

PAOLA VENDRAMINI FERREIRA ROSA

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA TUMORIGÊNESE
CUTÂNEA INDUZIDA QUIMICAMENTE EM CAMUNDONGOS SELVAGENS E
DEFICIENTES PARA COMPONENTES DA RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

São Paulo
2013

PAOLA VENDRAMINI FERREIRA ROSA

CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NA TUMORIGÊNESE
CUTÂNEA INDUZIDA QUIMICAMENTE EM CAMUNDONGOS SELVAGENS E
DEFICIENTES PARA COMPONENTES DA RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador(a): Dra. Jacqueline de Fátima Jacysyn

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Rosa, Paola Vendramini Ferreira.

Caracterização da resposta inflamatória na tumorigênese cutânea induzida quimicamente em camundongos selvagens e deficientes para componentes da resposta imune adaptativa / Paola Vendramini Ferreira Rosa. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Jacqueline de Fátima Jacysyn.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Carcinogênese química.

Versão do título para o inglês: Characterization of the inflammatory response in chemically induced skin tumorigenesis in wild mice and deficient for components of the adaptive immune response.

1. Pele 2. Câncer 3. DMBA/TPA 4. Camundongos 5. Citocinas
6. Resposta inflamatória I. Profa. Dra. Jacysyn, Jacqueline de Fátima
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0218/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Paola Vendramini Ferreira Rosa.

Título da Dissertação: Caracterização da resposta inflamatória na tumorigênese cutânea induzida quimicamente em camundongos selvagens e deficientes para componentes da resposta imune adaptativa.

Orientador(a): Profa. Dra. Jacqueline de Fátima Jacysyn.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **029** nas fls. **125** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Jacqueline F. Jacysyn**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Papel dos neutrófilos, células NK e Linfócitos T Citotóxicos na proteção contra Carcinogênese*" do qual participam o(s) **Paola Vendramni Ferreira Rosa, Nathália Cruz de Victo**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **17 .05.2012, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 21 de maio de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

Aos meus queridos pais, Rose e Luiz, aos meus filhos amados, Gustavo e Guilherme e aos meus irmãos Raphael e Lucas. Obrigada pelo apoio incondicional e por nunca desistirem de mim.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por não me permitir cair em desânimo, principalmente nas horas de dificuldades, as quais foram muitas nesses dois anos de mestrado, e que nunca me deixou esquecer que pelos meus filhos tudo valeria a pena.

A Dr(a). Jacqueline de Fátima Jacysyn, minha orientadora, a quem devo total gratidão pelos conhecimentos adquiridos em todo o desenvolvimento do meu mestrado, por me permitir realizar um projeto sob sua orientação, e pela oportunidade de conhecê-la e saber quão magnífica pessoa ela é;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a CAPES pelo apoio financeiro.

A minha querida amiga Carolina Quina, pelos incontáveis auxílios durante a execução do projeto, pela fiel amizade, pela paciência e pelos momentos alegres que me fazem, com toda certeza, uma pessoa mais feliz. Obrigada, você é crucial em minha vida.

A minha querida amiga Monique, que mesmo distante por algum tempo, sempre esteve presente. Você me ensinou a ver a vida de uma maneira diferente. Espero um dia poder retribuir todo o carinho.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular Julia, Tiago, Flavia, Maria Emilia, Luciana, Narciso, Daniel, Priscila Denapoli, Priscila, Marcela, Barbara, Barbara Saty, Cristiane, Jennifer, Sandy pelo auxílio e convivência, tornando-se mais que colegas e, sim amigos. E aos colegas que já saíram do laboratório, Inaê e Rodolfo pelo companheirismo.

A colega do Laboratório LIM62, Nathalia pelas conversas e pelo apoio nesses dois anos.

Aos meus familiares, tios e tias, primos e primas, a minha vó Ordalice, vocês fazem parte dessa conquista.

Ao Professor Dr. Gustavo P. Amarante-Mendes pelo espaço cedido, pela colaboração com o projeto e por todo o aprendizado conquistado;

As minhas amigas de moradia, Carla, Juciane e Anna Beatriz, que se tornaram mais que amigas, vocês são minha família paulistana. Vocês também foram essenciais.

Aos meus pais, Rose e Luiz, que me escolheram filha e eu os fiz exemplo. Mãe e Pai sem vocês eu nada seria. Amo vocês.

Aos meus irmãos Raphael e Lucas, que muito amo, pelo apoio incondicional essa conquista também é de vocês.

Aos meus filhos, Gustavo e Guilherme, que são tudo que eu mais amo nessa vida, e que se nunca desisti foi por lembrar que eles existem para alegrar meus dias;

E a todos os meus amigos que direta ou indiretamente me incentivaram e me auxiliaram na formação acadêmica e pessoal.

“Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é caridade.”

S.Tomás de Aquino.

RESUMO

Vendramini PFR. Caracterização da resposta inflamatória na tumorigênese cutânea induzida quimicamente em camundongos selvagens e deficientes para componentes da resposta imune adaptativa. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

No Brasil, o câncer de pele não-melanoma é o mais frequente e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados no país. O câncer representa desequilíbrio na homeostase do organismo e os mecanismos de defesa para controlar as células tumorais envolvem respostas do sistema imune inato e adaptativo, sendo que a primeira reação do organismo é a inflamação. Os eventos que impedem ou inibem o surgimento de células tumorais compreendem desde a resposta primária mediada por células e fatores solúveis até a produção de células citotóxicas e anticorpos. Utilizando um modelo de tumorigênese na pele de camundongos induzida quimicamente, o objetivo deste estudo foi caracterizar a resposta inflamatória em linhagens de camundongos C57BL/6, CD4KO, CD8KO, RAG e NUDE. Para isso utilizamos camundongos dos grupos: C57BL/6, CD4KO, CD8KO, RAG e NUDE, que foram tratados com o carcinógeno DMBA e o agente de promoção tumoral TPA. Os animais foram acompanhados e avaliados por 100 dias, após este período a pele tratada foi retirada e processada para análise de secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias, migração celular e enzima mieloperoxidase (MPO). Não houve diferenças na multiplicidade e incidência de tumores entre os grupos de camundongos avaliados. No entanto, as citocinas pró e anti-inflamatórias foram maiores nos animais CD4KO quando comparados aos outros grupos de animais. A MPO mostrou-se aumentada nos animais CD4KO quando comparados aos outros grupos de animais. Após análise dos resultados com o protocolo de 100 dias, selecionamos as linhagens C57BL/6 WT, CD4KO e NUDE que foram avaliadas 48 horas após tratamento com DMBA. Os animais da linhagem CD4KO apresentaram maior número de neutrófilos e citocinas pró-inflamatórias quando comparados aos grupos C57BL/6 WT e NUDE, enquanto que as citocinas anti-inflamatórias não mostraram diferenças nos 3 grupos tratados. Na análise por citometria de fluxo os linfócitos TCD8 foram vistos em maior porcentagem no linfonodo inguinal dos animais CD4KO quando comparados aos animais WT. Estes resultados sugerem que os linfócitos TCD4 participam do controle da inflamação induzida pelo tratamento com DMBA e TPA, a qual persiste durante o protocolo de tumorigênese nos animais C57BL/6 CD4KO.

Palavras-chave: Pele. Câncer. Camundongos. DMBA/TPA. Citocinas. Resposta inflamatória.

ABSTRACT

Vendramini PFR. Characterization of the inflammatory response in chemically induced skin tumorigenesis in wild mice and deficient for components of the adaptive immune response. [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

In Brazil non-melanoma skin cancer is the most common cancer and accounts for 25% of all malignant tumors reported in the country. Cancer represents imbalance in homeostasis and defense mechanisms to control the tumor cells involving the innate and adaptive immune responses, and the first reaction of the body is inflammation. The events that prevent or inhibit the appearance of tumor cells from primary response comprises cell-mediated and humoral factors to the production of cytotoxic cells and antibodies. Using a model of skin tumorigenesis chemically-induced in mice, the aim of this study was to characterize the inflammatory response in the following strains: C57BL/6 WT, CD4KO, CD8KO, RAG and NUDE mice. For this purpose, we treated the aforementioned strains with the carcinogen DMBA as well as with TPA tumor promoting agent. The animals were followed for 100 days before being subjected to evaluation. The treated skin of these mice was removed and processed for analysis of pro- and anti-inflammatory signals, cell migration and enzyme myeloperoxidase (MPO). We found no differences in tumor incidence and multiplicity between the groups of mice evaluated. However, the pro- and anti-inflammatory cytokines in CD4KO mice were higher than the other groups of animals. The MPO was increased in CD4KO animals when compared to other groups of mice. After analyzing the results of our 100 days protocol, we selected the C57BL/6 WT, CD4KO and NUDE strains that were assessed 48 hours after treatment with DMBA. The CD4KO mice showed higher numbers of neutrophils and pro-inflammatory cytokine than the C57BL/6 WT and NUDE mice, while anti-inflammatory cytokines showed no differences in the three treated groups. The analysis by flow cytometry showed an increase of CD8⁺ T lymphocytes in inguinal lymph node of CD4KO compared to the WT animals. These results suggest that CD4⁺ T lymphocytes participate in the control of inflammation induced by treatment with DMBA and TPA. This DMBA and TPA-dependent inflammation persists throughout the tumorigenesis protocol in C57BL/6 CD4KO mice.

Keywords: Skin. Cancer. Mice. DMBA/TPA. Cytokines. Inflammatory response.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AhR** - Receptor hidrocarboneto de arila
- AIRmax** - Resposta Inflamatória Aguda máxima
- AIRmin** – Resposta Inflamatória Aguda mínima
- ARA-9** - do inglês *AhR associated protein 9*
- ARNT** - Proteína translocadora do AhR
- BCC** - Carcinoma basocelular
- CTLs** - Linfócitos T citotóxicos
- DCs** - Células Dendríticas
- DMBA** - Dimetilbenzenoantraceno
- DO** – Densidade óptica
- ECM** - Matriz extracelular
- ELISA** – Ensaio Imunoenzimático
- EMT** – Transição Epitélio Mesênquimal
- FASL** - Ligante de FAS
- FOXP3** - Forkhead Box P3
- HCl** – Ácido clorídrico
- Hh** - Hedgehog
- Hsp90** - do inglês *heat shock protein*
- H-TAB** - Brometo de Hexadecil-Trimetil Amônio
- IFN** - Interferon
- IL-1** - Interleucina -1
- IL-10** - Interleucina -10
- IL-12** - Interleucina -12
- IL-13** – Interleucina -13
- IL-4** – Interleucina - 4
- IL-6** – Interleucina-6
- INCA** - Instituto Nacional do Câncer

LPS - Lipopolissacarídeo

MCA-3 – 3 metilcolantreno

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

MIP-1 - Proteína inflamatória de macrófagos

MMP - Metaloproteases

MPO - Mieloperoxidase

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NF- κ B - Fator Nuclear B

NK - Células natural killer

PAHs - Hidrocarbonetos poli aromáticos

PBST- PBSTween

SCC - Carcinoma de células escamosas

SFB – Soro Fetal Bovino

STAT-3 - Signal Transducer and Activator of Transcription 3

TA - Temperatura ambiente

TAM – Macrófagos associados ao tumor

TGF- β - Fator de crescimento tumoral

Th – T auxiliar

TMB - 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

TNF – Fator de necrose tumoral

TPA - Tetradecano forbolacetato

TRAIL - Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand / Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral

UV - Luz ultravioleta

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

WT – Wild-type/ camundongos selvagens

XAP-2 - do inglês *X-associated protein 2*

XREs - Xenobióticos

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais camadas da epiderme e estruturas da derme.....	19
Figura 2 - Via de sinalização do receptor AhR	22
Figura 3 - Estágios do modelo de carcinogênese cutânea realizada em camundongos	23
Figura 4 - Inflamação Aguda e Crônica.....	25
Figura 5 - Esquema de delineamento experimental	34
Figura 6 - Imagem representativa da pele dos animais 48 horas após tratamento com DMBA	39
Figura 7 - Imagem representativa da pele dos animais 20 dias após tratamento com DMBA/TPA	39
Figura 8 - Imagem representativa da pele dos animais 100 dias após o tratamento com DMBA/TPA	40
Figura 9 - Multiplicidade e incidência de papilomas na pele dos animais das linhagens C57BL/6, A/J e AIRmin tratados com DMBA/TPA.....	41
Figura 10 - Cortes histológicos dos grupos (a) C57BL/6, (b) A/J e (c) AIRmin 100 dias após tratamento com DMBA/TPA.....	41
Figura 11 - Imagem representativa da pele dos animais 48 horas após tratamento com DMBA	44
Figura 12 - Imagem representativa da pele dos animais 20 dias após tratamento com DMBA/TPA	45
Figura 13 - Imagem representativa da pele dos animais 100 dias após o tratamento com DMBA/TPA	46
Figura 14 - Multiplicidade e incidência de papilomas na pele dos grupos de animais C57BL/6 tratados com DMBA/TPA	47
Figura 15 - Cortes histológicos dos grupos C57BL/6 WT, C57BL/6 CD8KO, C57BL/6 CD4KO, C57BL/6 NUDE e C57BL/6 RAG 100 dias após tratamento com DMBA/TPA.....	49
Figura 16 - Perfil linfocitário no baço dos animais C57BL/6 WT, CD8KO, CD4KO e RAG ..	50
Figura 17 - Perfil linfocitário no linfonodo dos animais C57BL/6 WT, CD8KO, CD4KO e RAG	51
Figura 18 - Quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO) na pele dos grupos de animais C57BL/6.....	52
Figura 19 - Produção de citocinas pró-inflamatórias no macerado de pele dos grupos de camundongos C57BL/6 100 dias após indução da tumorigênese cutânea com DMBA/TPA	54

Figura 20 - Produção de citocinas anti-inflamatórias no macerado de pele dos grupos de camundongos C57BL/6 100 dias após indução da tumorigênese cutânea com DMBA/TPA	55
Figura 21 - Cortes histológicos dos grupos C57BL/6 WT, C57BL/6 CD4KO, C57BL/6 NUDE 48 horas após tratamento com DMBA	57
Figura 22 - Perfil linfocitário no baço dos animais C57BL/6 WT, CD4KO e NUDE, após tratamento com DMBA.....	58
Figura 23 - Perfil linfocitário no linfonodo dos animais C57BL/6 WT, CD4KO e NUDE, após tratamento com DMBA.....	59
Figura 24 - Quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO) na pele dos grupos de animais C57BL/6.....	60
Figura 25 - Produção de citocinas pró-inflamatórias na pele dos grupos de camundongos C57BL/6 após tratamento com DMBA	61
Figura 26 - Produção de citocinas anti-inflamatórias na pele dos grupos de camundongos C57BL/6 após tratamento com DMBA	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Tumorigênese de Pele	18
1.2 Resposta Imune na Tumorigênese de Pele	24
2 OBJETIVOS	32
2.1 Metas	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Animais	33
3.2 Reagentes	33
3.3 Indução da Tumorigênese Cutânea	33
3.4 Contagem de papilomas e tumores	34
3.5 Análise Histológica	34
3.6 Ensaio de Mieloperoxidase (MPO)	35
3.7 Ensaio Imunoenzimático para dosagens de citocinas na pele (ELISA)	35
3.8 Citometria de fluxo para caracterização dos camundongos	36
3.9 Análise Estatística	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Caracterização e Avaliação da Resposta Inflamatória à Tumorigênese cutânea em Camundongos da Linhagem C57BL/6, A/J e Airmin	38
<i>4.1.1 Incidência e Multiplicidade de papilomas e tumores de pele</i>	40
<i>4.1.2 Análise Histológica</i>	41
4.2 Indução da Tumorigênese Cutânea – Análise do perfil inflamatório em linhagens C57BL/6, C57BL/6 CD8KO, CD4KO, NUDE e RAG	43
<i>4.2.1 Incidência e Multiplicidade de papilomas e tumores de pele</i>	46
<i>4.2.2 Análise Histológica</i>	48
<i>4.2.3 Caracterização da população linfocitária em baço e linfonodo dos camundongos por citometria de fluxo</i>	49
<i>4.2.4 Dosagem da Enzima Mieloperoxidase para Quantificação de neutrófilos na pele</i>	51
<i>4.2.5 Produção de Citocinas Pró-inflamatórias na pele</i>	53
<i>4.2.6 Produção de Citocinas Anti-inflamatórias na pele</i>	54
4.3 Caracterização e Avaliação da Resposta Camundongos C57BL/6, C57BL/6 CD4KO e NUDE 48 horas após tratamento com DMBA	55
<i>4.3.1 Análise Histológica</i>	56

4.3.2 Caracterização da População Linfocitária no baço e linfonodo dos camundongos por Citometria de fluxo.....	57
4.3.3 Dosagem da Enzima Mieloperoxidase para Quantificação de neutrófilos na pele	59
4.3.4 Produção de Citocinas Pró-inflamatórias na pele	60
4.3.5 Produção de Citocinas Anti-inflamatórias na pele	61
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÕES	73
REFERENCIAS	74

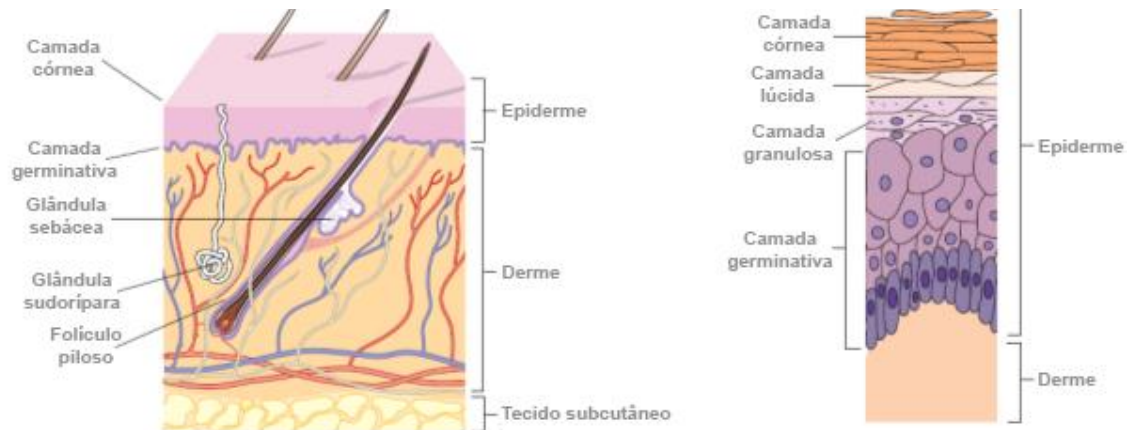
1 INTRODUÇÃO

1.1 Tumorigênese de Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e engloba aproximadamente 16% do peso corporal de um adulto, tem funções como proteção, termorregulação, percepção sensorial e síntese de vitamina D. Ela é dividida em duas camadas principais: a epiderme, de origem ectodérmica e a derme, de origem mesodérmica (McLafferty et al., 2012).

A epiderme é composta por quatro tipos principais de células, os queratinócitos que são cerca de 90% das células totais dessa região, os melanócitos, células produtoras de melaninas, as células de Langerhans, envolvidas na resposta imune e, por fim, as células de Merkel, responsáveis pela sensação de tato. A epiderme é dividida em cinco camadas: a camada germinativa ou basal, a camada espinhosa, a granulosa, a lúcida e a camada córnea. A camada basal, a mais profunda, é composta por queratinócitos, melanócitos e células de Merkel. A camada espinhosa, formada por células desde poliédricas a pavimentosas, possui também as células de Langerhans, ou células dendríticas do sistema imune especializadas. A camada granulosa é composta por 3 a 5 camadas de queratinócitos que assumem a forma pavimentosa e apresentam grânulos citoplasmáticos basófilos. A camada lúcida está localizada em áreas onde a pele é espessa, como palmas das mãos e solas dos pés, situa-se entre a camada granulosa e a camada córnea e fornece algum grau de impermeabilização para a pele. E por fim, a camada córnea, a mais superficial, a qual contém queratina que ajuda a proteger a pele de fatores externos como o calor e agentes químicos (McLafferty et al., 2012; Proksch et al., 2008). A **Figura 1** ilustra as principais camadas de epiderme e estruturas da derme.

Figura 1 – Principais camadas da epiderme e estruturas da derme.



Adaptada de (McLafferty et al., 2012).

A outra camada da pele conhecida como derme, composta por tecido conjuntivo, é responsável por fornecer nutrientes e sustentação para epiderme, nessa camada está localizado os vasos linfáticos, as terminações nervosas, os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas. A derme é composta de duas camadas: a reticular e a papilar. A camada reticular contém os nervos e os vasos capilares que alimentam a epiderme. A camada papilar é composta de tecido conjuntivo que possui colágeno e fibras elásticas, os quais conferem a derme capacidade de esticar e contrair (McLafferty et al., 2012; Proksch et al., 2008).

A pele exerce a função de barreira física, sendo um dos componentes da imunidade inata mais evidente contra invasão de patógenos estranhos ao organismo, agressões físicas e químicas, controle no balanço de sais e água (Proksch et al., 2008). Alguns fatores físicos e químicos como radiação ultravioleta (UV), radiação ionizante, hidrocarbonetos policíclicos e arsênio podem gerar danos no DNA, como por exemplo, no gene p53, das células epiteliais e levar ao desenvolvimento tumoral, o que compromete a homeostase e funções da pele (Campbell et al., 1993; McGuire et al., 2009). O câncer de pele não melanoma é a forma mais comum de malignidade em humanos e representa cerca de 95% de todos as neoplasias cutâneas (Rubin et al., 2005). Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) revelam que as formas mais comuns de câncer de pele não melanoma no Brasil incluem o carcinoma basocelular (BCC), abrange 70% dos

casos, e o carcinoma de células escamosas (SCC), cerca de 25% dos casos relatados. Outras formas como dermatofibrosarcoma protuberante, carcinoma celular de Merckel e neoplasias adnexais são encontrados com menor frequência.

