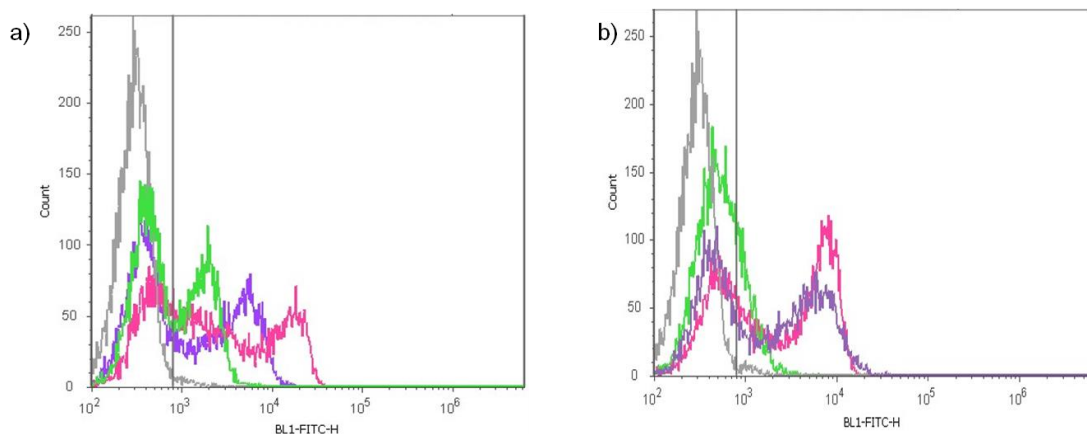


Figura 3.8- Análise do soro do murganho imunizado com OSM, obtido da amostra de sangue recolhida no dia da fusão celular, contra a linha celular MDA-MB-231 STn⁺ (a) tratada (verde) ou não com sialidase (roxo) e contra a linha celular MCR STn⁺ (b) tratada (verde) ou não tratada (roxo), por citometria de fluxo. A rosa encontra-se marcado o controlo positivo de marcação anti-STn das células não tratadas e a cinzento o controlo negativo de marcação das células marcadas apenas com o anticorpo secundário.

Relativamente à marcação com a linha MCR STn⁺ (Fig 3.8 b), observou-se que o soro marcou 56% das células com um MFI de 5545 em comparação com o controlo positivo de marcação TKH2 que marcou 65% das células com um MFI de 5716. Nas células desta linha tratadas enzimaticamente observou-se uma diminuição da marcação com o soro de 56% para 22% com um MFI de 1282.

Com base nestes ensaios, foi possível entender que no dia em que se realizou a fusão celular existiam células B, no murganho imunizado com OSM, produtoras de anticorpos contra estruturas sialiladas muito provavelmente STn.

Concluída a análise por citometria de fluxo, em que se estudou a reactividade do soro do murganho contra as glicoproteínas presentes na superfície das células tumorais, foi analisado o padrão de marcação do soro contra lisados proteicos de linhas celulares STn⁺ e STn⁻, por *Western blot*. Assim, foi possível realizar uma análise mais completa das glicoproteínas intra e extracelulares presentes nas linhas utilizadas como modelo de estudo neste trabalho.

3.2.3.2.1 Análise da reactividade do soro do murganho imunizado com OSM, por *Western blot*

Numa primeira fase, as células das linhas MDA-MB-231 STn⁺ e MCR STn⁺ foram lisadas e quantificadas quanto ao seu teor proteico. Os valores de quantificação obtidos foram de 14,85 µg/µL para a linha MDA-MB-231 STn⁺ e de 7,4 µg/µL para a linha MCR STn⁺.

De seguida, foi feito um gel de poliacrilamida a 12% (Fig 3.9 a) onde se colocou 60 µg de lisado proteico de cada linha por poço. A membrana foi marcada com o soro (1:50) e, após revelação da membrana num filme por quimioluminescência, foi possível observar o padrão de bandas das proteínas que foram reconhecidas pelo soro do murganho imunizado com OSM. A marcação pareceu ser semelhante para as duas linhas, com bandas na zona de massa molecular igual ou superior 50 kDa, embora mais intensa no caso da linha MDA-MB-231 STn⁺ possivelmente devido à maior expressão de STn que esta apresenta.

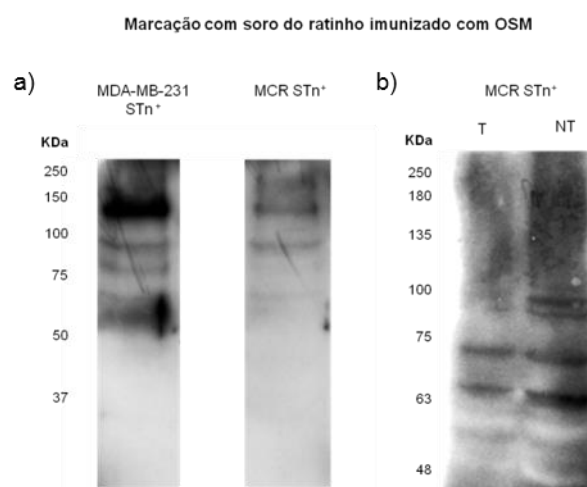


Figura 3.9- Análise por *Western blot* das proteínas STn⁺ presentes nos lisados proteicos da linha celular MDA-MB-231 STn⁺ e da linha MCR STn⁺ (a), e lisados proteicos da linha MCR STn⁺ tratada (T) ou não (NT) com sialidase (b), com marcação com o soro do murganho imunizado com OSM.

De forma a corroborar os resultados obtidos por citometria de fluxo, foi estudada a especificidade dos anticorpos presentes no soro contra o lisado proteico das linhas MDA-MB-231 STn⁺ e MCR STn⁺, as quais tinham sido previamente tratadas ou não com sialidase, por *Western blot*. Para isso, procedeu-se à lise das células e posterior quantificação de proteína, cujos valores foram de 3 µg/µL para a linha MDA-MB-231 STn⁺ tratada e não tratada e de 1 µg/µL para a linha MCR STn⁺ tratada e não tratada. Foi feito um gel de poliacrilamida a 8%, possibilitando uma maior migração das proteínas comparativamente ao gel a 12%, resultando numa melhor separação das proteínas com mais 50 kDa, onde foram aplicados aproximadamente 45 µg de cada lisado proteico, tratado ou não enzimaticamente. Após marcação com o soro, foi possível observar, embora com um pouco de *background*, a diferença no padrão de bandas presente na linha MCR STn⁺ tratada ou não com sialidase (Fig 3.9 b), principalmente na zona de massa molecular correspondente aos 100 kDa.

Relativamente à marcação do soro contra a linha MDA-MB-231 STn⁺ (Fig 3.10), não foi muito notória a diferença entre as células tratadas ou não enzimaticamente, tendo a marcação no geral sido considerada fraca. Por isso, com a mesma membrana procedeu-se a uma segunda marcação com o controlo positivo de marcação TKH2, onde foi possível observar uma marcação positiva forte e bastante distinta entre as células tratadas ou não com sialidase. Duas bandas muito evidentes presentes na marcação das células que não sofreram tratamento enzimático, uma entre os 50 e os 75 kDa e outra entre os 75 e os 100 kDa, desapareceram na marcação das células tratadas com a enzima.

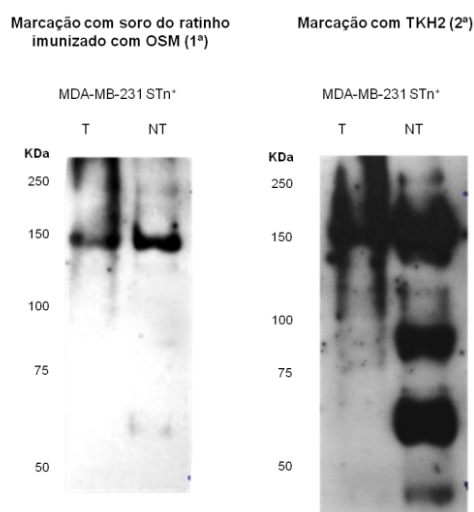


Figura 3.10- Análise por *Western blot* das proteínas STn⁺ presentes nos lisados proteicos da linha celular MDA-MB-231 STn⁺ tratada (T) ou não (NT) com sialidase. Primeira marcação com o soro do murganho imunizado com OSM e segunda marcação com o controlo positivo de marcação anti-STn TKH2.

Com o intuito de complementar o estudo sobre a especificidade do soro do murganho imunizado com OSM, foi analisado o padrão de marcação do soro contra duas amostras STn⁺, a quimera MUC1-STn e a amostra de origem animal BSM (Fig 3.11). Foi feito um gel de poliacrilamida a 8% onde foi

aplicado 5 µg de MUC1-STn e 10 µg de BSM, na condição de tratamento ou não com sialidase. Verificou-se que o soro reconheceu a estrutura de MUC1-STn, constituída pela glicoproteína MUC1 humana que apresenta uma elevada massa molecular na gama dos 135-250 kDa, e reconheceu o glicano STn uma vez que se observou uma redução bastante evidente da marcação da amostra tratada com sialidase. É de realçar o facto de o soro ter marcado de uma forma semelhante a amostra MUC1-STn ao TKH2. Relativamente à marcação do soro contra BSM, observou-se uma forte marcação que pode ser explicada pelo facto da amostra BSM ser constituída por mucinas animais e, pelo facto do soro obtido de uma amostra de sangue do murganho imunizado com OSM, o qual também é constituído por mucinas animais, possivelmente conter anticorpos contra mucinas deste tipo que podem estar também a reconhecer a BSM.

Com base nestes ensaios, foi também perceptível a eficácia do tratamento com sialidase na quimera MUC1-STn, constituída por uma única proteína, em detrimento dos lisados celulares tumorais.

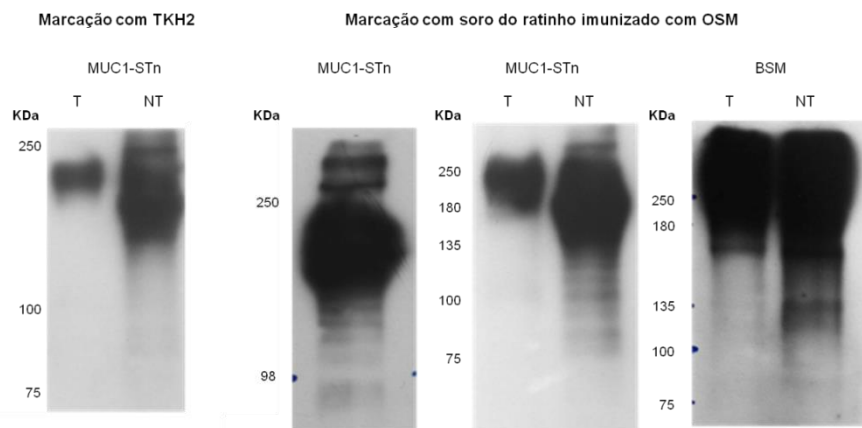


Figura 3.11- Análise por *Western blot* das proteínas STn⁺ presentes na amostra MUC1-STn, tratada (T) ou não (NT) com sialidase, e marcada com o controlo positivo de marcação TKH2. Análise das amostras MUC1-STn e BSM, ambas tratadas ou não enzimaticamente, marcadas com o soro do murganho imunizado com OSM.

Em suma, a análise do soro do murganho imunizado com OSM sugeriu a presença de anticorpos que reconheciam a quimera MUC1-STn, a amostra BSM e os lisados proteicos das linhas MDA-MB-231 STn⁺ e MCR STn⁺. Como o padrão de todas as marcações foi reduzido com o tratamento com sialidase, os anticorpos presentes no soro reconhecem estruturas sialiladas, possivelmente STn. É importante referir que, como esperado, na marcação de MUC1-STn (estrutura com um elevado teor em STn) com o anticorpo THK2 foi notória a diferença entre a marcação da quimera tratada ou não com sialidase. Como esta diferença na marcação também se verificou quando se utilizou o soro para marcar a mesma amostra, existe assim uma forte indicação que o murganho imunizado com OSM estava a produzir anticorpos contra STn.

3.2.3.2.2 Análise da reactividade do soro do murganho imunizado com OSM, por microscopia confocal

A reactividade e a especificidade do soro do murganho foram também analisadas, recorrendo à técnica de microscopia confocal. As células das linhas celulares MDA-MB-231 STn⁺, MCF-7 STn⁺, MCR STn⁺ e MCR CN foram marcadas com o corante TO-PRO3 de forma a evidenciar o núcleo e com o anticorpo positivo de marcação anti-STn TKH2 ou com o soro do murganho. É de evidenciar que a marcação representada a verde presente na superfície das células, com o controlo positivo de marcação ou com o soro, foi específica visto as células marcadas com o anticorpo secundário não apresentarem marcação.

As células da linha MDA-MB-231 STn⁺ (Fig 3.12), que possuem uma forma fusiforme, apresentaram uma marcação positiva forte bem visível com o soro do murganho, consistente com a marcação do controlo de marcação positivo TKH2. Regra geral, todas as células exibiram marcação na sua superfície celular, estando esta igualmente distribuída.

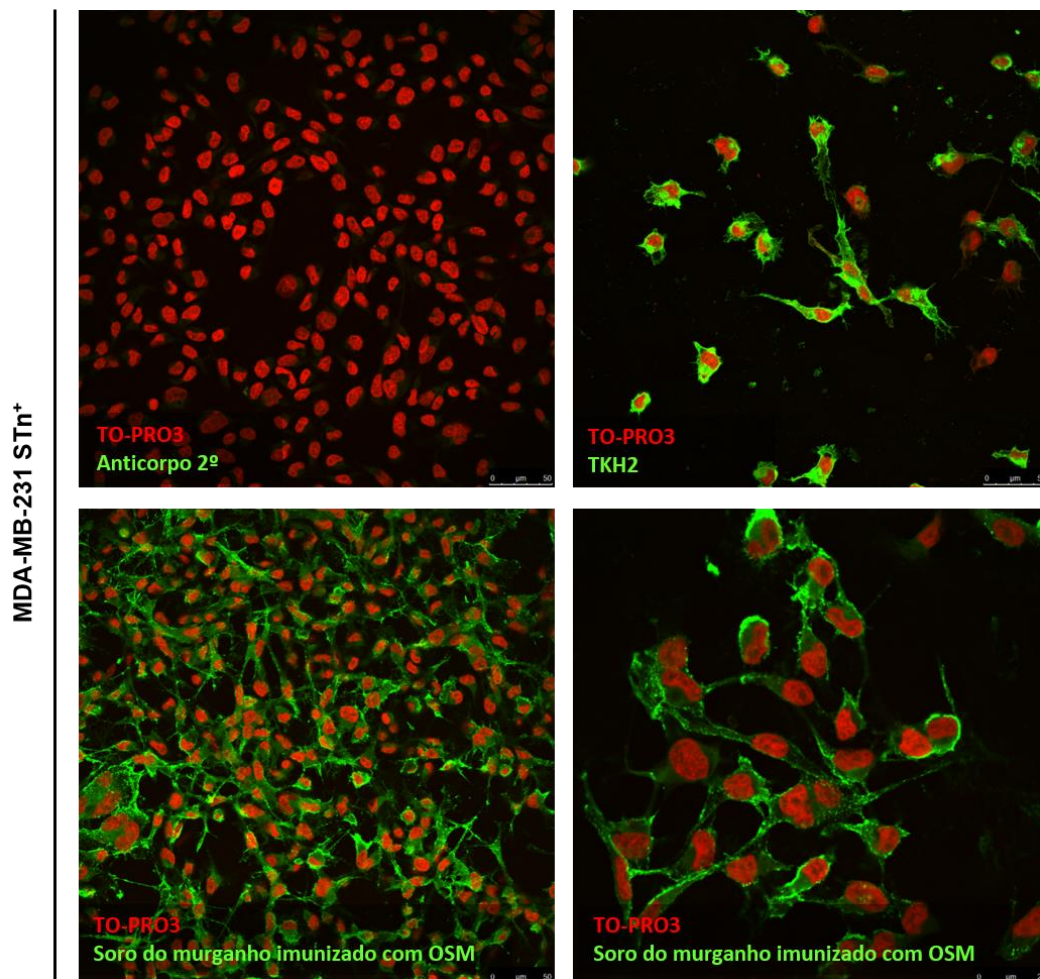


Figura 3.12- Imagens de microscopia confocal das células da linha celular MDA-MB-231 STn⁺ marcadas a verde com o anticorpo positivo de marcação anti-STn (TKH2) ou com o soro do murganho imunizado com OSM. A vermelho encontra-se marcado o núcleo das células com TO-PRO3.

