UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CARINE ERVOLINO DE OLIVEIRA

Análise do envolvimento do receptor de quimiocinas – CCR5 – na migração de células T reguladoras: correlação com o desenvolvimento de carcinoma espinocelular

CARINE ERVOLINO DE OLIVEIRA

Análise do envolvimento do receptor de quimiocinas - CCR5 - na

migração de células T reguladoras: correlação com o

desenvolvimento de carcinoma espinocelular

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, como pré-requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas, área de concentração: Patologia Bucal.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula Campanelli

Versão Corrigida

Bauru 2013 Oliveira, Carine Ervolino de

Ol4a Análise do envolvimento do receptor de quimiocinas – CCR5 - na migração de células T reguladoras: correlação com o desenvolvimento de carcinoma espinocelular/ Carine Ervolino de Oliveira. - Bauru, 2013.

197p.; il.; 30cm

Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof^a Dr^aAna Paula Campanelli

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução parcial desta tese, por processos fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Comitê de Ética em Pesquisa da FOB-USP: Projeto de pesquisa aprovado em 11 de abril de 2011

Número do protocolo: 06/2011

Trabalho realizado no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

Apoio: CAPES, CNPq e FAPESP (Processo 2012/15331-0).

Dedico esta tese à minha mãe, Sonia Maria Ervolino por todo amor, compreensão, fé e paciência em todos os momentos.

Não existem palavras que consigam expressar todo o meu amor e admiração por você.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Paula Campanelli, pela amizade, apoio imensurável, competência, e eficiência com que conduziu a orientação deste trabalho. Agradeço por todo o ensinamento e pela confiança que depositou em mim e no meu trabalho. Sempre uma referência como pessoa e pesquisadora, de grande seriedade e integridade. Sua dedicação me proporcionou grandes oportunidades, sempre vou tê-la como referência. Os bons momentos ficam na memória e no coração da gente!

Aos professores da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru Prof. Dr. Alberto Consolaro, Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira, Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira e Profa. Dra. Vanessa Soares Lara, por todos estes anos de convivência e por compartilharem o que têm de mais valioso, seu conhecimento.

Ao Prof. Dr. Sérgio Aparecido Torres, pelo aprendizado e agradável convivência.

Ao Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet, pelo aprendizado, ajuda e gentileza.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva pela ajuda e gentileza em ceder os animais CCR5KO sem os quais este trabalho não seria realizado.

Ao Prof. Dr. Ramon Kaneno, pela ajuda e gentileza em ceder a linhagem de células tumorais para realização dos ensaios de citotoxicidade.

À Dra. Maria Renata Renata Salles pelo auxílio na análise histopatológica dos resultados.

À Profa. Dra. Nilce Emy Tomita, uma das responsáveis pelo início da minha vida acadêmica e científica. Agradeço por estimular meu crescimento profissional.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, André Luís da Silva, Dalva de Oliveira, Edilene Zapater e Lívia Maria de Melo, por todo carinho e solicitude durante estes anos, que tornaram a convivência alegre e produtiva.

Às funcionárias da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru Maria Cristina Carrara Filippi, Fátima Aparecida Silveira e Marina dos Santos Corrêa, pelo carinho e convivência harmoniosa.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru, Luís Silva, Erasmo G. da Silva, Elias F. Cresta, Richard N. G. Simões e do Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Júlio Anselmo Siqueira, pelo auxílio fundamental nos cuidados com os animais e por tornarem o ambiente de trabalho sempre muito agradável.

Aos colegas do curso de pós-graduação Ana Regina Cassaroto, Andreia Espíndola, Aroldo Almeida, Bruno Aiello, Bruna Vilardi, Carla Sipert, Carlos Repeke, Cristiane Carvalho, Daniel Brozoski, Diego Maurício, Élcia Silveira, Érika Sinara, Hayana Ramos, Heliton de Lima, Juliana Pires, Lucas Bermejo, Melaine Lawall, Simone Faustino e Taisa Vilardi por todos os bons momentos compartilhados.

À querida amiga da pesquisa e da vida Thaís Helena Gasparoto, uma pessoa inteligentíssima, divertida, sincera e admirável. Agradeço pela orientação e companhia durante a execução dos experimentos. Obrigada por tudo que fez por mim, seu apoio e dedicação foram fundamentais para a realização deste trabalho. Eu me sinto honrada por ter convivido com você.

À querida amiga Cláudia Ramos Pinheiro, sincera, divertida, inteligente e competente. Uma pessoa que admiro profundamente e agradeço por todas as risadas, pelas lágrimas compartilhadas, pelas longas e maravilhosas conversas.

Às amigas Marina Duarte Garcia, Maria Carolina Vaz Goulart, Nathália Bigelli Del Neri, Tâmara Cintra e Ana Lúcia Gasparoto, pelo grande apoio e incentivo dado durante os momentos mais difíceis. Vocês sempre estarão no meu coração!

A minhas tias, avós e primos pelas orações, incentivo e apoio.

À minha mãe e aos meus irmãos Caroline e José Roberto pelo apoio incondicional, força, incentivo e amor sem igual. Sem vocês eu não seria o que sou e nada disso seria possível.

À Deus por me amparar nos momentos difícieis e me dar forças para superar as dificuldades.

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. José Carlos Pereira**.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa de seu presidente, **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**.

Ao curso de pós-graduação em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, na pessoa do sua coordenadora **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira**.

Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, por muitos anos de trabalho harmônico e acolhimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão de minha bolsa de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**), pelo auxílio financeiro concedido (2012/15331-0).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - (CNPq), pelo incentivo financeiro.

"Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar..."

Chico Xavier



RESUMO

Apesar dos avanços sobre a efetiva participação das células T reguladoras (Treg) na resposta imune antitumoral, ainda existem vários pontos que precisam ser esclarecidos. Visto que, os fatores que controlam a migração destas células para o microambiente tumoral ainda não estão totalmente definidos, o esclarecimento dos mecanismos de migração de células Treg no contexto do câncer poderia fornecer novos alvos para o desenvolvimento de terapias mais específicas. Diversos modelos de estudo demonstraram que o recrutamento preferencial de células Treg ao invés de outros tipos de células T pode ser explicado pela expressão diferencial de receptores de quimiocinas como o CCR5. Assim, é de extrema importância estabelecer qual é o papel de CCR5 na migração de células Treg em tumores induzidos quimicamente e seu envolvimento no desenvolvimento tumoral. Baseado no exposto, o presente estudo analisou o envolvimento de CCR5 na migração de células Treg e a sua correlação com o desenvolvimento de carcinoma espinocelular (CEC) induzido quimicamente. Os resultados obtidos demonstraram que camundongos geneticamente deficentes de CCR5 (CCR5KO) apresentaram baixo número de células Treg nas lesões e foram menos suscetíveis ao desenvolvimento de carcinoma espinocelular. Na fase de progressão tumoral verificou-se o desenvolvimento de CEC in situ por animais CCR5KO em combinação com a maior infiltração leucocitária, enquanto camundongos do grupo controle (WT^{CEC}) apresentaram lesões de CEC bem diferenciado associado à elevada frequência de células Treg no microambiente tumoral e menor infiltração leucocitária. Interessantemente, a transferência adotiva de células Treg CCR5⁺ para animais CCR5KO (CCR5^{CEC Treg}) resultou no acúmulo destas células no microambiente tumoral, elevado nível de CCL4, CCL17 e CCL22, e aumento da suscetibilidade desses animais à carcinogênese química. Verificou-se o desenvolvimento de CEC indiferenciado por animais CCR5^{CEC Treg} e este foi associado à elevada frequência de macrófagos, células mielóides e dendríticas, linfócitos CD19⁺, T CD4⁺, T CD8⁺ e células Treg na fase de progressão tumoral. Outro aspecto relevante de nosso estudo foi à observação de que a transferência adotiva de células T CD4⁺CD25⁻CCR5⁺ para animais CCR5KO (CCR5^{CEC CD4+}) induziu o desenvolvimento de CEC moderadamente diferenciado com características intermediárias as lesões observadas em animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC Treg}. A transferência adotiva de células T CD8⁺CCR5⁺ para animais CCR5KO (CCR5^{CEC CD8+}) promoveu o aparecimento precoce de papilomas e inibiu a progressão de papilomas para o

CEC. A menor suscetibilidade à carcinogênese química de animais $CCR5^{CEC \ CD8+}$ foi associada ao alto número de macrófagos, células mielóides, linfócitos B e T $CD8^+$, células NK detectado nas lesões destes animais. Dessa forma, os resultados descritos estabelecem que a quimiotaxia de células Treg para o microambiente tumoral é dependente de CCR5 e estas células regulam aspectos críticos desta doença, sugerindo que o bloqueio da migração de células Treg CCR5⁺ seria uma importante estratégia imunoterapêutica no combate deste tipo de câncer.

Palavras-chave: carcinoma espinocelular, células T reguladoras, quimiocinas, supressão imune.



ABSTRACT

Considering the advances on the effective participation of regulatory T cells (Treg) in the antitumor immune response, there are still several points that need to be clarified. The mechanisms that control the Treg cells migration to the tumor microenvironment are not completely defined, for these reason, establish these mechanisms could provide new targets for the development of more specific therapies. Several study models have demonstrated that preferential recruitment of Treg cells rather than other types of T cells can be explained by the differential expression of chemokine receptors such as CCR5. Thus, the present study examined the involvement of CCR5 in the migration of Treg cells and their correlation with the development of squamous cell carcinoma (SCC) chemically induced. The results showed that CCR5 knockout mice (CCR5KO) showed a low number of Treg cells in the lesions and these animals were less susceptible to the development of squamous cell carcinoma. SCC in situ was developed in CCR5KO mice and associated with high leukocytes infiltration, whereas the development SCC well differentiated in the control group (WT^{SCC}) was associated with a high number of Treg cells and lower leukocyte infiltration in the tumor microenvironment. Interestingly, adoptive transfer of CCR5⁺ Treg cells to CCR5KO mice (CCR5^{SCC Treg}) resulted in the accumulation of these cells, high levels of CCL4, CCL17 and CCL22 in the tumor microenvironment and increased susceptibility to chemical carcinogenesis. CCR5^{SCCTreg} mice developed SCC undifferentiated associated with a higher incidence of macrophages, myeloid and dendritic cells, CD19⁺, CD4⁺ T, CD8⁺ T lymphocytes, and Treg cells in the stage of tumor progression. Another relevant aspect of our study was the observation that adoptive transfer of CD4⁺CD25⁻CCR5⁺ T cells to CCR5KO animals (CCR5^{SCC CD4+}) induced the development of SCC moderately differentiated with intermediate features observed in the WT^{SCC} and CCR5^{SCC Treg} mice. The adoptive transfer of CD8⁺CCR5⁺ T cells to CCR5KO mice (CCR5^{SCC CD8+}) promoted the early incidence of papillomas and inhibited the progression to SCC. Reduced susceptibility to skin carcinogenesis in CCR5^{SCC CD8+} mice was associated with high frequency of macrophages, myeloid cells, B lymphocytes, CD8⁺ T lymphocyte and NK cells. In this study we showed that the migration of Treg cells to the tumor microenvironment is CCR5 dependent and that it regulates critical aspects of tumor development. The development of drugs that blocks CCR5⁺

Treg cells migration could be an important immunotherapeutic strategy to control this type of cancer.

Key-words: squamous cell carcinoma, T regulatory cells, chemokines, immune suppression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração das etapas do processo de carcinogênese química.	
Figura 2. Ilustração do protocolo de indução de carcinogênese química	48
Figura 3. Análise do peso.	60
Figura 4. Incidência de papilomas	62
Figura 5. Análise do desenvolvimento de papilomas	63
Figura 6. Fotomicrografias de amostras de tecido após 16 semanas de carcinogênese química	67
Figura 7. Fotomicrografias de amostras de tecido após 35 semanas de carcinogênese química	71
Figura 8. Análise de leucócitos no microambiente tumoral	74
Figura 9. Análise de macrófagos, células mielóides e dendríticas no microambiente tumoral	77
Figura 10. Análise de linfócitos no microambiente tumoral.	80
Figura 11. Fenotipagem de linfócitos T CD4 ⁺ no microambiente tumoral	85
Figura 12. Fenotipagem de linfócitos T CD4 ⁺ no microambiente tumoral	86
Figura 13. Fenotipagem de linfócitos T CD8 ⁺ no microambiente tumoral	91
Figura 14. Fenotipagem de linfócitos T CD8 ⁺ no microambiente tumoral	92

Figura 15. Fenotipagem de células T reguladoras no microambiente tumoral
Figura 16. Fenotipagem de células T reguladoras no microambiente tumoral10
Figura 17. Fenotipagem de linfócitos T CD8 ⁺ no microambiente tumoral
Figura 18. Análise da expressão de Fas e FasL por linfócitos T CD4 ⁺ no microambiente tumoral
Figura 19. Análise da expressão de Fas e FasL por linfócitos T CD8 ⁺ no microambiente tumoral
Figura 20. Análise de células NK no microambiente tumoral
Figura 21. Análise de leucócitos no linfonodo112
Figura 22. Análise de macrófagos, células mielóides e dendríticas no linfonodo
Figura 23. Análise de linfócitos no linfonodo
Figura 24. Fenotipagem de linfócitos T CD4 ⁺ no linfonodo
Figura 25. Fenotipagem de linfócitos T CD4 ⁺ no linfonodo
Figura 26. Fenotipagem de linfócitos T CD8 ⁺ no linfonodo
Figura 27. Fenotipagem de linfócitos T CD8 ⁺ no linfonodo
Figura 28. Fenotipagem de células T reguladoras no linfonodo
Figura 29. Fenotipagem de T reguladoras no linfonodo

Figura	30. Fenotipagem de linfócitos T CD8 ⁺ no linfonodo
Figura	31. Análise da expressão de Fas e FasL por linfócitos T CD4 ⁺ do linfonodo
Figura	32 . Análise da expressão de Fas e Fas-L por linfócitos T CD8 ⁺ isolados do linfonodo
Figura	33. Análise da citotoxicidade de células NK 146
Figura	34. Análise das quimiocinas no microambiente tumoral
Figura	35 . Análise das citocinas pró-inflamatórias no microambiente tumoral
Figura	36. Análise das citocinas anti-inflamatórias no microambiente tumoral

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APC	. Antigen-presenting cell (Célula apresentadora de antígeno)
APC	.Allophycocyanin (Aloficocianina)
BSA	.Bovine serum albumin (Albumina sérica bovina)
CCL	. <i>C-C chemokine ligant</i> (Ligante de quimiocina)
CCR	.C-C chemokine receptor (Receptor de quimiocina)
CCR5KO	Camundongo geneticamente deficiente de CCR5
CD	. Cluster of differentiation (Grupamento de diferenciação)
CEC	.Carcinoma espinocelular
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CTL	. Cytotoxic T lymphocyte (Linfócito T citotóxico)
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i> (Antígeno 4 associado ao linfócito T
	citotóxico - CD152)
CXCR	.C-X-C chemokine receptor (Receptor de quimiocina)
DC	<i>Dendritic cell</i> (Célula dendrítica)
DMBA	.7,12-dimetilbenzantraceno
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	.Densidade óptica
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etileno-dimano-tetra- acético)
ELISA	. Enzyme-linked immunosorbent assay (Ensaio imuno-enzimático)
EUA	Estados Unidos da América
FACS	.Fluorescence-activated cell sorting
Fas	.CD95
FasL	Ligante de Fas (CD178)
FITC	.Fluorescein isothiocyanate (Isotiocianato de fluoresceína)
FL	.Fluorescent light (Canal de fluorescência)
FoxP3	.Forkhead box P3
FSC	.Forward scatter (Parâmetro de análise celular por tamanho)
<i>g</i>	. gravidade
g	. grama
GITR	. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (Receptor do
	fator de necrose tumoral induzido por glicocorticóide)
HEPES	.4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
Н&Е	.Hematoxilina e eosina

HPV	.Human papiloma virus (Papiloma vírus humano)
ICOS	.Inducible T-cell costimulator (Coestimulador de células T induzível -
	CD278)
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iTreg	Linfócitos T reguladores induzidos
КО	<i>Knockout</i> (nocaute)
LAG-3	<i>Lymphocyte-activation gene 3</i> (Gene 3 de ativação linfocitária - CD223)
mg	.miligramas
MHC	.Major histocompability complex (Complexo principal de
	histocompatibilidade)
min	.minutos
MDC	.Macrophage-derived chemokine (Quimiocina derivada de macrófagos –
	CCL22)
MIP	Macrophage Inflammatory Proteins (Proteínas inflamatórias de
	macrófagos)
mL	.mililitro
mM	.milimolar
NK	.Célula natural killer
NKT	.Célula natural killer T
nm	nanômetros
nTreg	Linfócitos T reguladores naturais
PBS	.Phosphate buffered saline (Solução salina tamponada em fosfato)
PD-1	.Programmed cell death protein 1 (CD279)
PD-L1	.Programmed cell death 1 ligand 1 (CD274)
PE	.phycoerythrin (ficoeritrina)
PerCP	.peridinin chlorophyll protein (proteína clorofil peridina)
рН	potencial hidrogeniônico
PI	.Propidium iodide (Iodeto de propídeo)
РМА	.Phorbol myristate acetate (Acetato miristato de forbol)
p53	.Proteína 53
RAG2	Recombinação-ativação 2
RANTES	Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted (Citocina
	regulada por ativação, expressa e secretada por células T normais -
	CCL5)

SD	Standard deviation (desvio padrão)
SEM	Standard error of the mean (erro padrão da média)
SFB	Soro fetal bovino
SSC	Side scatter (Parâmetro de análise celular por granularidade)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription (Transdutor de sinal e
	ativador da transcrição)
TARC	Thymus and Activation Regulated Chemokine (Quimiocina regulada pelo
	timo e ativação - CCL17)
TGF	Transforming growth factor (Fator de crescimento transformador)
Th	Linfócito T auxiliar (<i>helper</i>)
TIL	Tumor infiltrating lymphocytes (Linfócitos infiltrantes do tumor)
TNF	Tumor Necrosis Factor (Fator de necrose tumoral)
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand (Ligante indutor de apoptose
	relacionado ao TNF)
Treg	Linfócitos T reguladores
TCR	<i> T cell receptor</i> (Receptor de células T)
WT	Wild type (Tipo selvagem)
μg	microgramas
μL	microlitros
μΜ	micromolar
SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	21
2 PROPOSIÇÃO	41
1. Objetivo Geral	43
2. Objetivos específicos	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
1. Reagentes	47
2. Animais	47
3. Carcinogênese química	47
4. Transferência de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ , CD4 ⁺ CD25 ⁻ e CD8 ⁺	49
4.1. Purificação de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ , CD4 ⁺ CD25 ⁻ e CD8 ⁺	49
4.2. Transferência Celular Adotiva	50
5. Eutanásia e coleta de tecidos tumorais	51
6. Análise histopatológica	51
7. Separação de leucócitos da lesão	51
8. Anticorpos	
9. Citometria de fluxo	54
10. Purificação de células natural killer (NK)	54
11. Cultura de linhagem de célula tumoral	55
12. Avaliação da citotoxicidade de células NK	55
13. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas e quimiocinas	56
14. Análise estatística	
4 RESULTADOS	57
1. Indução de carcinoma espinocelular	59
2. Análise macroscópica do desenvolvimento de tumores	61
3. Análise histopatológica	65

3.1. Análise histopatológica após 16 semanas de carcinogênese	
química	65
3.2. Análise histopatológica após 35 semanas de carcinogênese	
química	69
4. Fenotipagem do infiltrado inflamatório isolado do microambiente tumoral	73
4.1. Análise de macrófagos, células mielóides e dendríticas após 16	
semanas de carcinogênese química	75
4.2. Análise de macrófagos, células mielóides e dendríticas após 35	
semanas de carcinogênese química	76
4.3. Análise de linfócitos no microambiente tumoral após 16 semanas	
de carcinogênese química	78
4.4. Análise de linfócitos no microambiente tumoral após 35 semanas	
de carcinogênese química	79
5. Fenotipagem de linfócitos T no microambiente tumoral	
5.1. Fenotipagem de linfócitos T $CD4^+$ após 16 semanas de	
carcinogênese química	
5.2. Fenotipagem de linfócitos T $CD4^+$ após 35 semanas de	
carcinogênese química	
5.3. Fenotipagem de linfócitos T $CD8^+$ após 16 semanas de	
carcinogênese química	
5.4. Fenotipagem de linfócitos T $CD8^+$ após 35 semanas de	
carcinogênese química	
6. Fenotipagem de células T reguladoras - T $CD4^+Foxp3^+$ - no	
microambiente tumoral	
6.1 Fenotinagem de células T reguladoras após 16 semanas de	
carcinogênese química	93
6.2 Fenotinagem de células T reguladoras anós 35 semanas de	
carcinogênese química	94
7 Expressão de marcadores constitutivos ou relacionados com a atividade	
supressora de células T reguladoras	07
Supressora de colulas 1 reguladoras	

7.1. Expressão de marcadores constitutivos ou relacionados com	
atividade supressora de células T reguladoras após 16 semanas de	
carcinogênese química	97
7.2. Expressão de marcadores constitutivos ou relacionados com	
atividade supressora de células T reguladoras após 35 semanas de	
carcinogênese química	
8. Perforina e granzima em linfócitos T CD8 ⁺ no microambiente tumoral	
8.1. Perforina e granzima em linfócitos T $CD8^+$ após 16 semanas de	
carcinogênese química	
8.2. Perforina e granzima em linfócitos T CD8 ⁺ após 35 semanas de	
carcinogênese química	
9. Expressão de Fas e FasL em linfócitos isolados do microambiente	
tumoral	
9.1. Análise de Fas e FasL em linfócitos T CD4 ⁺ após 16 semanas de	
carcinogênese química	
9.2. Expressão de Fas e FasL em linfócitos T CD4 ⁺ após 35 semanas	
de carcinogênese química	
9.3. Expressão de Fas e FasL em linfócitos T CD8 ⁺ após 16 semanas	
de carcinogênese química	
9.4. Expressão de Fas e FasL em linfócitos T CD8 ⁺ após 35 semanas	
de carcinogênese química	
10. Análise da presença de células NK no microambiente tumoral	
10.1. Análise da presença de células NK após 16 semanas de	
carcinogênese química	
10.2. Análise da presença de células NK após 35 semanas de	
carcinogênese química	
11. Fenotipagem das populações de leucócitos nos linfonodos	111
11.1. Análise de macrófagos, células mielóides e dendríticas após 16	
semanas de carcinogênese química	
11.2. Análise de macrófagos, células mielóides e dendríticas após 35	
semanas de carcinogênese química	
11.3. Análise de linfócitos após 16 semanas de carcinogênese química	116
11.4. Análise de linfócitos após 35 semanas de carcinogênese química	117

12. Fenotipagem de linfócitos T no linfonodo	119
12.1. Fenotipagem de linfócitos T CD4 ⁺ após 16 semanas de	
carcinogênese química	119
12.2. Fenotipagem de linfócitos T $CD4^+$ após 35 semanas de	
carcinogênese química	121
12.3. Fenotipagem de linfócitos T CD8 ⁺ após 16 semanas de	
carcinogênese química	125
12.4. Fenotipagem de linfócitos T $CD8^+$ após 35 semanas de	
carcinogênese química	127
13. Fenotipagem de células T reguladoras - T CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ - no linfonodo	131
13.1. Fenotipagem de células T reguladoras após 16 semanas de	
carcinogênese química	131
13.2. Fenotipagem de células T reguladoras após 35 semanas de	
carcinogênese química	132
14. Expressão de marcadores constitutivos ou relacionados com a atividade	
supressora de células T reguladoras	135
14.1. Expressão de marcadores constitutivos ou relacionados com	
atividade supressora de células T reguladoras após 16 semanas de	
carcinogênese química	135
14.2. Expressão de marcadores constitutivos ou relacionados com	
atividade supressora de células T reguladoras após 35 semanas de	
carcinogênese química	136
15. Perforina e granzima em linfócitos T CD8 ⁺ no linfonodo	139
15.1. Perforina e granzima em linfócitos T CD8 ⁺ após 16 semanas de	
carcinogênese química	139
15.2. Perforina e granzima em linfócitos T CD8 ⁺ após 35 semanas de	
carcinogênese química	139
16. Expressão de Fas e FasL em linfócitos do linfonodo	141
16.1. Expressão de Fas e FasL em linfócitos T CD4 ⁺ após 16 semanas	
de carcinogênese química	141
16.2. Expressão de Fas e FasL em linfócitos T CD4 ⁺ após 35 semanas	
de carcinogênese química	141

16.3. Expressão de Fas e FasL em linfócitos T CD8 ⁺ após 16 semanas	
de carcinogênese química	143
16.4. Expressão de Fas e FasL em linfócitos T CD8 ⁺ após 35 semanas	
de carcinogênese química	143
17. Análise da citotoxicidade de células NK	145
17.1. Análise da citotoxicidade de células NK após 16 semanas de	
carcinogênese química	145
17.2. Análise da citotoxicidade de células NK após 35 semanas de	
carcinogênese química	145
18. Análise da produção de quimiocinas no microambiente tumoral	147
18.1. Análise da produção de quimiocinas após 16 semanas de	
carcinogênese química	147
18.2. Análise da produção de quimiocinas após 16 semanas de	
carcinogênese química	148
19. Análise da produção de citocinas no microambiente tumoral	150
19.1. Análise da produção de citocinas após 16 semanas de	
carcinogênese química	150
19.2. Análise da produção de citocinas após 35 semanas de	
carcinogênese química	151
5 DISCUSSÃO	157
6 CONCLUSÃO	169
REFERÊNCIAS	173
ANEXO	197

Introdução e Revisão da Literatura

O carcinoma espinocelular (CEC) é um dos tipos de cânceres humanos mais incidentes. Esta designação compreende um grupo de neoplasias que pode ter origem a partir do epitélio da pele, cérvix, esôfago ou cavidade bucal (JANES; WATT, 2006). Sendo que, a frequência, etiologia e o prognóstico desse tipo de câncer variam de acordo com a origem. Na pele, o desenvolvimento de CEC está associado com mutações no gene p53 induzidas pela radiação ultravioleta e exposição a agentes químicos; no cérvix pode ser causado por infecções pelo papiloma vírus humano (HPV); já o consumo de álcool e tabaco predispõe o desenvolvimento de CEC na cavidade bucal e no esôfago (ALAM; RATNER, 2001; STERLINKO; BANKS, 2004; BACKVALL et al., 2005; HUNTER; PARKINSON; HARRISON, 2005).

O CEC representa o segundo tipo de câncer mais frequente na pele e afeta cerca de 500.000 novos paciente por ano (KERBEL, 2008). Enquanto outras neoplasias progridem através de invasão, disseminação e metástase em locais distantes da origem, o CEC tem como características principais a disseminação linfática e a recorrência local (TIMAR et al., 2005). A progressão deste tipo de câncer pode levar a destruição tecidual local e formação de metástases que resultam em taxas de morbidade e mortalidade significativas (ALAM; RATNER, 2001).

Embora a maioria dos casos de CEC de pele sejam curados através da excisão cirúrgica, aproximadamente 8% dos pacientes apresentam recorrência local e 5% apresentam metástases dentro de 5 anos. Para os pacientes que apresentam CEC metastático, o prognóstico é ruim, com uma taxa de 10 a 20% sde obrevidade acima de 10 anos (ALAM; RATNER, 2001). Entretanto, o exato mecanismo envolvido na progressão deste tipo de tumor ainda não foi esclarecido e faz-se necessário.

O modelo de estudo mais utilizado para o estudo do CEC de pele é a carcinogênese química. O desenvolvimento de CEC por meio de indução química permite que as diferentes fases do desenvolvimento tumoral (iniciação, promoção e progressão) sejam avaliadas e monitoradas separadamente e visualmente, permitindo, por exemplo, a avaliação da eficácia de agentes quimiopreventivos (DIGIOVANNI, 1991; KUNDU; SHIN; SURH, 2006; ABEL et al., 2009). O papel de vários genes e vias de sinalização celular pode ser avaliado por meio de camundongos geneticamente modificados ou pela utilização de inibidores específicos (GLICK et al., 1994; PEREZ-LOSADA; BALMAIN, 2003; OWENS; WATT, 2003; MATSUMOTO et al., 2003; CHAN et al., 2004).

O processo da carcinogênese de uma maneira geral pode ser caracterizado por múltiplos estágios definidos em: iniciação, promoção e progressão (Figura 1). A iniciação corresponde ao passo inicial e irreversível no desenvolvimento do tumor, já que lesa de forma permanente a estrutura do DNA das células. Este processo pode ser induzido quimicamente em modelos animais com a utilização de 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) que, leva ao desenvolvimento de lesões morfológica e histologicamente semelhantes ao câncer em humanos (GIMENEZ-CONTI; SLAGA, 1993; MOORE et al., 1999; CHANG et al., 2000; BALASENTHIL; RAO; NAGINI, 2003). O DMBA é um hidrocarboneto poliaromático mutagênico ao qual seres humanos podem ser expostos e, mutações similares são comuns em carcinomas humanos (MODI et al., 2012). Ele provoca mutações no gene HRAS promovendo uma transversão A-T no códon 61 do mesmo (JANES; WATT, 2006).

Na fase de promoção, a exposição contínua e prolongada a agentes promotores como o *phorbol myristate acetate* (PMA), induz a proliferação celular (expansão clonal) das células que já tiveram contato com o carcinógeno (agente iniciador). Diferentemente da fase de iniciação, esta fase possui natureza epigenética e, geralmente é reversível (YUSPA, 1998).

Embora o PMA seja pleitrópico, seus efeitos pró-inflamatórios são cruciais para a promoção tumoral (XIAO, 2009), consistente com a comum associação da inflamação com a carcinogênese. Assim sendo, a carcinogênese química mimetiza muitos aspectos moleculares e etiológicos do câncer humano (MODI et al., 2012). Durante a promoção ocorre a formação de múltiplos papilomas que, representam clones de células iniciadas. Os papilomas apresentam três alterações que os distingue dos queratinócitos normais: hiperplasia, expressão alterada de marcadores de queratinócitos e, bloqueio ou atraso na diferenciação terminal (YUSPA, 1998).

O estágio seguinte é a progressão caracterizada pela irreversibilidade das alterações genéticas que conferem às células: alto potencial proliferativo, capacidade invasiva e metastática (GIMENEZ-CONTI; SLAGA, 1993; MOORE et al., 1999; CHANG et al., 2000; BALASENTHIL; RAO; NAGINI, 2003). Embora muitos papilomas se desenvolvam na pele de camundongos suscetíveis, apenas 10% destes progridem para CEC (PEREZ-LOSADA; BALMAIN, 2003). A exposição contínua dos papilomas aos agentes promotores aumenta a probabilidade de ocorrência de alterações genéticas adicionais necessárias à progressão maligna (YUSPA, 1994). Enquanto mutações no gene HRAS relacionam-se com a fase de iniciação, as mutações de p53 foram associadas com a progressão maligna (PEREZ-LOSADA; BALMAIN, 2003; OWENS; WATT, 2003). Além disso, um estudo recente demonstrou que a expressão de KRAS associada com a perda de p53 induziu CEC invasivo (LAPOUGE et al., 2011).



Figura 1- Ilustração das etapas do processo de carcinogênese química. Adaptação de Abel et al., 2009.

A indução de CEC pela administração tópica de agentes químicos permite o estudo de fatores locais, sistêmicos e ambienteais que influenciam a suscetibilidade, o crescimento e a progressão tumoral. A utilização desta metodologia para a indução de CEC na pele de camundongos tem sido utilizada há várias décadas e continua a ajudar na identificação de importantes vias moleculares e de mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento deste tipo de câncer (FILLER; ROBERTS; GIRARDI, 2007).

Várias evidências indicam a existência de mecanismos efetores contra células tumorais (BELL, 1970; RUCKDESCHEL et al., 1972; SHANKARAN et al., 2001; WEI; HANG, 1989). Camundongos deficientes de componentes essenciais da resposta imune inata ou adaptativa são mais suscetíveis ao desenvolvimento de carcinomas espontâneos ou induzidos quimicamente. Este é o caso de animais deficientes do gene RAG2, cuja deficiência resulta na ausência de linfócitos T, B e células NKT e desenvolvem leucemia espontaneamente (GLADDY et al., 2003).

O conceito de que o sistema imune reconhece e elimina tumores primários em desenvolvimento existe há quase 100 anos (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004). O primeiro

relato desta ideia é de autoria de Paul Ehrlich que, em 1909, propôs que o sistema imune controlaria o desenvolvimento de tumores (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004). Porém, devido à ausência de dados, esta hipótese não pôde ser comprovada na época. Apenas cerca de 50 anos depois, Burnet e Thomas reformularam as hipóteses de Ehrlich e propuseram o que hoje é conhecido como teoria da vigilância imunológica (*"câncer immunosurveillance"*) (BURNET, 1970). Essa teoria propõe que o sistema imune patrulha o organismo a procura de células transformadas, sendo capaz de reconhecer e destruí-las. Dessa forma, a ocorrência de tumores seria um evento raro, proveniente de células que escaparam dessa vigilância.

Atualmente, é reconhecido que o sistema imune apresenta, pelo menos, três papéis distintos na prevenção do câncer: protege o hospedeiro contra infecções virais e, portanto suprime o desenvolvimento de tumores induzidos por vírus; previne o estabelecimento de um ambiente inflamatório que poderia promover o desenvolvimento do tumor através da eliminação de patógenos e da rápida resolução da inflamação; além disso, elimina células transformadas que geralmente expressam ligantes para receptores de ativação das células da imunidade adaptativa e antígenos que são reconhecidos por receptores de linfócitos (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011).

Se por um lado, várias evidências indicam a existência de uma resposta imune contra as neoplasias; por outro há dados que contradizem esta hipótese (BELL, 1970; SHANKARAN et al., 2001; WEI; HANG,1989; GILL; BRYNES. 1989; PENN, 1991; DUNN et al., 2002). Dentre estes, o mais relevante é aquele que demonstra que tumores se desenvolvem em indivíduos imunocompetentes e indivíduos imunodeficientes não apresentam um aumento da incidência das neoplasias mais comuns no restante da população (GILL; BRYNES. 1989; PENN, 1991; DUNN et al., 2002). Assim, apesar da grande quantidade de dados sobre o estudo da resposta imune contra tumores, não se pode aceitar nem rejeitar totalmente a teoria da vigilância imunológica, mas é notória a importância do sistema imune na biologia das neoplasias.

A hipótese da imunoedição ("immunoediting") proporciona um melhor entendimento sobre o mecanismo de escape tumoral. Esta hipótese parte da idéia de que o sistema imune tem um duplo papel no processo tumoral (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004). O sistema imune pode atuar no câncer de duas formas: protegendo o hospedeiro contra o desenvolvimento do tumor ou promovendo o desenvolvimento do mesmo através da seleção de variantes com reduzida imunogenicidade (DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; SCHREIBER, 2005). A imunoedição pode ser divida em três fases que são eliminação, equilíbrio e escape. A fase de eliminação representa o conceito clássico da imunovigilância, em que as células e moléculas da resposta imune inata e adaptativa reconhecem e destroem os tumores, protegendo o hospedeiro contra o câncer. Esta fase inicial pode erradicar uma grande quantidade de células transformadas, porém algumas podem resistir e, a persistência destas células caracteriza a segunda etapa, denominada fase de equilibro. O equilíbrio representa um tipo de dormência na qual o crescimento das células tumorais é controlado pela imunidade (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011). Nesta fase, também chamada de período de "seleção Darwiniana", muitas células tumorais são eliminadas e poucas sofrem mutações, estas se tornam resistentes ao ataque do sistema imune devido às mutações sofridas (KHONG; RESTIFO, 2002). Assim, no fim da fase de equilíbrio surge uma nova população de clones tumorais sobreviventes, cuja característica principal é a baixa imunogenicidade. Nesta etapa observa-se a fase de escape, na qual as células que sofreram mutações tornaram-se resistentes à resposta imune e sobreviveram. Em seguida, iniciarão um crescimento exagerado, de maneira descontrolada, iniciando assim a progressãoo tumoral (ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006).

Estas evidências indicam que nos estágios iniciais da tumorigênese o sistema imune consegue eliminar as células com potencial malignizante, tal fato evidencia o importante papel das células do sistema imune no controle do desenvolvimento tumoral. Dentre as células envolvidas na imunidade tumoral destaca-se o papel de linfócitos T CD8⁺, estas células podem reconhecer e eliminar células tumorais que apresentam antígenos via moléculas MHC de classe I; secretam citocinas como IFN-γ, envolvida na inibição da angiogênese e do ciclo celular, estimulam a imunidade adaptativa; liberam grânulos contendo perforina que formam poros na membrana das células alvo que podem alterar a permeabilidade e levar à lise osmótica; e enzimas citotóxicas, como granzima que promove a lise da célula alvo; e podem induzir a morte celular através da ligação de receptores de morte celular como o Fas/FasL (CD95/CD178) (GORELIK; FLAVELL, 2001; DUNN; OLD; SCHREIBER, 2004; ZITVOGEL; TESNIERE; KROEMER, 2006; LIEBERMAN, 2003).