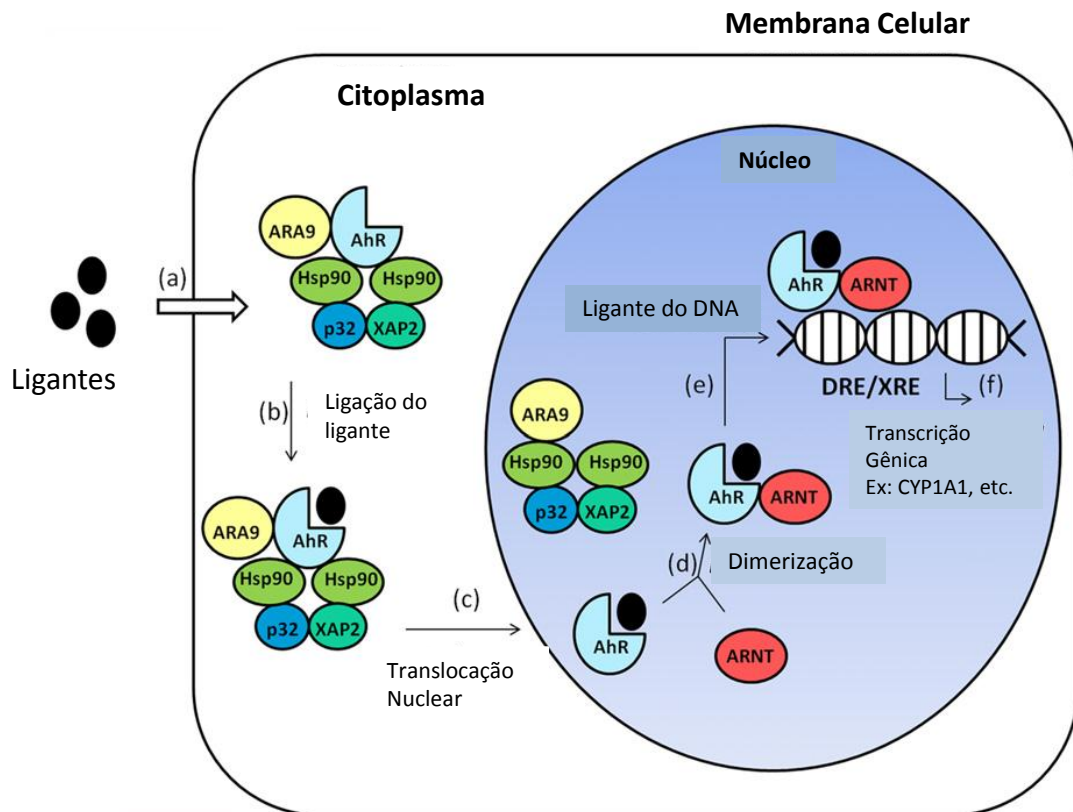
O carcinoma basocelular se caracteriza por ser a neoplasia dos queratinócitos que residem na camada basal da epiderme (Youseff et al., 2010). Radiação UV, hidrocarbonetos poliaromáticos, pigmentação da pele, e síndromes genéticas, como por exemplo, o xeroderma pigmentoso são fatores que predispoem o desenvolvimento do BCC que pode ser classificado em quatro tipos principais: nodular, superficial, pigmentar e morfofórmico. As lesões desse câncer de pele são caracterizadas por uma úlcera central com bordas bem definidas, muitas vezes com vasos sanguíneos visíveis na lesão ou borda adjacente a ela, com raros casos de metástases relatados. Uma característica comum aos casos de BCC é o aumento da via de sinalização intracelular Hedgehog (Hh), essa via é responsável por regular o crescimento celular e diferenciação durante a embriogênese, além de ser crucial no desenvolvimento das células humanas onde se encontram os folículos pilares (Dubas, Ingraffea 2013; McGuire et al., 2009; Paladini et al., 2005; Von Domarus, Stevens, 1984).

O segundo tipo de câncer de pele não melanoma comum, e também mais agressivo quando comparado ao BCC, é o carcinoma celular escamoso (McGuire et al., 2009). Esse câncer em grande parte ocorre devido à radiação UV responsável por causar dano no DNA e inativar o gene p53. Esse gene que codifica a proteína p53, conhecida como guardião do genoma, tem a função de parar o ciclo celular no sítio de dano do DNA e levar a apoptose da célula caso o dano seja irreparável. Assim, a mutação ou inativação da p53 permite a negligência do reparo levando ao dano do DNA e resistência a apoptose o que, nesse caso, caracteriza o desenvolvimento tumoral (Campbell et al., 1993; Jiang et al., 1999). O SCC tem por característica as pápulas ou papilomas em forma de verrugas, o que pode o levar a ser confundido com verrugas normais. Outros fatores, como o papiloma vírus (HPV) e carcinogênese química, também podem levar ao desenvolvimento do SCC (Dubas, Ingraffea, 2013; Liu, Colegio, 2013).

A carcinogênese química na pele é um tipo de câncer não melanoma e o seu desenvolvimento, descrito em modelos murinos, é um processo que envolve os

estágios conhecidos como iniciação, promoção e progressão do tumor. O processo de iniciação do tumor consiste no tratamento dos camundongos com doses de xenobióticos, compostos químicos estranhos a um organismo, como o hidrocarboneto poliaromático dimetilbenzenoantraceno (DMBA) (DiGiovanni, 1992). Esse agente químico é responsável por mutações no gene *HRas*, resultando na indução da carcinogênese, além de ser passível de causar mutações em outros dois genes, *KRas* ou *NRas*, que podem cooperar, simultaneamente, com o mutante *HRas* para promover o desenvolvimento das mutações (To et al., 2013). O DMBA não é um composto ativo e precisa ser metabolizado e convertido em diól epóxido, sua conformação ativa. Para isso, esse composto com capacidade cancerígena precisa se ligar ao receptor Hidrocarboneto de arila (AhR), levando-o a mudança conformacional e expondo sua sequência nuclear. Esse receptor é normalmente encontrado no citoplasma e auxiliado por proteínas chaperonas como Hsp90 (do inglês *heat shock protein*), proteína p23, XAP-2 (do inglês *X-associated protein 2*) e ARA-9 (do inglês *AhR associated protein 9*), as quais ajudam a manter a estrutura conformacional do AhR enquanto ainda não há o ligante, evitando sua translocação para o núcleo. Uma vez que o ligante, nesse caso o DMBA, se liga ao AhR há a migração desse complexo AhR-chaperonas-DMBA para o núcleo. Assim que esse complexo atravessa a membrana nuclear a proteína translocadora do AhR (ARNT) dissocia as proteínas chaperonas do AhR, e o heterodímero AhR-ARNT se liga a regiões específicas do DNA conhecidas como elemento de resposta a xenobióticos (XREs). Estas regiões estão localizadas na região promotora de genes alvos que vão levar a transcrição de enzimas do citocromo P450, como Cyp1a1 e Cyp1b1, os quais são responsáveis por causar a biotransformação (Denison, Nagy, 2003; Hao, Whitelaw, 2013; Yusuf et al., 2007). A **Figura 2** ilustra a via de sinalização do receptor AhR, conforme descrito anteriormente.

Figura 2 - Via de sinalização do receptor AhR.



(a) O ligante passa através da membrana plasmática para o citoplasma celular. (b) O ligante se liga ao complexo AhR no citoplasma. (c) O complexo AhR mais ligante é translocado para dentro do núcleo. (d) O ligante juntamente com o AhR se dissocia do complexo de proteínas chaperonas e se dimeriza com ARNT. (e) O complexo AhR- ligante -ARNT se liga a regiões específicas DRE/XRE o que leva a transcrição de genes alvos. Adaptada de (Busbee et al., 2013)

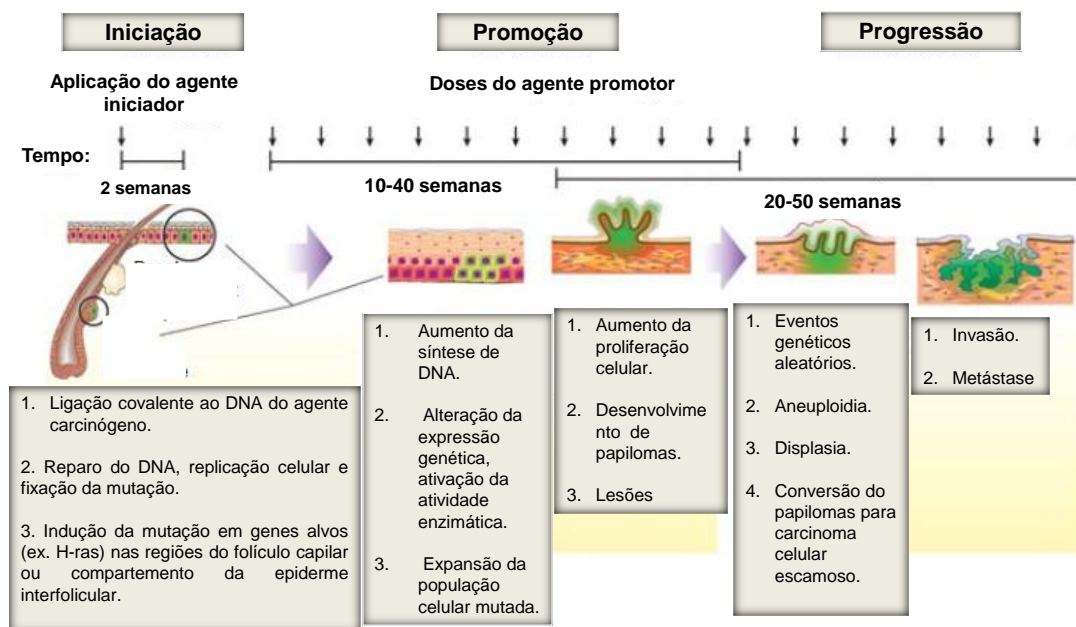
Outro fator importante no processo de iniciação da tumorigênese é a atividade da enzima hidrocarboneto hidroxilase, a qual é responsável por metabolizar os hidrocarbonetos poli aromáticos (PAHs). Estudos em camundongos mostraram que a atividade dessa enzima é controlada por 2 alelos no locus do receptor AhR. Animais que são homozigotos para o alelo b, como os camundongos AIRmin e C57BL/6, metabolizam PAHs com eficiência, o que facilita o desenvolvimento da tumorigênese cutânea. Já os animais homozigotos para o alelo d, como camundongos DBA/2 e AIRmax, possuem baixa afinidade de ligação entre o receptor AhR e o hidrocarboneto poliaromático, por isso podem ser resistentes ao desenvolvimento da tumorigênese cutânea quando comparados aos animais que

possuem o alelo b (De Souza et al., 2009; Poland et al., 1994; Thomas et al., 2002; Yusuf et al., 2007).

O processo de iniciação do tumor é um evento irreversível e nesse estágio ainda não há o aparecimento de tumores visíveis, o aparecimento de papilomas pode ser auxiliado pela aplicação de doses repetidas do TPA, agente promotor (DiGiovanni, 1992). Desse modo no estágio seguinte, conhecido por promoção e progressão, os camundongos são tratados continuamente com Tetradecano forbolacetato (TPA), o qual é responsável pela expansão clonal das células mutadas gerando então a multiplicação do número de papilomas (Kemp, 2005). O TPA mimetiza o diacilglicerol o qual é responsável por ativar a proteína quinase C, que consequentemente fosforila aminoácidos alvos, como serinas e treoninas. Desse modo o TPA funciona como segundo mensageiro, atuando na transcrição de genes responsáveis pela promoção do tumor (Mueller, 2006; Ohno, Nishizuka, 2002).

A **Figura 3** mostra as fases do desenvolvimento da carcinogênese química, conforme descrito anteriormente.

Figura 3 – Estágios do modelo de carcinogênese cutânea realizada em camundongos.



Adaptada de (Abel et al., 2009).

1.2 Resposta Imune na Tumorigênese de Pele

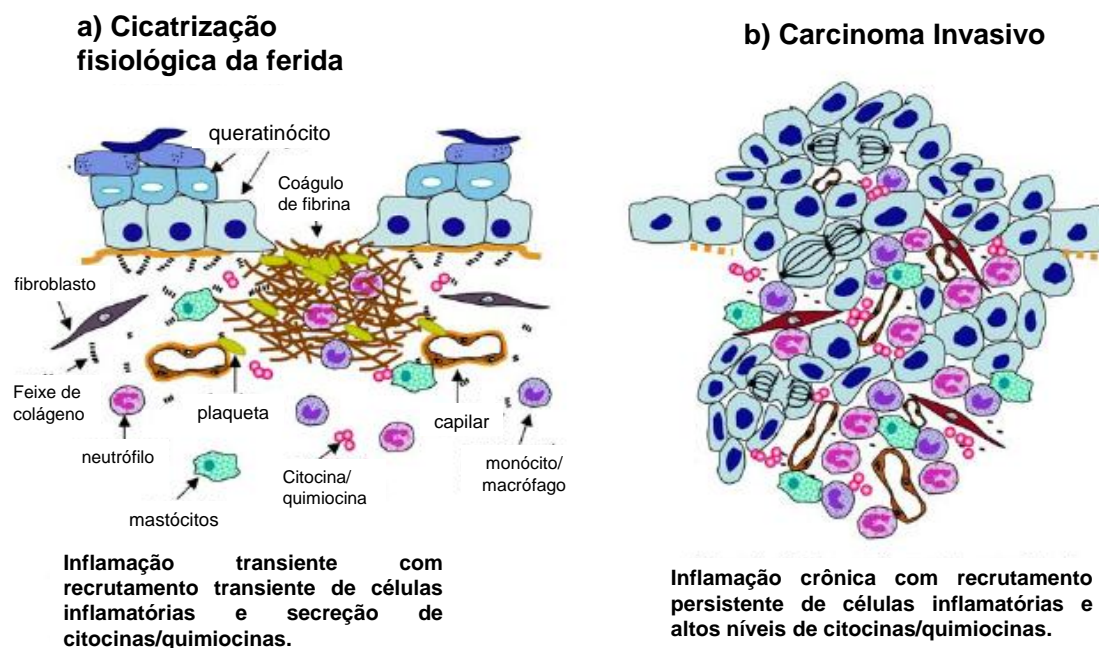
São inúmeros os mecanismos de defesa para controlar as células tumorais, desde uma resposta primária mediada por células e fatores solúveis até a produção de anticorpos e células citotóxicas contra antígenos tumorais. A resposta imune inata e adaptativa interage para manter a homeostase do organismo e, para que isso ocorra, a primeira reação do organismo frente a um desequilíbrio é a inflamação.

A resposta inflamatória é um evento fisiológico do organismo às agressões de agentes lesivos biológicos, químicos ou físicos que ultrapassam a barreira epitelial/endotelial e suas estruturas especializadas. Caracterizada por fenômenos vasculares e celulares nos tecidos comprometidos, tem como função principal recompor o tecido lesado e manter a homeostase. O processo inflamatório envolve a ativação de células da imunidade inata através de seus receptores de superfície e posterior secreção de fatores solúveis, como citocinas, que promovem alterações morfológicas e bioquímicas, entre os quais, três delas se destacam: dilatação dos capilares, vênulas e arteríolas; exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas e; migração dos leucócitos, por exemplo, neutrófilos, eosinófilos e basófilos, intravasculares para o foco inflamatório (Videm, Strand, 2004).

Na inflamação, o recrutamento de leucócitos ao local da lesão, ativa o processo de remoção dos restos celulares, elimina agentes agressores impedindo o crescimento de microrganismos patogênicos, iniciando a reparação tecidual. Além de facilitar a locomoção, os fatores quimiotáticos encontrados em grandes concentrações induzem a ativação destes leucócitos, resultando no estabelecimento da homeostase. O mecanismo pelo qual os leucócitos migram através do endotélio penetrando nos tecidos é chamado de quimiotaxia e, a locomoção dessas células é orientada de acordo com o gradiente de concentração formado a partir do foco injuriado pela presença de substâncias endógenas e exógenas (Devreotes, Zigmond, 1988; Videm, Strand, 2004). Das substâncias endógenas que atuam como fatores quimiotáticos são de fundamental importância os componentes do sistema complemento, em particular C5a, os metabólitos do ácido araquidônico originados via lipoxigenase e as citocinas da família das quimiocinas (Miller, Krangel, 1992).

O objetivo da inflamação aguda e crônica é reestabelecer a homeostase, e a diferença entre elas baseia-se no tempo que a resposta imune requer para isto. Desse modo, a inflamação aguda retorna ao equilíbrio e homeostase, ao contrário da inflamação crônica, que também se relaciona com patógenos persistentes de difícil erradicação. A **Figura 4** mostra a inflamação aguda e o processo de inflamação crônica patológico.

Figura 4 – Inflamação Aguda e Crônica



a) Durante a cicatrização da ferida ou lesão tecidual o processo de reparação é imediatamente iniciado pela formação de um coágulo de fibrina contendo matriz extracelular (ECM), proteínas extracelulares e plaquetas. A degranulação de plaquetas fornece a primeira "onda" de fatores de crescimento, como as citocinas e quimiocinas que recrutam células inflamatórias tais como mastócitos e neutrófilos. Monócitos / macrófagos são vistos em maiores quantidades quando o número de neutrófilos está declinando. Em seguida, estas células orquestram a resposta inflamatória do tecido, que é essencial para a indução de angiogênese e a cicatrização da ferida. Após a re-epitelização, a resposta inflamatória do tecido é diminuída, resultando em menores níveis de citocinas inflamatórias e redução no número de células do sistema imune inato na pele. (b) No tecido tumoral a reação inflamatória é "crônica", com recrutamento persistente de diferentes tipos de células inflamatórias para dentro do estroma do tumor, com de citocinas inflamatórias e quimiocinas, A secreção de proteases, de fatores angiogênicos e o infiltrado inflamatório contribui criticamente para aumento da angiogênese, invasão tumoral e metástase. Adaptada de: (Mueller, 2006)

Portanto, a inflamação crônica é aquela mantida por longos períodos de tempo, e pode ocasionar patologias cardiovasculares, neurológicas, pulmonares e neoplásicas (Aggarwal et al., 2006; Balkwill, Coussens, 2004). O câncer relacionado com a inflamação crônica facilita o potencial replicativo ilimitado da célula, independência de fatores de crescimento, resistência à inibição do crescimento celular, escape da morte celular programada, aumento da angiogênese e metástase (Hanahan, Weinberg, 2011). Análise de tumores pré-malignos e crescimento de carcinomas em adultos revelam que há a produção de inúmeros leucócitos e de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Balkwill, Mantovani, 2001).

O TNF- α pode induzir o foco de morte celular tumoral, e pode ainda estimular resposta antitumoral, além de estar comumente presente no estado de inflamação crônica e suas associações com o carcinoma (Philip et al., 2004; Smyth et al., 2004). Essa citocina pode influenciar células da derme e epiderme nos estágios iniciais do desenvolvimento tumoral, e a produção persistente de TNF- α , principalmente por queratinócitos, é importante para os estágios iniciais da promoção tumoral feita pela administração do agente promotor TPA, pois ativa fatores de transcrição como NF- κ B o que leva a proliferação ou crescimento clonal das células mutadas inicialmente (Fujiki, Suganuma, 2011; Moore et al., 1999).

A Interleucina-6 (IL-6) é um potente mediador pró-angiogênico presente no micro-ambiente inflamatório da maioria dos tumores sólidos, essa citocina tem um amplo espectro de atividades biológicas dentre elas à regulação da inflamação, proliferação celular, imunomodulação, hematopoiese e tumorigênese (Guo et al., 2012; Jones et al., 2011). IL-6 exerce atividade pró-angiogênica predominantemente através da via de sinalização STAT-3, a qual leva a transcrição de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), e também induz proliferação e migração de células endoteliais (Fan et al., 2008; Holzinger et al., 1993; Niu et al., 2002).

A citocina pró-inflamatória IL-1 β , assim como a citocina TNF- α , é considerada citocina de “alarme”, visto que não é normalmente expressa a não ser quando é sintetizada por macrófagos após o início do processo inflamatório. IL-1 β e TNF- α ativam células estromais e potencializam a migração de leucócitos aumentando a resposta inflamatória (Apte, Voronov, 2002), desse modo em altas doses se torna

agressiva desencadeando aumento da angiogênese, invasão e supressão da resposta imune (Song et al., 2003; Song et al., 2005).

As citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 β , descritas acima, e a proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1) são capazes de recrutar macrófagos, células importantes da imunidade inata, para o local do sítio inflamatório, quando a quantidade de neutrófilos começa a decrescer (Coussens, Werb, 2002; DiPietro, 1995). Os macrófagos associados ao tumor (TAM) podem polarizar para dois tipos diferentes de células, M1 ou M2. Os macrófagos M1 estão presentes quando há um aumento no perfil de citocinas Th1 como, por exemplo, IFN- γ , ou ainda podem estar presentes quando há componentes microbianos como lipopolissacarídeos (LPS). Esse perfil Th1 tem como papel clássico a defesa contra microorganismos ou células tumorais e produzem eficientemente moléculas efetoras como intermediários de reativos de oxigênio e nitrogênio e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Sica, Mantovani, 2012). Ao contrário dos macrófagos M1 os macrófagos M2 se polarizam na presença de citocinas como IL-4 e IL-13. Essas citocinas inibem a ativação clássica da resposta Th1 e levam a resposta, conhecida como alternativa, para macrófagos M2 (Gordon, Taylor, 2005). Esses macrófagos M2 possuem características como alta produção de IL-10, baixa produção de IL-12 e fraca capacidade de apresentação de antígeno (Noel et al., 2004), além de suprimirem a resposta Th1, participarem na resolução da inflamação, na proteção contra parasitas, promoverem a cicatrização de feridas, angiogênese e reparo tecidual (Biswas, Mantovani, 2010). A maioria dos estudos indica que o perfil dos macrófagos associados ao tumor é o perfil M2.