Como foi possível observar, as células da linha celular MCF-7 STn⁺ possuem uma forma fusiforme semelhante à linha MDA-MB-231 STn⁺ (Fig 3.13). Tal como esperado e de acordo com os resultados de citometria de fluxo, esta linha apresentou uma marcação positiva moderada com o controlo positivo de marcação TKH2, em que é evidente a existência de uma população que expressa STn e outra que não expressa o glicano. A marcação com o soro foi semelhante à do controlo positivo mencionado. É de realçar que esta marcação foi realizada antes do isolamento positivo para STn⁺ desta linha, conforme descrito na secção 2.5 dos Materiais e Métodos, sendo portanto mais notória a existência de uma população de células negativas para o glicano STn.

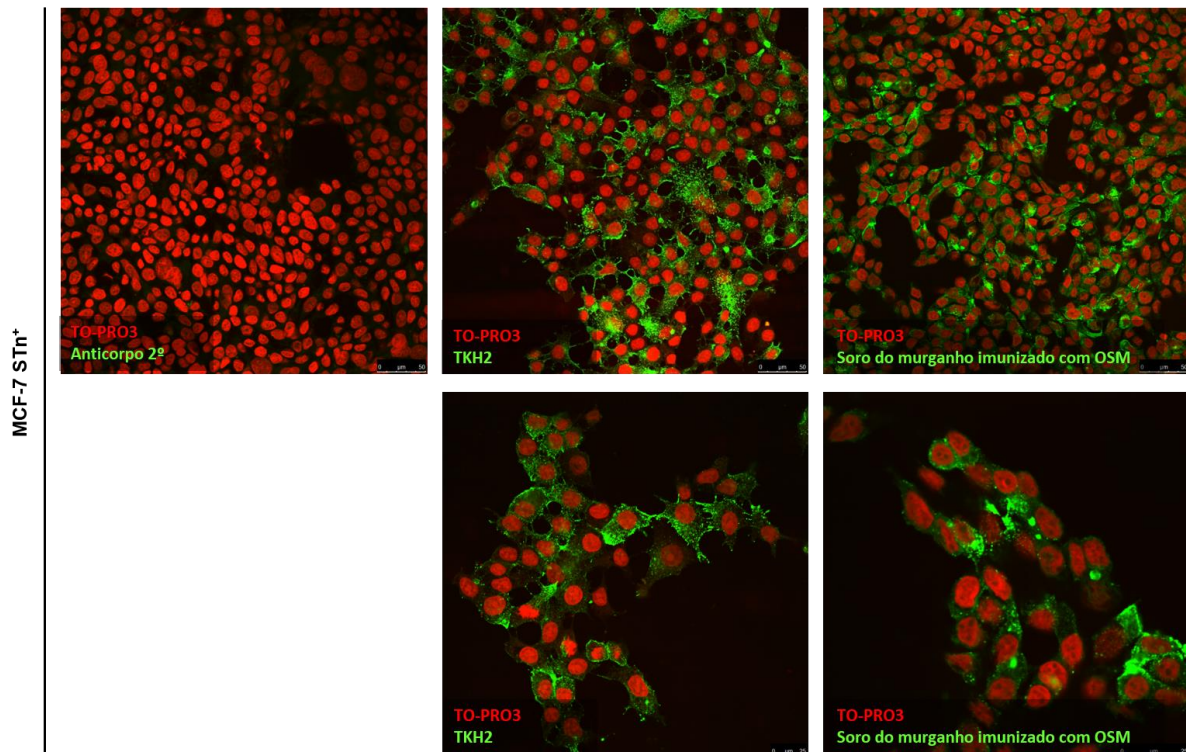


Figura 3.13- Imagens de microscopia confocal das células da linha celular MCF-7 STn⁺ marcadas a verde com o anticorpo positivo de marcação anti-STn (TKH2) ou com o soro do murganho imunizado com OSM. A vermelho encontra-se marcado o núcleo das células com TO-PRO3.

As células das linhas MCR STn⁺ e MCR CN apresentaram uma forma mais arredondada (Fig 3.14). Conforme previsto, e apesar da reduzida confluência celular, as células da linha MCR STn⁺ marcaram com o controlo positivo de marcação TKH2 e esta marcação foi consistente com a marcação do soro do murganho. As células da linha MCR CN, utilizadas como um modelo negativo para STn, não marcaram com o anticorpo anti-STn TKH2 como era de esperar mas, marcaram com o soro do murganho.

Assim, com estes resultados de microscopia percebeu-se que apesar de terem sido produzidos anticorpos no murganho contra STn, muito possivelmente existem anticorpos contra outras estruturas proteicas ou glicosídicas, demonstrando alguma inespecificidade do soro. Desta forma, o soro é considerado policlonal uma vez que possui diversos anticorpos contra diferentes alvos, e porque não foi purificado para apenas apresentar os anticorpos de interesse.

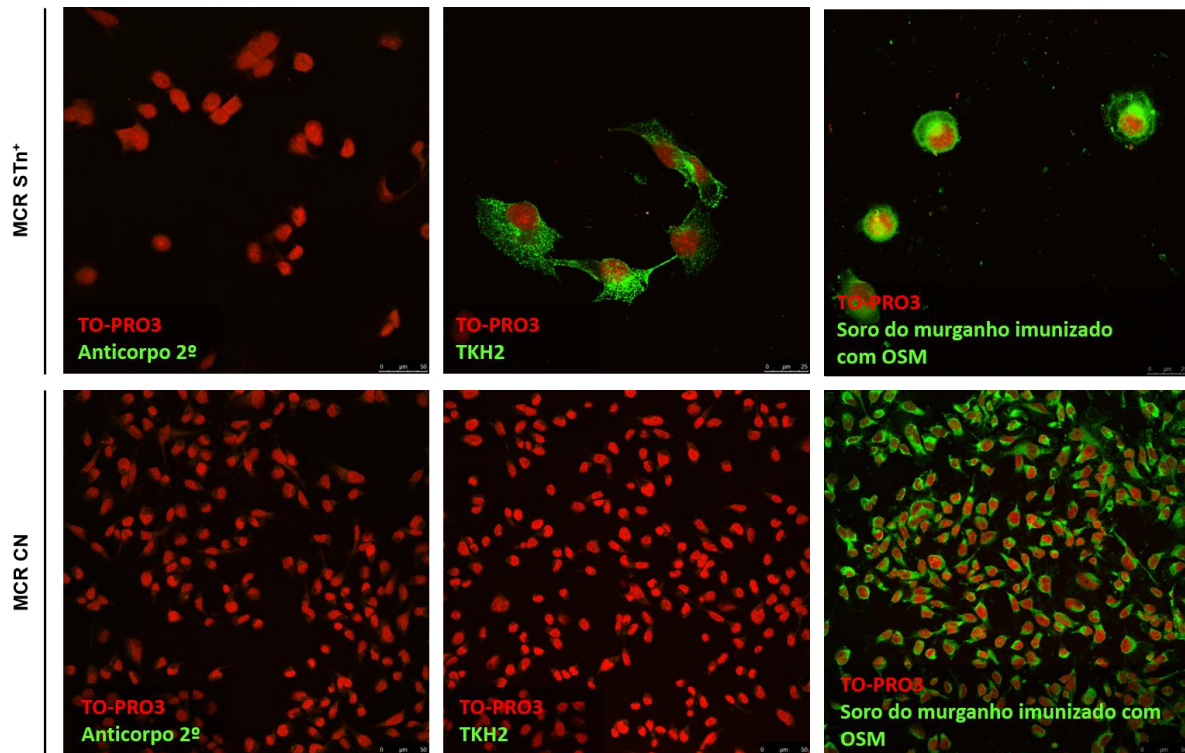


Figura 3.14- Imagens de microscopia confocal das células da linha celular MCR STn⁺ e MCR CN marcadas a verde com o anticorpo positivo de marcação anti-STn (TKH2) ou com o soro do murganho imunizado com OSM. A vermelho encontra-se marcado o núcleo das células com TO-PRO3.

Embora os resultados da análise do soro com as três técnicas anteriormente descritas tenham sido promissores, verificou-se que o processo de fusão celular foi muito pouco eficiente, obtendo-se um número muito reduzido de hibridomas (inferior a dez), cujos sobrenadantes das culturas marcaram negativamente contra linhas celulares STn⁺.

3.2.4 Análise do efeito imunogénico de lisados celulares tumorais STn⁺ na produção de anticorpos anti-STn

O último antígeno a ser testado neste trabalho consistiu em lisados celulares da linha celular de cancro da mama MDA-MB-231 STn⁺. Foram dadas imunizações semanais, com aproximadamente 200 µg de lisados proteicos por imunização.

3.2.5 Estudo da reactividade do soro do murganho imunizado, por citometria de fluxo e *Western blot*

Após a terceira imunização, a reactividade do soro foi analisada contra a linha MDA-MB-231 STn⁺, tratada ou não com sialidase, por citometria de fluxo (Fig 3.15). Observou-se que o soro marcou 92% das células com um MFI de 6384, comparativamente ao controlo positivo de marcação TKH2 que marcou 63% das células com um MFI de 7450, no entanto esta marcação aumentou após tratamento enzimático para 97% de marcação com um MFI correspondente de 10631. Como controlo do

tratamento, foram marcadas com TKH2, células tratadas e não tratadas com sialidase. Como esperado observou-se uma diminuição da marcação de 63% com um MFI de 7450 para 41% com um MFI de 4215. O soro foi também analisado contra a linha MCR STn⁺, tendo a marcação sido semelhante à da linha MDA-MB-231 STn⁺.

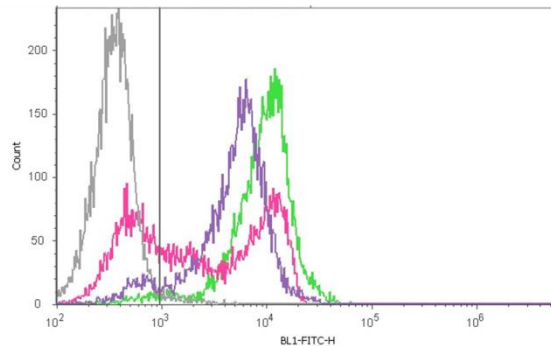


Figura 3.15- Análise do soro do murganho imunizado com lisados celulares STn⁺ contra a linha MDA-MB-231 STn⁺, tratada (verde) ou não com sialidase (roxo) e da expressão de STn com o anticorpo TKH2 (rosa) nas células não tratadas (a), por citometria de fluxo. A cinzento encontra-se representado o controlo negativo de marcação, ou seja, células apenas marcadas com anticorpo secundário.

Com esta análise percebeu-se que os lisados proteicos STn⁺ são mais imunogénicos que os glicanos associados a mucinas. Constatou-se também que no soro estavam presentes anticorpos que reconheciam essencialmente proteínas, visto a marcação ter aumentado nas células tratadas, nas quais foram removidos os ácidos siálicos presentes nas porções terminais das proteínas, ficando estas mais expostas. Embora os resultados não tenham sido promissores e não apontarem para uma produção de anticorpos STn no murganho, uma vez que foi desencadeada uma resposta forte por parte do sistema imunitário, prosseguiu-se com o processo de fusão celular. O soro do murganho obtido a partir de uma amostra de sangue recolhida no dia da fusão foi analisado contra a linha MCR STn⁺, uma linha STn⁺ que não a MDA-MB-231 utilizada como antígeno, por citometria de fluxo (Fig 3.16).

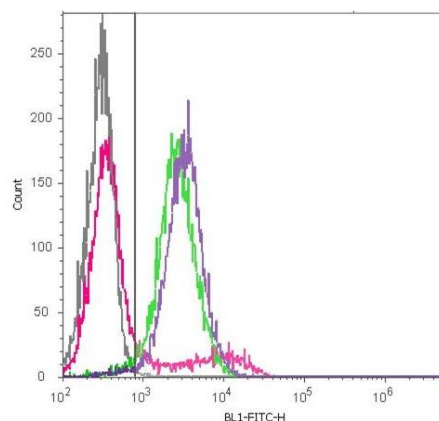


Figura 3.16 - Análise do soro do murganho imunizado com lisados celulares STn⁺, obtido da amostra de sangue recolhida no dia da fusão celular, contra a linha celular MCR STn⁺ tratada (verde) ou não com sialidase (roxo), por citometria de fluxo. A rosa encontra-se marcado o controlo positivo de marcação anti-STn das células não tratadas e a cinzento o controlo negativo de marcação das células marcadas apenas com o anticorpo secundário.

Observou-se que o soro marcou 98% das células não tratadas com um MFI de 3754 e 97% das células tratadas enzimaticamente com um MFI de 3090. Como se pode verificar pelo histograma apresentado, o padrão de marcação foi semelhante ao soro analisado após a terceira imunização. Embora tenha ocorrido uma pequena diminuição da marcação nas células tratadas com sialidase, esta não foi considerada significativa uma vez que as células não tratadas estavam a expressar pouco STn.

Para validar os resultados obtidos por citometria de fluxo, a reactividade do soro foi também analisada por *Western blot* contra as linhas MDA-MB-231 STn⁺, MDA-MB-231 WT e MCF-7 STn⁺, tratadas ou não com sialidase (Fig 3.17). Foi feito um gel de poliacrilamida a 8% onde foi aplicado 45 µg de cada lisado proteico. A membrana foi marcada com o soro (1:30) durante o período da noite. Surpreendentemente, após revelação da membrana em filme, foi possível observar com elevada nitidez a diferença entre o padrão de marcação da linha MDA-MB-231 STn⁺ e da linha MDA-MB-231 WT sugerindo a presença de anticorpos contra STn. Da mesma forma, foi possível constatar a presença de padrões de marcação com o soro distintos, contra a linha MCF-7 STn⁺, tratada ou não enzimaticamente.