Os linfócitos T CD4⁺ podem reconhecer antígenos tumorais restritos ao MHC de classe II controlando o desenvolvimento de tumores. Além disso, podem coordenar a resposta contra tumores, através da produção citocinas que estimulam a diferenciação de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL), e induzem a ativação de células da imunidade inata como os macrófagos através da liberação de IFN-γ produzido por células Th1. No entanto, células Th2 e Th17 indiretamente favorecem o desenvolvimento de tumores por recrutar células com atividade supressora como as células mielóides (Gr1⁺CD11b⁺) (CASERTA; BORGER; ZAMOYSKA, 2012).

As células NK exercem atividade citotóxica contra células tumorais sem a necessidade de reconhecimento de antígeno específico. A baixa expressão de moléculas MHC de classe I ou a alta expressão de proteínas relacionadas com o estresse celular por células tumorais leva a ativação das células NK que, por sua vez, matam as células tumorais através da ligação de receptores de superfície nas células tumorais, ou injetando nelas enzimas proteolíticas (granzima e perforina) que ativam a cascata das caspases, e desencadeiam a apoptose através da sinalização via membros da família de receptores de morte celular do TNF (FasL, TNF- α e TRAIL) (ZAMAI et al., 2007; VIVIER et al., 2012).

As células dendríticas representam um importante papel no combate ao câncer, pois possuem a capacidade de fagocitar células tumorais, digerir e apresentar seus antígenos a linfócitos T CD4⁺. Além disso, estas células podem induzir a morte de células tumorais via liberação de perforina e granzima ou por meio da sinalização via membros da família de receptores de morte celular do TNF (STARY et al., 2007; LU et al., 2002).

Apesar destes mecanismos, a resposta imune antitumoral pode ser ineficiente devido aos vários mecanismos de escape utilizados pelas células neoplásicas (CHIOU et al., 2005). Dentre estes mecanismos, destaca-se a indução de anergia, definida como o estado de hiporresponsividade de células T, no qual a produção de citocinas e a proliferação são prejudicadas após a exposição a determinado antígeno, favorecendo a progressão tumoral. A indução de anergia ocorre principalmente pelo fato das células tumorais, sobreviventes da fase de equilíbrio, ser pouco imunogênicas e não apresentar moléculas coestimuladoras (KHONG; RESTIFO, 2002).

Em relação aos outros mecanismos que estariam relacionados com o escape tumoral, pode-se citar a indução de apoptose de linfócitos intratumorais (*tumor infiltrating lymphocytes -TILs*) através da via Fas-FasL e à inativação funcional de células T por moléculas de superfície, como por exemplo, a interação PD-1/PDL-1 (KHONG; RESTIFO, 2002). A produção de citocinas por células tumorais também tem importante papel nos mecanismos de escape. Sabe-se que a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF-β, induz angiogênese, crescimento tumoral, formação de metástases e apresenta importante papel na inibição da resposta imune protetora mediada por células T CD8⁺ e NK (CASTRICONI et al., 2003; THOMAS; MASSAGUÉ, 2005; GURUVAYOORAPPAN, 2008; FLAVELL et al., 2010; HAO et al., 2012). Além destes fatores, muitas evidências têm indicado que o recrutamento de células T reguladoras (Treg), conhecidas pelo seu potencial supressor, seria um dos principais mecanismos responsáveis pela inibição da resposta imune antitumoral (DAS; LEVINE, 2008; SAKAGUCHI; POWRIE, 2007).

As células Treg representam de 5% a 10% da população de células T CD4⁺ em humanos e camundongos (STEPHENS et al., 2001; SAKAGUCHI, 2005). As células Treg naturais (nTreg) constituem uma população de linfócitos T CD4⁺CD25⁺, gerada no timo cuja principal função é manter a tolerância periférica, prevenindo o desenvolvimento de doença autoimune e, limitando o desenvolvimento de resposta imune exacerbada contra patógenos ou alérgenos (SHEVACH, 2002; NG et al., 2001; DIECKMANN et al., 2002; READ; POWRIE, 2001; TAKAHASHI et al., 2000; HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003; FEUERER et al., 2009; VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008; WING; SAKAGUCHI, 2010). No entanto, sua função supressora também pode limitar o desenvolvimento de respostas imunológicas antitumorais facilitando o desenvolvimento de tumores (FEUERER et al., 2009; VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008; WING; SAKAGUCHI, 2010).

As células nTreg co-expressam constitutivamente a cadeia α do receptor de IL-2 (CD25) (SHEVACH, 2002). A eliminação ou inativação destas células resulta no desenvolvimento de doença autoimune e acentuação da resposta imune contra aloantígenos e tumores (SHEVACH, 2002; NG et al., 2001; DIECKMANN et al., 2002; READ; POWRIE, 2001; TAKAHASHI et al., 2000; HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003). Estudos recentes demonstraram que o fator de transcrição "*forkhead*" Foxp3 ("*scurfin*") é essencial para o desenvolvimento e função das células Treg (HAIQI; YONG; YI, 2011; BETTINI; VIGNALI, 2010). Foxp3 é o marcador mais específico de células Treg humanas e murinas (BETTINI; VIGNALI, 2010; HAIQI; YONG; YI, 2011).

Diferentemente das células nTreg, as células Treg induzidas (iTreg) diferenciam-se a partir de linfócitos T CD4⁺ *naïve* após a exposição a sinais derivados de células tolerogênicas, drogas imunossupressoras, microbiota e pelo reconhecimento de antígenos expressos por células apresentadoras de antígenos na ausência de co-estímulos e citocinas pró-inflamatórias (BELKAID, 2007). As células iTregs desenvolvem-se em órgãos linfóides secundários, no tecido epitelial, no estroma tumoral, em tecidos cronicamente inflamados e enxertos (BILATE; LAFAILLE, 2012; CUROTTO DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009). Para a diferenciação de linfócitos T *naïve* em iTregs é necessário à sinalização via TCR, TGF- β , IL-10 e sinais co-inibitórios via CTLA-4 e PD-1 os quais estão envolvidos com a expressão de Foxp3, via a ativação de STAT3 e NFAT (BILATE; LAFAILLE, 2012; FRANCISCO et al., 2009; LIANG et al., 2005; JOSEFOWICZ; RUDENSKY, 2009). Em humanos, a expressão de Foxp3 em células iTreg pode ser transitória (WALKER et al., 2003; FANTINI et al., 2004; MAILLOUX; YOUNG, 2010). Estas células migram em resposta a fatores quimiotáticos via sinalização por receptores diferentes daqueles relacionados à migração das células nTreg (YAMAZAKI et al., 2008).

As células Tregs naturais e induzidas expressam diversos marcadores de superfície, como CD44, CD45RO, CD69, GITR, CD103, CD62L, CD73, CD39 além de moléculas coinibitórias, como ICOS, CTLA-4 e PD-1, galectinas, receptor de folato quatro e receptores de citocinas (BELKAID, 2007; FEUERER et al., 2009; YAMAGUCHI et al., 2007). E apresentam atividade supressora sobre diversos tipos celulares, como linfócitos efetores ou de memória, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e mastócitos (AZUMA et al., 2003; SHEVACH, 2009; TANG; BLUESTONE, 2008). Embora o mecanismo exato de ação das células nTreg na supressão da resposta imune não seja completamente conhecido, alguns estudos *in vitro* demonstram que: a) necessitam da ativação via TCR para exercerem sua função supressora; b) a regulação exercida por elas é antígeno inespecífica; c) a supressão é dependente do contato célula-célula e independente de fatores solúveis; d) inibe a produção de IL-2 por células T CD4⁺ e CD8⁺; e) a supressão da proliferação de células T pode ser superada pela adição de IL-2 exógena ou pelo aumento da produção de IL-2 pelas células T estimuladas com anti-CD28; f) a função supressora da célula Treg pode ser temporariamente suprimida pela sinalização através de GITR na superfície da célula, e finalmente; g) células dendríticas ativadas podem inibir a função de células Treg *in vitro* (SHEVACH, 2002; NG et al., 2001; DIECKMANN et al., 2002; READ; POWRIE, 2001; TAKAHASHI et al., 2000; HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003).

Sabe-se que a sua ação ocorre via contato célula-célula, como mencionado anteriormente, porém, os eventos bioquímicos envolvidos neste mecanismo ainda não foram plenamente elucidados. Acredita-se que o efeito sobre as células apresentadoras de antígenos (APCs) inclua a diminuição da expressão de MHC classe II, diminuição da expressão de B7, aumento da produção de IL-10 e diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias. Sobre os linfócitos, especificamente, acredita-se que ocorra a diminuição de secreção de citocinas, aumento da expressão do receptor de TGF- β , redução da proliferação, indução de anergia, apoptose e conversão destas células em fenótipo regulador (iTreg) (SHEVACH, 2002). As nTreg também podem controlar a magnitude de memória de células T CD8⁺ em resposta a infecções virais e bacterianas, bem como transplantes *in vivo*, através da inibição da proliferação de células de memória (CHEN et al., 2005).

O papel das citocinas em mediar os efeitos supressores das células nTreg é altamente controverso. Alguns estudos falharam em detectar a produção de IL-10 e TGF-β por células

Treg humanas, enquanto outros claramente demonstraram a secreção destas citocinas em resposta a uma variedade de estímulos (SHEVACH, 2002; NG et al., 2001; DIECKMANN et al., 2002; READ; POWRIE, 2001; TAKAHASHI et al., 2000; HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003; CHEN et al., 2005; ANNACKER et al., 2001; BRADEL et al., 2008; ZHANG et al., 2009; BYSTRY et al., 2001, CAVASSANI, et al., 2006; MOREIRA et al., 2008; YURCHENKO et al., 2006; TAN et al., 2009; MILLS, 2004). Embora existam controvérsias quanto ao envolvimento de citocinas mediando à ação supressora das células Treg, *in vitro*, os mecanismos pelos quais estas células suprimem doença autoimune, *in vivo*, são mais complexos, e algumas citocinas supressoras IL-10 e TGF-β têm sido implicadas como tendo papel crucial neste processo (SHEVACH, 2002). Por exemplo, observou-se TGF- β na superfície das células Treg, esta citocina ligada à superfície das células Treg mediaria sua função supressora dependente de contato (NAKAMURA; KITANI; STROBER, 2001). Entretanto, estes resultados precisam ser reanalisados, uma vez que a presenca de TGF- β na membrana de células Treg humanas permanece controversa. Além disso, IL-35 é expressa constitutivamente por células Treg de camundongos e estudos sugerem que sua expressão contribui para a função supressora das células Treg de camundongos (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008; BRADEL et al., 2008).

Inúmeros trabalhos sugerem o envolvimento de células Treg no desenvolvimento e progressão de neoplasias (SMYTH et al., 2006; GHIRINGHELLI et al., 2005). Embora o exato mecanismo de ação das células Treg na supressão da resposta imune não seja conhecido, sua relação com a progressão tumoral foi claramente demonstrada (SMYTH et al., 2006; GHIRINGHELLI et al., 2005). Vários estudos demonstraram que o aumento no número destas células em cânceres como de pâncreas, mama, pulmão e ovário se relaciona com uma menor sobrevivência dos pacientes. Por outro lado alguns autores correlacionam o aumento

de Treg no tecido tumoral a um favorável prognóstico para a doença (LIYANAGE et al., 2002; WOO et al., 2002; SHEVACH, 2004; BADOUAL et al., 2006; SATO et al., 2005).

A migração de células T reguladoras para tecidos periféricos é mediada por CCL1, CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β), CCL5 (RANTES), CCL17 (TARC), CCL22 (MDC), CCL28 (MEC) via sinalização por receptores específicos (CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR1 e CXCR4) (IELLEM et al., 2001; WYSOCKI et al., 2005; YURCHENKO et al., 2006; KALLIKOURDIS et al., 2007; MOREIRA et al., 2008; KLEINEWIETFELD et al., 2005; HIRAHARA et al., 2006; MENNING et al., 2007; EKSTEEN et al., 2006; WAN; FLAVELL, 2005).

A expressão específica de receptores de quimiocinas por células Treg favorece a migração dessas células tanto para órgãos linfóides como para tecidos periféricos. Em relação às doenças infecciosas, demonstrou-se que camundongos deficientes de CCR5 (CCR5KO) controlam a infecção por *Mycobacterium tuberculosis, Listeria monocytogenes* e por *Leishmania major* (ALGOOD; FLYNN, 2004; ZHONG et al., 2004; YURCHENKO et al., 2006). Em infecções fúngicas, foi demonstrado que camundongos CCR5KO controlam o crescimento e disseminação de *Paracoccidioides brasiliensis*, além de apresentarem menor acúmulo de células Treg no pulmão, sugerindo que CCR5 modula a migração e a função supressora das células Tregs (MOREIRA et al., 2008).

Ainda em relação à migração de células Treg, um estudo recente demonstrou que a produção de CCL28 por células tumorais de câncer de ovário promoveu o recrutamento de células Treg dependente de CCR10 (FACCIABENE et al., 2011). Em pacientes com câncer de mama ou próstata, a produção de CCL22 pelas células tumorais promoveu o acúmulo de células Treg que expressavam de CCR4 (MILLER et al., 2006; GOBERT et al., 2009). Outros

estudos demonstraram que as células Treg encontradas no microambiente tumoral expressavam CCR5 (SCHLECKER, et al., 2012).

CCR5 é expresso em células T naïve, de memória e efetoras, NKT, em monócitos, macrófagos e células dendríticas imaturas (SCHALL, 1991; SALLUSTO et al., 1999; APPAY; ROWLAND-JONES, 2001; MOTSINGER et al., 2002; THOMAS et al., 2003). As principais quimiocinas ligantes de CCR5 são: CCL3, CCL4 e CCL5, as quais estão presentes em grande quantidade em tecidos inflamados como no líquido sinovial em pacientes com artrite inflamatória ou no sistema nervoso central de camundongos com encefalomielite autoimune (CHOI; AN, 2011; LOETSCHER et al., 1998; WANG; LIU, 2003; BAGAEVA; WILLIAMS; SEGAL, 2003). Também constitui o correceptor necessário para a entrada do vírus HIV (vírus da imunodeficiência humana) nos linfócitos T CD4⁺ (DENG et al., 1996; DRAGIC et al., 1996). Além disso, CCR5 é expresso por fibroblastos, neurônios, células epiteliais e endoteliais (VAN DEVENTER, et al., 2005).

Seus ligantes podem ser sintetizados por várias células do sistema imune, ou não, e sua produção, assim como a do próprio receptor é regulada por múltiplos estímulos próinflamatórios (LAPTEVA; HUANG, 2010). O nível de expressão de CCR5 e de seus ligantes também é influenciado por variações genéticas, como polimorfismos que promovem sua retenção no interior das células ou redução da expressão de CCL5 (SAMSON et al., 1996; AN et al., 2002). A redução na expressão de CCR5 foi relacionada com efeitos benéficos para o hospedeiro, como a redução da rejeição de transplantes de rim ou de coração (GILLIAM; RIEDEL; REDFIELD, 2011). Por outro lado, apresentou efeitos prejudiciais relacionados ao desenvolvimento autoimune, doença cardiovascular e de doença esquizofrenia (RASMUSSEN et al., 2006). Além disso, este receptor tem apresentado um papel paradoxal no desenvolvimento de tumores.

Em câncer pancreático, de próstata, mama, figado e de pulmão demonstrou-se que o bloqueio ou ausência de CCR5 controla o desenvolvimento do tumor sugerindo que a ausência deste receptor poderia limitar a migração de células Treg para tecidos inflamados (TAN et al., 2009; TAN et al., 2009; ZHANG, et al., 2010; ROBINSON et al., 2003; BARASHI et al., 2013; LEE et al., 2012). Além disso, outros estudos sugerem que a migração de tipos celulares específicos para o microambiente tumoral via CCR5 promove o desenvolvimento de metástases, indução de angiogênese e evasão da resposta imune (VAN DEVENTER et al., 2005; WU et al. 2008, AZENSHTEIN et al., 2002, MELLADO et al., 2001; ROBINSON et al., 2003). De modo contrário, camundongos CCR5KO apresentaram maior incidência de fibrossarcoma induzido quimicamente (GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2011). Estudos mostraram que as células tumorais ativadas via CCR5 aumentam a atividade de p53, o que leva a inibição da progressão tumoral (MAÑES et al., 2003). No entanto, são escassosos os relatos sobre o papel de CCR5 na quimiotaxia de células Treg para o microambiente tumoral, particularmente em lesões de carcinoma espinocelular.

Como mencionado anteriormente, evidências correlacionam CCR5 e seus ligantes com a biologia de tumores, embora haja certa controvérsia sobre o papel deste receptor na progressao tumoral. Estudos são necessários para apliar à compreensão de como os sinais mediados via CCR5 podem controlar o microambiente tumoral. Particularmente, estudos são necessários para determinar a correlação entre CCR5 e a migração de células Trege os mecanismos de escape tumoral. Enfatizando que muitos obstáculos ainda restam para traduzir este conhecimento em aplicação clínica para o tratamento de tumores.

Neste sentido, várias terapias têm sido propostas objetivando inibir a ação supressora das células Treg e, consequentemente, melhorar o prognóstico do paciente com câncer. Em relação às terapias antitumorais, estudos demonstraram que a deleção das células Treg através do tratamento com anti-CD25 resultou na redução da velocidade de crescimento tumoral em camundongos (ONIZUKA, et al., 1999; RAMOS, et al., 2012). A deleção de células Treg pelo bloqueio GITR e CTLA-4 também tem sido proposta (KO et al., 2005; SHIMIZU et al., 2002; TURK et al., 2004; SUTMULLER et al., 2001). A partir disto, sugeriu-se que a eliminação das células Treg pode estar envolvida na proteção contra diversos tipos de tumores (SHIMIZU; YAMAZAKI; SAKAGUCHI, 1999).

Como mencionado anteriormente, existem obstáculos quanto à aplicação clínica destas terapias, visto que, também resultam na inativação de células efetoras uma vez que, estes marcadores de superfície não são expressos apenas em células Treg. Além disso, estas modalidades de tratamento apresentam outro obstáculo quanto a sua utilização devido sua incapacidade de distinguir entre células Treg necessárias para a homeostasia corporal daquelas envolvidas nos processos patológicos tais como a evasão da resposta imune pelas células tumorais (TAN et al., 2009).

Neste tópico, interferir com a migração de células Treg é um alvo de grande interesse para futuras terapias, uma vez que interferindo com a migração destas células poderia ocorrer uma efetiva diminuição nos mecanismos de escape tumoral. Sendo que as estratégias de inibição dos receptores de quimiocinas, e não a inibição de uma quimiocina específica representaria a estratégia mais apropriada, pois as quimiocinas apresentam certa redundância e promiscuidade na ligação com seus receptores. Desta forma, ao inibir um receptor de quimiocina, automaticamente a função de uma ou mais quimiocinas que se utilize de tal receptor seria prejudicada.

Além disso, apesar dos avanços sobre a efetiva participação das células Treg na resposta imune contra tumores, ainda existem vários pontos que precisam ser esclarecidos. Os mecanismos que controlam a migração destas células para o microambiente tumoral ainda não

estão totalmente definidos. O esclarecimento dos mecanismos de migração de células Treg no contexto do câncer poderá fornecer novos alvos para o desenvolvimento de terapias mais específicas. Assim, é de extrema importância estabelecer qual é o papel de CCR5 na migração de células Treg em CEC induzido quimicamente e sua contribuição no controle do desenvolvimento tumoral, para que se possa desenvolver estratégias mais elaboradas de imunoterapia.

Proposição

1. Objetivo Geral:

Avaliar o envolvimento de CCR5 na migração de células T reguladoras e a sua correlação com o desenvolvimento de carcinoma espinocelular induzido quimicamente.

2. Objetivos específicos:

2.1. Avaliar o desenvolvimento e progressão de carcinoma espinocelular em camundongos geneticamente deficientes de CCR5;

2.2. Determinar o fenótipo das células isoladas do microambiente tumoral e linfonodos;

2.3. Analisar o papel de células T reguladoras CCR5⁺ durante o desenvolvimento de carcinoma espinocelular;

2.4. Determinar o perfil de citocinas IL-10, IL-12, IL-17, TGF- β , IFN- γ , TNF- α e quimiocinas CCL4, CCL5, CCL17, CCL22 no microambiente tumoral.

Material e Métodos
1. Reagentes

Phorbol 12 myristate 13-acetate (PMA) (Sigma) (10 μ g/ 100 μ L de acetona) – agente promotor;

7,12-dimetilbenz[a]ntraceno (DMBA) (Sigma, St. Louis, EUA) (125 μ g/ 200 μ L de acetona) – agente carcinogênico químico;

Meio RPMI-1640 (Gibco[®], Nova Iorque, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) e 2 mM L-glutamina (Gibco) – utilizado na cultura de células tumorais;

Meio RPMI-1640 suplementado com 20% de soro de coelho e 5% de albumina sérica bovina - utilizado para bloqueio de ligações inespecíficas;

PBS+ BSA + EDTA (tampão PBS pH 7,2 suplementado com 0,5% de BSA e 2 mM de EDTA) – utilizado durante a purificação de linfócitos;

Carboxyfluorescein-succinimydil-ester (CFSE, Molecular Probe, Invitrogen, Burlington, Canada) (5 µM) - solução utilizada para marcação das células YAC-1;

Iodeto de propídeo (PI, BD Biosciences) - marcador de morte celular;

Kits de Elisa para citocinas IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α , TGF- β (BD Bioscience, San Diego, CA, EUA), IL-17 (eBioscience San Diego, CA, EUA) e quimiocinas CCL4, CCL5, CCL17 e CCL22 (R&D Systems, Minneapolis, MN);

PBS + Tween 20 (BD Bioscience) (0,05%) – solução utilizada para lavar as placas de Elisa.

2. Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos C57BL/6 (WT) e geneticamente deficientes de CCR5 (CCR5KO), machos, de 6 a 8 semanas, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru e do Biotério Central do Campus USP da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, respectivamente. Os animais foram alocados individualmente, ao acaso, em gaiolas de polipropileno e mantidos em condições apropriadas, com livre acesso à água e a uma dieta padrão de laboratório. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3. Carcinogênese química

A região dorsal dos camundongos foi submetida à assepsia com álcool 70% v/v e a tricotomia realizada com auxílio de lâminas de barbear Gillette aço inox. Após este procedimento, iniciou-se o protocolo de indução de carcinogênese química (adapatado de Moore et. al 1999) que compreende duas fases: iniciação e promoção (Figura 1). Durante a fase de iniciação, os camundongos receberam no dorso a aplicação tópica de uma dose de DMBA (125 µg/ 200 µL de acetona). Durante a fase de promoção, os camundongos receberam no dorso a aplicação, os camundongos receberam no dorso a aplicação tópica de uma dose de DMBA (125 µg/ 200 µL de acetona). Durante a fase de promoção, os camundongos receberam no dorso aplicações tópicas de PMA (10 µg/ 100 µL de acetona), 3 vezes por semana, durante 16 ou 35 semanas (Figura 2). Os camundongos CCR5KO submetidos à transferência adotiva de células T CD8⁺ foram avaliados apenas após 35 semanas de carcinogênese devido a indisponilidade de animais. O desenvolvimento do tumor foi acompanhado visualmente no transcorrer de todo o período experimental e as alterações morfológicas foram devidamente registradas. A análise da variação de peso foi realizada semanalmente em balança analítica digital (Radwag WTB 2000). A taxa de sobrevida foi obtida com a observação diária da sobrevivência dos camundongos submetidos à carcinogênese química.



Figura 2. Ilustração do protocolo de indução de carcinogênese química.

4. Transferência de linfócitos T CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁻ e CD8⁺

A transferência celular adotiva foi realizada com o intuito de analisar o papel de células T CCR5⁺ no desenvolvimento de CEC. Com base no perfil de transferência celular adotiva os camundongos foram divididos em grupos (4 animais/ grupo), como segue:

Grupo 1. Camundongos C57BL/6 que não foram submetidos à carcinogênese química (WT^{Sham});

Grupo 2. Camundongos C57BL/6 que foram submetidos à carcinogênese química (WT^{CEC});

Grupo 3. Camundongos CCR5KO que não foram submetidos à carcinogênese química (CCR5^{Sham});

Grupo 4. Camundongos CCR5KO que foram submetidos à carcinogênese química (CCR5^{CEC});

Grupo 5. Camundongos CCR5KO que foram submetidos à carcinogênese química e à transferência adotiva de células T CD4⁺CD25⁺CCR5⁺ (CCR5^{CEC} ^{Treg});

Grupo 6. Camundongos CCR5KO que foram submetidos à carcinogênese química e à transferência adotiva de células T CD4⁺CD25⁻CCR5⁺ (CCR5^{CEC} ^{CD4+});

Grupo 7. Camundongos CCR5KO que foram submetidos à carcinogênese química e à transferência adotiva de células T CD8⁺CCR5⁺ (CCR5^{CEC CD8+}).

4.1. Purificação de linfócitos T CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁻ e CD8⁺

Para a separação das subpopulações de células T CD4⁺ em CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25⁻ foi utilizado o sistema de purificação por meio de microesferas magnéticas (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Glaadbach, Germany) de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante. A purificação das células CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25⁻ foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, células do baço de camundongos C57BL/6 que não foram submetidos à carcinogênese química foram incubadas com um coquetel de anticorpos monoclonais

conjugados a biotina (anti CD8, anti-CD11b, anti-CD45R, anti-CD49b e anti-Ter-119) e, em seguida, incubadas com microesferas contendo anticorpos anti-biotina. Após esse procedimento, as células $CD4^+$ foram excluídas da suspensão celular pela exposição da coluna MACS apropriada a um campo magnético fornecido pelo equipamento VarioMACS (Miltenyi Biotec). Na segunda etapa, as células T CD4⁺ foram marcadas com microesferas contendo anticorpos anti-CD25 e selecionadas positivamente, após passagem pela coluna MACS apropriada. As células T CD4⁺CD25⁺ ficaram retidas na coluna e após a remoção da coluna do campo magnético foram eluídas com PBS + EDTA. Para a alta pureza, a seleção positiva da fração de células foi realizada duas vezes consecutivas e confirmada através de análise por citometria de fluxo. Desta forma, as populações celulares de interesse foram obtidas: de células T CD4⁺CD25⁺ (Treg CCR5⁺) e CD4⁺CD25⁻ (T CD4^{conv} CCR5⁺).

Para a separação da população de células T CD8⁺ foi utilizado o sistema de purificação por meio de microesferas magnéticas (Mouse CD8 Cell Enrichment Set-DM IMag, BD) de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante. A purificação das células CD8⁺ foi realizada em uma única etapa, assim, células do baço de camundongos C57BL/6 que não foram submetidos à carcinogênese química foram incubadas com um coquetel de anticorpos monoclonais conjugados a biotina (anti-CD4, anti-CD11b, anti-CD45R, anti-CD49b e anti-Ter-119) e, em seguida, incubadas com partículas de estreptavidina magnéticas. Após esse procedimento, as células T CD8⁺ foram coletadas da suspensão celular pela exposição do tubo contendo células a um campo magnético fornecido pelo equipamento magneto (BD Imagnet). Para a alta pureza, a seleção da fração de células foi realizada duas vezes consecutivas e confirmada através de análise por citometria de fluxo. Desta forma, a população celular de interesse foi obtida: células T CD8⁺ CCR5⁺.

4.2. Transferência Celular Adotiva

Para o ensaio de transferência célular, na quinta semana após o início do protocolo de carcinogênese química, os animais CCR5KO, foram anestesiados e, receberam por via endovenosa caudal, um volume de 100 μ L da suspensão celular contendo 2x10⁵ células T CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁻ ou CD8⁺ isoladas conforme descrito anteriormente.

5. Eutanásia e coleta de tecidos tumorais

Os animais foram submetidos à eutanásia na 16^a ou 35^a semana após o início da aplicação do carcinógeno. As lesões foram coletadas e armazenadas em RPMI a 4°C e, em seguida, encaminhadas para o laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB) USP. No laboratório, este material foi dividido em duas partes: o primeiro fragmento foi destinado à analíse histopatológica e o segundo à separação de leucócitos da lesão.

6. Análise histopatológica

Para a análise histopatológica, as amostra de tecido foram fixadas em solução de formalina a 10% em temperatura ambiente. O passo seguinte foi a desidratação gradativa em álcool, seguida de xilol e inclusão em parafina. Cortes seriados com espessura de 5µm foram obtidos através de um micrótomo, montados em lâminas, e corados com hematoxilina e eosina. A análise histopatológica foi realizada através da análise de cortes seriados em microscopia ótica, visando basicamente a análise da presença e da localização de células inflamatórias no microambiente tumoral, assim como as características histológicas do tecido tumoral.

7. Separação de leucócitos da lesão

Para caracterização dos leucócitos presentes no microambiente tumoral, amostras de tecido foram coletadas, fragmentadas e incubadas por 40 minutos a 37°C com meio RPMI contendo 500 μ g/ mL de liberase. Após este procedimento, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para posterior dosagem de citocinas e quimiocinas e, o tecido foi processado em presença de tampão PBS + BSA + EDTA usando Medimachine (BD Bioscience), por 4 minutos. As células foram colhidas, lavadas e a viabilidade celular determinada por exclusão do azul de Trypan.

8. Anticorpos

Foram utilizados anticorpos monoclonais purificados ou conjugados à ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), proteína clorofilaperidinina (PerCP) ou aloficocianina (APC) (BD Bioscience) para os ensaios de fenotipagem por citometria de fluxo (Tabela 1). Os anticorpos purificados foram conjugados a anticorpos secundários conjugados aos fluorocromos Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 647 (Invitrogen) (Tabela 1).

Molécula-alvo	Fluorocromo	Clone	Fabricante
CD3	PE	145-2C11	
CD4	PercP	RM4-5	
CD8	FITC/APC	53-6.7/53-6.7	BDBioscience
CD11b	PE	M1/70	
CD11c	FITC	HL3	
CD14	FITC	rmC5-3	
CD19	FITC	1D3	
CD25	PE	PC61	
CD28	PE	3.751	
CD45RA	PE	148	
CD45RB	PE	16A	
CD62L	PE	MEL-14	
CD69	PE	H1.2F3	
CD95	PE	Jo2	
CD103	PE	M290	
CD154	PE	MR1	
CD178	PE	MFL3	
LAG3	PE	C9B7W	
CCR5	PE	C34-3448	
CTLA-4	PE	UC10-4F10-11	
PD-1	PE	J43	
PD-L1	PE	MIHI	
PD-L2	PE	MIH18	
NK1.1	PE	PK136	
GITR	PE	DTA-1	
DC	PE	33D1	
Gr1	FITC	RB6-8C5	
FoxP3	Alexa Fluor 488	MF23	
MIP-1β	Purificado	A65-2	
Perforina	PE	OMAK-D	
Granzima	Purificado	LUEE	eBioscience
F4/80	PE	BM8	

Tabela 1 - Anticorpos utilizados nos ensaios de Fenotipagem

9. Citometria de fluxo

A análise da expressão de marcadores de superfície foi realizada com o intuito de fenotipar a população de leucócitos, bem como as subpopulações de células T CD4⁺CD25⁺ isoladas do tecido tumoral e linfonodos dos animais de experimentação. As células (1x10⁶ células) foram lavadas e incubadas com o bloqueio de ligações inespecíficas por 60 minutos a 4°C. Em seguida, acrescentou-se os anticorpos e as amostras foram incubadas por 1 hora a 4°C. Após incubação com os anticorpos, as amostras foram lavadas duas vezes com RPMI incompleto, sendo centrifugadas a 460 x g por 10 minutos.

Para a detecção de Foxp3, os leucócitos isolados foram ressuspensos em 100 µL de PBS e, primeiramente, marcados com anticorpos anti-moléculas de superfície, conjugados a PE, PerCP e APC, de acordo com o protocolo descrito acima. Após a incubação com os anticorpos, as células foram lavadas sucessivamente e permeabilizadas por 20 minutos em uma solução de permeabilização/fixação (Cytofix/Cytoperm, BD Bioscience) de acordo com as instruções do fabricante. As células permeabilizadas foram lavadas com uma solução "Perm/Wash" (BD Bioscience) e, então incubadas com anticorpo específico anti-Foxp3 conjugado a Alexa 488 na diluição 1:100 por 40 minutos à 4⁰C, sendo posteriormente lavadas com a solução de "Perm/Wash" e, em seguida, analisadas por citometria de fluxo.

As amostras foram adquiridas em FACS Callibur[™] (BD Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ). As análises foram realizadas utilizando o programa CELLQuest[™] (BD Immunocytometry Systems) o qual permite analisar todas as células adquiridas ou apenas determinadas populações, individualizadas por janelas (ou "*gates*") selecionadas de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) ou fluorescência (FL).

10. Purificação de células natural killer (NK)

Para a separação da população de células natural killer (NK) foi utilizado o sistema de purificação por meio de microesferas magnéticas (Mouse NK CellEnrichment Set-DM BD IMag, BD Bioscience) de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante. A purificação das células NK foi realizada em uma única etapa, assim, células do baço de camundongos C57BL/6 e CCR5KO submetidos ou não à carcinogênese química foram incubadas com um coquetel de anticorpos monoclonais conjugados a biotina (anti-CD4, anti-CD5, anti-CD8a,

anti-CD19, anti-CD24, anti-Gr-1 e anti-Ter-119) e, em seguida, incubadas com partículas magnéticas de estreptavidina. Após esse procedimento, as células NK foram coletadas da suspensão celular pela exposição do tubo contendo células a um campo magnético fornecido pelo equipamento magneto (BD Imagnet). Para a alta pureza, a seleção positiva da fração de células foi realizada duas vezes consecutivas. Desta forma, a população celular de interesse foi obtida: células NK.

11. Cultura de linhagem de célula tumoral

A linhagem tumoral YAC-1 (linfoma murino) foi utilizada neste estudo como células alvo nos ensaios para avaliação da citotoxicidade de células NK. A linhagem foi mantida em meio RPMI completo. A manutenção da linhagem tumoral ocorreu a cada 48-72h, quando foram supridas com meio de cultura novo e as células repicadas sempre que necessário. Para a avaliação da citotoxicidade celular, as células alvo foram marcadas, previamente ao ensaio de citotoxicidade, com CFSE. As células (2,5 x 10^5) foram incubadas em PBS 5 μ M de CFSE, por 10 minutos a 4°C, ao abrigo da luz. Após este passo, as células foram lavadas duas vezes (centrifugação por 5 minutos, 4°C, 250 g) com meio RPMI completo.

12. Avaliação da citotoxicidade de células NK

A ação citotóxica das preparações de células efetoras ricas em células NK foi avaliada por citometria de fluxo utilizando-se a linhagem celular YAC-1 (linfoma murino) como célula alvo. Para a avaliação da citotoxicidade foram utilizadas células efetoras isoladas como descrito anteriormente (item 10).

As células alvo (A) marcadas com CFSE foram misturadas às células efetoras (E) nas proporções (E:A) de 10:1, 25:1 e 50:1 e incubadas por 4 horas a 37°C. Foram realizadas triplicatas das misturas E:A. O iodeto de propídeo (PI) foi adicionado à preparação ao término das 4 horas de incubação. Dez minutos após a adição do PI os tubos contendo as misturas de células alvo e células efetoras foram avaliados através da citometria de fluxo. As misturas de células efetoras e células alvo foram analisadas após o ajuste apropriado dos canais SSC/FSC, permitindo localizar cada uma destas populações celulares, com aquisição de 30.000 eventos. A citotoxicidade foi calculada segundo a fórmula: porcentagem de células mortas =

[(morte tubo teste – morte espontânea de células alvo) / (espontânea de células alvo)] x 100 (modificação de MARCUSSON-STAHL; CEDERBRANT, 2003).

13. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para dosagem de citocinas e quimiocinas

O perfil de citocinas e quimiocinas no microambiente tumoral foi determinado por ELISA (Opteia, BD Bioscience). Para tanto, placas de 96 poços foram recobertas com o respectivo anticorpo primário diluído em Coating Buffer e incubadas durante 18h em geladeira. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas com PBS + Tween (BD Bioscience) e bloqueadas durante 1 hora, em temperatura ambiente, com Assay diluent (BD Bioscience). As placas foram lavadas com PBS+Tween e incubadas com amostras do sobrenadante do tecido tumoral e quantidades conhecidas de recombinante durante 3 horas a 37°C. Após este período, as placas foram novamente lavadas e incubadas com anticorpo biotinilado e estreptavidina diluídas em Assay diluent por 2 horas em temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente e o substrato peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina na proporção de 1:1 (BD Bioscience) foi adicionado conforme as instruções do fabricante. Após 30 minutos, a solução de paralisação da reação (ácido sulfúrico 4N) foi adicionada e a leitura foi realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 450nm (Bio-Rad, EUA).

14. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) ou média \pm desvio padrão (SD) dos resultados obtidos para cada grupo. A análise estatística foi realizada aplicando-se o teste adequado a cada ensaio com o auxílio do programa GraphPad Prism 5. Todos os valores foram considerados significativos quando P < 0,05.

Resultados

1. Indução de carcinoma espinocelular

Relatos da literatura têm demonstrado que o desenvolvimento tumoral está associado a alterações fisiopatológicas. Desta forma, avaliaram-se eventuais alterações fisiológicas e possíveis modificações na sobrevida de camundongos submetidos à carcinogênese química. Durante os períodos de 16 e 35 semanas não foram observados óbitos nem alterações de comportamento, alimentação e ciclo circadiano dos animais.

