

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

DESENVOLVIMENTO DE MELANOMA EM ANIMAIS
SELECIONADOS PELA INTENSIDADE DE RESPOSTA
INFLAMATÓRIA AGUDA (AIRMAX/AIRMIN):
CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER*, NKT,
 T_{REG} E PERFIL DE CITOCINAS

LINDSEY CASTOLDI

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP para obtenção do título de Doutor em Patologia.

BOTUCATU – SP

2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU

DESENVOLVIMENTO DE MELANOMA EM ANIMAIS
SELECIONADOS PELA INTENSIDADE DE RESPOSTA
INFLAMATÓRIA AGUDA (AIRMAX/AIRMIN):
CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS *NATURAL KILLER*, NKT,
T_{REG} E PERFIL DE CITOCINAS

DOUTORANDA: LINDSEY CASTOLDI

ORIENTADOR: PROF. DR. RAMON KANENO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP para obtenção do título de Doutor em Patologia.

BOTUCATU – SP

2007

À minha família querida, meus pais Danilo e Fabíola e minha irmã Milene, pelo imenso amor, apoio, confiança e amizade. Não há palavras suficientes para dizer o quanto sou grata por participar desta família e espero ser capaz de construir um lar tão alegre, divertido e amoroso quanto esse.

Ao meu amado e querido noivo Rogério, que sempre esteve ao meu lado, dividindo os momentos de alegria e de dificuldades, por todo amor, carinho, apoio, amizade e paciência. Tenho muita sorte por ter meu melhor amigo como meu companheiro para a vida.

À minha nova família, Claudio, Lia e Dani, por me acolherem no lar de vocês e por todo apoio, compreensão e confiança em mim e no meu trabalho.

*Amo Vocês!
Muito Obrigada!*

Agradecimentos

Agradeço, com todo carinho, aos amigos que participaram da realização deste trabalho e dividiram comigo esta caminhada.

Ao professor Dr. Ramon Kaneno, por me orientar no desenvolvimento deste trabalho, compartilhando seus conhecimentos sobre imunologia e, principalmente, sobre a vida. Obrigada pela confiança no meu trabalho e pela amizade.

Ao Dr. Orlando G. Ribeiro e Dra. Olga M Ibañez pela confiança na proposta deste trabalho, pela disposição em discutir os nossos resultados e por ceder gentilmente os animais AIR.

Ao Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria por ceder gentilmente as células de melanoma S91.

À Marjorie A. Golim pelo auxílio nos experimentos de citometria de fluxo, bem como na análise dos resultados.

À Profa. Martha pelo auxílio na análise estatística, pela paciência e disposição em ajudar na realização dos testes.

Aos professores do Depto. de Microbiologia e Imunologia, Dr. Sílvio Luís de Oliveira, Dr. José Maurício Sforcin, Dra. Maria Terezinha S. Peraçoli, Dra. Ângela Maria V Campos Soares, Dra. Alexandrina Sartori, por sempre contribuírem na solução de problemas práticos e pelas sugestões na elaboração do trabalho.

Aos funcionários de Depto. de Microbiologia e Imunologia, principalmente ao Lula e ao Luís, pelo auxílio nos experimentos e por tornar o ambiente de trabalho sempre harmonioso.

Às amigas Graziela Gorete Romagnoli, Maria Carolina Gameiro, Priscila Raquel Martins e Andréa Vanessa Pinto pelos finais de semana, feriados e madrugadas de ajuda nos experimentos. A decisão de abraçar um trabalho tão longe só foi possível porque sabia que podia contar com vocês. Muito obrigada pela confiança, apoio, amizade e cumplicidade.

Ao Prof. Marco Antônio, diretor da UFMT-Campus de Sinop, por confiar na minha capacidade e por permitir as minhas viagens para a finalização deste trabalho.

Aos professores e funcionários da UFMT-Campus de Sinop, pelo carinho, amizade e confiança, tornando o novo ambiente de trabalho tão acolhedor. Em especial gostaria de agradecer aos professores Egídio e Maria José pela disposição na troca de aulas durante as minhas viagens e as professoras Fabiana e Teresinha e os secretários Everton e Jô por cuidarem da coordenação do Curso de Enfermagem durante as minhas ausências.

Aos alunos do Curso de Enfermagem pela compreensão nos momentos em que precisei me ausentar da coordenação do curso e pelas trocas das aulas durante as minhas viagens.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos através do Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão dos recursos financeiros para realização deste trabalho.

Sumário

	<i>Pags.</i>
Revisão bibliográfica	01
Referências bibliográficas	17
Manuscrito	26
<i>Resumo</i>	29
<i>1. Introdução</i>	30
<i>2. Resultados</i>	33
2.1. Análise do desenvolvimento tumoral e metástases	33
2.2. Atividade citotóxica	35
2.3. Quantificação de células produtoras de IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ	37
2.4. Quantificação de células CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD4 ⁺ /CD25 ⁺ , CD3 ⁺ /CD49b ⁺ e CD49b ⁺ em suspensão de células esplênicas	46
<i>3. Discussão</i>	57
<i>4. Material e Métodos</i>	65
4.1. Delineamento Experimental	65
4.2. Animais	65
4.3. Cultura de células dos melanomas murino B16F10 e S91	66
4.4. Suspensão de células Yac.1	67
4.4.1. Ensaio colorimétrico para Análise de Atividade Citotóxica	68
4.5. Determinação do número de células produtoras de citocinas pela técnica de ELISPOT	69
4.6. Quantificação de células CD49b ⁺ , CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD4 ⁺ /CD25 ⁺ e CD3 ⁺ /CD49b ⁺ em suspensão de células esplênicas	70
4.6.1. Anticorpos monoclonais para Citometria de Fluxo	71
4.7. Análise estatística	71
<i>Agradecimentos</i>	72
<i>Referências</i>	72
Anexo	78

1. Revisão bibliográfica

A inflamação é uma resposta fisiológica a uma variedade de estímulos físicos, químicos e infecciosos, em geral acompanhada por uma resposta sistêmica, caracterizada pela presença de proteínas plasmáticas de fase aguda liberadas pelos hepatócitos e migração de leucócitos polimorfonucleares para o sítio inflamatório (Cavailon & Duff, 1999; Balkwill & Montovani, 2001). Esse processo resulta de um balanço delicado entre amplificação e controle da resposta, cujo objetivo é restaurar o tecido lesionado e eliminar o agente agressor.

Embora a inflamação represente um mecanismo primário de defesa do hospedeiro contra agressões do meio, sua permanência ou cronicidade pode representar um fator iniciador ou promotor do desenvolvimento tumoral (Coussen & Werb, 2002; Balkwill & Mantovani, 2001). Atualmente, está bem estabelecida a relação de muitos tipos de tumores com situações de inflamação crônica decorrente de infecções, doenças auto-imunes ou pela presença de agentes químicos ou físicos (Balkwill & Montovani, 2001). Como exemplos dessa associação, Lennard-Jones e colaboradores (1990) observaram que pacientes com colite ulcerativa alternando episódios de ulceração e regeneração da mucosa colorretal apresentam um aumento no desenvolvimento de carcinomas colorretais, enquanto o tratamento destes indivíduos com drogas antiinflamatórias não-esteróides (NSAIDs) é capaz de reduzir este risco (Rodriguez et al., 2001). Indivíduos infectados com o vírus da hepatite B e C desenvolvem processos inflamatórios crônicos com intensa destruição tecidual do fígado e elevada incidência de carcinomas hepatocelulares (Kuper et al., 2000). Além disso, observações epidemiológicas demonstram que indivíduos com doença respiratória exibindo inflamação crônica, apresentam um risco aumentado para o

desenvolvimento de câncer pulmonar e o uso de drogas antiinflamatórias diminui esta incidência (Malkinson, 2005).

A associação entre inflamação e câncer pode ser explicada pela presença de mediadores inflamatórios, como óxido nítrico (NO) e água oxigenada (H₂O₂), que danificam o DNA nas células em proliferação, propiciando o acúmulo de alterações genéticas e o aumento da instabilidade destas células. Além disso, o processo de reparo tecidual que acompanha a inflamação permite, às células alteradas, um estímulo proliferativo pelos fatores de crescimento e de angiogênese presentes (Gallin et al., 1999; Coussents et al., 2002). Alguns fatores inflamatórios, como o fator inibidor da migração dos macrófagos (MIF), favorecem o acúmulo de lesões genéticas nas células através da inibição da atividade do *p53*, um gene supressor tumoral responsável pela manutenção da integridade do genoma celular, que controla a ação dos fatores de transcrição, proliferação celular e a apoptose (Coussens & Werb, 2002; Takaoka et al., 2003). Dessa forma, a interação das células do estroma e células imunes com as células neoplásicas pode modular o crescimento, diferenciação e invasão tumoral.

Entretanto, muitos tipos de tumores podem ser combatidos no sítio inflamatório devido à presença e atuação de células efectoras diversas (Alexander et al., 1981). A presença de densos infiltrados de linfócitos intratumorais nos estágios iniciais do desenvolvimento neoplásico são fortemente correlacionados com redução da frequência de metástases e aumento da sobrevida dos pacientes com diversos tipos de câncer, indicando que a resposta imune do hospedeiro pode atenuar a progressão tumoral (Dranoff, 2004). Assim, a presença de linfócitos T citotóxicos (CTL), células *natural killer* (NK), macrófagos e neutrófilos, capazes de liberar mediadores como citocinas, proteases e agentes oxidantes, favorecem tanto a lise direta das células

tumorais quanto a destruição do seu estroma e inibição da angiogênese (Di Carlo et al., 2001). Um exemplo da contribuição da inflamação na resposta antitumoral é o tratamento de câncer de bexiga com vacinas intravesicais do bacilo Calmette-Guérin (BCG), procedimento que estimula uma reação inflamatória local com influxo intenso de linfócitos T, macrófagos e células NK e produção de citocinas pró-inflamatórias (Suttman et al., 2004). Em recente estudo, observamos que a inoculação de polissacarídeos de cogumelos medicinais no sítio de desenvolvimento do tumor de Ehrlich, provoca aumento do processo inflamatório local com maior intensidade de necrose do tecido tumoral (dados não publicados).

Com o objetivo de melhor compreender os mecanismos genéticos envolvidos no controle da inflamação, pesquisadores do Departamento de Imunogenética do Instituto Curie (Paris, França) em colaboração com o Departamento de Imunogenética do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil), desenvolveram linhagens selecionadas para resposta inflamatória aguda máxima (AIRmax) ou mínima (AIRmin) (Ibanez et al., 1992; Biozzi et al., 1998). O modelo AIR foi obtido por uma seleção bidirecional a partir do cruzamento de oito linhagens isogênicas para uma forte ou fraca resposta inflamatória aguda contra a poliacrilamida (Biogel), um agente quimicamente inerte e não imunogênico. Esta seleção foi baseada no influxo de leucócitos e na concentração de proteínas no exsudato inflamatório (Ibanez et al., 1992; Biozzi et al., 1998).

No limite da seleção, os animais da linhagem AIRmax e AIRmin diferem 20 vezes quanto ao número de células no infiltrado leucocitário (principalmente neutrófilos) e 2,5 vezes na concentração de proteína no exsudato inflamatório após 24 horas do inóculo subcutâneo do Biogel (Ibañez et al., 1992; Ribeiro et al., 2003). Essa diferença entre as linhagens reflete alterações na granulopoiese da medula óssea

em resposta aos fatores hematopoiéticos, associada à resistência à apoptose dos neutrófilos presentes no exsudato inflamatório dos animais AIRmax (Ribeiro et al., 2003). Os animais AIR apresentam também diferenças quanto ao número e atividade das células NK. Em estudos do nosso grupo, observamos que os animais AIRmax normais apresentam aumento da população de células NK e TCD8⁺, associado a maior atividade citotóxica das células esplênicas não-aderentes e à capacidade de produção *in vitro* de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral – alfa (TNF- α), interferon-gama (IFN- γ) e interleucina (IL) -12p40 (Castoldi et al., 2006).

Assim, contrastando com a possível associação entre inflamação crônica e desenvolvimento tumoral, Biozzi e colaboradores (1998) demonstraram que a incidência e multiplicidade de tumor de pele quimicamente induzido por 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) e 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA) foi significativamente maior em animais AIRmin. Esse grupo também avaliou a resistência ou suscetibilidade destas linhagens ao desenvolvimento de metástases de melanomas transplantáveis, observando que os animais AIRmin foram mais suscetíveis ao desenvolvimento de lesões metastáticas de melanoma murino B16F10 ou humano SKMel-28 (Maria et al., 2001). Assim, esses resultados demonstraram que o desenvolvimento de tumores primários é dependente da compatibilidade MHC, e que há menor ocorrência de metástases quanto maior a intensidade da resposta inflamatória (Maria et al., 2001).

A possível relação genética entre resposta inflamatória e tumorigênese pode ser observada no modelo de carcinogênese pulmonar induzido por uretana, no qual os animais AIRmin apresentaram uma resposta inflamatória subaguda persistente, com 40 vezes mais focos tumorais que o grupo AIRmax (Maria et al., 2003). Neste modelo de carcinogênese, as divergências parecem estar relacionadas com a

segregação de alelos suscetíveis (AIRmin) ou resistentes (AIRmax) para a região de suscetibilidade para adenoma pulmonar (PAS-1), e evidenciam o envolvimento deste *locus* na resposta inflamatória. No entanto, a relação genética entre inflamação e câncer pode envolver a expressão diferencial de genes de suscetibilidade relacionados a diferentes órgãos-alvo. Assim, Di Pace e colaboradores (2006), demonstraram que a resistência ao desenvolvimento de carcinomas pulmonares observada nos animais AIRmax não é mantida no modelo de carcinogênese de colon, no qual os animais AIRmax apresentam maior número de focos de criptas aberrantes e adenocarcinomas que os animais AIRmin (Di Pace et al., 2006).

Além das diferenças observadas quanto ao desenvolvimento de tumores, os animais AIR também apresentam diferenças quanto ao desenvolvimento de doenças infecciosas e autoimunes. Os animais AIRmax são resistentes à infecção por *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes* e suscetíveis a artrite induzida por pristane (Araújo et al., 1998; Borrego et al., 2006; Vigar et al., 2000). Da mesma forma que o observado na carcinogênese pulmonar, estas diferenças parecem estar associadas à segregação de alelos resistentes ou suscetíveis do gene *Slc11a1* (Nramp1), no qual os animais AIRmax apresentam predomínio do alelo resistente (*Slc11a1* R) enquanto 90% dos animais AIRmin apresentam o alelo suscetível (*Slc11a1* S) (Borrego et al., 2006). O alelo resistente está relacionado com o desenvolvimento de resposta inflamatória aguda intensa e a produção de citocinas do perfil Th1, principalmente IL-6 e IFN- γ (Araújo et al., 1998; Borrego et al., 2006; Vigar et al., 2000; Peters et al., 2007).

Esses resultados demonstram que os genes que determinam a intensidade da resposta inflamatória podem, pelo menos em parte, estar envolvidos na suscetibilidade ou resistência ao desenvolvimento de tumores. Entretanto, deve ser

considerado que a resposta diferencial à carcinogênese observada nos animais AIR, pode envolver a participação de genes relacionados com outros fatores da resposta imune. Na realidade, além dos fatores inerentes à própria biologia da célula tumoral, é geralmente aceito que a resistência antitumoral está mais associada a fatores como a geração de CTLs específicos, a atividade NK, perfil de citocinas e produção de fatores angiogênicos do que à intensidade da resposta inflamatória desenvolvida pelo hospedeiro.

Modelos experimentais para o estudo de neoplasias têm permitido o estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento tumoral e a elaboração de estratégias para o tratamento do câncer. Uma variedade de modelos *in vivo* para o estudo de neoplasias está disponível, cada um com suas vantagens e desvantagens, e entre eles podemos citar o inóculo de linhagens de células de melanoma em animais de experimentação (Khavari, 2006).

A cada ano, cerca de três milhões de novos casos de câncer de pele são diagnosticados no mundo e o melanoma corresponde a aproximadamente 132 mil destes casos. Quando diagnosticado na fase inicial, 80% dos casos de melanoma são curados através da remoção cirúrgica. No entanto, a forma metastática é altamente refratária às terapias existentes, com uma média de sobrevida de 6 meses a 5 anos (menos de 5% dos pacientes) (Gray-Schopfer, 2007).

Melanomas são freqüentemente infiltrados por linfócitos (TILs – *tumour-infiltrating lymphocytes*), incluindo linfócitos B, linfócitos T e células NK. A intensidade do infiltrado celular é um forte fator de prognóstico para o melanoma (Hussein, 2005), de modo que 77% dos pacientes com melanoma na fase de crescimento vertical com TIL ativo apresentam uma taxa de sobrevida de 5 anos, enquanto que, apenas 37% dos pacientes com melanomas sem TIL apresentam tal

índice de sobrevida (Hussein, 2005). Os CTLs são os principais tipos celulares que compõem os TIL e estas células são capazes de eliminar as células do melanoma através do reconhecimento de antígenos tumorais específicos, de modo restrito as moléculas de histocompatibilidade (Hussein, 2005).

Os CTL e as células NK são altamente eficientes na destruição de células infectadas e células tumorais e embora os receptores envolvidos no reconhecimento do alvo sejam diferentes, o mecanismo de indução de morte da célula alvo é, essencialmente, o mesmo (Trambas & Griffiths, 2003). Assim, a atividade lítica de ambas populações de células citotóxicas depende da exocitose de grânulos citoplasmáticos e da expressão de receptores de superfície da família do TNF- α (Vivier et al., 2004; Seaman, 2000). Os grânulos citoplasmáticos são lisossomos especializados, liberados pelas células efetoras após contato célula-célula (Lieberman, 2003). Esses grânulos contêm uma variedade de moléculas com ação citotóxica como as perforinas, que se polimerizam e formam poros na superfície da célula facilitando a entrada das granzimas (Rener & Müllbacher, 2004). As granzimas, também encontradas nos grânulos citoplasmáticos, são importantes ativadoras da cascata das caspases, além de causar danos diretamente à molécula de DNA (Regner & Müllbacher, 2004; Lieberman, 2003). Os linfócitos CTLs e NK também são capazes de expressar receptores de superfície, como FasL ou *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) que induzem a ativação de DNAases resultando na morte, por apoptose, da célula alvo (Wallach et al., 1999; Berke, 1997; Bossi & Griffiths, 1999).

Os CTL são linfócitos TCD8⁺ capazes de eliminar seus alvos após reconhecimento de antígenos específicos associados a moléculas de histocompatibilidade (MHC) de classe I (Seki et al., 2002). Os CTLs isolados de

melanomas humanos podem reconhecer proteínas específicas do tumor como tirosinases, antígeno de melanoma reconhecido por células T1 (MART-1) e gp100 e, a transferência adotiva de células CTL gp100-específicas juntamente com IL-2 resulta na regressão do tumor (Kawakami et al., 2000). Apesar de reconhecerem alvos diferentes, a participação das células NK na regulação da atividade dos CTL tem sido bastante estudada. Observou-se que a depleção *in vivo* das células NK por anticorpos monoclonais favorece o desenvolvimento de melanomas transplantados por inibir a diferenciação de células TCD8⁺ em CTL tumor-específicos (Kos & Engleman, 1996).