Marcação com soro do ratinho imunizado com lisados celulares tumorais STn⁺

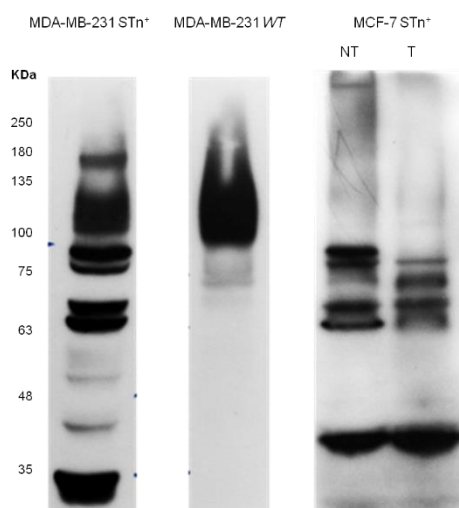


Figura 3.17- Análise por *Western blot* das proteínas STn⁺ presentes nos lisados proteicos da linha celular MDA-MB-231 STn⁺, MDA-MB-231 WT e da linha MCF-7 STn⁺, tratada (T) ou não (NT) com sialidase, com marcação com o soro do murganho imunizado com lisados celulares STn⁺.

A especificidade do soro foi também analisada contra as amostras BSM e MUC1-STn (Fig 3.18). De igual modo, foi feito um gel de poliacrilamida de 8% no qual foi aplicado 5 µg de MUC1-STn e 10 µg de BSM, na condição de tratamento ou não com sialidase. Percebeu-se que o soro também reconheceu as duas amostras STn⁺ e que o padrão de marcação foi diferente nas amostras tratadas em relação às não tratadas enzimaticamente indicando, que o soro afinal estava a reconhecer estruturas sialiladas como STn.

Marcação com soro do ratinho imunizado com lisados celulares tumorais STn⁺

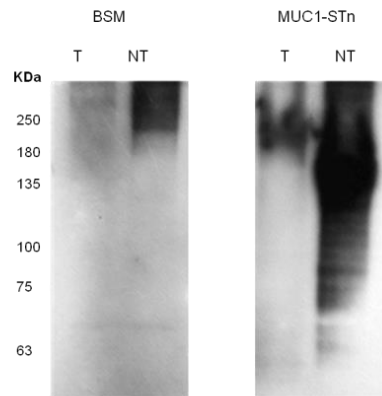


Figura 3.18- Análise por *Western blot* das proteínas STn⁺ presentes nas amostras BSM e MUC1-STn, ambas tratadas (T) ou não (NT) enzimaticamente, marcadas com o soro do murganho imunizado com lisados celulares STn⁺.

3.2.5.1 Análise da reactividade dos sobrenadantes das culturas dos hibridomas, por citometria de fluxo e ELISA indirecta

De seguida, procedeu-se à análise dos 35 sobrenadantes das culturas dos hibridomas resultantes do processo de fusão celular contra a linha MCR STn⁺, por citometria de fluxo. Destes 35 apenas 10 apresentaram uma pequena marcação, sendo que o hibridoma designado por 2D6 (Fig 3.19 a) foi o que apresentou o maior valor (38% com um MFI de 11882) em relação aos restantes sobrenadantes analisados e ao controlo de marcação positivo TKH2 (30% com um MFI de 7022).

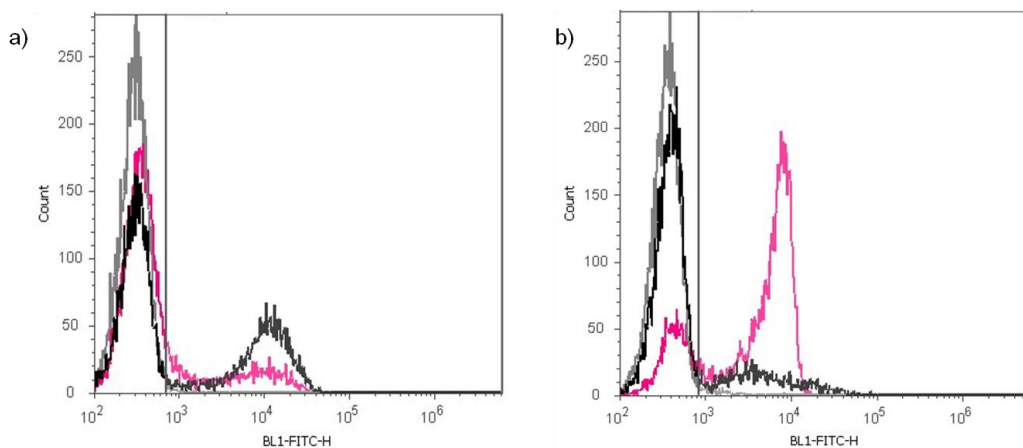


Figura 3.19- Análise da positividade dos sobrenadantes de cultura (preto) do hibridoma 2D6 contra a linha celular MCR STn⁺(a) e do hibridoma 2B4 contra a linha celular linha MDA-MB-231 STn⁺(b), obtidos após o processo de fusão celular. A rosa encontra-se marcado o controlo positivo de marcação anti-STn TKH2 e a cinzento o controlo negativo de marcação das células marcadas apenas com o anticorpo secundário.

Estes 10 sobrenadantes e outros 22 sobrenadantes foram depois analisados contra a linha MDA-MB-231 STn⁺ e todos apresentaram marcação negativa, com excepção do sobrenadante 2B4 (Fig 3.19 b)

que marcou 19% das células (com um MFI de 8074), em comparação com o controlo positivo de marcação que marcou 77% das células (com um MFI de 6640), embora a marcação não tenha sido considerada significativa.

Para além da análise anterior, outros 20 sobrenadantes de cultura de hibridomas foram testados contra a linha MDA-MB-231 STn⁺, por citometria de fluxo. Só o sobrenadante 3B1 demonstrou ser reactivo (Fig 3.20 a), embora a marcação tenha sido considerada duvidosa uma vez que marcou a quase a totalidade das células (99%), valor muito superior ao controlo positivo de marcação TKH2 que marcou 70%. O passo seguinte consistiu na análise do sobrenadante da cultura do hibridoma 3B1 contra a mesma linha celular, tratada ou não com sialidase (Fig 3.20 b). Constatou-se que o sobrenadante marcou novamente quase a totalidade das células não tratadas (99%) em comparação com o controlo positivo de marcação TKH2 que marcou 73% (com um MFI de 3465). Relativamente às células tratadas, foram apresentadas com duas populações a marcar positivamente com o sobrenadante, uma a marcar 37% (com um MFI de 2025) e outra a marcar 61% (com um MFI de 14705). Apesar disso, a marcação das células tratadas foi considerada duvidosa na medida em que a maioria das células analisadas se encontravam mortas.

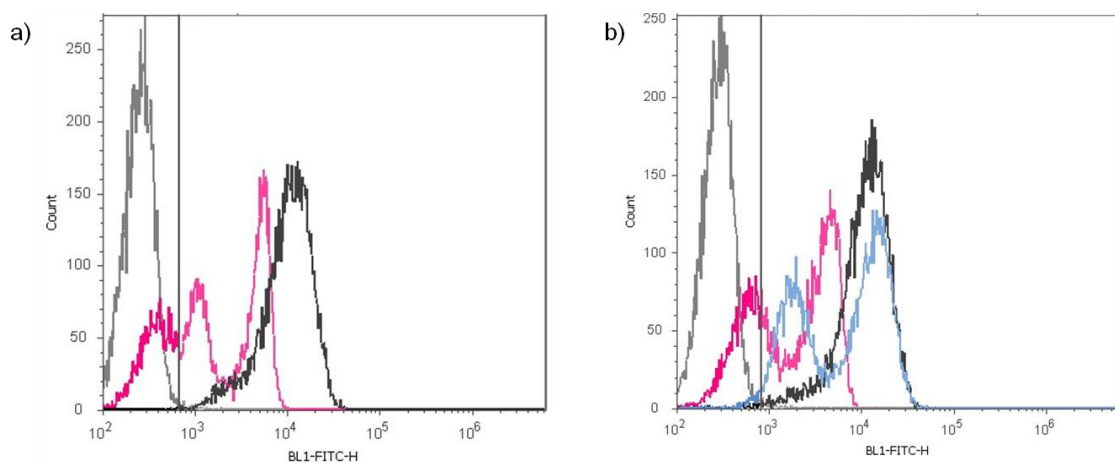


Figura 3.20- Análise da positividade do sobrenadante da cultura do hibridoma 3B1 (preto), obtido após o processo de fusão celular, contra a linha celular MDA-MB-231 STn⁺ (a). Análise da especificidade do sobrenadante 3B1 contra a linha celular MDA-MB-231 STn⁺ (b), tratada (azul) ou não (preto) com sialidase. A rosa encontra-se marcado o controlo positivo de marcação anti-STn TKH2 e a cinzento o controlo negativo de marcação das células marcadas apenas com o anticorpo secundário.

O passo seguinte consistiu em descongelar o hibridoma 3B1 que tinha sido congelado após recolha do sobrenadante analisado anteriormente, e repetir a análise do sobrenadante não só contra a linha MDA-MB-231 STn⁺, mas também contra as linhas celulares MDA-MB-231 WT, MCF-7 STn⁺, MCR STn⁺ e MCR CN, por citometria de fluxo. A marcação do sobrenadante foi negativa sugerindo que o congelamento das células conduziu à perda da capacidade de produzir os anticorpos. O sobrenadante foi ainda concentrado com um *amicon* (Centrifugal Filter Units, Millipore) e testado contra a linha MDA-MB-231 STn⁺ por citometria de fluxo, mas a marcação foi igualmente negativa.

A técnica de ELISA indirecta para análise da reactividade dos soros dos murganhos imunizados com os antígenos conjugados com STn e análise da positividade dos sobrenadantes de cultura dos hibridomas STn⁺, foi implementada e otimizada. Seguiu-se o protocolo estabelecido, conforme descrito na secção 2.6.4 dos Materiais e Métodos, para análise do soro do murganho imunizado com lisados celulares STn⁺ e do sobrenadante 3B1.

Numa primeira fase, foi avaliada qual a concentração de BSM que seria colocada a revestir o fundo dos poços da placa durante o período da noite e qual a diluição óptima de anticorpo TKH2 usado como controlo positivo. A leitura da absorvância a 450 nm (Fig 3.21) mostrou que o valor a usar seria de 0,5 µg por cada 100 µL poço, uma vez que a partir deste valor o valor da absorvância foi constante. O valor óptimo determinado para a diluição do anticorpo TKH2 foi de 1:50.

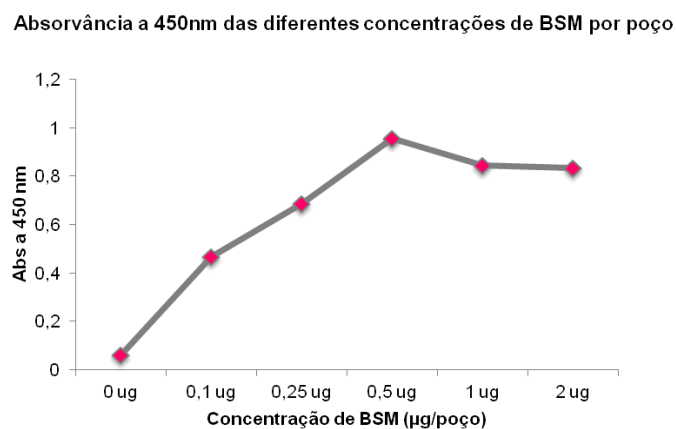


Figura 3.21- Análise da reactividade do anticorpo anti-STn TKH2 (1:50) contra diferentes concentrações de BSM colocadas a revestir os poços de uma placa de ELISA.

Procedeu-se seguidamente à optimização do tipo de bloqueio e da diluição do soro a usar durante um ensaio de marcação. Constatou-se que o bloqueio com o leite a 5% e soro numa diluição de 1:5000 representavam as melhores condições para o ensaio, permitindo que apenas os anticorpos específicos se ligassem à proteína de interesse imobilizada no fundo da placa, neste caso BSM.

Como ensaio final, recorreu-se a esta nova metodologia para estudar a reactividade do sobrenadante da cultura do hibridoma 3B1. O sobrenadante foi colocado directamente no poço sem diluição prévia e, num outro poço, diluído de 1:2. Nenhum dos poços apresentou marcação, sendo os valores de absorvância iguais aos do controlo negativo de marcação (poços sem proteína).

3.3 Caracterização no novo modelo celular MCF-7/GFP STn⁺

A segunda parte deste trabalho consistiu na criação de um novo modelo celular, que fosse fluorescente e que expressasse STn, a linha celular MCF-7/GFP STn⁺.

3.3.1 DNA plasmídico (pDNA) pLenti6/V5-D-TOPO

Para a criação deste novo modelo, foi necessário a utilização do vector lentiviral pLenti6/V5-D-TOPO, que possui gene de resistência à ampicilina, onde anteriormente tinha sido clonado o cDNA codificante para a sialiltransferase ST6GalNAc-I humana responsável pela expressão de STn (Ferreira et al., 2013). O pDNA pLenti6/V5-D-TOPO extraído das bactérias transformadas *E-coli Stb13*, foi quantificado e avaliado quanto à sua pureza, por espectrofotometria. Foi feita a leitura da absorvância do pDNA a 260 nm, que deu o valor de 0,060. Apesar de existir sempre um erro associado a esta leitura uma vez que foram utilizados apenas 5 µL do pDNA diluído 1:5000 em tampão pertencente ao *kit* pelo qual ele foi isolado, o pDNA foi considerado puro e o valor resultante da quantificação do DNA na amostra foi de 300 ng/ µL.

$$\text{Quantificação: } 0,060 \times 5000 = 300 \text{ ng/ } \mu\text{L (0,3 } \mu\text{g/ } \mu\text{L)}$$

De seguida, foi avaliada a integridade do pDNA por electroforese em gel de agarose a 0,8% (Fig 3.22). Observou-se a presença de uma única banda muito nítida, sem ter sido apresentada degradação, assumindo-se assim que o pDNA se encontrava íntegro.



Figura 3.22- Confirmação da integridade do pDNA pLenti6/V5-D-TOPO, por electroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v), 80V, 1h

Com base nestes resultados, deu-se início ao processo de transfecção, levado a cabo pelo Doutor José Ramalho, e posteriormente à transdução da linha MCF-7/GFP.

3.3.2 Análise fenotípica da linha celular MCF-7/GFP STn⁺, por citometria de fluxo

Após o processo de transdução descrito nos Materiais e Métodos, a nova linha foi analisada fenotipicamente quanto à sua expressão em STn, por citometria de fluxo. Verificou-se que 68% das células estavam a marcar STn e que, após o enriquecimento imunomagnético, este valor aumentou para 95%. No ensaio em que as células foram tratadas com sialidase, verificou-se que a marcação STn⁺ de 95% com um MFI de 82822 reduziu para 73% com um MFI de 66715 nas células tratadas. Consistentemente com estes resultados, as células não tratadas enzimaticamente não marcaram para o antigénio Tn mas, nas células tratadas em que foram removidos os ácidos siálicos presentes nas superfícies das proteínas, a percentagem de marcação foi de 75% com um MFI de 34462.

3.3.3 Análise genética da linha celular MCF-7/GFP STn⁺, por RT-PCR

Pela técnica de RT-PCR foi avaliada a expressão do gene codificante para a enzima ST6GalNAc-I responsável pelo fenótipo STn⁺ das células. Procedeu-se à análise genética da linha MCF-7/GFP STn⁺, utilizando como controlo a linha celular não transduzida MCF-7/GFP STn⁻, e como controlo endógeno, o gene da β -actina.