De modo relevante, os resultados de análise semanal do peso revelaram que os animais WT^{Sham} apresentaram média de peso significativamente maior em relação aos animais WT^{CEC} nas primeiras semanas (até a 16^a semana) (Figura 3A). De modo contrário, os animais CCR5^{Sham} apresentaram média de peso significativamente mais baixa do que os animais CCR5^{CEC} apenas na 17^a e 19^a semanas (Figura 3A). Além disso, os animais WT^{CEC} apresentaram média de peso significativamente mais alta em relação aos animais CCR5^{CEC} (Figura 3A). Esta diferença entre ambos os grupos se manteve, com pequenas variações de significância (Figura 3A).

Os animais CCR5^{CEC Treg} apresentaram média de peso significativamente mais alta do que os animais CCR5^{CEC} (1^a a 18^a, 20^a e 26^a semana) (Figura 3B). Os animais do grupo CCR5^{CEC CD4+} também apresentaram média de peso significativamente maior que os animais CCR5^{CEC} na 1^a a 20^a, 22^a a 26^a e 28^a a 30^a semanas (Figura 3B). No entanto, apenas na 19^a semana foi constatada média de peso significativamente diferente entre os animais CCR5^{CEC CD4+} (Figura 3B).

Em relação aos animais CCR5^{CEC CD8+}, verificou-se que estes apresentaram peso médio significativamente maior que os animais CCR5^{CEC} no transcorrer de quase todo o período experimental, exceto na 19^a, 21^a a 24^a e 31^a semana (Figura 3C).



Figura 3: Análise do peso. O peso de animais CCR5 KO e WT foi registrado durante 35 semanas. (A-C) Os gráficos representam a média \pm SEM do peso registrado semanalmente para cada animal analisado individualmente. Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. **P* < 0,05.

2. Análise macroscópica do desenvolvimento de tumores

O desenvolvimento de papilomas foi acompanhado visualmente no transcorrer de todo o período experimental. Os resultados revelaram que 100% dos animais WT^{CEC} apresentaram papilomas na 20ª semana. De modo contrário, apenas 33,33% dos animais CCR5^{CEC} apresentaram papilomas na 20^a semana de carcinogênese química (Figura 4A). Os resultados revelaram ainda que o desenvolvimento de papilomas em 100% dos animais CCR5^{CEC} só foi constatado a partir da 33^ª semana de carcinogênese química (Figura 4). Em relação aos animais que receberam a transferência celular adotiva, os resultados evidenciaram que 100% dos animais CCR5^{CEC Treg} e CCR5^{CEC CD4+} apresentaram lesões na 16^a e 17^a semana de carcinogênese química, respectivamente, assemelhando-se ao observado para os animais do grupo controle (WT^{CEC}) (Figura 4A-B). De modo contrário, 100% dos animais CCR5^{CEC CD8+} apresentaram papilomas em fase precoce, na 10^a semana (Figura 4C). A análise do número de papilomas revelou que os animais WT^{CEC} apresentaram número significativamente maior de papilomas em relação aos animais CCR5^{CEC} a partir da 18ª semana (Figura 5A). Além disso, animais CCR5^{CEC CD4+} apresentaram número significativamente maior de lesões a partir da 14^a semana, quando comparado com os animais do grupo CCR5^{CEC} (Figura 5B). Embora os animais CCR5^{CEC Treg} tenham apresentado um número de lesões relativamente maior que os animais CCR5^{CEC}, esta diferença só foi significativa na 21^a, 25^a, 26^a e 35^a semana (Figura 5B). De modo semelhante aos animais CCR5^{CEC CD4+}, os animais CCR5^{CEC CD8+} também apresentaram número significativamente maior de papilomas a partir da 14ª semana, em relação aos animais CCR5^{CEC}, contudo, esta diferença se manteve significativa somente até a 32^a semana (Figura 5C).

A avaliação macroscópica demonstrou o desenvolvimento de numerosas lesões ora com aspecto papilomatoso (CCR5^{CEC CD4+} e CCR5^{CEC CD8+}), ora com aspecto de carcinoma verrucoso (WT^{CEC} e CCR5^{CEC}), com ulceração central (CCR5^{CEC Treg}) ou uma associação de lesões com diferentes padrões macroscópicos, resultantes de intensa proliferação do epitélio escamoso estratificado no local, ao término da 35^a semana de carcinogênese química.



Figura 4: Incidência de papilomas. (A-C) Os gráficos representam a incidência de papilomas detectada semanalmente no dorso dos animais WT e CCR5 KO após 35 semanas de carcinogênese química. Dados representativos de três experimentos independentes.



Figura 5: Análise do desenvolvimento de papilomas. (A-C) Os gráficos representam a média \pm SEM do número de papilomas detectados semanalmente no dorso dos animais WT e CCR5 KO após 35 semanas de carcinogênese química. Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. **P*< 0,05.

3. Análise histopatológica

As amostras de pele de animais submetidos ou não à carcinogênese química foram coletadas e analisadas microscopicamente (Figuras 6-7). A presença de características de malignidade nas amostras foi determinada de acordo com os seguintes parâmetros: grau de queratinização, pleomorfismo celular e nuclear, presença de disqueratose, pérolas de queratina, perda da coesão celular típica, hipercromatismo nuclear e presença de mitoses atípicas (Figuras 6-7).

3.1. Análise histopatológica após 16 semanas de carcinogênese química

A análise histopatológica das amostras de pele de animais do grupo controle (WT^{Sham} e CCR5^{Sham}) revelou a presença de epitélio escamoso estratificado apresentando poucas camadas de células e presença dos anexos cutâneos (pelos e glândulas sebáceas) no tecido conjuntivo subjacente (Figuras 6A-B, E-F e 7A-B, E-F). Na 16^a semana, a amostra de tecido de animais WT^{CEC} revelou hiperplasia epitelial com formação de projeções bulbosas, intercaladas por tecido conjuntivo fibroso apresentando discreto infiltrado inflamatório (Figura 6C-D). Observou-se área de moderada displasia epitelial caracterizada pela perda da estratificação, presença de células pleomórficas, com núcleos hipercromáticos e preservação da integridade da membrana basal subjacente ao epitélio (Figura 6C-D). Já a análise microscópica das amostras de tecido de animais CCR5^{CEC} e CCR5^{CEC CD4+} revelou hiperplasia epitelial com formação de projeções digitiformes, com áreas centrais de tecido conjuntivo fibroso apresentando discreto infiltrado inflamatório (Figura 6G-H, K-L). Observou-se exocitose por polimorfonucleares e características displásicas (leves) restritas as camadas basal e parabasal e preservação da integridade da membrana basal subjacente (Figura 6G-H, K-L). A análise microscópica da amostra de tecido de animais CCR5^{CEC Treg} revelou hiperplasia epitelial com formação de projeções digitiformes, menos proeminente que a observada em animais CCR5^{CEC} e CCR5^{CEC CD4+}, e exocitose por polimorfonucleares, além de discreto infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo fibroso subjacente (Figura 6I-J). Contudo não foram observados sinais de displasia epitelial (Figura 6I-J).

Figura 6. Fotomicrografias de amostras de tecido após 16 semanas de carcinogênese química. As amostras de pele de animais controle WT^{Sham} (A-B), WT^{CEC} (C-D), $CCR5^{Sham}$ (E-F), $CCR5^{CEC}$ (G-H), $CCR5^{CEC Treg}$ (I-J) e $CCR5^{CEC CD4+}$ (K-L) foram coletadas, processadas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Aumento de 5x (A, C,E, G, I e K); aumento de 40x (B, D, F, H, J e L).



3.2. Análise histopatológica após 35 semanas de carcinogênese química

Após 35 semanas de carcinogênese química, a análise histopatológica das amostras de tecido de animais WT^{CEC} revelou o desenvolvimento de carcinoma espinocelular bem diferenciado, caracterizado por cristas epiteliais largas e alongadas, com abundante produção de paraqueratina entre as projeções superficiais (Figura 7). Observou-se intensa displasia epitelial envolvendo toda a espessura do epitélio e áreas de perda de integridade da membrana basal além de discreto infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subjacente (Figura 7C-D). Em amostras do grupo CCR5^{CEC} observou-se displasia epitelial envolvendo toda a espessura do epitélio, sem ruptura da membrana basal, caracterizando o desenvolvimento de CEC *in situ* (Figura 7G-H).

A análise histopatológica das lesões provenientes de animais CCR5^{CEC Treg} revelou a presença CEC indiferenciado caracterizado pela presença de disqueratose, intenso pleomorfismo celular e nuclear e ausência de produção de queratina (Figura 7I-J). Em amostras provenientes de animais CCR5^{CEC CD4+} observou-se a presença de lesão de CEC moderadamente diferenciado, com características intermediárias entre CCR5^{CEC} e CCR5^{CEC} ^{Treg} que se caracterizaram pela presença de cristas epiteliais alongadas com área de intensa displasia epitelial e formação de numerosos tampões de paraqueratina (Figura 7K-L). Nas amostras de animais CCR5^{CEC CD8+} observou-se o desenvolvimento de lesão papilomatosa apresentando hiperplasia epitelial e características de leve displasia epitelial (confinada às camadas basal e parabasal) além de moderado infiltrado inflamatório do tecido conjuntivo subjacente (Figura 7M-N).

Figura 7. Fotomicrografias de amostras de tecido após 35 semanas de carcinogênese química. As amostras de pele de animais controle WT^{Sham} (A-B), WT^{CEC} (C-D), $CCR5^{Sham}$ (E-F), $CCR5^{CEC}$ (G-H), $CCR5^{CEC}$ T^{reg} (I-J), $CCR5^{CEC}$ CD4+ (K-L) e $CCR5^{CEC}$ CD8+ (M-N) foram coletadas, processadas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Aumento de 5x (A, C,E, G, I, K e M); aumento de 40x (B, D, F, H, J, L e N).



4. Fenotipagem do infiltrado inflamatório isolado do microambiente tumoral

Para determinar o padrão celular presente no microambiente tumoral, leucócitos foram isolados das lesões de camundongos submetidos à carcinogênese química e da pele de animais do grupo controle (Sham). A análise foi realizada nas populações celulares com base em características de tamanho (FSC) e granularidade (SSC) e, permitiu determinar o número absoluto de células isoladas das amostras (Figuras 8-10).

Após 16 semanas de carcinogênese química, os dados demonstraram que animas WT^{CEC} (18,7 ± 7,21 x 10⁵) apresentaram maior número de leucócitos isolados das amostras, quando comparado com o grupo controle (WT^{Sham}) ($6,2 \pm 1,44 \times 10^5$) (Figura 8). Animais do grupo CCR5^{CEC} ($23,7 \pm 7,20 \times 10^5$) apresentaram número de leucócitos isolados das lesões significativamente maior que animais CCR5^{Sham} ($3,7 \pm 1,33 \times 10^5$), CCR5^{CEC Treg} ($6,2 \pm 1,44 \times 10^4$) e CCR5^{CEC CD4+} ($6,2 \pm 4,33 \times 10^4$) (Figura 8). No entanto, os animais WT^{CEC} ($18,7 \pm 7,21 \times 10^5$) e CCR5^{CEC ($23,7 \pm 7,20 \times 10^5$) apresentaram número similar de leucócitos isolados de lesões (Figura 8).}

Após 35 semanas de carcinogênese química, os resultados demonstraram diferenças significativas em relação ao número de leucócitos isolados das amostras de animais dos grupos WT^{CEC} (12,5 ± 8,0 x 10⁴) e WT^{Sham} (5,0 ± 0,75 x 10⁴) (Figura 8). Enquanto animais CCR5^{CEC} (54,0 ± 28,75 x 10⁵) apresentaram número de leucócitos significativamente maior quando comparado com os grupos CCR5^{Sham} (0,1 ± 0,05 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (13,1 ± 2,21 x 10⁵) (Figura 8). De modo relevante, número elevado de leucócitos foi isolado de amostras de animais dos grupos CCR5^{CEC Treg} (20,6 ± 3,95 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD8+} (49,1 ± 27,42 x 10⁵) quando comparado ao grupo CCR5^{Sham} (0,1 ± 0,05 x 10⁵) (Figura 8). Ademais, os resultados evidenciaram número de leucócitos significativamente maior comparado ao grupo CCR5^{Sham} (0,1 ± 0,05 x 10⁵) (Figura 8). Ademais, os resultados evidenciaram número de leucócitos significativamente maior nas lesões de animais CCR5^{CEC} (54,0 ± 28,75 x 10⁵) em comparação com animais WT^{CEC} (12,5 ± 8,0 x 10⁴) (Figura 8).



Figura 8. Análise de leucócitos no microambiente tumoral. Amostras de lesão e pele obtidas de camundongos WT^{Sham} , WT^{CEC} , $CCR5^{Sham}$, $CCR5^{CEC}$, $CCR5^{CEC Treg}$, $CCR5^{CEC CD4+}$, $CCR5^{CEC CD8+}$ foram submetidas à digestão enzimática, e os leucócitos isolados e analisados por citometria de fluxo. As colunas representam a média \pm SD do número de leucócitos totais isolados das lesões. Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. **P*< 0,05.

4.1. Análise de macrófagos, células mielóides e dendríticas após 16 semanas de carcinogênese química

A população de macrófagos, células mielóides e células dendríticas foi analisada nas amostras de pele e lesão por citometria de fluxo, através da análise da expressão dos marcadores de superfície F4/80, Gr1, CD11b, DC e CD11c.

Os resultados demonstraram aumento significativo no número de macrófagos (F4/80⁺) isolados das lesões de animais WT^{CEC} (82,7 ± 26,74 x 10⁴) em comparação com o grupo controle (WT^{sham}) (7,8 ± 8,23 x 10⁴) (Figura 9B). De modo semelhante, em lesões de animais CCR5^{CEC} (65,8 ± 24,4 x 10⁴), CCR5^{CEC Treg} (44,4 ± 3,00 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (31,6 ± 1,11 x 10⁴) observou-se aumento significativo no número de macrófagos em comparação com o grupo controle (CCR5^{Sham}) (0,42 ± 0,20 x 10⁴) (Figura 9B). No entanto, não houve diferença significativa em relação ao número de macrófagos isolados das lesões de animais WT^{CEC} (82,7 ± 26,74 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (65,8 ± 24,4 x 10⁴) (Figura 9B).

A análise de células mielóides (Gr1⁺CD11b⁺) que correspondem a precursores de macrófagos, células dendríticas e granulócitos com capacidade de suprimir a resposta imune antitumoral (PERANZONI et al., 2010; BAYNE et al., 2012), não demonstrou diferenças significativas em relação ao número de células isoladas das lesões de animais WT^{CEC} (26,0 ± 11,0 x 10⁴) e WT^{Sham} (8,3 ± 1,71 x 10⁴) (Figura 9D). De modo contrário, detectou-se diferenças significativas no número destas células isoladas das amostras do grupo CCR5^{CEC} (96,5 ± 6,68 x 10⁴) em relação ao grupo controle CCR5^{Sham} (9,8 ± 0,50 x 10⁴) (Figura 9D). Ademais, animais CCR5^{CEC} (96,5 ± 6,68 x 10⁴) apresentaram maior número de células mielóides isoladas das lesões quando comparado aos grupos WT^{CEC} (26,0 ± 11,0 x 10⁴), CCR5^{CEC Treg} (10,2 ± 0,70 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (32,5 ± 6,66 x 10⁴) (Figura 9D).

Em relação ao número de células dendríticas, os resultados evidenciaram menor número (P < 0,05) destas células isoladas das amostras do grupo controle WT^{Sham} (6,88 ± 0,50) quando comparado ao grupo WT^{CEC} (38,57 ± 0,65 x 10⁴) (Figura 9F). De modo semelhante, animais do grupo CCR5^{Sham} (9,1 ± 0,15 x 10⁴) apresentaram número significativamente menor de células dendríticas isoladas das amostras quando comparado ao grupo CCR5^{CEC} (76,4 ± 4,65 x 10⁴) (Figura 9F). Ademais, animais CCR5^{CEC} (76,4 ± 4,65 x 10⁴) (Figura 9F). Ademais, animais CCR5^{CEC} (76,4 ± 4,65 x 10⁴) apresentaram número significativamente maior de células dendríticas isoladas das lesões quando comparado aos grupos WT^{CEC} (38,57 ± 0,65 x 10⁴), CCR5^{CEC Treg} (19,9 ± 1,14 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (31,8 ± 1,01 x 10⁴) (Figura 9F).

4.2. Análise de macrófagos, células mielóides e dendríticas após 35 semanas de carcinogênese química

Os resultados demonstraram aumento significativo no número de macrófagos isolados de amostras de animais WT^{CEC} (74,5 ± 9,76 x 10⁴) em comparação com o grupo controle (WT^{sham}) (4,0 ± 3,80 x 10⁴) (Figura 9C). De modo contrário, não se detectou diferença significativa em relação ao número de macrófagos nas amostras de animais CCR5^{CEC} (51,7 ± 13,77 x 10⁴) e CCR5^{Sham} (9,10 ± 0,20 x 10⁴) (Figura 9C). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC} $^{CD4+}$ (43,8 ± 13,11 x 10⁴), os grupos CCR5^{CEC Treg} (207,4 ± 49,65 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (123,7 ± 37,55 x 10⁴) apresentaram aumento significativo no número de macrófagos quando comparado aos grupos CCR5^{Sham} (9,2 ± 0,20 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (51,7 ± 13,77 x 10⁴) (Figura 9C). No entanto, não houve diferença significativa no número de macrófagos isolados das lesões de animais CCR5^{CEC} (51,7 ± 13,77 x 10⁴) e WT^{CEC} (74,5 ± 9,76 x 10⁴) (Figura 9C).

A análise de células mielóides não demonstrou diferenças significativas em relação ao número de células isoladas das lesões de animais WT^{CEC} (51,7 ± 2,93 x 10⁴) e CCR5^{CEC}(55,8 ± 6,01 x 10⁴) em relação aos respectivos controles [WT^{Sham} (6,5 ± 3,81 x 10⁴) e CCR5^{Sham} (9,43 ± 0,49 x 10⁴)] (Figura 9E). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+} (14,9 ± 1,53 x 10⁴), observou-se número significativamente maior de células Gr1⁺CD11b⁺ isoladas de amostras dos grupos CCR5^{CEC Treg} (223,3 ± 47,69 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (106,1± 26,30 x 10⁴), quando comparado aos grupos CCR5^{Sham} (9,43 ± 0,49 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (55,8 ± 6,01 x 10⁴) (Figura 9E). Ademais, um número similar de células mielóides foi detectado nas lesões de animais WT^{CEC} (51,7 ± 2,93 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (55,8 ± 6,01 x 10⁴) (Figura 9E).

Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de células dendríticas isoladas das amostras de animais WT^{CEC} (44,9 ± 1,43 x 10⁴) e WT^{Sham} (5,2 ± 2,36 x 10⁴) (Figura 9G). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de células dendríticas nos grupos CCR5^{CEC} (42,2 ± 3,65 x 10⁴) e controle (CCR5^{Sham}) (9,1 ± 0,17 x 10⁴) (Figura 9G). Menor número de células dendríticas foi detectado em amostras dos grupos CCR5^{Sham} (9,1 ± 0,17 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (42,2 ± 3,65 x 10⁴) quando comparado aos animais do grupo CCR5^{CEC Treg} (156,8 ± 41,74 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (108,7 ± 48,92 x 10⁴) (Figura 9G). Contudo, o número de células dendríticas isolado das lesões foi semelhante entre os grupos WT^{CEC} (44,9 ± 1,43 x 10⁴), CCR5^{CEC} (42,2 ± 3,65 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (43,8 ± 13,11 x 10⁴) (Figura 9G).



Figura 9. Análise de macrófagos, células mielóides e dendríticas no microambiente tumoral. (A) A análise das populações foi realizada dentro de regiões específicas (R2) delimitada pelos parâmetros de FSC (tamanho) e SSC (granularidade). As colunas representam a média \pm SD do número de macrófagos (B-C), células mielóides (D-E) e células dendríticas (F-G). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *P< 0,05.

4.3. Análise de linfócitos após 16 semanas de carcinogênese química

A fenotipagem das populações de linfócitos demonstrou que animais WT^{CEC} (18,1 ± 0,38 x 10⁴) apresentaram número significativamente maior de células T CD3⁺CD4⁺ do que animais WT^{Sham} (2,8 ± 0,81 x 10⁴) (Figura 10B). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC} (11,4 ± 1,53 x 10⁴) apresentaram maior número de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ quando comparado aos grupos CCR5^{Sham} (0,9 ± 0,54 x 10⁴), CCR5^{CEC Treg} (2,1 ± 0,17 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (1,6 ± 0,10 x 10⁴) (Figura 10B). Embora animais do grupo WT^{CEC} (18,1 ± 0,38 x 10⁴) tenham apresentado maior número de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ quando comparado com animais do grupo CCR5^{CEC} (11,4 ± 1,53 x 10⁴), esta diferença não foi significativa (Figura 10B).

Em relação à população de linfócitos T CD8⁺, os resultados evidenciaram que animais do grupo WT^{CEC} apresentaram número significativamente maior de células T CD3⁺CD8⁺ (18,4±1,48 x 10⁴) quando comparado a animais do grupo controle (WT^{Sham}) (4,2 ± 0,42x 10⁴) (Figura 10D). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC} apresentaram maior número de linfócitos T CD8⁺ (8,9 ± 2,68 x 10⁴) em comparação com animais do grupo CCR5^{Sham} (2,2 ± 0,20 x 10⁴), porém esta diferença não foi significativa (Figura 10D). Ademais, os animais CCR5^{CEC Treg} (2,3 ± 0,06 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (3,6 ± 0,07 x 10⁴) apresentaram número de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ similar ao detectado no grupo CCR5^{Sham} (2,2 ± 0,20 x 10⁴) (Figura 10D). Embora sem significância, os resultados evidenciaram que animais do grupo WT^{CEC} (18,4± 1,48 x 10⁴) apresentaram maior número de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ isolados das lesões quando comparado com animais CCR5^{CEC} (8,9 ± 2,68 x 10⁴) (Figura 10D).

Em relação aos linfócitos B (CD19⁺), os dados demonstraram que animais WT^{CEC} (35,6 ± 3,65 x 10⁴) apresentaram número significativamente maior número de linfócitos B em comparação com animais WT^{Sham} (1,7 ± 0,99 x 10⁴) (Figura 10F). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC} (34,4± 9,76 x 10⁴) apresentaram número de linfócitos B significativamente maior em comparação com animais CCR5^{Sham} (1,0 ± 0,03 x 10⁴) (Figura 10F). Embora os animais CCR5^{CEC} T^{reg} (6,2 ± 0,24 x 10⁴) e CCR5^{CEC} CD4+</sup> (9,6 ± 0,06 x 10⁴) tenham apresentado menor número de linfócitos B do que animais CCR5^{CEC} (34,4 ± 9,76 x 10⁴), esta diferença não foi significativa (Figura 10F). Ademais, detectou-se número similar de linfócitos B nas lesões de animais WT^{CEC} (35,6 ± 3,65 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (34,4 ± 9,76 x 10⁴), (Figura 10F).

4.4. Análise de linfócitos após 35 semanas de carcinogênese química

Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ isolados das amostras de animais WT^{CEC} (12,3 ± 3,36 x 10⁴) e WT^{Sham} (2,3 ± 1,14 x 10⁴) (Figura 10C). De modo contrário, animais CCR5^{CEC} (41,8 ± 0,32 x 10⁴) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ em comparação com animais CCR5^{Sham} (1,4 ± 0,29 x 10⁴) (Figura 10C). Os animais CCR5^{CEC Treg} (37,1 ± 17,58 x 10⁴), CCR5^{CEC CD4+} (38,0 ± 3,30x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (21,5 ± 6,09 x 10⁴) também apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ em comparação com animais CCR5^{Sham} (1,4 ± 0,29 x 10⁴) (Figura 10C). No entanto, não foram observadas diferenças significativas quanto ao número de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ isolados de lesões de animais deficientes de CCR5 submetidos à carcinogênese química (Figura 10C). Os animais CCR5^{CEC} (41,8 ± 0,32 x 10⁴) também apresentaram número significativas quanto ao número de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ isolados de lesões de animais deficientes de CCR5 submetidos à carcinogênese química (Figura 10C). Os animais CCR5^{CEC} (41,8 ± 0,32 x 10⁴) também apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ isolados de lesões de animais deficientes de CCR5 submetidos à carcinogênese química (Figura 10C). Os animais CCR5^{CEC} (41,8 ± 0,32 x 10⁴) também apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ em relação ao grupo WT^{CEC} (12,3 ± 3,36 x 10⁴) (Figura 10C).

Animais WT^{CEC} (18,1 ± 1,90 x 10⁴) apresentaram número significativamente maior de células T CD3⁺CD8⁺ quando comparado com animais do grupo controle (WT^{Sham}) (3,0 ± 1,16 x 10⁴) (Figura 10E). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC} apresentaram maior número de linfócitos T CD8⁺ (8,9 ± 0,22 x 10⁴) em comparação com animais CCR5^{Sham} (2,1 ± 0,11 x 10⁴), no entanto, esta diferença não foi significativa (Figura 10E). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+} (5,4 ± 2,92 x 10⁴), animais dos grupos CCR5^{CEC Treg} (25,6 ± 3,08 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (19,6 ± 6,78 x 10⁴) apresentaram número de células T CD3⁺CD8⁺ significativamente maior ao detectado nas amostras do grupo CCR5^{Sham} (2,1 ± 0,11 x 10⁴) (Figura 10E). Ademais, os animais CCR5^{CEC (8,9 ± 0,22 x 10⁴)} apresentaram número de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ significativamente menor quando comparado com os grupos WT^{CEC} (18,1 ± 1,90 x 10⁴) e CCR5^{CEC Treg} (25,6 ± 3,08 x 10⁴) (Figura 10E).

Animais WT^{CEC} e WT^{Sham} apresentaram baixo número de linfócitos B (6,1 ± 4,38 x 10⁴) e (1,5 ± 1,38 x 10⁴) isolados das amostras (Figura 10G). De modo contrário, número significativamente maior de linfócitos B foi isolado das amostras de animais CCR5^{CEC} (22,6 ± 8,94 x 10⁴) quando comparado com animais CCR5^{Sham} (1,0 ± 0,03x 10⁴) (Figura 10G). Os resultados também mostraram número significativamente maior de células B nas lesões de animais CCR5^{CEC Treg} (38,3 ± 17,57x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (31,0 ± 3,73x 10⁴) em comparação com animais do grupo controle (CCR5^{Sham}) (1,0 ± 0,03x 10⁴), no entanto, esta diferença não foi significativa quando comparada com os animais do grupo CCR5^{CEC} (Figura 10G). Os resultados também evidenciaram um aumento significativo na proporção de linfócitos B nas lesões de animais CCR5^{CEC} (22,6 ± 8,94 x 10⁴) quando comparado com animais do grupo WT^{CEC} (6,1 ± 4,38 x 10⁴) (Figura 10G).



Figura 10. Análise de linfócitos no microambiente tumoral. (A) A análise das populações foi realizada dentro de regiões específicas (R1) delimitada pelos parâmetros de FSC (tamanho) e SSC (granularidade). As colunas representam a média \pm SD do número de linfócitos CD3⁺CD4⁺ (A-B), linfócitos CD3⁺CD8⁺ (C-D) e linfócitos CD19⁺ (E-F). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. **P*< 0,05.

5. Fenotipagem de linfócitos T no microambiente tumoral

Uma vez caracterizado o infiltrado inflamatório, avaliou-se, por citometria, o perfil de expressão de moléculas de superfície CD62L, CD25, CD45RB E CD152 e intracelulares MIP-1 β e Foxp3 em linfócitos T CD4⁺ isolados das lesões de camundongos submetidos à carcinogênese química e da pele de animais do grupo controle (Sham) (Figuras 11 e 12).

5.1. Fenotipagem de linfócitos T CD4⁺ após 16 semanas de carcinogênese química

Em relação à expressão de CD62L, uma molécula relacionada à capacidade de migração de linfócitos, os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺CD62L⁺ isolados das lesões de animais WT^{CEC} (3,2 ± 0,29 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (8,2 ± 0,66 x 10⁴) quando comparado com os respectivos controles [WT^{sham} (1,1 ± 0,13 x 10⁴) e CCR5^{Sham} (3,0 ± 2,19 x 10⁴)](Figura 11A). De modo contrário, animais CCR5^{CEC} apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺CD62L⁺ (8,2 ± 0,66 x 10⁴) quando comparado com animais CCR5^{CEC} T^{reg} (1,1 ± 0,22 x 10⁴) (Figura 11A). Os resultados evidenciaram que animais do grupo CCR5^{CEC} (8,2 ± 0,66 x 10⁴) apresentaram maior número de linfócitos T CD4⁺CD62L⁺ isolados das lesões quando comparado com o grupo WT^{CEC} (3,2 ± 0,29 x 10⁴), porém, esta diferença não foi significativa (Figura 11A).

Em relação ao número de células T $CD4^+CD25^+$, os dados evidenciaram número significativamente maior destes linfócitos em amostras do grupo WT^{CEC} (5,4 ± 0,53 x 10⁴) quando comparado ao grupo controle (WT^{Sham}) (0,5 ± 0,19 x 10⁴) (Figura 11C). De modo semelhante, animais $CCR5^{CEC}$ (8,6 ± 0,93 x 10⁴) e $CCR5^{CEC \ CD4+}$ (5,3 ± 0,45 x 10⁴) apresentaram maior número de linfócitos T $CD4^+CD25^+$ quando comparado com animais do grupo $CCR5^{Sham}$ (0,3 ± 0,23 x 10⁴) (Figura 11C). Ademais, animais $CCR5^{CEC}$ (8,6 ± 0,93 x 10⁴) apresentaram maior número de linfócitos T $CD4^+CD25^+$ em relação aos animais $CCR5^{CEC \ Treg}$ (0,5 ± 0,07 x 10⁴) (Figura 11C). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas no número de linfócitos T $CD4^+CD25^+$ isolados das amostras de animais $CCR5^{CEC}$ e WT^{CEC} .

As células T CD4⁺CD45RB⁺ (memória) foram detectadas em proporções significativamente maiores nas lesões de animais WT^{CEC} (9,8 ± 4,37 x 10⁴) quando comparado aos animais WT^{Sham} (0,8 ± 0,06 x 10⁴) (Figura 11E). De modo contrário, o número destas células foi similar em lesões de animais CCR5^{CEC} (4,8 ± 0,42 x 10⁴) em relação aos

grupos CCR5^{Sham} (2,3 ± 0,40 x 10⁴), CCR5^{CEC Treg} (0,8 ± 0,07 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (2,7 ± 0,11 x 10⁴) (Figura 11E). Além disso, os resultados evidenciaram maior número de linfócitos T CD4⁺CD45RB⁺ nas lesões de animais WT^{CEC} (9,8 ± 4,37 x 10⁴) em comparação com o grupo CCR5^{CEC} (4,8 ± 0,42 x 10⁴), porém esta diferença não foi significativa (Figura 11E).

Baixo número de linfócitos T CD4⁺CD152⁺ foi detectado em amostras de animais WT^{CEC} (3,2 ± 1,77 x 10⁴) e WT^{Sham} (1,0 ± 0,03 x 10⁴) (Figura 11G). Similar número de linfócitos T CD4⁺CD152⁺ foi detectado em amostras do grupo CCR5^{CEC} (3,4 ± 1,46 x 10⁴) quando comparado com o grupo controle (CCR5^{Sham}) (0,4 ± 0,06 x 10⁴) (Figura 11G). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺CD152⁺ isolados das lesões de animais CCR5^{CEC Treg} (0,9 ± 0,06 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (3,0 ± 0,11x 10⁴) em relação aos grupos CCR5^{Sham} (0,4 ± 0,06 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (3,0 ± 0,11x 10⁴) em relação aos grupos CCR5^{Sham} (0,4 ± 0,06 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (3,4 ± 1,46 x 10⁴) (Figura 11G). Ademais, número similar de células T CD4⁺CD152⁺ foi detectado nas amostras de animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC} (Figura 11G).

A análise da expressão de CCL4 (MIP-1 β) por linfócitos T CD4⁺ evidenciou maior número (P < 0,05) de células positivas para essa quimiocina em amostras de animais dos grupos WT^{CEC} (7,4 ± 0,29 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (8,6 ± 0,40 x 10⁴) quando comparado com os respectivos controles [WT^{sham} (0,2 ± 0,07x 10⁴) e CCR5^{Sham} (1,0 ± 0,11 x 10⁴)] (Figura 12A). Animais CCR5^{CEC Treg} (6,0 ± 0,07 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (7,1 ± 0,14 x 10⁴) apresentaram maior número de células T CD4⁺CCL4⁺ quando comparado com animais do grupo controle (CCR5^{Sham}) (1,0 ± 0,11 x 10⁴), porém, esta diferença não foi significativa (Figura 12A). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺CCL4⁺ isolados das lesões de animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC}.

Em relação à expressão de Foxp3, observou-se que animais WT^{CEC} (7,2 ± 1,52 x 10⁴) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺ expressando este marcador quando comparado com animais WT^{Sham} (0,7 ± 0,16 x 10⁴) (Figura 12C). Embora os animais CCR5^{CEC}(2,9 ± 1,38 x 10⁴) tenham apresentado maior número de linfócitos TCD4⁺Foxp3⁺ em relação ao grupo CCR5^{Sham} (0,6 ± 0,25 x 10⁴), esta diferença não foi significativa (Figura 12C). Animais CCR5^{CEC Treg} (6,0 ± 0,07 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (7,1 ± 0,14 x 10⁴) apresentaram maior número de células T CD4⁺Foxp3⁺ quando comparado com animais CCR5^{CEC} (2,9 ± 1,38 x 10⁴), porém, esta diferença não foi significativa (Figura 12C). Ademais, animais WT^{CEC} apresentaram maior número (P < 0,05) de células T CD4⁺Foxp3⁺ em relação aos animais CCR5^{CEC} (Figura 12C).
5.2. Fenotipagem de linfócitos T CD4⁺ após 35 semanas de carcinogênese química

Os resultados não mostraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺CD62L⁺ nas lesões de animais WT^{CEC} ($3,9 \pm 2,51 \times 10^4$) e CCR5^{CEC} ($4,2 \pm 2,16 \times 10^4$) quando comparado com os respectivos controles WT^{Sham} ($3,4 \pm 2,51 \times 10^4$) e CCR5^{Sham} ($2,2 \pm 0,31 \times 10^4$) (Figura 11B). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC Treg} ($11,1 \pm 7,94 \times 10^4$) e CCR5^{CEC CD8+} ($11,2 \pm 2,60 \times 10^4$), observou-se número significativamente maior de células T CD4⁺CD62L⁺ nas lesões de animais CCR5^{CEC CD4+} ($14,9 \pm 8,71 \times 10^4$) em comparação com animais CCR5^{Sham} ($2,2 \pm 0,31 \times 10^4$) e CCR5^{Sham} ($2,2 \pm 0,31 \times 10^4$) (Figura 11B).

Baixo número de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ foi detectado nas amostras de animais dos grupos WT^{CEC} (4,9 ± 0,49 x 10⁴) e WT^{Sham} (1,9 ± 1,85 x 10⁴) (Figura 11D). Resultados similares também foram observados entre animais CCR5^{Sham} (2,2 ± 0,30 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (4,3 ± 2,82 x 10⁴) (Figura 11D). Ao contrário, dos animais CCR5^{CEC Treg} (10,8 ± 5,31 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (6,1 ± 1,93 x 10⁴), o grupo CCR5^{CEC CD4+} (21,4 ± 4,80 x 10⁴) apresentou número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ quando comparado aos grupos CCR5^{Sham} (2,2 ± 0,30 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (4,3 ± 2,82x 10⁴) (Figura 11D). Ademais, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ isolados das lesões de animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC}.

O número de linfócitos T CD4⁺CD45RB⁺ isolados das amostras de animais WT^{CEC} (5,5 ± 0,32 x 10⁴) foi similar ao encontrado em animais WT^{Sham} (5,6 ± 0,87 x 10⁴) (Figura 11F). De modo contrário, animais CCR5^{CEC} (17,2 ± 4,49 x 10⁴) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺ expressando CD45RB em comparação com animais CCR5^{Sham} (2,4 ± 0,56 x 10⁴) (Figura 11F). Embora animais CCR5^{CEC Treg} (12,8 ± 0,59 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (12,0 ± 0,08 x 10⁴) tenham apresentado alto número de células T CD4⁺CD45RB⁺, apenas os animais CCR5^{CEC CD8+} (17,5 ± 0,67 x 10⁴) apresentaram aumento significativo destas células em relação aos animais CCR5^{Sham} (2,4 ± 0,56 x 10⁴) (Figura 11F). Os resultados evidenciaram maior número de linfócitos T CD4⁺CD45RB⁺ nos animais CCR5^{CEC} em comparação com o grupo WT^{CEC}, porém, esta diferença não foi significativa (Figura 11E).

Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T $CD4^+CD152^+$ isolados das amostras de animais WT^{CEC} (5,7 ± 1,14 x 10⁴) e

CCR5^{CEC} (11,9 \pm 0,22 x 10⁴) quando comparados com seus respectivos controles [WT^{Sham} (4,0 \pm 1,15 x 10⁴) e CCR5^{Sham} (2,2 \pm 0,25 x 10⁴)] (Figura 11H). No entanto, observou-se que animais CCR5^{CEC CD4+} (22,7 \pm 8,68 x 10⁴) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺CD152⁺ do que animais CCR5^{Sham} (2,2 \pm 0,25 x 10⁴), porém esta diferença não permaneceu significativa em relação ao grupo CCR5^{CEC} (11,9 \pm 0,22 x 10⁴) (Figura 11H). Ademais, detectou-se número similar de linfócitos T CD4⁺CD152⁺ isolados das amostras de animais CCR5^{CEC Treg} (11,5 \pm 3,90 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (12,6 \pm 3,43 x 10⁴) quando comparados ao grupo CCR5^{CEC} (11,9 \pm 0,22 x 10⁴) (Figura 11H). Além disso, os resultados não evidenciaram diferença significativa em relação ao número de linfócitos T CD4⁺CD152⁺ isolados das lesões de animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC} (Figura 11H).

A análise da expressão de CCL4 por linfócitos T CD4⁺ evidenciou maior número de células expressando esta quimiocina em amostras de animais dos grupos WT^{CEC} (13,2 ± 4,94 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (8,8 ± 3,02 x 10⁴) quando comparado com os respectivos controles [WT^{sham} (0,4 ± 0,14 x 10⁴) e CCR5^{Sham} (0,4 ± 0,11 x 10⁴)], porém, esta diferença não foi significativa (Figura 12B). Embora animais CCR5^{CEC CD4+} (29,1 ± 4,16 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (25,1 ± 0,12 x 10⁴) tenham apresentado maior número de células T CD4⁺CCL4⁺ quando comparado aos animais do grupo controle (CCR5^{Sham}), apenas animais CCR5^{CEC Treg} (57,1 ± 15,23 x 10⁴) apresentaram valores significativamente maiores em relação aos animais CCR5^{Sham} e CCR5^{CEC} (Figura 12B). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺CL4⁺entre os grupos WT^{CEC} e CCR5^{CEC} (Figura 12B).

A análise da expressão de Foxp3 em linfócitos T CD4⁺ mostrou que animais WT^{CEC} (5,4 \pm 0,65 x 10⁴) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺ expressando este marcador comparado com animais WT^{Sham} (0,6 \pm 0,04 x 10⁴) (Figura 12D). De modo contrário, animais CCR5^{CEC} apresentaram baixo número de células T CD4⁺Foxp3⁺ (1,5 \pm 0,54 x 10⁴), similar ao observado no grupo CCR5^{Sham} (1,6 \pm 0,78 x 10⁴) (Figura 12D). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+} (1,4 \pm 1,13 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (5,8 \pm 1,91 x 10⁴), os animais CCR5^{CEC Treg} (10,3 \pm 6,30 x 10⁴) apresentaram número significativamente maior de células T CD4⁺Foxp3⁺ em relação aos grupos CCR5^{Sham} e CCR5^{CEC} (Figura 12D). Animais WT^{CEC} apresentaram maior número de células T CD4⁺Foxp3⁺ do que os animais CCR5^{CEC, CEC, porém, esta diferença não foi significativa (Figura 12C).}



Figura 11. Fenotipagem de linfócitos T $CD4^+$ no microambiente tumoral. Os linfócitos isolados da lesão foram analisados quanto à expressão de CD62L (A-B), CD25L (C-D), CD45RB (E-F), CD152 (G-H) por citometria de fluxo. Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. **P*< 0,05.



Figura 12. Fenotipagem de linfócitos T $CD4^+$ no microambiente tumoral. Os linfócitos isolados da lesão foram analisados quanto à expressão de CCL4 (A-B) e Foxp3 (C-D). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. **P*< 0,05.

5.3. Fenotipagem de linfócitos T CD8⁺ após 16 semanas de carcinogênese química

Os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de T $CD8^+CD62L^+$ isoladas das amostras de animais WT^{CEC} (3,4 ± 0,49 x 10⁴) e WT^{Sham} (1,4 ± 0,53 x 10⁴) (Figura 13A). De modo contrário, animais $CCR5^{CEC}$ apresentaram número significativamente maior de linfócitos T $CD8^+CD62L^+$ (19,5 ± 5,44 x 10⁴) quando comparado com animais $CCR5^{CEC}$ Sham (0,6 ± 0,05 x 10⁴) (Figura13A). Ademais, os animais $CCR5^{CEC}$ apresentaram maior número de linfócitos T $CD8^+CD62^+$ (P < 0,05) em relação aos grupos $CCR5^{CEC}$ Treg (4,4 ± 0,48x 10⁴), $CCR5^{CEC}$ CD4+ (1,2 ± 0,23 x 10⁴) e WT^{CEC} (3,4 ± 0,49 x 10⁴) (Figura 13A).

Os dados mostraram número similar de linfócitos T CD8⁺CD25⁺ em amostras dos grupos WT^{CEC} (6,0 ± 0,08 x 10⁴) e WT^{Sham} (1,2 ± 0,14 x 10⁴) (Figura 13C). De modo contrário, animais do grupo CCR5^{CEC} (23,2 ± 5,55 x 10⁴) apresentaram maior número de linfócitos T CD8⁺CD25⁺ (P < 0,05) quando comparado com animais CCR5^{Sham} (0,2 ± 0,01 x 10⁴) (Figura 13C). Os resultados também demonstraram maior proporção de linfócitos T CD8⁺CD25⁺ nas lesões de animais CCR5^{CEC Treg} (15,4 ± 0,47x 10⁴) em comparação com animais CCR5^{Sham} (Figura 13C). Ademais, animais CCR5^{CEC} (23,2 ± 5,55 x 10⁴) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺ expressando CD25 do que animais WT^{CEC} (6,0 ± 0,08 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (2,4 ± 0,56 x 10⁴) (Figura 13C).

As células T CD8⁺CD45RB⁺ foram detectadas em número significativamente maior nas amostras de animais WT^{CEC} (12,3 ± 0,34 x 10⁴) quando comparado aos animais WT^{Sham} (2,2 ± 0,34 x 10⁴) (Figura 13E). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC} (33,5 ± 9,04 x 10⁴) e CCR5^{CEC Treg} (14,2 ± 0,24 x 10⁴) apresentaram maior número de linfócitos T CD8⁺CD45RB⁺ quando comparados com o grupo controle (CCR5^{Sham}) (1,0 ± 0,06 x 10⁴) (Figura 13E). Os resultados evidenciaram um número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺ e CCR5^{CEC CD4+} (5,2 ± 0,31 x 10⁴) (Figura 13E).

Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD8⁺CD152⁺ isolados das amostras de animais WT^{CEC} ($6,2 \pm 0,34 \times 10^4$) e WT^{Sham} ($1,2 \pm 0,32 \times 10^4$) (Figura 13G). De modo contrário, o número de linfócitos T CD8⁺CD152⁺ foi estatisticamente maior em amostras do grupo CCR5^{CEC} ($32,3 \pm 0,41 \times 10^4$) quando comparado com o grupo CCR5^{Sham} ($5,2 \pm 0,23 \times 10^4$) (Figura 13G). Observou-se

ainda que, animais CCR5^{CEC} também apresentaram maior número de linfócitos T CD8⁺ expressando CD152 quando comparado com animais WT^{CEC}, CCR5^{CEC Treg} ($9,3 \pm 0,44 \times 10^4$) e CCR5^{CEC CD4+} ($3,0 \pm 0,01 \times 10^4$) (Figura 13G).

O número de linfócitos T CD8⁺CCL4⁺ isolados das lesões de animais WT^{CEC} (13,2 ± 0,32 x 10⁴) não foi significativamente maior ao isolado de animais WT^{Sham} (8,2 ± 0,25 x 10⁴) (Figura 14A). De modo contrário, o número de linfócitos T CD8⁺ expressando CCL4 foi maior (P < 0,05) em amostras do grupo CCR5^{CEC} (30,3 ± 0,42 x 10⁴) quando comparado com o grupo CCR5^{Sham} (2,1 ± 0,20 x 10⁴) (Figura 14A). Aumento no número destas células também foi detectado nas lesões de animais CCR5^{CEC Treg} (39,1 ± 0,19 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (44,3 ± 0,41 x 10⁴), quando comparado com animais do grupo controle (CCR5^{Sham}), no entanto, não se observou diferença significativa em relação aos animais do grupo CCR5^{CEC} (Figura 14A).

Baixo número de linfócitos T CD8⁺Foxp3⁺ foi isolado das amostras de animais WT^{CEC} $(7,1 \pm 1,82 \times 10^4)$ e WT^{Sham} $(1,1 \pm 0,23 \times 10^4)$ (Figura 14C). O número de linfócitos T CD8⁺Foxp3⁺ foi similar em amostras dos grupos CCR5^{CEC} $(3,4 \pm 0,92 \times 10^4)$ e CCR5^{Sham} $(1,5 \pm 0,92 \times 10^4)$ (Figura 14C). De modo semelhante, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD8⁺Foxp3⁺ isolados das lesões de animais CCR5^{CEC Treg} $(4,9 \pm 2,74 \times 10^4)$ e CCR5^{CEC CD4+} $(1,9 \pm 1,54 \times 10^4)$ em relação ao grupo CCR5^{Sham} (Figura 14C).

5.4. Fenotipagem de linfócitos T CD8⁺ após 35 semanas de carcinogênese química

Após 35 semanas, não foram observadas diferenças significativas em relação ao número de células T CD8⁺CD62L⁺ isoladas das amostras de animais WT^{CEC} (4,9 ± 1,35 x 10⁴) e WT^{Sham} (2,5 ± 0,70 x 10⁴) (Figura 13B). De modo contrário, animais do grupo CCR5^{CEC} (12,5 ± 0,27 x 10⁴) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺CD62L⁺ em relação ao grupo controle (CCR5^{Sham}) (3,2 ± 0,27 x 10⁴) (Figura 13B). Ao contrário dos animais do grupo CCR5^{CEC CD4+} (10,4 ± 6,78 x 10⁴), os grupos CCR5^{CEC Treg} (1,6 ± 0,54 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (1,7 ± 0,08 x 10⁴) apresentaram menor número de linfócitos T CD8⁺CD62L⁺ quando comparados com animais CCR5^{CEC} (Figura 13B). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD8⁺

Em relação ao número de células T CD8⁺CD25⁺, os dados demonstraram similar número destes linfócitos em amostras dos grupos WT^{CEC} ($0,8 \pm 0,60 \ge 10^4$) e WT^{Sham} ($0,8 \pm 0,12 \ge 10^4$) (Figura 13D). O número de linfócitos T CD8⁺CD25⁺ também foi similar em amostras dos grupos CCR5^{CEC} ($1,5 \pm 0,36 \ge 10^4$) e CCR5^{Sham} ($3,3 \pm 0,36 \ge 10^4$) (Figura 13D). De modo semelhante, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD8⁺CD25⁺ isolados das lesões de animais CCR5^{CEC Treg} ($1,1 \pm 0,49 \ge 10^4$), CCR5^{CEC CD4+} ($2,1 \pm 1,57 \ge 10^4$) e CCR5^{CEC CD8+} ($1,0 \pm 0,10 \ge 10^4$) em relação ao grupo CCR5^{Sham} (Figura 13D).

O número de linfócitos T CD8⁺CD45RB⁺ foi similar em amostras de animais WT^{CEC} (10,5 ± 4,44 x 10⁴) e WT^{Sham} (5,3 ± 3,21 x 10⁴) (Figura 13F). De modo contrário, as células T CD8⁺CD45RB⁺ foram detectadas em proporções significativamente maiores nas lesões de animais CCR5^{CEC} (28,5 ± 7,35 x 10⁴) quando comparado com animais CCR5^{Sham} (5,2 ± 0,34 x 10⁴) (Figura 13F). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC Treg} (8,6 ± 2,68 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (14,4 ± 0,34 x 10⁴), animais CCR5^{CEC CD4+} (6,3 ± 2,13 x 10⁴) apresentaram número significativamente menor de linfócitos expressando CR45RB quando comparado com animais CCR5^{CEC} (Figura 13F). Os resultados evidenciaram maior número de linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RB isolados das lesões de animais CCR5^{CEC} em comparação com o grupo WT^{CEC}, porém, este aumento não foi significativo (Figura 13F).

Em relação à expressão de CD152⁺, os resultados evidenciaram número similar de linfócitos T CD8⁺ expressando este marcador em amostras de animais WT^{CEC} (2,4 ± 1,51 x 10⁴) e WT^{Sham} (3,2 ± 1,91 x 10⁴) (Figura 13H). De modo contrário, observou-se número significativamente maior de células T CD8⁺CD152⁺ em amostras de animais CCR5^{CEC} (15,2± 5,32 x 10⁴) quando comparado com o grupo controle (CCR5^{Sham}) (2,3 ± 0,40 x 10⁴) (Figura 13H). No entanto, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD8⁺CD152⁺ isolados das lesões de animais CCR5^{CEC Treg} (3,5 ± 2,08 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (8,3 ± 4,54 x 10⁴) em relação ao grupo CCR5^{Sham} (Figura 13H). O número de linfócitos T CD4⁺CD152⁺ isolado das lesões de animais CCR5^{CEC CD4+} (8,3 ± 4,54 x 10⁴) em relação ao grupo CCR5^{Sham} (Figura 13H). O número de linfócitos T CD4⁺CD152⁺ isolado das lesões de animais CCR5^{CEC CD8+}.

A análise da expressão de CCL4 por linfócitos T CD8⁺ mostrou maior número de células expressando esta quimiocina em amostras de animais do grupo WT^{CEC} (17,1 ± 2,71 x 10⁴) quando comparado com o grupo controle (WT^{sham}) (12,2± 4,43 x 10⁴), porém, esta diferença não foi significativa (Figura 14B). As células T CD8⁺CCL4⁺ foram detectadas em

proporções significativamente maiores nas amostras de animais CCR5^{CEC} ($36,9 \pm 18,82 \times 10^4$) e CCR5^{CEC CD4+} ($42,2 \pm 7,55 \times 10^4$) quando comparado com os animais CCR5^{Sham} ($1,0\pm 0,10 \times 10^4$) (Figura 14B). Ao contrário do grupo CCR5^{CEC CD8+} ($10,9 \pm 1,14 \times 10^4$), o grupo CCR5^{CEC Treg} ($84,3 \pm 9,63 \times 10^4$) apresentou número estatisticamente superior de linfócitos T CD8⁺CCL4⁺ quando comparado aos grupos CCR5^{Sham} e CCR5^{CEC} (Figura 14B). Embora os resultados tenham evidenciado maior número de linfócitos T CD8⁺ expressando CCL4 nas lesões de animais CCR5^{CEC} em comparação com o grupo WT^{CEC}, este aumento não foi significativo.

A análise da expressão de Foxp3 mostrou que, similarmente aos animais WT^{Sham} (1,8 $\pm 2,04 \ge 10^4$), os animais WT^{CEC} (1,1 $\pm 1,16 \ge 10^4$) apresentaram baixo número de linfócitos T CD8⁺Foxp3⁺ (Figura 14D). De modo contrário, animais CCR5^{CEC} (81,1 $\pm 6,94 \ge 10^4$) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺Foxp3⁺ em relação ao grupo controle (CCR5^{Sham}) (1,8 $\pm 0,90 \ge 10^4$) (Figura 14D). Os resultados também evidenciaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD8⁺Foxp3⁺ isolados das amostras de animais CCR5^{CEC} quando comparado aos grupos WT^{CEC} (1,1 $\pm 1,16 \ge 10^4$), CCR5^{CEC Treg} (1,1 $\pm 1,46 \ge 10^4$), CCR5^{CEC CD4+} (2,1 $\pm 1,79 \ge 10^4$) e CCR5^{CEC CD8+} (0,9 $\pm 0,75 \ge 10^4$) (Figura 14D).



Figura 13. Fenotipagem de linfócitos T CD8⁺ **no microambiente tumoral.** Os linfócitos isolados da lesão foram analisados quanto à expressão de CD62L (A-B), CD25L (C-D), CD45RB (E-F), CD152 (G-H). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *P< 0,05.



Figura 14. Fenotipagem de linfócitos T CD8⁺ no microambiente tumoral. Os linfócitos isolados da lesão foram analisados quanto à expressão de CCL4 (A-B) e Foxp3 (C-D). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *P< 0,05.

6. Fenotipagem de células T reguladoras - T CD4⁺Foxp3⁺ - no microambiente tumoral

O recrutamento de células T reguladoras (T CD4⁺Foxp3⁺), conhecidas pelo seu potencial supressor é um dos principais mecanismos responsáveis pela inibição da resposta imune antitumoral (SAKAGUCHI; POWRIE, 2007; NISHIKAWA; SAKAGUCHI, 2010). Devido à importância destas células nos mecanismos envolvidos com o escape e progressão de tumores, avaliamos o perfil de expressão de moléculas de superfície empregadas na caracterização de células T reguladoras (CD45RA, CD45RB, CD62L, CD69 e CD154) por citometria de fluxo (Figura 15).

6.1. Fenotipagem de células T reguladoras após 16 semanas de carcinogênese química

O número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RA⁺ foi similar em amostras de animais WT^{CEC} (4,3 ± 0,79 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (2,2 ± 0,23 x 10⁴) (Figura 15A). Embora os resultados tenham evidenciado maior número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RA⁺ nas lesões de animais CCR5^{CEC} (2,2 ± 0,23 x 10⁴) em comparação com os grupos CCR5^{CEC Treg} (0,3± 0,03 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (0,6 ± 0,20 x 10⁴), este número não foi significativo (Figura 15A). Ademais, detectou-se menor número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RA⁺ nas lesões de animais CCR5^{CEC Treg} quando comparado com o grupo WT^{CEC}.

A análise da expressão de CD45RB mostrou que, similarmente aos animais WT^{CEC} ($5,8 \pm 1,56 \times 10^4$), animais CCR5^{CEC} ($1,2 \pm 0,27 \times 10^4$) apresentaram baixo número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RB⁺ (Figura 15C). De modo semelhante, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RB⁺ isolados das lesões de animais CCR5^{CEC Treg} ($0,4 \pm 0,07 \times 10^4$) e CCR5^{CEC CD4+} ($0,6 \pm 0,40 \times 10^4$) quando comparados ao grupo CCR5^{CEC} ($1,2 \pm 0,27 \times 10^4$) (Figura 15C). No entanto, os resultados evidenciaram menor número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RB⁺ em amostras do grupo CCR5^{CEC Treg} quando comparado com o grupo WT^{CEC} (Figura 15C).

Baixo número de linfócitos T $CD4^+Foxp3^+CD62L^+$ foi isolado das amostras de animais WT^{CEC} (4,3 ± 0,61 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (2,1 ± 0,22 x 10⁴) (Figura 15E). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC} CD4+</sup> (0,6 ± 0,26 x 10⁴), o grupo CCR5^{CEC} Treg (0,3 ± 0,02 x 10⁴)

apresentou número significativamente menor de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD62L⁺ quando comparado com os grupos CCR5^{CEC} e WT^{CEC} (Figura 15E).

Os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD69⁺ isolados das lesões de animais WT^{CEC} (4,2 ± 1,00 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (1,3 ± 0,31 x 10⁴) (Figura 15G). Embora os resultados tenham evidenciado maior número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD69⁺ em amostras de animais CCR5^{CEC} (1,3 ± 0,31 x 10⁴) em comparação com os grupos CCR5^{CEC Treg} (0,2 ± 0,07 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (0,5 ± 0,11 x 10⁴), este resultado não foi significativo (Figura 15G). No entanto, os resultados evidenciaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD69⁺ em amostras do grupo WT^{CEC} quando comparado com os grupos CCR5^{CEC Treg} e CCR5^{CEC CD4+} (Figura 15G).

O número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD4154⁺ foi similar em amostras de animais WT^{CEC} (4,5 ± 1,09 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (2,2 ± 0,18 x 10⁴) (Figura 15I). De modo semelhante, os resultados não mostraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD154⁺ isolados das amostras de animais CCR5^{CEC Treg} (0,3 ± 0,18 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (0,5± 0,16 x 10⁴) em relação ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 15C). No entanto, os resultados evidenciaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD69⁺ no grupo WT^{CEC} quando comparado com os grupos CCR5^{CEC Treg} e CCR5^{CEC CD4+} (Figura 15G).

6.2. Fenotipagem de células T reguladoras após 35 semanas de carcinogênese química

Os resultados mostraram que animais WT^{CEC} (5,4 ± 0,67 x 10⁴) apresentaram maior número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RA⁺ quando comparado ao grupo CCR5^{CEC} (1,7 ± 0,45 x 10⁴), porém, esta diferença não foi significativa (Figura 15B). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+} (0,4 ± 0,25 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (3,6 ± 1,30 x 10⁴), os animais do grupo CCR5^{CEC Treg} (15,9 ± 0,22 x 10⁴) apresentaram maior número (*P* < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RA⁺ quando comparado com o grupo CCR5^{CEC} (Figura 15B). Os dados também demonstraram número significativamente maior de células T CD4⁺Foxp3⁺CD45RA⁺ em amostras de animais WT^{CEC} quando comparado com o grupo CCR5^{CEC CD4+}.

Os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RB⁺ isolados das lesões de animais WT^{CEC} ($5,4 \pm 0,73 \times 10^4$) e CCR5^{CEC} ($1,7 \pm 0,56 \times 10^4$) (Figura 15D). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+} ($0,6 \pm 0,16$

x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (3,3 ± 0,53 x 10⁴), os animais do grupo CCR5^{CEC Treg} (15,8 ± 0,51 x 10⁴) apresentaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RB⁺ quando comparado com os grupos CCR5^{CEC} e WT^{CEC} (Figura 15D). Ademais, detectou-se número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RB⁺ em amostras do grupo WT^{CEC} em relação ao grupo CCR5^{CEC CD4+} (Figura 15G).

Baixo número de células T $CD4^{+}Foxp3^{+}CD62L^{+}$ foi detectado em amostras de animais WT^{CEC} (5,6 ± 0,69 x 10⁴) e $CCR5^{CEC}$ (1,7 ± 0,49 x 10⁴) (Figura 15F). Ao contrário dos animais $CCR5^{CEC CD4+}$ (0,6 ± 0,27 x 10⁴) e $CCR5^{CEC CD8+}$ (3,3 ± 1,22 x 10⁴), o grupo $CCR5^{CEC Treg}$ (15,6 ± 0,43 x 10⁴) apresentou número significativamente maior de linfócitos T $CD4^{+}Foxp3^{+}CD62L^{+}$ quando comparado com os grupos $CCR5^{CEC}$ e WT^{CEC} (Figura 15F).Os resultados também evidenciaram menor número (P < 0,05) de linfócitos T $CD4^{+}Foxp3^{+}CD62L^{+}$ isolados de amostras do grupo $CCR5^{CEC CD4+}$ quando comparado com o grupo WT^{CEC} (Figura 15F).

Os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD69⁺ isolados das lesões de animais WT^{CEC} (5,5 ± 0,65 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (1,6 ± 0,54 x 10⁴) (Figura 15H). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+} (0,3 ± 0,18 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (4,8 ± 2,10 x 10⁴), os animais do grupo CCR5^{CEC Treg} (15,6 ± 0,55 x 10⁴) apresentaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD69⁺ quando comparado com os grupos CCR5^{CEC} e WT^{CEC} (Figura 15H). Ademais, detectou-se menor número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD69⁺ em amostras do grupo CCR5^{CEC CD4+} quando comparado com o grupo WT^{CEC} (Figura 15H).

O número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD154⁺ foi similar nas lesões de animais WT^{CEC} ($5,4 \pm 0,83 \times 10^4$) e CCR5^{CEC} ($1,6 \pm 0,51 \times 10^4$) (Figura 15J). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+} ($0,5 \pm 0,35 \times 10^4$) e CCR5^{CEC CD8+} ($4,3 \pm 2,14 \times 10^4$), o grupo CCR5^{CEC Treg} ($16,8 \pm 1,43 \times 10^4$) apresentou número significativamente menor de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD62L⁺ quando comparado com os grupos CCR5^{CEC} e WT^{CEC} (Figura 15J). Os resultados também evidenciaram menor número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD62L⁺ em amostras do grupo CCR5^{CEC CD4+} quando comparado com o grupo WT^{CEC} (Figura 15J).



Figura 15. Fenotipagem de células T reguladoras no microambiente tumoral. Os linfócitos isolados de lesões foram analisados quanto à expressão de (A-B) CD45RA, (C-D) CD45RB, (E-F) CD62L, (G-H) CD69 e (I-J) CD154. Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *P< 0,05.

7. Expressão de marcadores constitutivos ou relacionados com a atividade supressora de células T reguladoras

Avaliou-se também o perfil de expressão de moléculas constitutivas (GITR e CD103) ou relacionadas com atividade supressora (LAG-3, CTLA-4 e PD-1) das células T reguladoras (T CD4⁺Foxp3⁺) isoladas de lesões de camundongos submetidos à carcinogênese química (Figura 16).

7.1. Expressão de marcadores constitutivos ou relacionados com atividade supressora de células T reguladoras após 16 semanas de carcinogênese química

Baixo número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺GITR⁺ foi detectado em amostras de animais WT^{CEC} (4,8 ± 0,66 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (2,2 ± 0,18 x 10⁴) (Figura 16A). De modo semelhante, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺GITR⁺ isolados das amostras de animais CCR5^{CEC Treg} (0,3 ± 0,04 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (0,5 ± 0,30 x 10⁴) em relação ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 16A). No entanto, detectou-se menor número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺GITR⁺ em amostras dos grupos CCR5^{CEC Treg} (0,3 ± 0,04 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (0,5 ± 0,30 x 10⁴) e C

Em relação à expressão de LAG-3, uma molécula relacionada com a atividade supressora de células T reguladoras na proliferação de linfócitos T cD4⁺Foxp3⁺LAG-3⁺ similar em amostras de animais WT^{CEC} (4,7 ± 1,00 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (2,1 ± 0,18 x 10⁴) (Figura 16C). Embora os resultados tenham evidenciado maior número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺LAG-3⁺ em lesões de animais CCR5^{CEC} em comparação com os grupos CCR5^{CEC Treg} (0,3± 0,02 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (0,7 ± 0,16 x 10⁴), este número não foi significativo (Figura 16C). Menor número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺LAG-3⁺ foi detectado em amostras de animais CCR5^{CEC Treg} quando comparado com o grupo WT^{CEC} (Figura 16C).

Os resultados evidenciaram baixo número de linfócitos T $CD4^{+}Foxp3^{+}CD103^{+}$ isolados das amostras de animais WT^{CEC} (5,2 ± 1,36 x 10⁴) e $CCR5^{CEC}$ (2,0 ± 0,04 x 10⁴) (Figura 16E). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T $CD4^{+}Foxp3^{+}CD103^{+}$ isolados das amostras de animais $CCR5^{CEC}$ Treg (0,2 ± $0,05 \times 10^4$) e CCR5^{CEC CD4+} ($0,6 \pm 0,25 \times 10^4$) em relação ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 16E). Os animais CCR5^{CEC Treg} e CCR5^{CEC CD4+} ($0,6 \pm 0,25 \times 10^4$) apresentaram número significativamente menor de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD103⁺ quando comparado com o grupo WT^{CEC} (Figura 16E).

A expressão de CTLA-4, uma molécula envolvida com a supressão da resposta imune, foi determinada e os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CTLA-4⁺ isolados das lesões de animais WT^{CEC} (4,1 ± 1,58 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (2,1 ± 0,11 x 10⁴) (Figura 16G). Embora os resultados tenham evidenciado maior número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CTLA-4⁺ nas lesões de animais CCR5^{CEC} em comparação com os grupos CCR5^{CEC Treg} (0,2 ± 0,06 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (0,6 ± 0,18 x 10⁴) este resultado não foi significativo (Figura 16G). No entanto, os resultados evidenciaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CTLA-4⁺ no grupo WT^{CEC} quando comparado com os grupos CCR5^{CEC Treg} e CCR5^{CEC CD4+} (Figura 16G).

Baixo número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺PD-1⁺ foi isolado de amostras de animais WT^{CEC} (5,2 ± 1,48 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (1,1 ± 0,25 x 10⁴) (Figura 16I). Os resultados não mostraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺PD-1⁺ isolados das amostras de animais CCR5^{CEC Treg} (0,2 ± 0,02 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (0,6 ± 0,12 x 10⁴) em relação ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 16I). No entanto, os resultados evidenciaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺PD-1⁺ em amostras do grupo WT^{CEC} quando comparado com os grupos CCR5^{CEC Treg} e CCR5^{CEC CD4+} (Figura 16I).

7.2. Expressão de marcadores constitutivos ou relacionados com atividade supressora de células T reguladoras após 35 semanas de carcinogênese química

Os resultados mostraram que os animais WT^{CEC} (5,3 ± 0,75 x 10⁴) apresentaram maior número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺GITR⁺ quando comparado ao grupo CCR5^{CEC} (1,7 ± 0,48 x 10⁴), porém, esta diferença não foi significativa (Figura 16B). Ao contrário dos animais $CCR5^{CEC CD4+}$ (0,4 ± 0,20 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (4,1 ± 1,24 x 10⁴), os animais do grupo $CCR5^{CEC Treg}$ (15,7 ± 0,56 x 10⁴) apresentaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T $CD4^{+}Foxp3^{+}GITR^{+}$ quando comparado com os grupos $CCR5^{CEC}$ e WT^{CEC} (Figura 16B). Os dados também demonstraram número significativamente maior de células T $CD4^{+}Foxp3^{+}GITR^{+}$ em amostras de animais WT^{CEC} quando comparado com animais do grupo $CCR5^{CEC CD4+}$. Em relação à expressão de LAG3, os resultados evidenciaram baixo número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺LAG-3⁺ em amostras de animais WT^{CEC} (5,6 ± 0,57 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (1,7 ± 0,44 x 10⁴) (Figura 16D). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+} (0,6 ± 0,23 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (3,3 ± 1,36 x 10⁴), o grupo CCR5^{CEC Treg} (15,9 ± 0,28 x 10⁴) apresentou número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺LAG-3⁺ quando comparado com os grupos CCR5^{CEC} e WT^{CEC} (Figura 16D). Os resultados também evidenciaram menor número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺LAG-3⁺ no grupo CCR5^{CECCD4+} quando comparado com o grupo WT^{CEC} (Figura 16D).

Os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD103⁺ isolados das lesões de animais WT^{CEC} (5,5 ± 0,75 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (1,8 ± 0,42 x 10⁴) (Figura 16F). Animais do grupo CCR5^{CEC Treg} (14,6 ± 1,66 x 10⁴) apresentaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD103⁺ quando comparado com os grupos CCR5^{CEC} e WT^{CEC} (Figura 16F), o mesmo não foi observado em amostras dos grupos CCR5^{CEC CD4+} (0,3 ± 0,26 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (4,2 ± 1,31 x 10⁴). Menor número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD103⁺ foi observado em amostras do grupo CCR5^{CEC CD4+} (P < 0,05) em relação ao grupo WT^{CEC} (Figura 16F).

O número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CTLA-4⁺ foi similar em amostras de animais WT^{CEC} (5,7 ± 0,59 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (1,6 ± 0,53 x 10⁴) (Figura 16H). Número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CTLA-4⁺ foi detectado em amostras de animais CCR5^{CEC Treg} (15,3 \pm 0,85 x 10⁴), quando comparado com os grupos CCR5^{CEC} e WT^{CEC}. Enquanto baixo número destas células foi detectado nas amostras de animais $CCR5^{CEC CD4+}$ (0,5 ± 0,31 x 10⁴) e $CCR5^{CEC CD8+}$ (4,5 ± 1,64 x 10⁴) (Figura 16H). Os resultados também evidenciaram menor número (P < 0,05) de linfócitos T $CD4^{+}Foxp3^{+}CTLA-4^{+}$ no grupo $CCR5^{CEC CD8+}$ (4,5 ± 1,64 x 10⁴) quando comparado com o grupo WT^{CEC} (Figura 16H). Os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺PD-1⁺ isolados das lesões de animais WT^{CEC} $(4,3 \pm 1,25 \times 10^4)$ e CCR5^{CEC} $(1,7 \pm 0,49 \times 10^4)$ (Figura 16J). Número significativamente alto de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺PD1⁺ foi detectado em amostras de animais CCR5^{CEC Treg} (15,9 \pm 0,53 x 10⁴) quando comparado com os grupos CCR5^{CEC} e WT^{CEC} (Figura 16J). Enquanto baixo número destas células foi detectado nas amostras de animais $CCR5^{CEC CD4+}$ (0,4 ± 0,19 x 10^4) e CCR5^{CEC CD8+} (5,2 ± 2,09 x 10^4) (Figura 16J). O número de linfócitos T $CD4^{+}Foxp3^{+}PD-1^{+}$ foi maior em amostras de WT^{CEC} (P < 0,05) quando comparado com o grupo CCR5^{CEC CD4+} (Figura 16J).



Figura 16. Fenotipagem de células T reguladoras no microambiente tumoral. Os linfócitos isolados da lesão foram analisados quanto à expressão de GITR (A-B), LAG-3(C-D), CD103(E-F), CTLA-4(G-H) e PD-1(I-J). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *P< 0,05.

8. Perforina e granzima em linfócitos T CD8⁺ isolados do microambiente tumoral

Os linfócitos T CD8⁺ estão envolvidos ativamente nos mecanismos de eliminação das células tumorais. Estes linfócitos reconhecem células tumorais via MHC, e a através da liberação de perforina induzem a formação de poros no citoplasma da célula tumoral, os quais permitem a entrada de enzimas citotóxicas, como granzima, que induzem a lise da célula tumoral (TRAPANI; SMYTH, 2002; LIEBERMAN, 2003). Devido à importância destas moléculas nos mecanismos efetores dos linfócitos T CD8⁺, avaliamos a expressão de perforina e granzima por células isoladas das amostras de animais submetidos à carcinogênese química (Figura 17).

8.1. Perforina e granzima em linfócitos T CD8⁺ após 16 semanas de carcinogênese química

Em relação à detecção de perforina, os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD8⁺ expressando este marcador em amostras de animais dos grupos WT^{CEC} (29,0 ± 0,04 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (24,2 ± 0,28 x 10⁴) (Figura 17A). O mesmo perfil foi observado quando se comparou a expressão de perforina por linfócitos T CD8⁺ provenientes de amostras de animais CCR5^{CEC Treg} (28,2 ± 0,28 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (12,1 ± 0,13 x 10⁴) (Figura 17A). O menor número de linfócitos T CD8⁺Perforina⁺ foi detectado em amostras do grupo CCR5^{CEC CD4+} (P < 0,05), quando comparado com o grupo WT^{CEC} (Figura 17A).

O número de linfócitos T CD8⁺Granzima⁺ foi baixo em amostras de animais WT^{CEC} (9,1 \pm 0,21 x 10⁴), CCR5^{CEC} (6,3 \pm 0,36 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (8,1 \pm 0,15 x 10⁴) (Figura 17C). O grupo CCR5^{CEC Treg} (33,1 \pm 0,20 x 10⁴) apresentou número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺Granzima⁺ quando comparado com o grupo CCR5^{CEC} (Figura 17C).

8.2. Perforina e granzima em linfócitos T CD8⁺ após 35 semanas de carcinogênese química

O número de linfócitos T CD8⁺Perforina⁺ foi baixo em amostras de animais WT^{CEC} $(2,3 \pm 0,45 \times 10^4)$ e CCR5^{CEC} $(8,2 \pm 0,25 \times 10^4)$ (Figura 17B). Número maior de linfócitos T

CD8⁺Perforina⁺ foi isolado de amostras de animais CCR5^{CEC Treg} (26,1 ± 4,45 x 10⁴), CCR5^{CEC CD4+} (21,1 ± 0,13 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (45,3 ± 1,58 x 10⁴), quando comparado com o grupo CCR5^{CEC}, mas apenas os valores do grupo CCR5^{CEC CD8+} foram significativos (Figura 17B). Os resultados também evidenciaram menor número (P < 0,05) de linfócitos T CD8⁺Perforina⁺ no grupo WT^{CEC} quando comparado com os grupos CCR5^{CEC Treg} e CCR5^{CEC ^{CD8+} (Figura 17B).}

Os resultados mostraram que os animais CCR5^{CEC} (10,4± 0,48 x 10⁴) apresentaram maior número de linfócitos T CD8⁺Granzima⁺ quando comparado ao grupo WT^{CEC} (3,4 ± 0,56 x 10⁴), porém, esta diferença não foi significativa (Figura 17D). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+} (27,1 ± 0,17 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (35,3 ± 1,35 x 10⁴), os animais do grupo CCR5^{CEC Treg} (61,5 ± 6,83 x 10⁴) apresentaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD8⁺ expressando granzima quando comparado com o grupo CCR5^{CEC} (10,4± 0,48 x 10⁴) (Figura 17D). Os dados também demonstraram número significativamente menor de células T CD8⁺Granzima⁺ em amostras de animais WT^{CEC} quando comparado com animais CCR5^{CEC CD8+} (Figura 17D).



