

EXPRESSÃO DE INTERLEUCINAS EM LINHAGEM CELULAR DE MELANOMA A375 APÓS O TRATAMENTO COM rBCG PASTEUR/CP09720

STELLA CARDOZO¹; FERNANDA SOUSA²; BRUNA SILVEIRA PACHECO³;
CAMILA BENDER⁴; SIBELE BORSUK⁵; FABIANA SEIXAS⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – Stellacbiotec@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – nandinha_sousa4@hotmail.com;

³Universidade Federal de Pelotas - pacheco.sbruna@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - camilabbender@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - sibeleborsuk@gmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

O câncer de pele é uma das formas mais comuns de câncer diagnosticadas atualmente, abrangendo diversos tipos, incluindo o carcinoma espinocelular, carcinoma basocelular e melanoma. Embora o melanoma seja menos comum, sua notoriedade reside na sua capacidade acentuada de invadir tecidos adjacentes, tornando-o uma das formas mais agressivas da doença (Instituto Nacional de Câncer - National Cancer Institute). A taxa de mortalidade desse tipo de câncer diminuiu em 18% nos últimos três anos, isso é explicado, principalmente, pela introdução de novas imunoterapias mais eficazes, como também aplicadas como adjuvantes (Long et al., 2023).

A aplicação intralesional de *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), foi recomendada como uma eficiente e barata opção de tratamento de melanoma em estágio III inoperável (Kremenovic et al., 2020). Porém, a cepa sozinha nem sempre é capaz de produzir uma resposta imune forte, dessa forma, se faz a busca de cepas recombinantes (KIBBI et al., 2015). Entre elas, podemos destacar a cepa Pasteur/CP09720, essa proteína, derivada de *C. pseudotuberculosis*, considerada a segunda melhor em conduzir imunogenicidade segundo a plataforma MED (Mature Epitope 43 Density Analysis). (Pinho et al., 2023)

As interleucinas, citocinas do sistema imunológico, desempenham um papel fundamental na promoção de respostas pró-inflamatórias e na comunicação com células T e células Natural Killer (NK) (Briukhovetska et al., 2021). Assim, o uso de interleucinas superexpressadas de maneira coordenada têm sido utilizado como alvos de diversos estudos como uma opção de terapia de primeira linha para diversos tipos de câncer, incluindo o melanoma (Schadendorf et al., 2009).

Nesse contexto, este estudo tem como objetivo analisar o potencial da cepa inédita rBCG Pasteur/CP09720 em comparação com a cepa selvagem rBCG Pasteur na indução de citocinas pró-inflamatórias, como Interleucinas 2, 6 e 12, em células de melanoma A375, dessa forma, avaliando a utilização da mesma como um potencial agente capaz de desenvolver resposta imune contra o câncer.

2. METODOLOGIA

2.1 CULTIVO DE BCG

Para o desenvolvimento do trabalho foram usadas cepas de BCG pasteur e pasteur/CP09720. As cepas foram cultivadas em meio 7h9 (Difco, BD, São Paulo, SP, Brazil) suplementado com 10% de ácido oleico, albumina e complexo de dextrose (OADC – Difco), 0.2% de glicerol e 0.05% de tween 80 (Sigma) ou meio 7h10 Middlebrook em base de agar (Difco, BD, São Paulo, SP, Brazil) com 10% de OADC e 0.2% de glicerol. O antibiótico Canamicina foi adicionado quando necessário (1 µL/mL). *Escherichia coli* TOP10 e BL21 (DE3) foram cultivadas em meio Luria-Bertani com adição de ampicilina (100mg/mL) ou Canamicina (1 µL/mL)

2.2 CULTIVO DE CÉLULAS

As células de melanoma A375 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (PABCAM, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil) e suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino. Foram mantidas em ambiente controlado em uma atmosfera de 37°C, 95% de umidade e 5% de CO₂. Os experimentos foram realizados após as células atingirem estado de sub-confluência.

2.3 AVALIAÇÃO DE GENES IMUNES ATIVADOS EM CÉLULAS DE MELANOMA APÓS O TRATAMENTO COM BCG RECOMBINANTE

A avaliação do perfil imunológico das células de melanoma após tratamento com *M. bovis* BCG foi feita por qRT-PCR. As células foram cultivadas em placas com 6 poços em uma densidade de 2×10^5 células por poço e cultivadas a 37°C em uma atmosfera úmida e controlada. Posteriormente, as células foram incubadas com as cepas Pasteur e Pasteur/CP09720 em uma concentração de 50:1 BCG/células por 24h, onde ao final as placas ficaram divididas em três grupos, controle, tratadas com rBCG Pasteur e tratadas com rBCG Pasteur/CP09720. Depois desse tempo, o RNA foi extraído usando o reagente TRIzol® (Invitrogen). O cDNA foi sintetizado usando 1 µg de RNA a partir do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) de acordo com o protocolo do fabricante. As reações de Real-Time PCR foram realizadas em um equipamento Stratagene Mx3005P Real-Time PCR System (Agilent Technologies) com SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, RU). Todas as reações foram realizadas em triplicatas. Os dados obtidos foram analisados utilizando o $2^{-\Delta\Delta Ct}$, de acordo com Livak *et al.* (2001) (Livak; Schmittgen, 2001)