As células NK são linfócitos granulares grandes capazes de destruir espontaneamente seus alvos, sem necessidade de sensibilização prévia e de modo independente do MHC (Herberman et al., 1987; Trinchieri, 1989; Gallin et al., 1999; Miller, 2001), característica que faz dessa população celular uma importante barreira primária contra vírus e tumores (Seaman, 2000). As células NK são também importantes na organização da resposta imune, sendo um ponto de ligação entre a resposta imune inata e a adaptativa (Kos & Engleman, 1996). Assim, essas células são uma importante fonte de IFN- γ (Warren & Smyth, 1999), além de produzir uma variedade de citocinas como TNF- α/β , fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF), proteína inibitória de macrófago-1 (MIP-1), IL-1, IL-8, IL-3, IL-5, IL-10 e IL-13 e fator de crescimento e transformação β (TGF- β) (Seaman, 2000; Geldhof et al., 2002).

Apesar das células NK não serem capazes de destruir todos os tipos de células tumorais, vários estudos demonstram a importância dessas células na defesa do hospedeiro contra o desenvolvimento de tumores. Nesse sentido, estudos utilizando células dendríticas transfectadas com vetores para IL-12 recombinante (Rodriguez-

Calvillo et al., 2002), ou células de melanomas B16 transfectadas com gene da IL-12 (Nagai et al., 2000), indicam que a secreção local de IL-12 retarda o desenvolvimento tumoral por estimular a atividade das células NK e a produção de IFN- γ por estas células. Além disso, a presença de IL-21 (Wang et al., 2003) e IL-18 (Hashimoto et al., 2003; Miller, 2001) parece potencializar a atividade citotóxica das células NK. Estudos têm demonstrado que a frequência das células NK no infiltrado celular intratumoral é baixa e a sua habilidade em migrar para o sítio tumoral está estritamente ligada ao seu estágio de ativação (Albertsson et al., 2003). Dessa forma, o tratamento sistêmico com citocinas pode favorecer o acúmulo destas células no microambiente tumoral.

A presença de citocinas específicas no microambiente é responsável por direcionar o tipo de resposta a se desenvolver. Assim, a produção preferencial de citocinas do padrão Th 1 ou Th 2 pode resultar na resistência ou facilitação do desenvolvimento tumoral. O TNF- α é o principal mediador da inflamação, atuando tanto na destruição quanto na remodelagem dos tecidos lesados (Balkwill, 2002). Atuando em sinergismo com a IL-1, o TNF- α favorece a migração leucocitária, aumentando a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e estimulando a produção de prostaglandinas e citocinas, como IL-6 e IL-8 (Wallach et al., 1999a). Além disso, esta citocina ativa o sistema de coagulação e induz a formação de granulomas no sítio da lesão, limitando a dispersão de patógenos (Wallach et al., 1999a). Embora exerça efeito deletério ao hospedeiro, o TNF- α em concentrações moderadas pode favorecer a remodelagem do tecido através do estímulo a produção de fatores de crescimento e angiogênese, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator básico de crescimento dos fibroblastos (bFGF ou FGF-2) (Balkwill, 2002). O TNF- α atua também estimulando

a produção de metabólitos reativos do oxigênio pelos macrófagos e neutrófilos e estimula a atividade citotóxica das células NK (Wallach et al., 1999a). Essa citocina pode exercer uma ação antitumoral direta, através de um efeito citocida sobre as células tumorais, ou indireta, causando alterações na vasculatura tumoral e a ativação de células T e NK (Watanabe et al., 1988; Baxevanis et al., 2000). Baxevanis e colaboradores (2000) demonstraram a importância do TNF na atividade citotóxica mediada por linfócitos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, uma vez que camundongos *knockout* para esta citocina apresentam redução da atividade lítica das células NK, das células *killer* ativadas por linfocina (LAK) e das CTL, reduzindo a capacidade de rejeição tumoral.

Além do TNF, outras citocinas como IL-12 e IFN- γ participam do controle das respostas imunes. A IL-12 é o principal ativador das funções citolíticas das células NK e CTL, além de estimular a diferenciação de células TCD4⁺ em células Th1 produtoras de IFN- γ (Lamont & Adorini, 1996; Belardelli & Ferrantini, 2002). A IL-12 é uma citocina formada por uma subunidade de 35 kD (p35) associada a uma subunidade de 40kD (p40), formando um heterodímero de 70 kD biologicamente ativo (Jun Há et al., 1999). A subunidade p35 é produzida por uma variedade de tipos celulares, enquanto que a p40 é produzida apenas por células apresentadoras de antígenos (APC) (Trinchieri, 1999). A IL-12 participa da resposta imune antitumoral contra uma variedade de tumores, incluindo carcinomas de colon, rins e pulmão, sarcomas induzidos por carcinógeno e melanomas (Smyth et al., 2000).

A ação antitumoral da IL-12 é complexa e envolve os mecanismos efetores da resposta imune inata e adaptativa e está intimamente ligada à produção de IFN- γ . Dessa forma, a IL-12 pode estimular a produção de IFN- γ pelos linfócitos T e células

NK, resultando na rejeição tumoral devido à produção de metabólitos reativos do oxigênio pelos macrófagos, na inibição da angiogênese devido à produção de proteína 10 induzida por IFN- γ (IP-10) e citocina induzida por IFN- γ (MIG) e devido à ativação da atividade lítica das células NK e CTL (Smyth et al., 2000; Trinchieri, 2003). Além disso, a IL-12 pode induzir a produção de imunoglobulinas fixadoras do complemento e opsoninas pelos linfócitos B, que também participam da resposta antitumoral *in vivo* (Trinchieri, 2003).

A família IFN foi originalmente reconhecida por sua capacidade em proteger células T *naïve* contra a infecção viral, mas, atualmente, é reconhecida a importância destas citocinas na regulação e ligação das respostas imunes inata e adaptativa. Os IFNs do tipo I, IFN- α e IFN- β , são produzidos por células nucleadas em resposta à infecção viral e por outros microrganismos (Dunn et al., 2006). Dunn e colaboradores (2006) demonstraram que o bloqueio dos receptores de IFN tipo 1 com anticorpos monoclonais inibe a resposta antitumoral do hospedeiro, permitindo o desenvolvimento de sarcomas induzidos por metilcolantreno (Meth-A), que normalmente são rejeitados por camundongos não tratados. Os IFN tipo 1 são importantes na ativação e diferenciação de células dendríticas, na produção de anticorpos e na geração de CTLs, sendo um potente adjuvante natural (Belardelli e Ferrantini, 2002). A participação dos IFN do tipo 1 na promoção da imunidade antitumoral vem despertando o interesse nesta citocina como estratégia para imunoterapias anti-câncer. De fato, o *US Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a utilização do IFN- α e IFN- β no tratamento de sarcomas de Kaposi relacionados à infecção pelo HIV, da leucemia mielóide crônica, do linfoma folicular e de melanomas (Dunn et al., 2006).

O IFN do tipo 2, representado pelo IFN- γ , é uma citocina produzida por células T, células NK e NKT e, em menor extensão, por células dendríticas e macrófagos. As ações imunomodulatórias e os efeitos na imunidade antitumoral do IFN- γ há muito tempo são conhecidos. Entre os principais mecanismos do IFN- γ envolvidos no controle da progressão tumoral podemos citar a inibição da proliferação celular, promoção da apoptose através da expressão de caspases, FAS e TRAIL e a inibição da angiogênese (Belardelli e Ferrantini, 2002). Além disso, o IFN- γ favorece o desenvolvimento de linfócitos do tipo Th1, promovendo a resposta imune celular através da maturação de CTLs e ativação de macrófagos e a inibição da geração e ativação de células T regulatórias (T_{reg}) (Nishikawa et al., 2003).

As células T_{reg} ($TCR4^+/CD25^+/Foxp3^+$) têm um importante papel na manutenção da autotolerância, bem como no controle das reações imunes contra o não-próprio (Scheffold et al., 2005). Estudos prévios demonstram que a inibição das células T_{reg} favorece a imunidade antitumoral induzida pela IL-2 e a expansão de células $TCR4^+$, $TCR8^+$ e NK no ambiente tumoral, resultando na regressão do tumor (Imai et al., 2007). As células T_{reg} representam de 5% a 10% das células $TCR4^+$ nos roedores e de 5% a 15% nos humanos. Essas células expressam, constitutivamente, altos níveis da molécula CD25 (IL-2R α) na superfície celular, receptor de TNF induzido por glicocorticóide (GITR), antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4) e Foxp3, proteína intracelular que atua como regulador gênico para a indução do fenótipo T_{reg} (Antony e Restifo, 2005).

Os mecanismos supressivos das células T_{reg} vêm sendo amplamente estudados em modelos *in vitro* e *in vivo* e incluem o contato célula-célula e a produção de fatores solúveis (Zou, 2006). No microambiente tumoral, as células T_{reg} podem

induzir a supressão através da indução da produção de IL-10 ou TGF- β pelas células locais, como as APCs e células T (Zou, 2006). A expressão do receptor de alta afinidade da IL-2 pelas células T_{reg} resulta no consumo competitivo por esta citocina entre as células T_{reg} e as demais células, resultando na limitação da oferta de IL-2 no ambiente tumoral e conseqüente diminuição na expansão das células T (Antony e Restifo, 2005; Zou, 2006). Além disso, a IL-2 tem um importante papel na manutenção, expansão e ativação das funções supressivas das células T_{reg} (Scheffold et al., 2005). As células T_{reg} também exercem seus efeitos supressivos através da lise direta de células T e APCs via liberação de perforinas e granzima B, pela indução de IDO (indoleamina 2,3-dioxigenase) - enzima que degrada o tripofano nas células APCs e inibe a ativação das células T, através da interação com CTLA-4 e via indução de B7-H4 nas APCs, resultando no bloqueio do ciclo celular nas células T e conseqüentemente na inibição de sua resposta (Zou, 2006). Dessa forma, as células T_{reg} podem controlar as respostas imunes através da inibição tanto das células T quanto das APCs.

Além das células T_{reg}, as células NKT também participam do controle das respostas imunes, especialmente em camundongos, incluindo a manutenção da autotolerância e imunovigilância tumoral (Tupin et al., 2007). As células NKT co-expressam receptores de células T e receptores típicos de células NK na superfície celular e são capazes de secretar um painel de citocinas imunoregulatórias incluindo IL-4, IL-10, IL-13 e IFN- γ (Smyth et al., 2002). Estas células reconhecem antígenos lipídicos e glicolipídicos apresentados em associação à molécula CD1d, uma família de moléculas apresentadoras de antígenos (Wu et al., 2003; Tupin et al., 2007, Smyth et al., 2000). Wu e colaboradores (2003) demonstraram que as células NKT são capazes de reconhecer o gangliosídeo GD3 associado à molécula CD1d, resultando

na produção de IL-4, IL-10 e IFN- γ por estas células. O GD3 é um gangliosídeo abundantemente expresso em tumores humanos de origem neuroectodérmica como os melanomas e sarcomas, mas pouco expresso nas células normais e foi o primeiro ligante natural descoberto para as células NKT (Wu et al., 2003). Estudos demonstram que o efeito antitumoral da IL-12 depende da participação das células NKT. Estas células são capazes de responder ao estímulo da IL-12, mesmo em baixas concentrações da citocina, devido a expressão constitutiva de altos níveis de receptores para IL-12 e, dessa forma, são capazes de dar início a produção de IFN- γ que irá atuar sobre as células NK, APC e células T (Smyth et al., 2002). Além dos seus efeitos na imunidade antitumoral, as células NKT podem também favorecer o desenvolvimento de respostas do tipo Th2 quando estimuladas via receptor de IL-7, resultando na produção de IL-4 e IL-13 (Smyth et al., 2002).

Entre as citocinas produzidas para regular a resposta imune, destacamos a IL-10 e o TGF- β . O TGF- β é um potente fator limitante do crescimento celular, controlando a proliferação de células epiteliais, hematopoiéticas e endoteliais, e favorecendo a formação da matriz extracelular pelas células mesenquimais (Roberts, 1998). A IL-10 é uma citocina regulatória, produzida por linfócitos T, linfócitos B e macrófagos ativados para limitar a resposta imune celular, inibindo as atividades e a produção de citocinas pelas APC (Mocellin et al., 2001; Pretolani et al., 1999). Sua ação provoca diminuição da expressão de MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias, contribuindo para a inibição da resposta de linfócitos T (Mocellin et al., 2001). Embora classicamente referida como uma citocina imunoregulatória, a IL-10 pode apresentar efeitos imunoestimuladores, favorecendo a proliferação e atividade de CTL, bem como a ativação de células NK e LAK (Pretolani et al., 1999; Groux et al., 1999). Fujii e colaboradores (2001) observaram que a IL-10 estimula a

proliferação de CTL, bem como a formação de linfócitos TCD8⁺ de memória com capacidade de responder rapidamente aos antígenos específicos.

Assim, podemos hipotetizar que a maior resistência ao desenvolvimento de tumores nos animais AIRmax seja resultado não apenas da intensidade do processo inflamatório, mas de sua capacidade em estimular mais intensamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, visto que as células efetoras imunes como células NK e CTLs são favorecidas pela presença de tais citocinas. Desse modo, o presente projeto foi formulado com o **objetivo de verificar a atividade NK, quantificar subpopulações de linfócitos T, a população de NKT e T_{reg} e a produção de citocinas nos animais AIRmax ou AIRmin inoculados com células de melanomas murinos.**

2. Referências bibliográficas *

- Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Goldfarb RH, Nagelkerke JF, Nannmark U, et al. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol.* 2003; 24: 603-9.
- Alexander P, Parr IB, Jackson LE. Mechanism of the local antitumor action of inflammation. *Transplant Proc* 1981; 4: 1929-31.
- Antony PA, Restifo NP. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, immunotherapy of cancer, and interleukin-2. *J Immunother.* 2005; 28: 120-28.
- Araujo LMM, Ribeiro OG, Siqueira M, De Franco M, Starobinas N, Massa S. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. *Eur J Immunol.* 1998; 28: 2913-20.
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539-45.
- Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Reviews* 2002; 13: 135-41.
- Baxevanis CN, Voutsas IF, Tsitsilonis OE, Tsiatas DG, Pappmichail M. Compromised anti-tumor response in tumor necrosis factor- α knockout mice. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1957-51.
- Belardelli F, Ferrantini M. Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends Immunol* 2002; 23: 201-8.
- Berke G. Killing mechanisms of cytotoxic lymphocytes. *Curr Opin Hematol* 1997; 4: 32-40.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. *Annu Inter Med* 1997; 126: 36-47.

- Biozzi G, Ribeiro OG, Saran A, Araújo LM, Maria DA, De Franco M, Cabrera WH, Sant'anna AO, Massa S, Covelli V, Mouton D, Neveu T, Siqueira M, Ibañez OM. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. *Carcinogenesis* 1998; 19: 337-46.
- Borrego A, Peters LC, Jensen JR, Ribeiro OG, Cabrera WHK, Starobinas N, et al. Genetic determinants of acute inflammation regulate *Salmonella* infection and modulate *Slc11a1* gene (formerly *Nramp1*) effects in selected mouse lines. *Microbes and Infection* 2006; 8: 2766-71.
- Bossi G, Griffiths GM. Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med* 1999; 5: 90-6.
- Castoldi L, Golim MA, Ribeiro Filho OG, Romagnoli GG, Ibañez OCM, Kaneno R. Enhanced natural killer activity and production of pro-inflammatory cytokines in mice selected for high acute inflammatory response (AIRmax). *Immunol.* 2006; 120: 372-79.
- Cavaillon JM, Duff G. Cytokines and the cellular mechanism of inflammation. In: Theze J, editors. *The cytokine network and immune functions*. Oxford: University Press, 1999. p. 251-61.
- Coussens LM & Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-67.
- Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 2002; 295: 2387-92.
- Di Carlo E, Forni G, Lollini P, Colombo MP, Modesti A, Musiani P. The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood* 2001; 97: 339-45.

- Di Pace RF, Massa S, Ribeiro OG, Cabrera WHK, De Franco M, Starobinas N, et al. Inverse genetic predisposition to colon versus lung carcinogenesis in mouse lines selected based on acute inflammatory responsiveness. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1517-25.
- Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Rev Cancer* 2004; 4: 11-22.
- Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Rev Immunol.* 2006; 6: 836-48.
- Fujii S, Shimizu K, Shimizu T, Lotze MT. Interleukin-10 promotes the maintenance of antitumor CD8⁺ T-cell effector function in situ. *Blood* 2001; 98: 2143-51.
- Gallin JI & Snyderman R. *Inflammation: Basis Principles and Clinical Correlates*. 3ed. Philadelphia-USA, Lippincott Williams & Wilkins – 1999.
- Geldhof A, Van Ginderachter JA, Liu Y, Noël W, Raes G, De Baetselier P. Antagonistic effect of NK cells on alternatively activated monocytes: a contribution of NK cells to CTL generation. *Blood* 2002; 100: 4049-58.
- Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 2007; 445: 851-7.
- Groux H, Cottrez F, Rouleau M, Mauze S, Antonenko S, Hurst S, McNeil T, Bigler M, Roncarolo MG, Coffman RL. A transgenic model to analyse the immunoregulatory role of IL-10 secreted by antigen-presenting cells. *J Immunol* 1999; 162: 1723-29.
- Hashimoto W, Tanaka F, Robbins PD, Taniguchi M, Okamura H, Lotze MT, Tahara H. Natural killer, but not natural killer T, cells play a necessary role in the promotion of an innate antitumor response induced by IL-18. *Int J Cancer* 2003; 103: 508-13.

- Herberman RB, Hiserodt J, Vujanovic N, Balch C, Lotzová E, Bolhuis R, Golub S, Lanier LL, Phillips JH, Riccard C, Ritz J, Santoni A, Schmidt RE, Uchida A. Lymphokine-activated killer cell activity: Characteristics of effector cells and their progenitors in blood and spleen. *Immunol Today* 1987; 8:178.
- Hussein MR. Tumour-infiltrating lymphocytes and melanoma tumorigenesis: an insight. *British J Dermatol.* 2005; 153: 18-21.
- Ibañez OM, Stiffel C, Ribeiro OG, Cabrera WH, Massa S, De Franco M, Sant'anna AO, Decreusefond C, Mouton D, Siqueira M, Biozzi G. Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. *Eur. J. Immunol* 1992; 22:2555-63.
- Imai H, Saio M, Nonaka K, Suwa T, Umemura N, Ouyang GF, et al. Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells enhances interleukin-2-induced antitumor immunity in a mouse model of colon adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 2007; 98: 416-23.
- Jun Ha S, Lee CH, Lee SB, Kim CM, Jang KL, Shin HS, Sung YC. A novel function of IL-12p40 as a chemotactic molecule for macrophages. *J Immunol* 1999; 163: 2902-08.
- Kawakami Y, Suzuki Y, Shofuda T, Kiniwa Y, Inozume T, Dan K, Sakurai T, Fujita T. T cell immune responses against melanoma and melanocytes in cancer and autoimmunity. *Pigment Cell Res.* 2000; 13: 163-9.
- Khavari PA. Modelling cancer in human skin tissue. *Nature Rev Cancer* 2006; 6: 270-80.
- Kos FJ, Engleman EG. Immune regulation: a critical link between NK cells and CTLs. *Immunol Today* 1996; 17: 174-76.

- Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D. Infections as a major preventable cause of human cancer. *J Intern Med* 2000; 248: 171-83.
- Lamont AG, Adorini L. IL-12: a key cytokine in immune regulation. *Immunol Today* 1996; 17: 214-17.
- Lennard-Jones JE, Melville DM, Morson BC *et al.* Precancer and cancer in extensive ulcerative colitis: findings among 401 patients over 22 years. *Gut* 1990; 31: 800-6.
- Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature Rev* 2003; 3: 361-70.
- Malkinson AM. Role of inflammation in mouse lung tumorigenesis: a review. *Exp Lung Res.* 2005; 31: 57-82.
- Maria DA, Manenti G, Galbiati F, Ribeiro OG, Cabrera WK, Barrera RG, Pettinicchio A, De Franco M, Starobinas N, Siqueira M, Dragani TA, Ibañez OM. Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas 1) locus affects inflammatory response. *Oncogene* 2003; 22: 426-32.
- Maria DA, Ribeiro OG, Pizzocaro KF, De Franco M, Cabrera WK, Starobinas N, Gallois V, Siqueira M, Seman M, Ibañez OM. Resistance to melanoma metástases in mice selected for high acute inflammatory response. *Carcinogenesis* 2001; 22: 337-42.
- Miller JS. The biology of natural killer cells in cancer, infection and pregnancy. *Exp Hematol* 2001; 29: 1157-68.
- Mocellin S, Wang E, Marincola FM. Cytokines and immune response in the tumor microenvironment. *J. Immunoth* 2001; 24 392-407.

- Nagai H, Hara I, Horikawa T, Fuji M, Kurimoto M, Kamidono S, Ichihashi M. Antitumor effects on mouse melanoma elicited by local secretion of interleukin-12 and their enhancement by treatment with interleukin-18. *Cancer Invest* 2000; 18: 206-13.
- Nishikawa H, Kato T, Tanida K, Hiasa A, Tawara I, Ikeda H, Ikarashi Y, et al. CD4⁺CD25⁺ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 10902-6.
- Peters LC, Jensen JR, Borrego A, Cabrera WHK, Baker N, Starobinas N, et al. Slc11a1 (formerly NRAMP1) gene modulates both acute inflammatory reactions and pristane-induced arthritis in mice. *Genes and Immunity* 2007; 8: 51-6.
- Pretolani M, Stordeur P, Golman M. Interleukin 10. In: Theze J, editors. *The cytokine network and immune functions*. Oxford: University Press, 1999. p. 45-50.
- Rener M, Müllbacher A. Granzymes in cytolytic lymphocytes- to kill a killer? *Immunol and Cell Biol* 2004; 82: 161-69.
- Ribeiro OG, Maria DA, Adriouch S, Pechberty S, Cabrera WHK, Morisset J, et al. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. *J Leukoc Biol*. 2003; 74: 497-506.
- Roberts AB. Molecular and cell biology of TGF- β . *Miner. Electrolyte Metab* 1998; 24: 111-19.
- Rodriguez LAG, Huerta-Alvarez C. Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Epidemiology* 2001; 12: 88-93.

Rodriguez-Cavillo M, Duarte M, Tirapu I, Berraondo P, Mazzolini G, Qian C, Prieto J, Melero I. Upregulation of natural killer cells functions underlies the efficacy of intratumorally injected dendritic cells engineered to produce interleukin-12. *Exp Hematol* 2002; 30: 195-204.

Scheffold A, Hühn J, Höfer T. Regulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity: it takes (IL-) two to tango. *Eur J Immunol*. 2005; 35: 1336-41.

Seaman WE. Natural Killer Cells and Natural Killer T Cells (review). *Am. Coll Rheum* 2000; 43: 1204-17.

Seki N, Brooks AD, Carter CR, Back TC, Parsonneault EM, Smyth MJ, Wilttrout RH, Sayers TJ. Tumor-specific CTL kill murine renal cancer cells using both perforin and Fas-ligand-mediated lysis in vitro, but cause tumor regression in vivo in the absence of perforin. *J immunol* 2002; 168: 3484-92.

Smyth MJ, Crowe NY, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Godfrey D. NKT cells- conductors of tumor immunity? *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 165-71.

Smyth MJ, Taniguchi M, Street SEA. The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *The J Immunol*. 2000; 165: 2665-70.

Suttmann H, Jacobsen M, Reiss K, Jocham D, Bohie A, Brandau S. Mechanisms of bacillus Calmette-Guerin mediated natural killer cell activation. *J Urol* 2004; 4: 1490-5.

Takaoka A, Hayakama S, Yanai H, Stolber D, Negishi H, Kikuchi H, Sasaki S, Imal K, Shibue T, Honda K, Tanaguchi T. Integration of interfero- α/β signalling to p53 responses in tumor suppression and antiviral defence. *Nature* 2003; 424: 516-23.

Trambas CM, Griffiths G. Delivering the kiss of death. *Nature Immunol* 2003; 4: 399-403.

- Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol* 1989; 47: 187-376.
- Trinchieri G. Interleukin 12. In: Theze J, editors. *The cytokine network and immune functions*. Oxford: University Press, 1999. p. 97-103.
- Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Rev Immunol*. 2003; 3: 133-46.
- Tupin E, Kinjo Y, Kronenberg M. The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nature Rev Microbiol*. 2007; 5: 405-17.
- Vigar ND, Cabrera WH, Araujo LMN, Ribeiro OG, Ogata TRP, Siqueira M, Ibañez OM, De Franco M. Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. *Eur. J. Immunol* 2000; 30: 431-37.
- Vivier E, Nunès JA, Vély F. Natural Killer cell signaling pathways. *Science* 2004; 306: 1517-19.
- Wallach D, Bigda J, Engelman H. The tumor necrosis factor (TNF) family and related molecules. In: Theze J, editors. *The cytokine network and immune functions*. Oxford: University Press, 1999. p. 251-61.a
- Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 331-7.
- Wang G, Tschol M, Spolski R, Lou Y, Ozaki K, Feng C, Kim G, Leonard WJ, Hwu P. In vivo antitumor activity of interleukin-21 mediated by natural killer cells. *Cancer Res* 2003; 15: 9016-22.
- Warren H, Smyth M. NK cells and apoptosis. *Immunol and Cell Biol* 1999; 77: 64-75.

Watanabe N, Niitsu Y, Umero H et al. Synergistic cytotoxic and antitumor effects of recombinant tumour necrosis factor and hyperthermia. *Cancer Res* 1988; 48: 650-3.

Wu DY, Segal NH, Sidobre S, Kronenberg M, Chapman PB. Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *J Exp Med*. 2003; 198: 173-81.

Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Rev Immunol*. 2006; 6: 295-307.

Manuscrito[☆]

^{*} De acordo com as normas da revista *European Journal of Immunology*.

running title: **Desenvolvimento de melanomas em camundongos AIR**

Desenvolvimento de melanoma em animais selecionados pela intensidade de resposta inflamatória aguda (AIRmax/AIRmin): caracterização das células *natural killer*, NKT, T_{reg} e perfil de citocinas

Lindsey Castoldi^{1,2}, Graziela G. Romagnoli^{1,2}, Marjorie de Assis Golim³, Orlando Garcia Ribeiro⁵, Olga Célia Martinez Ibañez⁵, Andréa Vanessa Ferreira Pinto^{1,2}, Maria Carolina Gameiro¹, Priscila Raquel Martins^{1,2}, Martha Maria Mischan⁴, Ramon Kaneno¹

1. UNESP, Instituto de Biociências de Botucatu, Depto. de Microbiologia e Imunologia, Brasil
2. UNESP, Faculdade de Medicina de Botucatu, Depto. de Patologia, Brasil
3. UNESP, Faculdade de Medicina de Botucatu, Divisão Hemocentro, Brasil
4. UNESP, Instituto de Biociências de Botucatu, Depto. de Bioestatística, Brasil
5. Instituto Butantan, Laboratório de Imunogenética, Brasil

Palavras chaves: Citocinas, Inflamação, Melanoma, Natural killer, NKT

Autor correspondente: Dr. Ramon Kaneno

Depto. de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu –
UNESP, Distrito de Rubião Júnior, s/nº, Caixa Postal: 510, Botucatu – SP,
Brasil, CEP: 18610-000; FONE: 55 14 3811 6058; FAX: 55 14 3815 3744;
rskaneno@yahoo.com.br

Resumo:

Animais selecionados de acordo com a intensidade da sua resposta inflamatória aguda (AIR) à poliacrilamida, foram inoculados s.c. com células de melanoma B16F10 ou S91. Aos 7, 14 ou 30 dias, os animais foram sacrificados para obtenção do baço e avaliação do número de células T, T_{reg}, NK e NKT, por citometria de fluxo, e do perfil de algumas citocinas (ELISpot). Os resultados demonstraram que os animais AIRmax apresentaram maior incidência do melanoma B16F10, associado ao aumento do número de células T_{reg}, e também incidência elevada do melanoma S91, associada ao aumento da produção IL-10 e redução de IFN- γ , em relação aos animais AIRmin. Estes resultados permitem inferir que a sensibilidade ao desenvolvimento de melanomas pode ser resultado de alterações nos mecanismos regulatórios da resposta imune, que neste caso, inibiram o desenvolvimento de uma resposta eficiente nos animais AIRmax.

1. Introdução

A linhagem AIR (*acute inflammatory response*) foi desenvolvida através de seleção genética bidirecional para uma forte (AIRmax) ou fraca (AIRmin) resposta inflamatória aguda. A seleção foi realizada a partir de uma linhagem fundadora F₀, altamente polimórfica, gerada pelo intercruzamento de oito linhagens de camundongo isogênicos (A, DBA2, P, SWR, SJL, CBA, BALB/c e C57BL/6) [1]. O processo seletivo baseou-se na concentração de células e proteínas presentes no exsudato inflamatório gerado pelo inóculo subcutâneo de partículas de poliacrilamida (*biogel*), uma substância inerte e não imunogênica [1]. Atualmente, essas linhagens representam um importante modelo murino para o estudo dos componentes genéticos da imunidade não-específica que influenciam o desenvolvimento de doenças infecciosas, autoimunes e neoplásicas [2-5].

Estudos realizados com os animais da linhagem AIR demonstram que a seleção genética, obtida de acordo com a intensidade da resposta inflamatória aguda, pode ter favorecido também a seleção de fatores relacionados à resposta imunológica antitumoral. Trabalhos desenvolvidos por nosso grupo demonstraram que animais AIRmax normais apresentam maior número de células NK (CD49b⁺) e células TCD8⁺, associado a maior atividade citotóxica contra células Yac.1 e à produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), em comparação aos animais da linhagem AIRmin [6]. Ribeiro et al. observaram que os animais AIR apresentam diferenças quanto à granulopoiese dos neutrófilos, uma vez que os animais AIRmax normais são capazes de produzir maiores níveis mais elevados de fatores de crescimento

e quimiotáticos para neutrófilos que os animais AIRmin [7]. Além disso, os autores observaram que neutrófilos dos animais AIRmax são mais resistentes à apoptose [7].

Estudos prévios relatam que esses animais apresentam diferenças quanto ao desenvolvimento de tumores, quimicamente induzidos ou transplantáveis, e quanto à infecção por microrganismos patogênicos intracelulares. Nesse sentido, Biozzi et al. [8] observaram que os animais AIRmax submetidos ao processo de carcinogênese química de pele induzido por 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) e 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA), apresentam menor incidência e multiplicidade tumoral que os animais da linhagem AIRmin [8]. No modelo de carcinogênese pulmonar induzido por uretana [9], DMBA [10] ou 1,2 dimetilhidrazina (DMH) [10] os animais AIRmax também se mostraram mais resistentes que os AIRmin ao desenvolvimento de adenomas e adenocarcinomas e, nesse caso, as divergências pareceram estar relacionadas com a segregação de alelos suscetíveis (nos AIRmin) ou resistentes (nos AIRmax) para a região de suscetibilidade para adenoma pulmonar (PAS-1). Além disso, os animais AIRmax são resistentes ao desenvolvimento de metástases de melanomas murinos (B16F10) e humanos (SKMel-28) e o tratamento destes animais com drogas anti-inflamatórias não esteroides (aspirina e nimesulide) altera esse perfil, aumentando em 60% a incidência de metástases nestes animais [5]. No entanto, a suscetibilidade a neoplasias parece depender do tipo órgão-alvo, uma vez que os animais AIRmax são mais sensíveis à carcinogênese química de colon induzida por DMH [11].

Embora a resposta inflamatória seja um evento fisiológico do hospedeiro, há um consenso de que sua cronicidade pode favorecer o desenvolvimento de uma variedade de tumores [12-15]. De fato, a presença de leucócitos e outras células fagocíticas no sítio da inflamação pode favorecer a tumorigênese devido à produção de fatores de crescimento, angiogênese e substâncias nocivas ao DNA, como os metabólitos reativos do oxigênio e nitrogênio. No entanto, a resposta inflamatória local pode favorecer o desenvolvimento da resposta imune específica, na medida que estimula a produção de citocinas e quimiocinas pelas células imunes locais, resultando no desenvolvimento de células T citotóxicas e T helper efectoras [16]. Melanomas são freqüentemente infiltrados por TIL (*tumour-infiltrating lymphocytes*) capazes de reconhecer antígenos tumor-associados (TAA) e mediar a regressão tumoral [17]. Neoplasias em estágio inicial, quando densamente infiltradas por TIL, são fortemente correlacionadas com diminuição da incidência de metástases e melhor prognóstico para o paciente [18].

Dessa forma, é possível que o processo inflamatório agudo intenso, observado nos animais AIRmax, seja responsável pelo desenvolvimento de resposta antitumoral subsequente, através da estimulação de células da imunidade inata como as células *natural killer* (NK). Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar o perfil imunológico de animais AIRmax e AIRmin inoculados s.c. com células de melanoma, avaliando a atividade de células NK esplênicas, o número de células T, NK, NKT e T regulatórias (T_{reg}) e o número de células produtoras das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-2, IL-6 e IL-10.

2. Resultados

2.1. Análise do desenvolvimento tumoral e metástases

O local do implante tumoral foi cirurgicamente removido e processado histologicamente para a análise microscópica com coloração de hematoxilina e eosina. Foram considerados para a análise do crescimento tumoral as massas tumorais com diâmetro superior a 1mm. Dessa forma, observamos que aos 7 dias, o desenvolvimento tumoral de B16F10 e S91 foi nulo em todas as linhagens (Tabela 1). A análise descritiva dos dados obtidos aos 14 e 30 dias demonstra que os animais da linhagem AIRmin apresentaram menor incidência do melanoma B16F10 ou S91 que os animais da linhagem AIRmax e BALB/c (Tabela 1). Não foram observadas metástases na cavidade torácica e abdominal dos animais inoculados com o melanoma B16F10 ou S91.

Tabela 1. Incidência de crescimento do tumor primário dos melanomas murinos B16F10 e S91 nos animais das linhagens AIR e BALB/c.

Linhagem Animal	Linhagem Tumoral					
	Melanoma B16F10			Melanoma S91		
	7 dias	14 dias	30 dias	7 dias	14 dias	30 dias
AIRmax	0%*	62,5%	50%	0%*	61,53%	58,3%
AIRmin	0%*	12,5%	25%	0%*	50%	36,3%
BALB/c	0%*	37,5%	100%	0%*	50%	61,5%

* diâmetro tumoral <1mm

2.2. Atividade citotóxica

Como pode ser observado na Figura 1, o inóculo de células B16F10 não provoca alterações significativas na atividade NK ao longo do desenvolvimento tumoral (7,14 e 30 dias). O tumor S91, por sua vez provocou redução da atividade NK esplênica no período mais precoce (AIRmax S91: $2,65 \pm 0,00\%$ vs Controle: $23,41 \pm 17,12\%$; AIRmin S91: $13,86 \pm 7,59\%$ vs Controle: $24,37 \pm 22,95\%$), ainda que a análise estatística tenha revelado redução significativa apenas nos animais BALB/c (S91 $3,61 \pm 3,57\%$ vs Controle $24,19 \pm 12,21\%$). Aos 14 e 30 dias, os animais AIRmax e BALB/c inoculados com S91 tiveram a atividade lítica restaurada, enquanto os animais AIRmin mantiveram o perfil mais baixo que o controle (14 dias: AIRmin S91: $4,94 \pm 4,09\%$ vs Controle: $14,85 \pm 5,25\%$).

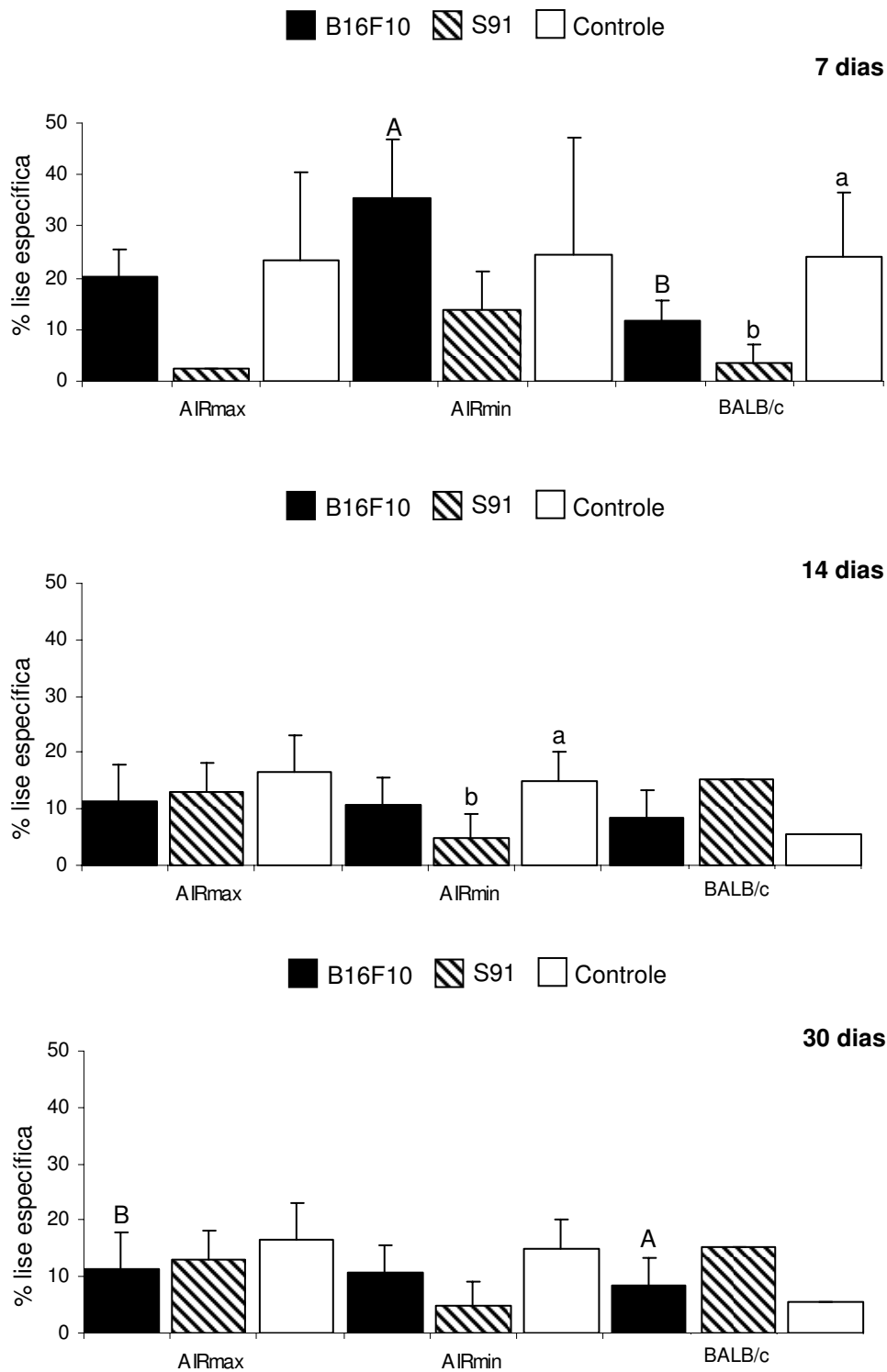


Figura 1. Atividade citotóxica de células esplênicas de camundongos da linhagem AIR e BALB/c (n=6) avaliada pela atividade da lactato-desidrogenase e detectada por método colorimétrico não radioativo. Os valores estão representados em média% $\pm$ SD da lise específica contra células Yac.1 na proporção efetora:alvo de 40:1. As letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos em cada linhagem (a>b, p<0,05). As letras maiúsculas representam diferenças entre as linhagens, de acordo com o tratamento (A>B, p<0,05).