Verificou-se que, as duas linhas celulares apresentaram um valor de C_T semelhante para o gene da β -actina (26,854 para o caso da linha MCF-7/GFP STn⁻ e 28,093 para a linha MCF-7/GFP STn⁺). Relativamente ao gene codificante em estudo, a linha MCF-7/GFP STn⁺ apresentou um valor de C_T de 17,354 enquanto a linha MCF-7/GFP STn⁻ apresentou um valor de 32,919. Desta forma, e conforme explicado na secção 2.3.5 dos Materiais e Métodos, a linha MCF-7/GFP STn⁺ apresentou um valor de ΔC_T de -10,739 e um valor de $\Delta\Delta C_T$ -16,804, enquanto a linha MCF-7/GFP STn⁻ apresentou um valor de ΔC_T de 6,005 e um valor de $\Delta\Delta C_T$ nulo. Utilizando o método de quantificação relativa desenvolvido por Livak e Schmittgen, a linha MCF-7/GFP STn⁺ demonstrou uma expressão do gene codificante para a sialiltransferase ST6GalNAc-I 114418 vezes superior comparativamente à linha controlo MCF-7/GFP STn⁻. É de realçar que a sialiltransferase analisada na nova linha apresenta um nível de expressão de mRNA bastante elevado quando comparado com o gene do controlo endógeno ($1,7 \times 10^6$ moléculas de mRNA por cada 1000 moléculas de mRNA de β -actina).

Em suma, uma nova linha celular de cancro da mama que possui células fluorescentes e positivas para STn foi estabelecida, possibilitando no futuro o estudo dos anticorpos anti-STn produzidos.

4 Discussão

O antigénio sialil-Tn (STn) consiste num pequeno O-glicano expresso aberrantemente pela maioria dos carcinomas humanos, incluindo o carcinoma da mama, e que se encontra ausente em indivíduos saudáveis demonstrando a sua natureza associada a tumores. A expressão deste antigénio é associada a processos de migração celular e invasão, consistentes com o fenótipo maligno de cancro em estadios mais avançados (Pinho et al., 2007). No início da década de 90, foi demonstrado que o STn tem um papel no reconhecimento das células tumorais pelo sistema imunitário, protegendo as células metastáticas da degradação na corrente sanguínea (Ogata et al., 1992). Em 2014, foi relatado que este antigénio tem a capacidade de estabelecer um microambiente tolerogénico que permite o escape imunológico das células tumorais (Carrascal et al., 2014).

A expressão de STn é clinicamente relevante, não apenas por ter sido considerado um possível marcador de resistência à quimioterapia (Miles et al., 1994) e muito útil para fins de prognóstico em cancro (teste serológico de CA72-4) (Reis et al., 2010), mas também por ser considerado como um potencial alvo para estratégias imunoterapêuticas. Apesar destas evidências, existem diversos desafios imunológicos proeminentes no desenvolvimento de uma imunoterapia anti-tumoral baseada em antigénios STn, devido à sua baixa imunogenicidade (Julien et al., 2012). São necessários novos estudos que permitam aumentar o efeito imunogénico de STn e quebrar a imunotolerância por ele estabelecida. Por esta razão, tem vindo a ser difícil a produção de anticorpos específicos para STn, por exemplo, pela tecnologia de hibridoma. Neste tipo de produção, existem alguns passos críticos que devem ser tidos em consideração e que necessitam de ser otimizados, tais como a escolha do tipo e da quantidade do antigénio, a selecção do adjuvante, a preparação da mistura que será injectada no murganho, o volume de injeção e, por último, a escolha da rotina de imunizações, ou seja, o intervalo de tempo entre cada imunização (Leenaars and Hendriksen, 2005).

Assim, este trabalho teve como objectivo geral a produção de anticorpos monoclonais terapêuticos contra sTn, e como um dos objectivos específicos o estudo do papel imunogénico de diferentes antigénios baseados em STn para a produção desses anticorpos. Para monitorizar a produção dos anticorpos de interesse, foi recolhida uma amostra de sangue do murganho e foi analisada a reactividade do soro obtido a partir dessa amostra, por diferentes técnicas laboratoriais. A presença dos anticorpos nos sobrenadantes de cultura dos hibridomas foi analisada contra células tumorais STn⁺, por citometria de fluxo. A técnica de ELISA indirecta foi otimizada para futura análise da especificidade de sobrenadantes.

4.1 Caracterização fenotípica das linhas celulares de cancro da mama

Durante este trabalho, foi utilizado como modelo de estudo as linhas celulares de cancro da mama MDA-MB-231 e MCF-7. As duas linhas representam o cancro da mama em fase metastática mas diferem no tipo histológico, isto é, a linha MCF-7 pertence ao subtipo luminal A (RE⁺, RP^{+/-}, HER2⁻) (Holliday and Speirs, 2011), embora já tenha sido descrita como HER2⁺ (Lattrich et al., 2008), e a linha

MDA-MB-231 representa o cancro denominado por triplo negativo (RE^- , RP^- , $HER2^-$) (Holliday and Speirs, 2011).

As variantes das duas linhas celulares, positivas e negativas para STn foram caracterizadas fenotipicamente, por citometria de fluxo. A marcação com a lectina PNA e SNA demonstrou ser coerente para a linha MCF-7, em que MCF-7 STn⁺ apresentou uma menor expressão do antígeno T e ST e uma maior marcação de estruturas sialiladas $\alpha 2,6$ em relação a MCF-7 WT. Ou seja, a sobreexpressão da sialiltransferase ST6GalNAc-I, responsável pela expressão do antígeno STn, na linha MCF-7 STn⁺ tem a capacidade de inibir, por competição, a adição de um resíduo de galactose ao antígeno Tn, que daria origem ao antígeno T. Por sua vez, se existe em pouca quantidade o antígeno T então, não existe substrato suficiente para as sialiltransferases específicas formarem a forma glicosídica ST. A mesma coerência de resultados não foi observada na caracterização fenotípica da linha MDA-MB-231. As células MDA-MB-231 STn⁺ apresentaram uma menor quantidade de estruturas sialiladas $\alpha 2,6$ e uma maior expressão do antígeno T comparativamente à linha controlo MDA-MB-231 WT. Relativamente à marcação com a lectina MAA, esta deveria ser menor nas linhas STn⁺ visto a expressão de ST6GalNAc-I inibir a formação da sialilação em $\alpha 2,3$. Contrariamente ao esperado, a marcação com esta lectina foi muito forte para a linha MDA-MB-231 STn⁺ sugerindo que, possivelmente, a marcação desta lectina não foi específica e que provavelmente tenha a capacidade de reconhecer também estruturas com sialilação em $\alpha 2,6$. A linha MCF-7 apresentou uma quantidade semelhante de sialilação $\alpha 2,3$ nas duas linhas o que pode ser explicado pela presença de uma grande população STn⁻ da linha MCF-7 STn⁺, antes do enriquecimento imunomagnético realizado. Embora o tratamento com sialidase não tenha sido bem sucedido na marcação com as lectinas SNA e MAA, seria suposto observar uma diminuição da marcação com as duas lectinas confirmando o conteúdo de ácido siálico com os tipos de ligação $\alpha 2,6$ e $\alpha 2,3$ presente nos terminais glicosídicos na superfície das células tumorais. Ainda assim, as marcações da linha MCF-7 STn⁺ com as lectinas PNA, SNA e MAA estão de acordo com o que foi descrito relativamente à linha de cancro de bexiga MCR STn⁺ (Carrascal et al., 2014).

Como seria de esperar da marcação com os anticorpos, as células das linhas MDA-MB-231 STn⁺ e MCF-7 STn⁺ apresentaram expressão do antígeno STn e apenas a linha MCF-7 STn⁺ demonstrou expressar o antígeno Tn. A presença de STn e a especificidade do anticorpo TKH2 usado como controlo positivo de marcação durante todo este trabalho, foi confirmada nas duas linhas tratadas enzimaticamente, pela ausência de marcação com o anticorpo anti-STn e pelo aumento da marcação com o anticorpo anti-Tn. Por fim, constatou-se que a glicoproteína mucina 1 (MUC1) tanto é expressa pela linha MCF-7 STn⁺ como pela linha MCF-7 WT e que, apesar da linha MDA-MB-231 STn⁺ não ter apresentado marcação, esta pode estar presente mas dificilmente ser detectada tal como foi descrito anteriormente (Julien et al., 2009).

A principal conclusão que se pode tirar após esta caracterização fenotípica das duas linhas celulares de cancro da mama, é que a sobreexpressão da sialiltransferase ST6GalNAc-I não só é responsável pela expressão de STn como também pela alteração do padrão de O-glicosilação presente na superfície das células, facto este que já tinha sido anteriormente descrito (Carrascal et al., 2014;

Julien et al., 2006). Para além disso, é possível inferir que a linha MDA-MB-231 *WT* utilizada como controlo negativo de marcação para STn possivelmente não representa um verdadeiro controlo relativamente à linha MDA-MB-231 STn⁺, visto o processo de transfecção poder alterar por si só as células. Um bom controlo negativo seria a linha MDA-MB-231 anteriormente tranfectada com o vector plasmídico vazio, ou seja, sem a região codificante para a enzima ST6GalNAc-I (Julien et al., 2001).

4.2 Murganho imunizado com a quimera MUC1-STn induziu tolerância imunológica

Inicialmente foi analisado se o antigénio STn seria um imunogénio mais eficiente se tivesse conjugado com a MUC1 humana, uma glicoproteína expressa por mais de 90% dos cancros de mama (Sorensen et al., 2006). Com o intuito de produzir anticorpos anti-STn, foi utilizado como antigénio a glicofoma específica de tumores, a MUC1-STn, considerada uma nova e valiosa glicoproteína com potencial de imunodiagnóstico e para fins terapêuticos (Tarp et al., 2007). Esta quimera foi obtida através de um processo quimioenzimático em que se recorreu ao uso de três glicosiltransferases recombinantes humanas (GalNAc-T2, GalNAc-T4 e GalNAc-T11) para sintetizar a estrutura Tn em péptidos sintéticos de MUC1 com múltiplas repetições (60-mer), e posteriormente a sialiltransferase ST6GalNAc-I recombinante de rato para a produção de STn (Sorensen et al., 2006).

Neste trabalho verificou-se que, imunizando um murganho com 10 ou 20 µg da quimera, MUC1-STn semanalmente ou quinzenalmente respectivamente, existia produção de anticorpos do isotipo IgG, que estavam a reconhecer estruturas sialiladas. No entanto, como não se observou um aumento significativo na quantidade destes anticorpos no soro do murganho ao longo das imunizações, esse facto sugere que ocorreu tolerância imunológica e, subsequentemente, os sobrenadantes de cultura dos hibridomas obtidos após a realização da fusão celular não demonstraram reactividade contra linhas tumorais STn⁺. Este resultado pode ser comparado com um estudo anterior em que um murganho foi subcutaneamente imunizado com 10 a 15 µg da quimera MUC1-STn acoplada à proteína KLH, quinzenalmente, e no qual se verificou uma grande produção de anticorpos que reconheciam MUC1, também do isotipo IgG, que reagiram contra linhas tumorais MUC1⁺, não sendo no entanto nesse soro detectado anticorpos que reconhecessem OSM (STn) (Sorensen et al., 2006). Neste mesmo estudo de Sorensen *et al*, foi demonstrado que o soro de murganhos imunizados com a quimera MUC1-STn marcavam tecidos de cancro da mama primário que expressavam MUC1 e STn, indicando que poderá existir produção de anticorpos que reconhecem estas duas estruturas em conjunto e não individualmente. Outra evidência para esta hipótese é que este soro reagiu com a quimera MUC1-STn, mas não com a estrutura MUC1 não glicosilada.

Como já descrito por Soares *et al.*, as vacinas baseadas em estruturas MUC1 são ineficientes em induzir respostas humorais contra mucinas associadas a cancro, devido ao efeito de tolerância (Soares et al., 2001). Neste trabalho, ao contrário de Sorensen *et al*, verificou-se indução de tolerância quando os murganhos foram imunizados com a quimera MUC1-STn. Uma das razões para tal pode ter sido pelo não acoplamento da quimera à proteína KLH, a qual provavelmente iria estimular uma resposta humoral muito mais eficaz. Portanto, conclui-se que a quimera MUC1-STn

por si só não é muito imunogénica, necessitando de algo para além do adjuvante Freund, o qual foi utilizado nas duas situações, que aumente a sua imunogenicidade. Mesmo assim, se esta glicofoma for utilizada como antigénio, possivelmente a maioria dos anticorpos produzidos serão contra o conjunto da MUC1 com STn e não para a estrutura sialilada STn ou para a MUC1 individualmente.

Um outro estudo também relatou que murganhos imunizados com 10 µg da quimera em adjuvante Freund, sem conjugação com KLH, desenvolveram uma resposta imune humoral forte, com anticorpos do isotipo IgG contra MUC1-STn, embora menor do que quando acoplado a KLH. Neste caso, os murganhos foram previamente injectados com ciclofosfamida, um imunomodulador que ajuda a eliminar linfócitos T reguladores de forma a tornar o processo de imunizações mais eficiente. Apesar disso, os resultados foram pouco consistentes visto a produção de anticorpos que reconheciam a glicofoma MUC1-STn ter apenas ocorrido em 50% dos murganhos imunizados e não se ter verificado qualquer alteração na monitorização do crescimento do tumor no murganho em comparação com os murganhos controlos (Julien et al., 2009).

Com esta parte do trabalho foi possível concluir que, apesar da tolerância imunológica desenvolvida pelo murganho é possível produzir anticorpos anti-MUC1-STn do isotipo IgG, utilizando como antigénio a quimera MUC-STn. Embora os resultados não tenham sido positivos na sua maioria, acredita-se que com alterações no protocolo de imunizações como a dose de antigénio por injeção, o aumento do número de dias entre imunizações e o acoplamento da quimera a uma molécula estimulatória e/ou a adjuvante Freund completo na primeira imunização, seja possível aumentar a eficácia deste antigénio para produção de anticorpos anti-STn (Julien et al., 2009).

4.3 Mucinas de origem animal como antigénios: OSM é mais imunogénico que BSM

As mucinas de origem animal OSM e a BSM representam dois tipos de mucinas presentes nas secreções da cavidade oral, produzidas pelas glândulas submaxilares de gado ovino e bovino, respectivamente. A mucina OSM que foi utilizada como antigénio é essencialmente constituída por 94% de STn, 4% do antigénio T e 2% da estrutura $Fuc\alpha(1-2)Gal\beta(1-3)GalNAc$ em relação ao seu peso total. Não foi possível saber com exactidão a constituição da mucina BSM utilizada nas imunizações, no entanto, esta foi descrita como tendo 53% de STn (Tsuji and Osawa, 1986). Estas duas mucinas animais, anteriormente purificadas e caracterizadas (Hill et al., 1977; Jiang et al., 2000; Tettamanti and Pigman, 1968), foram utilizadas como antigénios baseados em STn para a produção de anticorpos anti-STn, sendo que a mucina BSM já foi descrita como uma possível homóloga da mucina MUC5B humana (Jiang et al., 2000).