Os mecanismos que impedem ou inibem o surgimento de células tumorais é constituído de eventos que incluem, desde a resposta primária mediada por células e fatores solúveis até a produção de células citotóxicas e anticorpos, numa interação entre as respostas imune inata e adaptativa. Desse modo, as duas células que têm papel fundamental na resposta imune antitumoral pelo mecanismo de citotoxicidade celular são as células natural killer (NK), pertencente à resposta imune inata, e os linfócitos T citotóxicos (CTLs), que fazem parte da resposta imune adquirida. Ambas as células possuem um progenitor linfóide comum, e durante um quadro de infecção ou na presença de um antígeno tumoral, por exemplo, tornam-se ativadas através

de receptores antígenos-específicos e por citocinas pró-inflamatórias como IL- 12 e IFN- γ (Sun et al., 2010).

Células NK são capazes de matar células-alvo, independentemente de qualquer ativação anterior. Estas características funcionais têm sugerido desde o tempo de sua identificação um papel para as células NK no controle do crescimento tumoral e da metástase *in vivo*. Com a estimulação de citocinas, as células NK se tornam células assassinas que proliferam, produzem citocinas, e regulam positivamente moléculas efetoras, tais como moléculas de adesão, NKp44, perforina, granzimas, ligante de FAS (FASL) e TRAIL. Portanto, isso leva a um aumento da adesão celular e a liberação de grânulos, bem como o aumento da apoptose das células-alvo, que envolve a adesão celular e é mediada pelos membros da família do TNF presente na superfície, que podem ser FASL, TNF- α e TRAIL, os quais interagem com receptores específicos na superfície da célula-alvo (Johnsen et al., 1999; Medvedve et al., 1997; Mirandola et al., 2004; Zamai et al., 1998).

As células NK reconhecem e destroem células infectadas ou neoplásicas, mas em geral não causam dano as células normais. Essa capacidade de reconhecer células danificadas e transformadas de estruturas próprias saudáveis depende da expressão tanto de receptores de inibição (por exemplo, os KIRs) quanto da expressão de receptores de ativação (por exemplo, CD16 e NKG2D). Os receptores de inibição das células NK reconhecem moléculas MHC classe I (responsáveis por ativar os linfócitos TCD8), as quais são geralmente expressas na maioria das células saudáveis do corpo, e não são expressas em células cancerosas. Em geral os receptores de ativação das células NK reconhecem estruturas que estão presentes tanto em células alvos susceptíveis quanto em células normais, mas a influência das vias de inibição domina quando o MHC classe I é reconhecido (Abbas et al., 2008; Karre et al., 1986; Long, 1999).

A segunda classe de células efetoras responsáveis pela resposta anti-tumoral são os linfócitos T citotóxicos. Essas células podem atuar de duas formas, através dos ligantes da superfamília do Fator de Necrose Tumoral (TNF) ou pela secreção de grânulos como granzimas e perforinas, em que esses linfócitos se aproximam da célula alvo e liberam granzimas para o citosol da célula, levando-a a morte por

apoptose. Apesar de serem células principais na defesa contra o tumor estudos tem mostrado que em hospedeiros com tumores, os linfócitos CTLs específicos tumorais não são eficientes. A chave para a teoria de que esses linfócitos CTLs se encontram prejudicados está na ausência dos linfócitos TCD4+ auxiliares. Sem os linfócitos TCD4+ auxiliares os CTLs são insuficientes para dirigir uma resposta efetiva contra o tumor, pois quando esses linfócitos não estão presentes não há produção de anticorpos e nem expansão das células CTLs específicas contra o tumor (Marzo et al., 2000; Mitchison, 1971). Além do que, os linfócitos TCD4+ auxiliares são necessários para geração e manutenção das células T citotóxicas de memória (Bourgeois, Tanchot, 2003).

Como já descrito anteriormente, os tumores sólidos expressam MHC-I, mas não complexo de histocompatibilidade principal II (MHC-II), por isso acredita-se que os linfócitos T citotóxicos sejam as células efetoras principais no combate ao tumor. Entretanto, estudos recentes tem mostrado que células TCD4+ reativas contra o tumor podem desenvolver atividade citotóxica e mediar rejeição tumoral via MHC-classe II restrito ao reconhecimento do antígeno tumoral, sugerindo que as células TCD4+ podem ser efetoras na resposta tumoral (Quezada et al., 2010). O efeito anti-tumoral das células TCD4+ se dá através da atividade das citocinas IFN- γ e TNF- α , essas duas citocinas produzidas pelas células TCD4+ possuem efeito citotóxicos sobre as células tumorais (Corthay et al., 2005; Fransen et al., 1986; Qin, Blankenstein, 2000). O IFN- γ pode regular positivamente moléculas de MHC e aumentar o número de complexos (MHCII -peptídeo) das mesmas, assim como pode alterar a maquinaria de processamento antigênico resultando em maior apresentação de antígenos e maior número de lise celular (Dighe et al., 1994). O TNF- α age juntamente com o IFN- γ causando dormência nas células tumorais prevenindo assim o mecanismo de escape do tumor, assim na ausência dessas duas citocinas pode haver uma maior progressão tumoral e transformação maligna. A ação combinada dessas duas citocinas pode ainda induzir células dendríticas (DCs) a produzirem quimiocinas anti-angiogênicas, como CXCL10 e CXCL9, na tentativa de impedir o crescimento tumoral (Coughlin et al., 1998; Muller-Hermelink et al., 2008).

E por fim, os linfócitos B também têm sido vistos como células efetoras na resposta tumoral. Os linfócitos B são células centrais da imunidade humoral e tem como funções principais a produção de anticorpos, apresentação de antígenos, e secreção de citocinas pró-inflamatórias. No contexto tumoral, essas células têm a capacidade de alterar os níveis de citocinas locais e circulantes e inibirem os linfócitos T influenciando a imunidade antitumoral. Em modelos de camundongos com câncer colorretal a depleção parcial das células B resultou em significativa redução do tumor (Barbera-Guillem et al., 2000). Os linfócitos B são capazes de produzirem citocinas imunossupressoras. Dentre elas foi relatada a produção de IL-10 e TGF- β (fator de crescimento transformador) o que levaria os linfócitos T a um estado de anergia (D'Amico et al., 2004; Knoechel et al., 2005). A citocina IL-10 é descrita principalmente pela sua função imunossupressora, por inibir as células apresentadoras de antígenos (APC), MHC e moléculas co-estimuladoras da família B7, por diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, e reduzir a diferenciação e maturação de células dendríticas (Moore et al., 2001; O'Garra, Murphy, 2009; Vicari, Trinchieri, 2004). No entanto, recentemente a IL-10 foi destacada por inibir a produção de citocinas inflamatórias, dificultar o desenvolvimento de células T reguladoras (Treg) e células supressoras mielóides derivadas (MDSC) no ambiente tumoral, o que retardaria o desenvolvimento, crescimento e metástase do tumor (Tanikawa et al., 2012).

A citocina TGF- β , assim como a IL-10, tem sua função principal como imunossupressora. Essa citocina tem capacidade de suprimir as atividades anti-tumorais das células T, células NK, neutrófilos, monócitos e macrófagos que são importantes por regularem a promoção tumoral (Li et al., 2006; Wrzesinski et al., 2007). No estágio inicial da carcinogênese o TGF- β pode suprimir a resposta inflamatória necessária para a promoção tumoral. E, produzido cronicamente, no período de progressão da carcinogênese, pode levar a invasão e metástase por promover transição epitélio-mesenquimal (EMT) nas células epiteliais, além de inibir a proliferação celular (Glick, 2004; Heldin et al., 2009; Mordasky Markell et al., 2010; Siegel, Massague, 2003). Por fim, a citocina TGF- β pode ativar o fator de transcrição SMAD-3 e induzir a produção de colagenase por fibroblastos os quais são capazes de elaborar matriz extracelular (Chen et al., 1999).

A literatura mostra que células da imunidade inata e da imunidade adaptativa, bem como citocinas e quimiocinas, participam da resposta ao tumor. Com base nestas informações este trabalho tem o objetivo de caracterizar e avaliar o papel das células da resposta imune adaptativa em resposta à tumorigênese induzida por agentes químicos.

2 OBJETIVO

Comparar a resposta inflamatória de camundongos C57BL/6 e C57BL/6 deficientes para linfócitos TCD4, deficientes para linfócitos TCD8, camundongos NUDE e RAG frente ao modelo de tumorigênese cutânea induzida por DMBA e TPA.

2.1 Metas

- avaliar a multiplicidade e a incidência de papilomas nas linhagens tratadas com DMBA e TPA;
- analisar o perfil de citocinas pró- (IL-1 β , IL-6, TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) secretadas na pele dos animais tratados com DMBA e TPA;
- avaliar a quantidade de enzima mieloperoxidase, para quantificação de neutrófilos, na pele dos animais tratados com DMBA e TPA;
- verificar o perfil de linfócitos em órgãos linfóides drenantes, como linfonodo inguinal e baço, dos animais tratados com DMBA e TPA;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Neste trabalho, foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 selvagens, camundongos C57BL/6 nocauteados para CD4+, que não possuem linfócitos TCD4, C57BL/6 nocauteados para CD8+, os quais não possuem linfócitos TCD8, camundongos C57BL/6 NUDE, os quais não possuem linfócitos T maduros, camundongos C57BL/6 RAG os quais não possuem linfócitos T e B, e camundongos A/J com idade entre 6-8 semanas, pesando 25 à 30 g (www.jax.org.br). Estes animais foram provenientes do Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo. Foram utilizados também camundongos machos da linhagem AirMin, que possuem uma baixa resposta inflamatória aguda, do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan com idade entre 6-8 semanas.

3.2 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho, para indução de tumorigênese cutânea, foram o DMBA (Dimetilbenzenoantraceno) e o TPA (Tetradecano forbolacetato) adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

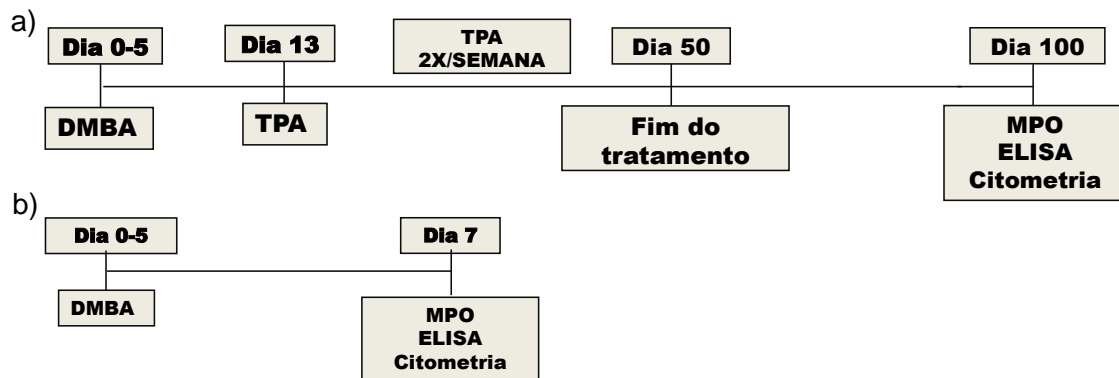
3.3 Indução da Tumorigênese Cutânea

Para a indução de tumorigênese cutânea, cada animal recebeu 50 ug de DMBA, dissolvido em 0,1 ml de acetona (agente iniciador) no dorso previamente depilado durante cinco dias consecutivos. Após 7 dias da aplicação da última dose do DMBA, cada animal recebeu, da mesma forma, no dorso, 5 ug de TPA em 0,1 ml de acetona, duas vezes por semana, durante 50 dias. Os animais foram acompanhados por 100 dias. Durante este período os diferentes grupos de animais foram observados e o número de papilomas contados. Ao final dos 100 dias tiveram a pele retirada para análise histológica, dosagem de citocinas e dosagem de

mieloperoxidase (MPO). A **Figura 5a** mostra o esquema de protocolo executado nesses animais. Também foram retirados os linfonodos inguinais e baço para avaliação em citômetro de fluxo. Neste protocolo avaliamos 2 grupos experimentais, os camundongos C57BL/6 comparados aos grupos de animais AirMin e A/J e os camundongos modificados geneticamente comparados aos camundongos C57BL/6.

Durante o trabalho um novo experimento foi realizado, os camundongos nocauteados para CD4 foram comparados aos camundongos NUDE e C57BL/6, 48 horas após aplicação do carcinógeno DMBA. A **Figura 5b** nos permite ver o protocolo realizado nesse experimento de 48h.

Figura 5 – Esquema de delineamento experimental.



(a) Delineamento experimental de indução de tumorigênese cutânea com DMBA/TPA por 100 dias. (b) Delineamento experimental de aplicação do carcinógeno DMBA.

3.4 Contagem de Papilomas e Tumores

A contagem do número de papilomas foi realizada semanalmente através de análise macroscópica no dorso dos animais tratados com DMBA/TPA até atingir os 100 dias. A avaliação de tumores e metástases nos grupos de animais, também foi feita macroscopicamente em órgãos internos no dia 100. A pele foi retirada e armazenada em paraformaldeído 10% para posterior avaliação histológica.

3.5 Análise Histológica

A análise histológica da pele dos animais submetidos ao protocolo de indução da tumorigênese foi realizada utilizando fragmentos de pele desses animais coletados após o sacrifício. Os fragmentos de pele da região dorsal foram retirados e submetidos ao protocolo para inclusão em parafina, que consiste em fixação do material em formol tamponado 10% PBS por 24 horas, seguido de desidratação em uma série crescente de álcoois (70%, 90% e 100%), diafanização em xilol e impregnação e inclusão em parafina. Os cortes foram feitos na espessura de 5µm para evitar sobreposição de células e corados com Hematoxilina-Eosina (HE). A avaliação foi feita por microscopia ótica (Leitz-Dioplan) e a aquisição e digitalização das imagens através dos sistemas CCD-IRIS (Sony Company).

3.6 Citometria de Fluxo para Caracterização das Células dos Camundongos

O presente estudo realizou a caracterização e fenotipagem, por citometria de fluxo, da população linfocitária. Após 100 dias de indução da tumorigênese cutânea os animais foram sacrificados e o linfonodo inguinal e baço de cada animal foram retirados e macerados. Aproximadamente, 1×10^6 células destes órgãos foram centrifugadas a 500 g por 5 minutos a 4 °C e ressuspensas em 200 µl de PBS 1x enriquecido com 2% Soro Fetal Bovino e 0,1% azida sódica. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspensado em 25 µl da mesma solução contendo os anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 e anti-CD19 na concentração determinada para cada um deles. Após 30 minutos de incubação a 4 °C no escuro, as células foram lavadas duas à três vezes em 200 µl de PBS contendo 0,1% azida e, em seguida, foi realizada a leitura no citômetro de fluxo FACSCanto II.

3.7 Ensaio de Mieloperoxidase (MPO)

Para quantificação de neutrófilos, foi avaliada a atividade da enzima MPO nos tecidos dos animais após indução da tumorigênese. Segmentos de pele foram cortados em pequenos pedaços, pesados e imersos em solução tampão contendo

fosfato de sódio e EDTA para homogeneização. Em seguida, o tecido foi centrifugado a 600 x g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuspensionado por agitação no vórtex em solução tampão contendo fosfato de sódio 0,02M e EDTA, e, a seguir, adicionado solução de NaCl 0,2% à 4 °C para lisar as hemácias. O *pellet* obtido após centrifugação foi ressuspensionado em solução tampão contendo fosfato de sódio 0,05M e detergente H-TAB 0,05% (Brometo de Hexadecil-Trimetil Amônio, Sigma-Aldrich, EUA). Para finalizar a extração das proteínas, a amostra foi congelada em nitrogênio líquido e descongelada 3 vezes e centrifugada a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático o qual foi feito em placas de 96 poços, contendo 25 µl de amostra, que foi revelada pela adição de TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina, BD Pharmigent™, EUA). A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 4M, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro a 450 nm. Os resultados foram expressos em atividade de MPO (absorbância em densidade ótica - DO 450 nm/mg de tecido homogeneizado).

3.8 Ensaio Imunoenzimático para Dosagens de Citocinas na Pele - ELISA

A dosagem de citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10 e TGF- β foi realizada pelo método de ELISA utilizando-se o sobrenadante da pele dos animais submetidos ao protocolo de indução da tumorigênese cutânea, a qual foi macerada no processador de tecidos Polytron.

Placas de ELISA (Costar) foram sensibilizadas com anticorpos anti-IL-1 β , anti-TNF- α , anti-IL-6, anti-IL-10 (e-Bioscience) e anti-TGF- β (R&D Systems) em PBS (100 µL/poço) e incubadas por 18 h/temperatura ambiente (TA). Para dosagem das citocinas a solução de PBS contendo 1% de Soro Albumina Bovina (Sigma) foi empregada como bloqueio por 1 hora. Ao final da incubação, foram realizadas três lavagens com 0,05% PBSTween (PBST) e adicionados 100 µL/poço das citocinas recombinantes diluídas na razão 1:2 em reagente diluente assim como as amostras de sobrenadantes.

Para a ativação do TGF- β presente nos sobrenadantes, 100 µL das amostras foram incubadas com 20 µL de solução de HCl (1N) por 10 minutos e, em seguida,

foram adicionados 20 μL de solução de NaOH 1,2 N/0,5 M de HEPES, conforme orientações do fabricante do “kit” (R&D Systems).

As placas foram incubadas com as amostras e recombinantes por 2 h/TA e em seguida, foram lavadas em PBST. Anticorpos biotinizados anti-IL1 β , anti-TNF- α , anti-IL-6, anti-IL-10 e anti-TGF- β foram adicionados às placas (100 μL /poço) e realizada nova incubação de 2 h/TA. Outras três lavagens em PBST foram feitas e adicionados 100 μL /poço do conjugado estreptoavidina-peroxidase. As placas foram novamente incubadas por 30 min/TA. Em seguida, outro ciclo de três lavagens foi realizado e a reação revelada pela adição de 100 μL /poço do substrato contendo o cromógeno TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine - eBioscience). A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico 4M.

3.9 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio de um software computacional chamado Graphpad Prism, da companhia Graphpad Software Incorporation, versão 5.0. Para análise da incidência tumoral de pele foi utilizado o Teste Exato de Fisher, o restante das análises foram feitas pelo teste One-Way ANOVA seguido pelo Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. O nível mínimo de significância estabelecido foi $p < 0,05$.

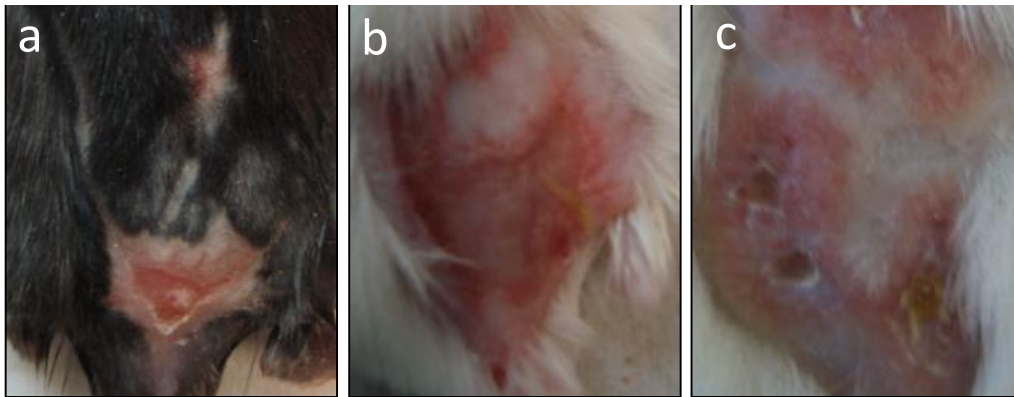
4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da Resposta Inflamatória à Tumorigênese Cutânea em Camundongos das Linhagens C57BL/6, A/J e AIRmin

Para caracterizar o modelo de resposta inflamatória nos animais C57BL/6, nosso primeiro estudo foi avaliar a resposta ao tratamento com DMBA/TPA em animais A/J e AIRmin e comparar com a resposta em animais C57BL/6. Os animais A/J, possuem maior susceptibilidade a promoção do tumor por TPA quando comparado à linhagem C57BL/6 (Ashman et al.,1982), e os camundongos AIRmin, os quais possuem baixa resposta inflamatória aguda são susceptíveis a indução da tumorigênese pelo DMBA (Biozzi et al., 1998). Para isso animais A/J, AIRmin e C57BL/6 foram tratados com DMBA, iniciador do tumor na dose de 50ug/0,1mL por cinco dias consecutivos e TPA, agente promotor, na dose de 5 ug/0,1mL duas vezes por semana no período de 50 dias, ambos diluídos em acetona. Os animais foram observados por mais 50 dias após o término de aplicação do TPA, conforme delineamento experimental descrito na **Figura 5a**.

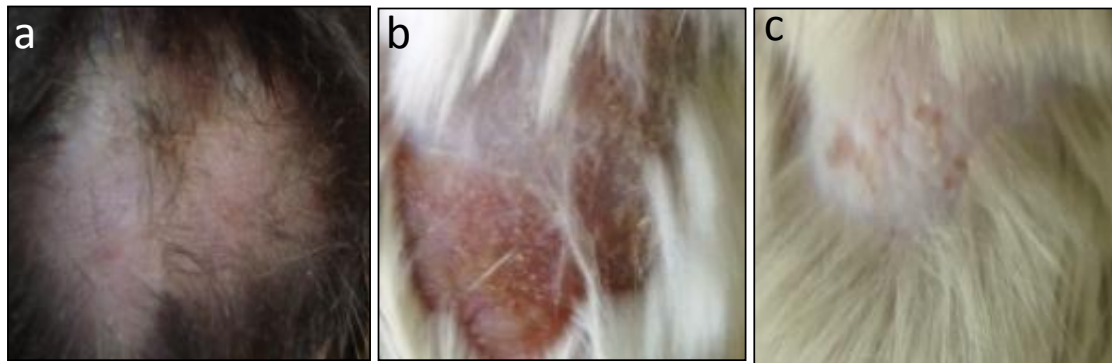
Como demonstrado na **Figura 6** os camundongos A/J (**6b**) e AIRmin (**6c**) demonstraram reação inflamatória no dorso 48 horas após aplicação das 5 doses consecutivas do carcinógeno DMBA. Ao se observar os animais da linhagem C57BL/6 (**6a**), notamos que os camundongos responderam de forma semelhante aos outros 2 grupos, sendo que todos os grupos apresentaram resolução da inflamação no decorrer de 15 a 20 dias (**Figura 7**).