2.3. Quantificação de células produtoras de IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ

Os animais das linhagens AIR inoculados com células de melanoma B16F10 ou S91 foram avaliados quanto ao número de células esplênicas produtoras de IL-2, IL-6, IL-10, IL-12p70, TNF- α e IFN- γ pela técnica de ELISpot, após 7, 14 ou 30 dias de implantação tumoral.

A análise do número de células produtoras de IL-6 (células IL-6⁺) demonstrou que aos 7 dias, animais AIRmax, AIRmin e BALB/c implantados com melanoma S91 tiveram maior número de células IL-6⁺ que seus respectivos grupos controle (AIRmax S91 626,44 $\pm$ 106,37 vs Controle 319,82 $\pm$ 97,22; AIRmin S91 539,88 $\pm$ 89,70 vs Controle 379,87 $\pm$ 33,14; BALB/c S91 632,25 $\pm$ 197,01 vs Controle 362,31 $\pm$ 94,53). A implantação de células B16F10 promoveu ligeiro aumento no número de células IL-6⁺ nos animais AIRmax e AIRmin (0,05<p<0,1), ao passo que entre os animais BALB/c essa diferença foi estatisticamente significativa (BALB/c B16F10 693,08 $\pm$ 39,70 vs Controle 362,31 $\pm$ 94,53) (Figura 2).

Nos períodos seguintes de análises, apenas o grupo AIRmin S91 manteve a diferença em relação ao seu grupo controle (14 dias: AIRmin S91 564,24 $\pm$ 175,98 vs Controle 385,23 $\pm$ 80,07; 30 dias: AIRmin S91 705,45 $\pm$ 96,89 vs Controle 464,22 $\pm$ 181,42). Tanto a linhagem AIRmax, quanto AIRmin inoculados com melanomas S91 apresentaram maior número de células esplênicas IL-6⁺ no 14º e 30º dia, enquanto que para o grupo B16F10, o número de células secretoras foi semelhante nos três períodos avaliados (Figura 2).

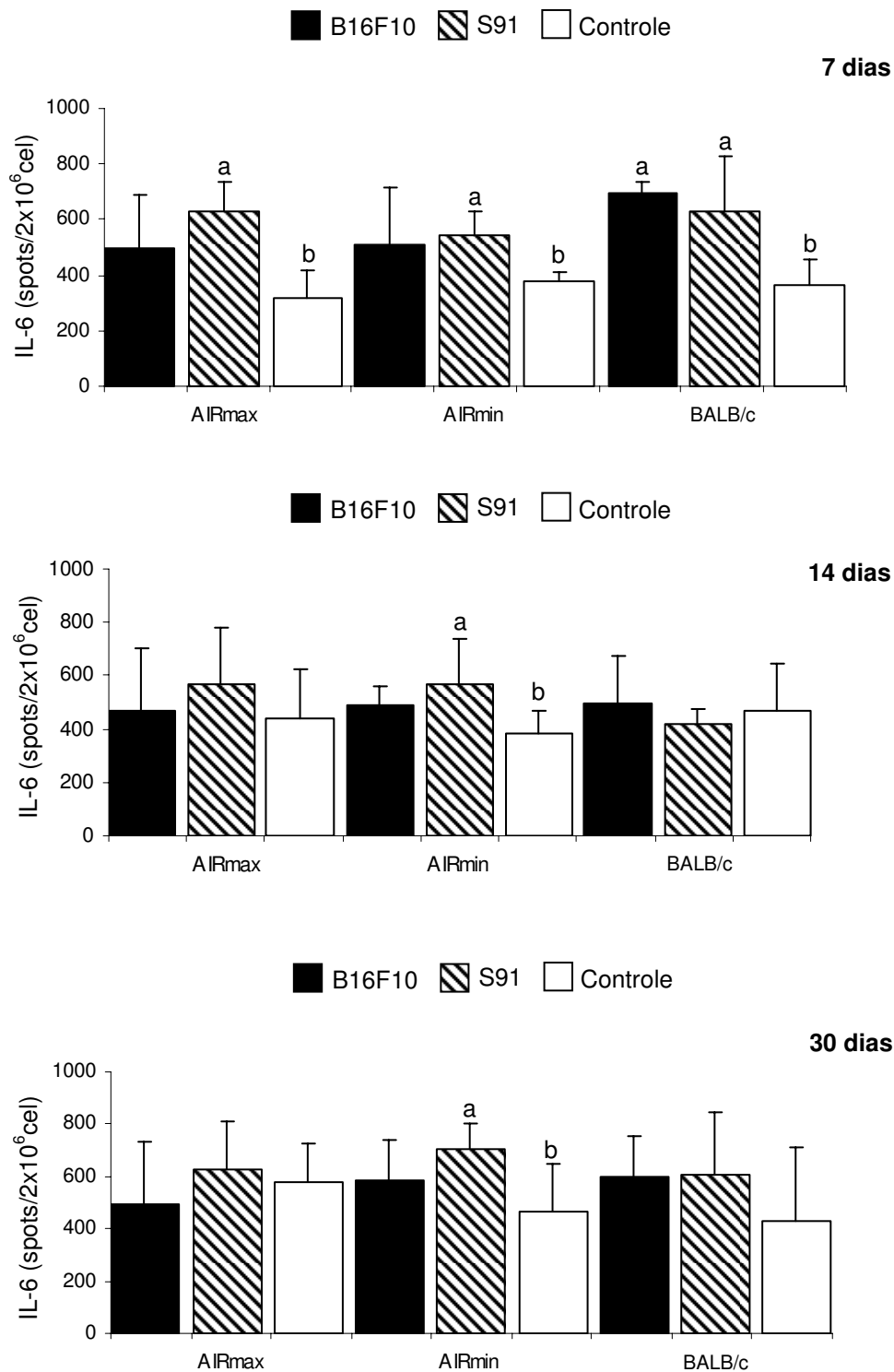


Figura 2. Quantificação do número de células esplênicas produtoras de IL-6 pela técnica do ELISpot. Os valores estão expressos como média spots/2x10⁶cel ± SD (n=14). As letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos em cada linhagem (a>b, p<0,05). As letras maiúsculas representam diferenças entre as linhagens, de acordo com o tratamento (A>B, p<0,05).

A análise das células secretoras de TNF- α demonstrou que não houve diferença entre AIRmax e AIRmin no período de 7 dias (Figura 3). Aos 14 dias houve queda no número de células produtoras de TNF- α na linhagem AIR implantados com melanoma S91 (AIRmax 112,44 $\pm$ 55,84 vs Controle 270,39 $\pm$ 112,39). No entanto, aos 30 dias observamos aumento nos animais AIRmin S91 (AIRmin S91 438,33 $\pm$ 85,16 vs Controle 331,03 $\pm$ 41,55) (Figura 3).

Em relação ao número de células produtoras de IFN- γ (IFN- γ^+), observamos que, aos 7 dias, a implantação de células S91 induziu aumento no número de células IFN- γ^+ tanto na linhagem AIR, quanto BALB/c (AIRmax S91 252,21 $\pm$ 78,51 vs Controle 99,90 $\pm$ 62,21; AIRmin S91 296,41 $\pm$ 96,58 vs Controle 103,34 $\pm$ 56,71; BALB/c S91 266,73 $\pm$ 95,29 vs Controle 162,63 $\pm$ 50,77). Nesse período, observamos que animais AIRmax responderam com aumento do número de células IFN- γ^+ tanto à implantação de células B16F10 (AIRmax B16F10 228,23 $\pm$ 92,47 vs Controle 99,90 $\pm$ 62,21), quanto S91. Animais AIRmin mostraram o mesmo perfil de resposta, embora a análise estatística tenha revelado significância apenas para os animais inoculados com S91 (Figura 4). Aos 14 dias, chamou a atenção a drástica redução no número de células IFN- γ^+ dos animais AIRmax e AIRmin implantados com S91. A análise dos dados obtidos aos 30 dias, indica que o número de células IFN- γ^+ normaliza-se no grupo AIRmax S91 e leva a um expressivo aumento no grupo AIRmin S91 (AIRmax S91 252,19 $\pm$ 142,00; AIRmin S91 526,36 $\pm$ 201,97; AIRmin Controle 188,67 $\pm$ 66,17; BALB/c S91 225,00 $\pm$ 154,17) (Figura 4).

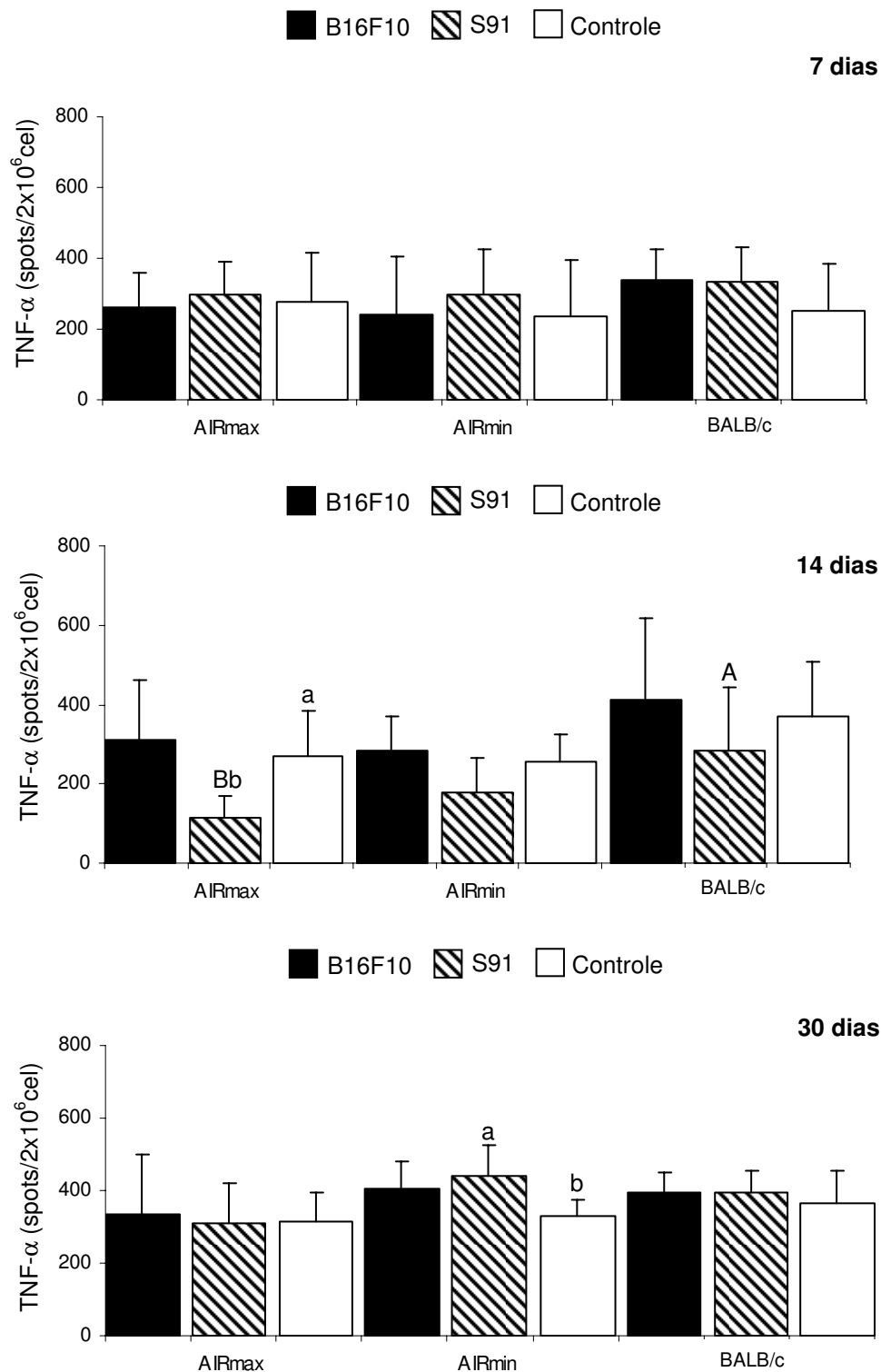


Figura 3. Quantificação do número de células esplênicas produtoras de TNF- α pela técnica do ELISpot. Os valores estão expressos como média spots/ 2×10^6 cel $\pm$ SD (n=12). As letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos em cada linhagem (a>b, p<0,05). As letras maiúsculas representam diferenças entre as linhagens, de acordo com o tratamento (A>B, p<0,05).

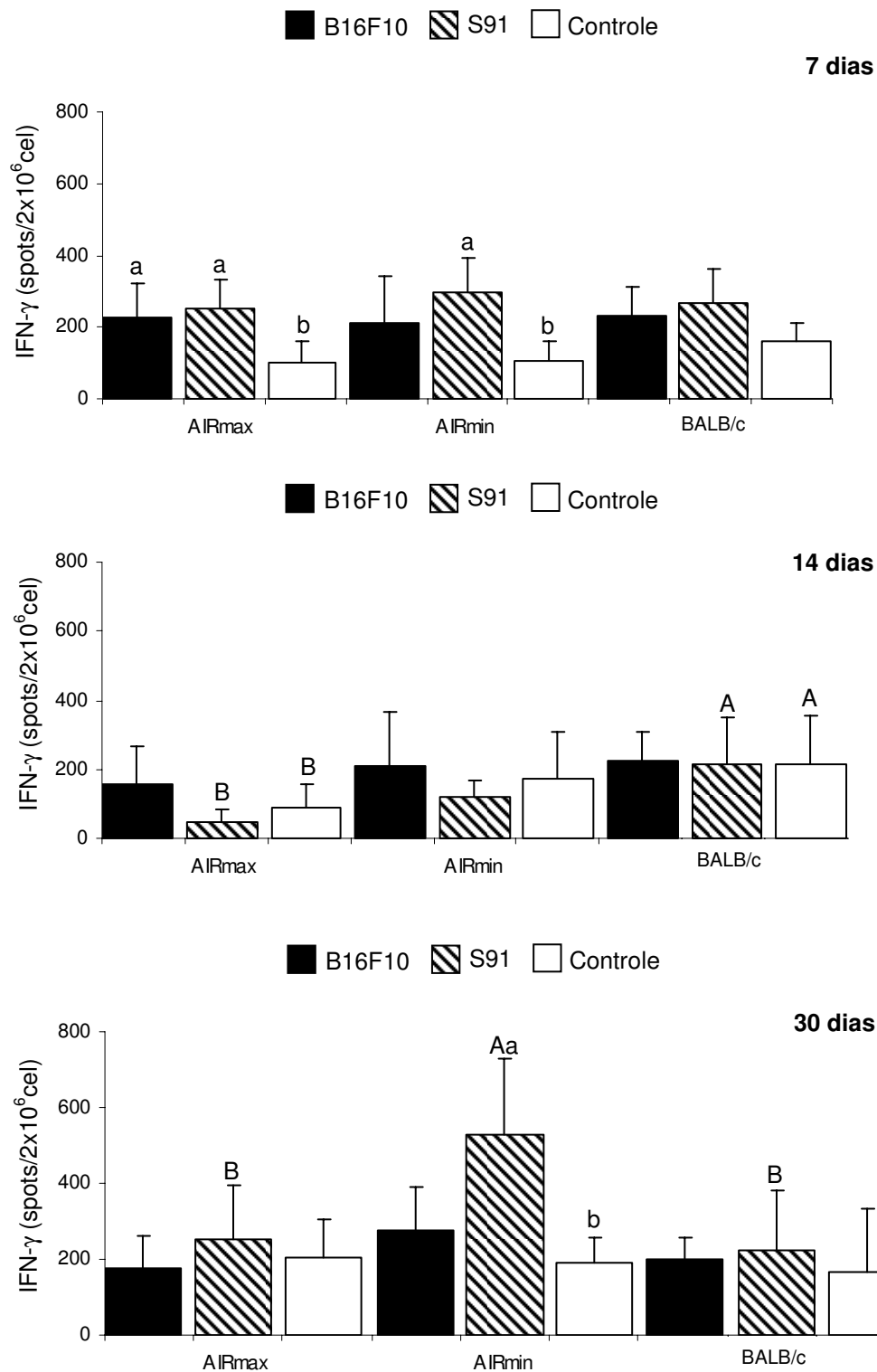


Figura 4. Quantificação do número de células esplênicas produtoras de IFN- γ pela técnica do ELISpot. Os valores estão expressos como média spots/2x10⁶cel $\pm$ SD (n=13). As letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos em cada linhagem (a>b, p<0,05). As letras maiúsculas representam diferenças entre as linhagens, de acordo com o tratamento (A>B, p<0,05).

Com relação à produção de IL-2, uma característica geral observada nos três períodos de análises, foi o aumento do número de células produtoras desta citocina (IL-2⁺) nos animais com tumor (B16F10 ou S91) em relação aos seus controles. Assim, aos 7 dias, a linhagem BALB/c implantada com melanoma apresentou um aumento significativo de células IL-2⁺ em relação ao grupo controle (BALB/c B16F10 207,70±52,68; BALB/c S91 232,86±77,83; BALB/c Controle 42,38±23,24). Comportamento semelhante foi observado entre os esplenócitos dos animais AIRmax implantados com tumor em comparação ao seu controle (AIRmax B16F10 107,45±66,18; AIRmax S91 190,60±30,22; AIRmax Controle 21,04±13,48). Chama a atenção o fato de que, nesse período, o número de células produtoras de IL-2 nos animais BALB/c implantados com melanoma é visivelmente superior à resposta ao tumor desenvolvida tanto por animais AIRmax, quanto para animais AIRmin (Figura 5).

Diferenças significativas entre animais implantados com tumor e seus respectivos controles foram observadas também aos 14 (AIRmax B16F10 79,04±31,33 e S91 76,00±43,98 vs Controle 38,32±15,27; AIRmin B16F10 65,74±22,66 e S91 76,13±29,07 vs Controle 14,28±7,30; BALB/c B16F10 109,06±22,72 vs Controle 48,07±25,84) e 30 dias, à exceção dos animais AIRmax aos 30 dias (AIRmin B16F10 186,67±47,61 e S91 89,00±26,01 vs Controle 31,88±15,10; BALB/c B16F10 148,25±93,32 e S91 97,39±23,11 vs Controle 53,75±34,31) (Figura 5).

A ocorrência de células produtoras de IL-10 e IL-12 foi bastante discreta nos 3 períodos, observando-se apenas diferenças pontuais entre os grupos AIRmax S91 e AIRmin S91 no período de 30 dias (Figuras 6 e 7).