Pela técnica de citometria de fluxo, foi analisada a reactividade do soro do murganho imunizado para os anticorpos de interesse e foi também testada selectivamente a presença de anticorpos dos isotipos IgM e IgG em resposta aos antigénios BSM e OSM. Regra geral, o primeiro isotipo de imunoglobulina a aparecer em resposta à exposição de um antigénio é o isotipo IgM que, devido à sua baixa afinidade para os antigénios e curto período de semi-vida, permite apenas uma protecção rápida e de

curto prazo não tendo a capacidade de combater as células tumorais. Apenas quando as células B do murganho imunizado são capazes de receber os sinais estimulatórios das células T (ativação da célula B dependente da célula T), é que ocorre a mudança de isotipo de anticorpo de IgM para IgG. Os anticorpos IgG que possuem uma elevada afinidade para o antigénio, conseguem ligar-se às células tumorais e causar a sua destruição por um mecanismo de citotoxicidade dependente do complemento (CDC) ou citotoxicidade mediada por células e dependente de anticorpos (ADCC). Este tipo de activação da célula B é essencial para a formação de células B de memória e para respostas humorais de longa duração. Por norma, os glicanos quando administrados sozinhos ou não desencadeiam nenhuma resposta por parte do sistema imunitário ou activam as células B através de um mecanismo independente da célula T, impossibilitando a formação de anticorpos IgG de elevada afinidade. Assim, é necessário a conjugação dos glicanos com uma proteína transportadora, para que ocorra apresentação da proteína à célula T e consequente activação da célula B por um mecanismo dependente da célula T (Liu and Ye, 2012). Por esta razão, é necessário que o antigénio STn esteja conjugado a um transportador imunogénico, como por exemplo a MUC1 humana referida na secção anterior, mucinas de origem animal ou as próprias glicoproteínas presentes na superfície das células tumorais, para que ocorra produção de anticorpos do isotipo IgG e um aumento do rácio IgG/IgM levando a melhores respostas anti-tumorais. De acordo com o referido, já foi demonstrado anteriormente que STn conjugado com a proteína KLH (vacina *Theratope*) levou a uma grande produção de anticorpos IgG (Miles et al., 2011). Até à data, nenhum dos anticorpos anti-STn existentes direccionado para células de cancro da mama foi descrito como tendo a capacidade de inibir o crescimento do tumor num murganho. O único anti-STn descrito que teve essa capacidade foi o anti-3P9 (isotipo IgM) que demonstrou reconhecer e inibir especificamente células de carcinoma colo-rectal STn⁺, possivelmente por um mecanismo de CDC (An et al., 2013). Neste trabalho, verificou-se também que STn associado a treonina ou conjugado com poli(acrilamida) não demonstrou ser imunogénico, não tendo a capacidade de activar as células B mesmo através de um mecanismo independente da célula T.

Relativamente ao murganho imunizado com BSM, verificou-se que ocorreu uma produção de anticorpos embora esta não tenha sido significativa. A justificação mais plausível para este facto reside possivelmente na baixa imunogenicidade do antigénio ou no desenvolvimento de tolerância imunológica ao longo do tempo. Uma vez que a quantidade de anticorpos detectada no soro não foi considerada relevante, o processo de fusão celular não foi concretizado. Em 2006 já tinha sido demonstrado que anticorpos policlonais anti-BSM produzidos em coelho tinham a capacidade de reconhecer mucinas de diferentes origens, bovina ou humana, como por exemplo MUC1 humana (Golubovic and Bojic-Trbojevic, 2006), demonstrando que este antigénio tem potencial imunogénico e que o protocolo utilizado neste trabalho necessita de ser optimizado para permitir a produção de anticorpos anti-STn em murganho.

Contrariamente, o murganho imunizado com OSM demonstrou que este antigénio foi bastante imunogénico, visto no soro do animal terem sido detectados anticorpos do isotipo IgG, contra estruturas sialiladas muito provavelmente STn. Com base nestes resultados positivos, prosseguiu-se para o processo de fusão celular. O murganho foi sacrificado, removido o baço para a realização da

fusão celular e recolhida uma amostra de sangue, de volume superior ao recolhido durante a monitorização da resposta imune humoral, de modo a não provocar anemia no animal. O máximo de sangue recomendado que deve ser recolhido depende da espécie animal, e em murganhos não deve ultrapassar 0,3 mL (Leenaars and Hendriksen, 2005). Assim, apenas quando o murganho foi sacrificado para remoção do baço, é que se obteve uma maior quantidade de sangue que permitiu a análise da reactividade do soro para os anticorpos específicos desejados, pela técnica de *Western blot*. Esta nova análise não só permitiu a confirmação dos resultados obtidos por citometria de fluxo, como também permitiu analisar de forma mais detalhada a especificidade dos anticorpos produzidos. Assim, a capacidade do soro do murganho imunizado com OSM de reconhecer várias proteínas STn⁺ foi estudada por *Western blot*. As linhas celulares MDA-MB-231 STn⁺ e MCR STn⁺, bem como as amostras MUC-STn e BSM, foram usadas como fonte de proteínas STn⁺. Foram observadas diversas bandas na marcação contra as duas linhas tumorais STn⁺, entre os 50 kDa e superiores a 200 kDa, que correspondem a proteínas sialiladas sensíveis ao tratamento com sialidase. Este padrão de marcação da MDA-MB-231 STn⁺ está de acordo com a marcação descrita com o anticorpo anti-STn HB-STn, em que se concluiu que uma banda próxima dos 100 kDa correspondia à proteína CD44 e que uma banda superior a 200 kDa correspondia a MUC1 (Julien et al., 2006). Por sua vez, o controlo positivo de marcação com o anti-STn TKH2 que apresentou uma forte marcação e um número diverso de bandas foi consistente com o anteriormente descrito (Julien et al., 2009), sendo que algumas destas glicoproteínas (bandas) ainda não se encontram identificadas. Relativamente às duas marcações da linha MCR STn⁺ que foram feitas, foi possível observar duas bandas nítidas, nos 75 kDa e 150 kDa, que já tinham sido descritas como duas possíveis proteínas decoradas com STn (Carrascal et al., 2014). A banda de 75 kDa corresponde à proteína CD44 e a marcação superior a 150 kDa possivelmente corresponde a mucinas, no entanto o tratamento com sialidase não foi totalmente eficiente e, por isso, não se observou um desaparecimento total das bandas. Por fim, foi possível concluir que o soro do murganho imunizado com OSM, para além de reconhecer diversas proteínas decoradas com STn presentes em células tumorais, tinha muito provavelmente presente anticorpos também capazes de reconhecer outras mucinas de origem animal decoradas com STn, como a BSM, bem como a MUC1 humana presente na construção quimérica MUC1-STn. Ao fim de algumas utilizações foi notório que o soro perdeu a sua especificidade, o que não permitiu a análise de mais amostras por esta técnica.

Pela técnica de microscopia confocal em que se utilizou uma pequena quantidade de soro, foi analisada a especificidade dos anticorpos presentes no soro não só pela marcação com três linhas STn⁺ mas também com uma linha STn⁻. Verificou-se assim que o soro do murganho era inespecífico, visto marcar também a linha STn⁻, o que significa que embora tivesse anticorpos específicos contra STn também devia conter anticorpos contra outras estruturas proteicas e/ou glicosídicas.

É de realçar que o anticorpo monoclonal TKH2 do isotipo IgG representa um dos anti-STn mais usados em prática laboratorial de investigação e foi obtido a partir de imunizações com OSM (Kjeldsen et al., 1988). Entretanto, outros dois possíveis anticorpos monoclonais anti-STn, o 3C2 e o 3D1, de isotipo IgM, foram desenvolvidos através de um protocolo de imunizações de murganhos com OSM. A reactividade destes anticorpos foi confirmada pela técnica de ELISA, tendo estes

demonstrado reactividade contra BSM e OSM sugerindo que possivelmente reconhecem STn (Coomber et al., 1998; Devine et al., 1995). Para além disso, já foi relatado que doentes com cancro da mama metastático vacinados com STn acoplado a KLH desenvolveram respostas imunes humorais anti-OSM do tipo IgG e provavelmente específicas para o STn (Ibrahim et al., 2013).

Com esta parte do trabalho foi possível concluir que a percentagem de STn presente na estrutura proteica das mucinas animais contribui positivamente para o seu efeito imunogénico. A mucina OSM demonstrou ter a capacidade de desencadear uma resposta por parte do sistema imunitário e levar à produção de anticorpos anti-STn. Apesar disso, o rendimento do processo de fusão foi muito baixo e os poucos hibridomas obtidos não estavam a secretar anticorpos anti-STn indicando que novas imunizações com este antigénio devem ser feitas e, por conseguinte, uma nova fusão celular. Não obstante, mais uma vez se observou que para além das proteínas já descritas como transportadoras de STn, muitas outras existem e devem ser descobertas para fins terapêuticos.

4.4 Lisados celulares STn⁺ como antigénio para produção de anticorpos anti-STn

O último antigénio a ser testado neste trabalho consistiu em lisados celulares da linha MDA-MB-231 STn⁺. Mesmo sabendo que a quantidade de antigénio que é injectada determina a resposta imunológica que é evocada e que, se o antigénio for utilizado em quantidade excessiva pode induzir tolerância ou uma resposta imunológica não desejada, foi utilizado por injeção 200 µg do lisado misturado em adjuvante Freund. Regra geral, a dose administrada do antigénio proteico em adjuvante Freund, em murganho, deve variar entre 10 e 200 µg (Leenaars and Hendriksen, 2005).

Os resultados da análise do soro do murganho, por citometria de fluxo, não foram os expectáveis. Embora tenha ocorrido uma grande produção de anticorpos, estes não pareciam ser específicos para estruturas glicosídicas mas sim para estruturas proteicas. Ainda assim, o murganho foi sacrificado e realizou-se a fusão celular. Embora na maioria dos casos exista uma correlação positiva entre uma produção elevada de anticorpos detectada no soro e uma produção com elevado rendimento de hibridomas específicos, está descrito que nem sempre este pressuposto seja assim tão linear (Schonherr and Houwink, 1984). Por vezes uma baixa detecção dos anticorpos de interesse no soro poderá estar correlacionada com uma fusão celular com elevado rendimento em que se obtém os hibridomas de interesse e vice-versa. Nesta perspectiva, embora não tivessem sido detectados à partida anticorpos anti-STn no soro, estes poderiam estar presentes mas numa concentração muito baixa e, por isso, decidiu-se sacrificar o animal e realizar a fusão celular.

O soro do murganho obtido a partir de uma amostra de sangue recolhida no dia da fusão foi analisado por citometria de fluxo. Observou-se que, possivelmente, existiam anticorpos a reconhecer estruturas sialiladas no entanto, este ensaio não foi considerado totalmente válido uma vez que a linha MCR STn⁺ contra a qual se estava a analisar a reactividade do soro estava a expressar muito pouco este glicano. Isto deveu-se às células utilizadas para a marcação estarem com uma confluência de aproximadamente 100% e ao facto desta linha não ter sido ainda seleccionada positivamente para STn⁺. O mesmo soro foi analisado por *Western blot* contra lisados proteicos das

linhas MDA-MB-231 STn⁺ e MCF-7 STn⁺ e contra o lisado proteico da linha controlo MDA-MB-231 *WT*. Surpreendentemente, foi possível observar com bastante nitidez um padrão de marcação bem distinto entre os lisados proteicos das duas linhas STn⁺ e a linha controlo, indicando a presença de anticorpos contra estruturas sialiladas, que também foi confirmada pelo desaparecimento ou menor intensidade de bandas na linha MCF-7 STn⁺ previamente tratada com sialidase. Não foi analisada a reactividade do soro contra lisados proteicos MDA-MB-231 STn⁺ previamente tratados com sialidase, no entanto seria de prever que uma maior quantidade de bandas iria desaparecer visto esta linha apresentar uma expressão de STn significativamente superior à linha MCF-7 STn⁺. Comparativamente à marcação dos lisados proteicos MDA-MB-231 STn⁺ com o soro do murganho imunizado com OSM, esta marcação foi mais inespecífica visto o murganho ter sido imunizado com os lisados proteicos totais da mesma linha contra a qual se está a estudar a reactividade, o que resulta no reconhecimento de várias proteínas, não só glicoproteínas STn⁺. O padrão de marcação contra os lisados proteicos das duas linhas STn⁺ foi no geral semelhante, com uma forte marcação a partir dos 63 kDa, embora se estivesse à espera de uma marcação igualmente forte superior a 100 kDa para linha MCF-7 STn⁺ correspondente à massa molecular das mucinas. Ainda assim, foi possível observar uma banda de elevada massa molecular que corresponde a uma proteína sensível à sialidase e que provavelmente será a MUC1. A banda localizada perto dos 100 kDa corresponde possivelmente à proteína CD44 na linha MDA-MB-231 STn⁺, conforme já descrito (Julien et al., 2006). Em relação à linha MCF-7 STn⁺ nada se pode afirmar uma vez que por análise de citometria de fluxo esta demonstrou ser CD44⁻. Por último, e de acordo com os resultados anteriormente discutidos, verificou-se que o soro reconheceu as amostras BSM e MUC1-STn e que a reactividade foi bastante menor quando as amostras tinham sido previamente tratadas com sialidase, comprovando a existência de anticorpos contra estruturas sialiladas.

Neste caso, o processo de fusão dos esplenócitos do murganho com as células de mieloma foi eficiente e originou uma grande quantidade de hibridomas cujos sobrenadantes de cultura foram rastreados e analisados para a presença de anticorpos anti-STn. Apenas um sobrenadante, designado por 3B1, demonstrou conter os anticorpos específicos contra estruturas sialiladas no entanto, o ensaio foi considerado pouco credível na medida em que grande parte da população contra a qual se estava a analisar o sobrenadante apresentava células maioritariamente mortas. Não obstante, quando se tentou repetir o ensaio, o hibridoma que tinha sido congelado após remoção do sobrenadante da cultura, durante a fase de rastreio dos sobrenadantes, perdeu a capacidade de produzir e secretar anticorpos contra o alvo desejado.

Em suma, os lisados celulares totais de linhas STn⁺ foram muito imunogénicos e podem ser utilizados como possíveis antigénios para produção de anticorpos anti-STn. Apesar disso, pequenos passos-chave devem ser modificados no protocolo como a redução da dose de lisado celular usado por injeção e o aumento do período entre imunizações para 15 dias em vez de semanalmente. O processo de rastreio dos sobrenadantes deve ser também mais rápido para que se evite o congelamento dos hibridomas e, conseqüentemente, a perda da capacidade de produção dos anticorpos de interesse.

4.5 Optimização da técnica de ELISA indirecta para análise de sobrenadantes anti-STn

Num trabalho com esta dinâmica, foi necessário otimizar e estabelecer diferentes técnicas laboratoriais sempre com a finalidade de avaliar a reactividade do soro dos murganhos imunizados com os diferentes antigénios baseados em STn e a presença dos anticorpos anti-STn no sobrenadante da cultura dos hibridomas. A técnica de citometria de fluxo foi o método utilizado por excelência uma vez que permite uma mimetização mais próxima das condições reais idealizadas para o produto final do trabalho, ou seja, obter um anticorpo que se ligue ao antigénio STn presente na porção terminal de proteínas na superfície das células tumorais. Pela técnica de Western blot, foi não só possível analisar a reactividade do soro mas também avaliar a presença de glicoproteínas STn⁺ intra e extracelulares presentes nas linhas celulares tumorais STn⁺. Por microscopia confocal foi igualmente possível avaliar e tirar conclusões sobre a especificidade do soro e observar visualmente o padrão de marcação do mesmo nas células.