Figura 17. Fenotipagem de linfócitos T CD8⁺ **no microambiente tumoral.** As colunas representam o número de linfócitos isolados das lesões expressando perforina (A-B) e granzima (C-D). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *P< 0,05.

9. Expressão de Fas e FasL em linfócitos isolados do microambiente tumoral

A via Fas-FasL induz a apoptose celular e apresenta importante papel na regulação do sistema imune e desenvolvimento tumoral (KHONG; RESTIFO, 2002). Devido à importância destas moléculas nos mecanismos de escape tumoral via indução da apoptose de linfócitos efetores, avaliamos a expressão de Fas (CD95) e FasL (CD178) por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ isolados das amostras de animais submetidos à carcinogênese química (Figuras 18-19).

9.1. Expressão de Fas e FasL em linfócitos T CD4⁺ após 16 semanas de carcinogênese química

O número de linfócitos T CD4⁺CD95⁺ isolado das lesões de animais CCR5^{CEC} (70,0 ± 0,07 x 10⁴) foi significativamente maior ao detectado em amostras de animais WT^{CEC} (3,0 ± 0,05 x 10⁴), CCR5^{CEC Treg} (0,92 ± 0,02 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (1,0 ± 0,07 x 10⁴) (Figura 18A).

Os resultados evidenciaram proporções significativamente maiores de linfócitos T $CD4^+CD178^+$ nas lesões de animais $CCR5^{CEC}$ (54,1 ± 0,17 x 10⁴) quando comparado com animais WT^{CEC} (4,3 ± 0,36 x 10⁴) (Figura 18C). Ademais, animais $CCR5^{CEC}$ apresentaram número significativamente maior de linfócitos T $CD4^+$ expressando FasL quando comparado com animais $CCR5^{CEC Treg}$ (0,6 ± 0,07 x 10⁴) e $CCR5^{CEC CD4+}$ (0,7 ± 0,03 x 10⁴) (Figura 18C).

9.2. Expressão de Fas e FasL em linfócitos T CD4⁺ após 35 semanas de carcinogênese química

Os resultados mostraram que os animais CCR5^{CEC} (14,5± 0,72 x 10⁴) apresentaram maior número de linfócitos T CD4⁺CD95⁺ quando comparado ao grupo WT^{CEC} (3,3 ± 0,39 x 10⁴), porém, esta diferença não foi significativa (Figura 18B). Os resultados não mostraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺CD95⁺ nas lesões de animais CCR5^{CEC Treg} (16,7 ± 3,84 x 10⁴), CCR5^{CEC CD4+} (19,8 ± 0,34 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (14,7 ± 4,62 x 10⁴) quando comparado ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 18B). Maior número de linfócitos T CD4⁺ expressando Fas foi detectado em amostras do grupo CCR5^{CEC CD4+} (P < 0,05) quando comparado com o grupo WT^{CEC} (Figura 18B).

Os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺CD178⁺ isolados das lesões de animais WT^{CEC} (2,7 ± 1,52 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (7,6 ± 1,51 x 10⁴) (Figura 18D). De modo semelhante, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺ expressando FasL em amostras de animais CCR5^{CEC Treg} (9,0 ± 1,35 x 10⁴), CCR5^{CEC CD4+} (14,0 ± 1,05 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (11,8 ± 0,59 x 10⁴) quando comparado com o grupo CCR5^{CEC} (Figura 18D). Baixo número de linfócitos T CD4⁺CD178⁺ (P < 0,05) foi detectado em amostras de animais WT^{CEC} quando comparado com o grupo CCR5^{CEC CD4+} (Figura 18D).



Figura 18. Análise da expressão de Fas e FasL por linfócitos T $CD4^+$ no microambiente tumoral. As colunas representam o número de linfócitos isolados das lesões expressando de CD95/Fas (A-B) e CD178/FasL (C-D). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *P < 0,05.

9.3. Expressão de Fas e FasL em linfócitos T CD8⁺ após 16 semanas de carcinogênese química

As células T CD8⁺CD95⁺ foram detectadas em proporções significativamente maiores nas lesões de animais CCR5^{CEC} (16,4 ± 0,55 x 10⁴) quando comparado com animais WT^{CEC} (0,5 ± 0,04 x 10⁴) (Figura 19A). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC Treg} (5,0 ± 0,10 x 10⁴), os animais CCR5^{CEC CD4+} (2,2 ± 0,33 x 10⁴) apresentaram número significativamente menor de linfócitos TCD8⁺ expressando Fas quando comparado com animais CCR5^{CEC} (Figura 19A).

Animais CCR5^{CEC} (13,2 ± 0,18 x 10⁴) apresentaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD8⁺ expressando FasL quando comparado ao grupo WT^{CEC} (2,4 ± 0,27 x 10⁴) (Figura 19B). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC Treg} (5,3 ± 0,20 x 10⁴), os animais CCR5^{CEC} ^{CD4+} (2,4 ± 0,27 x 10⁴) apresentaram número significativamente menor de linfócitos T CD8⁺CD178⁺ em relação ao grupo CCR5^{CEC} (13,2 ± 0,18 x 10⁴) (Figura 19A).

9.4. Expressão de Fas e FasL em linfócitos T CD8⁺ após 35 semanas de carcinogênese química

Baixo número de linfócitos T CD8⁺CD95⁺ foi detectado em amostras de animais WT^{CEC} ($5,2 \pm 1,04 \ge 10^4$) e CCR5^{CEC} ($8,1 \pm 1,00 \ge 10^4$) (Figura 19B). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC Treg} ($9,2 \pm 7,01 \ge 10^4$) e CCR5^{CEC CD4+} ($2,1 \pm 1,01 \ge 10^4$), os animais CCR5^{CEC CD8+} ($24,2 \pm 4,30 \ge 10^4$) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺ expressando Fas em relação ao grupo CCR5^{CEC} ($8,1 \pm 1,00 \ge 10^4$) (Figura 19B). Detectou-se menor número de linfócitos T CD8⁺CD95⁺ em amostras de animais WT^{CEC} (P < 0,05) quando comparado com o grupo CCR5^{CEC CD8+} (Figura 19B).

O número de linfócitos T CD8⁺CD178⁺ foi similar em amostras de animais WT^{CEC} $(5,9 \pm 3,78 \times 10^4)$ e CCR5^{CEC} $(6,2 \pm 0,32 \times 10^4)$ (Figura 19D). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+} $(2,5 \pm 1,68 \times 10^4)$, os animais dos grupos CCR5^{CEC Treg} $(24,5 \pm 1,93 \times 10^4)$ e CCR5^{CEC CD8+} $(33,1 \pm 6,17 \times 10^4)$ apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺ expressando FasL quando comparado com o grupo CCR5^{CEC} $(6,2 \pm 0,32 \times 10^4)$ (Figura 19D). Os resultados também evidenciaram menor número (P < 0,05) de linfócitos T CD8⁺CD178⁺ no grupo WT^{CEC} quando comparado aos grupos CCR5^{CEC Treg} e CCR5^{CEC CD8+} (Figura 19D).



Figura 19. Análise da expressão de Fas e FasL por linfócitos T CD8⁺ no microambiente tumoral. As colunas representam o número de linfócitos isolados das lesões expressando de CD95/Fas (A-B) e CD178/FasL (C-D). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *P< 0,05.

10. Análise da presença de células NK no microambiente tumoral

As células NK apresentam importante papel no combate ao câncer, induzem a morte de células tumorais via liberação do conteúdo de seus grânulos ou por meio da sinalização de receptores de morte celular. Além disso, exercem atividade citotóxica contra células tumorais sem a necessidade de reconhecimento de antígeno específico (LIEBERMAN, 2003; ZAMAI et al., 2007; VIVIER et al., 2012). Devido à importância destas células nos mecanismos de eliminação das células tumorais, avaliamos a presença de células NK nas lesões de animais submetidos à carcinogênese química e na pele de animais do grupo controle (Sham) (Figura 20).

10.1. Análise da presença de células NK após 16 semanas de carcinogênese química

Os resultados evidenciaram número significativamente maior de células NK isoladas das lesões de animais WT^{CEC} (31,9 ± 1,12 x 10⁴) em relação ao grupo WT^{Sham} (2,8 ± 0,55 x 10⁴) (Figura 20). De modo semelhante, animais $CCR5^{CEC}$ (33,9 ± 5,45 x 10⁴) apresentaram maior número (P < 0,05) de células NK quando comparado com animais $CCR5^{Sham}$ (0,6 ± 0,07 x 10⁴) (Figura 20). Ao contrário de animais $CCR5^{CEC}$ T^{reg} (10,5 ± 0,61 x 10⁴), camundongos do grupo $CCR5^{CEC CD8+}$ (35,2 ± 2,53 x 10⁴) apresentaram maior número (P < 0,05) de células NK do que animais $CCR5^{Sham}$ (0,6 ± 0,07 x 10⁴) (Figura 20). Ademais, número similar de células NK foi detectado em amostras de animais WT^{CEC} e $CCR5^{CEC}$ (Figura 20).

10.2. Análise da presença de células NK após 35 semanas de carcinogênese química

Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de células NK isoladas das lesões de animais WT^{CEC} (15,5 ± 0,44 x 10⁴) e do grupo controle (WT^{Sham}) (2,0 ± 1,09 x 10⁴) (Figura 20). De modo contrário, animais $CCR5^{CEC}$ (51,7 ± 6,75 x 10⁴) apresentaram número significativamente maior de células NK em comparação com animais $CCR5^{Sham}$ (0,2 ± 0,09 x 10⁴) (Figura 20). Os animais $CCR5^{CEC Treg}$ (31,6 ± 1,41 x 10⁴), $CCR5^{CEC CD4+}$ (30,9 ± 5,52 x 10⁴) e $CCR5^{CEC CD8+}$ (55,8 ± 4,80 x 10⁴) também apresentaram número significativamente maior de células NK quando comparado com o grupo $CCR5^{Sham}$ (Figura 20). Os animais $CCR5^{CEC}$ também apresentaram número significativamente maior de células NK quando comparado com o grupo $CCR5^{Sham}$ (Figura 20). Os animais $CCR5^{CEC}$ também apresentaram número significativamente maior de células NK quando comparado com o grupo $CCR5^{Sham}$ (Figura 20). Os animais $CCR5^{CEC}$ também apresentaram número significativamente maior de células NK quando comparado com o grupo $CCR5^{Sham}$ (Figura 20). Os animais $CCR5^{CEC}$ também apresentaram número significativamente maior de células NK quando comparado com o grupo $CCR5^{Sham}$ (Figura 20). Os animais $CCR5^{CEC}$ (Figura 20).



Figura 20. Análise de células NK no microambiente tumoral. As colunas representam a média \pm SD do número de células NK1.1⁺ isoladas das lesões. Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. **P*< 0,05.

11. Fenotipagem das populações de leucócitos nos linfonodos

Para determinar o padrão celular presente nos linfonodos, os leucócitos foram isolados dos linfonodos inguinais e axiais de camundongos submetidos à carcinogênese química e de animais do grupo controle (Sham).

Após 16 semanas de carcinogênese química, os dados demonstraram que animas WT^{CEC} (411,0 ± 4,61 x 10⁵) apresentaram maior número de leucócitos isolados dos linfonodos, quando comparado com o grupo controle (WT^{Sham}) (30,0 ± 4,61 x 10⁵) (Figura 21). De modo semelhante, animais do grupo CCR5^{CEC} (480,0 ± 70 x 10⁵) apresentaram número de leucócitos isolados dos linfonodos maior (P < 0,05) que animais CCR5^{Sham} (22,8 ± 1,01 x 10⁵) (Figura 21). Animais CCR5^{CEC Treg} (408,1 ± 88,05 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (702,3 ± 56,21 x 10⁵) também apresentaram maior número (P < 0,05) de leucócitos quando comparado ao grupo CCR5^{Sham} (Figura 21). Os resultados evidenciaram número similar de leucócitos isolados dos linfonodos de animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC} (Figura 21).

Após 35 semanas de carcinogênese química, os resultados demonstraram maior número (P < 0,05) de leucócitos nos grupos WT^{CEC} (153,8 ± 42,84 x 10⁴) em relação ao grupo WT^{Sham} (12,6 ± 4,29 x 10⁴) (Figura 21). Os animais CCR5^{CEC} (450,8 ± 97,80 x 10⁵) também apresentaram número de leucócitos significativamente maior quando comparado ao grupo controle (CCR5^{Sham}) (19,3 ± 6,18 x 10⁵) (Figura 21). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC Treg} (684,2 ± 79,15 x 10⁵), CCR5^{CEC CD4+} (259,8 ± 87,67 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD8+} (354,8 ± 79,55 x 10⁵) também apresentaram maior número (P < 0,05) de leucócitos quando comparado ao grupo CCR5^{Sham} (Figura 21). Diferente do observado na 16^a semana, maior número de leucócitos foi isolado dos linfonodos de animais CCR5^{CEC} quando comparado com



Figura 21. Análise de leucócitos nos linfonodos. Os leucócitos dos linfonodos de camundongos WT^{Sham}, WT^{CEC,} CCR5^{Sham}, CCR5^{CEC}, CCR5^{CEC Treg}, CCR5^{CEC CD4+}, CCR5^{CEC CD4+}, CCR5^{CEC}, CD8+ foram isolados e analisados por citometria de fluxo. As colunas representam a média \pm SD do número de leucócitos totais nos linfonodos. Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. **P*< 0,05.

11.1. Análise de macrófagos, células mielóides e dendríticas após 16 semanas de carcinogênese química

Os resultados demonstraram que animais WT^{CEC} $(1,6 \pm 0,15 \times 10^5)$ e WT^{Sham} $(0,3 \pm 0,09 \times 10^5)$ apresentaram baixo número de macrófagos isolados dos linfonodos (Figura 22A). O número de macrófagos também foi baixo em amostras de linfonodos de animais CCR5^{CEC} $(2,9 \pm 0,38 \times 10^5)$ e CCR5^{Sham} $(0,3 \pm 0,10 \times 10^5)$ (Figura 22A). De modo semelhante, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de macrófagos isolado dos linfonodos de animais CCR5^{CEC Treg} $(0,8 \pm 0,45 \times 10^5)$ e CCR5^{CEC CD4+} $(1,8 \pm 0,20 \times 10^5)$ em relação ao grupo CCR5^{Sham} $(0,3 \pm 0,10 \times 10^5)$ (Figura 22A).

A análise de células mielóides não demonstrou diferenças significativas em relação ao número destas células isoladas dos linfonodos de animais WT^{CEC} ($0,5 \pm 0,50 \times 10^5$) e WT^{Sham} ($3,2 \pm 0,28 \times 10^5$) (Figura 22C). De modo contrário, detectou-se diferenças significativas no número de células mielóides nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} ($3,7 \pm 1,46 \times 10^5$) em relação ao grupo controle (CCR5^{Sham}) ($0,7 \pm 0,45 \times 10^5$) (Figura 22C). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de células mielóides nos linfonodos de animais CCR5^{CEC CD4+} ($1,8 \pm 0,57 \times 10^5$) em relação ao grupo CCR5^{Sham} (Figura 22C).

Em relação ao número de células dendríticas, os resultados evidenciaram menor número destas células isoladas de linfonodos de animais do grupo controle (WT^{Sham}) (0,7 ± 0,57x 10⁵) quando comparado ao grupo WT^{CEC} (1,71 ± 0,03 x 10⁵), porém esta diferença não foi significativa (Figura 22E). Animais CCR5^{Sham} (0,5 ± 0,31 x 10⁵), CCR5^{CEC} (1,4 ± 0,15 x 10⁵), CCR5^{CEC Treg} (0,6 ± 0,04 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (0,9 ± 0,19 x 10⁵) apresentaram número similar de células dendríticas (Figura 22E). Número similar de células dendríticas também foi detectado nos linfonodos de animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC}.

11.2. Análise de macrófagos, células mielóides e dendríticas após 35 semanas de carcinogênese química

Animais WT^{CEC} $(2,1 \pm 1,82 \times 10^5)$ e WT^{Sham} $(0,3 \pm 0,11 \times 10^5)$ apresentaram baixo número de macrófagos isolado dos linfonodos (Figura 22B). De modo contrário, detectou-se número significativamente alto de macrófagos nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} $(25,6 \pm 10^{-5})$

 $0,91 \times 10^5$) quando comparado ao grupo controle (CCR5^{Sham}) ($0,3 \pm 0,05 \times 10^5$) (Figura 22B). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+} ($13,5 \pm 5,60 \times 10^5$), os grupos CCR5^{CEC Treg} ($9,9 \pm 0,57 \times 10^5$) e CCR5^{CEC CD8+} ($3,0 \pm 1,11 \times 10^5$) apresentaram baixo número (P < 0,05) de macrófagos quando comparado ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 22B). No entanto, os animais CCR5^{CEC Treg} ($9,9 \pm 0,57 \times 10^5$) e CCR5^{CEC CD4+} ($13,5 \pm 5,60 \times 10^5$) apresentaram número significativamente maior de macrófagos quando comparados ao grupo CCR5^{Sham} (Figura 22B). Os resultados evidenciaram aumento significativo na proporção de macrófagos nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} em comparação com animais do grupo WT^{CEC} (Figura 22B).

Animais WT^{CEC} (4,6 ± 0,56 x 10⁵) apresentaram maior número (P < 0,05) de células mielóides isoladas dos linfonodos quando comparado com o grupo controle (WT^{Sham}) (0,2 ± 0,56 x 10⁵) (Figura 22D). De modo contrário, a análise de células mielóides não demonstrou diferença significativa em relação ao número destas células em animais CCR5^{CEC} (0,7 ± 0,28 x 10⁵) em relação ao grupo controle (CCR5^{Sham}) (0,8 ± 0,53 x 10⁵) (Figura 22D). No entanto, número estatisticamente maior de células mielóides foi detectado nos linfonodos de animais CCR5^{CEC Treg} (14,7 ± 2,90 x 10⁵), CCR5^{CEC CD4+} (19,7 ± 6,87 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD8+} (16,0 ± 5,89 x 10⁵) em relação aos grupos CCR5^{Sham} e CCR5^{CEC} (Figura 22D).

Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de células dendríticas isoladas dos linfonodos de animais WT^{CEC} (0,8 ± 0,30 x 10⁵) e WT^{Sham} (0,2 ± 0,03 x 10⁵) (Figura 22F). De modo semelhante, não se detectou diferença significativa no número de células dendríticas nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} (0,3 ± 0,19 x 10⁵) em relação ao grupo controle (CCR5^{Sham}) (0,5 ± 0,31 x 10⁵) (Figura 22F). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC Treg} (1,3 ± 1,40 x 10⁵), animais dos grupos CCR5^{CEC CD4+} (2,7 ± 1,49 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD8+} (4,4 ± 1,74 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de células dendríticas quando comparados aos grupos CCR5^{CEC} e CCR5^{Sham} (Figura 22F).



Figura 22. Análise de macrófagos, células mielóides e dendríticas no linfonodo. As colunas representam a média \pm SD do número de macrófagos (A-B), células mielóides (C-D) e células dendríticas (E-F). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. **P*< 0,05.

11.3. Análise de linfócitos após 16 semanas de carcinogênese química

A fenotipagem das populações de linfócitos demonstrou que animais WT^{CEC} (204,5 ± 8,72 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de células T CD3⁺CD4⁺ do que animais WT^{Sham} (12,6 ± 0,43 x 10⁵) (Figura 23A). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC} (220,3 ± 47,90 x 10⁵) apresentaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ quando comparado ao grupo controle (CCR5^{Sham}) (9,9 ± 2,22 x 10⁵) (Figura 23A). Os animais CCR5^{CEC Treg} (162,3 ± 32,20 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (229,0 ± 18,17 x 10⁵) também apresentaram número significativamente maior de células T CD3⁺CD4⁺ quando comparados ao grupo CCR5^{Sham} (Figura 23A).

Em relação à população de linfócitos T CD8⁺, os resultados evidenciaram que animais do grupo WT^{CEC} apresentaram número significativamente maior destas células (140,6± 0,49 x 10⁵) quando comparado aos animais do grupo controle (WT^{Sham}) (14,5 ± 0,84x 10⁵) (Figura 23C). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC} apresentaram maior número de linfócitos T CD8⁺ (170,2 ± 30,72 x 10⁵) em comparação com animais do grupo CCR5^{Sham} (14,9 ± 1,62 x 10⁵) (Figura 23C). Animais CCR5^{CEC Treg} (196,5 ± 12,62 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (186,9 ± 55,31 x 10⁵) também apresentaram maior número de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ quando comparados ao grupo CCR5^{Sham} (Figura 23C). Os resultados evidenciaram que animais do grupo CCR5^{CEC} apresentaram maior número de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ nos linfonodos quando comparado com animais do grupo WT^{CEC}, porém esta diferença não foi significativa (Figura 23C).

Em relação aos linfócitos B, os dados demonstraram que animais WT^{CEC} (63,7 ± 8,65 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de linfócitos B em comparação com animais WT^{Sham} (0,3 ± 0,08 x 10⁵) (Figura 23E). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC} (18,2 ± 5,99 x 10⁵) apresentaram maior número de linfócitos B em comparação com animais CCR5^{Sham} (4,0 ± 0,07 x 10⁵), porém esta diferença não foi significativa (Figura 23E). Animais CCR5^{CEC Treg} (51,4 ± 7,07 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (72,5 ± 7,95 x 10⁵) apresentaram maior número (P < 0,05) de linfócitos CD19⁺ quando comparado aos grupos CCR5^{CEC} (18,2 ± 5,99 x 10⁵) e CCR5^{Sham} (4,0 ± 0,07 x 10⁵) (Figura 22E). Número significativamente maior de linfócitos B foi isolado dos linfonodos de animais WT^{CEC} quando comparado com animais CCR5^{CEC} (Figura 23E).

11.4. Análise de linfócitos após 35 semanas de carcinogênese química

Os resultados evidenciaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ nos linfonodos de animais WT^{CEC} (124,1 ± 10,03 x 10⁵) quando comparado ao grupo controle (WT^{Sham}) (9,5 ± 6,59 x 10⁵) (Figura 23B). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC} (331,7 ± 46,25 x 10⁵), CCR5^{CEC Treg} (283,7 ± 77,25 x 10⁵), CCR5^{CEC CD4+} (345,1 ± 71,22 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD8+} (328,7 ± 40,15 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ em comparação com animais CCR5^{Sham} (6,4 ± 2,23 x 10⁵) (Figura 23B). Ademais, animais CCR5^{CEC} também apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ em relação ao grupo WT^{CEC} (Figura 23B).

Animais WT^{CEC} (158,9 ± 48,76 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de células T CD3⁺CD8⁺ quando comparado com animais do grupo controle (WT^{Sham}) (6,3 ± 2,04 x 10⁵) (Figura 23D). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC} (167,6 ± 57,48 x 10⁵), CCR5^{CEC Treg} (154,2 ± 34,40 x 10⁵), CCR5^{CEC CD4+} (175,9 ± 57,75 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD8+} (142,1 ± 9,38 x 10⁵) apresentaram maior número de linfócitos T CD8⁺ em comparação com animais CCR5^{Sham} (2,7 ± 0,63 x 10⁵) (Figura 23D).

Animais WT^{CEC} apresentaram maior número de linfócitos B ($39,6 \pm 19,03 \times 10^5$) nos linfonodos quando comparado ao grupo controle (WT^{Sham}) ($1,0 \pm 0,69 \times 10^5$) (Figura 23F). De modo semelhante, número significativamente maior de linfócitos CD19⁺ foi isolado dos linfonodos de animais CCR5^{CEC} ($24,3 \pm 14,07 \times 10^5$), CCR5^{CEC Treg} ($18,3 \pm 6,03 \times 10^5$), CCR5^{CEC CD4+} ($70,6 \pm 12,53 \times 10^5$) e CCR5^{CEC CD8+} ($43,7 \pm 1,68 \times 10^5$) em relação aos animais CCR5^{Sham} ($1,6 \pm 1,05 \times 10^5$) (Figura 23F). Apenas nos linfonodos do grupo CCR5^{CEC CD4+} detectou-se número significativamente maior de células B, quando comparado com o grupo CCR5^{CEC} ($24,3 \pm 14,07 \times 10^5$) (Figura 23F). Animais do grupo WT^{CEC} apresentaram maior número de células B quando comparado com animais do grupo CCR5^{CEC}, porém esta diferença não foi significativa (Figura 23F).



Figura 23. Análise de linfócitos no linfonodo. As colunas representam a média \pm SD do número de linfócitos CD3⁺CD4⁺ (A-B), linfócitos CD3⁺CD8⁺ (C-D) e linfócitos CD19⁺ (E-F). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. **P*< 0,05.
12. Fenotipagem de linfócitos T no linfonodo

12.1. Fenotipagem de linfócitos T CD4⁺ após 16 semanas de carcinogênese química

Os resultados demonstraram que animais WT^{CEC} (140,2 \pm 3,09 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺CD28⁺ quando comparado ao grupo controle (WT^{Sham}) (6,0 \pm 0,02 x 10⁵) (Figura 24A). De modo contrário, os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺CD28⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} (28,0 \pm 14,54 x 10⁵) quando comparado com o grupo CCR5^{Sham} (6,4 \pm 0,47 x 10⁵) (Figura 24A). No entanto, os resultados evidenciaram maior número (*P* < 0,05) de linfócitos T CD4⁺CD28⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC CD4+} (149,4 \pm 38,75 x 10⁵) em relação aos grupos CCR5^{CEC Treg} (132,8 \pm 29,11 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (149,4 \pm 38,75 x 10⁵) em relação aos grupos CCR5^{CEC} e CCR5^{Sham} (Figura 24A). Ademais, animais do grupo WT^{CEC} apresentaram maior número de linfócitos T CD4⁺CD28⁺ quando comparado com animais do grupo CCR5^{CEC}.

Em relação ao número de células T CD4⁺CD62L⁺, os dados evidenciaram número significativamente maior destes linfócitos isolados dos linfonodos de animais WT^{CEC} (143,1 ± 1,03 x 10⁵) e CCR5^{CEC} (144,4 ± 42,43 x 10⁵) quando comparado aos respectivos controles [WT^{Sham} (9,2 ± 0,31 x 10⁵) e CCR5^{Sham} (31,0 ± 1,24 x 10⁵)] (Figura 24C). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC Treg} (141,7 ± 44,41 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (283,4± 23,10 x 10⁵) apresentaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺CD62L⁺ em relação ao grupo CCR5^{Sham} (Figura 24C). Ademais, o número de linfócitos T CD4⁺CD62L⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC CD4+} foi estatisticamente maior ao detectado no grupo CCR5^{CEC} (Figura 24C).

Em relação à expressão de CD25, observou-se que o grupo WT^{CEC} (37,5 ± 0,48 x 10⁵) apresentou maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺ expressando este marcador quando comparado com animais WT^{Sham} (0,6 ± 0,13 x 10⁵) (Figura 24E). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC} (40,9 ± 13,35 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de linfócitos TCD4⁺CD25⁺ em relação ao grupo CCR5^{Sham} (0,8 ± 0,07 x 10⁵) (Figura 24E). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+} (15,5 ± 0,78 x 10⁵), os animais CCR5^{CEC Treg} (46,6 ± 8,90 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ quando comparado com o grupo CCR5^{Sham} (Figura 24E).

As células T CD4⁺CD45RB⁺ foram detectadas em número significativamente maior nos linfonodos de animais WT^{CEC} (154,9 ± 1,29 x 10⁵) quando comparado aos animais WT^{Sham} $(3,0 \pm 0,02 \times 10^5)$ (Figura 24G). De modo semelhante, maior número destas células foi detectado nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} (295,0 ± 53,21 x 10⁵), CCR5^{CEC Treg} (286,2± 64,73 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (234,0± 28,19 x 10⁵) quando comparados com o grupo controle (CCR5^{Sham}) (22,0 ± 0,70 x 10⁵) (Figura 24G). Os resultados evidenciaram maior número de linfócitos T CD4⁺CD45RB⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} em comparação com o grupo WT^{CEC} (Figura 24G).

O número de linfócitos T CD4⁺CD152⁺ foi maior (P < 0,05) nos linfonodos de animais WT^{CEC} ($4,2 \pm 1,03 \times 10^5$) quando comparado com o grupo controle (WT^{Sham}) ($0,7 \pm 0,01 \times 10^5$) (Figura 24I). Animais CCR5^{CEC} e CCR5^{Sham} apresentaram baixo número de linfócitos T CD4⁺CD152⁺ ($3,2 \pm 0,36 \times 10^5$) e ($0,2 \pm 0,02 \times 10^5$) nos linfonodos (Figura 24I). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+} ($5,0 \pm 2,10 \times 10^5$), os animais CCR5^{CEC Treg} ($5,3\pm 1,83 \times 10^5$) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺CD152⁺ quando comparado com o grupo CCR5^{Sham} (Figura 24I).

A análise da expressão de CCL4 por linfócitos T CD4⁺ evidenciou número significativamente maior de células positivas para essa quimiocina nos linfonodos de animais WT^{CEC} (10,9 ± 0,09 x 10⁵) quando comparado com grupo controle (WT^{sham}) (0,6 ± 0,03 x 10⁵) (Figura 25A). De modo contrário, detectou-se número similar de células T CD4⁺CCL4⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} (1,1 ± 0,22 x 10⁵) e CCR5^{Sham} (1,0 ± 0,03 x 10⁵) (Figura 25A). No entanto, animais CCR5^{CEC Treg} (11,9 ± 1,95 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (7,6 ± 0,26 x 10⁵) apresentaram maior número (P < 0,05) de células T CD4⁺ expressando CCL4 quando comparados ao grupo CCR5^{Sham} (Figura 25A). Ademais, o grupo CCR5^{CEC Treg} também apresentou número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺CCL4⁺ quando comparado ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 25A). Os resultados também evidenciaram que animais WT^{CEC} apresentaram número significativamente maior de células T CD4⁺CCL4⁺ em relação aos animais CCR5^{CEC}.

Em relação à expressão de Foxp3, observou-se que o grupo WT^{CEC} (3,1 ± 1,97 x 10⁵) apresentou maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺ expressando este marcador quando comparado com animais WT^{Sham} (0,1 ± 0,06 x 10⁵) (Figura 25C). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC} (2,1 ± 0,95 x 10⁵), CCR5^{CEC Treg} (2,5 ± 1,70 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (4,4 ± 1,06 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺ em relação ao grupo CCR5^{Sham} (0,07 ± 0,06 x 10⁵) (Figura 25C). No entanto, apenas o grupo

CCR5^{CEC Treg} apresentou maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺ quando comparado ao grupo CCR5^{CEC}.

12.2. Fenotipagem de linfócitos T CD4⁺ após 35 semanas de carcinogênese química

A análise da expressão de CD28 por linfócitos T CD4⁺ evidenciou maior número de células expressando este marcador nos linfonodos de animais dos grupos WT^{CEC} (82,8 ± 1,41 x 10⁵) e CCR5^{CEC} (171,0 ± 31,77 x 10⁵) quando comparado com os respectivos controles [WT^{sham} (2,6 ± 0,67x 10⁵) e CCR5^{Sham} (1,3 ± 0,45 x 10⁵)] (Figura 24B). Animais CCR5^{CEC Treg} (186,8 ± 19,80 x 10⁵), CCR5^{CEC CD4+} (133,0 ± 10,31 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD8+} (158,1 ± 17,01 x 10⁵) também apresentaram maior número de células T CD4⁺CD28⁺ quando comparado com animais do grupo controle (CCR5^{Sham}) (Figura 24B).

Os resultados mostraram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺CD62L⁺ isolados dos linfonodos de animais WT^{CEC} (55,5 ± 11,33 x 10⁵) e CCR5^{CEC} (74,01 ± 5,00 x 10⁵) quando comparados com os respectivos controles [WT^{Sham} (2,8 ± 0,72 x 10⁵) e CCR5^{Sham} (3,18 ± 0,21 x 10⁵)] (Figura 24D). Animais CCR5^{CEC Treg} (226,7 ± 34,59 x 10⁵), CCR5^{CEC CD4+} (164,4 ± 32,46 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD8+} (215,9 ± 4,23 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de células T CD4⁺CD62L⁺ em relação aos animais CCR5^{Sham}. No entanto, apenas os grupos CCR5^{CEC Treg} e CCR5^{CEC CD8+} mostraram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺CD62L⁺ quando comparados ao grupo CCR5^{CEC}.

Baixo número de linfócitos TCD4⁺CD25⁺ foi detectado nos linfonodos de animais WT^{CEC} (4,6 \pm 1,94 x 10⁵) e WT^{Sham} (1,2 \pm 1,43 x 10⁵) (Figura 24F). De modo contrário, animais CCR5^{CEC} (65,5 \pm 8,65 x 10⁵), CCR5^{CEC Treg} (70,6 \pm 13,80 x 10⁵), CCR5^{CEC CD4+} (62,7 \pm 5,52 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD8+}(57,7 \pm 6,35 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ em relação ao grupo CCR5^{Sham} (1,4 \pm 0,02 x 10⁵) (Figura 24F). Os dados também mostraram número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ em relação de animais CCR5^{CEC} quando comparado com animais WT^{CEC}.

O número de linfócitos T CD4⁺CD45RB⁺ nos linfonodos de animais WT^{CEC} (123,8 \pm 12,48 x 10⁵) foi significativamente maior ao detectado no grupo controle (WT^{Sham}) (5,5 \pm 3,70 x 10⁵) (Figura 24H). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC} (181,5 \pm 5,01x 10⁵), CCR5^{CEC}

^{Treg} (229,4 \pm 32,97 x 10⁵), CCR5^{CEC CD4+} (167,9 \pm 5,20 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD8+} (247,0 \pm 29,02 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de linfócitos TCD4⁺ expressando CD45RB em comparação com animais CCR5^{Sham} (6,6 \pm 0,10 x 10⁵) (Figura 24H). Embora os resultados tenham evidenciado maior número de linfócitos T CD4⁺CD45RB⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} em comparação com o grupo WT^{CEC}, esta diferença não foi significativa (Figura 24H).

Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺CD152⁺ nos linfonodos de animais WT^{CEC} ($2,4 \pm 0,70 \times 10^5$) e CCR5^{CEC} ($5,8 \pm 2,52 \times 10^5$) e seus respectivos controles [WT^{Sham} ($0,4 \pm 0,28 \times 10^5$) e CCR5^{Sham} ($2,2 \pm 0,36 \times 10^5$)] (Figura 24J). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+} ($6,4 \pm 2,25 \times 10^5$) e CCR5^{CEC CD8+} ($11,1 \pm 5,70 \times 10^5$), os animais CCR5^{CEC Treg} ($9,9 \pm 2,02 \times 10^5$) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺ expressando CD152 do que animais CCR5^{Sham} (Figura 24J). Animais CCR5^{CEC} apresentaram maior número de células T CD4⁺CD152⁺ do que os animais WT^{CEC}, porém, esta diferença não foi significativa.

Baixo número de linfócitos T $CD4^+CCL4^+$ foi isolado dos linfonodos de animais WT^{CEC} (6,9 ± 3,14 x 10⁵) e WT^{Sham} (0,7 ± 0,19 x 10⁵) (Figura 25B). De modo contrário, animais $CCR5^{CEC}$ (34,6 ± 16,72 x 10⁵), $CCR5^{CEC Treg}$ (28,5± 5,36 x 10⁵), $CCR5^{CEC CD4+}$ (14,8± 1,85 x 10⁵) e $CCR5^{CEC CD8+}$ (21,0 ± 5,58 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T $CD4^+CCL4^+$ em relação ao grupo $CCR5^{Sham}$ (1,3 ± 0,35 x 10⁵) (Figura 25B). Os dados também mostraram número significativamente maior de linfócitos T $CD4^+CCL4^+$ em relação ao grupo $CCR5^{Sham}$ (1,3 ± 0,35 x 10⁵) (Figura 25B). Os dados também mostraram número significativamente maior de linfócitos T $CD4^+$ $CCL4^+$ em relação ao grupo $CCR5^{CEC}$ quando comparado aos animais WT^{CEC} .

Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺ isolados dos linfonodos de animais WT^{CEC} (0,3 \pm 0,22 x 10⁵) e WT^{Sham} (0,3 \pm 0,22 x 10⁵) (Figura 25D). De modo contrário, animais CCR5^{CEC} (7,0 \pm 2,32 x 10⁵) apresentaram maior número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺ quando comparado ao grupo controle (CCR5^{Sham}) (0,8 \pm 0,27 x 10⁵) (Figura 25D). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC Treg} (6,2 \pm 3,86 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD8+} (3,0 \pm 1,02 x 10⁵), animais CCR5^{CEC CD4+} (28,9 \pm 19,99 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de linfócitos TCD4⁺ expressando Foxp3 quando comparado aos grupos CCR5^{Sham} e CCR5^{CEC} (Figura 25D). Ademais, os resultados evidenciaram maior número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} em comparação com o grupo WT^{CEC}.



Figura 24. Fenotipagem de linfócitos T CD4⁺ no linfonodo. Os linfócitos isolados dos linfonodos foram analisados quanto à expressão de CD62L (A-B), CD25L (C-D), CD45RB (E-F), CD152 (G-H). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *P<0,05.