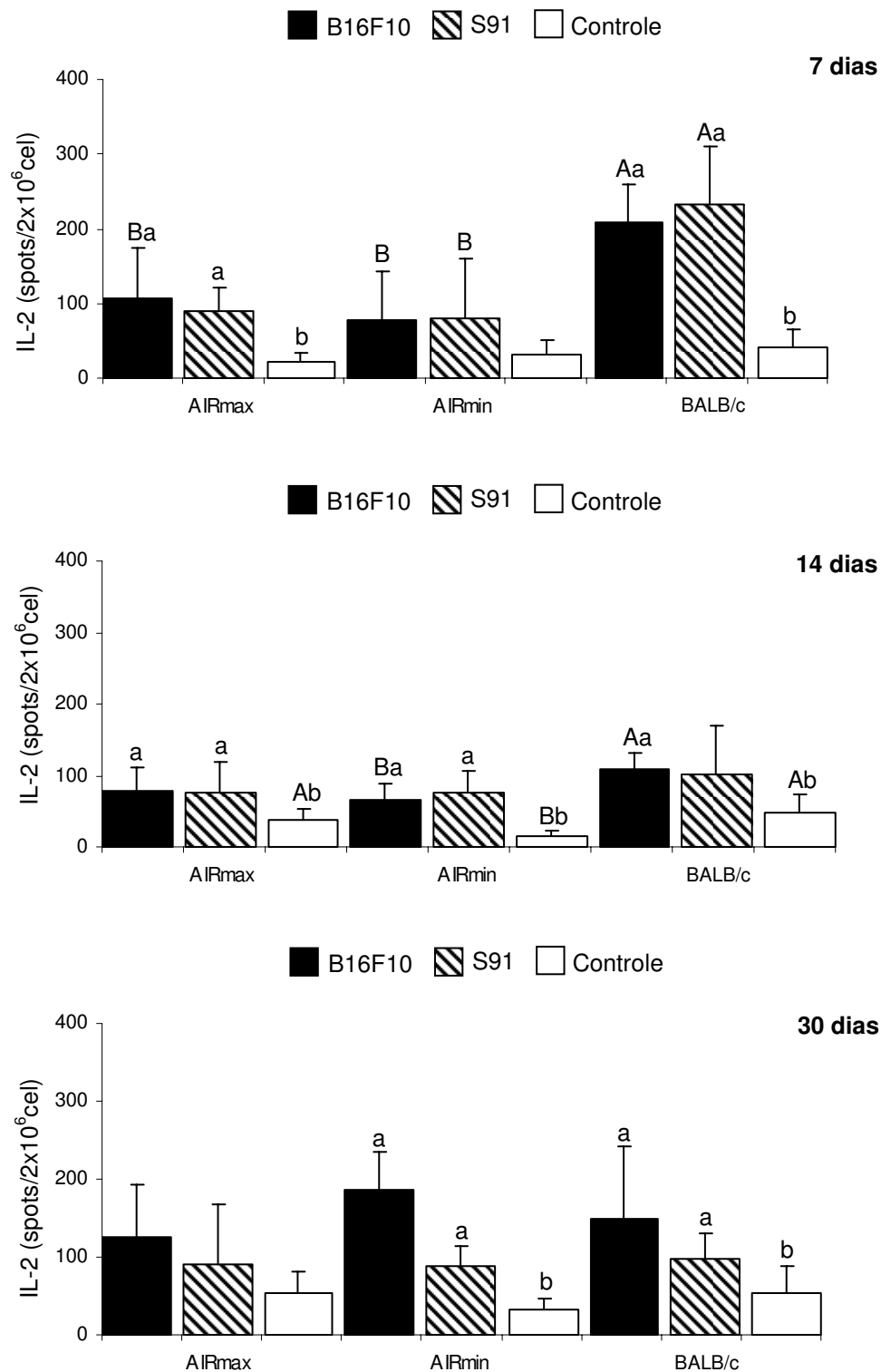


Figura 5. Quantificação do número de células esplênicas produtoras de IL-2 pela técnica do ELISpot. Os valores estão expressos como média spots/2x10⁶cel ± SD (n=14). As letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos em cada linhagem (a>b, p<0,05). As letras maiúsculas representam diferenças entre as linhagens, de acordo com o tratamento (A>B, p<0,05).

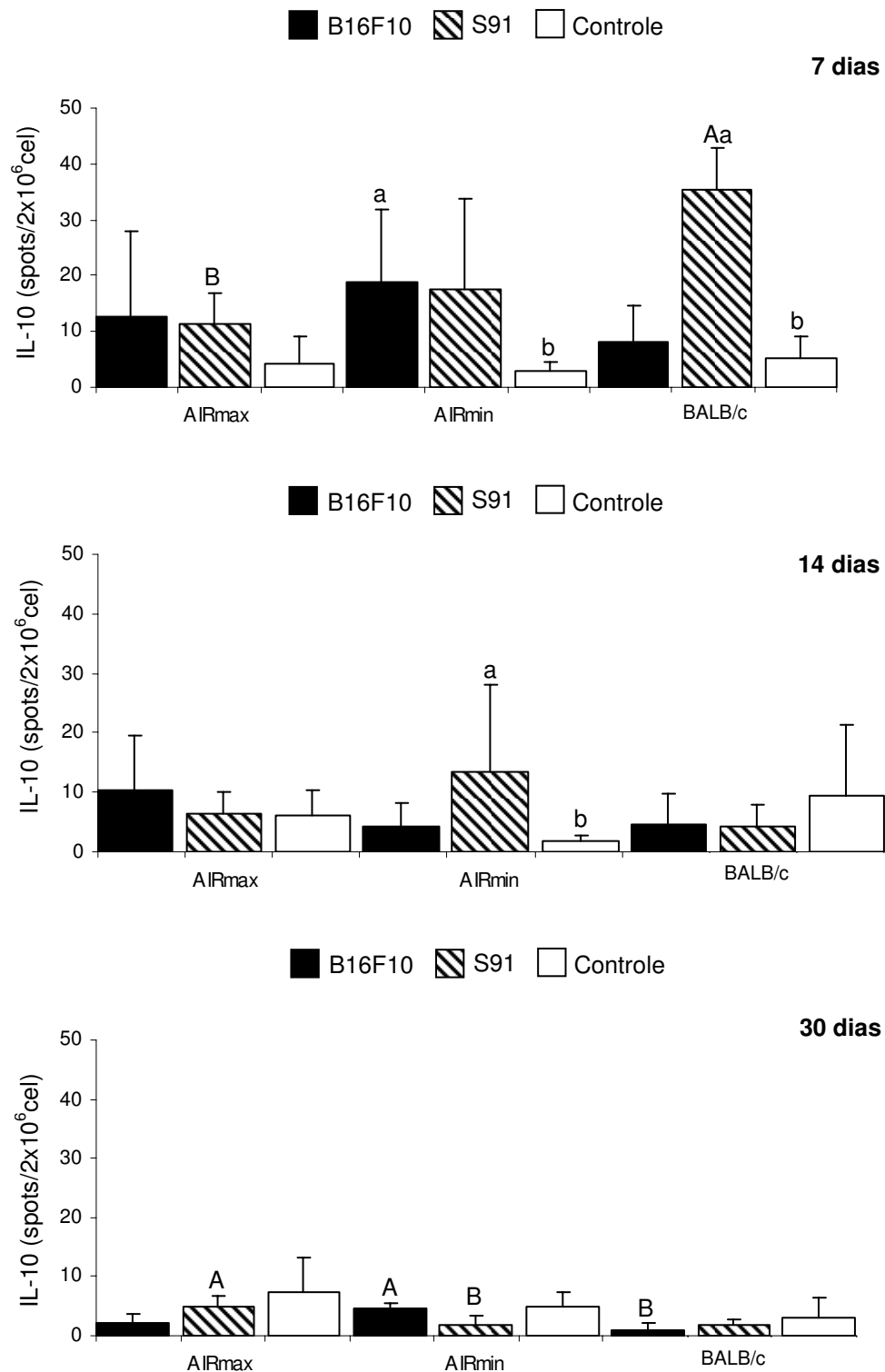


Figura 6. Quantificação do número de células esplênicas produtoras de IL-10 pela técnica do ELISpot. Os valores estão expressos como média spots/2x10⁶cel ± SD (n=10). As letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos em cada linhagem (a>b, p<0,05). As letras maiúsculas representam diferenças entre as linhagens, de acordo com o tratamento (A>B, p<0,05).

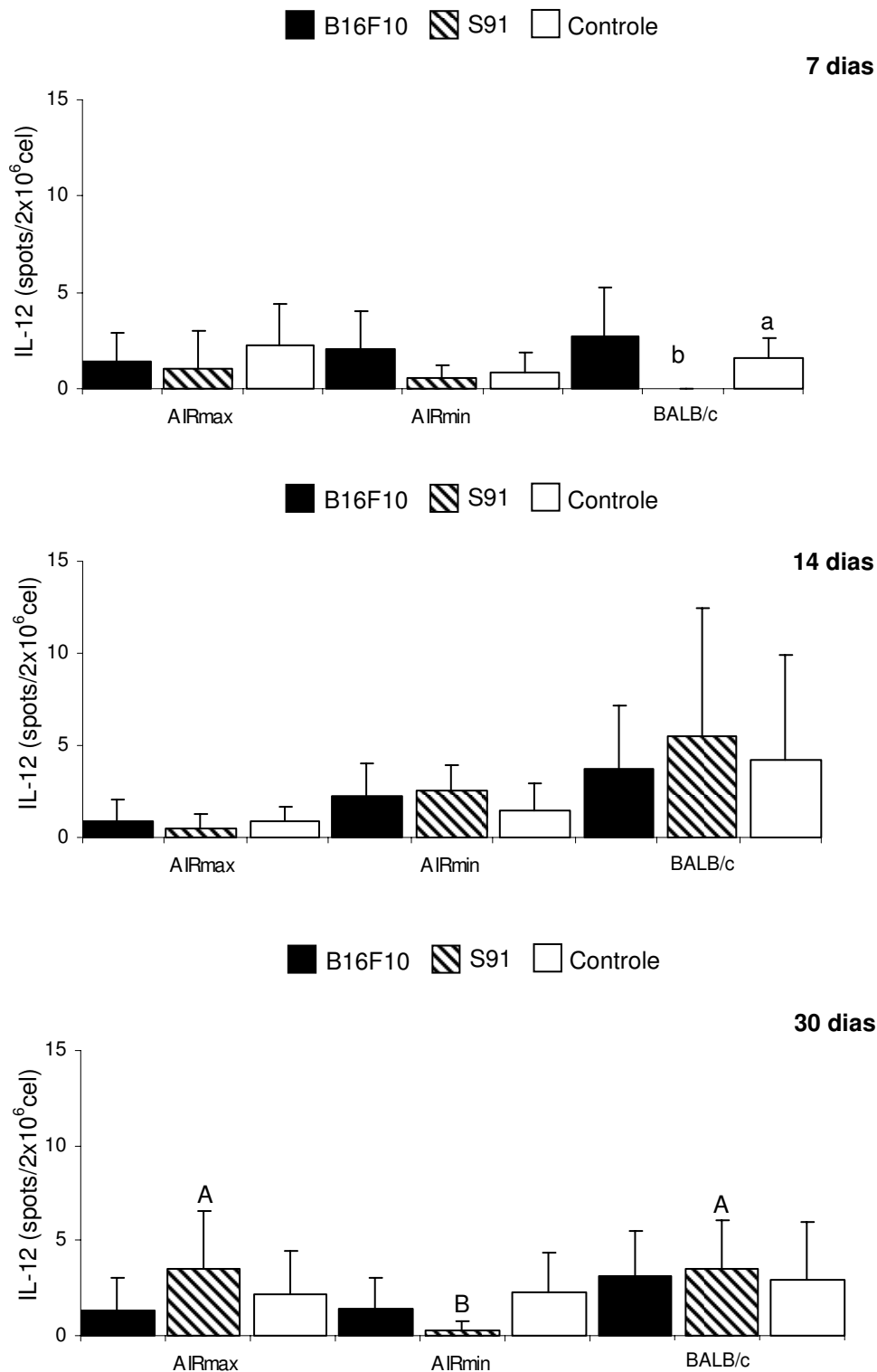


Figura 7. Quantificação do número de células esplênicas produtoras de IL-12 pela técnica do ELISpot. Os valores estão expressos como média spots/2x10⁶cel $\pm$ SD (n=12). As letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos em cada linhagem (a>b, p<0,05). As letras maiúsculas representam diferenças entre as linhagens, de acordo com o tratamento (A>B, p<0,05).

2.4. Quantificação de células CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD25⁺, CD3⁺/CD49b⁺ e CD49b⁺ em suspensão de células esplênicas

Como pode ser observado na Figura 8, o inóculo de células S91 ou B16F10 induziu aumento de células CD3⁺ no baço dos animais BALB/c, no período mais precoce de avaliação (BALB/c S91 $43,28 \pm 4,22\%$; BALB/c B16F10 $36,52 \pm 4,07\%$; BALB/c Controle $19,90 \pm 5,94\%$), retornando aos níveis de normalidade após 14 e 30 dias. Essa reação ao implante tumoral não foi observada nos animais AIR nos dois períodos iniciais de avaliação e, apenas aos 30 dias pós-implante, os animais AIRmax inoculados com o tumor S91 apresentam redução no número de células esplênicas CD3⁺ (AIRmax B16F10 $30,69 \pm 4,71\%$; AIRmax S91 $18,62 \pm 4,65\%$; AIRmax Controle $32,94 \pm 2,45\%$). Tomados em conjunto, os dados indicam que os animais AIR não apresentam diferenças entre si quanto ao número de células CD3⁺ no baço, diferença somente observada na avaliação aos 14 dias (AIRmax Controle $39,55 \pm 5,46\%$; AIRmin Controle $25,89 \pm 4,28\%$).

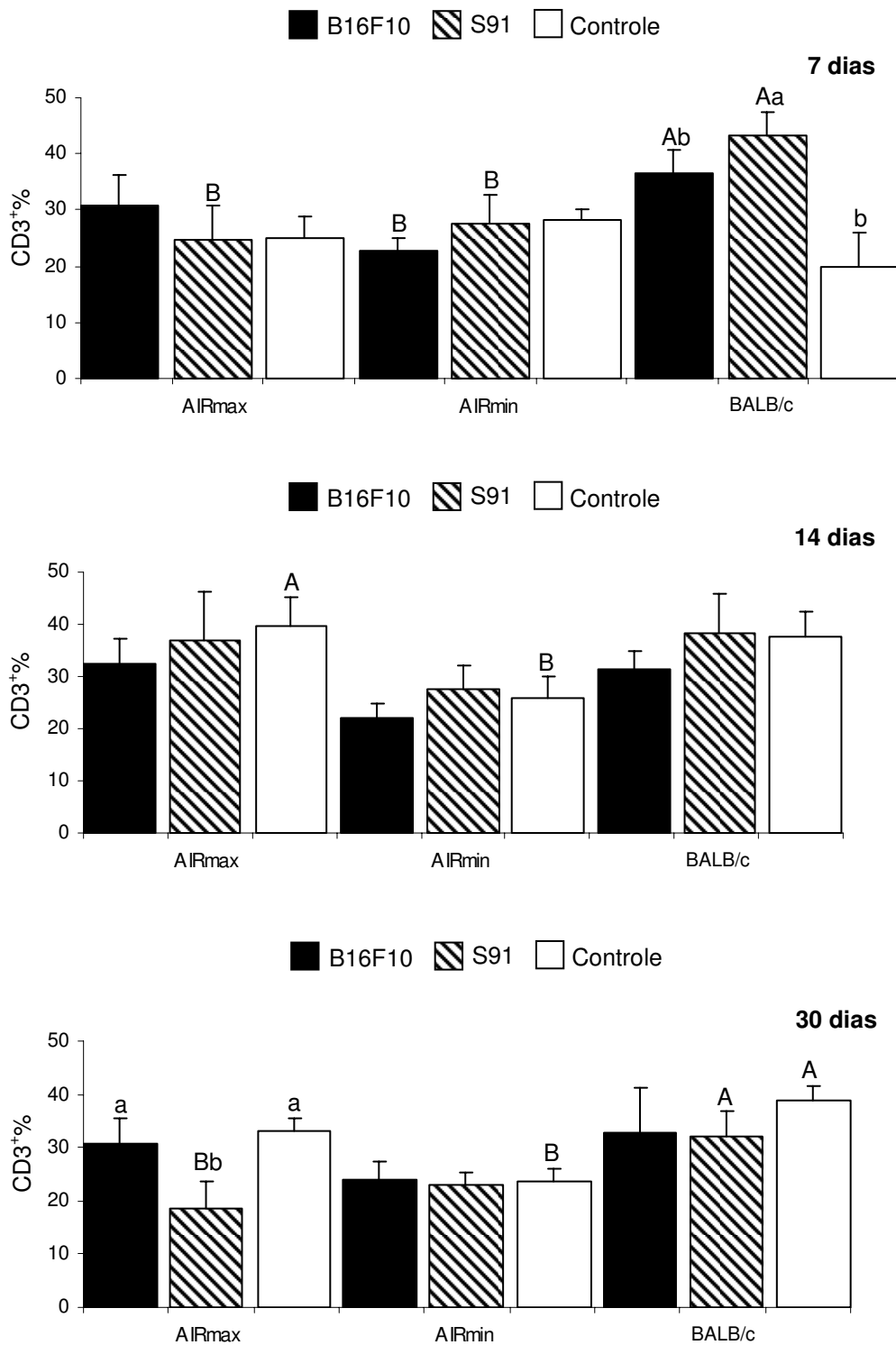


Figura 8. Número relativo de células CD3⁺ esplênicas de animais da linhagem AIR e BALB/c (n=8) avaliados por FACS. Os valores estão expressos em média% $\pm$ SD da população específica. As letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos em cada linhagem (a>b, p<0,05). As letras maiúsculas representam diferenças entre as linhagens, de acordo com o tratamento (A>B, p<0,05).

Na Figura 9, apresentamos os valores da quantificação das células CD4⁺ no baço dos animais da linhagem AIR e BALB/c. Aos 7 dias, observamos que a presença dos melanomas, B16F10 ou S91, resultaram em valores elevados de células T CD4⁺ nos animais da linhagem BALB/c, em relação aos animais da linhagem AIR (AIRmax B16F10 20,60 ± 4,39; AIRmax S91 15,76 ± 0,87; AIRmin B16F10 14,41 ± 0,90; AIRmin S91 17,16 ± 2,91; BALB/c B16F10 25,58 ± 1,96; BALB/c S91 26,60 ± 2,83). Aos 14 dias, observamos que os animais da linhagem BALB/c apresentaram valores mais elevados de CD4⁺ que os animais da linhagem AIRmin para os grupos controle (AIRmin Controle 16,76 ± 4,48%; BALB/c Controle 27,12 ± 3,07%) e portadores do melanoma S91 (AIRmin S91 18,23 ± 3,58%; BALB/c S91 28,41 ± 4,77%). Aos 30 dias, observamos que o grupo AIRmax S91 (12,00 ± 2,97%) apresentou uma diminuição do número de células CD4⁺ em comparação aos grupos AIRmax B16F10 (19,65 ± 1,56%), AIRmax Controle (22,07 ± 4,47%) e BALB/c S91 (23,74 ± 2,63%). Observamos também que o grupo controle da linhagem BALB/c apresentou valores mais elevados de células CD4⁺ que os animais dos grupos controle da linhagem AIR (AIRmax Controle 22,07 ± 4,47%; AIRmin Controle 16,82 ± 1,70%) e BALB/c S91 (23,74 ± 2,63%). Com relação ao melanoma S91, observamos que sua presença resulta em diferenças quanto ao número de células CD4⁺ entre as linhagens AIRmin e BALB/c (AIRmin S91 15,18 ± 1,27%; Balb/c S91 23,74 ± 2,63%). Acompanhando o perfil de células CD3⁺, não foram observadas diferenças entre os animais AIRmax e AIRmin, independentemente do tumor inoculado.