Embora estas três técnicas tenham sido cruciais e os resultados obtidos por cada uma delas tenha sido complementar com os resultados obtidos pelas outras duas técnicas, foi necessário otimizar uma nova metodologia que permitisse uma análise igualmente eficiente mas com uma maior rapidez de forma a rastrear as centenas de sobrenadantes que normalmente resultam de um processo de fusão celular eficiente. Assim, a técnica de ELISA foi a escolhida uma vez que permite a detecção de todos os tipos de moléculas biológicas mesmo em quantidades e concentrações muito baixas (Gan and Patel, 2013). A metodologia de ELISA indirecta foi então otimizada e estabelecida de forma a que, no futuro, seja possível identificar e seleccionar de uma forma mais rápida todos os sobrenadantes, sem ser necessário recorrer a um processo de congelação dos hibridomas que altere a sua capacidade de produzir os anticorpos. Em caso de resultados positivos ou dúbios, a reactividade dos sobrenadantes pode ser analisada e confirmada por citometria de fluxo.

4.6 Desenvolvimento de uma linha celular de cancro da mama a expressar STn

Já foi demonstrado que, em modelos celulares de cancro da mama e cancro gástrico, as células tumorais perdem a capacidade de expressar, *in vitro*, o antigénio STn (Clement et al., 2004; Julien et al., 2001; Julien et al., 2005; Julien et al., 2006), e por isso, as linhas celulares de cancro da mama não expressam nem ST6GalNAc-I nem STn (Cazet et al., 2010b; Julien et al., 2001).

A segunda parte deste trabalho consistiu na criação de uma nova linha celular fluorescente de cancro da mama que expressasse o antigénio STn, conseguida pela transdução lentiviral com o vector retroviral pLenti6/V5-D-TOPO anteriormente gerado e utilizado na criação da linha celular MCR STn⁺ (Ferreira et al., 2013). Toda a região codificante para a sialiltransferase ST6GalNAc-I foi anteriormente clonada no vector pLenti6/V5-D-TOPO, que permitiu a expressão dos genes inseridos através do promotor CMV. Assim, foi criada a linha celular MCF-7/GFP STn⁺ e a eficácia do processo de transdução foi analisada por citometria de fluxo e PCR em tempo real. Por RT-PCR, os níveis de

mRNA do gene codificante para ST6GalNAc-I foram analisados e normalizados em relação ao gene da B-actina, que já tinha sido demonstrado como um gene com expressão estável em linhas celulares de cancro (Videira et al., 2007), demonstrando-se a elevada expressão de ST6GalNAc-I nesta linha estabelecida. Por citometria de fluxo, foi confirmada a expressão do antígeno STn na superfície das células tumorais desta nova linha. Com estes dois ensaios complementares, mais uma vez se demonstrou que a sobreexpressão da sialiltransferase ST6GalNAc-I constitui uma das condições *sine qua non* para a expressão do antígeno STn na superfície das células tumorais.

Tal como foi provado para a linha celular de cancro da bexiga MCR STn⁺ (Ferreira et al., 2013) e para as linhas celulares de cancro da mama MDA-MB-231 STn⁺ e MCF-7 STn⁺ transfectadas com o vector de expressão pRc-CMV-hST6GacNAc-I (Julien et al., 2001), possivelmente esta nova linha terá também uma maior capacidade de migração e invasão consistente com o fenótipo maligno modulado pela expressão de STn. Para além disso, o uso de células a expressar GFP tem tido sucesso para estudar o processo metastático tumoral em diversos tipos de cancro, incluindo o cancro da mama (Li et al., 2001). Estes modelos GFP representam uma poderosa ferramenta para visualização, *in vivo*, do crescimento do tumor e processos como angiogénese, invasão e metástases (Xu et al., 2004). Assim, a nova linha de cancro de mama gerada constitui um bom modelo de estudo em virtude de apresentar todas as vantagens por ter células fluorescentes e por estas expressarem na sua superfície o antígeno STn.

4.7 Perspectivas futuras

O desenvolvimento deste trabalho foi importante na medida em que se estudou a capacidade antigénica de diferentes moléculas naturais ou sintéticas baseadas em STn e de lisados celulares totais de linhas celulares STn⁺ desencadear uma resposta imunológica forte, levando à produção de anticorpos do isotipo IgG específicos contra o antígeno tumoral STn.

Embora uns resultados tenham sido mais promissores que outros, foi possível delinear alguns dos passos críticos no processo de produção dos anticorpos anti-STn que têm que ser optimizados. Ficou definido que as próximas imunizações serão intercaladas quinzenalmente e que a dose de antígeno será restringida entre os 20 e os 100 µg dependendo do tipo de antígeno utilizado. As injeções consistirão novamente na mistura do antígeno com adjuvante Freund na proporção de 1:1 sendo utilizado na primeira imunização adjuvante Freund completo, para aumentar o efeito imunogénico do antígeno, e nas imunizações seguintes adjuvante Freund incompleto. Nestas condições, serão repetidas novas imunizações com OSM. O potencial imunogénico de novos antígenos será também testado e analisado. Novos murganhos da estirpe Balb/c serão imunizados, em separado, com a fracção membranar das células da linha MDA-MB-231 STn⁺, MCF-7 STn⁺ e MCR STn⁺, tendo em consideração que o anticorpo anti-STn B72-3 foi obtido através de imunizações com a fracção da membrana de células de cancro da mama metastático (Nutti et al., 1982).

Para além disso, uma nova estratégia de imunização será utilizada para ultrapassar o problema da tolerância imunológica muito associada a glicanos. Desta forma, um murganho será inicialmente

tolerizado através de uma primeira imunização com um lisado celular total da linha MDA-MB-231 WT, sendo utilizado como antigénio nas imunizações seguintes lisados celulares totais da linha MDA-MB-231 STn⁺. Para confirmar a eficácia desta estratégia, um outro murganho será imunizado, em paralelo, com o mesmo protocolo mas utilizando as linhas MCR CN e MCR STn⁺.

Futuramente, as reactividades dos soros dos murganhos bem como a selecção dos sobrenadantes das culturas dos hibridomas serão analisados por citometria de fluxo, *Western blot*, microscopia confocal e ELISA indirecta para a presença de anticorpos anti-STn. Quando for provado que um sobrenadante tem anticorpos específicos contra STn, realizar-se-á um processo de diluição por limite de forma a isolar uma única célula produtora de um anticorpo monoclonal (mAb) anti-STn. Posteriormente, ensaios de toxicidade contra células de cancro da mama serão realizados com o intuito de observar o mecanismo de acção dos anticorpos, seja ele CDC ou ADCC. Estes ensaios poderão ser realizados *in vitro* com as linhas celulares tumorais já caracterizadas, ou *in vivo* em ratos ou murganhos e recorrendo ao uso da nova linha MCF-7/GFP STn⁺.

Numa fase muito futura, estes mAbs irão fazer parte integrante da construção de anticorpos biespecíficos, anti-STn x anti-CD3, e biespecíficos trifuncionais, anti-STn x anti-CD3 com porção Fc, para terapia de cancro de mama ou outros tipos de cancro que expressem STn.

4.8 Conclusões gerais

A realização deste trabalho mais uma vez demonstrou que o antigénio STn é muito pouco imunogénico e que, para além do uso de adjuvante Freund, este glicano tem que ser conjugado a algo que aumente a sua imunogenicidade como proteínas, por exemplo, mucinas.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que tanto a mucina MUC1 humana como as mucinas BSM e OSM têm a capacidade de desencadear uma resposta imunológica levando à produção dos anticorpos anti-STn. Ainda assim, foi possível verificar que a construção quimérica MUC1-STn e a mucina BSM induziram uma fraca resposta humoral e, possivelmente, propiciaram um processo de tolerância imunológica. Por isso, e com base no que foi observado, se estas duas amostras STn⁺ forem novamente utilizadas como antigénios é necessário otimizar os protocolos de imunizações. Relativamente à mucina OSM, esta demonstrou ser bastante imunogénica, muito provavelmente devido ao seu teor elevado em STn, levando à produção de anticorpos anti-STn no murganho. Infelizmente o processo de fusão celular não correu como esperado e o rendimento foi relativamente baixo, sem nenhum hibridoma a secretar os anticorpos de interesse. No futuro, será repetido todo o processo de imunizações com este antigénio e realizada novamente a fusão celular.

Os lisados celulares totais de uma linha STn⁺ utilizados nas imunizações de um murganho, demonstraram que este antigénio foi o que despoletou uma maior resposta imunológica humoral, embora os anticorpos presentes no soro não pareciam ser específicos para estruturas sialiladas. Ainda assim, prosseguiu-se para o processo de fusão celular e surpreendentemente no soro do murganho parecia existir anticorpos que conheciam estruturas sialiladas. Dos hibridomas obtidos, apenas uma minoria apresentou fraca reactividade contra linhas celulares STn⁺. Apenas um

hibridoma secretava anticorpos possivelmente contra estruturas sialiladas, no entanto, este acabou por perder a capacidade de produzir anticorpos.

Em suma, os antigénios usados demonstraram diferentes capacidades de induzir uma resposta imunológica nos murganhos imunizados e mais uma vez se observou que o antigénio STn exerce uma potente actividade imunossupressora com a capacidade de causar tolerância imunológica. Verificou-se ainda que murganhos imunizados têm a capacidade de produzir anticorpos anti-STn e que estes podem ser detectados inicialmente no soro do animal.

Neste trabalho para além do estudo dos diferentes antigénios baseados em STn, procedeu-se à optimização das técnicas de citometria de fluxo, *Western blot* e microscopia confocal para análise da presença dos anticorpos anti-STn e, à optimização e implementação da técnica de ELISA indirecta que permitirá uma análise mais rápida da multiplicidade dos hibridomas obtidos em cada fusão celular.

Como conclusão da segunda parte do trabalho pode assumir-se que, actualmente existe uma nova linha celular fluorescente de cancro da mama que expressa STn, a linha MCF-7/GFP STn⁺, que permitirá futuramente o estudo do mecanismo de acção dos anticorpos anti-STn produzidos.

No geral, este trabalho contribuiu com informação importante para o desenvolvimento de uma terapia anti-tumoral baseada em anticorpos que poderá ser aplicada em prática clínica, a longo prazo, em doentes com cancro da mama ou outro tipo de cancro STn⁺.

Bibliografia

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. 2012a. Antibodies and antigens. In Cellular and Molecular Immunology, 7^a ed., pp. 89-108, Saunders, Philadelphia.
- Abbas, A.k., Lichtman, A.H., and Pillai, S. 2012b. Properties and overview of immune responses. In Cellular and Molecular Immunology, 7^a ed., pp. 1-14, Saunders, Philadelphia.
- An, Y., Han, W., Chen, X., Zhao, X., Lu, D., Feng, J., Yang, D., Song, L., and Yan, X. 2013. A novel anti-sTn monoclonal antibody 3P9 Inhibits human xenografted colorectal carcinomas. *Journal of Immunotherapy* 36: 20-28.
- Angata, T., and Varki, A. 2002. Chemical diversity in the sialic acids and related alpha-keto acids: an evolutionary perspective. *Chemical Reviews* 102: 439-469.
- Armon-Omer, A., Hadary, A., Hilu, G., Tayar, B.E., Keren, T., Sharabi-Nov, A., Bickel, A., and Klein, O. 2014. Detection of breast cancer from blood through analysis of lymphocyte fluorescent intensity using MUC1 antigen. *Breast Cancer*.
- Arosa, F.A., Cardoso, E.M., and Pacheco, F.C. 2012a. Imunoglobulinas. In Fundamentos de Imunologia, 2^a ed., pp 195-214, Lidel, Lisboa, Portugal.
- Arosa, F.A., Cardoso, E.M., and Pacheco, F.C. 2012b. Imunidade inata e inflamação. In Fundamentos de imunologia, 2^a ed., pp 57-93, Lidel, Lisboa, Portugal.
- Arosa, F.A., Cardoso, E.M., and Pacheco, F.C. 2012c. Imunologia tumoral. In Fundamentos de imunologia, 2^a ed., pp. 363-383, Lidel, Lisboa, Portugal.
- Arosa, F.A., Cardoso, E.M., and Pacheco, F.C. 2012d. Perspetiva Histórica da Imunologia. In Fundamentos de imunologia, 2^a ed., pp 1-30, Lidel, Lisboa, Portugal.
- Benson, J.R., Jatoi, I., Keisch, M., Esteva, F.J., Makris, A., and Jordan, V.C. 2009. Early breast cancer. *The Lancet* 373: 1463-1479.
- Buskas, T., Thompson, P., and Boons, G.J. 2009. Immunotherapy for cancer: synthetic carbohydrate-based vaccines. *Chemical communications* 36:5335-5349.
- Cailleau, R., Young, R., Olive, M., and Reeves, W.J., Jr. 1974. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute* 53: 661-674.
- Campbell, C.T., and Yarema, K.J. 2005. Large-scale approaches for glycobiology. *Genome biology* 6: 236.
- Cao, Y., Stosiek, P., Springer, G.F., and Karsten, U. 1996. Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study. *Histochemistry and cell biology* 106: 197-207.
- Carrascal, M.A., Severino, P.F., Guadalupe Cabral, M., Silva, M., Ferreira, J.A., Calais, F., Quinto, H., Pen, C., Ligeiro, D., Santos, L.L., *et al.* 2014. Sialyl Tn-expressing bladder cancer cells induce a tolerogenic phenotype in innate and adaptive immune cells. *Molecular Oncology* 8: 753-765.
- Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Burchell, J., and Delannoy, P. 2010a. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Research* 12: 204.
- Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Krzewinski-Recchi, M.A., Harduin-Lepers, A., Groux-Degroote, S., and Delannoy, P. 2010b. Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. *Carbohydrate research*. 345:1377-1383.
- Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., and Baty, D. 2009. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future. *British Journal of Pharmacology* 157: 220-233.