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no software Graphpad Prism 8 utilizando uma via de ANOVA. Foi utilizado o pós-teste de Bonferroni. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A expressão de genes imunológicos, interleucinas, foi analisada em células de melanoma A375 após tratamento com cepas rBCG Pasteur e Pasteur/CP09720. Um grupo controle foi utilizado para validar os resultados obtidos. Em todos os tratamentos analisados, foi possível observar que ambos os rBCGs promovem maior expressão de IL-2, IL-6 e IL-12 em células de melanoma em relação aos grupos controles. A expressão das interleucinas 6 e 12 foi superior nas células tratadas com Pasteur/CP09720 em comparação com aquelas tratadas com a cepa Pasteur, enquanto a interleucina 2 demonstrou uma expressão mais elevada nas células tratadas com a cepa Pasteur em relação às células tratadas com Pasteur/CP09720.

A Interleucina 2, atua como um agente que estimula a divisão celular em células T não ativadas e promovendo a expansão clonal das células T ativadas. (Bastholt *et al.*, 2019). As células T ajudam a detectar, ativar e eliminar as células cancerígenas do organismo. Somando-se a isso, a interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pleiotrópica, o que significa que ela exerce efeitos em diferentes tipos de células e desempenha um papel crucial como um dos principais mediadores da fase aguda da inflamação (Varella; Forte, 2001). Essa citocina tem influência nas funções das células presentes no microambiente tumoral (Fernandes, 2023). A IL-12 atua como um potente ativador das células NK, aumentando sua atividade citotóxica, ou seja, as tornam mais eficazes na detecção e destruição de células tumorais (Rademacher *et al.*, 2021). Além disso, a IL-12 promove um aumento na síntese de interferon-gama (IFN-gama) em linfócitos periféricos, como também

desempenha um papel na regulação do tipo de imunoglobulina produzida, inibindo a síntese de IgE, ajudando a resposta imunológica antitumoral. (Vignali; Kuchroo, 2012).

A elevada expressão das citocinas IL-2, IL-6 e IL-12 desempenha um papel crucial na resposta inflamatória, uma vez que essas substâncias desempenham funções essenciais na comunicação celular com as células do sistema imunológico, como as células T e as células NKA observação desta expressão aumentada durante o tratamento com rBCG Pasteur/CP09720 sugere uma possível inclinação em direção à apoptose das células tumorais.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, torna-se claro que a cepa Pasteur/CP09720 apresentou uma capacidade substancialmente superior de aumentar a expressão de interleucinas nas células de melanoma A375 em comparação com a cepa rBCG Pasteur. Isso sugere que a cepa possui uma maior aptidão para induzir a inflamação em células de melanoma, o que, por sua vez, evidencia seu potencial como agente imunoterapêutico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASTHOLT, L., et al. High-dose interleukin-2 and interferon as first-line immunotherapy for metastatic melanoma: long-term follow-up in a large unselected Danish patient cohort. **European Journal of Cancer**, v. 115, p. 61-67, 2019.
- BRIUKHOVETSKA, D., et al. Interleukins in cancer: from biology to therapy. **Nature Reviews Cancer**, Estados Unidos da América, v. 21, n. 8, p. 481-499, 2021.
- FERNANDES, L. M. **Efeito da interleucina-6 na expressão de proteínas da linhagem tumoral SCC-25 e Detroit 562**. Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2023. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/242440>>
- KIBBI, N., et al. Treatment of In-Transit Melanoma With Intralesional Bacillus Calmette-Guérin (BCG) and Topical Imiquimod 5% Cream: A Report of 3 Cases. **Journal of Immunotherapy**, Estados Unidos da América, v. 38, n. 9, p. 371–375, 2015.
- KREMENOVIC, M., et al. Clinical and molecular insights into BCG immunotherapy for melanoma. **Journal of Internal Medicine**, Suécia, v. 288, n.6, p. 609-739, 2020.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v.25, n.4, p. 402-408, 2021. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- LONG, G. V., et al. Cutaneous Melanoma. **Seminar**, Alemanha, v. 402, n.10400, p. 485-502, 2023.
- PINHO, R. **Mycobacterium bovis BCG expressing the proteins CP40 or CP09720 of Corynebacterium pseudotuberculosis promotes protection in mice after challenge**. 2023. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.
- RADEMACHER, M. J., et al. Sarcoma IL-12 overexpression facilitates NK cell immunomodulation. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 8321, 2021.
- SCHADENDORF, D., et al. Immunotherapy of distant metastatic disease. **Annals of Oncology**, Inglaterra, v. 20, n. 6, p. 141-150, 2009.
- VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. Citocinas: Revisão. **Revista Brasileira de Alergia Imunopatologia**, Brasil, v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001.
- VIGNALI, D. A. A.; KUCHROO, V. K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. **Nature Immunology**, v. 13, n. 8, p. 722-728, 2012.