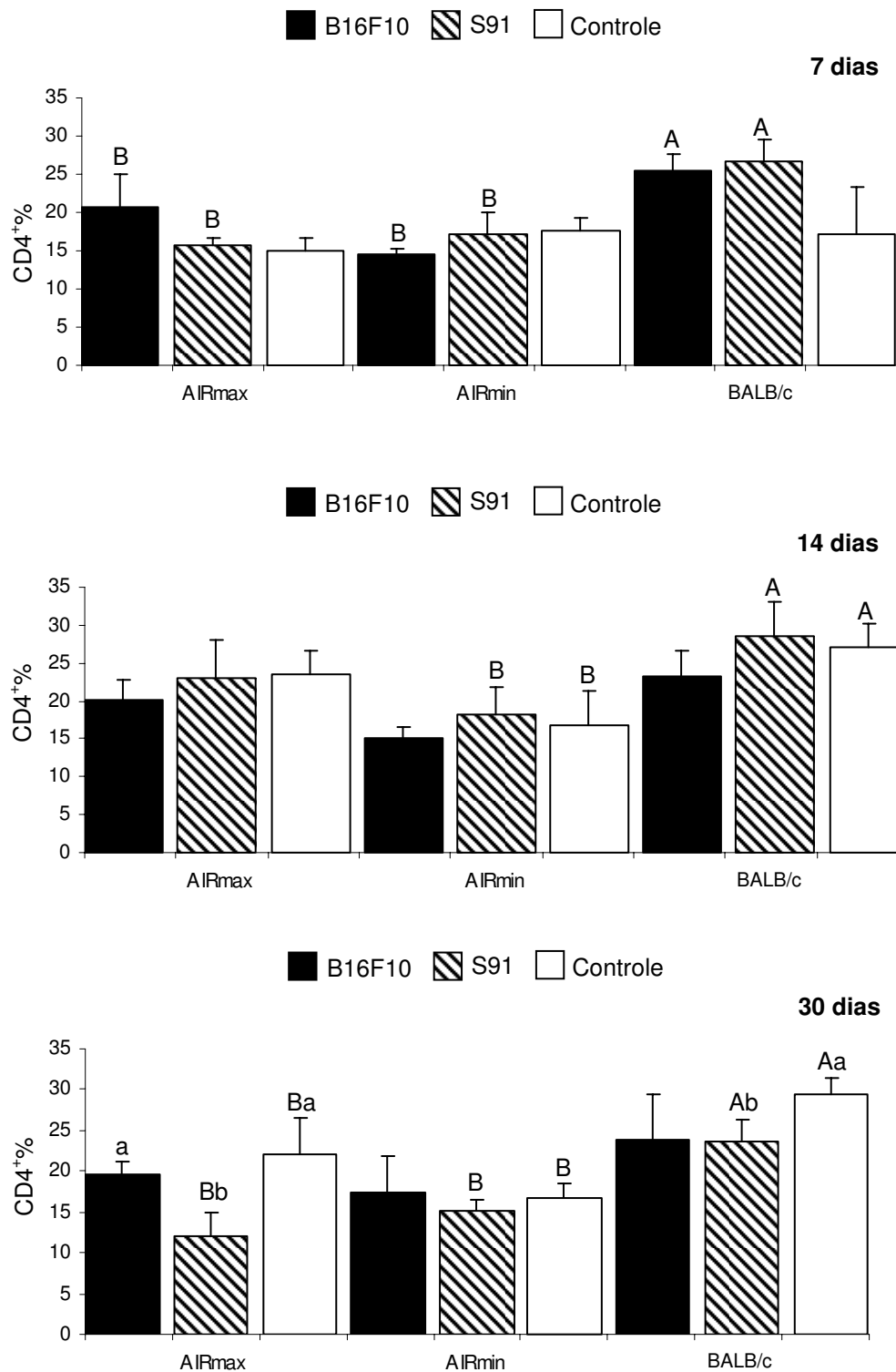


Figura 9. Número relativo de células CD4⁺ esplênicas de animais da linhagem AIR e BALB/c (n=8) avaliados por FACS. Os valores estão expressos em média% $\pm$ SD da população específica. As letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos em cada linhagem (a>b, p<0,05). As letras maiúsculas representam diferenças entre as linhagens, de acordo com o tratamento (A>B, p<0,05).

Na Figura 10, observamos que, no período mais precoce da avaliação, as células CD8⁺ também mostram-se elevadas no baço dos animais BALB/c inoculados com S91 (BALB/c S91 $16,51 \pm 3,01$; BALB/c Controle $9,91 \pm 4,45$) com normalização aos 14 e 30 dias. Os animais do grupo controle da linhagem AIRmax e BALB/c também apresentaram diferenças significativas quanto ao número de células CD8⁺ (AIRmax Controle $16,20 \pm 3,20$; BALB/c Controle $9,91 \pm 4,45$). Chama a atenção o menor número relativo de células CD8⁺ nos animais AIRmin aos 14 dias de avaliação (AIRmin B16F10 $6,72 \pm 1,17\%$; AIRmin S91 $8,07 \pm 0,90\%$; AIRmin Controle $9,04 \pm 2,24\%$).

A quantificação de células T_{reg} CD4⁺/CD25⁺ (Figura 11) mostrou que, aos 7 dias, a implantação do melanoma B16F10 nos animais AIRmax resultou no aumento da população de células TCD4⁺/CD25⁺ em relação aos animais AIRmin e BALB/c (AIRmax B16F10 $3,92 \pm 0,58$; AIRmin B16F10 $2,89 \pm 0,57$; BALB/c B16F10 $2,79 \pm 0,43$). A presença do melanoma S91, entretanto, resulta na inversão deste perfil com os animais AIRmax S91 apresentando valores inferiores aos observados nos animais AIRmin e BALB/c (AIRmax S91 $1,48 \pm 0,21$; AIRmin S91 $2,94 \pm 0,66$; BALB/c S91 $2,77 \pm 0,50$). Aos 14 dias, observamos que as linhagens AIRmax e AIRmin diferem entre si na presença do melanoma B16F10 (AIRmax B16F10 $2,64 \pm 1,14\%$; AIRmin B16F10 $0,87 \pm 0,38\%$), observando-se também pequena diferença entre os controles de AIRmin e BALB (AIRmin Controle $1,38 \pm 0,86\%$; BALB/c Controle $2,70 \pm 0,92\%$). Aos 30 dias, observamos que os animais do grupo controle da linhagem AIRmax ($2,51 \pm 0,76\%$) apresentam

maior número de CD4⁺/CD25⁺ que os animais do grupo Balb/c Controle ($0,91 \pm 0,40\%$).

A quantificação de células NKT através da dupla marcação com anticorpos anti-CD3 e anti-CD49b (Figura 12) indicou que aos 7 dias os animais do grupo controle da linhagem BALB/c apresentaram maior quantidade de células CD3⁺/CD49⁺ que os animais da linhagem AIR (AIRmax Controle $2,02 \pm 0,56\%$; AIRmin Controle $1,77 \pm 0,26\%$; BALB/c Controle $5,16 \pm 2,24\%$). Animais BALB/c portadores de tumor também apresentaram redução no número de células NKT (BALB/c B16F10 $2,81 \pm 2,46\%$; BALB/c S91 $1,44 \pm 0,36\%$). Aos 14 dias, observamos que não houve diferença quanto ao número de células CD3⁺/CD49⁺ esplênicas entre as linhagens ou presença de tumor. No entanto, aos 30 dias, observamos que tanto os grupos S91 quanto os grupos controles dos animais da linhagem BALB/c (BALB/c S91 $3,83 \pm 0,70\%$; BALB/c Controle $3,03 \pm 1,25\%$) apresentaram valores elevados de células CD3⁺/CD49⁺ em comparação aos animais da linhagem AIR (AIRmax S91 $1,39 \pm 0,88\%$; AIRmax Controle $1,34 \pm 0,19\%$; AIRmin S91 $1,26 \pm 0,21\%$; AIRmin Controle $1,30 \pm 0,47\%$).

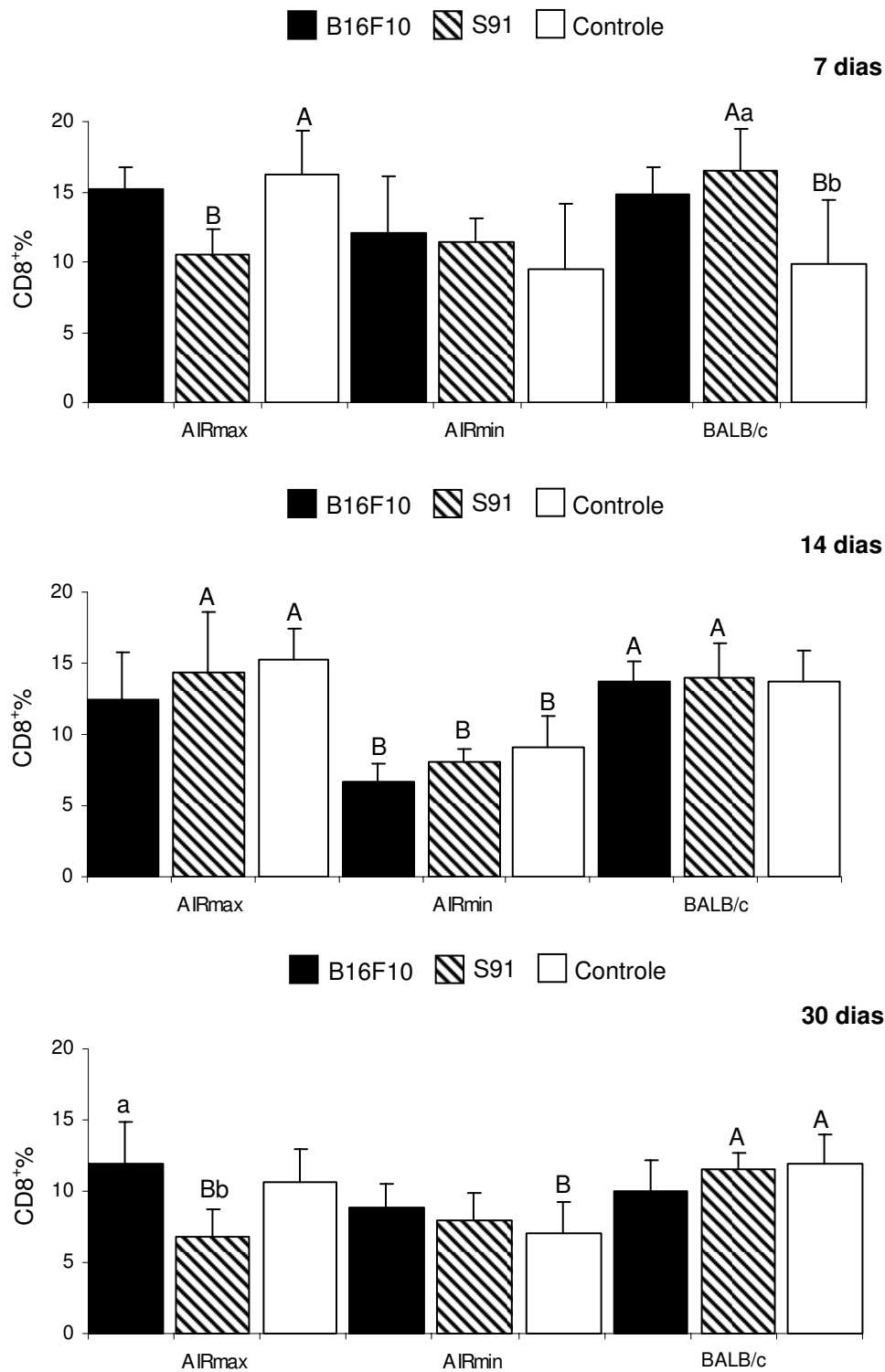


Figura 10. Número relativo de células CD8⁺ esplênicas de animais da linhagem AIR e BALB/c (n=8) avaliados por FACS. Os valores estão expressos em média% $\pm$ SD da população específica. As letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos em cada linhagem (a>b, p<0,05). As letras maiúsculas representam diferenças entre as linhagens, de acordo com o tratamento (A>B, p<0,05).

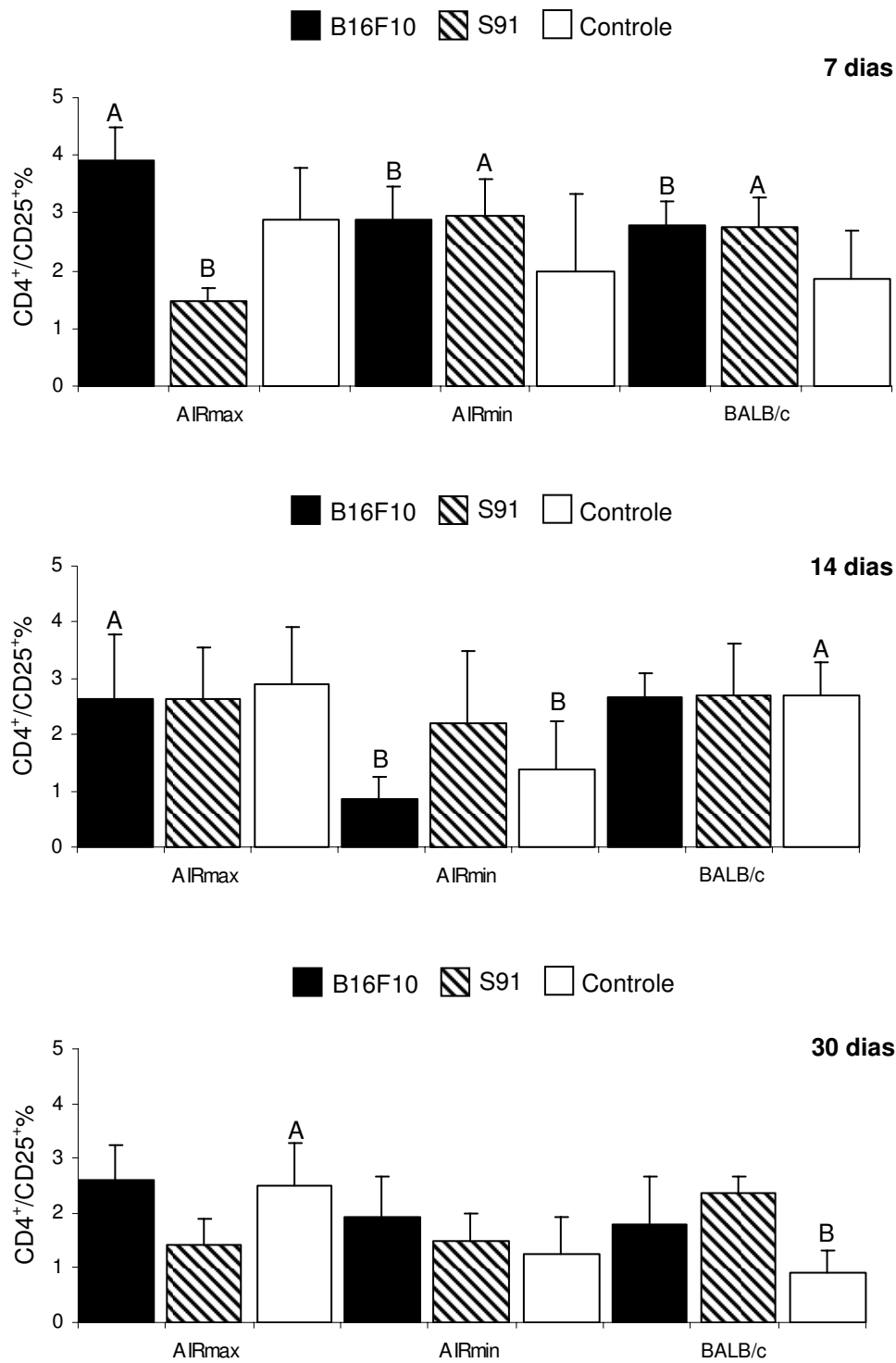


Figura 11. Número relativo de células CD4⁺/CD25⁺ esplênicas de animais da linhagem AIR e BALB/c (n=8) avaliados por FACS. Os valores estão expressos em média% ± SD da população específica. As letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos em cada linhagem (a>b, p<0,05). As letras maiúsculas representam diferenças entre as linhagens, de acordo com o tratamento (A>B, p<0,05).

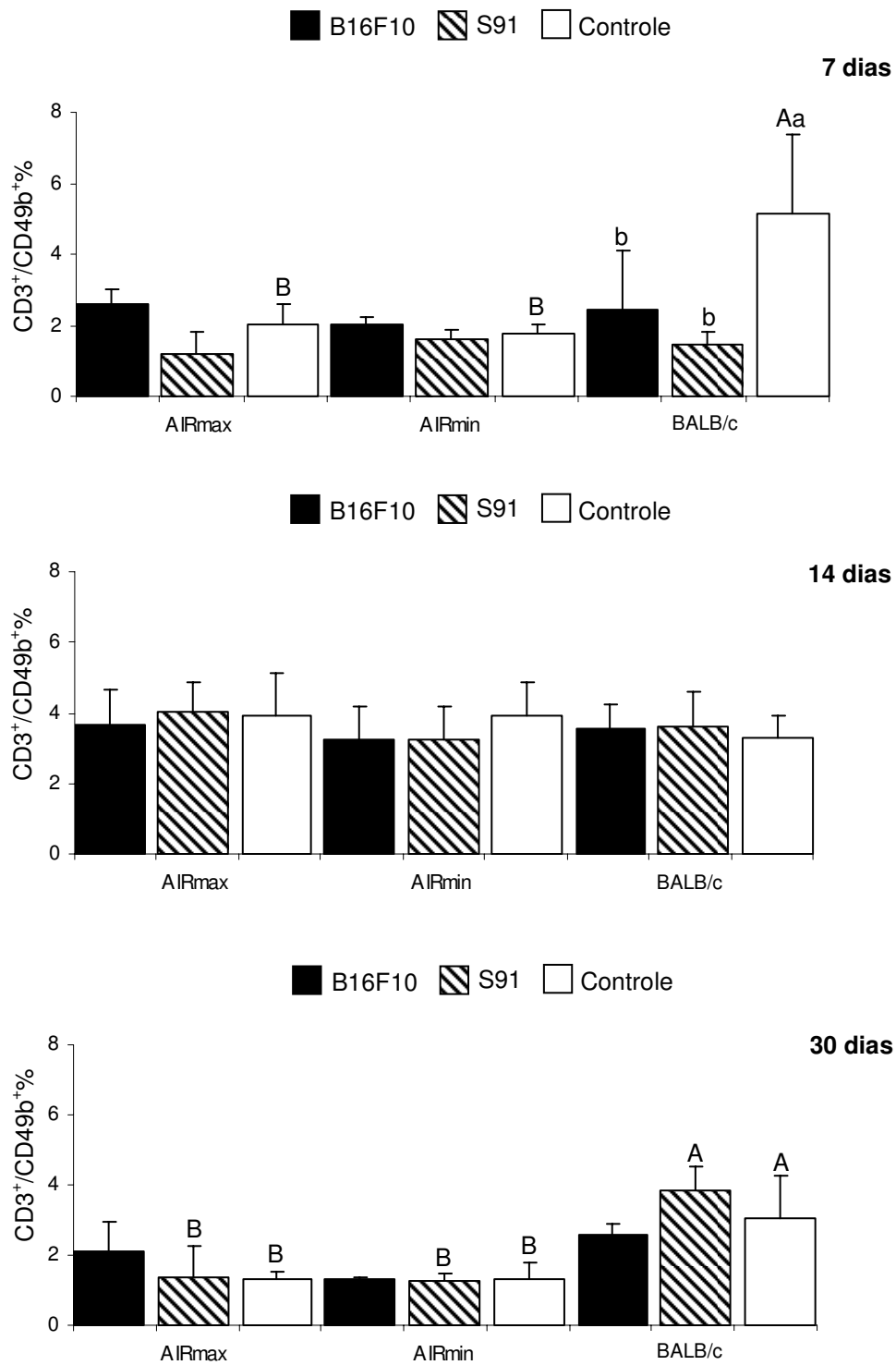


Figura 12. Número relativo de células CD3⁺/CD49b⁺ esplênicas de animais da linhagem AIR e BALB/c (n=9) avaliados por FACS. Os valores estão expressos em média% ± SD da população específica. As letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos em cada linhagem (a>b, p<0,05). As letras maiúsculas representam diferenças entre as linhagens, de acordo com o tratamento (A>B, p<0,05).