- Ching, C.K., Holmes, S.W., Holmes, G.K., and Long, R.G. 1993. Comparison of two sialosyl-Tn binding monoclonal antibodies (MLS102 and B72.3) in detecting pancreatic cancer. *Gut* 34: 1722-1725.
- Choi, B.D., Cai, M., Bigner, D.D., Mehta, A.I., Kuan, C.T., and Sampson, J.H. 2011. Bispecific antibodies engage T cells for antitumor immunotherapy. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 11: 843-853.
- Clement, M., Rocher, J., Loirand, G., and Le Pendu, J. 2004. Expression of sialyl-Tn epitopes on beta1 integrin alters epithelial cell phenotype, proliferation and haptotaxis. *Journal of cell science* 117: 5059-5069.
- Coomber, D.W., Hawkins, N.J., Dalley, D., and Ward, R.L. 1998. The significance of anti-sialyl-Tn antibodies in patients with colorectal and breast cancer. *Neoplasma* 45: 12-16.
- Crespo, H.J., Lau, J.T., and Videira, P.A. 2013. Dendritic Cells: A Spot on Sialic Acid. *Frontiers in Immunology* 4: 491.
- Croce, M.V., Isla-Larrain, M.T., Demichelis, S.O., Gori, J.R., Price, M.R., and Segal-Eiras, A. 2003. Tissue and serum MUC1 mucin detection in breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 81: 195-207.
- Dall'Olio, F., and Chiricolo, M. 2001. Sialyltransferases in cancer. *Glycoconjugate journal* 18: 841-850.
- De Abreu, F.B., Schwartz, G.N., Wells, W.A., and Tsongalis, G.J. 2014. Personalized therapy for breast cancer. *Clinical Genetics* 86: 62-67.
- Devine, P.L., Birrell, G.W., Quin, R.J., and Shield, P.W. 1995. Monoclonal antibodies recognising sialyl-Tn: production and application to immunochemistry. *Disease Markers* 12: 175-186.
- Duffy, M.J., Shering, S., Sherry, F., McDermott, E., and O'Higgins, N. 2000. CA 15-3: a prognostic marker in breast cancer. *The International journal of biological markers* 15: 330-333.
- Eissler, N., Ruf, P., Mysliwicz, J., Lindhofer, H., and Mocikat, R. 2012. Trifunctional bispecific antibodies induce tumor-specific T cells and elicit a vaccination effect. *Cancer Research* 72: 3958-3966.
- Fabbri, F., Brigladori, G., Ulivi, P., Tesei, A., Vannini, I., Rosetti, M., Bravaccini, S., Amadori, D., Bolla, M., and Zoli, W. 2005. Pro-apoptotic effect of a nitric oxide-donating NSAID, NCX 4040, on bladder carcinoma cells. *Apoptosis* 10: 1095-1103.
- Fanger, M.W., Segal, D.M., and Wunderlich, J.R. 1990. Going both ways: bispecific antibodies and targeted cellular cytotoxicity. *FASEB Journal* 4:2846-9.
- Ferreira, J.A., Videira, P.A., Lima, L., Pereira, S., Silva, M., Carrascal, M., Seuerino, P.F., Fernandes, E., Almeida, A., Costa, C., *et al.* 2013. Overexpression of tumour-associated carbohydrate antigen sialyl-Tn in advanced bladder tumours. *Molecular Oncology* 7: 719-731.
- Gan, S.D., and Patel, K.R. 2013. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology* 133.
- Goldsby, R. A., Kindt, T.J., Osborne, B.A. and Kuby, J.I. 2007. *Kuby immunology*, 6ed ed., W.H. Freeman & Company, New York.
- Golubovic, S.J., and Bojic-Trbojevic, Z.T. 2006. Human carcinoma-associated and salivary mucins detected by anti-bovine submaxillary mucin antibodies. *Biochemistry* 71: 9-17.
- Gray, A., Yan, L., and Kast, W.M. 2010. Prevention is better than cure: the case for clinical trials of therapeutic cancer vaccines in the prophylactic setting. *Molecular Interventions* 10: 197-203.

- Hill H.D., J., Schwyzer, M., Steinman, H.M., and Hill, R.L. 1977. Ovine submaxillary mucin. Primary structure and peptide substrates of UDP-N-acetylgalactosamine:mucin transferase. *252(11)*:3799-804.
- Holliday, D.L., and Speirs, V. 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research 13*: 215.
- Holmberg, L.A., and Sandmaier, B.M. 2004. Vaccination with Theratope (STn-KLH) as treatment for breast cancer. *Expert review of vaccines 3*: 655-663.
- Hortobagyi, G.N., de la Garza Salazar, J., Pritchard, K., Amadori, D., Haidinger, R., Hudis, C.A., Khaled, H., Liu, M.C., Martin, M., Namer, M., *et al.* 2005. The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clinical Breast Cancer 6*: 391-401.
- Iannello, A., and Ahmad, A. 2005. Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies. *Cancer and Metastasis Reviews 24*: 487-499.
- Ibrahim, N.K., Murray, J.L., Zhou, D., Mittendorf, E.A., Sample, D., Tautchin, M., and Miles, D. 2013. Survival Advantage in Patients with Metastatic Breast Cancer Receiving Endocrine Therapy plus Sialyl Tn-KLH Vaccine: Post Hoc Analysis of a Large Randomized Trial. *Journal of Cancer 4*: 577-584.
- Jager, M., Schoberth, A., Ruf, P., Hess, J., and Lindhofer, H. 2009. The trifunctional antibody ertumaxomab destroys tumor cells that express low levels of human epidermal growth factor receptor 2. *Cancer Research 69*: 4270-4276.
- Jiang, W., Gupta, D., Gallagher, D., Davis, S., and Bhavanandan, V.P. 2000. The central domain of bovine submaxillary mucin consists of over 50 tandem repeats of 329 amino acids. Chromosomal localization of the BSM1 gene and relations to ovine and porcine counterparts. *European Journal of Biochemistry 267*: 2208-2217.
- Ju, T., Otto, V.I., and Cummings, R.D. 2011. The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity. *Angewandte Chemie International Edition in English 50*: 1770-1791.
- Ju, T., Wang, Y., Aryal, R.P., Lehoux, S.D., Ding, X., Kudelka, M.R., Cutler, C., Zeng, J., Wang, J., Sun, X., *et al.* 2013. Tn and sialyl-Tn antigens, aberrant O-glycomics as human disease markers. *Proteomics Clinical Applications 7*: 618-631.
- Ju, T., Aryal, R.P., Kudelka, M.R., Wang, Y., and Cummings, R.D. 2014. The Cosmc connection to the Tn antigen in cancer. *Cancer Biomarkers 14*: 63-81.
- Julien, S., Krzewinski-Recchi, M.A., Harduin-Lepers, A., Gouyer, V., Huet, G., Le Bourhis, X., and Delannoy, P. 2001. Expression of sialyl-Tn antigen in breast cancer cells transfected with the human CMP-Neu5Ac: GalNAc alpha2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc-I) cDNA. *Glycoconjugate journal 18*: 883-893.
- Julien, S., Lagadec, C., Krzewinski-Recchi, M.A., Courtand, G., Le Bourhis, X., and 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.
- Julien, S., Adriaenssens, E., Ottenberg, K., Furlan, A., Courtand, G., Vercoutter-Edouart, A.S., Hanisch, F.G., Delannoy, P., and 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*: 54-64.
- Julien, S., Picco, G., Sewell, R., Vercoutter-Edouart, A.S., Tarp, M., Miles, D., Clausen, H., Taylor-Papadimitriou, J., and Burchell, J.M. 2009. Sialyl-Tn vaccine induces antibody-mediated tumour protection in a relevant murine model. *British journal of cancer 100*: 1746-1754.
- Julien, S., Videira, P.A., and Delannoy, P. 2012. Sialyl-Tn in Cancer: (How) Did We Miss the Target? *Biomolecules 2*: 435-466.

- Kiewe, P., Hasmuller, S., Kahlert, S., Heinrigs, M., Rack, B., Marme, A., Korfel, A., Jager, M., Lindhofer, H., Sommer, H., *et al.* 2006. Phase I trial of the trifunctional anti-HER2 x anti-CD3 antibody ertumaxomab in metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research* 12: 3085-3091.
- Kimura, T., and Finn, O.J. 2013. MUC1 immunotherapy is here to stay. *Expert Opinion on Biological Therapy* 13: 35-49.
- Kinney, A.Y., Sahin, A., Vernon, S.W., Frankowski, R.F., Annegers, J.F., Hortobagyi, G.N., Buzdar, A.U., Frye, D.K., and Dhingra, K. 1997. The prognostic significance of sialyl-Tn antigen in women treated with breast carcinoma treated with adjuvant chemotherapy. *Cancer* 80: 2240-2249.
- Kjeldsen, T., Clausen, H., Hirohashi, S., Ogawa, T., Iijima, H., and Hakomori, S. 1988. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed to the tumor-associated O-linked sialosyl-2-6 alpha-N-acetylgalactosaminyl (sialosyl-Tn) epitope. *Cancer Research* 48: 2214-2220.
- Kurosaka, A., Kitagawa, H., Fukui, S., Numata, Y., Nakada, H., Funakoshi, I., Kawasaki, T., Ogawa, T., Iijima, H., and Yamashina, I. 1988. A monoclonal antibody that recognizes a cluster of a disaccharide, NeuAcalpha(2-6)GalNAc, in mucin-type glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 8724-8726.
- Kurosaka, A., Nakajima, H., Funakoshi, I., Matsuyama, M., Nagayo, T., and Yamashina, I. 1983. Structures of the major oligosaccharides from a human rectal adenocarcinoma glycoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 258: 11594-11598.
- Lattrich, C., Juhasz-Boess, I., Ortmann, O., and Treeck, O. 2008. Detection of an elevated HER2 expression in MCF-7 breast cancer cells overexpressing estrogen receptor beta1. *Oncology Reports* 19: 811-817.
- Lavrsen, K., Madsen, C.B., Rasch, M.G., Woetmann, A., Ødum, N., Mandel, U., Clausen, H., Pedersen, A.E., and Wandall, H.H. 2013. Aberrantly glycosylated MUC1 is expressed on the surface of breast cancer cells and a target for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Glycoconjugate Journal* 30: 227-236.
- Leenaars, M., and Hendriksen, C.F. 2005. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *Ilar Journal* 46: 269-279.
- Lenhard, R.E., Osteen, R.T., and Gansler, T. 2001. Breast Cancer. In *Clinical Oncology, The American Cancer Society's*. 1st ed, cap10, The American Cancer Society.
- Li, M., Song, L., and Qin, X. 2010. Glycan changes: cancer metastasis and anti-cancer vaccines. *Journal of Biosciences* 35: 665-673.
- Li, Y., Tondravi, M., Liu, J., Smith, E., Haudenschild, C.C., Kaczmarek, M., and Zhan, X. 2001. Cortactin potentiates bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Research* 61: 6906-6911.
- Liu, C.C., and Ye, X.S. 2012. Carbohydrate-based cancer vaccines: target cancer with sugar bullets. *Glycoconjugate Journal* 29: 259-271.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Longo, D.L., Kasper, D.L., Jameson, J.L., Fauci, A.S., Hauser, S.L., and Loscalzo, J. 2010. Oncology and hematology-Neoplastic disorders-Breast Cancer. In *Harrison's principles of internal medicine*, 18ed., pp. 754-763, McGraw-Hill Medical.
- Madsen, C.B., Wandall, H.H., and Pedersen, A.E. 2013. Potential for novel MUC1 glycopeptide-specific antibody in passive cancer immunotherapy. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 35: 649-652.

- Mahmood, T., and Yang, P.C. 2012. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences* 4: 429-434.
- Marcos, N.T., Bennett, E.P., Gomes, J., Magalhaes, A., Gomes, C., David, L., Dar, I., Jeanneau, C., DeFrees, S., Krustup, D., *et al.* 2011. ST6GalNAc-I controls expression of sialyl-Tn antigen in gastrointestinal tissues. *Frontiers in Bioscience* 3: 1443-1455.
- Miles, D.W., Happerfield, L.C., Smith, P., Gillibrand, R., Bobrow, L.G., Gregory, W.M., and Rubens, R.D. 1994. Expression of sialyl-Tn predicts the effect of adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer. *British Journal of Cancer* 70: 1272-1275.
- Miles, D.W., Towlson, K.E., Graham, R., Reddish, M., Longenecker, B.M., Taylor-Papadimitriou, J., and Rubens, R.D. 1996. A randomised phase II study of sialyl-Tn and DETOX-B adjuvant with or without cyclophosphamide pretreatment for the active specific immunotherapy of breast cancer. *British journal of cancer* 74: 1292-1296.
- Miles, D. W., Roche, H., Martin, M., Perren, T.J., Cameron, D.A., Glaspy, J., Dodwell, D., Parker, J., Mayordomo, J., Tres, A., *et al.* 2011. Phase III Multicenter Clinical Trial of the Sialyl-TN (STn)-Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) Vaccine for Metastatic Breast Cancer. *The oncologist*.16:1092-1100.
- Moremen, K.W., Tiemeyer, M., and Nairn, A.V. 2012. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 13: 448-462.
- Nuti, M., Teramoto, Y.A., Mariani-Costantini, R., Hand, P.H., Colcher, D., and Schlom, J. 1982. A monoclonal antibody (B72.3) defines patterns of distribution of a novel tumor-associated antigen in human mammary carcinoma cell populations. *International Journal of Cancer* 29: 539-545.
- Ogata, S., Maimonis, P.J., and Itzkowitz, S.H. 1992. Mucins bearing the cancer-associated sialosyl-Tn antigen mediate inhibition of natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Research* 52: 4741-4746.
- Ogata, S., Koganty, R., Reddish, M., Longenecker, B.M., Chen, A., Perez, C., and Itzkowitz, S.H. 1998. Different modes of sialyl-Tn expression during malignant transformation of human colonic mucosa. *Glycoconjugate Journal* 15: 29-35.
- Ormerod, M.G.2008. Flow Cytometry - A Basic Introduction. De Novo software. <http://flowbook-wiki.denovosoftware.com>;
- Orphanos, G., and Kountourakis, P. 2012. Targeting the HER2 receptor in metastatic breast cancer. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy* 5: 127-137.
- Paulson, J.C., and Colley, K.J. 1989. Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *The Journal of biological chemistry* 264: 17615-17618.
- Peipp, M., and Valerius, T. 2002. Bispecific antibodies targeting cancer cells. *Biochemical Society Transactions* 30: 507-511.
- Pinho, S., Marcos, N.T., Ferreira, B., Carvalho, A.S., Oliveira, M.J., Santos-Silva, F., Harduin-Lepers, A., and 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.
- Rabu, C., McIntosh, R., Jurasova, Z., and Durrant, L. 2012. Glycans as targets for therapeutic antitumor antibodies. *Future Oncology* 8: 943-960.
- Ragupathi, G., Howard, L., Cappello, S., Koganty, R.R., Qiu, D., Longenecker, B.M., Reddish, M.A., Lloyd, K.O., and Livingston, P.O. 1999. Vaccines prepared with sialyl-Tn and sialyl-Tn trimers using the 4-(4-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxyl hydrazide linker group result in optimal antibody titers against ovine submaxillary mucin and sialyl-Tn-positive tumor cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 48: 1-8.

- Reddish, M.A., Jackson, L., Koganty, R.R., Qiu, D., Hong, W., and Longenecker, B.M. 1997. Specificities of anti-sialyl-Tn and anti-Tn monoclonal antibodies generated using novel clustered synthetic glycopeptide epitopes. *Glycoconjugate Journal* 14: 549-560.
- Reis, C.A., Osorio, H., Silva, L., Gomes, C., and David, L. 2010. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *Journal of Clinical Pathology* 63: 322-329.
- Rogers, L.M., Veeramani, S., and Weiner, G.J. 2014. Complement in monoclonal antibody therapy of cancer. *Immunology Research* 59: 203-210.
- Ruf, P., and Lindhofer, H. 2001. Induction of a long-lasting antitumor immunity by a trifunctional bispecific antibody. *Blood* 98: 2526-2534.
- Schauer, R. 2000. Achievements and challenges of sialic acid research. *Glycoconjugate Journal* 17: 485-499.
- Schonherr, O.T., and Houwink, E.H. 1984. Antibody engineering, a strategy for the development of monoclonal antibodies. *Antonie Van Leeuwenhoek* 50: 597-623.
- Schultz, M.J., Swindall, A.F., and Bellis, S.L. 2012. Regulation of the metastatic cell phenotype by sialylated glycans. *Cancer and Metastasis Reviews* 31: 501-518.
- Scott, A.M., Wolchok, J.D., and Old, L.J. 2012. Antibody therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* 12: 278-287.
- Sewell, R., Backstrom, M., Dalziel, M., Gschmeissner, S., Karlsson, H., Noll, T., Gatgens, J., Clausen, H., Hansson, G.C., Burchell, J., *et al.* 2006. The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer. *Journal of Biological Chemistry; The Journal of biological chemistry* 281: 3586-3594.
- Shoji, T., Higuchi, H., Zaitso, Y., Nishijima, K.I., and Iijima, S. 2014. Enhanced lentiviral vector production in 293FT cells expressing Siglec-9. *Cytotechnology*.
- Singh, R., and Bandyopadhyay, D. 2007. MUC1: a target molecule for cancer therapy. *Cancer Biology & Therapy*, 6: 481-486.
- Smith, C.L. 2008. Basic confocal microscopy. In *Current Protocols in Molecular Biology*, Cap 14, pp 14.11.1-11.11.18.
- Soares, M.M., Mehta, V., and Finn, O.J. 2001. Three different vaccines based on the 140-amino acid MUC1 peptide with seven tandemly repeated tumor-specific epitopes elicit distinct immune effector mechanisms in wild-type versus MUC1-transgenic mice with different potential for tumor rejection. *Journal of Immunology* 166: 6555-6563.
- Soares, R., Marinho, A., and Schmitt, F. 1996. Expression of sialyl-Tn in breast cancer. Correlation with prognostic parameters. *Pathology, Research and Practice* 192: 1181-1186.
- Sorensen, A.L., Reis, C.A., Tarp, M.A., Mandel, U., Ramachandran, K., Sankaranarayanan, V., Schwientek, T., Graham, R., Taylor-Papadimitriou, J., Hollingsworth, M.A., *et al.* 2006. Chemoenzymatically synthesized multimeric Tn/STn MUC1 glycopeptides elicit cancer-specific anti-MUC1 antibody responses and override tolerance. *Glycobiology* 16: 96-107.
- Sotiriou, C., and Puzstai, L. 2009. Gene-expression signatures in breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 360: 790-800.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., and Brennan, M. 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 51: 1409-1416.