Figura 25. Fenotipagem de linfócitos T CD4⁺ **no linfonodo.** Os linfócitos isolados dos linfonodos foram analisados quanto à expressão de CCL4 (A-B) e Foxp3 (C-D). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *P< 0,05.

12.3. Fenotipagem de linfócitos T CD8⁺ após 16 semanas de carcinogênese química

As células T CD8⁺CD28⁺ foram detectadas em maior número (P < 0,05) nos linfonodos de animais WT^{CEC} (70,1 ± 15,40 x 10⁵) quando comparado aos animais WT^{Sham} (3,0 ± 0,09 x 10⁵) (Figura 26A). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC} (70,5 ± 8,39 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (99,0 ± 5,17 x 10⁵) apresentaram maior número de linfócitos T CD8⁺CD28⁺ quando comparado com o grupo controle (CCR5^{Sham}) (8,2 ± 0,32 x 10⁵) (Figura 26A). Os dados também mostraram número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺ expressando CD28 nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} quando comparado aos animais CCR5^{CEC Treg} (18,4 ± 4,49x 10⁵) (Figura 26A).

O número de linfócitos T CD8⁺CD62L⁺ isolados dos linfonodos de animais WT^{CEC} (164,1 \pm 5,86 x 10⁵) foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle (WT^{Sham}) (9,4 \pm 0,55 x 10⁵) (Figura 26C). De modo semelhante, o número de linfócitos T CD8⁺ expressando CD62L foi significativamente maior nos linfonodos dos grupos CCR5^{CEC} (86,7 \pm 8,01 x 10⁵), CCR5^{CEC Treg} (163,0 \pm 4,60 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (209,0 \pm 3,02 x 10⁵) em relação ao grupo CCR5^{Sham} (23,0 \pm 0,20 x 10⁵) (Figura 26C). No entanto, apenas o grupo CCR5^{CEC CD4+} apresentou número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺CD62L⁺ quando comparado ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 26C). Embora os resultados tenham evidenciado maior número de linfócitos T CD4⁺CD62L⁺ nos linfonodos de animais WT^{CEC} quando comparado ao grupo CCR5^{CEC}, esta diferença não foi significativa.

A análise da expressão de CD25 por linfócitos T CD8⁺ evidenciou maior número (P < 0,05) de células expressando este marcador nos linfonodos de animais do grupo WT^{CEC} (10,0 $\pm 2,01 \times 10^5$) quando comparado com o grupo controle (WT^{sham}) (0,8 $\pm 0,04 \times 10^5$) (Figura 26E). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC} (16,1 $\pm 1,07 \times 10^5$) e CCR5^{CEC CD4+} (26,4 $\pm 3,01 \times 10^5$) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺CD25⁺ em relação ao grupo CCR5^{Sham} (1,0 $\pm 0,06 \times 10^5$) (Figura 26E). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+}, os animais CCR5^{CEC Treg} (4,0 $\pm 2,19 \times 10^5$) apresentaram mémor número (P < 0,05) de células T CD8⁺CD25⁺ quando comparado com o grupo CCR5^{CEC} (Figura 26E). Embora animais CCR5^{CEC} tenham apresentado maior número de linfócitos T CD8⁺ cD25⁺ em relação ao grupo WT^{CEC} (Figura 26E).

Os resultados mostraram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD8⁺CD45RB⁺ nos linfonodos de animais WT^{CEC} (170,1 ± 3,92 x 10⁵) e CCR5^{CEC} (100,7 ± 12,24 x 10⁵) em

relação aos respectivos controles [WT^{Sham} (7,8 ± 0,09 x 10⁵) e CCR5^{Sham} (12,9 ± 1,43 x 10⁵)] (Figura 26G). Animais CCR5^{CEC Treg} (192,7 ± 19,61 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (171,7 ± 52,67 x 10⁵) também apresentaram número significativamente maior de células T CD8⁺CD45RB⁺ em relação ao grupo controle (CCR5^{Sham}) (Figura 26G). No entanto, apenas o grupo CCR5^{CEC Treg} apresentou maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD8⁺ expressando CD45RB quando comparado ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 26G).

Os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de T $CD8^+CD152^+$ nos linfonodos de animais WT^{CEC} (3,3 ± 0,19 x 10⁵) e WT^{Sham} (1,1 ± 0,16 x 10⁵) (Figura 26I). De modo contrário, animais $CCR5^{CEC}$ (4,5 ± 1,34 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T $CD8^+CD152^+$ quando comparado com animais $CCR5^{CEC Sham}$ (0,1 ± 0,04 x 10⁵) (Figura 26I). Ao contrário dos animais $CCR5^{CEC Treg}$ (3,3 ± 1,07 x 10⁵), os animais $CCR5^{CEC CD4+}$ (6,3 ± 1,50 x 10⁵) apresentaram maior número de linfócitos T $CD8^+CD152^+$ em relação ao grupo $CCR5^{Sham}$ (Figura 26I).

Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD8⁺CCL4⁺ isolados dos linfonodos de animais WT^{CEC} ($0,5 \pm 0,23 \times 10^5$) e CCR5^{CEC} ($1,2 \pm 0,16 \times 10^5$) e seus respectivos controles [WT^{Sham} ($1,2 \pm 0,04 \times 10^5$) e CCR5^{Sham} ($0,9 \pm 0,05 \times 10^5$)] (Figura 27A). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC Treg} ($4,2 \pm 1,12 \times 10^5$), os animais CCR5^{CEC CD4+} ($15,0 \pm 0,63 \times 10^5$) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺ expressando CCL4 do que animais CCR5^{Sham} (Figura 27A).

A análise da expressão de Foxp3 mostrou que, similarmente aos animais WT^{Sham} (0,2 \pm 0,07 x 10⁵), os animais WT^{CEC} (2,0 \pm 0,56 x 10⁵) apresentaram baixo número de linfócitos T CD8⁺Foxp3⁺ (Figura 27C). De modo semelhante, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD8⁺Foxp3⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} (4,4 \pm 0,86 x 10⁵) e CCR5^{Sham} (0,1 \pm 0,25 x 10⁵) (Figura 27C). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC} Treg</sup> (3,5 \pm 0,92 x 10⁵), os animais CCR5^{CEC} CD4⁺ (14,7 \pm 2,85 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺ expressando Foxp3 do que animais CCR5^{Sham} (Figura 27C).

12.4. Fenotipagem de linfócitos T CD8⁺ após 35 semanas de carcinogênese química

Baixo número de linfócitos T CD8⁺CD28⁺ foi detectado nos linfonodos de animais WT^{CEC} (8,8 ± 3,74 x 10⁵) e WT^{Sham} (1,8 ± 1,14 x 10⁵) (Figura 26B). De modo contrário, animais CCR5^{CEC} (49,6 ± 15,40 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺CD28⁺ quando comparado com o grupo CCR5^{Sham} (0,2 ± 0,04 x 10⁵) (Figura 26B). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+} (10,7± 3,13 x 10⁵), os grupos CCR5^{CEC Treg} (50,0± 7,30 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD8+} (136,2 ± 2,65 x 10⁵) apresentaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD8⁺ expressando CD28 em relação ao grupo CCR5^{Sham} (Figura 26B). No entanto, apenas o grupo CCR5^{CEC CD8+} mostrou número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺CD28⁺ quando comparado ao grupo CCR5^{CEC}.

O número de linfócitos T CD8⁺CD62L⁺ isolados dos linfonodos de animais WT^{CEC} (52,5± 9,78 x 10⁵) foi significativamente maior ao detectado no grupo controle (WT^{Sham}) (4,7 ± 0,14 x 10⁵) (Figura 26D). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC} (26,5 ± 12,53 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺ expressando CD62L em comparação com animais CCR5^{Sham} (0,05 ± 0,07 x 10⁵) (Figura 26D). Animais dos grupos CCR5^{CEC Treg} (133,9 ± 14,03 x 10⁵), CCR5^{CEC CD4+} (110,0 ± 3,35 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD8+} (131,1 ± 6,89 x 10⁵) apresentaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD8⁺CD62L⁺ quando comparados aos grupos CCR5^{Sham} e CCR5^{CEC} (Figura 26D).

As células T CD8⁺CD25⁺ foram detectadas em proporções significativamente maiores nos linfonodos de animais WT^{CEC} (32,0 ± 3,19 x 10⁵) quando comparado com o grupo controle (WT^{Sham}) (0,3 ± 0,31 x 10⁵) (Figura 26F). De modo contrário, número similar de linfócitos T CD8⁺CD25⁺ foi detectado nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} (2,3 ± 0,44 x 10⁵) e CCR5^{Sham} (0,9 ± 0,42 x 10⁵) (Figura 26F). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC Treg} (7,4 ± 2,45 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (9,8 ± 0,49 x 10⁵), os animais CCR5^{CEC CD8+} (15,2 ± 4,45 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺CD25⁺ quando comparado com animais CCR5^{Sham}. Os resultados evidenciaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD8⁺CD25⁺ nos linfonodos de animais WT^{CEC} quando comparado ao grupo CCR5^{CEC}.

Os resultados mostraram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD8⁺CD45RB⁺ nos linfonodos de animais WT^{CEC} (120,0 ± 11,68 x 10⁵) e CCR5^{CEC} (234,1 ± 55,66 x 10⁵) quando comparados com os respectivos controles [WT^{Sham} (6,8 ± 1,95 x 10⁵) e CCR5^{Sham} (11,3 ± 0,41

x 10^5)] (Figura 26H). Animais CCR5^{CEC Treg} (211,5 ± 41,12 x 10^5), CCR5^{CEC CD4+} (124,8 ± 4,84 x 10^5) e CCR5^{CEC CD8+} (143,7 ± 4,40 x 10^5) também apresentaram número significativamente maior de células T CD8⁺CD45RB⁺ em relação aos animais do grupo controle (CCR5^{Sham}).

A análise da expressão de CD152 mostrou que, similarmente aos animais WT^{Sham} (0,6 \pm 0,50 x 10⁵), os animais WT^{CEC} (1,2 \pm 0,64 x 10⁵) apresentaram baixo número de linfócitos T CD8⁺CD152⁺ (Figura 26J). De modo semelhante, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD8⁺CD152⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} (2,8 \pm 1,49 x 10⁵) e CCR5^{Sham} (1,3 \pm 0,40 x 10⁵) (Figura 26J). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC Treg} (2,8 \pm 2,17 x 10⁵), os animais CCR5^{CEC CD4+} (6,1 \pm 1,59 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD8+} (12,0 \pm 5,93 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺ expressando CD152 do que animais CCR5^{Sham} (Figura 26J).

Baixo número de linfócitos T CD8⁺CCL4⁺ foi isolado dos linfonodos de animais WT^{CEC} $(0,9 \pm 0,51 \times 10^5)$ e WT^{Sham} $(0,3 \pm 0,35 \times 10^5)$ (Figura 27B). De modo contrário, animais CCR5^{Sham} $(1,4 \pm 0,59 \times 10^5)$ apresentaram número significativamente menor de linfócitos T CD8⁺CCL4⁺ em relação aos grupos CCR5^{CEC} (69,6 ± 18,84 x 10⁵) e CCR5^{CEC} ^{CD4+} (23,6± 4,22 x 10⁵) (Figura 27B). Animais dos grupos CCR5^{CEC Treg} (15,4 ± 5,37 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD8+} (14,2 ± 1,67 x 10⁵) apresentaram menor número (P < 0,05) de linfócitos T CD8⁺CCL4⁺ quando comparados com o grupo CCR5^{CEC} (Figura 27B).

Animais WT^{CEC} (90,4 ± 26,36 x 10⁵) apresentaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD8⁺Foxp3⁺ quando comparado ao grupo controle (WT^{Sham}) (0,4 ± 0,18 x 10⁵) (Figura 27D). De modo contrário, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD8⁺Foxp3⁺ isolados dos linfonodos de animais CCR5^{CEC} (12,3 ± 2,54 x 10⁵), CCR5^{CEC Treg} (1,6 ± 0,64 x 10⁵), CCR5^{CEC CD4+} (4,1 ± 1,16 x 10⁵), CCR5^{CEC CD8+} (11,2 ± 2,22 x 10⁵) e CCR5^{Sham} (0,6 ± 0,20 x 10⁵) (Figura 27D). Maior número de linfócitos T CD8⁺Foxp3⁺ foi isolado dos linfonodos de animais WT^{CEC} em comparação com o grupo CCR5^{CEC}.



Figura 26. Fenotipagem de linfócitos T CD8⁺ **no linfonodo.** Os linfócitos isolados dos linfonodos foram analisados quanto à expressão de CD28 (A-B), CD62L (C-D), CD25 (E-F), CD45RB (G-H) e CD152 (I-J). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *P< 0,05.



Figura 27. Fenotipagem de linfócitos T CD8⁺ **no linfonodo.** Os linfócitos isolados dos linfonodos foram analisados quanto à expressão de CCL4 (A-B) e Foxp3 (C-D). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *P< 0,05.

13. Fenotipagem de células T reguladoras – T CD4⁺Foxp3⁺ - no linfonodo

13.1. Fenotipagem de células T reguladoras após 16 semanas de carcinogênese química

O número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RA⁺ foi similar nos linfonodos de animais WT^{CEC} (28,1 ± 2,46 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (18,9 ± 0,59 x 10⁴) (Figura 28A). Embora os resultados tenham evidenciado menor número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RA⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} (18,9 ± 0,59 x 10⁴) em comparação com os grupos CCR5^{CEC Treg} (25,6± 10,10 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (26,3 ± 1,36 x 10⁴), esta diferença não foi significativa (Figura 28A).

A análise da expressão de CD45RB mostrou que animais WT^{CEC} (31,6 ± 16,21 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (20,3 ± 0,03 x 10⁴) apresentaram número similar de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RB⁺ (Figura 28C). De modo semelhante, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RB⁺ isolados dos linfonodos de animais CCR5^{CEC Treg} (34,5 ± 16,92 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (45,0 ± 1,33 x 10⁴) em relação ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 28C).

Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD62L⁺ isolados dos linfonodos de animais WT^{CEC} (28,9 ± 14,18 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (18,0 ± 1,00 x 10⁴) (Figura 28E). Embora os resultados tenham mostrado menor número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD62L⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} (18,0 ± 1,00 x 10⁴) em comparação com os grupos CCR5^{CEC Treg} (31,2 ± 16,44 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (38,0 ± 2,25 x 10⁴), esta diferença não foi significativa (Figura 28E).

Os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD69⁺ isolados dos linfonodos de animais WT^{CEC} (14,5 ± 1,75 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (18,0 ± 0,20 x 10⁴) (Figura 28G). De modo semelhante, não se detectou diferença significativa em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD69⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC Treg} (24,6 ± 8,32 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (29,7 ± 2,78 x 10⁴) em relação ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 28G). No entanto, animais CCR5^{CEC CD4+} apresentaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD69⁺ quando comparado com o grupo WT^{CEC}.

Animais WT^{CEC} (29,5 \pm 1,10 x 10⁴) apresentaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD154⁺ quando comparado com animais CCR5^{CEC} (15,5 \pm 0,61 x

 10^4) (Figura 28I). No entanto, os resultados não mostraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD154⁺ isolados dos linfonodos de animais CCR5^{CEC Treg} (20,8 ± 5,28 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (23,6 ± 2,69 x 10⁴) em relação ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 27I).

13.2. Fenotipagem de células T reguladoras após 35 semanas de carcinogênese química

Os resultados mostraram que os animais WT^{CEC} (4,4 ± 0,53 x 10⁴) apresentaram menor número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RA⁺ quando comparado ao grupo CCR5^{CEC} (69,9 ± 28,39 x 10⁴) (Figura 28B). No entanto, os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RA⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC Treg} (64,3 ± 26,39 x 10⁴), CCR5^{CEC CD4+} (67,0 ± 1,36 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (20,1 ± 2,29 x 10⁴) em relação ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 28B). Os dados também demonstraram número significativamente maior de células T CD4⁺Foxp3⁺CD45RA⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC Treg} e CCR5^{CEC CD4+} quando comparados ao grupo WT^{CEC}.

Os resultados demonstraram que animais CCR5^{CEC} (50,1 ± 6,07 x 10⁴) apresentaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RB⁺ quando comparado ao grupo WT^{CEC} (5,9 ± 2,54 x 10⁴) (Figura 28D). Os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RB⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC Treg} (25,8 ± 11,85 x 10⁴), CCR5^{CEC CD4+} (96,2 ± 8,56 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (36,2 ± 13,59 x 10⁴) em relação ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 28D). Detectou-se menor número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD45RB⁺ nos linfonodos do grupo WT^{CEC} quando comparado ao grupo CCR5^{CEC CD4+}.

Animais CCR5^{CEC} (76,7 ± 20,64 x 10⁴) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD62L⁺ quando comparado com animais WT^{CEC} (4,3 ± 0,44 x 10⁴) (Figura 28F). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+} (75,2 ± 8,58 x 10⁴) e CCR5^{CEC ^{CD8+} (35,3 ± 12,69 x 10⁴), o grupo CCR5^{CEC Treg} (14,4 ± 3,39 x 10⁴) apresentou número significativamente menor de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD62L⁺ quando comparado ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 28F). Os resultados também evidenciaram menor número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD62L⁺ nos linfonodos de animais WT^{CEC} quando comparado com o grupo CCR5^{CEC CD4+}.} As células T CD4⁺Foxp3⁺CD69⁺ foram detectadas em maior número (P < 0,05) nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} (70,1 ± 5,86 x 10⁴) quando comparado aos animais WT^{CEC} (5,6 ± 1,90 x 10⁴) (Figura 28H). No entanto, os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD69⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC Treg} (44,6 ± 18,67 x 10⁴), CCR5^{CEC CD4+} (78,6 ± 16,34 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (34,6 ± 12,79 x 10⁴) em relação ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 28H). Menor número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD69⁺ (P < 0,05) foi isolado dos linfonodos do grupo WT^{CEC} quando comparado ao grupo CCR5^{CEC CD4+}.

Os linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD154⁺ foram isolados em maior número nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} (65,1 ± 25,51 x 10⁴) quando comparado aos animais WT^{CEC} (4,5 ± 0,67 x 10⁴) (Figura 28J). Ademais, os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD154⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} ^{Treg} (85,8 ± 3,28 x 10⁴), CCR5^{CEC CD4+} (134,6 ± 50,27 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (19,5 ± 4,28 x 10⁴) em relação ao grupo CCR5^{CEC} (65,1 ± 25,51 x 10⁴) (Figura 28J). No entanto, os resultados evidenciaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CD154⁺ nos grupos CCR5^{CEC Treg} (85,8 ± 3,28 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (134,6 ± 50,27 x 10⁴) quando comparados com o grupo WT^{CEC} (4,5 ± 0,67 x 10⁴) (Figura 28J).



Figura 28. Fenotipagem de células T reguladoras no linfonodo. Os linfócitos isolados dos linfonodos foram analisados quanto à expressão de (A-B) CD45RA, (C-D) CD45RB, (E-F) CD62L, (G-H) CD69 e (I-J) CD154. Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *P< 0,05.

14. Expressão de marcadores constitutivos ou relacionados com a atividade supressora de células T reguladoras

14.1. Expressão de marcadores constitutivos ou relacionados com atividade supressora de células T reguladoras após 16 semanas de carcinogênese química

O número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺GITR⁺ foi similar nos linfonodos de animais WT^{CEC} (29,5 ± 14,17 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (19,6 ± 0,54 x 10⁴) (Figura 29A). Embora os resultados tenham evidenciado menor número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺GITR⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC} (19,6 ± 0,54 x 10⁴) em comparação com os grupos CCR5^{CEC} ^{Treg} (33,1 ± 16,62 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (41,6 ± 0,35 x 10⁴), esta diferença não foi significativa (Figura 29A).

Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺LAG-3⁺ isolados do linfonodo de animais WT^{CEC} (29,9 ± 6,75 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (16,4 ± 2,62 x 10⁴) (Figura 29C). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+} (27,9 ± 3,06 x 10⁴), os animais CCR5^{CEC Treg} (31,2 ± 5,75 x 10⁴) apresentaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺LAG-3⁺ quando comparado ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 29C).

Em relação à expressão de CD103, detectou-se número similar de linfócitos T $CD4^{+}Foxp3^{+}CD103^{+}$ isolados dos linfonodos de animais WT^{CEC} (14,7 ± 2,48 x 10⁴) e $CCR5^{CEC}$ (18,4 ± 0,27 x 10⁴) (Figura 29E). Detectou-se menor número (P < 0,05) de linfócitos T $CD4^{+}Foxp3^{+}CD103^{+}$ isolados dos linfonodos de animais WT^{CEC} quando comparado aos grupos $CCR5^{CEC Treg}$ (32,6 ± 16,41 x 10⁴) e $CCR5^{CEC CD4+}$ (41,0 ± 0,43 x 10⁴) (Figura 29E).

Os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CTLA-4⁺ isolados dos linfonodos de animais WT^{CEC} (26,8 ± 8,72 x 10⁴) e CCR5^{CEC} (17,6 ± 1,06 x 10⁴) (Figura 29G). Ao contrário do grupo CCR5^{CEC CD4+} (31,6 ± 0,83 x 10⁴), o grupo CCR5^{CEC Treg} (42,1 ± 5,00 x 10⁴) apresentou maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CTLA-4⁺ em comparação com o grupo CCR5^{CEC} (Figura 29G).

Os resultados mostraram que os animais WT^{CEC} (35,2 ± 3,65 x 10⁴) apresentaram maior número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺PD-1⁺ quando comparado ao grupo CCR5^{CEC} (14,5 ± 3,10 x 10⁴) (Figura 29I). No entanto, os resultados não mostraram

diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T $CD4^{+}Foxp3^{+}PD-1^{+}$ isolados dos linfonodos de animais $CCR5^{CEC Treg}$ (35,6 ± 9,47 x 10⁴) e $CCR5^{CEC CD4+}$ (31,1 ± 3,34 x 10⁴) em relação ao grupo $CCR5^{CEC}$ (Figura 29I).

14.2. Expressão de marcadores constitutivos ou relacionados com atividade supressora de células T reguladoras após 35 semanas de carcinogênese química

Os resultados mostraram que os animais CCR5^{CEC} (54,9 ± 1,57 x 10⁴) apresentaram maior número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺GITR⁺ quando comparado ao grupo WT^{CEC} (5,7 ± 2,65 x 10⁴) (Figura 29B). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas no número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺GITR⁺ isolados dos linfonodos de animais CCR5^{CEC Treg} (29,3 ± 8,61 x 10⁴), CCR5^{CEC CD4+} (80,9 ± 20,70 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (35,9 ± 13,73 x 10⁴) quando comparados ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 29B). No entanto, detectou-se maior número (P < 0,05) de células T CD4⁺Foxp3⁺GITR⁺ nos linfonodos de animais CCR5^{CEC CD4+} quando comparado com o grupo WT^{CEC}.

Maior número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺LAG-3⁺ foi isolado dos linfonodos de animais CCR5^{CEC} (59,8 ± 25,63 x 10⁴) quando comparado ao grupo WT^{CEC} (4,0 ± 0,23 x 10⁴) (Figura 29D). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas no número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺LAG-3⁺ em animais CCR5^{CEC Treg} (63,3 ± 30,45 x 10⁴), CCR5^{CEC CD4+} (134,3 ± 29,81 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (22,6 ± 1,52 x 10⁴) quando comparados ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 29D). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD8+} (22,6 ± 1,52 x 10⁴), os grupos CCR5^{CEC Treg} (63,3 ± 30,45 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD4+} (134,3 ± 29,81 x 10⁴) apresentaram maior número (P < 0,05) de células T CD4⁺Foxp3⁺LAG-3⁺ em relação ao grupo WT^{CEC} (Figura 29D).

Os resultados demonstraram número significativamente maior de linfócitos T $CD4^{+}Foxp3^{+}CD103^{+}$ isolados dos linfonodos de animais $CCR5^{CEC}$ (48,3 ± 5,94 x 10⁴) quando comparado ao grupo WT^{CEC} (4,5 ± 2,74 x 10⁴) (Figura 29F). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas no número de linfócitos T $CD4^{+}Foxp3^{+}CD103^{+}$ em animais $CCR5^{CEC Treg}$ (37,4 ± 9,82 x 10⁴), $CCR5^{CEC CD4+}$ (78,5 ± 6,95 x 10⁴) e $CCR5^{CEC CD8+}$ (21,7 ± 2,10 x 10⁴) quando comparados ao grupo $CCR5^{CEC}$ (48,3 ± 5,94 x 10⁴) (Figura 29F). Ademais, o grupo $CCR5^{CEC CD4+}$ apresentou número significativamente maior de linfócitos T $CD4^{+}Foxp3^{+}CD103^{+}$ quando comparado ao grupo WT^{CEC} .

Animais CCR5^{CEC} (61,7 ± 28,35 x 10⁴) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CTLA-4⁺ quando comparado com animais WT^{CEC} (4,4 ± 0,99 x 10⁴) (Figura 29H). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas no número de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CTLA-4⁺ isolados dos linfonodos de animais CCR5^{CEC Treg} (71,8 ± 27,59 x 10⁴), CCR5^{CEC CD4+} (166,1 ± 26,30 x 10⁴) e CCR5^{CEC CD8+} (28,0 ± 13,00 x 10⁴) quando comparado ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 29H). Os resultados também evidenciaram menor número (P < 0,05) de linfócitos T CD4⁺Foxp3⁺CTLA-4⁺ isolados do grupo WT^{CEC} quando comparado com os grupos CCR5^{CEC Treg} e CCR5^{CEC CD4+}.

Os resultados demonstraram número significativamente maior de linfócitos T $CD4^{+}Foxp3^{+}PD-1^{+}$ isolados dos linfonodos de animais $CCR5^{CEC}$ (71,6 ± 28,55 x 10⁴) quando comparado com o grupo WT^{CEC} (4,5 ± 1,03 x 10⁴) (Figura 29J). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas no número de linfócitos T $CD4^{+}Foxp3^{+}PD-1^{+}$ isolados dos animais $CCR5^{CEC Treg}$ (64,2 ± 31,29 x 10⁴), $CCR5^{CEC CD4+}$ (134,4 ± 31,70 x 10⁴) e $CCR5^{CEC CD8+}$ (17,3 ± 7,36 x 10⁴) quando comparados ao grupo $CCR5^{CEC}$ (71,6 ± 28,55 x 10⁴) (Figura 29J). Ademais, o grupo WT^{CEC} apresentou número significativamente menor de linfócitos T $CD4^{+}Foxp3^{+}PD-1^{+}$ quando comparado aos grupos $CCR5^{CEC Treg}$ e $CCR5^{CEC CD4+}$.



Figura 29. Fenotipagem de T reguladoras no linfonodo. Os linfócitos isolados dos linfonodos foram analisados quanto à expressão de (A-B) GITR, (C-D) LAG-3, (E-F) CD103, (G-H) CTLA-4 e (I-J) PD-1. Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *P< 0,05.

15. Perforina e granzima em linfócitos T CD8⁺ no linfonodo

15.1. Perforina e granzima em linfócitos T CD8⁺ após 16 semanas de carcinogênese química

Os resultados demonstraram número significativamente maior de linfócitos T $CD8^+Perforina^+$ isolados dos linfonodos de animais WT^{CEC} (16,1 ± 0,69 x 10⁵) quando comparado aos animais $CCR5^{CEC}$ (3,10 ± 0,12 x 10⁵) (Figura 30A). O número de linfócitos T $CD8^+$ expressando perforina isolados dos linfonodos de animais $CCR5^{CEC}$ foi menor (P < 0,05) em relação aos grupos $CCR5^{CEC Treg}$ (16,9 ± 1,79 x 10⁵) e $CCR5^{CEC CD4+}$ (19,7 ± 4,96 x 10⁵) (Figura 30A).

Os resultados demonstraram número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺ expressando granzima nos linfonodos de animais WT^{CEC} (110,5 ± 36,87 x 10⁵) quando comparado com animais CCR5^{CEC} (26,8 ± 4,58 x 10⁵) (Figura 30C). Os resultados não mostraram diferenças significativas no número de linfócitos T CD8⁺Granzima⁺ em animais CCR5^{CEC Treg} (4,29 ± 2,35 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (5,2 ± 1,07 x 10⁵) quando comparados ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 30C). No entanto, os grupos CCR5^{CEC Treg} (4,29 ± 2,35 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (5,2 ± 1,07 x 10⁵) de linfócitos T CD8⁺Granzima⁺ quando comparados com o grupo WT^{CEC} (Figura 30C).

15.2. Perforina e granzima em linfócitos T CD8⁺ após 35 semanas de carcinogênese química

Os resultados demonstraram número significativamente maior de linfócitos T $CD8^+Perforina^+$ isolados dos linfonodos de animais $CCR5^{CEC}$ (12,1 ± 1,18 x 10⁵) quando comparado aos animais WT^{CEC} (5,3 ± 0,25 x 10⁵) (Figura 30B). No entanto, os resultados não mostraram diferenças significativas no número de linfócitos T $CD8^+$ expressando perforina dos animais $CCR5^{CEC Treg}$ (9,9 ± 0,31 x 10⁵), $CCR5^{CEC CD4+}$ (10,4 ± 0,50 x 10⁵) e $CCR5^{CEC}$ ($CD8^+$ (13,5 ± 4,56 x 10⁵) quando comparados ao grupo $CCR5^{CEC}$ (Figura 30C).

Os resultados mostraram que os animais CCR5^{CEC} (338,2 ± 32,01 x 10⁵) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺granzima⁺ quando comparado ao grupo WT^{CEC} (5,1 ± 0,60 x 10⁵) (Figura 30D). De modo semelhante, animais CCR5^{CEC Treg} (45,1 ± 10,37 x 10⁵), CCR5^{CEC CD4+} (65,9 ± 13,99 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD8+} (53,9 ± 4,06 x 10⁵) apresentaram menor número (P < 0,05) de linfócitos T CD8⁺ expressando granzima quando comparado com o grupo CCR5^{CEC} (Figura 30D).



Figura 30. Fenotipagem de linfócitos T CD8⁺ **no linfonodo.** As colunas representam o número de linfócitos isolados dos linfonodos expressando perforina (A-B) e granzima (C-D). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *P< 0,05.

16. Expressão de Fas e FasL em linfócitos do linfonodo

16.1. Expressão de Fas e FasL em linfócitos T CD4⁺ após 16 semanas de carcinogênese química

O número de linfócitos T CD4⁺Fas⁺ isolados dos linfonodos de animais WT ^{CEC} (129,8 \pm 8,65 x 10⁵) foi significativamente maior ao encontrado em animais CCR5^{CEC} (30,7 \pm 0,86 x 10⁵) (Figura 31A). Animais CCR5^{CEC} (30,7 \pm 0,86 x 10⁵) apresentaram número significativamente menor de linfócitos T CD4⁺ expressando Fas em comparação com animais CCR5^{CEC Treg} (192,3 \pm 19,86 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (176,9 \pm 4,51 x 10⁵) (Figura 31A).

Os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺ expressando FasL isolados dos linfonodos de animais WT^{CEC} ($2,6 \pm 0,24 \times 10^5$) e CCR5^{CEC} ($0,5 \pm 0,10 \times 10^5$) (Figura 31C). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+} ($6,5 \pm 2,42 \times 10^5$), animais CCR5^{CEC Treg} ($4,3 \pm 0,70 \times 10^5$) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺CD178⁺ quando comparado ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 31C).

16.2. Expressão de Fas e FasL em linfócitos T CD4⁺ após 35 semanas de carcinogênese química

Os resultados não mostraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺ expressando Fas isolados dos linfonodos de animais WT^{CEC} (47,6 ± 10,95 x 10^5) e CCR5^{CEC} (26,0± 10,90 x 10^5) (Figura 31B). Os animais CCR5^{CEC Treg} (211,2 ± 11,25 x 10^5), CCR5^{CEC CD4+} (131,3 ± 20,41 x 10^5) e CCR5^{CEC CD8+} (138,2 ± 36,72 x 10^5) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺CD95⁺ quando comparado aos grupos WT^{CEC} e CCR5^{CEC} (Figura 31B).

Os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD4⁺CD178⁺ isolados dos linfonodos de animais WT^{CEC} ($2,6 \pm 1,05 \times 10^5$) e CCR5^{CEC} ($0,8 \pm 0,16 \times 10^5$) (Figura 31D). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD8+} ($4,7 \pm 0,79 \times 10^5$), os animais dos grupos CCR5^{CEC Treg} ($15,2 \pm 2,34 \times 10^4$) e CCR5^{CEC CD4+} ($10,2 \pm 1,33 \times 10^5$) apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD4 expressando FasL quando comparados ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 31D). No entanto, apenas o grupo CCR5^{CEC} (Figura 31D). Treg apresentou maior número de linfócitos T CD4⁺CD178⁺ quando comparado com o grupo WT^{CEC}.



Figura 31. Análise da expressão de Fas e FasL por linfócitos T CD4⁺ do linfonodo. As colunas representam o número de linfócitos isolados dos linfonodos expressando de CD95/Fas (A-B) e CD178/FasL (C-D). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *P< 0,05.

16.3. Expressão de Fas e FasL em linfócitos T CD8⁺ após 16 semanas de carcinogênese química

O número de linfócitos T CD8⁺ expressando Fas isolado dos linfonodos de animais WT^{CEC} (134,7 ± 7,14 x 10⁵) foi significativamente maior ao encontrado em animais CCR5^{CEC} (85,1 ± 5,70 x 10⁵) (Figura 32A). No entanto, os resultados não mostraram diferenças significativas no número de linfócitos T CD8⁺CD95⁺ isolados dos linfonodos de animais CCR5^{CEC Treg} (47,4 ± 9,00 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (144,9 ± 53,19 x 10⁵) quando comparados ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 32A).

Os resultados demonstraram maior número de linfócitos T CD8⁺ expressando FasL isolados dos linfonodos de animais $CCR5^{CEC}$ (13,2 ± 5,73 x 10⁵) quando comparado aos animais WT^{CEC} (4,5 ± 1,36 x 10⁵), porém esta diferença não foi significativa (Figura 32C). De modo semelhante, não se detectou diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD8⁺CD178⁺ em animais CCR5^{CEC Treg} (2,8 ± 1,00 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD4+} (18,8 ± 3,46 x 10⁵) quando comparado ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 32C). No entanto, o grupo CCR5^{CEC CD4+} apresentou número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺ expressando Fas-L quando comparado ao grupo WT^{CEC}.

16.4. Expressão de Fas e FasL em linfócitos T CD8⁺ após 35 semanas de carcinogênese química

Os resultados não demonstraram diferenças significativas em relação ao número de linfócitos T CD8⁺ expressando Fas isolado dos linfonodos de animais WT^{CEC} (31,7 ± 7,17 x 10⁵) e CCR5^{CEC} (52,4 ± 6,68 x 10⁵) (Figura 32B). Os resultados evidenciaram menor número (P < 0,05) de linfócitos T CD8⁺CD95⁺ isolados dos linfonodos de animais CCR5^{CEC} (52,4 ± 6,68 x 10⁵) em comparação com os grupos CCR5^{CEC Treg} (100,2 ± 8,31 x 10⁵), CCR5^{CEC CD4+} (93,2 ± 21,71 x 10⁵) e CCR5^{CEC CD8+} (116,9 ± 30,28 x 10⁵) (Figura 32B). Animais dos grupos CCR5^{CEC Treg}, CCR5^{CEC CD4+} e CCR5^{CEC CD8+} também apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺CD95⁺ quando comparado ao grupo WT^{CEC} (Figura 32B).

O número de linfócitos T CD8⁺ expressando FasL foi similar nos linfonodos de animais WT^{CEC} $(1,2 \pm 0,55 \times 10^5)$ e CCR5^{CEC} $(3,0 \pm 1,84 \times 10^5)$ (Figura 32D). Embora os resultados tenham evidenciado maior número de linfócitos T CD8⁺CD178⁺ isolados dos linfonodos de animais CCR5^{CEC Treg} $(10,2 \pm 2,01 \times 10^5)$, CCR5^{CEC CD4+} $(11,4 \pm 6,79 \times 10^5)$ e CCR5^{CEC CD8+} $(9,1 \pm 4,04 \times 10^5)$ quando comparado com o grupo CCR5^{CEC} $(3,0 \pm 1,84 \times 10^5)$, esta diferença não foi significativa (Figura 32D). No entanto, animais dos grupos CCR5^{CEC Treg}, CCR5^{CEC CD4+} e CCR5^{CEC CD8+} apresentaram número significativamente maior de linfócitos T CD8⁺CD178⁺ quando comparado ao grupo WT^{CEC}.



Figura 32. Análise da expressão de Fas e FasL por linfócitos T CD8⁺ do linfonodo. As colunas representam o número de linfócitos isolados dos linfonodos expressando de CD95/Fas (A-B) e CD178/FasL (C-D). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *P<0,05.

17. Análise da citotoxicidade de células NK

A citotoxicidade de células NK isoladas do baço de animais dos grupos controle (Sham), WT e CCR5KO submetidos à carcinogênese química foram avaliadas contra células de linfoma murino (YAC-1) por citometria de fluxo (Figura 33).