Figura 6 – Imagem representativa da pele dos animais 48 horas após tratamento com DMBA.



(a) C57BL/6, (b) A/J e (c) AIRmin. Imagem representativa dos grupos de animais 48 horas após aplicação epicutânea por 5 dias consecutivos de DMBA diluído em acetona. Fonte: Vendramini P.V.R., 2013

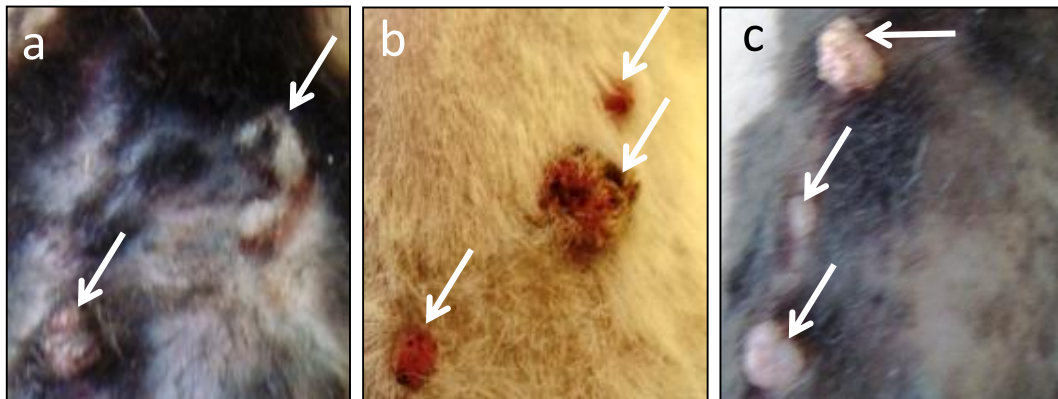
Figura 7 – Imagem representativa da pele dos animais 20 dias após tratamento com DMBA/TPA.



(a) C57BL/6, (b) A/J e (c) AIRmin. Imagem representativa dos grupos de animais 20 dias após aplicação epicutânea por 5 dias consecutivos de DMBA e 2 doses de TPA, ambos diluídos em acetona. Fonte: Vendramini P.V.R., 2013

Os grupos de animais C57BL/6, A/J e AIRmin, submetidos ao protocolo de tumorigênese, foram acompanhados semanalmente até o dia o final do período de experimentação, o dia 100. Ao observarmos a **Figura 8** notamos que os papilomas dos animais dos grupos C57BL/6 (**8a**) e AIRmin (**8c**) mostraram-se pálidos, com constante aumento de tamanho. No entanto foi observado em alguns casos que alguns papilomas regrediam neste mesmo período. No entanto, os camundongos A/J (**8b**) se caracterizaram por possuírem papilomas hiperêmicos.

Figura 8 – Imagem representativa da pele dos animais 100 dias após o tratamento com DMBA/TPA.

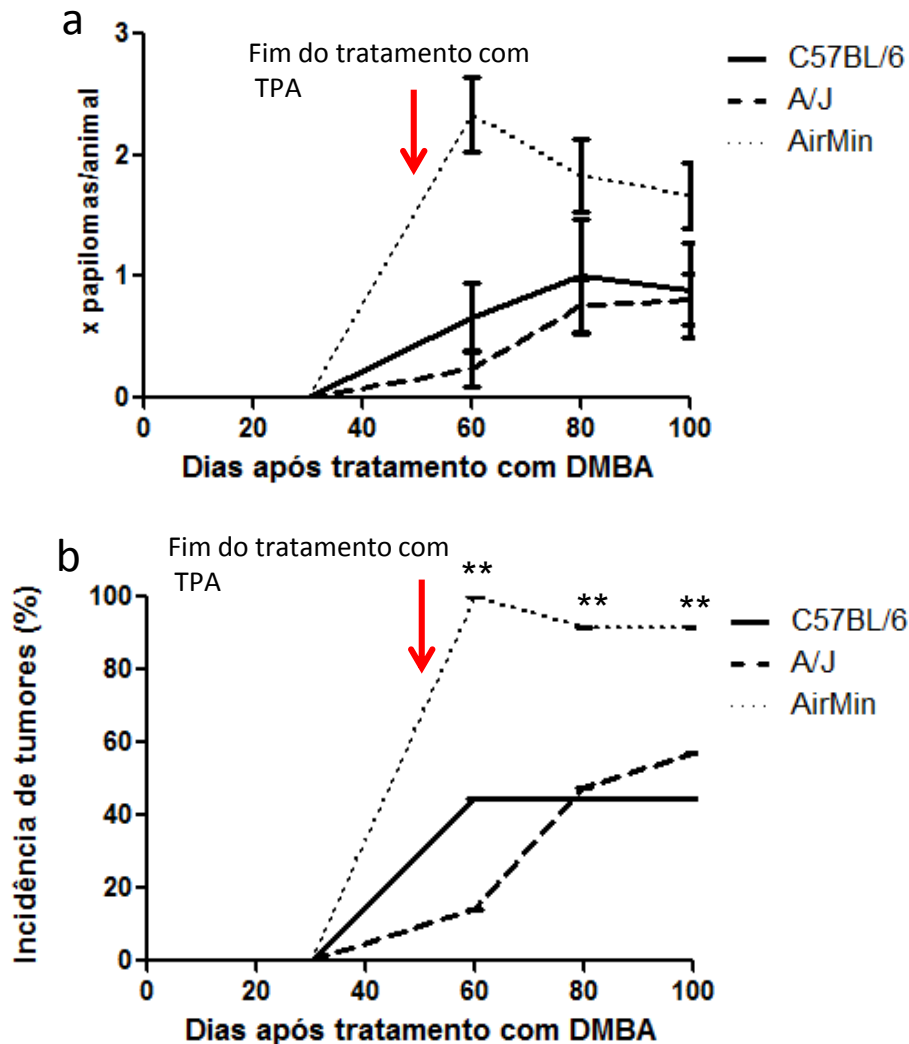


(a) C57BL/6, (b) A/J e (c) AIRmin. Imagem representativa dos grupos de animais 100 dias após aplicação epicutânea por 5 dias consecutivos de DMBA e 10 doses de TPA, 2x/semana até o dia 50, ambos diluídos em acetona. As setas mostram os papilomas na pele dos animais das 3 linhagens que foram tratadas. Fonte: Vendramini P.F.R., 2013

4.1.1 Incidência e Multiplicidade de Papilomas e Tumores de Pele

A multiplicidade e incidência foram avaliadas nos três grupos de animais. Os papilomas foram observados durante 100 dias de protocolo de indução da tumorigênese cutânea. A multiplicidade não mostrou diferença entre os animais C57BL/6, A/J e AIRmin. No entanto, a incidência mostrou um aumento significativo nos animais AIRmin quando comparados aos animais C57BL/6 e A/J (**Figura 9**).

Figura 9 – Multiplicidade e incidência de papilomas na pele dos animais das linhagens C57BL/6, A/J e AIRmin tratados com DMBA/TPA.

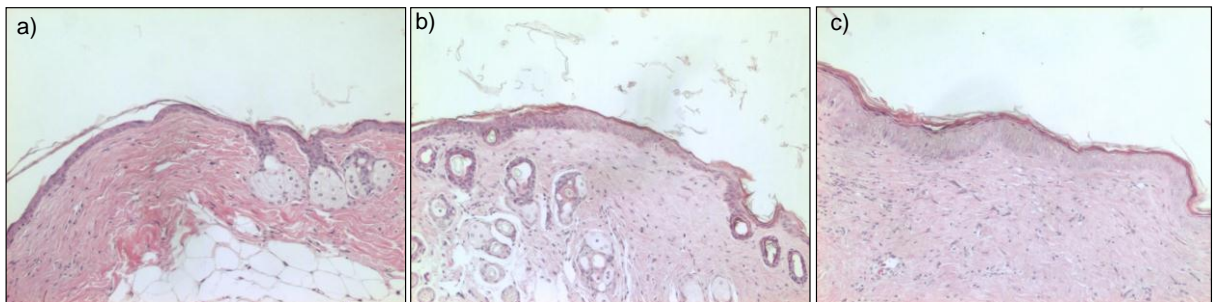


Animais das linhagens C57BL/6, A/J e AIRmin (n=10 para cada grupo) foram tratados com DMBA/TPA e observados por 100 dias. O gráfico de multiplicidade (a) mostra os resultados expressos que representam a média dos papilomas em cada grupo e em cada período de observação e o gráfico de incidência (b) os resultados expressos em porcentagem de animais positivos para o papiloma na observação macroscópica. Análise estatística da multiplicidade feita por One-way ANOVA seguido por Bonferroni, e a análise estatística da incidência feita pelo teste Exato de Fisher. $p < 0.05$: ** comparando AIRmin vs. C57BL/6 e AIRmin vs. A/J.

4.1.2 Análise Histológica da Pele

A análise histológica dos animais C57BL/6, A/J e AIRmin teve como objetivo a caracterização de alterações causadas pelos reagentes DMBA e TPA na pele desses camundongos. A detecção de diferenças na estrutura histológica entre os animais, assim como os tipos celulares envolvidos na reação do agente em questão é de extrema importância para a compreensão das possíveis diferenças na progressão da inflamação causada pelo processo de tumorigênese cutânea. Para isso a pele dos animais foi coletada para análise histológica 100 dias após o tratamento com DMBA/TPA. A coloração foi feita por HE. Como podemos observar na **Figura 10** os animais C57BL/6 **(a)**, A/J **(b)** e AIRmin **(c)** após 100 dias do tratamento com DMBA/TPA não apresentaram alterações significativas na pele. A organização histológica da pele se manteve normal, com camada de queratina de espessura normal. Há a presença de esparsos neutrófilos e macrófagos na camada dérmica da pele.

Figura 10 – Cortes histológicos dos grupos C57BL/6, A/J e AIRmin 100 dias após tratamento com DMBA/TPA.



Análise realizada após o tratamento com DMBA/TPA representativos dos grupos C57BL/6 (a), A/J (b) e AIRmin (c). Coloração por HE e aumento de 10X. Fonte: Vendramini P.V.R., 2013

4.2 Indução e Promoção da Tumorigênese Cutânea – Análise da Resposta Inflamatória nas Linhagens C57BL/6, C57BL/6 CD8KO, CD4KO, NUDE e RAG

Uma vez caracterizado e avaliado o modelo de tumorigênese cutânea induzida com DMBA/TPA em animais C57BL/6, o próximo passo foi utilizar as linhagens C57BL/6 CD8KO, CD4KO, NUDE e RAG para avaliar a resposta inflamatória destes animais em relação aos animais C57BL/6. O protocolo de indução de tumorigênese foi feito com DMBA e TPA, em dois estágios, conforme delineamento experimental (**Figura 5a**).

O tratamento com o carcinógeno DMBA e o agente promotor TPA tem como característica a formação de múltiplos papilomas, os quais podem regredir ou não, e em alguns casos, evoluir para carcinoma de pele. A contagem de papilomas e lesões sugestivas é fundamental para avaliar a sensibilidade à indução da carcinogênese química. Assim, os animais foram observados macroscopicamente durante 100 dias, após protocolo de indução de tumorigênese cutânea, e os papilomas contados semanalmente nesse período.

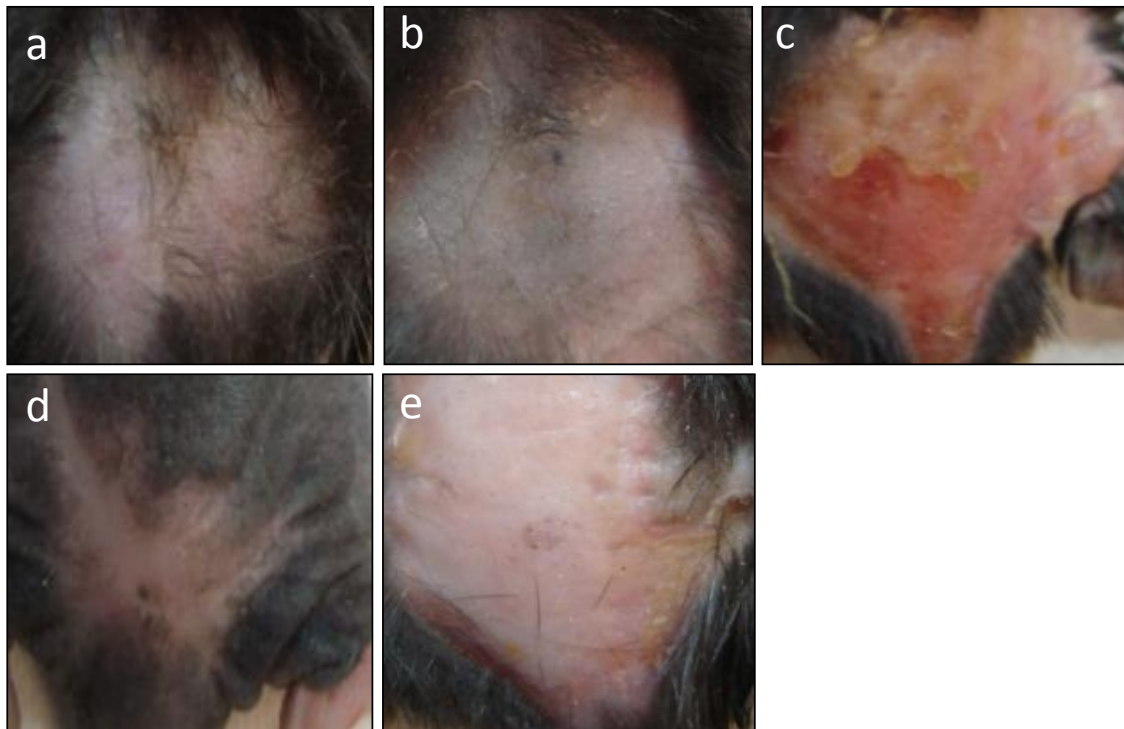
Ao observarmos a **Figura 11**, notamos que os camundongos dos grupos WT (a), CD8KO (b), CD4KO (c) e RAG (d) apresentaram reação inflamatória local 48 horas após os 5 dias de tratamento com DMBA. No entanto, o grupo de camundongos NUDE (d) foi exceção e não desenvolveu qualquer alteração visível na pele durante esse mesmo período. Decorrentes 15 a 20 dias do tratamento as lesões diminuíram de forma gradativa, com exceção dos animais CD4KO, que mantiveram a lesão até o término do protocolo (**Figura 12**).

Figura 11 – Imagem representativa da pele dos animais 48 horas após tratamento com DMBA.



(a) C57BL/6 WT, (b) C57BL/6 CD8KO, (c) C57BL/6 CD4KO, (d) C57BL/6 NUDE, (e) C57BL/6 RAG. Análise realizada 48 horas após aplicação epicutânea por 5 dias consecutivos de DMBA diluído em acetona. Fonte: Vendramini P.V.R., 2013

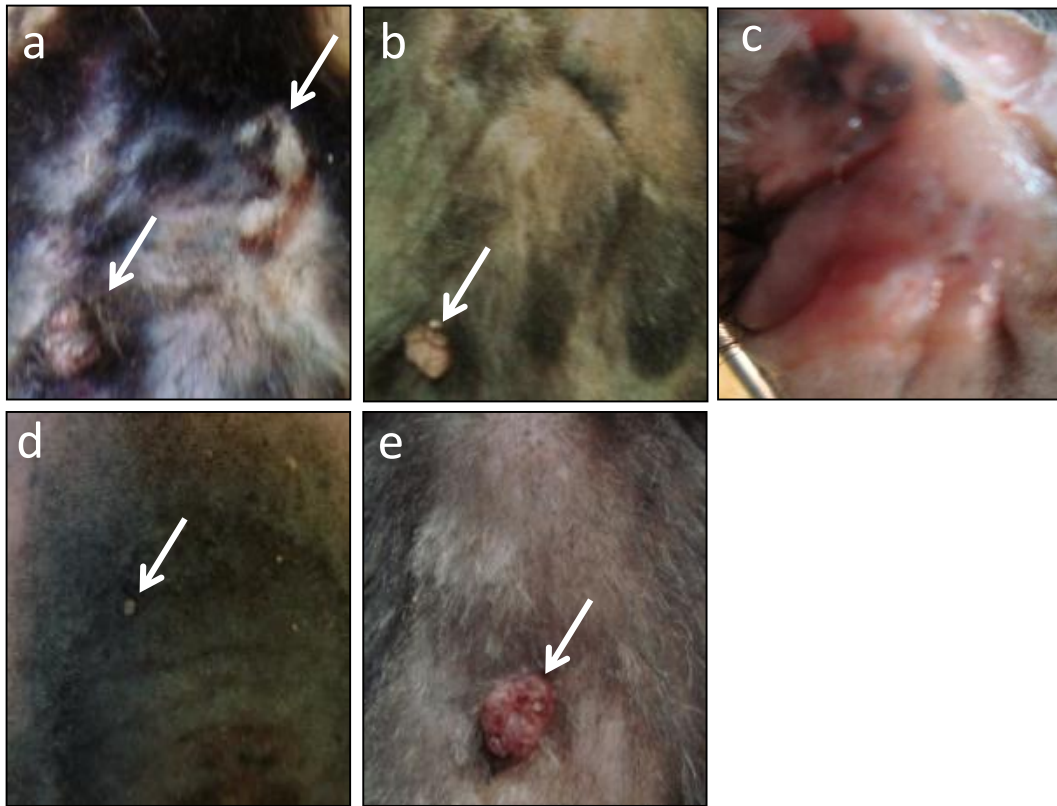
Figura 12 – Imagem representativa da pele dos animais 20 dias após tratamento com DMBA/TPA.



(a) C57BL/6 WT, (b) C57BL/6 CD8KO, (c) C57BL/6 CD4KO, (d) C57BL/6 NUDE, (e) C57BL/6 RAG. Imagem representativa dos grupos de animais 20 dias após aplicação epicutânea por 5 dias consecutivos de DMBA e 2 doses de TPA, ambos diluídos em acetona. Fonte: Vendramini P.V.R., 2013

Os grupos de animais de linhagem C57BL/6 também estão representados na **Figura 13** no término do protocolo de indução da tumorigênese cutânea. A característica dos papilomas se mostrou semelhante entre os animais selvagens e os animais nocautes que desenvolveram papilomas. Diferentemente dos outros grupos de animais, os camundongos C57BL/6 CD4 KO permaneceram com a pele inflamada durante todo o protocolo e sem o surgimento de papilomas.

Figura 13 – Imagem representativa da pele dos animais 100 dias após o tratamento com DMBA/TPA.



(a) C57BL/6 WT, (b) C57BL/6 CD8KO, (c) C57BL/6 CD4KO, (d) C57BL/6 NUDE, (e) C57BL/6 RAG. Imagem representativa dos grupos de animais 100 dias após aplicação epicutânea por 5 dias consecutivos de DMBA e 10 doses de TPA, 2x/semana até o dia 50, ambos diluídos em acetona. As setas mostram os papilomas na pele dos animais das 3 linhagens que foram tratadas. Fonte: Vendramini P.F.R., 2013

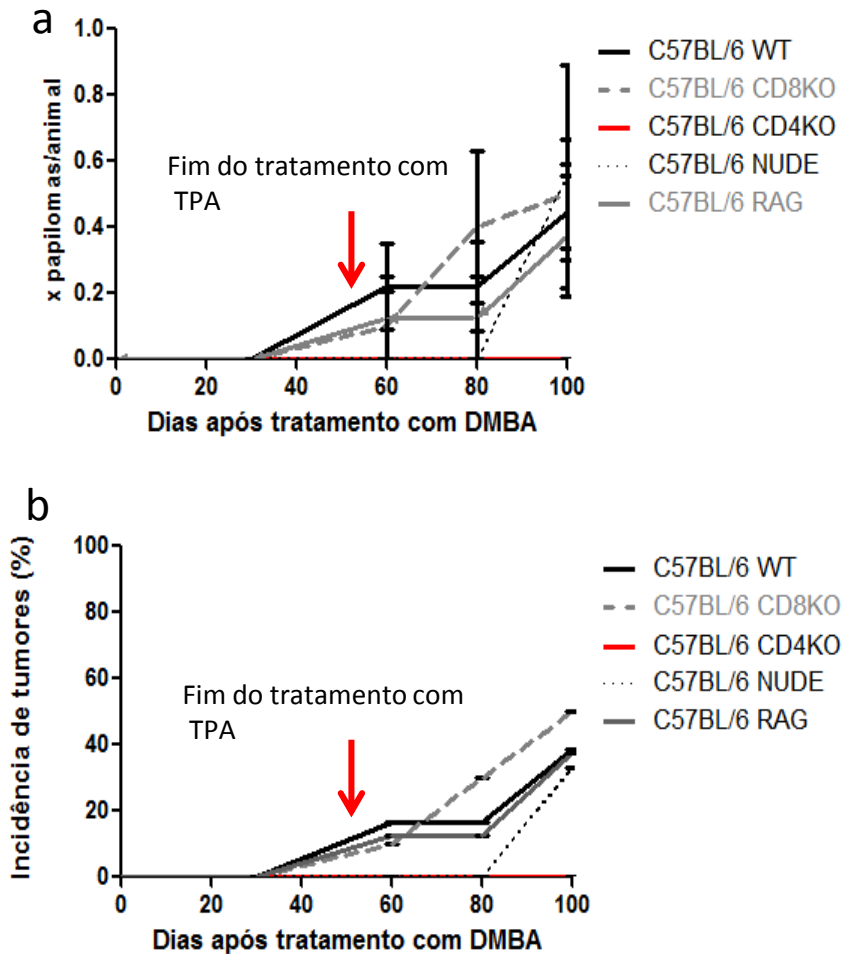
4.2.1 Incidência e Multiplicidade de Papilomas

Durante os 100 dias do protocolo, os grupos de animais C57BL/6, C57BL/6 CD8KO, CD4KO, NUDE e RAG foram acompanhados e a multiplicidade e incidência dos papilomas analisados. Os papilomas foram avaliados e contados semanalmente. Como mostra a **Figura 14a**, o crescimento dos papilomas foi observado entre os dias 30 e 60 e entre os dias 80 e 100.