Na Figura 13, podemos observar que, aos 7 dias, os animais do grupo controle das linhagens AIR apresentaram valores elevados de células CD49b⁺ em relação aos animais do mesmo grupo da linhagem BALB/c (AIRmax Controle 6,01 ± 1,14%; AIRmin Controle 6,30 ± 1,90%; BALB/c Controle 2,98 ± 1,46%). Na presença do melanoma, observamos que animais AIRmax e BALB/c apresentaram diferenças significativas após o inóculo com B16F10 (AIRmax B16F10 6,29 ± 0,84%; BALB/c B16F10 3,76 ± 1,90%). Aos 14 dias, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos e aos 30 dias, observamos que a presença do melanoma B16F10 resultou em maior número de células CD49b⁺ nos animais da linhagem AIRmax, em comparação a linhagem BALB/c (AIRmax B16F10 4,86 ± 0,65%; BALB/c B16F10 2,34 ± 0,57%).

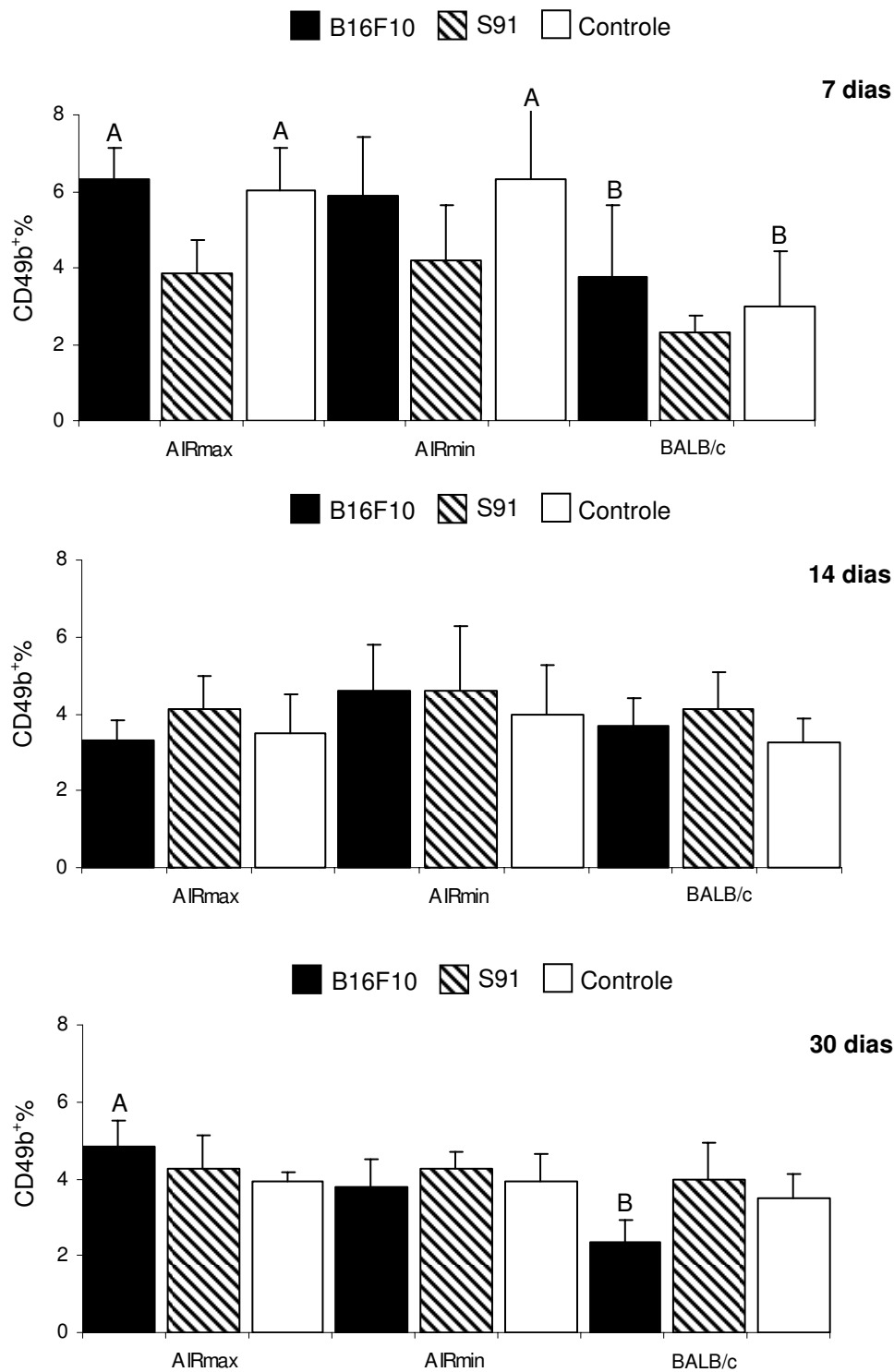


Figura 13. Número relativo de células CD49b⁺ esplênicas de animais da linhagem AIR e BALB/c (n=9) avaliados por FACS. Os valores estão expressos em média% $\pm$ SD da população específica. As letras minúsculas representam diferenças entre os tratamentos em cada linhagem (a>b, p<0,05). As letras maiúsculas representam diferenças entre as linhagens, de acordo com o tratamento (A>B, p<0,05).

3. Discussão

Os animais da linhagem AIR têm se mostrado como modelo murino bastante útil para o estudo da participação do processo inflamatório na tumorigênese e no desenvolvimento de doenças autoimunes e infecciosas [2-5, 8-11]. Estudos prévios demonstram que os animais da linhagem AIRmax apresentam resistência ao desenvolvimento de tumores de pele e pulmão quimicamente induzidos [8-11], bem como ao desenvolvimento de metástases de melanomas transplantáveis [5]. Com o objetivo de compreender a influência do processo inflamatório agudo no desenvolvimento de tumores, o presente estudo avaliou a participação das células NK, T_{reg} e NKT na resposta imune dos animais AIR durante o desenvolvimento do melanoma B16F10 e S91.

De maneira geral, a presença dos melanomas parece ter sido capaz de modular a resposta imune sistêmica dos animais AIR e BALB/c, em relação aos controles, principalmente através da produção de algumas citocinas como IL-2, IL-6, TNF- α e IFN- γ e também por alterações de algumas subpopulações celulares como as células CD3⁺ e CD8⁺. Observamos ainda que, o melanoma murino S91 parece ser mais imunogênico, induzindo alterações mais intensas na produção de citocinas que as observadas nos animais inoculados com melanoma B16F10. De fato, estudos demonstram que os melanomas são capazes de ativar a resposta imune do hospedeiro através da indução de uma resposta imune específica contra seus TAAs (gp100, gp75, MART-1 e tironisinas) [17, 19] e pela produção de fatores de crescimento e imunoregulatórios como fator básico de crescimento de

fibroblasto (bFGF), fator de crescimento e transformação alfa a beta (TGF- α e TGF-b), IL-8 e IL-10 [19-21].

Neste estudo, utilizamos duas linhagens de melanomas murino transplantáveis, a B16F10 e S91. A linhagem S91 (H-2^d) é originária dos animais DBA/2, enquanto que a linhagem B16F10 (H-2^b) é derivada de tumores malignos espontâneos de animais C57BL/6 [5, 22]. A linhagem B16F10 apresenta muitas características que correspondem às metástases humanas e, por este motivo, é muito utilizada em modelos experimentais de imunoterapia do câncer [23]. A seleção destas linhagens foi baseada nos haplótipos H-2, uma vez que os animais AIRmax são predominantemente H-2^b, enquanto que os AIRmin são H-2^d [5]. Entretanto, diferentemente do observado por Maria et al. [5], as linhagens AIR apresentaram alta frequência de desenvolvimento de tumores primários quando transplantados com células B16F10 ou S91 e total ausência de metástases no pulmão, fígado e rins. É possível que essas diferenças se devam a características da própria linhagem AIR, visto que no presente trabalho foram utilizados animais da 43^a a 45^a geração, enquanto que nos estudos de Maria et al. foram utilizados animais da 24^a a 26^a geração. Visto tratar-se de animais não isogênicos, apesar do processo seletivo para o carácter escolhido, é possível sugerir que alguns dos genes segregados em associação com os genes de inflamação aguda tenham sido perdidos ao longo dos cruzamentos. Outra possibilidade para explicar tal diferença é que a manutenção das linhagens de melanoma em cultura pode favorecer a seleção de variantes com baixa imunogenicidade. Esta visão é reforçada pelo fato de que animais BALB/c (H-2^d) foram suscetíveis às 2 linhagens

tumorais (H-2^d e H-2^b). Assim, seria interessante investigar se as linhagens usadas apresentam alteração na expressão das moléculas de histocompatibilidade.

Com relação às linhagens AIR, observamos que os animais AIRmax apresentam maior incidência do melanoma B16F10 que os animais AIRmin, associado ao aumento da população de células TCD4⁺/CD25⁺. As células TCD4⁺/CD25⁺ podem representar duas populações de linfócitos: células TCD4⁺ ativadas (Th ativados) ou células T_{REG} [24]. Apesar de não termos detectado diferenças quanto à produção de citocinas entre os animais AIR inoculados com B16F10, é possível que o número elevado de células TCD4⁺/CD25⁺ nos animais AIRmax represente alterações da população de T_{REG} que, conseqüentemente, pode ser responsável pela limitação do desenvolvimento de uma resposta imune antitumoral eficiente.

As células T_{reg} são uma subpopulação de linfócitos T responsáveis pela manutenção da tolerância periférica, bem como pela supressão da resposta imune contra antígenos não próprios [25]. Além da expressão de CD4 e CD25, estas células expressam constitutivamente altos níveis de receptor de TNF induzido por glicocorticóide (GITR) e antígeno 4 associado aos linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) [24, 26]. Os mecanismos de supressão das células T_{reg} parecem envolver a competição pela IL-2, uma vez que as células T_{reg} expressam receptores de alta afinidade para esta citocina, contato célula-célula, através da interação do CTLA-4 com as moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 nas células T ou APCs, e produção de citocinas supressivas como a IL-10 e o TGF-β [27]. Além disso, a presença destes fatores supressores (TGF-β e IL-10) pode favorecer a formação de células

T_{reg} diretamente, a partir da diferenciação de células $TCR4^+/CD25^-$ em células $TCR25^+$, ou indiretamente, por interferir na diferenciação e função das células dendríticas locais, resultando em células dendríticas com capacidade de estimular a diferenciação das T_{reg} [26].

A incidência do tumor primário S91 também foi mais elevada nos animais AIRmax e, para nossa surpresa, observamos que estes animais apresentaram diminuição do número de células $TCR4^+/CD25^+$ e de células produtoras de $IFN-\gamma$ e aumento na população de células $TCR8^+$ e de células produtoras de IL-10 e IL-12. À primeira vista esses resultados parecem contraditórios, visto que uma redução de células T_{reg} , deveria resultar em aumento de células $IFN-\gamma^+$ e diminuição de células $IL-10^+$. Assim, visto que não fizemos a análise da expressão de Foxp3, é possível que essas células $CD4^+/CD25^+$ representem células T ativadas, cuja redução induzida por S91, resulta em menor número de células $IFN-\gamma^+$ e aumento de células $IL-10^+$. Outro ponto contraditório é o aumento concomitante de células produtoras de IL-10 e de IL-12. Ainda que populações diferentes de células possam estar produzindo tais citocinas, esperaríamos um efeito antagônico entre estas.

Em estudos anteriores do nosso grupo, observamos que os animais AIRmax normais apresentam maior atividade citotóxica, associada ao maior número de células NK e $TCR3^+/CD8^+$ e à produção de IL-12p40, $TNF-\alpha$ e $IFN-\gamma$, que os animais AIRmin [6]. Entretanto, no presente trabalho observamos que os animais AIRmax não foram capazes de manter a produção destas citocinas e a atividade citotóxica quando desafiados com os

melanomas. É importante observar também que a produção de IFN- γ pode estar associada à proteção ou suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças [2-4, 11, 28]. Nos modelos de infecção por *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes*, a resistência dos animais AIRmax está associada a produção de IL-6 e IFN- γ [3], enquanto que, no modelo de artrite induzida por pristane e no modelo de carcinogênese de colon, a produção de IL-6, IFN- γ e TNF- α está relacionada a suscetibilidade dos animais AIRmax ao desenvolvimento destas doenças [4, 11].

No presente trabalho, os animais BALB/c foram utilizados como controle do perfil da resposta, uma vez que esta linhagem participou da formação da população F₀ que originou os animais AIR [1]. De acordo com os resultados obtidos nos grupos controles, observamos que a linhagem BALB/c apresenta números elevados de células NKT e uma diminuição da população de células NK em relação às linhagens AIR. Além disso, os animais BALB/c apresentam aumento das células produtoras de IFN- γ e IL-2, em relação aos animais da linhagem AIRmax e AIRmin, respectivamente.

A IL-2 é o principal fator de crescimento de célula T e está associado à ativação de células TCD8⁺ e células NK [18]. Embora com sucesso limitado, imunoterapias contra o câncer baseadas nas ações da IL-2 já foram propostas há décadas, nas quais células isoladas do sangue periférico (NK) ou TILs (linfócitos TCD8⁺ específicos para TAAs) são expandidas e ativadas através do tratamento *in vitro* com IL-2 e reinfundidas no paciente para destruição do tumor [24,29]. De maneira geral, as alterações no número de células produtoras de IL-2 foram acompanhadas de alterações nas

subpopulações de linfócitos TCD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺, corroborando com a ação proliferativa desta citocina.

As células NKT são uma subpopulação de linfócitos T que co-expressam receptores típicos da linhagem de células NK [30]. Estudos anteriores demonstram a importância das células NKT na imunorregulação e prevenção de doenças autoimunes e na rejeição tumoral [31]. As células NKT são responsáveis pela ligação da resposta imune inata à específica através da secreção de citocinas imunorreguladoras como IL-4, IL10, IL-13 e IFN- γ [31]. Kawamura et al. [32] demonstraram que o efeito antitumoral da IL-12 pode ser mediado pela ação conjunta das células NKT e NK, uma vez que as células NKT expressam constitutivamente altos níveis de receptores para IL-12 e, dessa forma, são mais sensíveis às baixas concentrações desta citocina [31]. Assim, baixos níveis de IL-12 seriam suficientes para estimular as células NKT, favorecendo a produção de IFN- γ por estas células e resultando na ativação das células NK, TCD8⁺ e macrófagos [30,31]. Além disso, de acordo com as características do microambiente tumoral, as células NKT podem inibir a resposta imune tumoral através da secreção de IL-4 e IL-13 [31]. As células NK são um dos mediadores da resposta imune inata, responsáveis pela defesa do hospedeiro contra doenças infecciosas e neoplasias [32]. Estas células são capazes de destruir seus alvos espontaneamente, sem necessidade de estimulação prévia e de modo independente do MHC de classe I [33, 34], exercem ação microbicida e são responsáveis pela ativação de outras células do sistema imune [32-34]. Assim, as diferenças observadas entre os animais AIR e BALB/c quanto a população de células NK e NKT pode refletir diferenças quanto ao

desenvolvimento de uma resposta imune eficiente, uma vez que as células NKT são importantes para o estímulo inicial da resposta imune.

Com relação ao desenvolvimento dos melanomas entre a linhagem parental BALB/c e a linhagem AIRmax, observamos que, inicialmente (7 e 14 dias), os animais BALB/c parecem controlar melhor o desenvolvimento do melanoma B16F10 com aumento da população de células TCD4⁺ e de células produtoras de IL-2, associada a diminuição de células TCD4⁺/CD25⁺. No entanto, aos 30 dias, observamos aumento da incidência tumoral nos animais BALB/c, acompanhado da diminuição da população de células NK, apesar de apresentar aumento da atividade citotóxica. Neste caso, é possível sugerir que a diminuição das células NK parece não ter sido compensada pelo aumento da função citotóxica nestes animais, o que resultou no favorecimento do desenvolvimento tumoral. Com relação ao melanoma S91, apesar de não existir diferenças quanto ao seu desenvolvimento nos animais AIRmax e BALB/c, observamos que os animais BALB/c parecem responder de forma mais intensa ao estímulo, uma vez que estes animais foram capazes de produzir IL-2, TNF- α , IFN- γ , associado ao aumento das populações de linfócitos TCD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ e NKT.

Da mesma forma, observamos que os animais BALB/c, apesar de apresentarem incidência tumoral mais elevada (aos 14 e 30 dias para o B16F10 e aos 30 dias para o melanoma S91) que os animais AIRmin, parecem ser capazes de reconhecer o tumor e iniciar uma resposta imune com produção de IL-2 e IL-12 e aumento das populações de CD3⁺, CD4⁺ e

CD8⁺, no entanto, falham em desenvolver uma resposta imune antitumoral eficiente.

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que o melanoma S91 parece ser mais imunogênico que a linhagem B16F10, resultando em alterações mais pronunciadas quanto à produção de citocinas e quanto ao número de linfócitos. Além disso, diferente do esperado, a linhagem AIRmax parece ser mais sensível ao desenvolvimento tumoral que os animais da linhagem AIRmin e esta suscetibilidade parece ser decorrente do aumento da população de células T_{REG} (CD4⁺/CD25⁺). Em contrapartida, os animais AIRmin foram mais resistentes ao desenvolvimento dos melanomas. Neste caso, vale resaltar que a baixa incidência do melanoma B16F10 nos animais AIRmin pode ter sido influenciada pela compatibilidade MHC, enquanto que para o melanoma S91, a resistência deve ser decorrente da resposta imune do animal, uma vez que a linhagem S91 apresenta o mesmo haplótipo H-2 que os AIRmin. A diminuição do desenvolvimento do melanoma S91 nos AIRmin foi acompanhada pelo aumento das células CD4⁺/CD25⁺ e de células produtoras de IFN- γ e diminuição da produção de IL-10. Neste caso, é possível que as células CD4⁺/CD25⁺ representem uma população de células Th do tipo 1 ativadas e produtoras de IFN- γ e, conseqüentemente, a ativação da resposta imune celular pode ser responsável pela diminuição do crescimento tumoral.