17.1. Análise da citotoxicidade de células NK após 16 semanas de carcinogênese química

Os resultados evidenciaram que a atividade citotóxica de células NK isoladas de animais do grupo controle (WT^{Sham}) foi significativamente maior quando comparada com os grupos WT^{CEC}, CCR5^{CEC} e CCR5^{Sham} (Figura 33). As células NK isoladas de animais CCR5^{CEC CD4+} apresentaram maior atividade citotóxica em comparação com o grupo CCR5^{CEC} (Figura 33). Os resultados demonstraram que não há diferenças significativas entre a atividade citotóxica de células NK isoladas de animais do grupo WT^{CEC} e CCR5^{CEC} (Figura 33).

17.2. Análise da citotoxicidade de células NK após 35 semanas de carcinogênese química

Os resultados evidenciaram que nas proporções de 10:1 e 25:1 (E:A) a atividade citotóxica de células NK de animais WT^{Sham} foi significativamente maior quando comparada com o grupo WT^{CEC} (Figura 33). Os grupos CCR5^{CEC Treg} e CCR5^{CEC CD4+} também apresentaram maior atividade citotóxica em comparação com o grupo CCR5^{Sham} (Figura 33). Ademais, nas proporções de 25:1 e 50:1 o grupo CCR5^{CEC CD8+} apresentou menor atividade citotóxica de células NK quando comparado com animais CCR5^{CEC} (Figura 33). Nas proporções de 10:1, 25:1 e 50:1 (E:A) a atividade citotóxica de células NK de animais CCR5^{CEC} foi significativamente maior quando comparada com o grupo WT^{CEC} (Figura 33).



Figura 33. Análise de citotoxicidade de células NK. A ação citotóxica das células NK (E) isoladas do baço de camundongos WT^{Sham},WT^{CEC} , $CCR5^{Sham}$, $CCR5^{CEC}$, $CCR5^{C$

18. Análise da produção de quimiocinas no microambiente tumoral

A produção de quimiocinas no microambiente tumoral e na pele de animais do grupo controle (Sham) foi avaliada por ELISA (Figura 34).

18.1. Análise da produção de quimiocinas após 16 semanas de carcinogênese química

Alto nível de CCL-4 (P < 0,05) foi detectado nas amostras de tecido de animais WT^{CEC} em comparação com o grupo WT^{Sham} (Figura 34A). De modo semelhante, observou-se produção significativamente maior de CCL4 nas amostras de animais CCR5^{CEC} quando comparado ao grupo controle (CCR5^{Sham}) (Figura 34A). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC} $^{CD4+}$, animais CCR5^{CEC Treg} apresentaram maior produção de CCL4 (P < 0,05) quando comparado ao grupo CCR5^{Sham} (Figura 34A). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação à produção de CCL4 nas lesões de animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC} (Figura 34A).

Baixo nível de CCL5 foi detectado nas amostras dos grupos WT^{CEC} e WT^{Sham} (Figura 34C). De modo contrário, o grupo $CCR5^{CEC}$ apresentou maior produção de CCL5 (P < 0,05) em comparação com o grupo $CCR5^{Sham}$ (Figura 34C). Ao contrário dos animais $CCR5^{CEC}$ $^{CD4+}$, detectou-se maior concentração de CCL5 em amostras de animais $CCR5^{CEC Treg}$ quando comparado com o grupo $CCR5^{Sham}$ (Figura 34C). Embora se detectasse maior produção de CCL5 em amostras de animais grupo WT^{CEC} , esta diferença não foi significativa (Figura 34C).

Alto nível de CCL17 foi detectado em amostras de animais do grupo WT^{CEC} em comparação com o grupo WT^{Sham} (Figura 34E). Embora se detectasse maior produção de CCL17 em amostras de animais CCR5^{CEC} quando comparado com as amostras de animais do grupo CCR5^{Sham}, esta diferença não foi significativa (Figura 34E). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC Treg}, animais do grupo CCR5^{CEC CD4+} apresentaram maior produção de CCL17 (P < 0,05) quando comparado aos grupos CCR5^{Sham} e CCR5^{CEC} (Figura 34E). Os resultados também evidenciaram que os animais WT^{CEC} apresentaram produção significativamente maior de CCL17 quando comparado com o grupo CCR5^{CEC} (Figura 34E).

A análise da produção de CCL22 evidenciou maiores níveis desta citocina nas amostras de animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC} quando comparados com os respectivos controles (WT^{sham} e CCR5^{Sham}) (Figura 34G). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+}, detectou-se maior produção de CCL22 nas lesões de animais CCR5^{CEC Treg} quando comparado com o grupo CCR5^{Sham} (Figura 34G). Embora os resultados tenham evidenciado maior produção de

CCL22 nas amostras de animais WT^{CEC} em comparação com o grupo CCR5^{CEC}, esta diferença não foi significativa (Figura 34G).

18.2. Análise da produção de quimiocinas após 35 semanas de carcinogênese química

Alto nível de CCL4 foi detectado nas amostras do grupo WT^{CEC} quando comparado com o grupo controle (WT^{sham}) (Figura 34B). De modo contrário, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação à produção de CCL4 nas amostras de animais CCR5^{CEC} e CCR5^{Sham} (Figura 34B). Animais CCR5^{CEC Treg}, CCR5^{CEC CD4+} e CCR5^{CEC} ^{CD8+} apresentaram maior produção de CCL4 (P < 0,05) quando comparado ao grupo CCR5^{Sham} (Figura 34B). Ademais, animais CCR5^{CEC Treg} e WT^{CEC} apresentaram produção significativamente maior de CCL4 quando comparado com o grupo CCR5^{CEC} (Figura 34B).

Alto nível de CCL5 foi detectado nas amostras do grupo WT^{CEC} quando comparado com o grupo controle (WT^{sham}) (Figura 34D). De modo semelhante, o grupo $CCR5^{CEC}$ apresentou maior produção (P < 0,05) de CCL5 em relação ao grupo $CCR5^{Sham}$ (Figura 34D). Alta produção de CCL5 (P < 0,05) foi detectada em amostras de animais $CCR5^{CEC Treg}$, $CCR5^{CEC CD4+}$ e $CCR5^{CEC CD8+}$ quando comparado com o grupo $CCR5^{Sham}$ (Figura 34D). No entanto, apenas os animais $CCR5^{CEC CD4+}$ e $CCR5^{CEC CD8+}$ apresentaram níveis significativamente maiores desta quimiocina quando comparado com o grupo $CCR5^{CEC}$ (Figura 34D). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação à produção de CCL5 nas lesões de animais WT^{CEC} e $CCR5^{CEC}$.

Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação à produção de CCL17 nas amostras de animais WT^{CEC} e $CCR5^{CEC}$ quando comparado a seus respectivos controles (WT^{Sham} e $CCR5^{Sham}$) (Figura 34F). Ao contrário dos animais $CCR5^{CEC CD4+}$, animais $CCR5^{CEC Treg}$ e $CCR5^{CEC CD8+}$ apresentaram maior produção de CCL17 (P < 0,05) quando comparado ao grupo $CCR5^{Sham}$ (Figura 34F). No entanto, apenas em amostras do grupo $CCR5^{CEC Treg}$ detectou-se alto nível de CCL17 (P < 0,05) em comparação com o grupo $CCR5^{CEC}$ (Figura 34F).

Alto nível de CCL22 foi detectado nas amostras do grupo WT^{CEC} quando comparado com o grupo WT^{Sham} (Figura 34H). De modo contrário, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação à produção de CCL22 nas amostras de animais CCR5^{CEC} e CCR5^{Sham} (Figura 34H). Embora dados tenham evidenciado maior produção de CCL22 em amostras de animais CCR5^{CEC CD4+}, CCR5^{CEC Treg} e CCR5^{CEC CD8+}, quando comparado ao grupo CCR5^{Sham}, apenas o grupo CCR5^{CEC Treg} apresentou produção significativamente maior desta citocina em relação ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 34H).





19. Análise da produção de citocinas no microambiente tumoral

A produção decitocinas pró-inflamatórias (IL-12, IFN- γ , TNF- α e IL-17) e antiinflamatórias (TGF- β e IL-10) no microambiente e tumoral e pele de animais do grupo controle (Sham) foi avaliada por ELISA (Figuras 35-36).

19.1. Análise da produção de citocinas após 16 semanas de carcinogênese química

Alto nível de IL-12 foi detectado nas amostras de animais do grupo WT^{CEC} em comparação com o grupo WT^{Sham} (Figura 35A). Embora os animais CCR5^{CEC} tenham apresentado maior quantidade de IL-12 nas amostras quando comparado com os animais CCR5^{Sham}, esta diferença não foi significativa (Figura 35A). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC Treg}, animais do grupo CCR5^{CEC CD4+} apresentaram maior produção (P < 0,05) de IL-12 quando comparado ao grupo CCR5^{Sham} (Figura 35A). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação à produção de IL-12 nas lesões de animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC} (Figura 35A).

A produção de IFN- γ foi estatisticamente maior nas lesões do grupo WT^{CEC} quando comparado com o grupo controle (WT^{sham}) (Figura 35C). Os resultados também evidenciaram maior nível de IFN- γ em amostras de animais do grupo CCR5^{CEC} quando comparado com grupo controle (CCR5^{Sham}) (Figura 35C). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+}, animais do grupo CCR5^{CEC Treg} apresentaram maior produção de IFN- γ (P < 0,05) quando comparado ao grupo CCR5^{Sham} (Figura 35C). Ademais, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação à produção de IFN- γ nas lesões de animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC} (Figura 35C).

A análise da produção de TNF- α evidenciou maiores níveis desta citocina nas lesões de animais dos grupos WT^{CEC} e CCR5^{CEC} quando comparados com os respectivos controles (WT^{sham} e CCR5^{Sham}) (Figura 35E). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+}, os animais CCR5^{CEC Treg} exibiram alto nível de TNF- α quando comparado como grupo CCR5^{Sham} (Figura 35E). Os resultados evidenciaram produção significativamente maior de TNF- α nas amostras de animais WT^{CEC} em comparação com o grupo CCR5^{CEC} (Figura 35E).

Alto nível de IL-17 foi detectado nas amostras do grupo WT^{CEC} quando comparado com o grupo WT^{sham} (Figura 35G). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas

em relação à produção de IL-17 nas amostras de animais CCR5^{CEC} e CCR5^{Sham} (Figura 35G). Ao contrário dos animais CCR5^{CEC CD4+}, os animais CCR5^{CEC Treg} exibiram alto nível de IL-17 quando comparado com o grupo CCR5^{Sham} (Figura 35G). Ademais, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação à produção de IL-17 nas lesões de animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC} (Figura 35G).

As amostras dos animais WT^{CEC} apresentaram nível elevado de TGF- β (P < 0,05) comparado com o grupo controle (WT^{sham}) (Figura 36A). De modo semelhante, os animais $CCR5^{CEC}$ e $CCR5^{CEC Treg}$ apresentaram produção significativamente maior de TGF- β quando comparado ao grupo controle ($CCR5^{Sham}$) (Figura 36A). Ademais, detectou-se uma quantidade significativamente menor de TGF- β nas lesões de animais $CCR5^{CEC CD4+}$ em relação ao grupo $CCR5^{CEC}$ (Figura 36A). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação à produção de TGF- β nas lesões de animais WT^{CEC} e $CCR5^{CEC}$ (Figura 36A).

Alto nível de IL-10 foi detectado nas amostras do grupo WT^{CEC} quando comparado com o grupo controle (WT^{sham}) (Figura 36C). De modo semelhante, o grupo $CCR5^{CEC}$ apresentou maior produção de IL-10 (P < 0,05) em relação ao grupo $CCR5^{Sham}$ (Figura 36C). Ao contrário dos animais $CCR5^{CEC CD4+}$, os animais $CCR5^{CEC Treg}$ exibiram maior produção de IL-10 quando comparado com o grupo $CCR5^{Sham}$ (Figura 36C). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação à produção de IL-10 nas lesões de animais WT^{CEC} e $CCR5^{CEC}$ (Figura 36C).

19.2. Análise da produção de citocinas após 35 semanas de carcinogênese química

Os resultados evidenciaram maior produção de IL-12 nas amostras de animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC} quando comparado aos seus respectivos controles (WT^{Sham} e CCR5^{Sham}) (Figura 35B). Animais CCR5^{CEC Treg}, CCR5^{CEC CD4+} e CCR5^{CEC CD8+} também apresentaram maior nível de IL-12 (P < 0,05) em relação ao grupo CCR5^{Sham}, porém, apenas o grupo CCR5^{CEC CD8+} apresentou produção significativamente maior desta citocina em comparação com o grupo CCR5^{CEC} (Figura 35B). Os resultados evidenciaram produção significativamente maior de IL-12 nas amostras de animais CCR5^{CEC} quando comparado ao grupo WT^{CEC} (Figura 35B).

Baixo nível de IFN- γ foi detectado nas amostras dos grupos WT^{CEC} e WT^{Sham} (Figura 35D). De modo semelhante, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação à produção de IFN- γ nas amostras de animais CCR5^{CEC} e CCR5^{Sham} (Figura 35D). No entanto, verificou-se que, ao contrário dos animais CCR5^{CEC Treg}, animais CCR5^{CEC CD4+} e CCR5^{CEC CD8+} apresentaram alta produção IFN- γ quando comparado com o grupo CCR5^{Sham} (Figura 35D). Ademais, detectou-se uma quantidade significativamente maior de IFN- γ nas lesões de animais CCR5^{CEC CD8+} em comparação com o grupo CCR5^{CEC} (Figura 35D). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação à produção de IFN- γ nas lesões de animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC} (Figura 35D).

A análise da produção de TNF- α não demonstrou diferenças significativas em relação aos níveis desta citocina nas amostras de animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC} quando comparados aos seus respectivos controles (WT^{Sham} e CCR5^{Sham}) (Figura 35F). De modo contrário, detectou-se nível significativamente alto de TNF- α nas amostras de animais CCR5^{CEC Treg}, CCR5^{CEC CD4+} e CCR5^{CEC CD8+} quando comparado com o grupo controle (CCR5^{Sham}) (Figura 35F). Ademais, detectou-se maior quantidade de TNF- α (P < 0,05) nas lesões de animais CCR5^{CEC CD4+} em relação ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 35F). Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação à produção de TNF- α nas lesões de animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC} (Figura 35F).

Os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação à produção de IL-17 nas amostras de animais WT^{CEC} e WT^{Sham} (Figura 35H). De modo contrário, maior produção de IL-17 foi detectada nas amostras de animais $CCR5^{CEC}$ quando comparado com o grupo controle ($CCR5^{Sham}$) (Figura 35H). Animais dos grupos $CCR5^{CEC Treg}$, $CCR5^{CEC CD4+}$ e $CCR5^{CEC CD8+}$ também apresentaram maior produção de IL-17 (P < 0,05) em comparação com o grupo $CCR5^{Sham}$, porém, apenas o grupo $CCR5^{CEC Treg}$ apresentou produção significativamente maior desta citocina em relação ao grupo $CCR5^{CEC}$ (Figura 35H). Os resultados evidenciaram produção significativamente maior de IL-17 nas amostras de animais $CCR5^{CEC}$ quando comparado com o grupo WT^{CEC} (Figura 35H).

Baixos níveis de TGF- β foram detectados nas amostras dos grupos WT^{CEC} e WT^{Sham} (Figura 36B). De modo semelhante, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação à produção de TGF- β nas amostras de animais CCR5^{CEC} e CCR5^{Sham} (Figura 36B). Animais dos grupos CCR5^{CEC} T^{reg}, CCR5^{CEC} CD4+</sup> e CCR5^{CEC} CD8+ apresentaram maior produção de TGF- β (*P* < 0,05) quando comparado com o grupo CCR5^{Sham}, porém, apenas o

grupo CCR5^{CEC Treg} apresentou produção significativamente maior desta citocina em relação ao grupo CCR5^{CEC} (Figura 36B). Ademais, os resultados não evidenciaram diferenças significativas em relação à produção de TGF- β nas lesões de animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC} (Figura 36B).

A análise da produção de IL-10 não demonstrou diferença significativa em relação ao nível desta citocina nas amostras de animais WT^{CEC} e WT^{Sham} (Figura 36D). De modo contrário, produção significativamente maior de IL-10 foi detectada nas amostras de animais $CCR5^{CEC}$ quando comparado com grupo controle ($CCR5^{Sham}$) (Figura 36D). Ao contrário dos animais $CCR5^{CEC CD8+}$, os animais $CCR5^{CEC CD8+}$, os animais $CCR5^{CEC CD4+}$ apresentaram maior produção de IL-10 (P < 0,05) quando comparado com o grupo $CCR5^{Sham}$ (Figura 36D). Ademais, detectou-se uma quantidade significativamente maior de IL-10 nas lesões de animais $CCR5^{CEC Treg}$ em relação ao grupo $CCR5^{CEC}$ (Figura 36D). Os resultados também evidenciaram que os animais $CCR5^{CEC}$ apresentaram maior produção de IL-10 em comparação com os animais WT^{CEC} , porém, esta diferença não foi significativa (Figura 36D).



Figura 35. Análise das citocinas pró-inflamatórias no microambiente tumoral. Os gráficos representam a média \pm SD da concentração de IL-12 (A-B), IFN- γ (C-D), TNF- α (E-F) e IL-17 (G-H). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. **P*< 0,05.


Figura 36. Análise das citocinas anti-inflamatórias no microambiente tumoral. Os gráficos representam a média \pm SD da concentração de TGF- β (A-B) e IL-10 (C-D). Dados representativos de três experimentos independentes. Os resultados foram avaliados pelo teste de ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. **P*< 0,05.

Discussão

As células Treg estão envolvidas nos mecanismos de evasão da resposta imune por células tumorais (SAKAGUCHI; POWRIE, 2007; NISHIKAWA; SAKAGUCHI, 2010). O acúmulo destas células em estágios iniciais da tumorigênese e o aumento de Tregs com o progredir do processo de carcinogênese favorecem a progressão da doença (HIRAOKA et al., 2006). A proporção de células Treg no microambiente tumoral está inversamente relacionada ao prognóstico de vários tipos de cânceres (SINICROPE et al., 2009; SALAMA et al., 2009; CURIEL et al., 2004; BATES et al., 2006; KOBAYASHI et al., 2007). Especula-se que a depleção de células Treg diminua a velocidade de crescimento de tumores, melhore a eficácia da terapia imunológica no tratamento de diferentes tipos de câncer e prolongue a sobrevida (ZOU, 2006; COLOMBO; PICONESE, 2007). Estudo recente do nosso grupo mostrou que a deleção de células reguladoras favorece o desenvolvimento de resposta imune protetora antitumoral, o que prejudica a progressão de carcinoma espinocelular (RAMOS et al., 2012). Assim, interferir com a migração de células T reguladoras seria um alvo de grande interesse para futuras terapias, uma vez que interferindo com a migração destas células poderia ocorrer uma efetiva diminuição nos mecanismos de escape tumoral. O recrutamento preferencial de células Treg ao invés de outros tipos de células T pode ser explicado pela expressão diferencial de receptores de quimiocinas, como CCR5, demonstrado em diversos modelos de estudo (TAN et al., 2009; ZHANG, et al., 2010; ROBINSON et al., 2003; BARASHI et al., 2013; LEE et al., 2012). Uma vez que células T reguladoras expressam CCR5 e migram para tecidos inflamados via a interação de CCR5 com seus ligantes, buscamos esclarecer quais seriam os mecanismos implicados com a migração destas células para o microambiente tumoral durante o desenvolvimento de carcinoma espinocelular e, inicialmente, avaliamos o desenvolvimento de tumores em animais geneticamente deficientes de CCR5.

Os resultados do presente estudo evidenciaram que camundongos CCR5KO são menos susceptíveis à carcinogênese química, apresentando menor incidência e número de papilomas, sugerindo que a migração de células CCR5⁺ tem um importante papel no desenvolvimento e, especialmente na progressão de CEC quimicamente induzido. Associado aos dados de menor número de lesões em animais CCR5^{CEC} observou-se também o desenvolvimento de papilomas com menor grau de displasia epitelial. Na fase de progressão verificou-se o desenvolvimento de lesões de CEC *in situ* por animais CCR5KO em combinação com a maior infiltração leucocitária, enquanto camundongos WT^{CEC} apresentaram lesões de CEC bem diferenciado e menor infiltração leucocitária após 35 semanas de carcinogênese química.

Uma possível explicação para a menor suscetibilidade de animais CCR5^{CEC} ao desenvolvimento de CEC poderia estar associada a alterações nos mecanismos de resposta imune, desta forma, o próximo passo foi avaliar a proporção e perfil de células inflamatórias no microambiente tumoral e linfonodos. Os resultados evidenciaram diferenças significativas no número de leucócitos isolados das lesões e linfonodos dos animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC}. sendo que esta diferenca foi mais evidente na fase de progressão, quando os animais CCR5^{CEC} apresentaram alto número de leucócitos isolados das lesões. Ao caracterizar o infiltrado inflamatório, foi observada elevada frequência de células mielóides e dendríticas nas lesões dos animais CCR5KO na fase de promoção e de linfócitos B e T CD4⁺ e células NK na fase de progressão, associada à baixa frequência de células Treg (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) nas lesões destes animais. Por outro lado, em amostras de animais WT^{CEC} observou-se elevado número linfócitos B e T CD4⁺ na fase de progressão associado elevado número de linfócitos T CD8⁺ e células Treg nas fases de promoção e progressão tumoral. Os resultados de fenotipagem e expressão de marcadores de superfície por células T convencionais e reguladoras foram empregados para a caracterização das células e estabelecimento dos perfis de ativação celular. Estes resultados indicam que CCR5 regula críticos aspectos do desenvolvimento de CEC. A migração de células T CD4⁺ e CD8⁺ ocorre de forma independente de CCR5, porque a ausência deste receptor não afetou o número de células presentes no microambiente tumoral. A migração de células T reguladoras é dependente de CCR5. Em acordo com esses dados estudos mostraram que o bloqueio de CCR5 resultou em menor acúmulo de células Treg em sítios de infecção por Leishmania major (YURCHENKO et al., 2006) e de adenocarcinoma pancreático (TAN et al., 2009) sem afetar de forma significativa a migração de células T efetoras para estes locais.

Estes dados reforçam as evidências de que o recrutamento específico de células Treg representa um mecanismo pelo qual o tumor pode escapar da vigilância imunológica, sugerindo que o bloqueio da migração de células Treg pode favorecer a defesa imunológica antitumoral (GOBERT et al., 2009; QIN, 2009). Os animais WT foram mais suscetíveis ao desenvolvimento de CEC através de um mecanismo associado à produção de quimiocinas (CCL4, CCL17 e CCL22) que direcionaram a migração de células Treg para o microambiente tumoral resultando em menor ativação da resposta imune antitumoral. Essa ideia é reforçada pela menor suscetibilidade de animais CCR5KO que, por sua vez, não produziram níveis de fatores quimiotáticos significativos no microambiente tumoral, onde também se detectou menor infiltração de células Treg e maior ativação da resposta imune. Assim estabelecemos a

relação de que o acúmulo de células Treg favorece o desenvolvimento de CEC quimicamente induzido.

O acúmulo de células Treg $CCR5^+$ no microambiente tumoral poderia explicar o desenvolvimento de lesões CEC em animais do grupo controle e, possivelmente associadas ao pior prognóstico. Vários estudos demonstram que um aumento no número destas células em cânceres como de pâncreas, mama, pulmão e ovário correlaciona-se com uma menor sobrevivência dos pacientes. Por outro lado alguns autores correlacionam o aumento de Treg no tecido tumoral a um favorável prognóstico para a doença (LIYANAGE et al., 2002; WOO et al., 2002; SHEVACH, 2004; SATO et al., 2005; BADOUAL et a., 2006). No presente modelo de estudo, a presença de células Treg no microambiente tumoral poderia inibir a função efetora das células NK e, provavelmente, a atividade citotóxica de células T CD8⁺ e a atividade efetora de linfócitos T CD4⁺ (TURK et al., 2004; SAKAGUCHI; POWRIE, 2007). A liberação de granzima e perforina constitui um dos principais mecanismos de eliminação das células tumorais mediado por linfócitos T CD8⁺ (TRAPANI; SMYTH, 2002; LIEBERMAN, 2003). Estudos demonstraram que além de suprimir a proliferação de células T CD8⁺, as células Treg inibem a atividade citotóxica destas células suprimindo a produção de perforina e IFN-y favorecendo a progressão de diferentes tipos de tumores (TRZONKOWSKI et al., 2004; STREET; CRETNEY; SMYTH, 2001; CHEN et al., 2005). Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, onde maior expressão de granzima e perforina foi detectada por linfócitos T CD8⁺ isolados do linfonodo de animais do grupo CCR5KO, durante a fase de progressão. Essas alterações na quantidade de mediadores citotóxicos poderiam ser relacionadas à menor incidência e agressividade das lesões em animais CCR5KO, uma vez que animais do grupo controle (WT), que apresentaram desenvolvimento mais rápido de CEC, apresentaram menor expressão destas moléculas por linfócitos T CD8⁺.

Outro mecanismo relevante que poderia justificar o desenvolvimento de lesões invasivas em animais do grupo controle, e mediado por células T CD8⁺, seria a indução de apoptose de células tumorais. Nos últimos anos, muitos autores têm reconhecido na indução de apoptose um mecanismo importante tanto para o desenvolvimento como para o controle imune e, portanto, para a manutenção da homeostasia (BUDD, 2001). Tem sido demonstrado que indução de apoptose não só possibilita a seleção de linfócitos T e B, através da eliminação de células autorreativas, mas também é um importante mecanismo de controle da

resposta imune na periferia, além de desempenhar papel fundamental nos processos de citotoxicidade mediada por células e, consequentemente na eliminação de patógenos e células tumorais (HILDEMAN et al., 2007; KHONG; RESTIFO, 2002). Estudos demonstraram que a expressão de Fas tornou as células tumorais mais imunogênicas e, por isso mais suscetíveis à atividade citotóxica de linfócitos T $CD8^+$ e, foi correlacionada com o atraso na progressão tumoral (BRADLEY et al. 1998; LEE et al., 2000). De acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, onde maior expressão de Fas-FasL foi detectada por linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ isolados das lesões de animais do grupo CCR5KO, poderíamos especular que esta via de eliminação de células tumorais poderia estar ocorrendo em nosso modelo e poderia explicar a menor suscetibilidade de animais CCR5KO ao desenvolvimento de tumores induzidos quimicamente. Outro aspecto relacionado à via Fas-FasL, que esclareceria o atraso no desenvolvimento de CEC em animais CCR5KO seria a indução de apoptose das células Treg que expressam Fas, por linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ ec $D8^+$ eccentemente relatada por um estudo que demonstrou que células T $CD8^+$ ativadas, expressando FasL induzem a apoptose de células Treg (KILINC et al., 2009).

Outro importante achado de nosso estudo refere-se à observação de que as células T peritumorais isoladas de animais do grupo CCR5KO apresentam um perfil de ativação diferente das células T peritumorais isoladas de animais do grupo controle. Altas proporções linfócitos T CD8⁺ expressando marcadores de ativação, bem como células T CD4⁺CD45RB⁺ (memória) foram detectadas nas lesões de animais CCR5KO na fase de promoção. Estes dados poderiam suportar a hipótese de que as células Treg peritumorais influenciaram negativamente a ativação de linfócitos T e, este seria um dos mecanismos que favoreceriam o desenvolvimento de CEC. Outro dado importante observado nesses animais foi a maior detecção de IL-12 no microambiente tumoral. IL-12 tem sido descrita por apresentar um efeito protetor durante a resposta imune antitumoral e camundongos deficientes de IL-12 são mais suscetíveis ao desenvolvimento de CEC induzido quimicamente (HE et al., 2012). No entanto, o efeito protetor de IL-12 pode ser revertido pela ação de IL-17 através de diferentes mecanismos de imunossupressão, dentre os quais se destaca a inibição da infiltração de células T CD8⁺, favorecendo o desenvolvimento de tumores induzidos quimicamente (HE et al., 2012; YUSUF et al., 2008). Isto poderia explicar o desenvolvimento tardio de CEC em animais CCR5KO que, de fato, apresentaram menor infiltração de células T CD8⁺ e maior produção de IL-17 após 35 semanas de carcinogênese química.

Outro aspecto relevante para o rápido estabelecimento e desenvolvimento de CEC em animais do grupo controle (WT^{CEC}) poderia estar relacionado à elevada produção de TNF-α e TGF- β na fase de promoção. TNF- α está envolvido na promoção e progressão de câncer e, animais deficientes de TNF- α ou de seu receptor (TNF-R1) são resistentes à carcinogênese química (ARNOTT et al., 2004; BALKWILL, 2006; KNIGHT et al., 2000). TGF-β está relacionado à invasão tumoral e, associado ao TNF-a, induz angiogênese e influencia negativamente a atividade antitumoral mediada por células NK, T CD8⁺ e de macrófagos, favorecendo o desenvolvimento de tumores (LIN; KARIN, 2007; TIAN; NEIL; SCHIEMANN, 2011). Outro mecanismo que também explicaria o rápido estabelecimento e desenvolvimento de CEC no grupo WT estaria relacionado à alta produção de IL-10, associada ao elevado número de linfócitos B, no microambiente tumoral. Corroborando com esta hipótese, há relatos de que a produção de IL-10 por células B influencia a resposta imune antitumoral (INOUE et al., 2006). Além disso, camundongos deficientes de células B são menos suscetíveis ao desenvolvimento de papilomas induzido quimicamente (SCHIOPPA et al., 2011). Essas possibilidades associadas à elevada proporção de linfócitos B detectada nas lesões de animais CCR5KO também poderiam explicar porque a ausência de células Treg CCR5⁺ não inibiu completamente o desenvolvimento de CEC em animais deficientes de CCR5. Dessa forma, constatamos que a migração de células Treg para o microambiente tumoral é dependente de CCR5 e as células Treg CCR5⁺ favorecem o desenvolvimento de CEC.

Uma vez que verificamos que a deficiência de CCR5 resultou em menor suscetibilidade de animais CCR5KO ao desenvolvimento de CEC, e esta menor suscetibilidade foi associada à baixa frequência de células Treg no microambiente tumoral, questionamos quais fatores estariam relacionados com o recrutamento de células Treg via CCR5. Para confirmar a associação entre a menor suscetibilidade ao desenvolvimento de CEC induzido quimicamente com a menor infiltração de células Treg devido o bloqueio da migração destas via CCR5, avaliamos o desenvolvimento de CEC em animais CCR5KO submetidos à transferência adotiva de células Treg (CCR5^{CEC Treg}). Os resultados do presente estudo evidenciaram que camundongos CCR5^{CEC Treg} foram mais susceptíveis à carcinogênese química, apresentando precoce incidência e multiplicidade de tumores superior a detectada em animais CCR5KO e WT, confirmando que a migração de células Treg CCR5⁺ tem um importante papel no desenvolvimento de CEC quimicamente induzido. Associado aos dados de maior número de lesões em animais CCR5^{CEC CEC} observou-se também o desenvolvimento de CEC indiferenciado

(tumores indiferenciados metastatizam mais frequentemente) nestes animais, sugerindo que a presença de células Treg CCR5⁺ favorece o desenvolvimento de lesões com pior prognóstico do que àquelas observadas em animais WT e CCR5KO.

Em seguida, analisamos a proporção e perfil de células inflamatórias no microambiente tumoral e linfonodos de animais CCR5KO submetidos à transferência adotiva de células T reguladoras. Os resultados evidenciaram que animais $CCR5^{CEC Treg}$ apresentaram elevada frequência de macrófagos, células mielóides e dendríticas, linfócitos CD19⁺, T CD4⁺, T CD8⁺ e células Treg na fase de progressão, associado a baixo número de células NK nas fases de promoção e progressão tumoral. Já na fase de promoção, o número destas células em animais $CCR5^{CEC Treg}$ foi inferior ao detectado nas lesões de animais WT e CCR5KO. Associada a detecção de elevado número de leucócitos nos linfonodos e baixa frequência destas células nas lesões de animais $CCR5^{CEC Treg}$, estes resultados sugerem que a progressão de CEC está relacionada com a influência que as células Treg exercem na ativação e/ ou quimiotaxia de leucócitos para o microambiente tumoral. Desta forma, as células T reguladoras CCR5⁺ exercem um fino controle na magnitude da resposta imune antitumoral, e estas células influenciam negativamente a ativação e/ou migração das células efetoras, facilitando o desenvolvimento do tumor.

Como já mencionado, as células Treg inibem a resposta imune antitumoral e constituem um dos principais obstáculos para o sucesso de tratamentos imunoterapêuticos no combate ao câncer (ZOU, 2006; CURIEL, 2007; QIN, 2009). Assim como demonstramos, crescentes evidências apontam o impacto negativo destas células em linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (TURK et al., 2004; KHAZAIE; VON BOEHMER, 2006; SAKAGUCHI; POWRIE, 2007). Em virtude disso, avaliamos a expressão de granzima e perforina por linfócitos T CD8⁺ de animais CCR5^{CEC Treg} e, detectamos que apenas a expressão de granzima foi menor em linfócitos T CD8⁺ isolados de linfonodos destes animais nas fases de promoção e progressão. Estes resultados sugerem que, outros mecanismos poderiam estar sendo utilizados para supressão da atividade citotóxica destes linfócitos. Outro aspecto que favoreceria o desenvolvimento de CEC em animais CCR5^{CEC Treg} seria a indução de apoptose das células T CD4⁺ e CD8⁺ via Fas-FasL como já foi demonstrado por estudos (RIVOLTINI et al., 2002) e que, de fato, foram detectadas em elevadas proporções nos linfonodos destes animais, na fase de progressão, o que explicaria o desenvolvimento de CEC indiferenciado nestes animais. Por outro lado, as lesões dos animais CCR5^{CEC Treg} também apresentaram

baixa frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando CD62L, CD25, CD45RB e CD152 na fase de progressão. Tais resultados poderiam estar sinalizando para uma menor ativação desta população de linfócitos T e esse poderia ser um fator relacionado ao precoce aparecimento de lesões nestes animais, confirmando a importância da função citotóxica destas células. Confirmando também que as células Treg influenciaram negativamente a ação de linfócitos T CD8⁺, e este seria um dos mecanismos que favoreceriam o desenvolvimento de CEC. Outro mecanismo que poderia colaborar para o desenvolvimento de CEC indiferenciado em animais CCR5KO que receberam a transferência adoptiva de células T reguladoras estaria relacionado à elevada frequência de células mielóides supressoras detectada nas lesões e linfonodos destes animais na fase de progressão. Estudos recentes indicam que estas células, possivelmente, interagem com células Treg para o estabelecimento de um microambiente tumoral imunossupressor (SCHLECKER et al., 2012). As células mielóides afetam severamente a resposta imune contra tumores, principalmente através da inibição da função de células T CD8⁺ citotóxicas pela interferência na ligação entre TCR e complexo antigênico (SOLITO; BRONTE; MANDRUZZATO, 2011). Acreditamos que a progressão de tumores induzidos quimicamente observada neste estudo, poderia ser favorecida pelo acúmulo de células mielóides no microambiente tumoral, e estas células seriam uma importante fonte de CCL5 e, esta quimiocina direcionaria a quimiotaxia de células Treg via CCR5, favorecendo a progressão tumoral.