Em relação à incidência, a **Figura 14b** mostra o mesmo perfil observado no gráfico de multiplicidade, um aumento entre os dias 30 e 60 e entre os dias 80 e 100. Portanto, segundo as análises realizadas não houve diferença significativa quanto à

incidência e multiplicidade entre os grupos de animais C57BL/6 WT e os animais CD8KO, NUDE e RAG. No entanto, os animais CD4KO, diferentemente dos outros grupos, não apresentaram crescimento de papilomas durante esse mesmo período.

Figura 14 – Multiplicidade e incidência de papilomas na pele dos grupos de animais C57BL/6 tratados com DMBA/TPA.

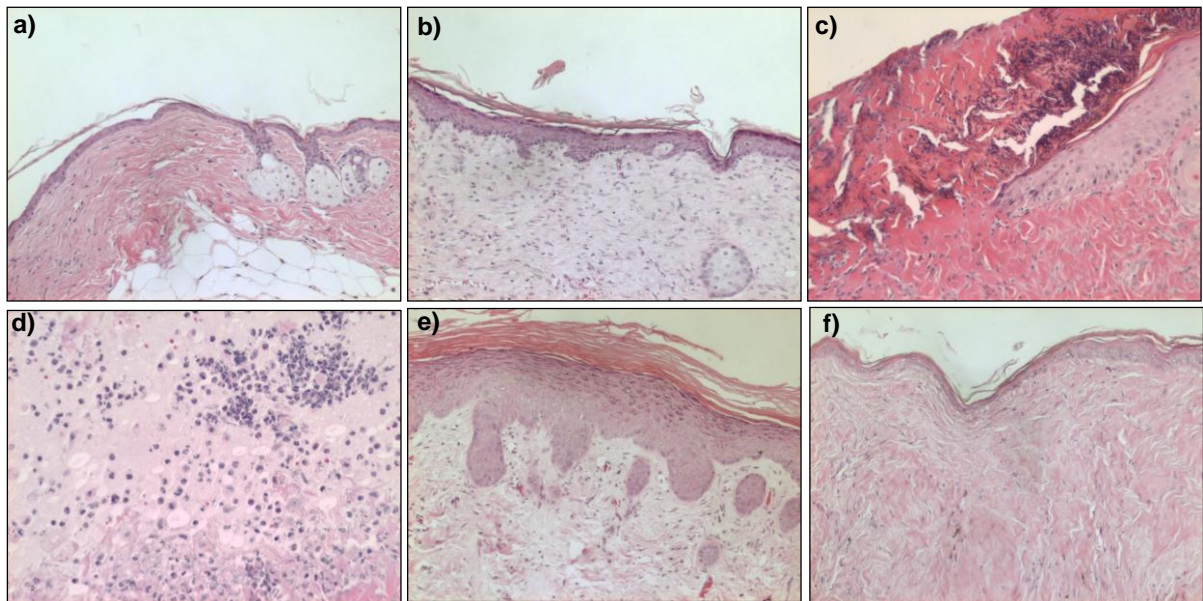


Animais C57BL/6 WT, CD8KO, CD4KO, NUDE e RAG (n=10 para cada grupo) foram tratados com DMBA/TPA e observados por 100 dias. O gráfico de multiplicidade (a) mostra os resultados expressos que representam a média dos papilomas em cada grupo e em cada período de observação e o gráfico de incidência (b) os resultados expressos em porcentagem de animais positivos para o papiloma na observação macroscópica. Análise estatística da multiplicidade feita por One-way ANOVA seguido por Bonferroni, e a análise estatística da incidência feita pelo teste Exato de Fisher.

4.2.2 Análise Histológica da Pele

Os animais C57BL/6 WT, CD8KO, CD4KO, NUDE e RAG após 100 dias de indução da tumorigênese cutânea por DMBA/TPA tiveram a pele coletada e avaliada quanto à presença de infiltrado inflamatório no corte histológico nesses grupos de animais. A coloração foi feita por HE. Como podemos observar na **Figura 15**, os animais C56BL/6 WT **(a)**, CD8KO **(b)**, NUDE **(e)** e RAG **(f)** mostraram esparsos infiltrados inflamatórios na derme, com epiderme preservada, por vezes apresentando por cima da camada córnea material amorfo constituído de crosta constituída de massa amorfa eosinofílica composta de restos coalescentes de queratinócitos, e neutrófilos degenerados. Os animais CD4KO **(15c)**, diferentemente dos outros grupos, mostraram necrose do epitélio de revestimento associado à formação de crostas constituídas de massa amorfa eosinofílica composta de restos coalescentes de queratinócitos, e neutrófilos degenerados. Esses animais por vezes revelaram total ou parcial destacamento da epiderme, com desnudamento do tecido dérmico. Logo a seguir em direção à camada dérmica evidenciou-se variável quantidade de infiltrado inflamatório misto composto predominantemente de neutrófilos e raros macrófagos. Ainda neste seguimento evidenciou-se tecido de granulação. O papilo quando presente no fragmento laminado apresentou esparsos neutrófilos e macrófagos. Quando há presença do bordo epidérmico, este apresentou acantose reacional, por vezes, com hiperqueratose ortoqueratótica. A **Figura 15d** nos permite ver, em um aumento de 20x, extensão da lesão para regiões mais profundas do corte histológico demonstrando o intenso infiltrado inflamatório nos animais C57BL/6 CD4KO.

Figura 15 – Cortes histológicos dos grupos C57BL/6 WT, C57BL/6 CD8KO, C57BL/6 CD4KO, C57BL/6 NUDE e C57BL/6 RAG 100 dias após tratamento com DMBA/TPA.

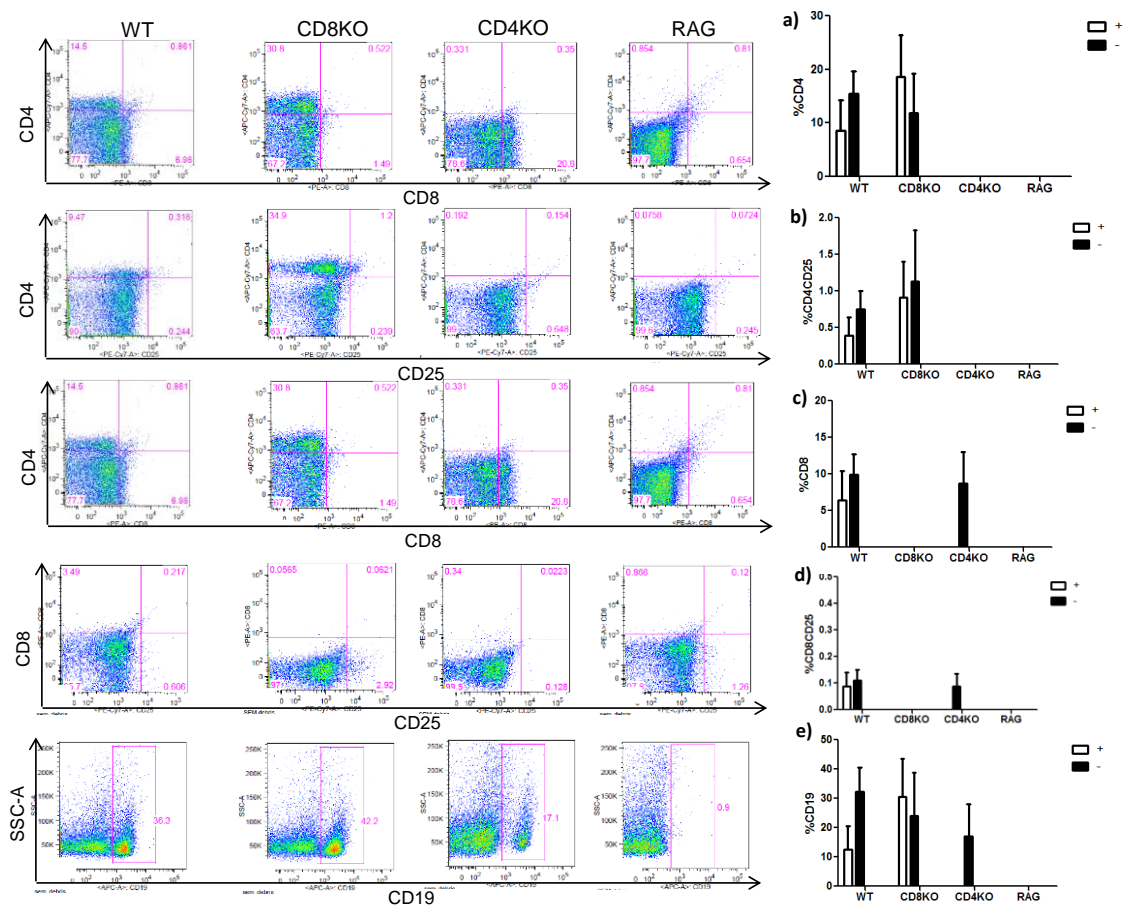


Análise realizada após o tratamento com DMBA/TPA representativos dos grupos C57BL/6 WT (a), CD8KO (b), CD4KO (c), CD4KO (aumento 20x) (d) NUDE (e) e RAG (f). Coloração feita por HE e aumento de 10X. Fonte: Vendramini P.V.R., 2013

4.2.3 Caracterização da População Linfocitária no Baço e Linfonodo dos Camundongos por Citometria de Fluxo

A população de linfócitos no baço e linfonodo inguinal dos animais C57BL/6 WT, CD8KO, CD4KO e RAG também foi caracterizada e comparada para os camundongos com (+) e sem (-) papilomas. Conforme podemos ver na **Figura 16**, não houve diferença significativa entre a porcentagem de linfócitos TCD4 (**16a**), TCD4CD25 (**16b**), TCD8 (**16c**), TCD8CD25 (**16d**) e CD19 (**16e**) ao se comparar os animais WT, CD8KO, CD4KO e RAG com e sem papilomas.

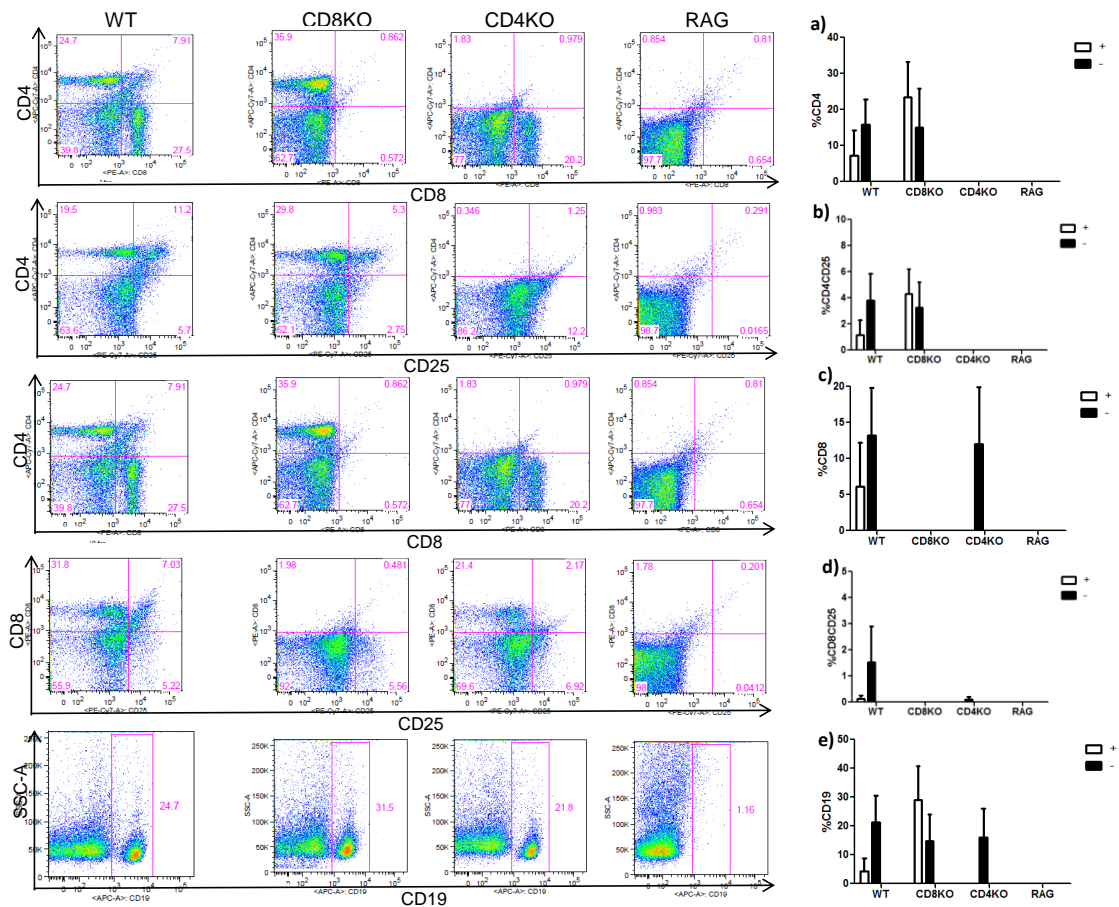
Figura 16 – Perfil linfocitário no baço dos animais C57BL/6 WT, CD8KO, CD4KO e RAG.



Análise de Citometria de fluxo de células provenientes de baço de animais tratados com DMBA/TPA após 100 dias. Os baços foram retirados e marcados com anticorpos fluorescentes, segundo material e métodos. A análise foi feita em programa de análise para citometria de fluxo FlowJo. Foram utilizados animais dos grupos C57BL/6 WT, CD8KO, CD4KO e RAG (n=10). (a)%CD4, (b)%CD4CD25, (c)%CD8, (d)%CD8CD25 e (e)%CD19. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. As análises foram feitas pelos testes One-way ANOVA seguido por Bonferroni.

Da mesma maneira que no baço, a porcentagem de células TCD4 (17a), TCD8 (17c), linfócitos B (17e) e da molécula CD25 (17 b,d), no linfonodo inguinal, também não mostrou diferenças significativas quando comparamos os camundongos WT, CD8KO, CD4KO e RAG com (+) papilomas e sem papilomas (-). Na **Figura 17** podemos observar a porcentagem de células nesses animais conforme descrito acima.

Figura 17 – Perfil linfocitário no linfonodo dos animais C57BL/6 WT, CD8KO, CD4KO e RAG.



Análise de Citometria de fluxo de células provenientes de linfonodo de animais tratados com DMBA/TPA após 100 dias. Os linfonodos foram retirados e marcados com anticorpos fluorescentes, segundo material e métodos. A análise foi feita em programa de análise para citometria de fluxo FlowJo. Foram utilizados animais dos grupos C57BL/6 WT, CD8KO, CD4KO e RAG (n=10). (a)%CD4, (b)%CD4CD25, (c)%CD8, (d)%CD8CD25 e (e)%CD19. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. As análises foram feitas pelos testes One-way ANOVA seguido por Bonferroni.

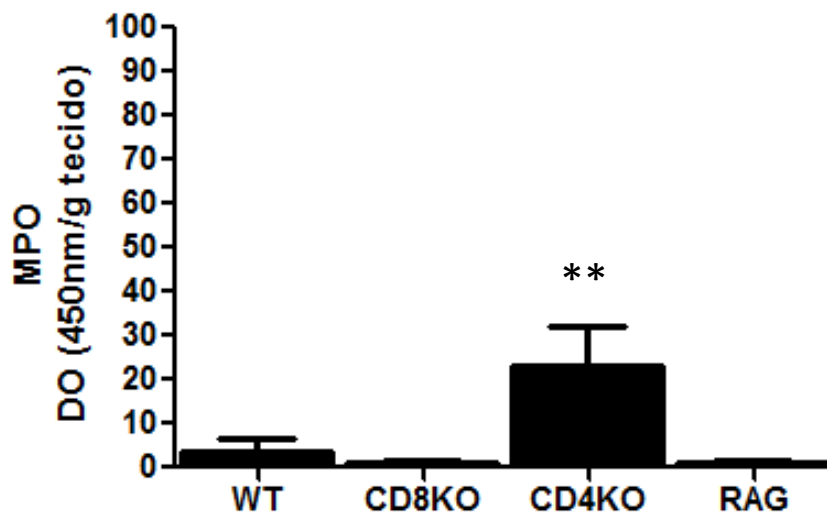
4.2.4 Dosagem da Enzima Mieloperoxidase (MPO) para Quantificação de Neutrófilos na Pele

Com o intuito de avaliar o infiltrado inflamatório na pele dos animais tratados com DMBA e TPA, após 100 dias de protocolo de indução de tumorigênese, a pele dos animais foi retirada e processada de acordo com material e métodos e submetidos ao ensaio de dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO). MPO foi

utilizado como um marcador enzimático para quantificar a produção de intermediários reativos de oxigênio pelos neutrófilos que se infiltraram na pele em resposta à aplicação tópica de DMBA/TPA.

Ao avaliarmos os resultados obtidos observamos que os animais C57BL/6 WT, CD8KO e RAG não apresentaram diferenças significativas entre si e se comportaram de forma semelhante. No entanto, o grupo dos animais C57BL/6 CD4KO apresentaram um aumento significativo da enzima MPO, cerca de 6,5 vezes quando comparado aos demais grupos de animais (**Figura 18**).

Figura 18 – Quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO) na pele dos grupos de animais C57BL/6.



Quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO) dosadas a partir do macerado da pele dos animais C57BL/6 WT, CD8KO, CD4KO e RAG (n=10), conforme descrição em Material e Métodos. A pele foi retirada no dia 100 após indução do protocolo de tumorigênese cutânea com DMBA/TPA. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. As análises foram feitas pelos testes One-way ANOVA seguido por Bonferroni. ** $p < 0,05$ comparando CD4KO vs. WT, CD4KO vs. CD8KO, CD4KO vs. RAG.

4.2.5 Produção de Citocinas Pró-inflamatórias na Pele

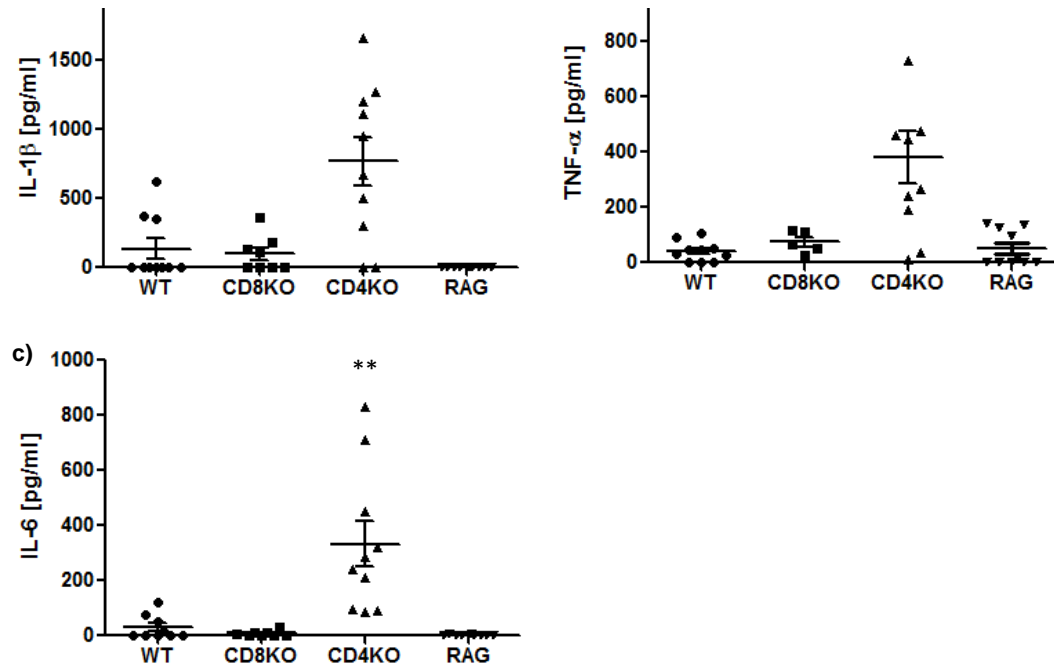
Para avaliar o perfil de produção de citocinas no processo inflamatório e tumorigênico, citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IL-6 foram quantificadas pelo método de ELISA. Para este ensaio foram utilizados os sobrenadantes do macerado da pele dos animais tratados com DMBA/TPA.

A citocina IL-1 β (**19a**) foi encontrada em maiores quantidades nos animais CD4KO, média de 766,87 pg/mL, cerca de 5,5 vezes maior que os animais WT e CD8KO, os quais apresentaram níveis de produção de citocinas IL-1 β de 134,81 pg/mL e de 115,19 pg/mL, respectivamente. No entanto, os animais RAG não tiveram níveis de citocina IL-1 β detectável.

Ao verificarmos os níveis de citocina TNF- α (**19b**) observamos que os animais CD4KO apresentaram cerca de 8 vezes mais TNF- α do que os animais WT, 381,15 pg/mL e 48,16 pg/mL, respectivamente. Em relação aos animais CD8KO e RAG, os níveis de TNF- α foram, 74,00 pg/mL e 51,39 pg/mL, respectivamente, os quais foram significativamente menores quando comparados aos camundongos CD4KO.