Comparando os resultados obtidos no presente trabalho com os resultados anteriores das linhagens AIR é possível sugerir que, apesar dos animais AIR terem atingido a seleção limite para a característica da intensidade da resposta inflamatória, o mesmo pode não ter acontecido para

os demais genes que compõem o genoma dos animais e dessa forma, as alterações observadas nesta geração podem ser resultantes da perda de alelos importantes para o desenvolvimento da resposta imune como produção de citocinas e fatores angiogênicos. Neste sentido, parece interessante iniciar uma nova seleção a partir da população fundadora F0 com o objetivo de avaliar a atividade natural killer, a produção de citocinas e as subpopulações celulares nas gerações iniciais.

4. Material e Métodos

4.1. Delineamento Experimental

Os camundongos das linhagens AIRmax e AIRmin foram divididos em grupos de 8 animais e inoculados subcutâneamente com 5×10^4 células de melanoma B16F10 ou S91 no flanco direito. Os grupos controles foram formados por animais normais, tratados apenas com salina. Aos 7, 14 ou 30 dias após a implantação das células tumorais, os animais foram sacrificados para avaliação dos parâmetros imunológicos. Pulmão, fígado e rins também foram retirados para avaliação macroscópica quanto à ocorrência de metástases. Uma terceira linhagem de camundongos, BALB/c, foi utilizada como controle do perfil de resposta, sendo submetida ao mesmo protocolo citado.

4.2. Animais

Os animais das seleções AIRmax e AIRmin, obtidos do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan – São Paulo, foram mantidos em caixas

de polipropileno, com ração e água *ad libitum* em ambiente com ciclo de claro/escuro de 12/12 horas e temperatura controlada de $22^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C. Os grupos foram constituídos de 8 animais machos da 43^a - 45^a geração e com 8-12 semanas de idade. No momento do sacrifício os animais foram anestesiados com 0,1 ml de pentobarbital sódico a 4% para obtenção do sangue total por punção cardíaca e retirada do baço, fígado, pulmão e rins. Os animais da linhagem BALB/c foram provenientes do CEMIB – UNICAMP – Campinas/SP e mantidos nas mesmas condições citadas anteriormente. Todos os experimentos envolvendo os animais seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (Protocolo nº 440).

4.3. Cultura de células dos melanomas murino B16F10 e S91

As células de melanoma murino B16F10 foram obtidas comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro e as células da linhagem S91 foram cedidas pelo Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan – São Paulo.

Alíquotas das células B16F10 e S91 criopreservadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas em banho-maria à 37°C. Rapidamente as células foram transferidas para tubo estéril com 10ml de meio DMEM (Cultilab, Campinas – SP, Brasil) com 25 mM HEPES (Sigma – Aldrich, St. Louis – MO, USA) e 50% de soro fetal bovino (SBF) (Cultilab, Campinas – SP, Brasil) e lavadas duas vezes por centrifugação durante 10 minutos à 1500rpm. A viabilidade das células foi avaliada através de exclusão por Azul

Tripan, considerando-se um mínimo de 70% de células vivas para uso. Posteriormente, as células foram cultivadas à 37°C e sob tensão de 5% CO₂, até completar a monocamada de células. Para o preparo do inóculo, a monocamada de células em cultura foi descolada com tripsina (Nutricell, Campinas – SP, Brasil), lavada por centrifugação, ressuspensa em DMEM e sua concentração ajustada para 5x10⁵ cel/ml. Os animais foram inoculados subcutaneamente com 0,1 ml da suspensão de células B16F10 ou S91.

4.4. Suspensão de células alvo Yac.1

Alíquotas das células Yac.1 criopreservadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas em banho-maria à 37°C. As células foram rapidamente transferidas para tubo estéril com 10ml de meio RPMI 1690 (Cultilab, Campinas – SP, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas – SP, Brasil), 200mM de L-glutamina, 2% de gentamicina e 25nM de HEPES (Sigma – Aldrich, St. Louis – MO, USA) (meio completo) e lavadas duas vezes por centrifugação durante 10 minutos à 1500rpm. A viabilidade das células foi avaliada, considerando-se um mínimo de 70% de células vivas para uso. Posteriormente, as células foram incubadas em estufa à 37°C e 5%CO₂, durante 5 a 7 dias para multiplicação celular. No momento do ensaio, a suspensão de células em cultura foi lavada por centrifugação, ressuspensa em RPMI 1% SBF e sua concentração ajustada para 10⁶ cel/ml. Paralelamente, 50 ul de RPMI 1% SBF foram distribuídos em uma placa de polipropileno de 96 alvéolos de fundo em “U” e, posteriormente, 50 ul da suspensão de células Yac.1 foram adicionados à placa e diluídos sucessivamente na proporção de 1:2. Por

fim, as células efetoras foram adicionadas, seguindo-se o protocolo descrito anteriormente.

4.4.1. Ensaio Colorimétrico para Análise de Atividade Citotóxica

Para avaliação da atividade citotóxica foi utilizado o método colorimétrico não radioativo baseado na medida da atividade da lactato-desidrogenase (*Cytotoxicity Detection Kit*, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Brevemente, esplenócitos dos animais normais foram submetidos à separação de células mononucleares em gradiente de ficoll-hypaque (Sigma-Aldrich, St. Louis – MO, USA) seguido da eliminação das células aderentes por incubação da suspensão em placas de Petri descartáveis por 90 minutos à 37°C. Após este período, as células não-aderentes foram recuperadas por lavagem da placa com meio. Cerca de 50 µl da suspensão de células não-aderentes (efetoras), ajustada à concentração de 10^7 cel/ml, foram distribuídas em placa de polipropileno de 96 alvéolos de fundo em “U”. Aos alvéolos foi adicionado igual volume da suspensão de células alvo (Yac.1) à concentração de 10^6 cel/ml. Após 4 horas de incubação à 37°C, sob tensão de 5% de CO₂, cerca de 50 µl do sobrenadante foi cuidadosamente removido de cada alvéolo e transferido para uma placa de polipropileno de fundo plano. Para a determinação da atividade da lactato-desidrogenase de cada sobrenadante, foram adicionados aos alvéolos 50 µl de mistura de reação composta por uma solução catalisadora de diaforase/NAD⁺ e uma solução corante de cloreto de iodotetrazolium e lactato de sódio, seguindo-se incubação por 30 minutos à temperatura

ambiente, em local protegido da luz. Após esse período, as placas de reação foram submetidas à leitura espectrofotométrica em leitora de ELISA à 492 nm (Thermo Electron Corporation, Waltham – MA, USA). A porcentagem de lise específica foi calculada de acordo com a fórmula: Citotoxicidade (%) = [(mistura de células alvo e efetoras – controle das células efetoras) – controle de lise espontânea] / (controle de lise máxima - controle de lise espontânea)] X 100.

4.5. Determinação do número de células produtoras de citocinas pela técnica de ELISPOT

O número de células secretoras de IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α e IFN- γ foi determinado pela reação de ELISA modificada para formação de pontos (ELISPOT). Inicialmente, microplacas (Millipore Corp., Molsheim, France) de 96 poços com fundo de Immulon[®] foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal de captura, diluído em PBS e incubadas *overnight* a 4°C. Após lavagem da placa com a solução de bloqueio (RPMI contendo 10% de soro bovino fetal – RPMI 10%SBF), os sítios livres foram bloqueados com RPMI 10%SBF e incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após este período, a solução de bloqueio foi descartada, seguindo-se a adição de 2×10^6 células esplênicas por alvéolo, em duplicata. As células foram incubadas por 21 horas a 37°C em estufa de 5% CO₂. Após esse período, as placas foram lavadas com água deionizada e PBS 10% SBF e incubadas com o anticorpo monoclonal biotilado correspondente por 2 horas à 37°C. Após novas lavagens, foi adicionado streptavidina-peroxidase diluída em PBS 10%SBF, seguida de incubação

por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS com 0,05% de Tween 20 e reveladas com substrato 3-amino-9-etilcarbazole (AEC Substrate Reagent Set for ELISPOT – BD Biosciences, San Diego – CA, USA). A leitura da reação foi realizada no Analisador de ImmunoSpot (BioSys GmbH) e o número de *spots* foi determinado através do programa Bioreader 3000 Pro (Biosys, Karben, Germany).

4.6. Quantificação de células CD49b⁺, CD3⁺ CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD25⁺ e CD3⁺/CD49b⁺ em suspensão de células esplênicas

A quantificação das populações celulares específicas foi realizada por citometria de fluxo a partir de uma suspensão de células esplênicas marcadas com anticorpos ligados à fluorocromos. Para a quantificação da população de células NK foi utilizada a marcação com CD49b e para as populações de células NKT e T_{REG} foram utilizadas duplas marcações com CD3/CD49b e CD4/CD25, respectivamente.

Uma porção macerada do baço foi utilizada para a obtenção de suspensão de células totais. A concentração foi ajustada para 10⁷ cel/ml e a suspensão distribuída em placa de 96 alvéolos de fundo em “U” (100ul/alvéolo). Inicialmente, a suspensão de células foi incubada com 10ul de soro normal e, posteriormente, com 10ul de anticorpos específicos para os marcadores estudados ou os controles isotípicos. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur Becton Dickinsons Immunocytometry Systems Becton Dickinsons Bioscience, San Jose – CA, USA). As marcações celulares realizadas com os anticorpos marcados com os

fluorocromos FITC, PE e PerCp foram determinadas em FL1, FL2 e FL3, respectivamente. Para cada análise, foi realizada a aquisição de 10.000 eventos e os resultados foram expressos em porcentagem das populações de interesse, em relação à população total.

4.6.1. Anticorpos monoclonais para citometria de fluxo

Para as quantificações dos diversos tipos celulares foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais da BD Pharmingen (San Diego – CA, USA): IgM de rato anti- CD49b/Pan-NK de camundongo marcado com PE, IgG de hamster anti-CD3 ϵ chain de camundongo marcado com PerCp, IgG de rato anti-CD4 (L3T4) de camundongo marcado com FITC, IgG de rato anti-CD8a (Ly-2) de camundongo marcado com PE, IgG de rato anti-CD25 (IL-2 receptor, α chain) de camundongo marcado com PE e os respectivos controles isotípicos.

4.7. Análise estatística

Os dados de células produtoras de citocinas foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do Teste de Dunn para comparações múltiplas, considerando o nível de significância de 5%.

A comparação entre as linhagens e os tratamentos para as avaliações da atividade citotóxica e quantificação das subpopulações celulares foi realizada através da análise em esquema fatorial 3x3, inteiramente casualizado (Software SAS System V8 for Windows), sendo consideradas significativas as diferenças cuja probabilidade de erro foram inferiores a 5% ($p < 0,05$) e para o teste de médias entre os grupos foi utilizado o Teste de

Tukey. Para os dados que não passaram no teste de homogeneidade de variância de Levene, foi realizada a transformação dos dados para log ou raiz quadrada, de acordo com o tipo de relação observada entre médias e desvios-padrão dos grupos. Nos casos nos quais a transformação não foi eficiente na estabilização das variâncias, foi realizado teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Célio Silva do Centro de Pesquisas em Tuberculose da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela leitura das placas de ELISpot. À CAPES pela concessão da bolsa de estudo através do Programa de Pós-Graduação em Patologia. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 05/56204-7) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 401266/2005-2) pela concessão dos recursos financeiros para realização deste trabalho.

Referências

- 1 Ibañez O.M., Stiffel C., Ribeiro O.G., Cabrera W.H., Massa S., De Franco M., Sant'anna A.O., Decreusefond C., Mouton D., Siqueira M. and Biozzi G.** Genetics of nonspecific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. *Eur. J. Immunol* 1992. **22**: 2555-2563.

- 2 **Araujo L.M.M., Ribeiro O.G., Siqueira M., De Franco M., Starobinas N. and Massa S.** Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. *Eur J Immunol.* 1998. **28**: 2913-2920.
- 3 **Borrego A., Peters L.C., Jensen J.R., Ribeiro O.G., Cabrera W.H.K., Starobinas N., Seman M., Ibañez O.M. and De Franco M.** Genetic determinants of acute inflammation regulate *Salmonella* infection and modulate *Slc11a1* gene (formerly *Nramp1*) effects in selected mouse lines. *Microbes and Infection* 2006. **8**: 2766-2771.
- 4 **Vigar N.D., Cabrera W.H., Araujo L.M.N., Ribeiro O.G., Ogata T.R.P., Siqueira M., Ibañez O.M. and De Franco M.** Pristane-induced arthritis in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory reaction. *Eur. J. Immunol* 2000. **30**: 431-437.
- 5 **Maria D.A., Ribeiro O.G., Pizzocaro K.F., De Franco M., Cabrera W.K., Starobinas N., Gallois V., Siqueira M., Seman M. and Ibañez O.M.** Resistance to melanoma metástases in mice selected for high acute inflammatory response. *Carcinogenesis* 2001. **22**: 337-342.
- 6 **Castoldi L., Golim M.A., Ribeiro Filho O.G., Romagnoli G.G., Ibañez O.C.M. and Kaneno R.** Enhanced natural killer activity and production of pro-inflammatory cytokines in mice selected for high acute inflammatory response (AIRmax). *Immunol.* 2006. **120**: 372-379.

- 7 Ribeiro O.G., Maria D.A., Adriouch S., Pechberty S., Cabrera W.H.K., Morisset J., Ibañez O.M. and Seman M.** Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. *J Leukoc Biol.* 2003. **74**: 497-506.
- 8 Biozzi G., Ribeiro O.G., Saran A., Araújo L.M., Maria D.A., De Franco M., Cabrera W.H., Sant'anna A.O., Massa S., Covelli V., Mouton D., Neveu T., Siqueira M. and Ibañez OM.** Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. *Carcinogenesis* 1998. **19**: 337-346.
- 9 Maria D.A., Manenti G., Galbiati F., Ribeiro O.G., Cabrera W.K., Barrera R.G., Pettinicchio A., De Franco M., Starobinas N., Siqueira M., Dragani T.A. and Ibañez O.M.** Pulmonary adenoma susceptibility 1 (Pas 1) locus affects inflammatory response. *Oncogene* 2003. **22**: 426-432.
- 10 Ribeiro O.G., Cabrera W.H., Maria D.A., De Franco M., Massa S., Di Pace R.F., Souza V.R.C., Starobinas N., Semen M. and Ibañez O.M.** Genetic selection for high acute inflammatory response confers resistance to lung carcinogenesis in the mouse. *Exp Lung Res.* 2005. **31**: 105-116.
- 11 Di Pace R.F., Massa S., Ribeiro O.G., Cabrera W.H.K., De Franco M., Starobinas N., Seman M. and Ibañez O.C.M.** Inverse genetic predisposition to colon versus lung carcinogenesis in mouse lines selected base don acute inflammatory responsiveness. *Carcinogenesis* 2006. **27**: 1517-1525.

- 12 Coussens L.M. and Werb Z.** Inflammation and cancer. *Nature* 2002. **420**: 860-867.
- 13 Balkwill F. and Mantovani A.** Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001. **357**: 539-545.
- 14 Raz A., Levine G. and Khomiak Y.** Acute local inflammation potentiates tumor growth in mice. *Cancer Letters* 2000. **148**: 115-120.
- 15 Malkinson A.M.** Role of inflammation in mouse lung tumorigenesis: a review. *Exp Lung Res.* 2005. **31**: 57-82.
- 16 Kupper T.S. and Fuhlbrigge R.C.** Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nature Rev Immunol.* 2004; **4**: 211-20.
- 17 Hussein M.R.** Tumour-infiltrating lymphocytes and melanoma tumorigenesis: an insight. *British J Dermatol.* 2005. **153**: 18-21.
- 18 Dranoff G.** Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Rev. Cancer* 2004. **4**: 11-22.
- 19 Belardelli F. and Ferrantini M.** Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends Immunol* 2002. **23**: 201-208.
- 20 Lázár-Molnár E., Hegyesi H., Tóth S. and Falus A.** Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 2000. **12**: 547-554.
- 21 Morelli J.G. and Norris D.A.** Influence of inflammatory mediators and cytokines on human melanocyte function. *J Invest Dermatol.* 1993. **100**: 191-195.

- 22 Costa M.M. and Águas A.P.** Inflammatory granulocytes decrease subcutaneous growth of melanoma in mice. *Inflammation* 2004. **28**: 355-357.
- 23 Nagai H., Hara I., Horikawa T., Oka M., Kamidono S. and Ichihashi M.** Gene transfer of secreted-type modified interleukin-18 gene to B16F10 melanoma cells suppresses in vivo tumor growth through inhibition of tumor vessel formation. *J Invest Dermatol.* 2002. **119**: 541-548.
- 24 Antony P.A. and Restifo N.P.** CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells, immunotherapy of cancer, and interleukin-2. *J Immunother.* 2005. **28**: 120-128.
- 25 Scheffold A., Hühn J. and Höfer T.** Regulation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell activity: it takes (IL-) two to tango. *Eur J Immunol.* 2005. **35**: 1336-1341.
- 26 Zou W.** Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Rev Immunol.* 2006. **6**: 295-307.
- 27 Boehmer H.V.** Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature Immunol.* 2005. **6**: 338-344.
- 28 Peters L.C., Jensen J.R., Borrego A., Cabrera W.H.K., Baker N., Starobinas N., Ribeiro O.G., Ibañez O.M. and De Franco M.** Slc11a1 (formerly NRAMP1) gene modulates both acute inflammatory reactions and pristane-induced arthritis in mice. *Genes and Immunity* 2007. **8**: 51-56.

- 29 Kawakami Y., Suzuki Y., Shofuda T., Kiniwa Y., Inozume T., Dan K., Sakurai T. and Fujita T.** T cell immune responses against melanoma and melanocytes in cancer and autoimmunity. *Pigment Cell Res.* 2000. **13**: 163-169.
- 30 Smyth M.J., Thia K.Y.T., Street S.E.A., Cretney E., Trapani J.A., Taniguchi M., Kawano T., Pelikan S.B., Crowe N.Y. and Godfrey D.I.** Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med.* 2000. **191**: 661-668.
- 31 Smyth M.J., Crowe N.Y., Hayakawa Y., Takeda K., Yagita H. and Godfrey D.** NKT cells - conductors of tumor immunity? *Curr Opin Immunol* 2002. **14**: 165-171.
- 32 Kawamura T., Takeda K., Mendiratta S.K., Kawamura H., Van Kaer L., Yagita H., Abo T. and Okumura K.** Critical role of NK1⁺ T cells in IL-12 induced immune responses in vivo. *J Immunol.* 1998. **160**: 16-19.
- 33 Herberman R.B., Hiserodt J., Vujanovic N., Balch C., Lotzová E., Bolhuis R., Golub S., Lanier L.L., Phillips J.H., Riccard C., Ritz J., Santoni A., Schmidt R.E., Uchida A.** Lymphokine-activated killer cell activity: Characteristics of effector cells and their progenitors in blood and spleen. *Immunol Today* 1987. **8**:178.
- 34 Trinchieri G.** Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol* 1989. **47**: 187-376.