Ao verificarmos o estabelecimento de CEC indiferenciado em animais CCR5^{CEC Treg}, comprovamos a relação de que a menor ativação da resposta imune foi, de fato, associada à presença de células Treg CCR5⁺. Em seguida avaliamos quais mediadores inflamatórios estariam correlacionados com a supressão da resposta imune antitumoral pela presença de células T reguladoras CCR5⁺. Os dados apontaram para elevada produção de TNF- α e IL-17 no microambiente tumoral, e estas citocinas criariam, dessa forma, um microambiente favorável para o desenvolvimento tumoral. De fato, alta produção de IL-17 tem sido relatada em diferentes tipos de tumores (MIYAHARA et al., 2008; LE GOUVELLO et al., 2008). Estudo recente associou a progressão de tumores, induzidos quimicamente, com a alta frequência de células mielóides e menor infiltração de linfócitos T CD8⁺ induzidos por IL-17 (HE et al., 2012). Adicionalmente, a elevada produção de IL-10 e TGF- β nas lesões de animais CCR5^{CEC Treg} poderiam ser correlacionadas com a supressão da resposta imune antitumoral, e poderia ser produzidas pelas células T reguladoras detectadas em maior número no microambiente tumoral. TGF- β inibe a proliferação de células T e a ativação de

macrófagos o que poderia contribuir para um microambiente favorável para o desenvolvimento tumoral, como o observado nas amostras de animais que receberam a transferência de células T reguladoras CCR5⁺ (SHEVACH, 2002; TIEMESSEN et al., 2007; HAO et al., 2012). De modo relevante, estudos revelam que TGF- β e IL-10 criam um microambiente favorável para a conversão de células T CD4⁺CD25⁻FOXP3⁻ em células T reguladoras CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ capazes de suprimir a resposta imune antitumoral e com base nessa informação seria possível especular que a conversão de células T convencionais em T reguladoras induzidas (iTreg) poderia ocorrer nas lesões destes animais, contribuindo para a progressão tumoral (KHONG; RESTIFO, 2002; SHEVACH, 2002; FRANCISCO et al., 2009; JOSEFOWICZ; RUDENSKY, 2009; BILATE; LAFAILLE, 2012). Ainda sob este aspecto, elevada produção de CCL5 foi observada nas lesões de animais CCR5^{CEC Treg} na fase de promoção tumoral. A produção de CCL5 no microambiente tumoral contribuiu para o desenvolvimento de diversos tipos de tumores (MROWIETZ et al., 1999; SUGASAWA et al., 2008; TAN et al., 2009) e, foi associada a progressão tumoral (SCHLECKER et al., 2012). Combinado com evidências que mostram alta expressão de CCL5 correlacionada com o escape e progressão tumoral, via infiltração de células Treg e indução de apoptose de linfócitos T CD8⁺ (SCHLECKER et al., 2012; CHANG et al., 2012), é de suma importância a realização de estudos que investiguem a utilidade do uso desta quimiocina como biomarcador de prognóstico de CEC e seu eventual auxílio nas tomadas de decisão em relação à escolha de tratamento mais adequado. Em conjunto estes resultados indicam que a migração, via CCR5, de células Treg, de fato, exerce importante papel na promoção e progressão de tumores quimicamente induzidos. Estas células Treg afetariam diferentes aspectos da imunidade antitumoral

Outro aspecto relevante de nosso estudo foi à observação de que células T CD4⁺ CCR5⁺ também apresentam um importante papel no desenvolvimento tumoral. Avaliamos o desenvolvimento de CEC em animais CCR5KO submetidos à transferência adotiva de células T CD4⁺ convencionais (T CD4⁺CD25⁻CCR5⁺) e detectamos o aparecimento precoce e elevada frequência de papilomas nestes animais. Estas lesões apresentaram características microscópicas similares ao grupo CCR5KO na fase de promoção. No entanto, após 35 semanas de carcinogênese química, constatou-se o desenvolvimento de CEC moderadamente diferenciado com características intermediárias as observadas em lesões de animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC Treg}. Além disso, detectamos menor número de leucócitos nas lesões de animais CCR5^{CEC CD4+} em comparação com animais WT^{CEC} e CCR5^{CEC}, nas fases de promoção e progressão, sugerindo que a presença de células T CD4⁺CD25⁻CCR5⁺ tem um importante papel na modulação da resposta imune durante o desenvolvimento de CEC quimicamente induzido. A caracterização do infiltrado inflamatório revelou que apenas as células T CD4⁺ foram detectadas em proporções elevadas nas lesões de animais CCR5^{CEC CD4+} na fase de progressão. Por outro lado, a frequência de células NK observada nas lesões destes animais foi similar, na fase de promoção e inferior, na fase de progressão à detectada em animais CCR5KO. Sendo que a baixa proporção de linfócitos T CD8⁺ expressando perforina e granzima na fase de promoção favoreceria o aparecimento precoce e elevada frequência de papilomas. Tais evidências apontam para um papel de células T CD4⁺CCR5⁺ na inibição da ativação/e ou migração de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos resultando em maior suscetibilidade de animais CCR5^{CEC CD4+} à carcinogênese química.

Para confirmar a associação entre a maior infiltração de células T CD4⁺CCR5⁺ e a inibição da ativação de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, avaliou-se o desenvolvimento de CEC em animais CCR5KO submetidos à transferência adotiva de células T CD8⁺. Interessantemente, os resultados do presente estudo evidenciaram que camundongos CCR5^{CEC CD8+} foram menos susceptíveis à carcinogênese química, mesmo apresentando precoce incidência e multiplicidade de tumores superior a detectada em animais CCR5KO, observou-se inibição da progressão de papilomas para CEC, sugerindo que a migração de células T CD8⁺CCR5⁺ tem um importante papel no controle do desenvolvimento de CEC quimicamente induzido. O perfil de células inflamatórias no microambiente tumoral e linfonodos de animais CCR5^{CEC CD8+} evidenciou alto número de macrófagos, células mielóides, linfócitos B e T CD8⁺, células NK e baixa frequência de células Treg nos linfonodos e nas lesões destes animais. De modo relevante, constatou-se, similarmente aos animais WT^{CEC}, as lesões do grupo CCR5^{CEC CD8+} apresentaram um predomínio de linfócitos T CD8⁺ em relação ao número de linfócitos T CD4⁺, no entanto este dado não foi acompanhado da elevada frequência de células Treg detectada nas lesões de animais WT^{CEC}, o que contribui para a menor susceptibilidade desses animais a carcinogênese química. A importância da atividade citotóxica de células T CD8⁺ no controle da progressão tumoral, neste modelo estudo, é mais reforçada pelo fato de que animais do grupo CCR5^{CEC CD8+} apresentaram em suas lesões, maior frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando granzima e perforina em relação aos grupos CCR5KO e WT. A alta produção de IL-12, IFN-y e TNF-a foi verificada nas lesões de animais CCR5^{CEC CD8+}, indicando que as células T, NK e macrófagos poderiam ser suficientemente ativados, e isso contribuiria para o estabelecimento

de uma resposta imune desfavorável à progressão tumoral. De fato, a presença de IL-12 é relacionada o desenvolvimento de resposta imune do padrão Th1 que, por sua vez, induz a produção IFN- γ e TNF- α que estimulam a atividade citotóxica de linfócitos T CD8⁺ e células NK, induz a polarização M1 de macrófagos e inibe a angiogênese promovendo o desenvolvimento de resposta imune antitumoral eficaz (KNUTSON; DISIS, 2005; MANTOVANI; ALLAVENA; SICA, 2004; POLLARD, 2004; HAO et al., 2012). Principalmente em relação à progressão de papilomas para CEC, esta modulação é relevante, uma vez que as células T CD8⁺ e NK constituem duas das mais importantes populações celulares no combate às células tumorais e, um eventual prejuízo na atividade citotóxica das células NK isoladas do baço dos animais avaliados foi similar entre os grupos. Contudo, como não realizamos ensaios com células NK isoladas das lesões, não podemos afirmar que o microambiente tumoral não influenciou a atividade citotóxica destas células.

Assim sendo, nossos estudos demonstraram que a ausência de CCR5, leva a um atraso no desenvolvimento e progressão de CEC, sugerindo que a deficiência deste receptor prejudica a migração de células Treg. Associado a esse dado estabeleceu-se uma correlação entre a quimotaxia de células Treg dependente de CCR5 e a promoção e progressão de CEC, mostrando que estas células regulam aspectos críticos desta doença, sugerindo que o bloqueio da migração de células Treg CCR5⁺ pode ser uma importante estratégia para prevenção da progressão tumoral.



Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que:

- Camundongos CCR5KO são menos suscetíveis ao desenvolvimento de CEC induzido quimicamente.
- A menor susceptibilidade de animais CCR5KO ao desenvolvimento de CEC está correlacionada com a menor presença de células Treg no microambiente tumoral.
- A menor suscetibilidade de animais CCR5KO pode ser revertida pela transferência adotiva de células Treg CCR5⁺ que favoreceu o desenvolvimento de CEC indiferenciado. A suscetibilidade está associada à elevada produção das citocinas IL-10, IL-17, TNF-α, TGF-β e quimiocinas CCL4, CCL17, CCL22 no microambiente tumoral.
- A transferência adotiva de células T CD4⁺CD25⁻CCR5⁺ aumenta suscetibilidade de animais CCR5KO a carcinogênese química, observando-se o desenvolvimento de CEC moderadamente diferenciado e foi associada ao acúmulo de linfócitos T CD4⁺ e inibição da ativação de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos no microambiente tumoral.
- A transferência de células T CD8⁺CCR5⁺ para animais CCR5KO inibiu a progressão de papilomas para CEC e foi associada ao acúmulo de células T CD8⁺, IL-12, IFN-γ e TNF-α no microambiente tumoral.
- A função efetora de células T CD8⁺ no microambiente tumoral é influenciada pela presença de linfócitos T CD4⁺ e de células Treg.
- A migração de células Treg para o microambiente tumoral é dependente de CCR5
 e as células Treg CCR5⁺ favorecem o desenvolvimento de CEC.

Referências

REFERÊNCIAS

Abel EL, Angel JM, Kiguchi K, DiGiovanni J. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. Nat Protoc. 2009;4(9):1350-62.

Alam M, Ratner D. Cutaneous squamous-cell carcinoma. N Engl J Med. 2001;344(13):975-83.

Algood HM, Flynn JL. CCR5-deficient mice control Mycobacterium tuberculosis infection despite increased pulmonary lymphocytic infiltration. J Immunol. 2004;173(5):3287-96.

Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25+CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. J Immunol. 2001;166(5):3008–18.

An P, Nelson GW, Wang L, Donfield S, Goedert JJ, Phair J, et al. Modulating influence on HIV/AIDS by interacting RANTES gene variants. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(15):10002-7.

Appay V, Rowland-Jones SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. Trends Immunol. 2001;22(2):83-7.

Arnott CH, Scott KA, Moore RJ, Robinson SC, Thompson RG, Balkwill FR. Expression of both TNF-alpha receptor subtypes is essential for optimal skin tumour development. Oncogene. 2004;23(10):1902-10.

Azenshtein E, Luboshits G, Shina S, Neumark E, Shahbazian D, Weil M, et al. The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. Cancer Res. 2002;62(4):1093-102.

Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, Kitamura T, Hirai H. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. Cancer Res. 2003;63(15):4516-20.

Bäckvall H, Asplund A, Gustafsson A, Sivertsson A, Lundeberg J, Ponten F. Genetic tumor archeology: microdissection and genetic heterogeneity in squamous and basal cell carcinoma. Mutat Res. 2005;571(1-2):65-79.

Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay Nel H, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. Clin Cancer Res. 2006;12(2):465-72.

Bagaeva LV, Williams LP, Segal BM. IL-12 dependent/IFN gamma independent expression of CCR5 by myelin-reactive T cells correlates with encephalitogenicity. J Neuroimmunol. 2003;137(1-2):109-16.

Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. J Clin Oncol. 2006;24(34):5373-80.

Bayne LJ, Beatty GL, Jhala N, Clark CE, Rhim AD, Stanger BZ, et al. Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor regulates myeloid inflammation and T cell immunity in pancreatic cancer. Cancer Cell. 2012;21(6):822-35.

Balasenthil S, Rao KS, Nagini S. Altered cytokeratin expression during chemoprevention of hamster buccal pouch carcinogenesis by S-allylcysteine. Polish J Pharmacol. 2003;55(5):793-8.

Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. Cancer Metastasis Rev. 2006;25(3):409-16.

Barashi N, Weiss ID, Wald O, Wald H, Beider K, Abraham M, et al. Inflammation induced hepatocellular carcinoma is dependent on CCR5. Hepatology. 2013.

Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. Nat Rev Immunol. 2007;7(11):875-88.

Bell JW. Possible immune factors in spontaneous regression of bronchogenic carcinoma. Ten year survival in a patient treated with minimal (1,200 r) radiation alone. Am J Surg. 1970;120(6):804-6.

Bettini ML, Vignali DA. Development of thymically derived natural regulatory T cells. Ann N Y Acad Sci. 2010;1183:1-12.

Bilate AM, Lafaille JJ. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. Annu Rev Immunol. 2012;30:733-58.

Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. Nat Rev Immunol. 2003;3(3):253–7.

Bradel E, Larousserie F, Charlot-Rabiega P, Coulomb-L'Herminé A, Devergne O. Human CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. J Immunol. 2008;181(10):6898-905.

Bradley M, Zeytun A, Rafi-Janajreh A, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Role of spontaneous and interleukin-2-induced natural killer cell activity in the cytotoxicity and rejection of Fas+ and Fas- tumor cells. Blood. 1998;92(11):4248-55.

Budd RC. Activation-induced cell death. Curr Opin Immunol. 2001;13(3):356-62.

Burnet FM. The concept of immunological surveillance. Prog Exp Tumor Res. 1970;13:1-27.

Bystry RS, Aluvihare V, Welch KA, Kallikourdis M, Betz AG. B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. Nat Immunol. 2001;2(12):1126-32.

Caserta S, Borger JG, Zamoyska R. Central and effector memory CD4 and CD8 T-cell responses to tumor-associated antigens. Crit Rev Immunol. 2012;32(2):97-126.

Castriconi R, Cantoni C, Della Chiesa M, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, et al. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(7):4120-5.

Cavassani KA, Campanelli AP, Moreira AP, Vancim JO, Vitali LH, Mamede RC, et al. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. J. Immunol. 2006;177(9):5811–8.

Chang KW, Sarraj S, Lin SC, Tsai PI, Solt D. p53 expression, p53 and Ha-ras mutation and telomerase activation during nitrosamine-mediated hamster pouch carcinogenesis. Carcinogenesis. 2000;21(7):1441-51.

Chang LY, Lin YC, Mahalingam J, Huang CT, Chen TW, Kang CW, et al. Tumor-derived chemokine CCL5 enhances TGF- β -mediated killing of CD8(+) T cells in colon cancer by T-regulatory cells. Cancer Res. 2012;72(5):1092-102.

Chan KS, Sano S, Kiguchi K, Anders J, Komazawa N, Takeda J, et al. Disruption of Stat3 reveals a critical role in both the initiation and the promotion stages of epithelial carcinogenesis. J Clin Invest. 2004;114(5):720-8.

Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, von Boehmer H, et al. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF signals in vivo. PNAS. 2005;102(2):419-24.

Chiou SH, Sheu BC, Chang WC, Huang SC, Hong-Nerng H. Current concepts of tumorinfiltrating lymphocytes in human malignancies. J Reprod Immunol. 2005;67(1-2):35-50.

Choi WT, An J. Biology and clinical relevance of chemokines and chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in human diseases. Exp Biol Med (Maywood). 2011;236(6):637-47.

Colombo MP, Piconese S. Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. 2007;7(11):880-7.

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat Med. 2004;10(9):942-9.

Curiel TJ. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. J Clin Invest. 2007;117(5):1167-74.

Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? Immunity. 2009;30(5):626-35.

Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. Nature. 1996;381(6584):661-6.

Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G. Human CD4+CD25+ regulatory, contact dependent T cells induce interleukin 1-producing, contact independent type 1-like regulatory T cells. J. Exp. Med. 2002;196(2):247–53.

DiGiovanni J. Modification of multistage skin carcinogenesis in mice. Prog Exp Tumor Res. 1991;33:192-229.

Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. Nature. 1996;381(6584):667-73.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol. 2002;3(11):991-8.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. Annu Rev Immunol. 2004;22:329-60.

Eksteen B, Miles A, Curbishley SM, Tselepis C, Grant AJ, Walker LS, et al. Epithelial inflammation is associated with CCL28 production and the recruitment of regulatory T cells expressing CCR10. J Immunol. 2006;177(1):593-603.

Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang LP, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. Nature. 2011;475(7355):226-30.

Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGFbeta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. J Immunol. 2004;172(9):5149–53.

Feuerer M, Hill JA, Mathis D, Benoist C. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. Nat Immunol. 2009;10(7):689-95.

Filler RB, Roberts SJ, Girardi M. Cutaneous two-stage chemical carcinogenesis. CSH Protoc. 2007.

Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limón P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. Nat Rev Immunol. 2010;10(8):554-67.

Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. J Exp Med. 2009;206(13):3015-29.

Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. J Exp Med. 2005;202(8):1075-85.

Gilliam BL, Riedel DJ, Redfield RR. Clinical use of CCR5 inhibitors in HIV and beyond. J Transl Med. 2011;9 Suppl 1:S9.

Gill PS, Brynes R. Recent advances in AIDS-related Kaposi's sarcoma. Curr Opin Oncol. 1989;1(1):57-61.

Gimenez-Conti IB, Slaga TJ. The hamster cheek pouch carcinogenesis model. J Cell Biochem. 1993;17F:83-90.

Gladdy RA, Taylor MD, Williams CJ, Grandal I, Karaskova J, Squire JA, et al. The RAG-1/2 endonuclease causes genomic instability and controls CNS complications of lymphoblastic leukemia in p53/Prkdc-deficient mice. Cancer Cell. 2003;3(1):37-50.

Glick AB, Lee MM, Darwiche N, Kulkarni AB, Karlsson S, Yuspa SH. Targeted deletion of the TGF-beta 1 gene causes rapid progression to squamous cell carcinoma. Genes Dev. 1994;8(20):2429-40.

Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. Cancer Res. 2009;69(5):2000-9.

González-Martín A, Gómez L, Lustgarten J, Mira E, Mañes S. Maximal T cell-mediated antitumor responses rely upon CCR5 expression in both CD4(+) and CD8(+) T cells. Cancer Res. 2011;71(16):5455-66.

Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. Nat Med. 2001;7(10):1118-22.

Gurudutt VV, Genden EM. Cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. J Skin Cancer. 2011;2011:502723.

Guruvayoorappan C. Tumor versus tumor-associated macrophages: how hot is the link? Integr Cancer Ther. 2008;7(2):90-5.

Haiqi H, Yong Z, Yi L. Transcriptional regulation of Foxp3 in regulatory T cells. Immunobiology. 2011;216(6):678-85.

Hao NB, Lü MH, Fan YH, Cao YL, Zhang ZR, Yang SM. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. Clin Dev Immunol. 2012;2012:948098.

He D, Li H, Yusuf N, Elmets CA, Athar M, Katiyar SK, et al. IL-17 mediated inflammation promotes tumor growth and progression in the skin. PLoS One. 2012;7(2):e32126.

Hildeman D, Jorgensen T, Kappler J, Marrack P. Apoptosis and the homeostatic control of immune responses. Curr Opin Immunol. 2007;19(5):516-21.

Hirahara K, Liu L, Clark RA, Yamanaka K, Fuhlbrigge RC, Kupper TS. The majority of human peripheral blood CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells bear functional skinhoming receptors. J Immunol. 2006;177(7):4488-94.

Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. Clin Cancer Res. 2006;12(18):5423-34.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science. 2003;299(5609):1057-61.

Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. Nat Rev Cancer. 2005;5(2):127-35.

Iellem A, Mariani M, Lang R, Recalde H, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F, et al. Unique chemotactic response profile and specific expression of chemokine receptors CCR4 and CCR8 by CD4+CD25+ regulatory T cells. J Exp Med. 2001;194(6):847–53.

Inoue S, Leitner WW, Golding B, Scott D. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. Cancer Res. 2006;66(15):7741-7.

Janes SM, Watt FM. New roles for integrins in squamous cell carcinoma. Nat Rev Cancer. 2006;6(3):175-83.

Josefowicz SZ, Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. Immunity. 2009;30(5):616-25.

Kallikourdis M, Andersen KG, Welch KA, Betz AG. Alloantigen-enhanced accumulation of CCR5+ 'effector' regulatory T cells in the gravid uterus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(2):594-9.

Kerbel RS. Tumor angiogenesis. N Engl J Med. 2008;358(19):2039-49.

Khazaie K, von Boehmer H. The impact of CD4+CD25+ Treg on tumor specific CD8+ T cell cytotoxicity and cancer. Semin Cancer Biol. 2006;16(2):124-36.

Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. Nat Immunol. 2002;3(11):999-1005.

Kilinc MO, Rowswell-Turner RB, Gu T, Virtuoso LP, Egilmez NK. Activated CD8+ Teffector/memory cells eliminate CD4+ CD25+ Foxp3+ T-suppressor cells from tumors via FasL mediated apoptosis. J Immunol. 2009;183(12):7656-60.

Kleinewietfeld M, Puentes F, Borsellino G, Battistini L, Rötzschke O, Falk K. CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the CD25(+)CD4+ T-cell subset. Blood. 2005;105(7):2877-86.

Knight B, Yeoh GC, Husk KL, Ly T, Abraham LJ, Yu C, et al. Impaired preneoplastic changes and liver tumor formation in tumor necrosis factor receptor type 1 knockout mice. J Exp Med. 2000;192(12):1809-18.

Knutson KL, Disis ML. Augmenting T helper cell immunity in cancer. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord. 2005;5(4):365-71.

Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, Ojima H, Kanai Y, Kosuge T, et al. FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. Clin Cancer Res. 2007;13(3):902-11.

Ko K, Yamazaki S, Nakamura K, Nishioka T, Hirota K, Yamaguchi T, et al. Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. J Exp Med. 2005;202(7):885-91.

Kundu JK, Shin YK, Surh YJ. Resveratrol modulates phorbol ester-induced pro-inflammatory signal transduction pathways in mouse skin in vivo: NF-kappaB and AP-1 as prime targets. Biochem Pharmacol. 2006;72(11):1506-15.

Lapouge G, Youssef KK, Vokaer B, Achouri Y, Michaux C, Sotiropoulou PA, et al. Identifying the cellular origin of squamous skin tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(18):7431-6.

Lapteva N, Huang XF. CCL5 as an adjuvant for cancer immunotherapy. Expert Opin Biol Ther. 2010;10(5):725-33.

Lee JK, Sayers TJ, Brooks AD, Back TC, Young HA, Komschlies KL. IFN-gammadependent delay of in vivo tumor progression by Fas overexpression on murine renal cancer cells. J Immunol. 2000;164(1):231-9.

Lee NJ, Choi DY, Song JK, Jung YY, Kim DH, Kim TM, et al. Deficiency of C-C chemokine receptor 5 suppresses tumor development via inactivation of NF-κB and inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 in urethane-induced lung tumor model. Carcinogenesis. 2012;33(12):2520-8.

Le Gouvello S, Bastuji-Garin S, Aloulou N, Mansour H, Chaumette MT, Berrehar F, et al. High prevalence of Foxp3 and IL17 in MMR-proficient colorectal carcinomas. Gut. 2008;57(6):772-9.

Liang S, Alard P, Zhao Y, Parnell S, Clark SL, Kosiewicz MM. Conversion of CD4+ CD25cells into CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. J Exp Med. 2005;201(1):127-37.

Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. Nat Rev Immunol. 2003;3(5):361-70.

Lim HW, Hillsamer P, Kim CH. Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses. J Clin Invest. 2004;114(11):1640–9.

Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. J Clin Invest. 2007;117(5):1175-83.

Liston A, Rudensky AY. Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. Curr Opin Immunol. 2007;19(2):176–85.

Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. J Immunol. 2002;169(5):2756-61.

Loetscher P, Uguccioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. Nature. 1998;391(6665):344-5.

Lu G, Janjic BM, Janjic J, Whiteside TL, Storkus WJ, Vujanovic NL. Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. II. Role of TNF, lymphotoxin-alpha(1)beta(2), Fas ligand, and TNF-related apoptosis-inducing ligand. J Immunol. 2002;168(4):1831-9.

Mailloux AW, Young MR. Regulatory T-cell trafficking: from thymic development to tumorinduced immune suppression. Crit Rev Immunol. 2010;30(5):435-47.

Mañes S, Mira E, Colomer R, Montero S, Real LM, Gómez-Moutón C, et al. CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner. J Exp Med. 2003;198(9):1381-9.

Mantovani A, Allavena P, Sica A. Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. Eur J Cancer. 2004;40(11):1660-7.

Marcusson-Stahl M, Cederbrant K. A flow-cytometric NK-cytotoxicity assay adapted for use in rat repeated dose toxicity studies. Toxicology. 2003;193(3):269-79.

Matsumoto T, Jiang J, Kiguchi K, Ruffino L, Carbajal S, Beltrán L, et al. Targeted expression of c-Src in epidermal basal cells leads to enhanced skin tumor promotion, malignant progression, and metastasis. Cancer Res. 2003;63(16):4819-28.

Mellado M, de Ana AM, Moreno MC, Martínez C, Rodríguez-Frade JM. A potential immune escape mechanism by melanoma cells through the activation of chemokine-induced T cell

death. Curr Biol. 2001;11(9):691-6.

Menning A, Höpken UE, Siegmund K, Lipp M, Hamann A, Huehn J. Distinctive role of CCR7 in migration and functional activity of naive- and effector/memory-like Treg subsets. Eur J Immunol. 2007;37(6):1575-83.

Miller AM, Lundberg K, Ozenci V, Banham AH, Hellström M, Egevad L, et al. CD4+CD25high T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients. J Immunol. 2006;177(10):7398-405.

Mills, K.H. 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? Nat Rev Immunol. 4(11):841-55.

Miyahara Y, Odunsi K, Chen W, Peng G, Matsuzaki J, Wang RF. Generation and regulation of human CD4+ IL-17-producing T cells in ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(40):15505-10.

Modi BG, Neustadter J, Binda E, Lewis J, Filler RB, Roberts SJ, et al. Langerhans cells facilitate epithelial DNA damage and squamous cell carcinoma. Science. 2012;335(6064):104-8.

Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, et al. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. Nat Med. 1999;5(7):828-31.

Moreira AP, Cavassani KA, Massafera Tristão FS, Campanelli AP, Martinez R, Rossi MA, et al. CCR5-dependent regulatory T cell migration mediates fungal survival and severe immunosuppression. J Immunol. 2008;180(5):3049-56.

Motsinger A, Haas DW, Stanic AK, Van Kaer L, Joyce S, Unutmaz D. CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. J Exp Med. 2002;195(7):869-79.

Mrowietz U, Schwenk U, Maune S, Bartels J, Küpper M, Fichtner I, et al. The chemokine RANTES is secreted by human melanoma cells and is associated with enhanced tumour formation in nude mice. Br J Cancer. 1999;79(7-8):1025-31.

Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4+CD25+regulatory T cells is mediated by cell surface bound transforming growth factor β . J Exp Med. 2001;194(5):629-44.

Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD, et al. Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. Blood. 2001;98(9):2736-44.

Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. Int J Cancer. 2010;127(4):759-67.

Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. Cancer Res. 1999;59(13):3128-33.

Owens DM, Watt FM. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. Nat Rev Cancer. 2003;3(6):444-51.

Papadimitrakopoulou VA, Izzo J, Mao L, Keck J, Hamilton D, Shin DM, et al. Cyclin D1 and p16 alterations in advanced premalignant lesions of the upper aerodigestive tract: role in response to chemoprevention and cancer development. Clin Cancer Res. 2001;7(10):3127-34.

Penn I. Cancer in the immunosuppressed organ recipient. Transplant Proc. 1991;23(2):1771-2.

Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, Mandruzzato S, et al. Myeloidderived suppressor cell heterogeneity and subset definition. Curr Opin Immunol. 2010;22(2):238-44.

Perez-Losada J, Balmain A. Stem-cell hierarchy in skin cancer. Nat Rev Cancer. 2003;3(6):434-43.

Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, et al. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. N Engl J Med. 2007;357(25):2552-61.

Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. Nat Rev Cancer. 2004;4(1):71-8.

Qin FX. Dynamic behavior and function of Foxp3+ regulatory T cells in tumor bearing host. Cell Mol Immunol. 2009;6(1):3-13.

Ragin CC, Taioli E, Weissfeld JL, White JS, Rossie KM, Modugno F, et al. 11q13 amplification status and human papillomavirus in relation to p16 expression defines two distinct etiologies of head and neck tumours. Br J Cancer. 2006;95(10):1432-8.

Ramos RN, Oliveira CE, Gasparoto TH, Malaspina TS, Belai EB, Cavassani KA, et al. CD25+ T cell depletion impairs murine squamous cell carcinoma development via modulation of antitumor immune responses. Carcinogenesis. 2012;33(4):902-9.

Rasmussen HB, Timm S, Wang AG, Soeby K, Lublin H, Fenger M, et al. Association between the CCR5 32-bp deletion allele and late onset of schizophrenia. Am J Psychiatry. 2006;163(3):507-11.

Read S, Powrie F. CD4(+) regulatory T cells. Curr Opin Immunol. 2001;13(6):644-49.

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

Robinson SC, Scott KA, Wilson JL, Thompson RG, Proudfoot AE, Balkwill FR. A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth. Cancer Res. 2003;63(23):8360-5.

Ruckdeschel JC, Codish SD, Stranahan A, McKneally MF. Postoperative empyema improves survival in lung cancer. Documentation and analysis of a natural experiment. N Engl J Med. 1972;287(20):1013-7.

Saibil SD, Deenick EK, Ohashi PS. The sound of silence: modulating anergy in T lymphocytes. Curr Opin Immunol. 2007;19(6):658-64.

Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. Nature Immunol. 2005;6(4):345–52.

Sakaguchi S, Powrie F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. Science. 2007;317(5838):627-9.

Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. J Clin Oncol. 2009;27(2):186-92.

Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, et al. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. Eur J Immunol. 1999;29(5):1617-25.

Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. Nature. 1996;382(6593):722-5.

Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8+ tumorinfiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci. 2005;102(51):18538-43.

Schall TJ. Biology of the RANTES/SIS cytokine family. Cytokine. 1991;3(3):165-83.

Schioppa T, Moore R, Thompson RG, Rosser EC, Kulbe H, Nedospasov S, et al. B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(26):10662-7.

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. Nature. 2001;410(6832):1107-11.

Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, Quack C, Falk CS, Umansky V, et al. Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. J Immunol. 2012;189(12):5602-11.

Schreiber RD. Cancer vaccines 2004 opening address: the molecular and cellular basis of cancer immunosurveillance and immunoediting. Cancer Immun. 2005;5 Suppl 1:1.

Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science. 2011;331(6024):1565-70.

Shevach EM. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. Nat Rev Immunol. 2002;2(6):389-400.

Shevach E. Fatal attraction: tumors beckon regulatory T cells. Nat. Rev. Immunol. 2004;10(9):900-901.

Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. Immunity. 2009;30(5):636-45.

Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. J Immunol. 1999;163(10):5211-8.

Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. Nat Immunol. 2002;3(2):135-42.

Sinicrope FA, Rego RL, Ansell SM, Knutson KL, Foster NR, Sargent DJ. Intraepithelial effector (CD3+)/regulatory (FoxP3+) T-cell ratio predicts a clinical outcome of human colon carcinoma. Gastroenterology. 2009;137(4):1270-9.

Skala MC, Squirrell JM, Vrotsos KM, Eickhoff JC, Gendron-Fitzpatrick A, Eliceiri KW, et al. Multiphoton microscopy of endogenous fluorescence differentiates normal, precancerous, and cancerous squamous epithelial tissues. Cancer Res. 2005;65(4):1180-6.

Smyth MJ, Teng MW, Swann J, Kyparissoudis K, Godfrey DI, Hayakawa Y. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. J Immunol. 2006;176(3):1582-7.

Solito S, Bronte V, Mandruzzato S. Antigen specificity of immune suppression by myeloidderived suppressor cells. J Leukoc Biol. 2011;90(1):31-6.

Stary G, Bangert C, Tauber M, Strohal R, Kopp T, Stingl G. Tumoricidal activity of TLR7/8activated inflammatory dendritic cells. J Exp Med. 2007;204(6):1441-51.

Stephens LA, Mottet C, Mason D, Powrie F. Human CD4+CD25+ thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. Eur J Immunol. 2001;31(4):1247–54.

Sterlinko Grm H, Banks L. HPV proteins as targets for therapeutic intervention. Antivir Ther.

2004;9(5):665-78.

Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. Blood. 2001;97(1):192-7.

Sutmuller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, et al. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. J Exp Med. 2001;194(6):823-32.

Sugasawa H, Ichikura T, Kinoshita M, Ono S, Majima T, Tsujimoto H, et al. Gastric cancer cells exploit CD4+ cell-derived CCL5 for their growth and prevention of CD8+ cell-involved tumor elimination. Int J Cancer. 2008;122(11):2535-41.

Szanya V, Ermann J, Taylor C, Holness C, Fathman CG. The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. J Immunol. 2002;169(5):2461–5.

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance is maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte–associated antigen 4. J Exp Med. 2000;192(2):303–10.

Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. Nat Immunol. 2008;9(3):239-44.

Tan MC, Goedegebuure PS, Belt BA, Flaherty B, Sankpal N, Gillanders WE, et al. Disruption of CCR5-dependent homing of regulatory T cells inhibits tumor growth in a murine model of pancreatic cancer. J Immunol. 2009;182(3):1746-55.

Thomas DA, Massagué J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. Cancer Cell. 2005;8(5):369-80.

Thomas SY, Hou R, Boyson JE, Means TK, Hess C, et al. CD1d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th1-type inflammatory homing cells. J Immunol. 2003;171(5):2571-80.

Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. J Exp Med. 1998;188(2):287–96.
Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen non-specific. J Immunol. 2000;164(1):183–90.

Tian M, Neil JR, Schiemann WP. Transforming growth factor- β and the hallmarks of cancer. Cell Signal. 2011;23(6):951-62.

Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJ, John S, Taams LS. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(49):19446-51.

Timar J, Csuka O, Remenar E, Repassy G, Kasler M. Progression of head and neck squamous cell cancer. Cancer Metastasis Rev. 2005;24(1):107-27.

Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. Annu Rev Pathol. 2006;1:119-50.

Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. Nat Rev Immunol. 2002;2(10):735-47.

Trzonkowski P, Szmit E, Myśliwska J, Dobyszuk A, Myśliwski A. CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. Clin Immunol. 2004;112(3):258-67.

Turk MJ, Guevara-Patiño JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Sakaguchi S, Houghton AN. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. J Exp Med. 2004;200(6):771-82.

van Deventer HW, O'Connor W Jr, Brickey WJ, Aris RM, Ting JP, Serody JS. C-C chemokine receptor 5 on stromal cells promotes pulmonary metastasis. Cancer Res. 2005;65(8):3374-9.

Venturi GM, Conway RM, Steeber DA, Tedder TF. CD25+CD4+ regulatory T cell migration requires L-selectin expression: L-selectin transcriptional regulation balances constitutive receptor turnover. J Immunol. 2007;178(1):291-300.

Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. Nat Rev Immunol. 2008;8(7):523-32.

Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. Nat Rev Immunol. 2012;12(4):239-52.

Walker MR, Kasprowicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25-T cells. J Clin Invest. 2003;112(9):1437–43.

Wan YY, Flavell RA. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(14):5126–31.

Wang CR, Liu MF. Regulation of CCR5 expression and MIP-1alpha production in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol. 2003;132(2):371-8.

Wei YQ, Hang ZB. In situ observation of lymphocyte-tumor cell interaction in human lung carcinoma. Immunol Invest. 1989;18(9-10):1095-105.

Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. Nat Immunol. 2010;11(1):7-13.

Woo EY, Yeh H, Chu CS, Schlienger K, Carroll RG, Riley JL, et al. Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. J Immunol. 2002;168:4272–6.

Wu Y, Li YY, Matsushima K, Baba T, Mukaida N. CCL3-CCR5 axis regulates intratumoral accumulation of leukocytes and fibroblasts and promotes angiogenesis in murine lung metastasis process. J Immunol. 2008;181(9):6384-93.

Wysocki CA, Jiang Q, Panoskaltsis-Mortari A, Taylor PA, McKinnon KP, Su L, et al. Critical role for CCR5 in the function of donor CD4+CD25+ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease. Blood. 2005;106(9):3300-7.

Xiao M, Wang C, Zhang J, Li Z, Zhao X, Qin Z. IFNgamma promotes papilloma development by up-regulating Th17-associated inflammation. Cancer Res. 2009;69(5):2010-7.

Yamaguchi T, Hirota K, Nagahama K, Ohkawa K, Takahashi T, Nomura T, et al. Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. Immunity. 2007;27(1):145-59.

Yamazaki T, Yang XO, Chung Y, Fukunaga A, Nurieva R, Pappu B, et al. CCR6 regulates the migration of inflammatory and regulatory T cells. J Immunol. 2008;181(12):8391–401.

Yurchenko E, Tritt M, Hay V, Shevach EM, Belkaid Y, Piccirillo CA. CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4+ regulatory T cells to sites of Leishmania major infection favors pathogen persistence. J Exp Med. 2006;203(11):2451-60.

Yuspa SH. The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis--thirty-third G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. Cancer Res. 1994;54(5):1178-89.

Yuspa SH. The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis. J Dermatol Sci. 1998;17(1):1-7.

Yusuf N, Nasti TH, Katiyar SK, Jacobs MK, Seibert MD, Ginsburg AC, et al. Antagonistic roles of CD4+ and CD8+ T-cells in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene cutaneous carcinogenesis. Cancer Res. 2008;68(10):3924-30.

Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galeotti L, et al. NK cells and cancer. J Immunol. 2007;178(7):4011-6.

Zhang N, Schröppel B, Lal G, Jakubzick C, Mao X, Chen D, Yin N, et al. Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. Immunity. 2009;30:458-69.

Zhang X, Haney KM, Richardson AC, Wilson E, Gewirtz DA, Ware JL, et al. Anibamine, a natural product CCR5 antagonist, as a novel lead for the development of anti-prostate cancer agents. Bioorg Med Chem Lett. 2010;20(15):4627-30.

Zhong MX, Kuziel WA, Pamer EG, Serbina NV. Chemokine receptor 5 is dispensable for innate and adaptive immune responses to Listeria monocytogenes infection. Infect Immun. 2004;72(2):1057-64.

Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. Nat Rev Immunol. 2006;6(10):715-27.

Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. Nat Rev Immunol. 2006;6(4): 295–307.





Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73 PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

> Comissão de Ética no Ensíno e Pesquisa em Animais Fone: (14)3235-8356 e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. № 006/2011

Bauru, 11 de abril de 2011.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado Análise do envolvimento do receptor de quimiocinas- CCR5- na migração de células T reguladoras: correlação com o desenvolvimento de carcinoma espinocelular., de autoria de Carine Ervolino de Oliveira, foi enviado ao relator e considerado APROVADO em reunião desta Comissão realizada nesta data.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr Gustavo Pompermaier Garlet Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Ana Paula Campanelli

Docente do Departamento de Ciências Biológicas