Ao verificarmos os níveis da citocina pró-inflamatória IL-6 (**19c**) observamos que nos animais CD4KO apresentou uma média foi de 331,73 pg/mL, cerca de 12 vezes maior que os animais WT que tiveram níveis de 28,96 pg/mL desta citocina. No entanto, observamos os níveis próximos ao zero de IL-6 nos animais CD8KO e RAG.

Figura 19 – Produção de citocinas pró-inflamatórias no macerado de pele dos grupos de camundongos C57BL/6 100 dias após indução da tumorigênese cutânea com DMBA/TPA.



Quantificação de citocinas (a) IL-1 β , (b) TNF- α , (c) IL-6 dosadas à partir do macerado da pele dos animais C57BL/6 WT, CD8KO, CD4KO e RAG (n=10), pelo método de ELISA, conforme descrição em Material e Métodos. A pele foi retirada no dia 100 após indução do protocolo de tumorigênese cutânea com DMBA/TPA. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. As análises foram feitas pelos testes One-way ANOVA seguido por Bonferroni. ** p<0,05 comparando CD4KO vs. WT, CD4KO vs. CD8KO, CD4KO vs. RAG

4.2.6 Produção de Citocinas Anti-inflamatórias na Pele

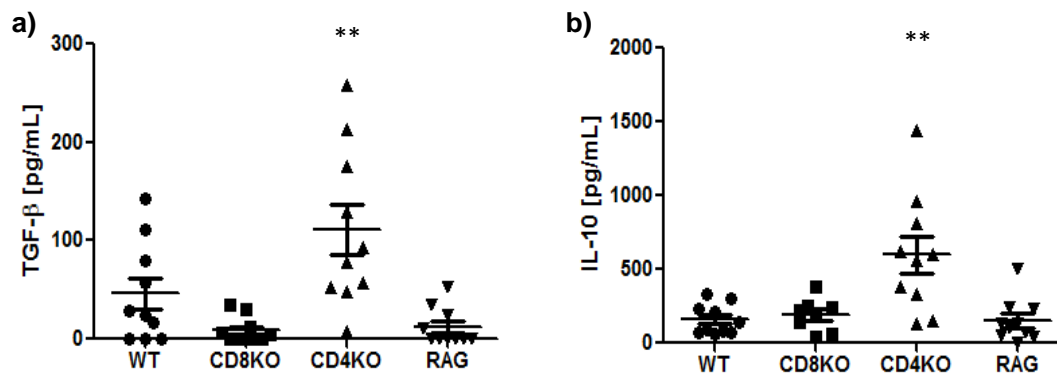
As citocinas anti-inflamatórias também foram investigadas nos animais tratados com DMBA/TPA. Após 100 dias. As citocinas TGF- β e IL-10 foram produzidas em maiores quantidades nos animais CD4KO em relação aos outros grupos de animais, conforme podemos observar na **Figura 20**.

A média da produção de citocina TGF- β (**20a**) foi de 46,06 pg/mL pelos animais WT, sendo que nos animais CD4KO foi de 111,304 pg/mL, cerca de 2,5 vezes maior. Os grupos de camundongos CD8KO e RAG apresentaram níveis de

11,61 pg/mL e 12,31 pg/mL, respectivamente, os quais foram significativamente menores quando comparados aos animais CD4KO.

A citocina IL-10 (**20b**) apresentou uma concentração de 158,89 pg/mL nos animais WT e de 600,02 pg/mL nos animais CD4KO, cerca de 4 vezes maior quando comparados aos animais WT. Nos animais CD8KO e RAG, as concentrações de IL-10 foram de 184,36 pg/mL e 131,48 pg/mL, respectivamente, resultados significativamente menores quando comparados aos animais CD4KO.

Figura 20 – Produção de citocinas anti-inflamatórias no macerado de pele dos grupos de camundongos C57BL/6 100 dias após indução da tumorigênese cutânea com DMBA/TPA.



Quantificação de citocinas (a) TGF-β e (b) IL-10 dosadas à partir do macerado da pele dos animais C57BL/6 WT, CD8KO, CD4KO e RAG (n=10), pelo método de ELISA, conforme descrição em Material e Métodos. A pele foi retirada no dia 100 após indução do protocolo de tumorigênese cutânea com DMBA/TPA. Os resultados foram expressos como média ± EPM. As análises foram feitas pelos testes One-way ANOVA seguido por Bonferroni. ** p<0,05 comparando CD4KO vs. WT, CD4KO vs. CD8KO, CD4KO vs. RAG.

4.3 Caracterização e Avaliação da Resposta Inflamatória em Camundongos C57BL/6, C57BL/6 CD4KO e NUDE 48 horas após Tratamento com DMBA

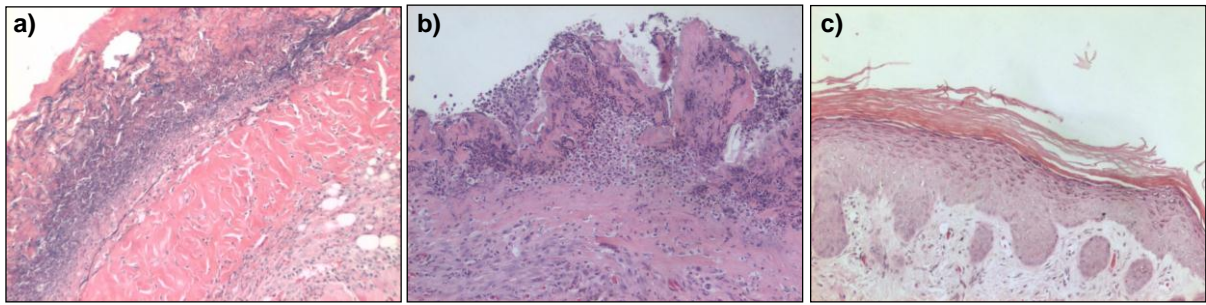
Ao avaliarmos os resultados obtidos nos diferentes grupos de animais, C57BL/6 WT, CD8KO, CD4KO e RAG, e anteriormente em camundongos NUDE, notamos que os animais CD4KO e NUDE apresentavam respostas praticamente opostas. Após acompanhar os 100 dias do protocolo destes 2 grupos de animais, observa-se que os camundongos da linhagem C57BL/6 CD4 KO desenvolvem resposta inflamatória após 48 horas (**Figura 11**), persistindo durante todo o protocolo e os camundongos NUDE praticamente não apresentam resposta

inflamatória ao tratamento com DMBA. Baseado nestes dados foi avaliado isoladamente estes grupos, C57BL/6 CD4 KO e NUDE, os quais receberam tratamento por 5 dias com DMBA e foram avaliados após 48 horas do término do tratamento, conforme delineamento experimental já descrito (**Figura 5b**).

4.3.1 Análise Histológica da Pele

Os animais C57BL/6 WT, CD4KO e NUDE foram tratados por 5 dias consecutivos com DMBA e 48h após o tratamento os animais tiveram a pele coletadas para análise histológica e foram avaliados quanto a presença ou não de infiltrado inflamatório. Como se observa na **Figura 21** os animais C57BL/6 WT (**a**) e C57BL/6 CD4KO (**b**) mostraram necrose do epitélio de revestimento associado á formação de crostas constituídas de massa amorfa eosinofílica composta de restos coalescentes de queratinócitos, e neutrófilos degenerados. Por vezes revelaram total ou parcial destacamento da epiderme, com desnudamento do tecido dérmico. Logo a seguir em direção á camada dérmica evidenciou-se variável quantidade de infiltrado inflamatório misto composto de predominantemente de neutrófilos e raros macrófagos. Ainda neste seguimento foi visto tecido de granulação. O panículo quando presente no fragmento laminado apresentou esparsos neutrófilos e macrófagos. Quando o bordo epidérmico estava presente apresentou acantose reacional, podendo haver hiperqueratose ortoqueratótica. Os camundongos NUDE (**21c**) mantiveram-se com a pele normal e camada de queratina de espessura normal. Foi visto a presença de esparsos neutrófilos e macrófagos na camada dérmica da pele desses animais.

Figura 21 – Cortes histológicos dos grupos C57BL/6 WT, C57BL/6 CD4KO, C57BL/6 NUDE 48 horas após tratamento com DMBA.

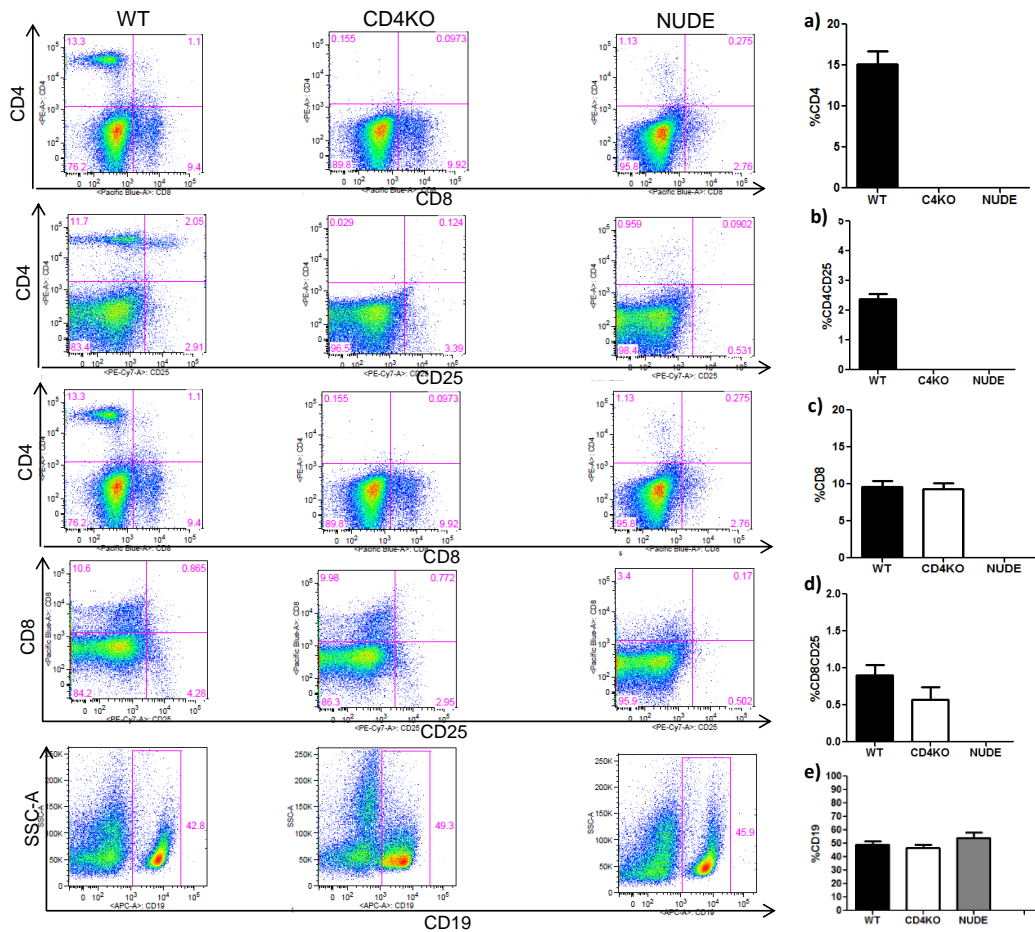


Análise realizada após o tratamento com DMBA representativos dos grupos C57BL/6 WT (a), CD4KO (b) e NUDE (c). Coloração feita por HE e aumento de 10X. Fonte: Vendramini P.V.R., 2013

4.3.2 Caracterização da População Linfocitária no Baço e Linfonodo dos Camundongos por Citometria de Fluxo

Os camundongos C57BL/6 WT, CD4KO e NUDE foram tratados por cinco dias consecutivos com DMBA, após isso os animais foram sacrificados, baço e linfonodos foram retirados e processados, para avaliação da população linfocitária. No baço os animais WT, CD4KO e NUDE não mostraram diferenças significativas entre si na porcentagem de linfócitos TCD4 (**Figura 22a**), TCD8 (**22c**), linfócitos B (**22e**) e na molécula CD25 (**22 b,d**).

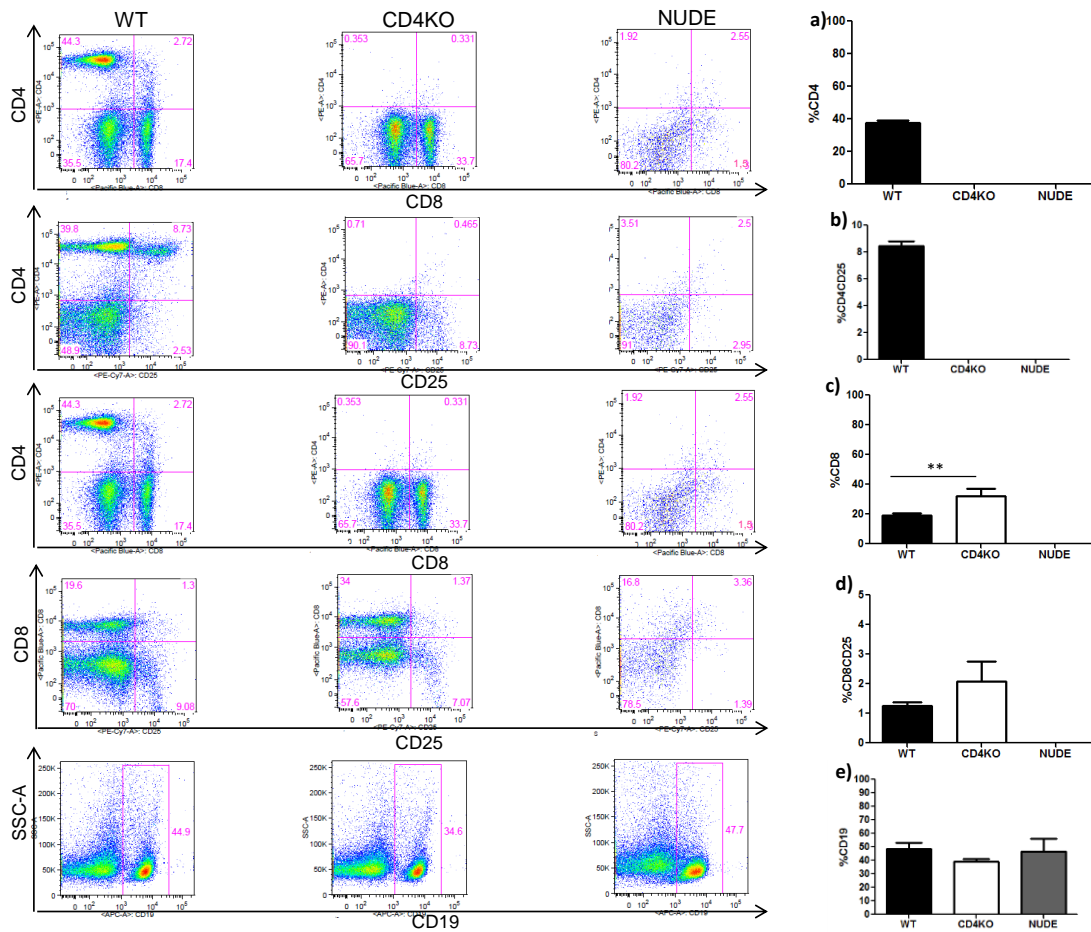
Figura 22 – Perfil linfocitário no baço dos animais C57BL/6 WT, CD4KO e NUDE, após tratamento com DMBA.



Análise de Citometria de fluxo de células provenientes de baço de animais tratados com DMBA após 48 horas. Os baços foram retirados e marcados com anticorpos fluorescentes, segundo material e métodos. A análise foi feita em programa de análise para citometria de fluxo, FlowJo. Foram utilizados animais dos grupos C57BL/6 WT, CD4KO e NUDE (n=10). (a) %CD4, (b) %CD4CD25, (c) %CD8, (d) %CD8CD25 e (e) %CD19. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. As análises foram feitas pelos testes One-way ANOVA seguido por Bonferroni.

Já no linfonodo inguinal, diferentemente do baço, a porcentagem de linfócitos TCD8 (**Figura 23c**) foi significativamente maior nos animais CD4KO, cerca de 32%, quando comparados aos animais WT, cerca de 18%. Os linfócitos TCD4 (**23a**) e a molécula CD25 (**23b**, **23d**) não mostraram diferenças significativas entre esses os grupos de camundongos. Os linfócitos B também foram comparados entre os 3 grupos de animais e também não mostraram diferenças significativas na porcentagem de células (**23e**).

Figura 23 – Perfil linfocitário no linfonodo dos animais C57BL/6 WT, CD4KO e NUDE, após tratamento com DMBA.



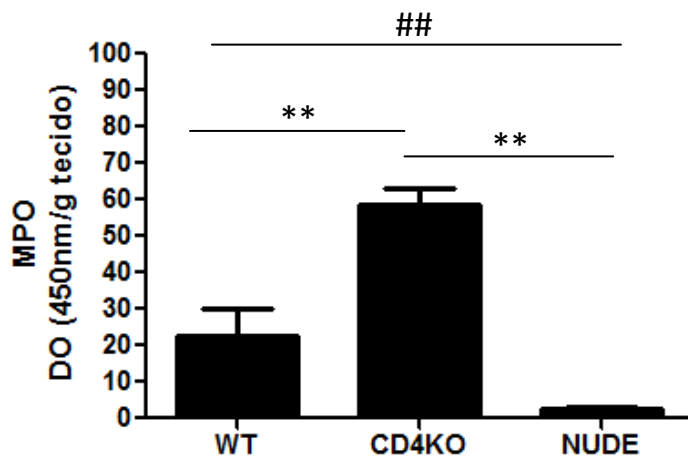
Análise de Citometria de fluxo de células provenientes de linfonodo de animais tratados com DMBA/TPA após 100 dias. Os linfonodos foram retirados e marcados com anticorpos fluorescentes, segundo material e métodos. A análise foi feita em programa de análise para citometria de fluxo FlowJo. Foram utilizados animais dos grupos C57BL/6 WT, CD4KO e NUDE (n=10). (a)%CD4, (b)%CD4CD25, (c)%CD8, (d)%CD8CD25 e (e)%CD19. Os resultados foram expressos como média ± EPM. As análises foram feitas pelos testes One-way ANOVA seguido por Bonferroni. ** p < 0,05 comparando os grupos C57BL/6 WT e CD4KO.

4.3.3 Dosagem da Enzima Mieloperoxidase (MPO) para Quantificação de Neutrófilos na Pele

Após 48 horas do término do tratamento com DMBA, a pele dos animais dos grupos C57BL/6 WT, CD4KO e NUDE foram avaliadas. Para analisar o infiltrado inflamatório, foi realizada a avaliação através do ensaio enzimático para dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO), que reflete a quantificação de neutrófilos (**Figura 24**). Esses dados mostram que o grupo de camundongos C57BL/6 CD4KO apresenta uma atividade enzimática 2,5 vezes maior, significativa, quando

comparados aos grupos de animais C57BL/6 WT, 58,34 e 22,72 nm/g de tecido, respectivamente. No entanto, os camundongos NUDE apresentam baixos níveis da atividade enzimática, cerca de 2,47 nm/g de tecido.

Figura 24 – Quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO) na pele dos grupos de animais C57BL/6.



Quantificação da enzima mieloperoxidase (MPO) dosadas a partir do macerado da pele dos grupos de animais C57BL/6 WT, CD4KO e NUDE (n=10), conforme descrição em Material e Métodos. A pele foi retirada 48 horas após indução do protocolo de tumorigênese cutânea com DMBA. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. As análises foram feitas pelos testes One-way ANOVA seguido por Bonferroni. ** p<0,05 comparando CD4KO vs. WT, CD4KO vs. NUDE e ## p<0,05 comparando WT vs. NUDE.

4.3.4 Produção de Citocinas Pró-inflamatórias na Pele

As citocinas pró-inflamatórias na pele dos grupos de animais C57BL/6 WT, CD4KO e NUDE também foram analisadas 48 horas após aplicação do carcinógeno DMBA.

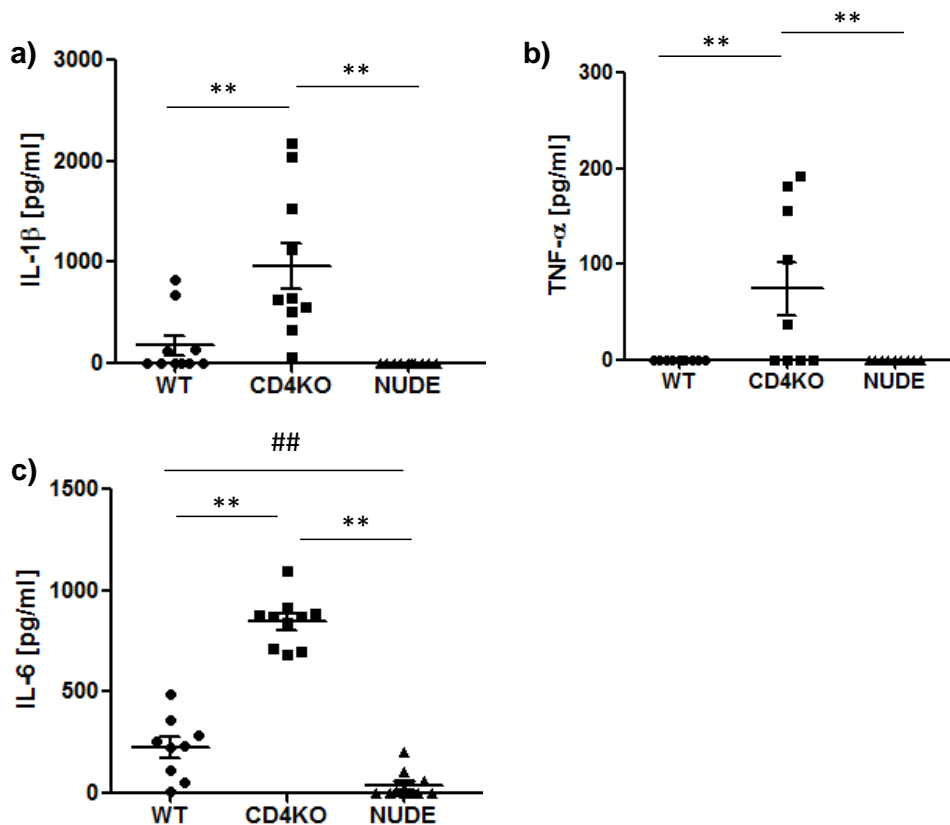
A concentração da citocina IL-1 β (**Figura 25a**) na pele dos animais C57BL/6 WT foi de 176,84 pg/mL e nos CD4KO de 961,99 pg/mL, cerca de 5,5 vezes maior. Já os camundongos NUDE, apresentaram níveis de IL-1 β não-detectáveis.