- Szybalski, W. 1992. Use of the HPRT gene and the HAT selection technique in DNA-mediated transformation of mammalian cells: first steps toward developing hybridoma techniques and gene therapy. *Bioessays* 14: 495-500.
- Tarp, M.A., Sorensen, A.L., Mandel, U., Paulsen, H., Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., and Clausen, H. 2007. Identification of a novel cancer-specific immunodominant glycopeptide epitope in the MUC1 tandem repeat. *Glycobiology* 17: 197-209.
- Terasawa, K., Furumoto, H., Kamada, M., and Aono, T. 1996. Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in the neoplastic transformation of uterine cervical epithelial cells. *Cancer Research* 56: 2229-2232.
- Tettamanti, G., and Pigman, W. 1968. Purification and characterization of bovine and ovine submaxillary mucins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 124: 41-50.
- Thakur, A., and Lum, L.G. 2010. Cancer therapy with bispecific antibodies: Clinical experience. *Current opinion in molecular therapeutics* 12: 340-349.
- Tsuji, T., and Osawa, T. 1986. Carbohydrate structures of bovine submaxillary mucin. *Carbohydrate Research* 151: 391-402.
- Vacchelli, E., Eggermont, A., Galon, J., Sautes-Fridman, C., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. 2013. Trial watch: Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* 1: 28-37
- van Kooyk, Y., and Rabinovich, G.A. 2008. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nature immunology* 9: 593-601.
- Varki, A. 2007. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature* 446: 1023-1029.
- Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., and Etzler, M.E. 2009. *Essentials of Glycobiology*, 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Varki, N.M., and Varki, A. 2007. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Laboratory Investigation* 87: 851-857.
- Videira, P.A., Ligeiro, D., Correia, M., and Trindade, H. 2007. Gene expression analysis in superficial bladder cancer: comparison of two suitable endogenous reference genes. *Current Urology*. 1:145-150.
- Weiner, L.M., Dhodapkar, M.V., and Ferrone, S. 2009. Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *The Lancet* 373: 1033-1040.
- Wolfert, M.A., and Boons, G.J. 2013. Adaptive immune activation: glycosylation does matter. *Nature Chemical Biology* 9: 776-784.
- Wong, M.L., and Medrano, J.F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39: 75-85.
- Xu, Y., Sun, H.C., Tian, B., Li, Y., Chen, J., Gao, D.M., Xue, Q., and Tang, Z.Y. 2004. Establishment of green fluorescent protein-expressing hepatocellular carcinoma cell lines with different metastatic potential: relevant models for in vivo monitoring of metastasis and angiogenesis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 130 375-382.
- Yamada, T. 2011. Therapeutic monoclonal antibodies. *Keio Journal of Medicine* 60: 37-46.
- Zeidler, R., Mysliwicz, J., Csanady, M., Walz, A., Ziegler, I., Schmitt, B., Wollenberg, B., and Lindhofer, H. 2000. The Fc-region of a new class of intact bispecific antibody mediates activation of accessory cells and NK cells and induces direct phagocytosis of tumour cells. *British Journal of Cancer* 83: 261-266.

Zeidler, R., Reisbach, G., Wollenberg, B., Lang, S., Chaubal, S., Schmitt, B., and Lindhofer, H. 1999. Simultaneous activation of T cells and accessory cells by a new class of intact bispecific antibody results in efficient tumor cell killing. *The Journal of Immunology* 163: 1246-1252.

Zhang, S., Walberg, L.A., Ogata, S., Itzkowitz, S.H., Koganty, R.R., Reddish, M., Gandhi, S.S., Longenecker, B.M., Lloyd, K.O., and Livingston, P.O. 1995. Immune sera and monoclonal antibodies define two configurations for the sialyl Tn tumor antigen. *Cancer Research* 55: 3364-3368.

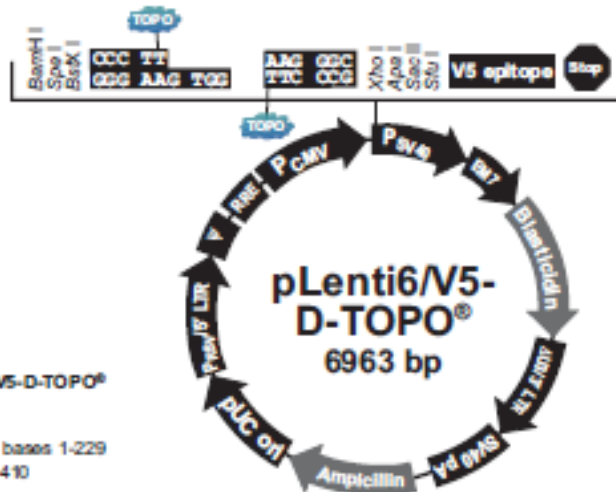
Zhou, X., Hu, W., and Qin, X. 2008. The role of complement in the mechanism of action of rituximab for B-cell lymphoma: implications for therapy. *Oncologist* 13: 954-966.

ANEXOS

Anexo I: Plasmídeo pLenti6/V5-D-TOPO utilizado na transdução da linha celular MCF-7/GFP

pLenti6/V5-D-TOPO® Map

The figure below shows the features of pLenti6/V5-D-TOPO® vector. The complete sequence of pLenti6/V5-D-TOPO® is available for downloading from our Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (see page 34).



Comments for pLenti6/V5-D-TOPO® 6963 nucleotides

RSV enhancer/promoter: bases 1-229
HIV-1 5' LTR: bases 230-410
5' splice donor: base 520
HIV-1 psi (ψ) packaging sequence: bases 521-565
HIV-1 Rev response element (RRE): bases 1075-1308
3' splice acceptor: base 1656
3' splice acceptor: base 1684
CMV promoter: bases 1808-2392
CMV forward priming site: bases 2274-2294
Directional TOPO® site: bases 2431-2444
V5 epitope: bases 2473-2514
V5(C-term) reverse priming site: bases 2482-2502
SV40 early promoter and origin: bases 2569-2877
EM7 promoter: bases 2932-2998
Blasticidin resistance gene: bases 2999-3397
 Δ U3 HIV-1 3' LTR: bases 3484-3717
 Δ U3: bases 3484-3536
Truncated HIV-1 3' LTR: bases 3537-3717
SV40 polyadenylation signal: bases 3789-3920
bla promoter: bases 4779-4877
Ampicillin (bla) resistance gene: bases 4878-5738
pUC origin: bases 5883-6556

Anexo II: Constituição das soluções utilizadas neste trabalho

Solução-tampão de fosfatos (PBS 1x):

Solução contendo 1.47mM KH₂PO₄, 4.29mM Na₂HPO₄·7H₂O, 137mM NaCl e 2.68mM KCl (pH=7,3) em água destilada

Tampão *Beads* frio utilizado na separação imunomagnética de células STn⁺:

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

Meio Luria-Bertani (LB), líquido suplementado com ampicilina:

1% (m/v) peptona de caseína obtida por digestão pancreática, 0,5% (m/v) extracto de levedura autolítica, 0,5% (m/v) NaCl; 0,001% (v/v) ampicilina, 100mg/mL

Meio Luria-Bertani (LB), sólido suplementado com ampicilina:

1% (m/v) peptona de caseína obtida por digestão pancreática, 0,5% (m/v) extracto de levedura autolítica, 0,5% (m/v) NaCl, 1,5% (m/v) agar-agar; 0,001% (v/v) ampicilina, 100mg/mL

Tampão Tris-Borato-EDTA 10x (TBE 10x), 1L:

1M Tris base, 1M ácido bórico e 0,02M EDTA

***Resolving gel* (12 mL):**

5,5mL ddH₂O, 3,2 mL acrilamida 30%, 3mL Tris base 1.5M (pH=8,8), 120 µL SDS 10%, 120 µL APS 10% e 12 µL TEMED

***Stacking gel* (10 mL):**

6mL ddH₂O, 1,34 mL acrilamida 30%, 2,5mL Tris base 0.5M (pH=6,8), 100 µL SDS 10%, 100 µL APS 10% e 10 µL TEMED

Solução de lise:

150 mM NaCl, 2mM CaCl₂, 50mM Tris Cl (pH=7,4), 20µg/mL PMSF, 2% NP40, 0,2% SDS, 1 pastilha do cocktail de inibidores de proteases sem EDTA por cada 200mL

Tampão de corrida (10x):

Solução contendo 30,3g Tris base 250mM, 144,1g Glicina 1920 mM, 10g SDS 1% em água destilada

Tampão de transferência (10x):

Solução contendo 100mM Tris, 0,95M glicina, 20% metanol em água destilada (pH=8,3)

***Tris-buffered saline* (TBS 1x):**

Solução contendo 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl em água destilada (pH=7,6)

Anexo III: Sumário submetido para o congresso “Glyco-T 2014”

Generation of Antibodies for the Treatment of Breast Cancer

Maria Reis, Mylène Carrascal, Carlos Novo, Paula Videira

Nowadays, breast cancer is the most common cause of death worldwide. Standard therapies often fail to eliminate residual cancer cells and prevent disease recurrence and metastasis. Immunotherapy is a novel potential therapy with high specificity, long-term efficacy and low toxicity that allows the manipulation of the immune system to eradicate tumor cells.

Our team has been creating antibodies that bind to cancer cells and engage patient's immune cells against these cancer cells. These antibodies will recognize specifically breast cancer cells via the sialyl-Tn (STn) antigen that is expressed not only in a great majority of breast cancer and absent in normal cells but also is associated with a poor prognosis, reduced overall survival of the patients and lack of response to chemotherapy ⁽¹⁾. In addition, we have recently reported that, in vitro, STn+ cancer cells exert immunosuppressive activity, downregulating the activity of human dendritic cells ⁽²⁾.

For this purpose hybridoma technology has been used based on the fusion a murine B cell that produces anti-STn monoclonal antibodies (mAbs) and a myeloma tumour cell with an infinite proliferative capacity to continuously supply anti-STn mAbs ⁽³⁾. These mAbs have been obtained by immunizations of Balb/c mice using different STn-based antigens. Due to its carbohydrate nature, STn by itself is a poorly immunogenic antigen and requires a protein conjugate to increase its immunogenicity. Therefore for immunization, the antigens that have been used were ovine submaxillary mucin (OSM), bovine submaxillary mucin (BSM), MUC1 protein enriched in STn (STn⁺MUC1), STn⁺ human cancer cells lysates and STn conjugate with threonine. The reactivity of mice's serum against STn⁺ breast cancer cell lines were analyzed by flow cytometry, western blot and confocal microscopy.

So far, only mice immunized with OSM and MUC1 protein enriched in STn produce antibodies, which reactivity was susceptible to sialidase treatment, based on flow cytometry and western blot analysis. Data suggests that mAb react sialylated structures, probably STn. Therefore, mouse B-cells were fused with myeloma tumour cells in order to obtain hybridomas producing anti-STn mAb.

Further investigations are in progress to select and maintain hybrid cells producing the desired antibodies anti-STn. In the future we intend to characterize them and analyse its potential cytolytic activity.

References:

- (1) Julien S, Videira PA and Delannoy P. *Biomolecules*. 2012; 2: 435-466
- (2) Carrascal MA, Severino PF, Guadalupe Cabral M, Silva M, Ferreira JA, Calais F, Quinto H, Pen C, Ligeiro D, Santos LL, Dall'olio F, Videira PA. *Molecular Oncology* (2014)
- (3) Pandey S. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2010; 1: 88-94

Anexo IV: Sumário submetido para o Workshop da EMBO 2014 “Glycobiology & glycochemistry: Applications to human health and disease”

Generation of Antibodies for the Treatment of Breast Cancer

Maria Reis, Mylène Carrascal, Carlos Novo, Paula Videira

Standard therapies often fail to eliminate residual cancer cells and to prevent disease recurrence and metastasis. Antibody-based immunotherapy allows the manipulation of the immune system to eradicate tumor cells showing potentially higher specificity, long-term efficacy and lower toxicity.

The sialyl Tn (STn) antigen is expressed not only in a great majority of breast cancer and absent in normal cells but also is associated with a poor prognosis, reduced overall survival of the patients and lack of response to chemotherapy ⁽¹⁾. In addition, we have recently reported that, in vitro, STn⁺ cancer cells exert immunosuppressive activity, downregulating the activity of human dendritic cells ⁽²⁾.

Our team has been developing monoclonal antibodies (mAb) that specifically recognize STn. However, is that STn by itself is a poorly immunogenic antigen and requires a protein conjugate to increase its immunogenicity.

For this purpose, the hybridoma technology has been used and optimized for different types of STn-based antigens in different concentrations and with different times of immunization to determine which is the best method to produce anti-STn mAbs. The mAbs have been obtained by immunizations of mice with animal mucins enriched in STn (OSM and BSM), human MUC1 enriched in STn, STn⁺ human cancer cell lysates and STn conjugated with threonine. The reactivity of mice's serum against STn⁺ breast cancer cell lines was analyzed by flow cytometry, western blot and confocal microscopy. Antibody titers of IgM and IgG to STn were also analyzed.

So far, only mice immunized with OSM and MUC1 protein enriched in STn produce antibodies with reactivity susceptible to sialidase treatment, suggesting that mAb reacts against sialylated structures, probably STn. Therefore, mice B-cells were fused with myeloma tumour cells in order to obtain hybridomas producing anti-STn mAb.

Further investigations are in progress to select and maintain hybrid cells producing the desired antibodies anti-STn.

References:

- (1) Julien S, Videira PA and Delannoy P. *Biomolecules*. 2012; 2: 435-466
- (2) Carrascal MA, Severino PF, Guadalupe Cabral M, Silva M, Ferreira JA, Calais F, Quinto H, Pen C, Ligeiro D, Santos LL, Dall'olio F, Videira PA. *Molecular Oncology* (2014)