Ao se verificar as concentrações da citocina TNF- α (**Figura 25b**), nota-se que os animais WT e NUDE não tiveram níveis detectáveis. No entanto os animais CD4KO tiveram níveis de 74,70 pg/mL de TNF- α .

As avaliações em relação à citocina IL-6 (**Figura 25c**) mostraram que as concentrações desta citocina no grupo de animais CD4KO (843,00 pg/mL) foi cerca

de 3,5 e 21 vezes maior do que os grupos de animais WT (228,77 pg/mL) e NUDE (38,59 pg/mL), respectivamente.

Figura 25 – Produção de citocinas pró-inflamatórias na pele dos grupos de camundongos C57BL/6 após tratamento com DMBA.



Quantificação de citocinas (a) IL-1 β , (b) TNF- α , (c) IL-6 dosadas a partir do macerado da pele dos animais C57BL/6 WT, CD4KO e NUDE (n=10), pelo método de ELISA, conforme descrição em Material e Métodos. A pele foi retirada 48 horas após indução do protocolo de tumorigênese cutânea com DMBA. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. As análises foram feitas pelos testes One-way ANOVA seguido por Bonferroni. ** p<0,05 comparando CD4KO vs. WT, CD4KO vs. NUDE e ## p<0.05 comparando WT vs. NUDE.

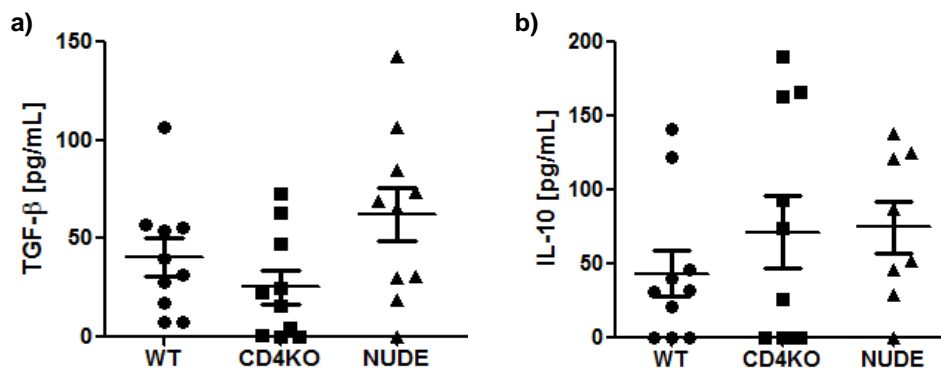
4.3.5 Produção de Citocinas Anti-inflamatórias na Pele

Os camundongos C57BL/6 WT, CD4KO e NUDE também foram avaliados quanto ao perfil de citocinas anti-inflamatórias, TGF- β e IL-10, 48h após a aplicação do DMBA. A concentração no macerado da pele da citocina TGF- β (**Figura 26a**) foi de 39,79 pg/mL no grupo dos animais WT, nos animais CD4KO foi de 24,90 pg/mL e

nos animais NUDE foi de 65,69 pg/mL. Estes valores, apesar do grupo de camundongos NUDE apresentar valores, 1,65 e 2,63 vezes menores que os grupos CD4KO e WT, respectivamente, não foram significativamente diferentes.

Em relação às concentrações da citocina IL-10 (**Figura 26b**), os animais NUDE e CD4KO, tiveram valores semelhantes, 74,73 e 74,07 pg/mL, respectivamente. O grupo de animais WT tiveram níveis menores de IL-10, 39,97 pg/mL. A análise feita mostrou que não há diferença significativa entre os grupos avaliados.

Figura 26 – Produção de citocinas anti-inflamatórias na pele dos grupos de camundongos C57BL/6 após tratamento com DMBA.



Quantificação de citocinas (a) TGF-β e (b) IL-10 dosadas a partir do macerado da pele dos animais C57BL/6 WT, CD4KO e NUDE (n=10), pelo método de ELISA, conforme descrição em Material e Métodos. A pele foi retirada 48 horas após indução do protocolo de tumorigênese cutânea com DMBA. Os resultados foram expressos como média ± EPM. As análises foram feitas pelos testes One-way ANOVA seguido por Bonferroni.

5 DISCUSSÃO

A resposta imune inata é a primeira barreira imune frente a um distúrbio patológico, e, em conjunto com o reparo do DNA e a morte celular, pode ser um dos principais mecanismos para o controle do surgimento de células neoplásicas. A inflamação, no seu perfil agudo ou crônico, tem ganhado cada dia mais importância por ser capaz de contribuir para o desenvolvimento, progressão e metástase tumoral. Em modelos animais os neutrófilos, macrófagos e mastócitos, células da imunidade inata, podem contribuir para a progressão tumoral do câncer de pele epitelial. Outros estudos, no entanto, mostram a importância dessas mesmas células no combate e proteção contra diversos tipos de câncer (Coussens, Werb, 2002; Mueller, 2006). Células do sistema imune inato podem produzir diversas citocinas/quimiocinas que recrutam células do sistema imune adaptativo, o qual é capaz de reconhecer e atacar células cancerosas, as quais, infelizmente, possuem a capacidade de evadir do processo de vigilância imunológica exercido pelo sistema imune (Abbas et al., 2008; Coussens, Werb, 2002).

Os animais da linhagem C57BL/6 são descritos por serem refratários no estágio de promoção da tumorigênese cutânea causada pelo TPA, por esse motivo, e pelo fato desses animais serem resistentes a tumorigênese cutânea quando comparados a outras linhagens de camundongos, como a SENCAR (Slaga, 1986), primeiramente utilizamos as linhagens AIRmin e A/J para validar o protocolo de indução de tumor de pele. Os camundongos AIRmin, são animais com uma resposta inflamatória aguda mínima, e são sensíveis a indução da tumorigênese cutânea por DMBA/TPA (Biozzi et al., 1998). Dados da literatura mostram que, os camundongos A/J, submetidos ao protocolo de indução de carcinogênese cutânea com DMBA/TPA, são mais sensíveis à fase de promoção do tumor quando comparados aos animais C57BL/6 (Ashman et al., 1982). Portanto, o primeiro experimento realizado neste trabalho foi a caracterização das linhagens de animais mais sensíveis ao tratamento com DMBA/TPA, AIRmin e A/J, e comparar com o grupo de animais C57BL/6, descrito como mais resistente. Estes grupos de animais foram submetidos ao protocolo de indução da tumorigênese cutânea com as doses de 50ug/0,1mL em acetona de DMBA por animal durante cinco dias consecutivos e 5

ug/0,1mL em acetona de TPA por animal duas vezes por semana até o dia 50, sendo os animais acompanhados por mais 50 dias. Ao avaliarmos as respostas destes animais, observamos que a multiplicidade de tumores (**Figura 9a**) não foi diferente nos três grupos de camundongos, no entanto, os animais AIRmin mostraram diferença significativa na incidência de camundongos com tumores quando comparados aos animais C57BL/6 e A/J, os quais não mostraram diferenças entre si (**Figura 9b**). A análise histológica não revelou diferenças quanto ao infiltrado inflamatório, quando se avaliou presença e ausência de células inflamatórias nestes três grupos, mesmo havendo presença de esparsos neutrófilos no dia 100 do protocolo (**Figura 15**). Os dados analisados podem ser correlacionados com o fato do câncer estar relacionado à inflamação e poder ser associado a duas vias, uma via extrínseca, a qual as condições inflamatórias levam ao desenvolvimento do câncer (como por exemplo, pela liberação de reativos de oxigênio e nitrogênio por neutrófilos), e uma via intrínseca, onde alterações genéticas levam a progressão do câncer contribuindo consequentemente para o estabelecimento de um microambiente favorável para o desenvolvimento do tumor. Desse modo, independente da origem do tumor, há células inflamatórias envolvidas no ambiente tumoral (Colotta et al., 2009; Mantovani et al., 2008; Schetter et al., 2010). Portanto, com estes dados constatamos que os camundongos AIRmin apresentaram maior incidência do que os animais C57BL/6.

Conhecendo melhor a resposta em animais C57BL/6, o próximo passo foi avaliar esta resposta em camundongos nocautes para células da imunidade adquirida (linfócitos T e B). O modelo de tumorigênese utilizado neste trabalho consiste na aplicação de agentes químicos, DMBA e TPA, os quais causam mutações nas células da epiderme, levando a um ambiente inflamatório o qual auxilia na progressão do tumor. Para isso, a avaliação de células e citocinas envolvidas na resposta inflamatória em animais da linhagem C57BL/6 e os seus respectivos camundongos nocauteados para células da imunidade adquirida (linfócitos T e B) nos permitiu avaliar o papel destas células na inflamação da pele destes animais e a participação destas células para o desenvolvimento da tumorigênese cutânea nesses animais.

De acordo com a análise estatística não há diferença na multiplicidade (**Figura 14a**) e incidência (**Figura 14b**) de tumores entre os camundongos selvagens da linhagem C57BL/6 (WT) e os animais CD8KO, CD4KO, NUDE e RAG. No entanto, os animais CD4KO não desenvolveram papilomas durante os 100 dias de acompanhamento do protocolo, quando comparado aos grupos WT, CD8KO, NUDE e RAG. Os animais CD4KO, além de não desenvolverem papilomas permaneceram com a pele inflamada, sem cicatrização da ferida, até o final do protocolo (dia 100) (**Figuras 11c, 12c e 13c**). O infiltrado inflamatório na pele dos animais C57BL/6 CD4KO mostrou-se presente e em maior intensidade, no dia 100 do protocolo, quando comparados aos grupos WT, CD8KO, NUDE e RAG, os quais mostraram uma esparsa quantidade de neutrófilos (**Figura 15**), confirmando a permanência do processo inflamatório na pele dos animais CD4KO vista nas imagens representativas. Ao avaliarmos o perfil linfocitário no baço (**Figura 16**) e linfonodo (**Figura 17**), por citometria de fluxo, de forma individual dos animais que desenvolveram ou não papilomas, avaliados macroscopicamente não encontramos diferenças entre eles. Apesar dos linfócitos TCD8, de maneira geral, contribuírem de forma efetora e os linfócitos TCD4 exercerem papel regulatório na defesa contra carcinogênese cutânea causada por xenobióticos (Anderson et al., 1995; Yusuf et al., 2008), os dados visto neste trabalho não nos permite afirmar qual seria o papel de fato desses linfócitos na proteção contra tumorigênese, uma vez que não houve diferenças significativas entre os grupos de animais C57BL/6 com e sem papilomas após tratamento com DMBA/TPA.

Em um processo inflamatório os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o local da lesão e/ou injúria e contribuem para a defesa contra microorganismos através de fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio. Além disso, eles são importantes produtores de quimiocinas/citocinas, as quais são necessárias para o recrutamento, ativação e diferenciação de diversas células do sistema imune (Brigati et al., 2002; Coussens, Werb, 2002). Para avaliar a presença de neutrófilos na pele dos animais C57BL/6 WT e dos animais CD4KO, CD8KO e RAG foi realizado a medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), a qual é encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos, por ser importante como agente bactericida, pois catalisa a formação de hipoclorito a partir de peróxido de hidrogênio

(H₂O₂) e cloreto (Sorensen, Borregaard, 1999; Suzuki et al., 1983). A dosagem de MPO correlaciona-se fortemente com a quantidade de neutrófilos recrutados para o local da lesão durante a inflamação, e esta enzima tem sido usada com sucesso como marcador bioquímico de recrutamento destas células como marcador de inflamações cutâneas (Bradley et al., 1982). Os resultados obtidos neste trabalho, mostraram que os animais nocauteados para CD4 mostraram uma atividade da enzima MPO maior do que os outros grupos de animais avaliados, WT, CD8, NUDE e RAG, tanto no dia 100, após indução da tumorigênese cutânea com DMBA/TPA (**Figura 18**), como 48 horas após a aplicação das 5 doses consecutivas de DMBA (**Figura 24**). Inferindo a migração e participação dos neutrófilos nesta resposta. Em trabalhos realizados com camundongos C3H/HeN CD4KO mostraram que estes animais possuem uma porcentagem menor de papilomas e apresentam uma maior hipersensibilidade por contato quando comparados aos animais WT, sugerindo que os linfócitos TCD4 são necessários para progressão tumoral (Yusuf et al., 2007). Estes dados evidenciam a importância dos linfócitos TCD4 para a progressão tumoral, visto que os grupo de animais C57BL/6 CD4KO, por nós avaliado, não apresentaram crescimento de papilomas e permaneceram com a pele inflamada, sugerindo uma hipersensibilidade por contato aos carcinógenos DMBA/TPA, durante todo o protocolo de experimentação.

As citocinas, assim como as células da imunidade inata, também participam do processo inflamatório e são chaves importantes de sinalização na resposta tumoral. Essas citocinas executam diversas funções e são secretadas em resposta a lesões causadas por carcinógenos, infecções e na presença de processo inflamatório. No início da inflamação sua função é minimizar o dano e promover o reparo no tecido, no entanto em doenças crônicas a produção persistente dessas citocinas pode contribuir para formação e progressão do tumor (Dranoff, 2004). As citocinas são produzidas por células estromais e células imunes em resposta a sinais produzidos pelas células tumorais, por exemplo, como parte do processo inflamatório que acompanha o crescimento tumoral (Mukaida et al., 2011; Smyth et al., 2004). Elas são subdivididas em famílias como: interleucinas, quimiocinas, interferons, fatores de crescimento, fatores de necrose tumoral (TNF) e fatores de crescimento transformador (TGF), e podem ainda serem classificadas como pró-

inflamatórias, IL-1, IL-6, IL-15, IL-17, IL-23, TNF- α , e anti-inflamatórias, IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β e IFN- γ , e dependendo do balanço entre esses dois grupos de citocinas (pró e anti) o efeito coletivo pode ser tanto pró como anti tumorigênico (Balkwill, Mantovani, 2001).

A citocina IL-1 β atua principalmente como citocina inflamatória, e pode ser produzida diretamente pelas células do tumor o que resulta na produção de fatores pró-angiogênicos e fatores que levam a metástase (Lewis et al., 2006). Esta citocina está envolvida em estágios iniciais da carcinogênese causando o aumento da produção de reativos de oxigênio e nitrogênio, os quais induzem a proliferação de células malignas, permitindo uma maior chance de mutações, um aumento da invasão das células tumorais, ativando os fatores angiogênicos e induzindo a secreção de moléculas inflamatórias como MMPs, quimiocinas e integrinas, que acabam por contribuir para metástase tumoral (Apte et al., 2006). Neste trabalho a quantidade da citocina IL-1 β mostrou-se aumentada nos animais C57BL/6 CD4KO tanto nos 100 dias de protocolo (**Figura 19a**) como no protocolo de 48 horas (**Figura 25a**) quando comparados aos animais WT, CD8KO e RAG os quais não mostraram diferenças entre si. A literatura descreve que pacientes com tumores sólidos como tumor de mama, cólon, pulmão, cabeça e pescoço e melanomas expressam quantidades maiores de IL-1 β com prognósticos piores (Apte et al., 2006; Chen et al., 1999; Elaraj et al., 2006; Gemma et al., 2001). Animais que superexpressam IL-1 α , da linhagem FVB e transgênicos, tratados com MCA-3 (3 – Metilcolantreno), um hidrocarboneto aromático policíclico como o DMBA, e TPA, mostraram menores números de papilomas e carcinomas quando comparados aos camundongos selvagens (Murphy et al., 2003). Assim os dados de Murphy e colaboradores (2003) demonstraram que a expressão de IL-1 β no microambiente tumoral está correlacionada tanto com o tratamento de indução de tumores como pela presença de tumores no local avaliado. Estes dados corroboram o grupo de animais CD4KO que expressaram maiores quantidades desta citocina e mostraram menores números de papilomas.

Outra citocina avaliada foi o TNF- α , citocina pró-inflamatória, pleiotrópica produzida por macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, queratinócitos, células NK, linfócitos T e B e que pode, também, ser produzido por células tumorais. Essa

citocina medeia à resposta inflamatória em condições aguda e crônica, e é um importante mediador de infecções e malignidades (Anderson et al., 2004; Younes, Aggarwall, 2003). O TNF- α tem sido descrito como um paradoxo, pois quando se trata de tumores, pode ser “fator de necrose tumoral”, mas também pode ser “fator de progressão tumoral”. Esse paradoxo é explicado, em parte, pelas diferenças dos níveis dessa citocina no tumor, ou seja, quando administrado terapeuticamente em altas doses ele age como agente de toxicidade vascular causando regressão tumoral, no entanto, quando produzido pelo próprio tumor, pelo TAM ou pelas células estromais em níveis fisiológicos, ele promove o crescimento tumoral, recruta altas quantidades de macrófagos, leva a uma maior produção de IL-8, estimula angiogênese, o que aumenta a expressão de fatores de crescimento (como MMP e VEGF) e promove a EMT (Balkwill, 2002; Szlosarek et al., 2006; Yoshida et al., 1997). Animais 129Sv \times C57BL/6 TNF α nocautes mostraram uma quantidade de papilomas dez vezes menor que os animais WT no período inicial da promoção e progressão tumoral da carcinogênese química induzida por DMBA/TPA, já em períodos tardios da progressão tumoral tal diferença não foi vista, reforçando a idéia de que o TNF- α é essencial para os períodos iniciais da promoção e progressão tumoral (Moore et al., 1999). A quantidade de TNF- α nos animais C57BL/6 CD4KO aos 100 dias de experimento, neste trabalho, foi significativamente maior que dos grupos de animais WT, CD8KO e RAG, como se pode observar na **Figura 19b**. A presença do TNF- α em altas quantidades nos animais CD4KO, os quais não desenvolveram papilomas, pode ser associado a dois fatores, o primeiro é de que a quantidade de TNF- α é bastante alta quando comparada aos níveis fisiológicos, e desse modo estaria funcionando como fator anti-tumoral, ou ainda ao fato de que mesmo o TNF sendo produzido em condições fisiológicas a promoção e progressão tumoral no modelo de tumorigênese cutânea não acontece, pois esta parece ser dependente dos linfócitos TCD4. É interessante notar que a presença desta citocina nos camundongos CD4KO já se encontra elevada desde o período de iniciação do tumor, ou seja, 48 horas após a aplicação do DMBA (**Figura 25b**), nos animais WT e NUDE a quantidade de TNF- α produzido neste mesmo tempo não foi possível detectar.

A citocina IL-6 é um fator pró-angiogênico e tem um amplo espectro de atividade biológica relativo à regulação da inflamação, proliferação celular, imunomodulação, hematopoiese e tumorigênese, podendo ser secretada por diversos tipos de células como fibroblastos, macrófagos, linfócitos T e B, células endoteliais e queratinócitos ativados (Conze et al., 2001; Guo et al., 2012). Camundongos Balb/c nocauteados para IL-6, após indução de ferida na pele, mostraram uma menor angiogênese e uma cicatrização da ferida mais lenta quando comparados aos animais WT (Lin et al., 2003). Xing e colaboradores (1998) mostraram que TNF- α e IL-1 β podem estimular a produção de IL-6 por fibroblastos. Neste trabalho a produção de IL-6, assim como a produção de TNF- α e IL-1 β foram maiores nos animais CD4KO quando comparados aos animais WT e NUDE 48 horas após aplicação do DMBA (**Figura 25c**). Os animais WT e NUDE também mostraram diferenças entre si na quantidade desta citocina. No dia 100 do protocolo de tumorigênese cutânea os animais CD4KO também mostraram quantidades de IL-6 significativamente maiores que os grupos WT, CD8KO e RAG (**Figura 19c**). Essa maior produção de IL-6 pelos camundongos CD4KO pode estar relacionada a alguns fatores. O primeiro deles pode ser uma maior quantidade das citocinas TNF- α e IL-1 β , as quais podem estar induzindo a produção de IL-6, conforme descrito anteriormente. Ou ainda, pelo fato da aplicação do TPA, agente promotor, causar inflamação e hiperplasia na pele dos camundongos (Naito et al., 1987), o aumento da citocina pró-inflamatória IL-6 pode confirmar a inflamação na pele dos camundongos, causada pelo DMBA 48 horas após aplicação epicutânea, e pelo TPA durante todo o protocolo. Os animais WT mostraram uma leve inflamação no período de 48 horas após o contato com o DMBA e os animais NUDE praticamente não desenvolveram tal inflamação, o que pode explicar a diferença da citocina IL-6, CD4KO>>WT>>NUDE, entre esses dois grupos de animais e, por conseguinte, com o grupo de camundongos CD4KO. Vasunia e colaboradores (1994) mostraram ainda que mesmo aplicando-se TPA e inibindo a citocina IL-6 na pele de camundongos, não há interferência no processo de promoção tumoral, uma vez que a IL-6 não modula tal processo. Dessa forma a presença da IL-6 na pele estaria confirmando o perfil inflamatório, mas não necessariamente confirmaria o evento da promoção do

tumor, o que neste trabalho, explicaria o fato dos animais CD4KO, estarem inflamados, mas sem a presença de papilomas.

As citocinas anti-inflamatórias também foram analisadas na pele dos animais C57BL/6 após indução da tumorigênese cutânea. O TGF- β é uma citocina reguladora que pode ter funções estimuladoras e supressoras no câncer, e é classificado como citocina anti-inflamatória, mas pode atuar como pró ou anti-inflamatória. Uma das funções desta citocina já bem elucidada é sua capacidade de evadir da vigilância imunológica o que causa o crescimento tumoral e metástase, pois o TGF- β é um potente imunossupressor, que pode bloquear a produção de IL-2, o qual é crucial para proliferação, ativação e expansão dos linfócitos T citotóxicos, esta citocina tem capacidade de inativar as células NK, aumentar a formação de células T reguladoras, bloquear a produção de imunoglobulinas e bloquear a expressão de IFN, o qual induz a expressão de genes do MHC II que são essenciais para o reconhecimento das células tumorais (Glick, 2004; Letterio, Roberts, 1998). Na carcinogênese química induzida por DMBA e TPA, os animais nocautes e/ou transgênicos para TGF- β possuem menor número de papilomas benignos e maior número de carcinoma celular escamoso e metástase quando comparados aos animais WT. O TGF- β na pele em condições normais suprime a inflamação, no entanto no sítio tumoral ele causa aumento da inflamação, o que contribui para promoção e progressão dos papilomas (Glick, 2004; Mordasky, et al., 2010; Perez-Lorenzo et al., 2010). A maior quantidade de TGF- β nos animais C57BL/6 CD4KO em relação aos grupos WT, CD8KO e RAG acontece apenas no dia 100 do protocolo de indução da tumorigênese cutânea (**Figura 20a**). Este aumento de TGF- β nos animais C57BL/6 CD4KO e a inflamação persistente na pele dos animais, durante os 100 dias, parecem estar associados à aplicação epicutânea do TPA, após o uso de DMBA, no dorso dos camundongos, este agente promotor tem a propriedade de causar hiperplasia epidermal e inflamação na derme, além de aumentar a expressão de TGF- β na epiderme (Akhurst et al., 1988; Muller, 2006), no entanto ao contrário do que a literatura afirma, neste trabalho os altos níveis de TGF- β não foram suficientes para aumentar a formação de papilomas nos animais CD4KO, mesmo havendo o quadro de inflamação exacerbada. Isso nos permite salientar que a produção dessa citocina pode, nesse caso, estar associada ao

controle da inflamação, e no entanto, a quantidade de TGF- β produzida no dia 100 não foi suficiente para o controlar o processo inflamatório. Outro dado importante é a quantidade de TGF- β 48 horas após aplicação do DMBA, neste tempo não há diferença desta citocina entre os grupos de animais WT, CD4KO e NUDE (**Figura 26a**), mesmo ela estando presente nos três grupos de animais. O TGF- β é também importante fator quimiotático de neutrófilos (Reibman et al.,1991), e pode ser associado ao aumento dessas células na pele dos animais CD4KO, já que os animais que possuem maiores quantidades de neutrófilos (**Figura 18**) na pele possuem também maior quantidade de TGF- β (**Figura 20a**).

A citocina IL-10, assim como TGF- β , é estudada, principalmente por seu papel anti-inflamatório. Ela foi inicialmente descrita como produto de células T auxiliares 2 (Th2), responsável por inibir as atividades das células Th1. Atualmente sabe-se que não somente as células Th2 produzem IL-10, mas também células T reguladoras, linfócitos B, células apresentadoras de antígenos (APCs), queratinócitos e células epiteliais (Enk, Katz, 1992; Jung et al., 1995; O'Garra, Murphy, 2009; Trinchieri, 2007). A citocina IL-10 pode auxiliar no mecanismo de evasão tumoral, pois tem a capacidade de diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células TCD4, inibir a expressão de MHC e moléculas co-estimulatórias, como por exemplo, as moléculas B7 (Moore et al., 2001; Vicari, Trinchieri, 2004). Mumm e colaboradores (2011) mostraram que camundongos C57BL/6 e Balb/c nocautes para IL-10, ao passarem pelo processo de indução da carcinogênese química com DMBA e TPA, mostraram maior número de papilomas, menor porcentagem de sobrevivência, além de menor expressão de MHC I, menor número de células TCD8 e menor expressão de IFN- γ na pele quando comparados aos animais WT. Os animais transgênicos que possuem superexpressão de IL-10 tiveram os parâmetros inversos ao IL-10 KO com maior expressão IFN- γ , maior número de células TCD8 e menor número de papilomas quando comparados aos WT e aos animais IL-10KO. Os dados deste trabalho se assemelham a Mumm e colaboradores visto que os animais C57BL/6 CD4KO mostraram maior quantidade de IL-10 quando comparados aos animais WT, CD8KO e RAG no dia 100 da tumorigênese (**Figura 20b**) e não desenvolveram papilomas, além de deixar evidente mais uma vez a tentativa no controle do processo inflamatório e o não

controle do processo pelo fato da quantidade de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, não serem suficientes. No período de iniciação do tumor, 48 horas após aplicação do DMBA, não foi visto diferença na quantidade de IL-10 na pele dos animais WT, CD4KO e NUDE (**Figura 26b**), mostrando que tal diferença da expressão de IL-10, assim como a de TGF- β , acontece na fase da promoção tumoral.

Os resultados gerais desse trabalho sugerem uma importante correlação entre as células da imunidade adquirida, resposta inflamatória e tumorigênese cutânea induzida, deixando evidente, mais uma vez, a participação de citocinas na resposta tumoral e a importância dessas mesmas em modificar e influenciar o ambiente tumoral.

6 CONCLUSÕES

- Analisando a multiplicidade e incidência tumoral pudemos mostrar que os animais C57BL/6 e A/J são mais resistentes a indução tumoral pelo protocolo de DMBA e TPA que os animais AIRmin;
- Analisando o protocolo de tumorigênese cutânea nos animais C57BL/6 Nude, C57BL/6 Rag, C57BL/6 CD8KO não apresentaram diferenças em relação aos animais C57BL/6 selvagens.
- Os animais CD4 Knockouts apresentaram inflamação contínua aos 100 dias e não desenvolveram nenhum papiloma. Apresentaram aumento da MPO, sugerindo infiltração de neutrófilos e aumento da produção de IL1- β , IL-6, TNF- α , TGF- β e IL10.
- Avaliando os tempos iniciais 48H após aplicação do DMBA, os animais Knockout para CD4 apresentaram aumento da MPO, IL1- β , IL-6, TNF- α , não havendo diferenças na secreção das citocinas IL-10 e TGF- β . Neste protocolo os animais C57BL/6 Nude tiveram respostas semelhantes aos animais C57BL/6 selvagens.

REFERÊNCIAS*

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

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

Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochemical Pharmacology*. 2006;72(11):1605-21.

Akhurst RJ, Fee F, Balmain A. Localized production of TGF-beta mRNA in tumour promoter-stimulated mouse epidermis. *Nature*. 1988;331(6154):363-5.

Anderson C, Hehr A, Robbins R, Hasan R, Athar M, Mukhtar H, et al. Metabolic requirements for induction of contact hypersensitivity to immunotoxic polyaromatic hydrocarbons. *J Immunol*. 1995;155(7):3530-7.

Anderson GM, Nakada MT, DeWitte M. Tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis and treatment of cancer. *Current Opinion in Pharmacology*. 2004;4(4):314-20.

Apte RN, Krelin Y, Song X, Dotan S, Recih E, Elkabets M, et al. Effects of micro-environment- and malignant cell-derived interleukin-1 in carcinogenesis, tumour invasiveness and tumour-host interactions. *Eur J Cancer*. 2006;42(6):751-9.

Apte RN, Voronov E. Interleukin-1--a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions. *Seminars in Cancer Biology*. 2002;12(4):277-90.

Ashman LK, Murray AW, Cook MG, Kotlarski I. Two-stage skin carcinogenesis in sensitive and resistant mouse strains. *Carcinogenesis*. 1982;3(1):99-102.

Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2002;13(2):135-41.

Balkwill F, Coussens LM. Cancer: an inflammatory link. *Nature*. 2004;431(7007):405-6.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539-45.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Barbera-Guillem E, Nelson MB, Barr B, Nyhus JK, May KF, Jr., Feng L, et al. B lymphocyte pathology in human colorectal cancer. Experimental and clinical therapeutic effects of partial B cell depletion. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*. 2000;48(10):541-9.

Biozzi G, Ribeiro OG, Saran A, Araujo ML, Maria DA, De Franco M, et al. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. *Carcinogenesis*. 1998;19(2):337-46.

Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*. 2010;11(10):889-96.

Bourgeois C, Tanchot C. Mini-review CD4 T cells are required for CD8 T cell memory generation. *European Journal of Immunology*. 2003;33(12):3225-31.

Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1982;78(3):206-9.

Brigati C, Noonan DM, Albini A, Benelli R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clinical & Experimental Metastasis*. 2002;19(3):247-58.

Busbee PB, Rouse M, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders. *Nutrition Reviews*. 2013;71(6):353-69.

Campbell C, Quinn AG, Ro YS, Angus B, Rees JL. p53 mutations are common and early events that precede tumor invasion in squamous cell neoplasia of the skin. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1993;100(6):746-8.

Chen SJ, Yuan W, Mori Y, Levenson A, Trojanowska M, Varga J. Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad 3. *The Journal of Investigative Dermatology*. 1999;112(1):49-57.

Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, et al. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 1999;5(6):1369-79.

Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1073-81.

Conze D, Weiss L, Regen PS, Bhushan A, Weaver D, Johnson P, et al. Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells. *Cancer Research*. 2001;61(24):8851-8.

Corthay A, Skovseth DK, Lundin KU, Rosjo E, Omholt H, Hofgaard PO, et al. Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity*. 2005;22(3):371-83.

Coughlin CM, Salhany KE, Gee MS, LaTemple DC, Kotenko S, Ma X, et al. Tumor cell responses to IFN γ affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity*. 1998;9(1):25-34.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.

D'Amico G, Vulcano M, Bugarin C, Bianchi G, Pirovano G, Bonamino M, et al. CD40 activation of BCP-ALL cells generates IL-10-producing, IL-12-defective APCs that induce allogeneic T-cell anergy. *Blood*. 2004;104(3):744-51.

De Souza VR, Cabrera WK, Galvan A, Ribeiro OG, De Franco M, Vorraro F, et al. Aryl hydrocarbon receptor polymorphism modulates DMBA-induced inflammation and carcinogenesis in phenotypically selected mice. *International Journal of Cancer Journal International du Cancer*. 2009;124(6):1478-82.

Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2003;43:309-34.

Devreotes PN, Zigmond SH. Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and Dictyostelium. *Annual Review of cell Biology*. 1988;4:649-86.

Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN γ receptors. *Immunity*. 1994;1(6):447-56.

DiGiovanni J. Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacology & Therapeutics*. 1992;54(1):63-128.

DiPietro LA. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock*. 1995;4(4):233-40.

Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4(1):11-22. Epub 2004/01/07.

Dubas LE, Ingraffea A. Nonmelanoma skin cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. 2013;21(1):43-53.

Elaraj DM, Weinreich DM, Varghese S, Puhlmann M, Hewitt SM, Carroll NM, et al. The role of interleukin 1 in growth and metastasis of human cancer xenografts. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2006;12(4):1088-96.

Enk AH, Katz SI. Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol*. 1992;149(1):92-5.

Fan Y, Ye J, Shen F, Zhu Y, Yeghiazarians Y, Zhu W, et al. Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2008;28(1):90-8.

Fransen L, Van der Heyden J, Ruyschaert R, Fiers W. Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon-gamma on a variety of normal and transformed human cell lines. *European Journal of Cancer & Clinical Oncology*. 1986;22(4):419-26.

Fujiki H, Suganuma M. Tumor promoters--microcystin-LR, nodularin and TNF-alpha and human cancer development. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2011;11(1):4-18.

Gemma A, Takenaka K, Hosoya Y, Matuda K, Seike M, Kurimoto F, et al. Altered expression of several genes in highly metastatic subpopulations of a human pulmonary adenocarcinoma cell line. *Eur J Cancer*. 2001;37(12):1554-61.

Glick AB. TGFbeta1, back to the future: revisiting its role as a transforming growth factor. *Cancer Biology & Therapy*. 2004;3(3):276-83.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*. 2005;5(12):953-64.

Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 2012;38(7):904-10.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.

Hao N, Whitelaw ML. The emerging roles of AhR in physiology and immunity. *Biochemical Pharmacology*. 2013;86(5):561-70.

Heldin CH, Landstrom M, Moustakas A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Current Opinion in Cell Biology*. 2009;21(2):166-76.

Holzinger C, Weissinger E, Zuckermann A, Imhof M, Kink F, Schollhammer A, et al. Effects of interleukin-1, -2, -4, -6, interferon-gamma and granulocyte/macrophage colony stimulating factor on human vascular endothelial cells. *Immunology Letters*. 1993;35(2):109-17.

Ibanez OM, Stiffel C, Ribeiro OG, Cabrera WK, Massa S, de Franco M, et al. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. *European Journal of Immunology*. 1992;22(10):2555-63.

Jiang W, Ananthaswamy HN, Muller HK, Kripke ML. p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene*. 1999;18(29):4247-53.

Johnsen AC, Haux J, Steinkjer B, Nonstad U, Egeberg K, Sundan A, et al. Regulation of APO-2 ligand/trail expression in NK cells-involvement in NK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine*. 1999;11(9):664-72.

Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *The Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(9):3375-83.

Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, et al. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *The Journal of Clinical Investigation*. 1995;95(1):55-65.

Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*. 1986;319(6055):675-8.

Kemp CJ. Multistep skin cancer in mice as a model to study the evolution of cancer cells. *Seminars in Cancer Biology*. 2005;15(6):460-73.

Knoechel B, Lohr J, Kahn E, Abbas AK. The link between lymphocyte deficiency and autoimmunity: roles of endogenous T and B lymphocytes in tolerance. *J Immunol*. 2005;175(1):21-6.

Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual Review of Immunology*. 1998;16:137-61.

Lewis AM, Varghese S, Xu H, Alexander HR. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *Journal of Translational Medicine*. 2006;4:48.

Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology*. 2006;24:99-146.

Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *Journal of Leukocyte Biology*. 2003;73(6):713-21.

Liu LS, Colegio OR. Molecularly targeted therapies for nonmelanoma skin cancers. *International Journal of Dermatology*. 2013;52(6):654-65.

Long EO. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annual Review of Immunology*. 1999;17:875-904.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44.

Marzo AL, Kinnear BF, Lake RA, Frelinger JJ, Collins EJ, Robinson BW, et al. Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol*. 2000;165(11):6047-55.

McGuire JF, Ge NN, Dyson S. Nonmelanoma skin cancer of the head and neck I: histopathology and clinical behavior. *American Journal of Otolaryngology*. 2009;30(2):121-33.

McLafferty E, Hendry C, Alistair F. The integumentary system: anatomy, physiology and function of skin. *Nurs Stand*. 2012;27(3):35-42.

Medvedev AE, Johnsen AC, Haux J, Steinkjer B, Egeberg K, Lynch DH, et al. Regulation of Fas and Fas-ligand expression in NK cells by cytokines and the involvement of Fas-ligand in NK/LAK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine*. 1997;9(6):394-404.

Miller MD, Krangel MS. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Critical Reviews in Immunology*. 1992;12(1-2):17-46.

Mirandola P, Ponti C, Gobbi G, Sponzilli I, Vaccarezza M, Cocco L, et al. Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood*. 2004;104(8):2418-24.

Mitchison NA. The carrier effect in the secondary response to hapten-protein conjugates. II. Cellular cooperation. *European Journal of Immunology*. 1971;1(1):18-27.

Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*. 2001;19:683-765.

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. *Nature Medicine*. 1999;5(7):828-31.

Mordasky Markell L, Perez-Lorenzo R, Masiuk KE, Kennett MJ, Glick AB. Use of a TGFbeta type I receptor inhibitor in mouse skin carcinogenesis reveals a dual role for TGFbeta signaling in tumor promotion and progression. *Carcinogenesis*. 2010;31(12):2127-35.

Mueller MM. Inflammation in epithelial skin tumours: old stories and new ideas. *Eur J Cancer*. 2006;42(6):735-44.

Mukaida N, Sasakki S-I, Popivanova BK. Tumor Necrosis Factor (TNF) and Chemokines in Colitis-Associated Cancer. *Cancers*. 2011;3:2811-26.

Muller-Hermelink N, Braumuller H, Pichler B, Wieder T, Mailhammer R, Schaak K, et al. TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell*. 2008;13(6):507-18.

Mumm JB, Emmerich J, Zhang X, Chan I, Wu L, Mauze S, et al. IL-10 elicits IFNgamma-dependent tumor immune surveillance. *Cancer Cell*. 2011;20(6):781-96.

Murphy JE, Morales RE, Scott J, Kupper TS. IL-1 alpha, innate immunity, and skin carcinogenesis: the effect of constitutive expression of IL-1 alpha in epidermis on chemical carcinogenesis. *J Immunol*. 2003;170(11):5697-703.

Naito M, Naito Y, DiGiovanni J. Comparison of the histological changes in the skin of DBA/2 and C57BL/6 mice following exposure to various promoting agents. *Carcinogenesis*. 1987;8(12):1807-15.

Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, et al. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*. 2002;21(13):2000-8.

Noel W, Raes G, Hassanzadeh Ghassabeh G, De Baetselier P, Beschin A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends in Parasitology*. 2004;20(3):126-33.

O'Garra A, Murphy KM. From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce T(H)1 development. *Nature Immunology*. 2009;10(9):929-32.

Ohno S, Nishizuka Y. Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue. *Journal of Biochemistry*. 2002;132(4):509-11.

Paladini RD, Saleh J, Qian C, Xu GX, Rubin LL. Modulation of hair growth with small molecule agonists of the hedgehog signaling pathway. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2005;125(4):638-46.

Perez-Lorenzo R, Markell LM, Hogan KA, Yuspa SH, Glick AB. Transforming growth factor beta1 enhances tumor promotion in mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2010;31(6):1116-23.

Philip M, Rowley DA, Schreiber H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Seminars in Cancer Biology*. 2004;14(6):433-9.

Poland A, Palen D, Glover E. Analysis of the four alleles of the murine aryl hydrocarbon receptor. *Molecular Pharmacology*. 1994;46(5):915-21.

Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*. 2008;17(12):1063-72.

Qin Z, Blankenstein T. CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity*. 2000;12(6):677-86.

Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X, et al. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *The Journal of Experimental Medicine*. 2010;207(3):637-50.

Reibman J, Meixler S, Lee TC, Gold LI, Cronstein BN, Haines KA, et al. Transforming growth factor beta 1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(15):6805-9.

Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine*. 2005;353(21):2262-9.

Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*. 2010;31(1):37-49.

Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LA, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007;21(2):325-32.

Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012;122(3):787-95.

Siegel PM, Massague J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(11):807-21.

Slaga TJ. SENCAR mouse skin tumorigenesis model versus other strains and stocks of mice. *Environmental Health Perspectives*. 1986;68:27-32.

Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, Hayakawa Y. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunological Reviews*. 2004;202:275-93.

Song X, Krelin Y, Dvorkin T, Bjorkdahl O, Segal S, Dinarello CA, et al. CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells. *J Immunol*. 2005;175(12):8200-8.

Song X, Voronov E, Dvorkin T, Fima E, Cagnano E, Benharroch D, et al. Differential effects of IL-1 alpha and IL-1 beta on tumorigenicity patterns and invasiveness. *J Immunol*. 2003;171(12):6448-56.

Sorensen O, Borregaard N. Methods for quantitation of human neutrophil proteins, a survey. *Journal of Immunological Methods*. 1999;232(1-2):179-90.

Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Immune memory redefined: characterizing the longevity of natural killer cells. *Immunological Reviews*. 2010;236:83-94.

Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Analytical Biochemistry*. 1983;132(2):345-52.

Szlosarek P, Charles KA, Balkwill FR. Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter. *Eur J Cancer*. 2006;42(6):745-50.

Tanikawa T, Wilke CM, Kryczek I, Chen GY, Kao J, Nunez G, et al. Interleukin-10 ablation promotes tumor development, growth, and metastasis. *Cancer Research*. 2012;72(2):420-9.

Thomas RS, Penn SG, Holden K, Bradfield CA, Rank DR. Sequence variation and phylogenetic history of the mouse *Ahr* gene. *Pharmacogenetics*. 2002;12(2):151-63.

To MD, Rosario RD, Westcott PM, Banta KL, Balmain A. Interactions between wild-type and mutant *Ras* genes in lung and skin carcinogenesis. *Oncogene*. 2013;32(34):4028-33.

Trinchieri G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *The Journal of Experimental Medicine*. 2007;204(2):239-43.

Vasunia KB, Miller ML, Andringa S, Baxter CS. Induction of interleukin-6 in the epidermis of mice in response to tumor-promoting agents. *Carcinogenesis*. 1994;15(8):1723-7.

Vicari AP, Trinchieri G. Interleukin-10 in viral diseases and cancer: exiting the labyrinth? *Immunological Reviews*. 2004;202:223-36.

Videm V, Strand E. Changes in neutrophil surface-receptor expression after stimulation with FMLP, endotoxin, interleukin-8 and activated complement compared to degranulation. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2004;59(1):25-33.

von Domarus H, Stevens PJ. Metastatic basal cell carcinoma. Report of five cases and review of 170 cases in the literature. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1984;10(6):1043-60.

Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clinical Cancer Research : an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(18 Pt 1):5262-70.

Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *The Journal of Clinical Investigation*. 1998;101(2):311-20.

Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, et al. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. 1997;17(7):4015-23.

Younes A, Aggarwall BB. Clinical implications of the tumor necrosis factor family in benign and malignant hematologic disorders. *Cancer*. 2003;98(3):458-67.

Youssef KK, Van Keymeulen A, Lapouge G, Beck B, Michaux C, Achouri Y, et al. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nature Cell Biology*. 2010;12(3):299-305.

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 Research*. 2008;68(10):3924-30.

Yusuf N, Timares L, Seibert MD, Xu H, Elmets CA. Acquired and innate immunity to polyaromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2007;224(3):308-12.

Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 1998;188(12):2375-80.